

TESIS DOCTORAL

DANIEL LOPEZ RODRIGUEZ



**RECONOCIMIENTO DEL ANTIGENO HLA-B27 POR
LINFOCITOS T CITOTOXICOS. FACTORES QUE INFLUENCIAN
LA DIVERSIDAD DE LA RESPUESTA ALOGENICA.**

DIRECTOR: DR. JOSE ANTONIO LOPEZ DE CASTRO

**PROFESOR DE INVESTIGACION DEL C.S.I.C.
CENTRO DE BIOLOGIA MOLECULAR
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA
MADRID, 1994.**

A todos aquellos que confiaron en mí, y espero que todavía lo hagan, incluso en esos momentos en los que ni yo mismo era capaz de creerles.

Todo el mundo había podido observar (...) las interminables horas que él solía pasar sentado en el pretil del atrio (...) calculando el ángulo de la mirada de aquel cuervo situado en el pórtico izquierdo, dirigida hacia un punto misterioso en el interior de la iglesia donde, probablemente, estaría oculta la Piedra filosofal.

Victor Hugo

NUESTRA SEÑORA DE PARIS

1.- INTRODUCCION	1
1.1.- COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD HUMANO (HLA)	2
1.1.1.- ORGANIZACION GENICA	2
1.1.2.- ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL Y POLIMORFISMO DE LOS ANTIGENOS DE HISTOCOMPATIBILIDAD	5
1.1.2.1.- Antígenos de clase I	5
1.1.2.2.- Antígenos de clase II	7
1.1.2.3.- Polimorfismo de HLA	9
1.2.- PROCESAMIENTO ANTIGENICO	9
1.2.1.- SISTESIS Y EXPRESION DE ANTIGENOS DE CLASE I	10
1.2.2.- UNION DE PEPTIDOS A ANTIGENOS DE CLASE I	11
1.2.3.- PROCESAMIENTO Y TRANSPORTE DE PEPTIDOS	14
1.3.- RECONOCIMIENTO ESPECIFICO	14
1.3.1.- COMPLEJO RECEPTOR DEL LINFOCITO T (TCR) Y CD3. CO-RECEPTORES CD4 O CD8	14
1.3.2.- TRANSDUCCION DE LA SEÑAL DE RECONOCIMIENTO ESPECIFICO. MECANISMO DE LISIS	15
1.4.- ACTIVACION DE LINFOCITOS T	17
1.5.- RECONOCIMIENTO ALOGENICO	18
1.6.- HLA-B27: SUBTIPOS Y ASOCIACION A ESPONDILITIS ANQUILOSANTE	20
2.- OBJETIVOS	22
3.- MATERIALES Y METODOS	24
3.1.- CULTIVOS CELULARES	25
3.1.1.- LÍNEAS LINFOBLASTOIDES B (LCL) Y TRANSFECTANTES DE HLA-B27	25
3.1.1.1.- Mantenimiento	25

3.1.1.2.- Congelación y descongelación	25
3.1.2.- HIBRIDOMAS DE RATÓN Y ANTICUERPOS MONOCLONALES (ACM)	26
3.1.2.1.- Obtención de líquido ascítico	26
3.1.2.2.- Anticuerpos monoclonales	27
3.1.3.- TRANSFECTANTES MURINOS DE HLA-DR2DW2	27
3.2.- INTERLEUCINA 2 (IL-2)	28
3.2.1.- CUANTIFICACION	28
3.2.2.- CALCULO DE LAS UNIDADES ARBITRARIAS DE IL-2	29
3.3.- ENSAYOS DE DETECCIÓN DE MICOPLASMAS EN CULTIVOS CELULARES	29
3.4.- OBTENCION, EXPANSION, CULTIVO Y ENSAYOS DE CLONES CITOLITICOS DE CELULAS T	31
3.4.1.- OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE SUERO HUMANO	31
3.4.2.- AISLAMIENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA (PBMC)	32
3.4.3.- CONGELACIÓN Y DESCONGELACIÓN DE PBMC	32
3.4.4.- CULTIVO MIXTO DE LINFOCITOS (MLC)	32
3.4.5.- CLONAJE DE CELULAS T	33
3.4.6.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA DILUCIÓN LÍMITE	34
3.4.7.- EXPANSIÓN Y MANTENIMIENTO DE LOS CLONES DE LINFOCITOS T	34
3.4.8.- CONGELACIÓN Y DESCOGELACIÓN DE CLONES DE CELULAS T	34
3.4.9.- ENSAYO DE CITOTOXICIDAD POR LIBERACIÓN DE ⁵¹ Cr	35
3.4.9.1.- Células diana	35
3.4.9.2.- Células efectoras	35
3.4.9.3.- Ensayos de citotoxicidad directa	36
3.4.9.4.- Ensayos de competición con AcM	37
3.4.9.5.- Ensayos de competición con dianas frías	37
3.4.10.- DETERMINACIÓN DEL FENOTIPO DE LOS CLONES T CITOLÍTICOS	38

4.- RESULTADOS	39
4.1.- AISLAMIENTO DE CLONES CITOLITICOS ESPECÍFICOS ANTI-HLA-B*2705.	
CLONAJE DE CTL	40
4.2.- CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DE LOS CLONES ESTADÍSTICOS	42
4.3.- DETERMINACIÓN DE LOS PATRONES DE REACCIÓN.	42
4.4.- CARACTERIZACION FENOTIPICA DE CTL ANTI-B*2705	43
4.5.- PATRONES DE REACCIÓN CLONALES	44
4.5.1.- GRUPO I	44
4.5.2.- GRUPO II	49
4.5.3.- GRUPO III	51
4.5.4.- GRUPO IV	54
4.5.5.- GRUPO V	60
4.5.6.- GRUPO VI	64
4.5.7.- GRUPO VII	66
4.5.8.- GRUPO VIII	69
4.5.9.- GRUPO IX	74
4.5.10.- GRUPO X	75
4.5.11.- GRUPO XI	79
4.5.12.- GRUPO XII	82
4.5.13.- GRUPO XIII	84
4.5.14.- GRUPO XIV	88
4.5.15.- GRUPO XV	91
4.5.16.- GRUPO XVI	97
4.5.17.- GRUPO XVII	99
4.5.18.- GRUPO XVIII	101
4.6.- EPITOPOS DE CELULAS T COMPARTIDOS POR LOS SUBTIPOS DE HLA-B27	118
4.7.- REACTIVIDAD CON OTROS ANTIGENOS HLA	120

4.8.- DIVERSIDAD Y FRECUENCIA DE LOS PATRONES DE REACCIÓN DE LOS CLONES ALOREACTIVOS ANTI-B*2705	122
4.9.- RECONOCIMIENTO ALOGENICO DE LA LINEA CELULAR NW, CON ANOMALIAS EN LA PRESENTACION DE ANTIGENO POR HLA-B27	125
4.10.- ANALISIS ESTRUCTURAL DE LAS CADENAS α Y β DE LOS TCR DE CLONES ALOREACTIVOS ANTI-HLA-B27	127
5.- DISCUSION	131
5.1.- LISIS DIFERENCIAL ENTRE LOS SUBTIPOS B*2704 Y B*2706	132
5.2.- RECONOCIMIENTO ALOGENICO DE LA LINEA CELULAR NW	135
5.3.- SIMILITUD DESETOPICA ASOCIADA A PRESENTACION PEPTIDICA ENTRE HLA-B27 Y HLA-DR2	135
5.4.- REACTIVIDAD CRUZADA CON ANTIGENOS DE LA FAMILIA DE HLA-B40	141
5.5.- RELACION ESTRUCTURA-FUNCION EN LA RESPUESTA CITOLITICA ANTI-HLA-B27	144
5.6.- DISCUSION GENERAL	145
6.- CONCLUSIONES	150
7.- BIBLIOGRAFIA	153

ABREVIATURAS

AcM	Anticuerpo monoclonal
β_2m	Beta-2-microglobulina
CTL	Linfocito T Citolítico
EA	Espondilitis Anquilosante
EBV	Virus de Epstein-Barr
E:D	Relación Efector:Diana
FCS	Suero de Ternera Fetal
Glc	Glucosa
HLA	Complejo Principal de Histocompatibilidad Humano
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Presión
Ig	Inmunoglobulina
IL-2	Interleucina-2
KD	Kilodalton
LCL	Línea linfoblastoide
MHC	Complejo Principal de Histocompatibilidad
MLC	Cultivo Mixto de Linfocitos
NacGlc	N-Acetil-Glucosamina
pb	Pares de Bases
PBMC	Células Mononucleares de Sangre Periférica
RE	Retículo Endoplásmico
TCR	Receptor de la Célula T

1.- INTRODUCCION

1.1.- COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD HUMANO (HLA).

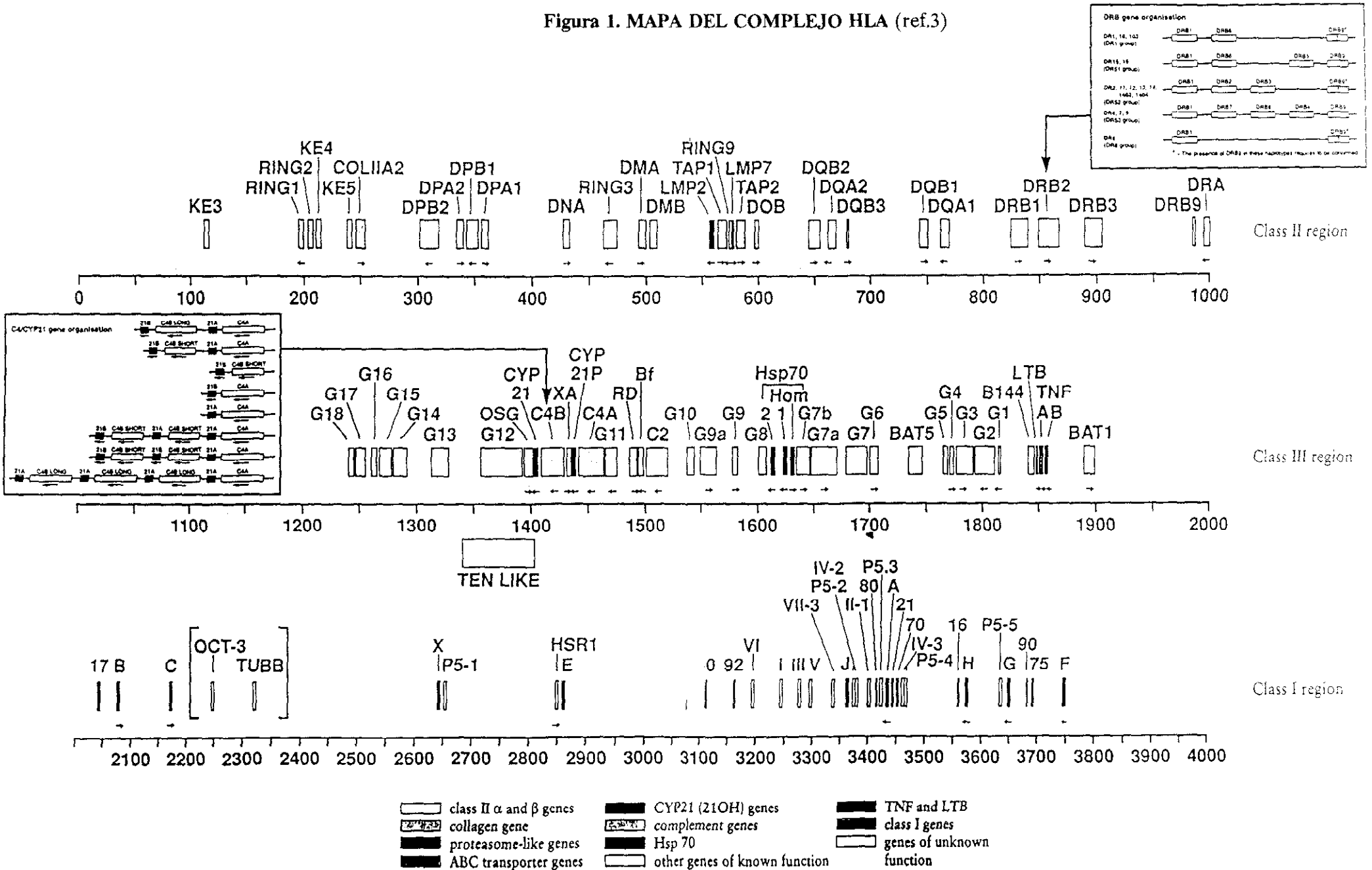
1.1.1.- ORGANIZACION GENICA

El MHC humano es una región génica localizada en el brazo corto del cromosoma 6 denominada 6p21.3, que abarca aproximadamente unos cuatro millones de pares de bases siendo además una de las regiones más polimórficas y también más estudiadas del genoma humano. Se halla en una posición telomérica con respecto al gen de la glioxilasa. Consta de al menos 70 genes conocidos (1-3) que han sido agrupados en tres regiones tanto desde el punto de vista estructural como funcional: la región más centromérica se ha denominado región de clase II, a continuación están los genes de clase III y en la posición más telomérica se encuentran los genes de clase I (Fig.1). Más recientemente se han descrito nuevos genes en estas regiones cuyas secuencias o funciones, en los casos que han podido ser determinadas, son diferentes de los genes descritos inicialmente en dichas regiones.

* La región de clase I consta de unos 2Mpb repartidos aproximadamente en unos 17 genes (4), de los cuales HLA-A, -B y -C son los más importantes porque codifican para proteínas expresadas en la superficie de todas las células nucleadas (5). Estos productos son altamente polimórficos y funcionan como elementos presentadores de antígeno a células T citotóxicas (6). También se han definido otros loci no clásicos entre los que destacan HLA-E, -F y -G que se expresan en algunas estirpes celulares, presentan un polimorfismo muy restringido y su funcionalidad no ha sido definida claramente. En esta región también se encuentran algunos pseudogenes de clase I como HLA-H y -J entre otros. Además se ha demostrado que la estructura general de todos estos genes es similar.

* La región de clase II, tiene aproximadamente 1Mpb de tamaño, y consta de al menos 6 genes de cadenas α y alrededor de 10 genes de cadenas β , subdividida en varias subregiones. Las subregiones clásicas de clase II son HLA-DP, -DQ y -DR, alineadas desde el centrómero, y constan cada una de ellas de un gen α , monomórfico para cada subregión, y entre uno (HLA-DP y -DQ) y dos (HLA-DR) genes β expresables altamente polimórficos. Además existen varios pseudogenes α y β definidos en cada una de estas subregiones, así como algunos genes HLA-DQ α y β (DQA2, B2 y B3) cuya posible expresión no está todavía determinada. La subregión DR es la única definida en clase II cuyo número

Figura 1. MAPA DEL COMPLEJO HLA (ref.3)



The exact locations of OCT-3 and TUBB have not yet been established.

de genes varía según el haplotipo individual. También existen algunos otros genes de clase II denominados HLA-DM, -DN y -DO que presentan muy bajo polimorfismo, el cual no se ubica en el sitio de unión antigénica y cuya función y posible expresión en membrana están todavía sin determinar. Además en esta región también codifican algunos genes, no relacionados directamente con los antígenos de clase II, como son el gen del colágeno, transportadores del sistema ABC o genes de proteosomas entre otros.

* La región de clase III, de aproximadamente 1,1Mpb, consta de una amplia colección de genes, que no están relacionados ni estructural ni funcionalmente con los anteriores, y que codifican para proteínas tan dispares como son algunos de los componentes del sistema del complemento (C4, C2 y factor B), proteínas de choque térmico (Hps70), factor de necrosis tumoral (TNF), 21-hidroxilasa, valil-tRNA sintetasa y varios genes de función desconocida (BAT1-5, G1-18, etc.).

Los antígenos de histocompatibilidad forman parte de la superfamilia de las inmunoglobulinas (7), cuyos miembros presentan como principal característica en común la localización de las cadenas ligera y pesada en cromosomas distintos, la estructura semejante en dominios variables y constantes y la alta homología entre los dominios constantes de todos ellos. Estos presentan una estructura básica muy conservada, lo que sugiere un origen evolutivo común (8). Así mismo, la mayoría de sus miembros intervienen de diversas formas en procesos de reconocimiento específico. Este grupo incluye: inmunoglobulinas, cadena α de HLA-clase I y β 2-microglobulina, cadenas α y β de los antígenos de clase II, cadena pesada de CD1a (antígeno asociado a β ₂m), cadenas (α , β , γ y δ) del receptor del linfocito T, receptor encargado del transporte de ciertas Igs a través de la mucosa intestinal (polyIgR), receptor de macrófagos que une IgG agregada (Fc 2b/1R), CD4 y CD8, marcador de linfocitos activados (CTLA-4), CD28, B7, algunas moléculas localizadas en el tejido cerebral como N-CAM, NP3 y MAG, CD3, moléculas de adhesión celular como CD2 y LFA-3, Thy-1, OX-2, antígeno carcinoembrionario (CEA), receptor del factor 1 estimulador de colonias (CSF1R), receptor para PDGF, α ₁B-glicoproteína y proteína que une basamentos membranosos.

1.1.2.- ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL Y POLIMORFISMO DE LOS ANTIGENOS DE HISTOCOMPATIBILIDAD.

Actualmente se ha podido determinar la estructural cristalográfica de varios antígenos de clase I: HLA-A2 (9-11), -Aw68 (12), -B27 (13,14) y H-2K^b (15,16) y también la de un antígeno de clase II (HLA-DR1) (17) lo que ha permitido profundizar el conocimiento de las características estructurales y funcionales del sistema HLA.

1.1.2.1.- Antígenos de clase I.

Los antígenos de clase I son heterodímeros de una cadena pesada (α) polimórfica y glicosilada en su posición N86, de aproximadamente 44KD (18) y de β_2m , que es una cadena monomórfica de unos 12 KD (18) codificada en el cromosoma 15 (19) unidas no covalentemente. Presentan una región extracelular de 281 residuos formada por cuatro dominios (Fig.2): en la porción más proximal a la membrana el dominio α_3 de la cadena pesada interacciona con la β_2m , que consta a su vez de 99 residuos. Ambas estructuras se encuentran plegadas de forma muy similar a los dominios constantes de las inmunoglobulinas, formando cada una de ellas dos láminas β antiparalelas de 4 y 3 cadenas respectivamente, que se relacionan mediante un eje de rotación de 146° . Entre ambas láminas existe un puente disulfuro que las conecta. La β_2m se encuentra además desplazada, hacia el extremo más distal de la membrana, sobre el eje de rotación unos 13Å. Por ello, la β_2m interacciona fuertemente con los dominios α_1 y α_2 jugando un papel importante en la estabilización del plegamiento de la cadena pesada. El extremo más distal a la membrana está formado por los dominios α_1 y α_2 que conforman una estructura común dividida aproximadamente por un plano de simetría binario. Cada dominio presenta un lámina β formada por 4 cadenas β antiparalelas que se continúa con una región helicoidal, que en caso de α_1 consta de dos hélices α y en α_2 de tres, transversal al eje de la lámina y que se encuentra curvada formando un puente respecto a la lámina. El extremo C-terminal de la última hélice α del dominio α_2 conecta con una cadena β del dominio α_3 . Además el dominio α_2 presenta un puente disulfuro entre las Cys 104 y 164.

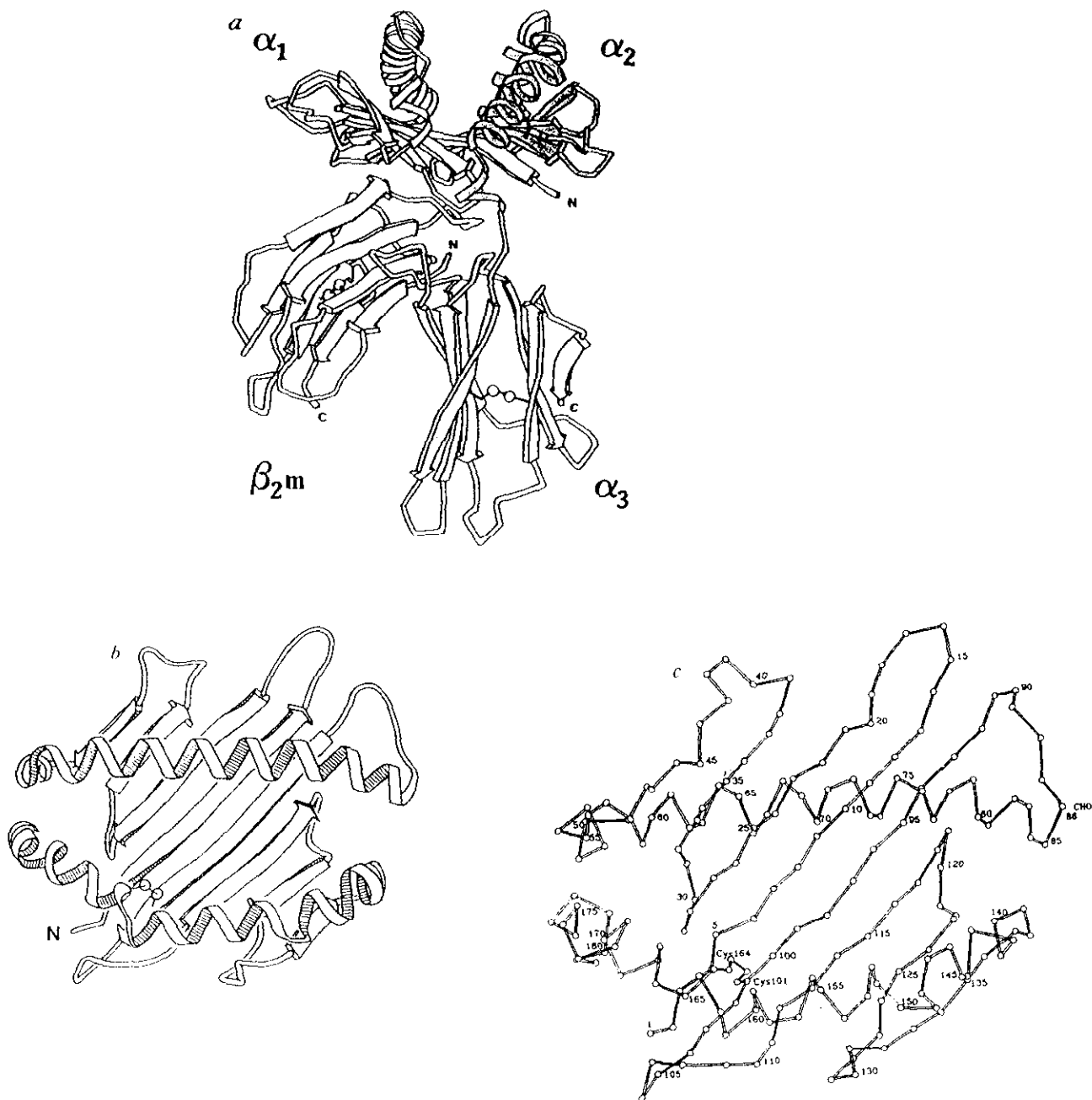


Figura 2. a) Representación esquemática de la estructura tridimensional de la porción extracelular de HLA-A2. b) Representación del sitio de unión del antígeno formado por los dominios α_1 y α_2 . c) Esqueleto de carbonos α del sitio de unión antigénico con las respectivas posiciones (referencias 9 y 10).

El conjunto de ambos dominios forma una estructura única de 8 cadenas β que definen una única lámina β en cuyos extremos se encuentran dos grandes regiones helicoidales transversales que conforman una amplio surco de unos 25x10A que es el sitio de unión de péptido. Esta cavidad central se estructura a su vez en varias subcavidades entre la lámina β y las regiones helicoidales, donde pueden alojarse las cadenas laterales de los péptidos antigénicos presentados en la cavidad principal. La estructura de estas subcavidades está formada por las cadenas laterales de los residuos de la molécula de clase I. Su configuración y polaridad están, por tanto, moduladas por el polimorfismo de HLA. A continuación de la región extracelular existe una región transmembrana hidrofóbica que comprende los residuos 282-306 y que probablemente está plegada en estructura helicoidal. Esta se continúa con una porción intracelular (residuos 307 al 337, la mayoría de los cuales son hidrofílicos) que corresponde al extremo C-terminal de la cadena pesada. Esta región puede fosforilarse "in vivo" e "in vitro" (20-22), e interaccionar con distintas proteínas del citoesqueleto (23,24).

La resolución de los antígenos de clase I hasta ahora determinados cristalográficamente ha demostrado una total conservación de la estructural general antes mencionada, concentrándose las diferencias entre los distintos antígenos en la estructura de las cavidades secundarias, lo que permite a estos antígenos unir grupos de péptidos distintos debido a la particular disposición tanto en tamaño como en carga de estas subcavidades.

1.1.2.2.- Antígenos de clase II.

Son heterodímeros $\alpha\beta$ glicosilados de aproximadamente 34 y 28KD (25) respectivamente que se expresan constitutivamente en ciertas estirpes celulares como linfocitos B, macrófagos, linfocitos T activados, células dendríticas, etc (26) y de forma inducible en otras células. Recientemente (17) se ha determinado la estructura cristalográfica de HLA-DR1, donde se observa que la disposición general de la misma es muy similar a la descrita para los antígenos de clase I, aun cuando la disposición de cadenas entre ambos grupos de antígenos es muy diferente. Como se observa en el diagrama de superposición (Fig.3) de las estructuras cristalográficas de HLA-A2 y HLA-DR1, existe un sorprendente alto grado de homología estructural, sobre todo teniendo en cuenta que las diferencias

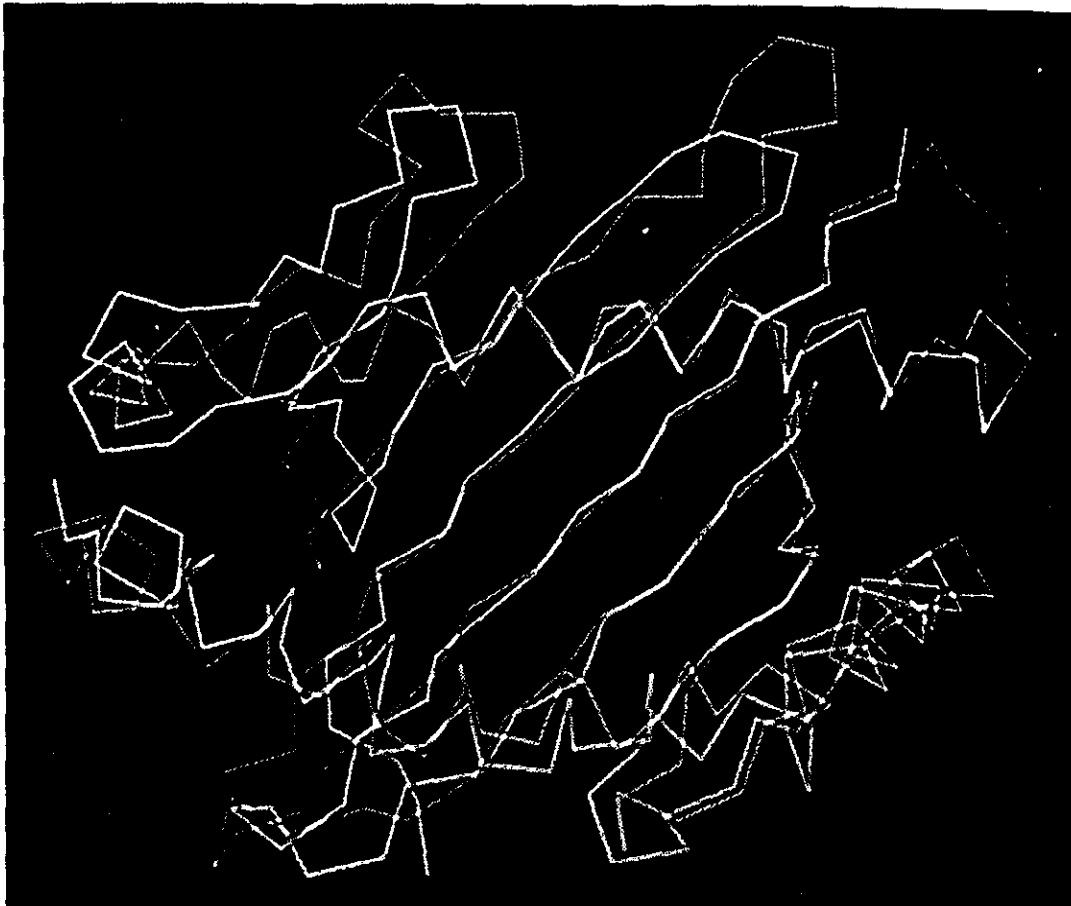


Figura 3. Diagrama de superposición de las estructuras cristalográficas de los dominios α_1 y α_2 del antígeno de clase I HLA-A2 (línea discontinua) y de los dominios α_1 y B_1 del antígeno de clase II HLA-DR1 (línea continua) (referencia 17).

entre ambos antígenos son aproximadamente entre 150-160 residuos del total de 180 aminoácidos de los que constan los dominios α_1 y α_2 de clase I y α_1 y β_1 de clase II.

Las principales diferencias con los antígenos de clase I se encuentran en los extremos de la cavidad definida por la lámina β y las dos zonas helicoidales. En HLA-DR1 ambos extremos se encuentran abiertos de tal forma que permiten el alojamiento de péptidos mucho mayores (de hasta 24 residuos) que los que habitualmente se unen a antígenos de clase I (alrededor de 9 residuos). También la composición y distribución de las cavidades secundarias es completamente distinta en HLA-DR1 donde destaca una subcavidad conservada en los antígenos HLA-DR que se ubica en una región equivalente a la subcavidad B de las moléculas de clase I que une residuos no polares por lo que la composición de los distintos péptidos unidos a antígenos de clase II (27,28) es bastante diferente a la encontrada con antígenos de clase I.

1.1.2.3.- Polimorfismo de HLA

La principal característica de los antígenos de histocompatibilidad es su elevado polimorfismo (29) encontrándose que la mayoría de las posiciones polimórficas se localizan en zonas concretas de los dominios α_1 y α_2 que determinan la estructura del sitio de unión antigénico, e interaccionan con el péptido antigénico y/o con el TCR. Muchas de las cadenas laterales de los residuos polimórficos intervienen en la especificidad de las cavidades secundarias donde se alojan las cadenas laterales de los péptidos unidos a HLA. Por tanto, el polimorfismo de HLA implica una modulación de la especificidad de los péptidos unidos a la molécula de histocompatibilidad junto con una variación de la interacción con el TCR.

El dominio α_3 es mucho menos polimórfico que los anteriores, asociándose algunos de estos cambios con la capacidad de interacción con la molécula CD8 (30).

1.2.- PROCESAMIENTO ANTIGENICO

El receptor $\alpha\beta$ de la célula T reconoce péptidos en asociación con los antígenos de

histocompatibilidad de clase I o de clase II. Dichos péptidos son el resultado del procesamiento intracelular de proteínas. La asociación entre los distintos péptidos y las moléculas de MHC estabiliza la estructura final que es transportada y expresada en membrana plasmática.

1.2.1.- SISTEMAS Y EXPRESION DE ANTIGENOS HLA DE CLASE I.

Tanto la cadena α como la β_2m se sintetizan en los ribosomas adosados a la membrana externa del retículo endoplásmico (RE), proceso durante el cual se produce la glicosilación inicial de la cadena pesada. Así, en la pared del RE existe un lípido denominado dolicol difosfato, que lleva unido un oligosacárido de 14 azúcares rico en manosa (contiene en total 2 NacGlc, 9 manosas y 3 Glc), y la enzima oligosacaridiltransferasa, que reconoce la secuencia canónica de glicosilación Asn-X-Ser. En los antígenos HLA de clase I ésta se encuentra en las posiciones 86-88, formando parte de un giro β del dominio α_1 . Dicha enzima se encarga de transferir este carbohidrato a la Asn86 mediante la formación de un enlace N-glicosídico (31). Ello es posible gracias a la existencia de un puente de hidrógeno entre Asn y Ser que aumenta la nucleofilia del par electrónico del grupo amida de la Asn, facilitándose la reactividad del grupo glicosídico donante. Una vez sintetizadas las cadenas, estas penetran en el RE, donde la cadena α se asocia a una chaperonina dependiente de Ca^{2+} , denominada p88 (32-34) que también se asocia a otras muchas proteínas en su paso por el RE como, por ejemplo, receptores para inmunoglobulinas y TCR (34). Posteriormente la β_2m se asocia con dicho complejo α -p88 aunque la disociación de la proteína p88 no se produce inmediatamente (32). En el RE se eliminan 3Glc y 1 manosa del carbohidrato. También puede ocurrir que parte de las moléculas α no se asocien con la β_2m y puedan posteriormente expresarse en superficie (35,36) lo que sugiere, un posible mecanismo alternativo tanto de plegamiento como de transporte a membrana. La proteína p88 se libera del complejo trimolecular en el propio RE (32) cuando se ha estabilizado la unión del péptido al conjunto α - β_2m , siendo el complejo cadena pesada- β_2m -péptido transportado al aparato de Golgi (32) donde se eliminan la mayoría de los restos de manosa y se incorporan NacGlc, galactosa y ácido siálico debido a la acción de distintas transferasas específicas, apareciendo la forma definitiva que se expresa en membrana (37). Se cree que el carbohidrato no es requerido para mantener la

conformación funcional necesaria de la molécula HLA, y que tampoco interacciona con el TCR o con cualesquiera de las otras moléculas accesorias que intervienen en el reconocimiento celular (38), aunque si se ha observado que, por ejemplo, los niveles de ácido siálico en la superficie celular son importantes en las fases de diferenciación y migración de los linfocitos T (39).

La β_2m al incorporarse a la cadena α permite la adopción de una conformación estable (40), transporte intracelular (41), procesos finales de glicosilación (42) y expresión en superficie (43) de la molécula HLA, por lo que su ausencia implica normalmente una cadena α rica en manosas que no se suele expresar en membrana.

1.2.2.- UNION DE PEPTIDOS A ANTIGENOS DE CLASE I

El polimorfismo de los antígenos de histocompatibilidad está íntimamente relacionado con la capacidad diferencial de unión a péptidos, como ha demostrado la determinación de las secuencias de péptidos eluidos de distintos antígenos de clase I (44-46) junto con la resolución cristalográfica de los mismos (9-16). En todos los casos estudiados se ha descrito que los péptidos unidos a moléculas de clase I presentan una longitud mayoritaria en torno a los 8-11 residuos, siendo los péptidos de 9 aminoácidos los más comunes. La Tabla 1 resume las características que presentan los conjuntos de péptidos unidos a varias moléculas de clase I humanas y de ratón. En ella se resalta que la mayoría de los antígenos estudiados presentan motivos conservados en la posición P2 y que dichos motivos son distintos para antígenos diferentes: HLA-A2 une L mientras que -B27 une R. Analogías parecidas pueden establecerse en clase I murino: K^d une en P2 residuos de Y mientras que K^k lo sustituye por E. Dichos motivos conservados pueden aparecer en otras posiciones en algunos antígenos. La naturaleza de los motivos peptídicos conservados se correlaciona con la estructura de cavidades secundarias determinadas en cada antígeno de clase I.

Además antígenos muy similares como A*0201 y A*0205, que presentan únicamente cuatro diferencias: Y9, R43, L95 y W156, son capaces de unir grupos de péptidos que presentan motivos conservados diferentes: A*0201 une principalmente péptidos con L en P2 y V en P9 mientras que A*0205 une péptidos con L en P9 mayoritariamente, presentando además distintas combinaciones de

residuos frecuentes. Consideraciones análogas se pueden extraer de la comparación de motivos péptidicos entre H-2K^k y H-2K^{km1} en el sistema murino (Tabla 1) o con los subtipos B*2705 y B*2702 en humano. Un estudio reciente (53) ha demostrado que la sustitución de la subcavidad B (6 residuos) de HLA-B*2705 por los residuos correspondientes de HLA-A*0201 induce el cambio en el motivo P2 de R por L (Tabla 1) lo que implica una alteración drástica del conjunto de péptidos presentados por la molécula mutante con respecto a HLA-B*2705 y ello conlleva la completa destrucción del reconocimiento allogénico y restringido.

Tabla 1

ANTIGENO	RESIDUO	POSICION									REFERENCIA
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	
H-2K ^d	Predominante		Y							L/I	44
	Frecuente			N	P	M	K	T			
H-2D ^b	Predominante					N				M	44
	Frecuente		M	I	K		L			J	
H-2K ^b	Predominante					F/Y			L	44	
	Frecuente			Y					M		
H-2K ^k	Predominante		E						I	45	
	Frecuente			K/N							
H-2K ^{km1}	Predominante								I	45	
	Frecuente		E	K							
HLA-A*0201	Predominante		L							V	44,46
	Frecuente		M	E/K	V	K					
HLA-A*0205	Predominante									L	47
	Frecuente		V	Y	G	V	I		K		
			L	P	E	Y					
			I	F	D	L					
HLA-B*2705	Predominante		R							L/F	48
	Frecuente										
HLA-B*2702	Predominante		R							F/Y	49
HLA-B*3501	Predominante		P								50
HLA-B*3701	Predominante		D			V					50
	Frecuente							F/M	I/L		
HLA-B7	Predominante		P								51
	Frecuente	A		R							
HLA-B8	Predominante			R/K		R/K				L/I	52

1.2.3.- PROCESAMIENTO Y TRANSPORTE DE PEPTIDOS

El mecanismo de procesamiento peptídico y su posterior unión a MHC no está totalmente definido aunque parece claro que la degradación de la mayoría de las proteínas celulares comienza con su conjugación, de forma covalente, con una proteína denominada ubiquitina (54) y que posteriormente los péptidos se generan por acción de diversas endopeptidasas con distintas especificidades (55-67)(C-terminal, residuos hidrofóbicos o residuos cargados) en forma de nonámeros ya procesados, o de péptidos de mayor tamaño (68), en el citosol dentro de complejos macromoleculares denominados proteosomas (69). Los fragmentos así originados son transportados al RE por los transportadores de péptidos denominados TAP (58,63) que presentan polimorfismo alélico. Estas proteínas presentan una gran homología con las integrantes de la familia de los transportadores de membrana ABC y son dependientes de ATP. Pueden poseer cierta especificidad, ya sea de tamaño o de motivos C-terminales, aunque determinados péptidos pueden traspasar la membrana de los microsomas sin requerimientos energéticos (70,71). Los nonámeros ya procesados o los precursores peptídicos llegarían al RE donde se ensamblan con la cadena α y la β_2m de los antígenos de clase I posibilitando su estabilización, transporte y expresión en superficie y además los precursores sufrirían un proceso de "recorte" mediante la acción de diversas enzimas que los transforman en nonámeros (66).

1.3.- RECONOCIMIENTO ESPECIFICO

1.3.1.- COMPLEJO RECEPTOR DEL LINFOCITO T (TCR) Y CD3. CO-RECEPTORES CD4 O CD8.

La capacidad que posee el linfocito T de reconocer antígenos virales en el contexto de los antígenos de histocompatibilidad propios (72) está ligada a la existencia y expresión en membrana del TCR (73). Este consta de dos cadenas glicoproteicas altamente polimórficas, unidas covalentemente en pares $\alpha\beta$ ó $\gamma\delta$, que se asocian de forma no covalente con el complejo invariante CD3 (74,75) formado a su vez por 5 cadenas (γ , δ , ϵ , ζ y η donde ζ puede formar homodímeros y las dos últimas heterodímeros siempre en baja proporción). De los dos posibles complejos de receptor, el denominado

$\alpha\beta$, es el mayoritario en células T, representando aproximadamente el 95% del total en humanos (76,77). Es el responsable del reconocimiento restringido, mientras que el papel funcional del receptor $\gamma\delta$ no está clarificado si bien existen evidencias de su implicación en algunas infecciones virales respiratorias (78). Para una transmisión eficiente de las señales de activación es necesaria la acción de los coreceptores CD4 ó CD8 que son glicoproteínas de membrana (79,80). CD4 se expresa habitualmente en los linfocito T cooperadores e interacciona con los dominios constantes de la molécula de HLA clase II. CD8 se expresa generalmente en los linfocitos T citolíticos e interacciona con el dominio α_3 de HLA clase I. Su acoplamiento al TCR provoca una amplificación de la señal de transducción del orden de unas 30-300 veces (81). De los cuatro dominios que conforman la estructura de CD4, se han cristalografiado los dos más distales a la membrana (82,83). Estos dos dominios de CD4 mantienen la estructura de láminas β antiparalelas enfrentadas ya descrita en otros miembros de la superfamilia de las Igs. El dominio más N-terminal presenta un par de cadenas β extra enfrentadas que es donde se producen los principales contactos con los dominios constantes de HLA clase II (82-84). CD8 consta de dos cadenas (α y β) que presentan en su extremo N-terminal un dominio similar a las regiones constantes de las Igs que en el caso de la cadena α (114 residuos) ha podido ser cristalizado (85) y que interacciona con la molécula de clase I a través de tres bucles intercadena β , seguido de otro dominio de menor tamaño y de estructura desconocida que presenta Cys que permiten la formación de homodímeros ($\alpha\alpha$) y heterodímeros ($\alpha\beta$). El homodímero se expresa en linfocitos T $\gamma\delta$ y células NK mientras que tanto el homodímero como el heterodímero están presentes en la superficie de los linfocitos T $\alpha\beta$. En el proceso de activación de linfocitos T, los co-receptores CD4 y CD8 están asociados físicamente al complejo TCR (86,87). Además también es necesaria la presencia de tirosin-quinasa p56^{lck} (88-90) asociadas a CD4/CD8 y de CD45 (tirosin-fosfatasa de transmembrana) (91) que presenta distintas isoformas que son el resultado de diferentes combinaciones de los exones intermedios conformando un ectodominio variable, y se expresa en todas las células con origen hematopoyético.

1.3.2.- TRANSDUCCION DE LA SEÑAL DE RECONOCIMIENTO ESPECIFICO. MECANISMO DE LISIS.

La eliminación de células infectadas se inicia con la interacción del TCR con el complejo

formado por la molécula de clase I más péptido. Esto conlleva la destrucción de la célula infectada mediante un mecanismo de lisis unidireccional (92). Este mecanismo se inicia cuando diversas subunidades del complejo CD3 (γ , δ , ϵ) (93) se fosforilan y transducen señales al citoplasma, que pueden cuantificarse como aumento de Ca^{2+} intracelular, flujo de K^+ , activación de la ruta de los fosfatidil-inositoles y activación de la proteína-quinasa C. Posteriormente ocurre una reorientación y polarización del aparato de Golgi y del centro organizador de los microtúbulos de la célula efectora, concentrándose una serie de gránulos citolíticos o granulosomas en la parte del citosol más próxima a la célula diana. Estos granulosomas (94,95) constan de un núcleo denso rodeado de una área periférica. Contienen numerosos cuerpos vesiculares con proteoglicanos, perforinas y granzimas (D, E y F) y presentan propiedades secretoras y lisosómicas (93-99). Esto es, poseen un pH ácido y están rodeados de la proteína de membrana asociada a lisosomas (LAMP) o el receptor para manosa-6-fosfato que permite su tránsito por la vía endocítica/endosómica hacia la membrana plasmática (98), desde donde se liberan al medio intracelular las distintas proteínas. Se ha propuesto que estos orgánulos presentan, asociados a su membrana, moléculas de TCR que permitirían una interacción del orgánulo con la molécula de HLA de la célula diana liberándose posteriormente la carga enzimática directamente sobre la membrana de la misma.

Las perforinas (101-106) o proteínas formadoras de poro son glicoproteínas de 60KD de glicosilación heterogénea, estructural y evolutivamente relacionadas con la proteína C9 del sistema del complemento (107,108). Presentan un dominio central responsable de la polimerización y de la formación de canales transmembrana y probablemente el extremo C-terminal presenta una zona de inserción en membrana. Las perforinas se insertan y polimerizan de forma irreversible en forma de agregados de numerosos tamaños sobre la membrana de la célula diana, mediante un mecanismo similar al que presenta C9 en su interacción con C5b-8 (109) que implica un cambio conformacional en ellas. Se ha postulado que durante este cambio queda expuesto un dominio hidrofóbico, que inicialmente estaba protegido, y que es capaz de insertarse en la membrana de la diana. Así, moléculas de perforina mono y dimericas forman complejos estables transmembrana funcionales, detectables morfológicamente por microscopía electrónica (110) y que causan en la célula diana un choque osmótico con pérdida de material citoplásmico (111,112).

Los linfocitos T efectores son resistentes a este proceso (113,114) ya que poseen una proteína asociada a membrana denominada factor de restricción homólogo ó HFR68 que los protege frente a

la acción de las perforinas (115,116). Aunque su mecanismo de acción no está bien definido se supone que dichas proteínas pueden formar rápidamente complejos con los monómeros de perforina en el propio plano de la bicapa lipídica antes de la formación del poro.

Acompañando a los procesos de ruptura de la membrana plasmática y pérdida de material celular aparecen también fenómenos de degradación y liberación de DNA nuclear (117) que no parecen estar asociados a la formación de poros en la membrana. El proceso de degradación de material genético está asociado a incrementos de Ca^{2+} (118) y a la presencia de lisosomas ácidos (119) y, aunque el mecanismo concreto no está bien estudiado, parece implicar un desencadenamiento de apoptosis.

1.4.- ACTIVACION DE LINFOCITOS T

El proceso de activación de las células T implica la interacción específica del TCR con la molécula de histocompatibilidad más péptido(s) inmunogénico. Las distintas moléculas de adhesión caracterizadas tanto en la célula efectora (120,121) como en la diana (122-125) contribuyen a estabilizar la mencionada interacción. Esta unión implica la transducción de señales mediadas por el complejo CD3 que, a través de una serie de segundos mensajeros, producen la activación de los genes de la IL-2 y de su receptor específico. La posterior interacción entre la IL-2 y su receptor (126) induce un conjunto complejo y parcialmente desconocido de señales de transducción que conlleva la proliferación de las células T (127).

La IL-2 es una glicoproteína de unos 16KD (126) que además de promover el crecimiento y diferenciación de linfocito T está implicada en múltiples procesos biológicos de activación como son: crecimiento y diferenciación de células B (128), generación de células citolíticas activadas por linfoquinas (células LAK) (129), potenciación de la actividad NK (130), proliferación y maduración de células oligodendrogliales (131), apoptosis de células T (132) y reversión de la anergia clonal de células T (133).

La IL-2 posee un receptor específico formado al menos por 3 cadenas denominadas α , β y γ de 55, 75 y 64KD respectivamente (134) que pueden coexpresarse generando receptores de alta (α , β y γ), media (β y γ) y baja (α) afinidad. Este último puede unir IL-2 (135,136) aunque no es funcional con respecto a la internalización y transmisión de la señal específica (137,138). La cadena β presenta

la mayor región citoplásmica de las tres cadenas del receptor aunque no contiene ningún motivo catalítico como puede ser la secuencia consenso de tirosina-quinasa (139). Únicamente la coexpresión de las cadenas β y γ es capaz de generar señales mitóticas. Existe evidencia de que estas tres cadenas pueden estar asociadas a otras subunidades de naturaleza y función todavía desconocidas (140,141). Estudios con mutantes de la región citoplásmica de la cadena β (142) han determinado que existen dos regiones distintas implicadas en la asociación con la proteína $p56^{lck}$ (región rica en residuos ácidos) y en el crecimiento celular (región rica en Ser) aunque ambas son necesarias para la activación de la tirosina-quinasa $p56^{lck}$ (143-147), asociada al receptor de IL-2 (148,149), por un mecanismo que se supone similar al de la transducción de señal mediado por TCR y CD4/CD8.

1.5.- RECONOCIMIENTO ALOGÉNICO

Históricamente el reconocimiento alógeno (150) se definió "in vivo" mediante experimentos de rechazo frente a injertos, e "in vitro" con ensayos de cultivo mixto de linfocitos. Estudios posteriores (151-155) demostraron que existía una alta frecuencia de precursores de células T que son capaces de responder a un determinado aloantígeno (entre el 1 y el 10%) en contraste con la frecuencia obtenida en respuestas restringidas, donde los resultados eran de dos órdenes de magnitud inferiores. Para explicar estas diferencias se propuso inicialmente (156,157) que el repertorio de TCR se seleccionó evolutivamente de forma que cada molécula de MHC tuviera su TCR complementario. Después este repertorio derivaría, por mutación somática, hacia el reconocimiento específico de moléculas propias. Esta teoría implicaría que los repertorios usados en los reconocimientos restringido y aloespecífico están separados y no existiría implicación peptídica en el epítipo reconocido por los TCR aloespecíficos.

Actualmente la hipótesis aceptada consiste en suponer que un determinado receptor reconoce un epítipo que comprende parte de la molécula HLA más un péptido (158). Así, en el reconocimiento restringido el antígeno HLA sería propio y el péptido tendría un origen exógeno (viral, etc.), mientras que en el reconocimiento alógeno el péptido sería endógeno y el antígeno HLA alógeno. La cantidad de posibles complejos aloantígeno + péptido endógeno es muy alta. Así, una célula normal expresa $1-2 \times 10^5$ moléculas de clase I de una especificidad dada y, suponiendo que la cantidad de péptido expresado por término medio es de 200 copias, se estarían expresando normalmente entre 500-

1000 péptidos distintos/célula (159). En realidad las cantidades relativas de cada uno de ellos podrían variar entre el 5-10% del total de moléculas de clase I en el caso de péptidos mayoritarios (160) y varios órdenes de magnitud menores con los más minoritarios. Esto explicaría la mayor frecuencia de linfocitos T aloespecíficos frente a los que reconocen antígenos propios + péptidos virales. Así mismo, implicaría que los repertorios de ambos sistemas serían solapantes en la medida que un conjunto aloantígeno + péptido endógeno podría mimetizar el epítipo reconocido en la molécula de HLA propia + péptido viral. Ello ha podido ser demostrado mediante la caracterización de una serie de clones generados en respuestas restringidas que son capaces de reaccionar con aloantígenos (161-163), es decir, que los repertorios implicados en ambos sistemas son los mismos. Todo ello sugiere que, el aloreconocimiento representa una reactividad adicional a aquella para la que fue seleccionado evolutivamente el sistema, que no sería otra que el reconocimiento de antígenos HLA propios con baja afinidad. Esto está en consonancia con los modelos de selección tímica que proponen la delección de aquellos TCR que interaccionan fuertemente con complejos HLA propios y péptidos endógenos mientras que aquellos otros que interaccionan debilmente con ellos se seleccionan positivamente (164-167). Además, las mismas regiones del TCR están implicadas en reconocimiento tanto restringido como aloespecífico (161).

Existen numerosas evidencias indirectas que sugieren que distintos péptidos intervienen en la formación de los epítipos aloespecíficos (168-172). Asimismo se ha demostrado de una forma directa la implicación de péptidos en este sistema mediante experimentos de reconstitución de reactividad con líneas celulares de distintas especies mediante lisados celulares procesados con BrCN (174), con el uso de células deficientes en presentación peptídica (RMA-S, T2)(175-178) o combinando estos ensayos con el fraccionamiento por HPLC de lisados celulares y posterior reconstitución de alo-reconocimiento por fracciones individuales (179,180). En estos últimos experimentos se ha determinado que al menos un 60-70% de los clones anti-H-2K^b ensayados son dependientes de péptido. Así, existen clones que se modulan por péptido individuales, por péptidos específicos de especie, e incluso existen clones que reconocen epítipos donde debe estar presente un péptido cualquiera. Además, recientemente (181) se han generado respuestas alorestringidas donde los CTL generados presentan una alta especificidad en el reconocimiento tanto del aloantígeno como del péptido estimuladores.

1.6.- HLA-B27: SUBTIPOS Y ASOCIACION A ESPONDILITIS ANQUILOSANTE

Estudios tendentes a cuantificar la heterogeneidad estructural de HLA-B27 han demostrado que existen al menos 7 subtipos denominados B*2701 hasta B*2707 (182,183). Estos subtipos presentan distinta distribución étnica, así B*2705 se encuentra en el 90% de los individuos HLA-B27⁺ caucasoides y en sólo el 45% de los orientales HLA-B27⁺. Los subtipos B*2701 y B*2702 solo se han encontrado en caucasoides siendo el primero de ellos un subtipo muy raro mientras que B*2702 se encuentra en el 10% de dicha población. Los subtipos B*2704 y B*2706 se restringen a individuos orientales siendo B*2704 el predominante en esta población (55%). El subtipo B*2703 se ha definido únicamente en poblaciones negroides del Africa Occidental. Las diferencias estructurales entre los distintos subtipos se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2

SUBTIPO	RESIDUO ^a										
	59	74	77	80	81	97	113	114	116	131	152
B*2705	Y	D	D	T	L	N	Y	H	D	S	V
B*2701		Y	N		A						
B*2702			N	I	A						
B*2703	H										
B*2704			S								E
B*2706			S					D	Y		E
B*2707						S	H	N	Y	R	

^a Únicamente se expresan las posiciones donde algún otro subtipo se diferencia de B*2705. Los blancos indican identidad con el correspondiente residuo de B*2705.

HLA-B27 está asociado a la EA (184,185) y a algunas artritis reactivas desencadenadas por bacterias intracelulares. Esta asociación es independiente del haplotipo, y depende solo de HLA-B27. Posteriormente se determinó que al menos los tres subtipos mayoritarios en Caucasoides (B*2705 y B*2702) y en Orientales (B*2704) están igualmente ligados a esta enfermedad (186). Del resto de los subtipos no existen datos epidemiológicos aunque un estudio (187) ha especulado con que el subtipo B*2703 puede no estar asociado a la EA. Aunque la mayoría de los enfermos de EA son HLA-B27⁺ únicamente el 2% del total de los individuos que expresa este gen desarrolla la enfermedad (188) por lo que *HLA-B27 no es un buen marcador de la enfermedad. Ello sugeriría la existencia de factores adicionales que predisponen a la enfermedad.*

Estudios con ratas transgénicas de HLA-B27 (189) han demostrado que existe un cuadro clínico general de enfermedad relativamente similar a las artropatías humanas, que se correlaciona con los niveles de HLA-B27 expresados por las mismas (190). Estos experimentos sugieren una implicación directa de HLA-B27 en la patogenia de la enfermedad, presumiblemente debido a su capacidad de actuar como elemento de restricción en respuestas T. Dentro de este contexto, una hipótesis para explicar el mecanismo de asociación de HLA-B27 a la EA postula que HLA-B27 puede actuar como molécula presentadora de un péptido(s) artrítogénico(s) específico de tejido articular, que probablemente poseería motivos estructurales similares a algún péptido de origen bacteriano (191). En condiciones normales el péptido artrítogénico se expresaría en muy bajas cantidades y por tanto no sería capaz de generar respuestas de células T pero en algunas infecciones bacterianas se produciría una sensibilización mediada por los péptidos exógenos presentados, que compartirían ciertos epítomos con el péptido(s) artrítogénico(s) que haría posible una respuesta de tipo autoinmune hacia estos últimos.

2.- OBJETIVOS

El principal objetivo de esta tesis ha sido el estudio de la naturaleza y diversidad de los determinantes aloantigénicos reconocidos por células T anti-HLA-B27 desde tres puntos de vista:

- * Importancia de las posiciones polimórficas en HLA-B27 en la modulación del reconocimiento de éste antígeno por células T.
- * Grado de similitud antigénica entre los distintos subtipos de HLA-B27 medido como la cantidad de epítomos conservados entre los mismos.
- * Influencia de las diferencias individuales entre respondedores en la generación de respuestas citotóxicas aloreactivas y su posible relación con el fenotipo HLA de los mismos.

Además, se analizó el grado de solapamiento del repertorio de péptidos aloespecíficos presentados endógenamente por HLA-B27 en una línea celular defectiva en presentación antigénica mediada por éste antígeno con respecto a células normales.

3.- MATERIALES Y METODOS

3.1.- CULTIVOS CELULARES

3.1.1.- LÍNEAS LINFOBLASTOIDES B (LCL) Y TRANSFECTANTES DE HLA-B27.

3.1.1.1.- Mantenimiento.

Las líneas linfoblastoides, obtenidas de linfocitos B de sangre periférica por transformación con el virus de Epstein-Barr (EBV), así como los transfectantes de HLA-B*2705 o mutantes de éste en células HMy2.C1R (192,193) fueron cultivados en medio de cultivo RPMI 1640 que contenía 2mM de L-Gln y 25mM de tampón HEPES (GIBCO), suplementado con un 10% v/v de suero de ternera fetal (FCS) (GIBCO) previamente inactivado durante 30 minutos a 56°C. Estos cultivos se mantuvieron en el rango de concentraciones de 1×10^5 - 1×10^6 células/ml añadiéndose medio completo al menos dos veces por semana. Todos los cultivos se mantuvieron en ausencia de antibióticos en una estufa a 37°C, en atmósfera de 5% CO₂ y 95% de humedad relativa.

3.1.1.2.- Congelación y descongelación de LCL y transfectantes.

En el proceso de congelación se centrifugaron al menos 1×10^6 células y posteriormente se resuspendieron entre 0,1 y 0,4 ml de medio completo. Previamente se preparó un medio de congelación consistente en 40% RPMI 1640, 40% FCS y 20% de dimetilsulfoxido (DMSO) (Merck) y se estabilizó a una temperatura de 4°C. Se añadió, gota a gota, una cantidad de dicho medio idéntica a la que se usó en la resuspensión de las células, y el volumen final se transfirió a viales de congelación que se mantuvieron durante 3-6 horas a -70°C. Pasado este tiempo, los viales se transfirieron a un contenedor de N₂ líquido donde se almacenaron.

El proceso de descongelación consistió en añadir con una pipeta Pasteur, gota a gota, 1ml de medio completo de cultivo previamente atemperado a 37°C. La mezcla así obtenida se añadió a un tubo estéril que contenía otros 9 ml del mismo medio y todo el conjunto se centrifugó durante 5 minutos a 300g. Se desechó el sobrenadante y el sedimento celular se resuspendió en medio completo

a 3×10^5 - 5×10^5 células/ml. Se transfirió todo el volumen a un frasco de cultivo y se mantuvo a 37°C y $5\% \text{CO}_2$.

3.1.2.- HIBRIDOMAS DE RATÓN Y ANTICUERPOS MONOCLONALES (ACM).

Estos cultivos fueron congelados, descongelados y mantenidos en cultivo de forma similar a las LCL y transfectantes con la única excepción de que los medios de cultivo completo se suplementaron con β -mercaptoetanol a una concentración final de $0,05\text{mM}$.

3.1.2.1.- Obtención de líquido ascítico.

Inicialmente se inyectan $0,5\text{ml}$ de pristano (Aldrich Chemical Company) en el peritoneo de ratones jóvenes BALB/C. Después de una semana, se inyectaron intraperitonealmente a éstos ratones 2×10^6 células del correspondiente hibridoma resuspendidas en $0,5\text{ml}$ de solución salina estéril. Al cabo de algunas semanas, cuando el peritoneo de los ratones se hubo hinchado lo suficiente se introdujo en dicha cavidad una aguja estéril de $0,9\text{mm}$ de diámetro para evacuar líquido ascítico por propia presión. Este líquido se recogió en tubos Ependorff estériles con heparina que posteriormente se centrifugaron a 13000 rpm en microfuga durante 5 minutos. El sobrenadante se extrajo, evitando arrastrar la interfase lipídica, se alicuotó y congeló a -70°C .

3.1.2.2.- Anticuerpos monoclonales.

Los anticuerpos monoclonales usados en el posterior estudio fueron los siguientes:

Tabla 3

AcM	Especificidad	Referencia
SPV-T3b	anti-CD3	194
HP2/6	anti-CD4	195
B9/4	anti-CD8	196
W6/32	anti-HLA clase I monomórfico	197
EDU-1	anti-HLA clase II monomórfico	198
ME1	anti-HLA-B27+B7+Bw22	199
L234	anti-HLA-DR monomórfico	200
B7.21	anti-HLA-DP monomórfico	201
Genox 3.53	anti-HLA-DQ1	202

3.1.3.- TRANSFECTANTES MURINOS DE HLA-DR2DW2.

Las células L murinas sin transfectar, y los correspondientes transfectantes de los heterodímeros DR2Dw2 (B5*0101) y DR2Dw2 (B1*1501) (203) fueron crecidos en RPMI 1640 suplementado con 10%FCS y 0,05mM de β -mercaptoetanol que además contenía como medio de selección: 0,25mM de xantina, 0,15mM de hipoxantina y $2 \cdot 10^{-3}$ de ácido micofenólico. Este medio de selección evita el sobrecrecimiento de células que no contengan el episoma transfectado.

3.2.- INTERLEUCINA 2 (IL-2).

Se usó IL-2 recombinante que fue generosamente donada por Hoffmann-La Roche (New Jersey, USA). La IL-2r inicialmente liofilizada, se resuspendió en 1 ml de RPMI 1640 y, después de alicuotarse en tandas de 20 μ l, se almacenó en viales de congelación en N₂ líquido. Para su uso, una alicuota de IL-2r se descongeló en 3 ml de FCS, para saturar la unión inespecífica de proteínas al plástico, y el volumen final se transfirió a un frasco que contenía 100ml de RPMI 1640, alicuotandose posteriormente en tubos de 10ml y conservándose a -20°C.

3.2.1.- Cuantificación de IL-2r.

Para medir la actividad de cada lote de IL-2r se utilizó una modificación del método de Guillis (204) que se basa en la medida de la capacidad de inducir respuesta proliferativa en las células CTL-L2. Esta línea celular procede de la cepa C57BL/6, su crecimiento es dependiente de IL-2 (205) y no necesita ningún otro factor específico para reestimularse "in vitro". Esta propiedad ha hecho que sea la línea comúnmente usada en los ensayos de cuantificación de IL-2. Estas células se mantuvieron en cultivo de forma similar al resto de las líneas de ratón anteriormente descritas con la salvedad de que el medio de cultivo se suplementó con 10 UI/ml de IL-2r. La concentración máxima nunca excedió de 5-6x10⁵ células/ml. El método de cuantificación consistió en crecer la línea CTL-L2 hasta una concentración de 2-3x10⁵ células/ml. 5x10⁵ células de este cultivo se centrifugaron y lavaron dos veces, para eliminar cualquier resto de IL-2r del medio de cultivo, y se resuspendieron en 10 ml de medio de cultivo suplementado con 0,05mM de β -mercaptoetanol sin IL-2r.

El ensayo se realizó en placas de 96 pocillos de fondo redondo (Costar). En los pocillos de la columna 1 se añadieron 200 μ l de cada sobrenadante a ensayar. En los pocillos de las columnas 2 a 12 se añadieron 100 μ l de medio completo sin IL-2r. A partir de los pocillos de la columna 1 se hicieron diluciones seriadas 1/2 de los sobrenadantes a valorar hasta la columna 11. Los pocillos de las columna 12 se utilizaron como control negativo sin IL-2r. Posteriormente se añadieron 100 μ l de la suspensión de células CTL-L2 a cada pocillo, de esta forma todos los pocillos llevaban igual cantidad de células

y la proliferación es únicamente dependiente de la cantidad de IL-2r de cada pocillo. Las placas así dispuestas se incubaron 24 horas a 37°C y 5%CO₂. Pasado dicho intervalo de tiempo se comprobó en un microscopio de contraste de fase que las células de los pocillos de la columna 12 estaban muertas, y se añadió a cada pocillo 1µl de ³H-timidina (Amersham). Cuatro horas después, se recogieron las células en un colector celular (Titertek Cell harvester, Flow) usando filtros de papel (Skatron Inc.). Los filtros se secaron durante 30 minutos a 80°C y se les añadió 2 ml de líquido de centelleo (Aquasol, Dupont). La radioactividad incorporada se midió en un contador de radiación beta Beckman LS 2800 (Beckman Instruments).

3.2.2.- Cálculo de las unidades arbitrarias de IL-2.

Las unidades de IL-2 de cada sobrenadante se calcularon mediante un programa computerizado que ajusta el logaritmo en base 2 de la inversa de las diluciones usadas en abscisas a una recta de regresión definida por el logaritmo en base 10 del número de cuentas obtenidas en la misma dilución en ordenadas. Una vez obtenida dicha recta de regresión, se calculó para cada sobrenadante el punto de la abscisa correspondiente a la ordenada cuyo valor era el 50% del número de cuentas máximo obtenido en el ensayo, es decir, se calculó la inversa de la dilución teórica en que se obtendría el 50% de la estimulación máxima, siendo éste el valor teórico de unidades de IL-2 asignado.

3.3.- ENSAYOS DE DETECCIÓN DE MICOPLASMAS EN CULTIVOS CELULARES

Se utilizaron dos sistemas distintos para detectar presencia de micoplasmas en cultivos de celulares. En ambos métodos las líneas a ensayar fueron crecidas hasta una concentración de 8x10⁵-1x10⁶ células/ml no habiendo sido manipuladas durante los 3-4 días previos al ensayo.

El primer método consistió en mezclar 80ml de agua destilada, 1 gr. de agar noble (Difco) y 2,1gr. de PPLO (Difco). La mezcla se esterilizó en un autoclave a 120°C durante 30 minutos, transfiriéndose a un baño a 56°C. Paralelamente se disolvieron 0,5 gr. de extracto de levadura (Difco) en 20ml de FCS inactivado previamente, esterilizándose la disolución con un filtro de 0,22µm de

diámetro (Sartorius), e introduciéndose en un baño a 56°C. Cuando la temperatura de ambos recipientes se estabilizó a 56°C, se mezclaron ambas disoluciones y se depositaron 5ml de esta mezcla final a placas de Petri de 6cm de diámetro (Soria-Greiner) dejando que el medio resultante gelificara al menos durante 1 hora. Se recogieron 10ml de cultivo celular de LCL y después de centrifugarse, se desecharon 9,8ml de sobrenadante sembrándose los 0,2ml restantes que contienen el sedimento celular en una placa de Petri previamente preparada. Dichas placas se mantuvieron una noche en cámara seca a 37°C para fijar el sedimento celular en el agar. Después se introdujeron en una cámara húmeda en posición invertida en una atmósfera carente de oxígeno, compuesta de 95% de nitrógeno y 5% de CO₂. Este proceso de incubación se prolongó durante 5-6 días, acabado el cual las placas se tiñeron con el colorante de Dienes. Dicho colorante consta de 1,25gr de Azul de Metileno, 0,62gr de Azur 2 (Merck), 5 gr de maltosa (Merck), 0,125gr de Na₂CO₃ y 0,1gr de ácido benzoico (Merck) disueltos en 500ml de agua destilada. La solución final se filtra antes de su uso. Las placas ya teñidas se observaron en un microscopio invertido con objetivo de inmersión.

El segundo método es un ensayo comercial basado en la hibridación con una sonda de DNA tritiada complementaria a RNA ribosomal de distintas especies de micoplasmas (Gen-probe). El método consistió en obtener 10ml de sobrenadante de cultivo celular de cada línea a ensayar, se centrifugó a 15000g durante 15 minutos desechándose el sobrenadante. El sedimento se resuspendió en 1ml de solución salina y el contenido total se transfirió a un vial Eppendorf que se microfugó a 15000 rpm durante otros 10 minutos. Se añadieron 200µl de solución que contiene sonda tritiada, se agitó e incubó durante 2-3 horas en baño a 72°C. Además se prepararon dos controles que también constan de 200µl de sonda marcada siendo uno positivo que contendrá 50µl de una solución de extractos de ácidos nucleicos no infecciosos de micoplasmas y otro negativo que sustituye el DNA-RNA de micoplasmas por un tampón. Estos controles se manipularon de forma idéntica al resto de las muestras. A continuación, la muestra previamente incubada con la sonda radioactiva y 5ml de una suspensión de separación que consta de hidroxapatito se transfirieron a un vial de centelleo (Beckman). Se agitaron las muestras y se incubaron durante 5 minutos a 72°C. Pasado este tiempo, se volvieron a agitar los viales y se centrifugaron a 500g durante 1 minuto. Se desechó el sobrenadante y se lavó dos veces el precipitado con 5 ml de solución de lavado. El precipitado resultante se mezcló

con 5ml de líquido de centelleo y se determinó la radioactividad de cada muestra en un contador beta. Para determinar la actividad total de la sonda radioactiva, se centrifugaron 5ml de suspensión de separación a 500g durante 1 minuto, desechándose el sobrenadante. Se añadieron 50µl de sonda marcada radioactivamente y se añadieron 5 ml de líquido de centelleo y la mezcla total se agitó vigorosamente para mezclar al máximo los distintos componentes. El porcentaje de hibridación de cada muestra se calculó por el siguiente algoritmo:

$$\% \text{ Hibridación} = \frac{\text{CPM Muestra}}{\text{CPM Total}} \times 100$$

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

3.4.- OBTENCIÓN, EXPANSION, CULTIVO Y ENSAYOS DE CLONES CITOLITICOS DE CELULAS T.

3.4.1.- OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE SUERO HUMANO.

Todos los medios de cultivos para linfocitos T fueron similares a los medios de cultivo de LCL y transfectantes con la única salvedad de que se suplementaron con 10% v/v de mezclas de sueros humanos en lugar de FCS y el medio no contuvo tampón HEPES. Estas mezclas se obtuvieron de donantes sanos varones A+ y AB+, se inactivaron durante 30 minutos a 56°C, se ultracentrifugaron a 20000g durante una hora a temperatura ambiente y el sobrenadante libre de lípidos se congeló en alícuotas de 10ml a -20°C.

3.4.2.- AISLAMIENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA (PBMC).

Estas células se aislaron partiendo de sangre periférica heparinizada de un donante sano extraída en condiciones estériles. La sangre se diluyó en un volumen igual de RPMI 1640, 7ml de esta solución se depositaron cuidadosamente sobre 3 ml de una solución de metrizoato sódico-Ficoll (Lymphoprep) en tubos estériles de 10ml. Los tubos se centrifugaron durante 20 minutos a 300g y temperatura ambiente. Las células mononucleares se recogieron de la interfase y se lavaron dos veces en RPMI 1640. El precipitado celular se resuspendió en medio de cultivo de linfocitos humanos que consta de RPMI 1640 suplementado con 10% v/v de suero humano y 2mM de L-Gln.

3.4.3.- CONGELACIÓN Y DESCONGELACIÓN DE PBMC.

Se resuspendieron entre 1×10^6 - 1×10^7 de PBMC en volumen que osciló entre 0,1 y 0,3ml de medio de cultivo de linfocitos. El proceso de congelación y descongelación es similar al de LCL y transfectantes excepto que en la preparación del medio de congelación se sustituyó el FCS por suero humano.

3.4.4.- CULTIVO MIXTO DE LINFOCITOS (MLC)

Se colocaron en un tubo de 10ml las siguientes cantidades de células:

- 1×10^6 de PBMC de un individuo previamente tipado para los distintos antígenos HLA de clase I y de clase II, que actuarán como células respondedoras a los aloantígenos de las células estimuladoras.
- 1×10^6 de PBMC del mismo individuo irradiadas a 4000 rads. Estas células servirán como césped celular en el cultivo.
- 1×10^5 de células de una determinada célula HLA-B27⁺, irradiadas a 6000 rads y que actuarán

como células estimuladoras alogénicas.

El conjunto se centrifugó durante 5 minutos a 300g y se desechó el sobrenadante. Se resuspendió el sedimento celular en 2ml de medio completo de cultivo de linfocitos y se transfirió el volumen a una placa de 24 pocillos de fondo plano (Costar) que se incubó durante 7 días a 37°C y 5%CO₂. El cultivo se duplicó tantas veces como fue necesario para que la concentración en cada momento en el cultivo no excediera el millón de células/ml. Después de este período las células se recolectaron para su clonaje, o bien se reestimularon de forma similar a la anteriormente descrita con la única salvedad de que ahora este cultivo se consideró como células respondedoras. Desde el momento de la segunda reestimulación el medio de cultivo de linfocitos se suplementó con IL-2r a una concentración final de 20 U/ml.

3.4.5.- CLONAJE DE CELULAS T.

Tras el MLC, las células estimuladas se lavaron dos veces a 300g y 5 minutos. Se determinó su concentración y se sembraron en placas de 96 pocillos de fondo redondo (Costar) en volúmenes de 15µl a concentraciones decrecientes de 40; 20; 10; 5; 2,5; 1,2; 0,6 y 0,3 células por pocillo. Además a cada pocillo se le añadieron 30µl de medio que contenían 2x10⁴ PMBC autólogas irradiadas a 4000 rads y 2x10³ LCL irradiadas a 6000 rads. A partir de este momento todos los medios de cultivo de linfocitos contuvieron 20 U/ml de IL-2r.

Cada clonaje fue reestimulado semanalmente con una cantidad similar de células estimuladoras y de PBMC, aunque a partir de la segunda semana se utilizaron PBMC alogénicos provenientes de mezclas de varios individuos.

En algún caso se realizó un ensayo de subclonaje que fue totalmente similar al método de clonaje previamente descrito, sembrando células del clon citolítico previamente establecido a diluciones crecientes.

3.4.6.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA DILUCIÓN LÍMITE.

Durante las semanas siguientes al clonaje, una serie de pocillos presentaron poblaciones en crecimiento. Se fueron anotando el número de estos pocillo positivos, la fecha de aparición y su ubicación en las distintas placas sembradas. Tras una semana desde la aparición del último pocillo positivo del clonaje se analizaron los datos según la distribución de Poisson (206). Este tratamiento algorítmico consiste en un programa computerizado en el que a cada dilución de células se le asignó un punto que poseía como abcisa el número de células sembradas por pocillo y como ordenada el logaritmo en base 10 de la fracción de pocillos no crecidos para cada dilución. Esta ordenación de los datos permite obtener una recta de regresión por el método de mínimos cuadrados y calcular la variación de la pendiente de la recta obtenida con un determinado coeficiente de seguridad (que en el caso que nos ocupa fue del 95%), utilizándose para ello la T de Student. Se consideraron pocillos clonados estadísticamente a aquellos que fueron sembrados con un número de células inferior a un teórico definido como la concentración celular mínima que se correspondiera con un 37% de pocillos negativos. Se expandieron e intentaron estudiar todos los pocillos positivos que estaban una dilución por debajo de la del límite estadístico calculado mediante el procedimiento descrito.

3.4.7.- EXPANSIÓN Y MANTENIMIENTO DE LOS CLONES DE LINFOCITOS T.

A cada pocillo considerado clon estadístico se le añadieron 150 μ l de medio de cultivo de linfocitos con 20 U/ml de IL-2r y cuando la cantidad de células crecidas era suficiente se duplicó para su posterior estudio. Todos los clones fueron semanalmente reestimulados en las condiciones previamente descritas.

3.4.8.- CONGELACIÓN Y DESCOGELACIÓN DE CLONES DE CÉLULAS T.

Cuando un determinado clon estaba lo suficientemente crecido, se transfirieron 100 μ l de un pocillo a un vial de congelación y se le añadía una cantidad igual de medio de congelación de linfocitos

(40% de RPMI 1640 + 40% de suero humano + 20% de DMSO) previamente enfriado a 4°C. El vial se mantuvo 3-6 horas a -70°C y posteriormente se transfirió a un contenedor de N₂ líquido donde se almacenó. Para su descongelación se añadió gota a gota y agitando suavemente 1ml de medio completo de cultivo de linfocitos hasta homogeneizar totalmente el conjunto. Después este volumen se alicuotó en pocillos donde previamente se habían añadido células estimuladoras y alogénicas previamente irradiadas hasta un volumen total de 200ul y las placas se mantuvieron a 37°C y 5%CO₂.

3.4.9.- ENSAYO DE CITOTOXICIDAD DE LOS CLONES DE CELULAS T POR LIBERACIÓN DE ⁵¹Cr.

3.4.9.1.- Células diana.

Se recolectaron en un tubo de 15 ml de fondo en pico, 5x10⁵ células de cada LCL a usar. Después de lavar las células una vez, se desechó el sobrenadante y se añadió 50ul de FCS y 50μl (50uCi) de ⁵¹Cr en forma de cromato sódico (Amersham) al sedimento celular. Se agitó suavemente el conjunto y se incubó en un baño a 37°C durante 1 hora agitándose cada tubo cada 15-20 minutos. Se realizaron dos lavados con un medio que contenía RPMI 1640 suplementado con 5% de FCS. Las células se resuspendieron en 2ml del mismo medio y se determinó la radioactividad presente en 50μl de suspensión celular. Posteriormente estas células diana se diluyeron de manera que 50μl contuvieran entre 300 y 500 cpm y alrededor de 2000 células.

3.4.9.2.- Células efectoras.

Las células efectoras usadas fueron clones de linfocitos T. Cada clon se transfirió a un tubo estéril de 15ml de fondo en pico y se determinó la concentración celular existente. Se centrifugaron en dicho tubo las células necesarias para el experimento y se resuspendieron en el volumen adecuado de medio con 5% de FCS. El ensayo propiamente dicho (207) se realizó en placas de 96 pocillos de fondo en pico no estériles (Costar). Así, en cada pocillo para un volumen final de 150μl, se añadieron

50µl de células diana marcadas con ^{51}Cr , 50µl de células efectoras a la relación efector:diana adecuada para cada experimento y 50µl de medio con 5% de FCS. Las placas se centrifugaron suavemente durante 5 minutos a 120g y se incubaron durante 4 horas a 37°C y 5%CO₂. Pasado dicho período las placas se volvieron a centrifugar en las mismas condiciones y se extrajo un volumen de 100µl de sobrenadante de cada pocillo. La radioactividad se determinó en un contador de radioactividad gamma. En cada ensayo se incluyeron para cada LCL marcada, tres pocillos que determinaban la liberación máxima de ^{51}Cr para esa LCL (50µl de diana marcada y 100µl de ácido clorhídrico 0,1M) y tres pocillos que indicaban la liberación espontánea de ^{51}Cr (50µl de diana y 100µl de medio con 5% de FCS). La lisis específica se midió como el porcentaje de liberación de ^{51}Cr por las células diana según el siguiente algoritmo:

$$\% \text{ LISIS} = 100 \times \frac{\text{X} - \text{E}}{\text{M} - \text{E}}$$

siendo X las cpm liberadas al mezclar células efectoras y diana en cada pocillo, E las cpm liberadas en el sobrenadante que sólo contenía células diana y M cpm medidas en los pocillos que contienen dianas en presencia de ácido clorhídrico. No se consideraron experimentos en los cuales la relación entre la liberación espontánea y la máxima era superior al 35% y todos los puntos fueron realizados por duplicado.

3.4.9.3.- Ensayos de citotoxicidad directa.

En el caso de los pocillos positivos provenientes de los clonajes el ensayo fué similar al anteriormente explicado excepto que la cantidad de células efectoras no fue determinada previamente y solo se utilizaron aquellos pocillos positivos que al microscopio presentaron un marcado crecimiento, por lo que la relación efector:diana fue desconocida.

3.4.9.4.- Ensayos de competición con AcM.

Una modificación del ensayo de citotoxicidad consistió en la adición en algunos pocillos de AcM específicos de proteínas de membrana de la célula diana (anti-HLA) ó de la efectora (anti-CD3, -CD4 y -CD8). En estos casos el método consistió en mezclar en un determinado pocillo 50µl de efectora, 50µl de diana marcada y 50µl de un determinado anticuerpo monoclonal, siendo en todos los casos la concentración del AcM de 1:150 excepto con EDU-1 (dilución 1:300). Se calculó el porcentaje de inhibición de la citotoxicidad según la fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = 100 - \frac{\% \text{ lisis en presencia de AcM}}{\% \text{ lisis en ausencia de AcM}} \times 100$$

3.4.9.5.- Ensayos de competición con dianas frías.

La realización de este tipo de ensayos fue idéntica a la del aparatado anterior exceptuando que aquí el agente competidor consistió en líneas linfoblastoides que se usaron sin marcar con radioactividad denominadas dianas frías. Estas células eran de tipaje conocido, y se usaron de tal forma que únicamente compartieran con las células marcadas el antígeno(s) nominal responsable de la especificidad. El ensayo consistió en mezclar en el pocillo las mismas cantidades de células efectoras y de dianas marcadas que en los casos anteriormente descritos y 50µl de una cantidad determinada de células LCL no marcadas (que genralmente fueron usadas a las tres relaciones dianas fría:caliente de 16:1, 4:1 y 1:1). Se calculó el porcentaje de inhibición de la citotoxicidad según la fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = 100 - \frac{\% \text{ lisis en presencia de dianas frías}}{\% \text{ lisis en ausencia de dianas frías}} \times 100$$

3.4.10.- DETERMINACIÓN DEL FENOTIPO DE LOS CLONES T CITOLÍTICOS.

Todos los clones que fueron considerados citotóxicos, mediante ensayos de liberación de ^{51}Cr , fueron analizados por citometría de flujo para su expresión de moléculas específicas de membrana de linfocitos. Entre 5×10^4 y 2×10^5 células de cada clon se lavaron dos veces y se alicuotaron en 4 tubos Eppendorf. Tres de ellos se incubaron con 50 μl de una dilución 1:300 de los AcM SPV-T3b (anti-CD3), HP2/6 (anti-CD4) ó B9/4 (anti-CD8) durante 20 minutos a 4°C . Se lavaron dos veces, a 10000g durante 10 segundos con 1ml de solución salina previamente enfriada a 4°C , y se añadió a cada uno de los cuatro tubos 50 μl de una dilución 1:50 de (Fab) $'_2$ fluoresceinado (Kallestad). Se incubaron nuevamente los tubos a 4°C durante otros 20 minutos y posteriormente se lavaron otras dos veces con solución salina tal y como anteriormente. Las células se resuspendieron en 100 μl de RPMI 1640 y se midió la fluorescencia de superficie en las células en un citómetro de flujo EPICS, contandose al menos 1000 células viables.

4.- RESULTADOS

4.1.- AISLAMIENTO DE CLONES CITOLITICOS ESPECÍFICOS ANTI-HLA-B*2705.

CLONAJE DE CTL.

Se han estudiado las respuestas citolíticas anti-HLA-B*2705 de tres respondedores sanos. Se estimularon células mononucleares de sangre periférica de cada individuo con distintas líneas linfoblastoides HLA-B*2705⁺ y en un caso, con el transfectante B*2705⁺ 1-3B y las combinaciones respondedor/estimulador usadas en el presente estudio se representan en la Tabla 4.

Tabla 4. Combinaciones respondedor/estimulador usadas en la obtención de CTL anti-B*2705.

<u>RESPONDEDOR</u>	<u>ESTIMULADOR</u>			
	<u>MLC PRIMARIO^a</u>	<u>MLC SECUNDARIO</u>	<u>CLONAJE</u>	<u>CLONES^b</u>
DL (HLA-A29, 31; B39, 44; DR2, 7)	I-3B	---	I-3B	DM5 (1), DTB (1)
	R69	---	R69	DRD (3), DAG (1)
	R69	R69	LG15	DLE (1)
	LG15	LG15	R69	DRF (8)
GM (HLA-A1, 24; B7, 8; DR1, 3)	R69	---	R69	GRK (15)
	LG15	---	LG15	GM (1)
	LG15	LG15	LG15	A2 (2)
SR (HLA-A3, 29; B7, 44; DR2, 7)	R69	---	R69	S69 (4), SRF (2) SRY (4), SRB (1)
	R69	R69	R69	SRZ (1), SRC (3)
	R69	R69	LG15	SLG (8)
	R69	R15	R15	S15 (10)

^a Las I.C.L. usadas como estimuladoras fueron R69 (HLA-A3, 24; B*2705, 7; DR3, 5), LG15 (HLA-A32; B*2705; DR1) y R15 (HLA-A3; B*2705, 35). I-3B es el transfectante de HMy.2C1R que expresa el antígeno B*2705 (177).

^b El nombre generico de cada experimento de clonaje está seguido, entre parentesis, por el numero de clones de CTL especificos HLA-B*2705 que crecieron en cantidades suficientes para el análisis de especificidad fina.

4.2.- CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DE LOS CLONES ESTADÍSTICOS.

Los pocillos que mostraron proliferación celular fueron analizados inicialmente en un ensayo de citotoxicidad a relación efector:diana (E:D) desconocida, para determinar su posible especificidad anti-HLA-B*2705. Este ensayo se realizó siguiendo alguno de los dos procedimientos siguientes:

- * Usando como célula diana la correspondiente LCL estimuladora tanto en presencia como en ausencia del anticuerpo ME1 (anti-HLA-B27).
- * Utilizando como control positivo el transfectante HMy2.C1R que contiene el gen de B*2705 (1-3B) y como control negativo del experimento la correspondiente célula transfectada únicamente con el vector pSV2neo, que contiene el gen de selección (177).

Todos aquellas células T que en dicho ensayo presentaron un valor de lisis superior al 20% (entre el 18% y el 44% de los clones estadísticos obtenidos en cada clonaje) y que además tuvieran valores de lisis inferiores al menos en un 50% en presencia de ME1 o de la célula transfectante con pSV2neo con respecto a 1-3B, fueron expandidos para su posterior caracterización.

4.3.- DETERMINACIÓN DE LOS PATRONES DE REACCIÓN.

Un total de 66 clones de los tres respondedores pudieron ser expandidos en cantidad suficiente para analizar su capacidad lítica frente al subtipo estimulador y su especificidad fina. Se realizaron los siguientes ensayos:

- * Ensayos de panel frente a dianas representativas de los subtipos B*2701 a B*2706 y a varias LCL HLA-B27⁻.
- * Ensayos de inhibición con anticuerpos monoclonales ya sea específicos de moléculas de superficie relevantes de linfocitos T (CD3, CD4 y CD8) o de moléculas de histocompatibilidad expresadas por las distintas dianas.
- * Ensayos de inhibición fría que permiten determinar la avidéz relativa de un determinado clon por distintas moléculas de histocompatibilidad presentes en diferentes LCL.

Se caracterizaron 15 clones del respondedor DL, 18 de GM y 33 de SR, que, teniendo en

cuenta sus respectivas reactividades frente a los distintos subtipos de HLA-B27, pueden agruparse en 18 patrones de reacción. Estos grupos de reacción se han ordenado de la especificidad más restringida a la más amplia y se describirán de forma detallada más adelante.

4.4.- CARACTERIZACION FENOTIPICA DE CTL ANTI-B*2705.

La gran mayoría de los clones estudiados (63/66) fueron fenotipados mediante citometría de flujo. Debido al escaso número de células disponibles los clones estadísticos 28DTB, 102GRK y 59SLG no pudieron ser fenotipados. Así, 53 de los 63 CTL fenotipados (13 clones del respondedor DL, 12 de GM y 28 de SR) fueron poblaciones fenotípicamente homogéneas $CD3^+CD4^-CD8^+$. Los 10 clones restantes (12DM5 de DL; 20GRK, 41GRK, 112GRK, 116GRK y 123GRK de GM; y 7SR Y, 18SR Y, y 11SLG de SR) presentaron mezclas de poblaciones $CD4^+$ y $CD8^+$ en distintas proporciones. Todos ellos fueron cultivados en medio completo de linfocitos suplementado con una dilución 1:100 de AcM anti-CD4. Además, en todos los casos, la célula estimuladora original fue sustituida, en las sucesivas reestimulaciones semanales, por otra LCL del mismo subtipo. Ambos procesos en una primera fase impidieron el sobrecrecimiento de las poblaciones $CD4^+$ (por ser éstas las de más rápido crecimiento) y en estadios más tardíos las disminuyeron. A partir de este momento los clones fueron red denominados con ".8" después del ordinal. Después de un periodo mínimo de cultivo de 3-4 semanas la población $CD4^+$ fue totalmente deplecionada de los cultivos en los clones 12.8DM5, 20.8GRK, 41.8GRK, 116.8GRK, 123.8GRK, 7.8SR Y, 18.8SR Y y 11.8SLG obteniéndose un fenotipo final $CD3^+CD4^-CD8^+$ que se mantuvo estable aún en ausencia del AcM anti-CD4. Sólo en el caso de los clones 112.8GRK y 33.8S15, la población $CD4^+$, que en ambos casos representaba entre el 5 y el 10% de la población total $CD3^+$, no pudo ser totalmente eliminada manteniéndose de forma indefinida el AcM anti-CD4 en el medio de cultivo para evitar el sobrecrecimiento de dicha población.

4.5.- PATRONES DE REACCIÓN CLONALES.

4.5.1.- GRUPO I

Este grupo consta de aquellos clones que presentan la especificidad más restringida, ya que únicamente reconocen al subtipo estimulador, B*2705⁺. Existen clones con este patrón en los tres individuos estudiados. La Tabla 5 resume la especificidad fina de los 9 clones del respondedor DL que pertenecen a este grupo (12.8DM5, 28DTB, 22DAG, 212DRD, 64DRF, 67DRF, 80DRF, 102DRF y 2DLE) y la Tabla 6 de los correspondientes a los respondedores GM (41.8GRK, 82GRK, 116.8GRK y 17A2) y SR (11SRY, 40SRY, 13SRC y 36SRC). La lisis de dianas relevantes es marcadamente diferente entre unos clones y otros, variando entre 60-70% de lisis en clones como 12.8DM5 ó 17A2 y aproximadamente el 20% del clon 67DRF a relación E:D 4:1. Ello sugiere diferencias de avidéz por las dianas B*2705⁺ entre los clones de este grupo.

Dos clones (2DLE y 36SRC) reconocen respectivamente a las LCL HLA-B27⁻ VEN y TTL que presentan cada una un antígeno de la familia de HLA-B22 (B54 y B56 respectivamente) que están relacionados serológicamente con HLA-B27.

La especificidad anti-B*2705 fue confirmada en 15 de los 17 clones de este grupo mediante ensayos de inhibición con AcM. En la Tabla 7 se presentan los valores de lisis de cada uno de estos clones frente a una diana representativa del subtipo B*2705 a dos relaciones E:D distintas y los valores de lisis correspondientes en presencia de los AcM ME1 (anti-HLA-B27 + B7 + B22) y EDU-1 (anti-clase II monomórfico). Todos los clones presentan valores de lisis específica nulos o muy disminuidos en presencia de ME1 y valores de lisis similares al control positivo sin AcM cuando la diana B*2705⁺ se incubó con EDU-1, usado como control negativo.

De los dos clones que presentaban una reactividad adicional (2DLE y 36SRC) sólo se pudieron realizar inhibiciones con AcM del clon 2DLE frente a la diana VEN (HLA-B55⁺). La lisis específica frente a esta diana fue totalmente inhibida con ME1 pero no con EDU-1 con lo que se demuestra que dicho clon reconoce específicamente al antígeno B55 en la diana VEN (Tabla 5). Sobre la base del análisis de panel la lisis de TTL por el clon 36SRC (Tabla 7) solo los antígenos HLA-B51, 54 pueden

ser los reconocidos por este clon. Dado que HLA-B54 pertenece al grupo de reacción cruzada de HLA-B27 podría sugerirse, aunque no se demostró formalmente, que éste es el antígeno reconocido.

Los AcM anti-CD3 y -CD8 pero no anti-CD4 inhiben con distinta eficacia la lisis de las dianas correspondientes por los distintos clones (Tabla 7). Así, para 11 clones (12.8DM5, 22DAG, 212DRD, 67DRF, 82GRK, 116.8GRK, 17A2, 11SRY, 40SRY, 13SRC y 2DLE frente a las dos especificidades reconocidas) la inhibición por ambos AcM es significativa. En otros casos como 28DTB y 36SRC, el AcM anti-CD3 inhibe casi totalmente mientras que anti-CD8 no inhibe y en 102DRF y 41.8GRK el comportamiento es el contrario. Esto sugiere que cada clon presenta una contribución diferente de CD3/TCR y de CD8 a la avidéz total.

Tabla 5. Especificidad fina de los clones del grupo I: Ensayo de panel¹.

CELULA DIANA	HLA				CTL																		
	A	B	C	DR	12.8DM5		28DTB		22DAG		212DRD		64DRF		67DRF		80DRF		102DRF		2DLE		
					<u>4:1</u>	<u>1:1</u>	<u>4:1</u>	<u>1:1</u>	<u>4:1</u>	<u>1:1</u>	<u>4:1</u>	<u>1:1</u>	<u>4:1</u>	<u>1:1</u>	<u>4:1</u>	<u>1:1</u>	<u>4:1</u>	<u>1:1</u>	<u>4:1</u>	<u>1:1</u>	<u>4:1</u>	<u>1:1</u>	
LG15	32	*2705	2	1	<u>66(2)</u>	<u>36(2)</u>	-	-	<u>41(5)</u>	<u>28(5)</u>	<u>40(4)</u>	<u>24(1)</u>	<u>40(2)</u>	<u>32(1)</u>	<u>30(3)</u>	<u>20(3)</u>	-	-	<u>38(5)</u>	<u>34(5)</u>	<u>52(8)</u>	<u>26(7)</u>	
R69	3, 24	*2705, 7	-	3, 5	<u>77(1)</u>	<u>77(1)</u>	<u>38(2)</u>	<u>28(2)</u>	<u>37(2)</u>	<u>23(2)</u>	<u>27(10)</u>	<u>24(9)</u>	<u>27(3)</u>	<u>21(3)</u>	<u>30(4)</u>	<u>19(4)</u>	<u>21(3)</u>	<u>15(3)</u>	<u>33(6)</u>	<u>24(6)</u>	<u>57(7)</u>	<u>37(7)</u>	
LH	24	*2701, 8	1, 7	3, 4	0(2)	0(2)	0(1)	0(1)	7(1)	2(1)	4(2)	0(2)	3(2)	4(1)	2(1)	0(1)	3(1)	1(1)	1(2)	2(2)	0(2)	0(2)	
R34	2, 24	*2702, 18	-	-	2(1)	1(1)	1(1)	4(1)	0(1)	0(1)	0(1)	0(1)	0(1)	0(1)	0(1)	0(1)	2(1)	6(1)	0(1)	0(1)	5(1)	4(1)	
R56	2, 11	*2702, 14	-	-	0(1)	1(1)	7(1)	4(1)	0(1)	0(1)	2(1)	0(1)	-	-	1(1)	6(1)	-	-	0(1)	0(1)	1(2)	1(2)	
NW	3, 33	*2702, 8	-	-	-	-	-	-	1(1)	0(1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0(1)	5(1)	
CH	31, 32	*2703, 18	2, 7	8, 11	0(1)	0(1)	3(1)	4(1)	4(3)	7(3)	12(6)	10(6)	-	-	8(1)	10(1)	0(1)	0(1)	-	-	1(3)	1(3)	
LAR	23, 31	*2703, 53	2, 4	-	2(1)	0(1)	0(1)	0(1)	9(1)	6(1)	10(8)	7(8)	7(1)	2(1)	0(1)	0(1)	-	-	0(2)	0(2)	9(6)	7(5)	
R42	2, 9	*2704, *2706	-	-	0(1)	0(1)	3(1)	3(1)	0(1)	0(1)	1(1)	0(1)	1(2)	2(2)	-	-	0(1)	6(1)	3(2)	1(2)	9(4)	2(4)	
Wewak I	11, 24	*2704, 62	2, 4	2	-	0(1)	0(1)	8(1)	1(1)	1(1)	6(1)	5(1)	9(2)	7(2)	4(1)	7(1)	-	-	0(1)	2(1)	7(4)	2(4)	
KNE	1, 2, 4	*2704, 8	-	2, 3	0(1)	3(2)	0(1)	8(1)	-	-	10(2)	8(2)	-	-	6(1)	8(1)	9(1)	0(1)	12(1)	12(1)	-	-	
ET	2, 11	*2704, 38	-	4	-	-	0(1)	3(1)	0(1)	0(1)	0(1)	0(1)	-	-	-	-	-	-	7(1)	-	1(3)	4(3)	
LIE	2, 11	*2706, 54	-	12	0(1)	0(1)	8(1)	5(1)	0(1)	0(1)	5(1)	-	-	-	-	1(1)	5(2)	-	-	0(1)	0(1)	0(1)	0(1)
PAR	11, 24	*2706, 48	-	2, 11	0(1)	0(1)	4(2)	8(2)	1(1)	4(1)	4(1)	3(1)	-	-	6(2)	1(2)	-	-	1(1)	3(1)	0(1)	0(1)	
JY	2	7	-	4, 6	0(1)	0(1)	0(1)	0(1)	0(1)	0(1)	1(1)	0(1)	0(1)	7(1)	0(1)	0(1)	-	-	0(1)	3(1)	0(1)	0(1)	
LB	28	60	3	6	0(1)	0(1)	1(1)	0(1)	0(1)	0(1)	3(1)	0(1)	-	-	0(1)	0(1)	1(1)	0(1)	7(1)	2(1)	0(1)	0(1)	
SWEIG	29	61	2	11	3(1)	5(1)	4(1)	3(1)	0(1)	7(1)	0(1)	0(1)	8(1)	5(1)	5(1)	0(1)	0(1)	4(1)	11(7)	7(7)	0(1)	0(1)	
TTL	11, 33	51, 54	1, 3	2, 6	0(1)	1(1)	0(1)	0(1)	0(1)	0(1)	0(1)	0(1)	-	-	0(1)	0(1)	0(1)	0(1)	0(1)	0(1)	1(2)	0(2)	
VEN	3, 31	18, 55	3, 5	-	8(1)	6(1)	4(1)	5(1)	0(1)	0(1)	4(1)	1(1)	2(1)	5(1)	8(1)	0(1)	-	-	0(1)	0(1)	<u>45(3)</u>	<u>15(3)</u>	
VOO	1, 3	8, 56	1	-	0(1)	0(1)	0(1)	0(1)	0(1)	5(1)	0(1)	0(1)	-	-	1(1)	1(1)	0(1)	0(1)	1(1)	1(1)	1(2)	2(2)	
FJO	2, 3	7, 16	-	2	0(1)	0(1)	2(1)	0(1)	0(1)	0(1)	0(1)	0(1)	7(1)	0(1)	4(1)	2(1)	0(1)	0(1)	1(1)	3(1)	0(1)	0(1)	

¹ Los datos están expresados como % de lisis específica y son medias del número de experimentos indicado entre paréntesis. Valores de citotoxicidad positiva (≥14% a la relación mayor) están subrayados. (-): Ensayo no realizado.

Tabla 6. Especificidad fina de los clones del grupo I: Ensayo de panel*.

CELULA	HLA				CTL															
	A	B	C	DR	GM								SR							
					41.8GRK		82GRK		116.8GRK		17A2		11SRV		40SRV		13SRC		36SRC	
					4:1	1:1	4:1	1:1	4:1	1:1	4:1	1:1	4:1	1:1	4:1	1:1	4:1	1:1	4:1	1:1
LG15	32	*2705	2	1	44(3)	23(3)	40(3)	22(3)	-	-	60(2)	36(2)	-	-	-	-	32(1)	19(1)	-	-
R69	3, 24	*2705, 7	-	3, 5	45(5)	25(5)	54(7)	45(7)	40(10)	27(8)	69(5)	46(5)	47(3)	32(2)	48(5)	35(5)	50(1)	24(1)	-	-
R70	3, 24	*2705, 7	-	3, 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23(3)	15(3)
R15	3	*2705, 35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	42(3)	34(3)	36(2)	30(2)	28(3)	19(2)	44(3)	34(3)
LH	24	*2701, 8	1, 7	3, 4	0(2)	1(2)	8(2)	9(2)	6(3)	0(3)	0(1)	0(1)	2(2)	2(2)	3(2)	1(2)	5(2)	5(2)	2(2)	2(2)
R34	2, 24	*2702, 18	-	-	1(1)	0(1)	0(1)	0(1)	1(3)	3(2)	5(1)	0(1)	0(1)	0(1)	1(2)	0(2)	8(3)	2(2)	11(1)	3(1)
R56	2, 11	*2702, 14	-	-	1(1)	0(1)	6(1)	6(1)	6(1)	-	9(2)	4(2)	2(1)	1(1)	0(1)	0(1)	7(3)	6(2)	0(1)	0(1)
CHR	2, 3	*2702, 35	2, 4	1, 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6(1)	2(1)	-	-
NW	3, 33	*2702, 8	-	-	-	-	-	-	1(3)	2(2)	-	-	0(1)	8(1)	0(1)	0(1)	0(2)	8(1)	6(1)	2(1)
CH	31, 32	*2703, 18	2, 7	8, 11	2(1)	0(1)	5(1)	6(1)	6(3)	3(2)	6(1)	5(1)	6(1)	1(1)	3(1)	0(1)	8(2)	7(2)	0(1)	0(1)
LAR	23, 31	*2703, 53	2, 4	-	1(1)	0(1)	5(1)	3(1)	-	-	0(1)	0(1)	1(2)	0(2)	0(2)	0(2)	9(3)	4(3)	3(1)	3(1)
R42	2, 9	*2704, *2706	-	-	0(1)	3(1)	13(5)	8(5)	6(2)	3(2)	7(4)	7(5)	-	-	0(1)	1(1)	4(1)	3(1)	-	-
Wewak I	11, 24	*2704, 62	2, 4	2	5(1)	6(1)	5(1)	0(1)	8(4)	4(5)	8(2)	5(2)	4(1)	0(1)	4(1)	0(1)	0(1)	0(1)	0(1)	0(1)
KNE	1, 2, 4	*2704, 8	-	2, 3	0(1)	0(1)	10(1)	10(1)	4(1)	9(1)	7(1)	9(1)	3(2)	5(2)	0(1)	0(1)	0(1)	0(1)	0(1)	0(1)
JSL	11	*2704, 48	2	-	0(2)	1(2)	0(1)	0(1)	-	-	-	-	0(1)	0(1)	-	-	1(1)	2(1)	-	-
ET	2, 11	*2704, 38	-	4	0(1)	0(1)	5(1)	7(1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SIA	2, 24	*2704, 60	4	3, 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3(1)	3(1)	0(1)	0(1)
LIE	2, 11	*2706, 54	-	12	0(1)	0(1)	1(1)	2(1)	5(2)	0(1)	0(1)	0(1)	0(1)	1(1)	6(1)	0(1)	0(1)	7(2)	-	-
PAR	11, 24	*2706, 48	-	2, 11	0(2)	0(2)	1(2)	1(2)	2(2)	2(2)	0(1)	5(1)	0(3)	0(3)	1(2)	0(2)	0(2)	0(2)	0(2)	0(2)
JY	2	7	-	4, 6	0(2)	0(2)	0(1)	0(1)	0(1)	0(1)	0(1)	0(1)	2(2)	7(1)	0(1)	0(1)	0(1)	0(1)	6(1)	5(1)
LB	28	60	3	6	0(1)	0(1)	0(1)	0(1)	0(1)	0(1)	0(1)	0(1)	4(4)	8(3)	0(1)	0(1)	3(2)	6(2)	10(2)	7(2)
SWEIG	29	61	2	11	0(1)	2(1)	1(1)	2(1)	5(1)	3(2)	0(1)	0(1)	0(2)	0(1)	0(1)	5(1)	4(1)	7(1)	0(1)	0(1)
TTL	11, 33	51, 54	1, 3	2, 6	0(1)	1(1)	1(1)	1(1)	0(1)	2(1)	0(1)	2(1)	0(2)	0(1)	0(1)	0(1)	3(1)	0(1)	22(1)	12(1)
VEN	3, 31	18, 55	3, 5	-	1(1)	0(1)	1(1)	0(1)	1(1)	6(1)	2(1)	0(1)	2(3)	5(1)	0(1)	0(1)	3(1)	4(1)	0(2)	0(1)
VOO	1, 3	8, 56	1	-	0(1)	0(1)	0(1)	0(1)	0(1)	0(1)	0(1)	0(1)	0(3)	0(2)	9(2)	3(3)	3(1)	0(1)	0(1)	0(1)
FJO	2, 3	7, 16	-	2	0(1)	0(1)	4(1)	0(1)	1(2)	0(1)	8(1)	6(1)	-	-	0(1)	-	-	-	-	-

* Ver Tabla 3.

Tabla 7. Ensayos de inhibición con AcM de los clones del grupo I.

		CTL									
<u>ANTIGENO^a</u>	<u>AcM</u>	<u>12.8DM5</u>		<u>28DTB</u>		<u>22DAG</u>		<u>212DRD</u>		<u>67DRF</u>	
		<u>4:1</u>	<u>1:1</u>	<u>4:1</u>	<u>1:1</u>	<u>4:1</u>	<u>1:1</u>	<u>4:1</u>	<u>1:1</u>	<u>4:1</u>	<u>1:1</u>
B*2705	Nada	58	26	30	14	52	47	17	15	26	23
	Anti-CD3	0	0	2	1	18	11	10	7	0	0
	Anti-CD4	54	18	29	9	51	41	22	14	22	12
	Anti-CD8	6	0	23	5	2	0	0	0	0	0
	ME1	0	0	0	1	2	1	0	0	0	0
	EDU-1	46	23	32	16	41	35	14	12	32	18
B*2705	Nada	52	43	40	14	53	43	59	24	57	36
	Anti-CD3	26	28	26	10	5	0	0	0	4	1
	Anti-CD4	44	35	41	21	58	48	38	33	54	31
	Anti-CD8	3	4	3	2	0	0	0	2	21	9
	ME1	3	1	6	3	6	3	0	0	0	0
	EDU-1	37	33	47	17	42	35	47	31	56	34
B*2705	Nada	45	19	30	24	50	24	42	26	81	47
	Anti-CD3	9	6	8	9	9	6	5	4	24	9
	Anti-CD4	40	19	26	17	39	18	32	20	83	38
	Anti-CD8	10	5	1	2	14	6	23	18	6	0
	ME1	0	0	4	1	17	16	0	0	14	8
	EDU-1	43	20	35	26	52	35	56	42	80	47
B55	Nada	-	-	-	-	-	-	-	-	35	27
	Anti-CD3	-	-	-	-	-	-	-	-	5	10
	Anti-CD4	-	-	-	-	-	-	-	-	37	29
	Anti-CD8	-	-	-	-	-	-	-	-	3	7
	ME1	-	-	-	-	-	-	-	-	2	5
	EDU-1	-	-	-	-	-	-	-	-	49	46

^a Los valores numéricos representan % de lisis específica a las relaciones E:D 4:1 y 1:1. Se utilizó R69 como diana B*2705⁺ en todos los clones excepto 12.8DM5, 22DAG, 67DRF, 102DRF y 2DLE donde se usó LG15, y con 40SRV, 13SRC y 36SRC donde ésta fue R15. La diana B55⁺ fue VEN.

4.5.2.- GRUPO II

Este grupo consta de 6 clones (168DRF proveniente del donante DL, 1GRK y 102GRK de GM y 7S15, 13S15 y 93S15 de SR) que presentan valores positivos de lisis frente a los subtipos B*2705 y B*2701 (Tabla 8). Ninguno de ellos excepto el clon 7S15 reconoce dianas HLA-B27⁻. Este clon reconoce a la diana VEN y por estudio de panel puede descartarse el reconocimiento de los antígenos HLA-A3, 31 y B18 por lo que probablemente el antígeno reconocido es HLA-B55.

La lisis del subtipo B*2705 fue significativamente inhibida con el AcM ME1 (anti-B27) y no con EDU-1 (anti-clase II) (Tabla 9), confirmándose la especificidad anti-B*2705. Además en los clones 168DRF y 93S15 también se comprobó que la lisis del subtipo B*2701 era inhibida por ME1 y no por EDU-1. Para el resto de los clones los ensayos de panel de la Tabla 8 indican que la lisis de LH (B*2701⁺) está mediada por B*2701.

Con los clones 168DRF y 93S15 también se realizaron ensayos de inhibición con AcM anti-CD3, -CD4 y -CD8. En ambos casos se observó una inhibición significativa, total o parcial, de la lisis específica por anti-CD8 y anti-CD3.

Tabla 8. Especificidad fina de los clones del grupo II: Ensayo de panel*.

CELULA	HLA				CTL								
	A	B	C	DR	DL		GM			SR			
					168DRF		102GRK	1GRK		13S15	93S15		7S15
DIANA					<u>4:1</u>	<u>1:1</u>	<u>4:1</u>	<u>4:1</u>	<u>1:1</u>	<u>4:1</u>	<u>4:1</u>	<u>1:1</u>	<u>4:1</u>
LG15	32	*2705	2	1	<u>64(2)</u>	<u>40(2)</u>	<u>22(1)</u>	-	-	-	-	-	-
R69	3, 24	*2705, 7	-	3, 5	<u>101(3)</u>	<u>74(3)</u>	<u>30(2)</u>	<u>32(3)</u>	<u>17(3)</u>	-	<u>58(3)</u>	<u>53(1)</u>	<u>31(1)</u>
R70	3, 24	*2705, 7	-	3, 5	-	-	-	-	-	<u>38(1)</u>	<u>58(3)</u>	-	<u>25(3)</u>
R15	3	*2705, 35	-	-	-	-	-	-	-	<u>45(1)</u>	<u>66(4)</u>	<u>40(1)</u>	<u>25(2)</u>
LH	24	*2701, 8	1, 7	3, 4	<u>70(4)</u>	<u>43(4)</u>	<u>16(1)</u>	<u>30(2)</u>	10(2)	<u>23(1)</u>	<u>29(4)</u>	-	<u>24(3)</u>
R34	2, 24	*2702, 18	-	-	0(1)	0(1)	3(2)	4(1)	0(1)	-	0(1)	-	6(3)
R56	2, 11	*2702, 14	-	-	0(1)	0(1)	-	<u>16(1)</u>	0(1)	8(1)	0(1)	0(1)	<u>16(3)</u>
NW	3, 33	*2702, 8	-	-	-	-	-	0(1)	0(1)	-	-	-	0(1)
CH	31, 32	*2703, 18	2, 7	8, 11	2(1)	2(1)	0(1)	1(2)	4(2)	-	0(2)	-	0(2)
LAR	23, 31	*2703, 53	2, 4	-	7(2)	3(2)	1(1)	0(1)	0(1)	2(1)	6(1)	-	2(1)
R42	2, 9	*2704, *2706	-	-	0(1)	0(1)	5(1)	0(2)	0(2)	-	8(1)	-	0(2)
Wewak I	11, 24	*2704, 62	2, 4	2	-	-	3(1)	6(1)	0(1)	0(1)	0(2)	0(1)	0(1)
KNE	1, 2,4	*2704, 8	-	2, 3	8(1)	7(1)	-	6(1)	0(1)	-	1(1)	0(1)	0(1)
JSL	11	*2704, 48	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LIE	2, 11	*2706, 54	-	12	6(1)	3(1)	8(1)	0(1)	0(1)	0(1)	0(1)	0(1)	0(1)
PAR	11, 24	*2706, 48	-	2, 11	0(1)	0(1)	-	-	-	-	8(2)	0(1)	0(2)
JY	2	7	-	4, 6	1(1)	0(1)	-	-	-	-	0(1)	0(1)	6(1)
LB	28	60	3	6	2(1)	9(1)	-	-	-	-	0(1)	0(1)	0(1)
SWEIG	29	61	2	11	<u>2(1)</u>	<u>5(1)</u>	-	-	-	-	<u>0(1)</u>	<u>0(1)</u>	<u>1(2)</u>
TTL	11, 33	51, 54	1, 3	2, 6	0(1)	0(1)	-	-	-	-	3(1)	0(1)	2(2)
VEN	3, 31	18, 55	3, 5	-	0(1)	0(1)	-	-	-	-	0(1)	0(1)	<u>18(4)</u>
VOO	1, 3	8, 56	1	-	0(1)	0(1)	-	-	-	-	-	-	7(1)
FJO	2,3	7, 16	-	2	0(1)	3(1)	-	-	-	-	-	-	-

* Ver Tabla 3.

Tabla 9. Ensayos de inhibición con AcM de los clones del grupo II.

		CTL					
<u>ANTIGENO^a</u>	<u>AcM</u>	<u>168DRF</u>		<u>93S15</u>		<u>1GRK</u>	
		<u>4:1</u>	<u>1:1</u>	<u>4:1</u>	<u>1:1</u>	<u>4:1</u>	<u>1:1</u>
B*2705	Nada	72	60	62	-	33	20
	Anti-CD3	53	27	56	-	-	-
	Anti-CD4	71	48	69	-	-	-
	Anti-CD8	5	7	32	-	-	-
	ME1	14	11	4	-	3	5
	EDU-1	77	50	60	-	36	30
B*2701	Nada	58	40	35	-	-	-
	Anti-CD3	-	-	-	-	-	-
	Anti-CD4	-	-	-	-	-	-
	Anti-CD8	-	-	-	-	-	-
	ME1	10	0	0	-	-	-
	EDU-1	42	33	33	-	-	-
		<u>102GRK</u>		<u>7S15</u>		<u>13S15</u>	
		<u>4:1</u>	<u>1:1</u>	<u>4:1</u>	<u>1:1</u>	<u>4:1</u>	<u>1:1</u>
B*2705	Nada	30	11	27	-	45	-
	Anti-CD3	-	-	-	-	-	-
	Anti-CD4	-	-	-	-	-	-
	Anti-CD8	-	-	-	-	-	-
	ME1	0	0	2	-	3	-
	EDU-1	26	17	17	-	42	-

^a Los valores numéricos representan % de lisis específica. Las LCL B*2705⁺ usadas fueron: LG15 (clon 168DRF), R15 (clones 93S15, 7S15 y 13S15) y R69 (clones 1GRK y 102GRK). La LCL B*2701⁺ utilizada fue LH.

4.5.3.- GRUPO III

Este grupo está formado por 5 clones (3 de DL y 2 de SR) que reconocen B*2705 y B*2702 (Tabla 10). En general los valores de lisis de los dos subtipos son similares. Sin embargo, los clones 202DRD y 21S69 parecen lisar algo mejor al subtipo B*2702 que al B*2705. No se detectó reactividad

Tabla 10. Especificidad fina de los clones del grupo III: Ensayo de panel*.

CELULA	HLA				CTL									
	A	B	C	DR	DL						SR			
					139DRD		202DRD		172DRF		21S69		29S15	
					4:1	1:1	4:1	1:1	4:1	1:1	4:1	1:1	4:1	1:1
DIANA														
LG15	32	*2705	2	1	44(4)	32(3)	31(1)	28(1)	39(7)	23(4)	-	-	-	-
R69	3, 24	*2705, ?	-	3, 5	58(8)	54(9)	39(6)	30(8)	27(2)	14(1)	40(1)	-	22(1)	-
R70	3, 24	*2705, ?	-	3, 5	-	-	-	-	-	-	-	-	31(3)	-
R15	3	*2705, 35	-	-	-	-	-	-	-	-	27(2)	-	35(2)	-
LH	24	*2701, 8	1, 7	3, 4	1(1)	0(1)	3(2)	7(1)	3(4)	0(1)	5(2)	-	11(3)	-
R34	2, 24	*2702, 18	-	-	34(3)	24(3)	52(4)	39(4)	15(5)	7(3)	55(3)	-	39(3)	-
R56	2, 11	*2702, 14	-	-	41(6)	35(6)	74(4)	50(4)	22(6)	11(4)	66(1)	-	21(1)	-
NW	3, 33	*2702, 8	-	-	31(1)	-	25(2)	-	4(1)	1(1)	31(2)	-	20(3)	-
CH	31, 32	*2703, 18	2, 7	8, 11	4(1)	8(1)	0(1)	4(1)	5(1)	3(1)	0(1)	-	7(2)	-
LAR	23, 31	*2703, 53	2, 4	-	7(5)	6(4)	5(2)	1(2)	3(1)	4(1)	4(1)	-	12(2)	-
R42	2, 9	*2704, *2706	-	-	2(3)	9(2)	0(2)	0(2)	4(2)	5(2)	0(1)	-	5(1)	-
Wewak I	11, 24	*2704, 62	2, 4	2	4(3)	8(2)	7(2)	3(2)	7(2)	7(2)	0(1)	-	0(1)	-
KNE	1, 2, 4	*2704, 8	-	2, 3	6(2)	3(2)	2(2)	2(2)	-	-	0(1)	-	0(1)	-
ET	2, 11	*2704, 38	-	4	6(1)	7(1)	5(1)	2(1)	0(1)	0(1)	-	-	-	-
LIE	2, 11	*2706, 54	-	12	2(1)	0(1)	5(2)	6(2)	0(2)	0(1)	0(1)	-	0(1)	-
PAR	11, 24	*2706, 48	-	2, 11	3(1)	5(1)	5(2)	5(2)	-	-	0(1)	-	0(2)	-
JY	2	7	-	4, 6	4(1)	0(1)	3(1)	0(1)	1(1)	2(1)	0(1)	-	0(1)	-
LB	28	60	3	6	4(1)	3(1)	1(2)	0(2)	0(1)	-	0(1)	-	0(1)	-
SWEIG	29	61	2	11	3(1)	2(1)	0(1)	2(1)	2(1)	-	1(1)	-	0(1)	-
TTL	11, 33	51, 54	1, 3	2, 6	11(3)	0(2)	0(1)	0(1)	2(1)	1(1)	0(1)	-	-	-
VEN	3, 31	18, 55	3, 5	-	1(1)	4(1)	5(2)	4(2)	5(1)	3(1)	0(1)	-	-	-
VOO	1, 3	8, 56	1	-	4(4)	0(3)	1(1)	0(1)	0(1)	-	0(1)	-	-	-
FJO	2, 3	7, 16	-	2	-	-	0(1)	5(1)	0(1)	-	-	-	-	-

* Ver Tabla 3.

con antígenos distintos de HLA-B27.

En todos los casos, excepto con el clon 172DRF, se realizaron ensayos de inhibición con AcM (Tabla 11) que confirmaron la especificidad anti-HLA-B27 de estos clones. Además tanto anti-CD3 como anti-CD8 inhiben específicamente la lisis de dianas B*2702⁺ en todos los casos probados, excepto con el clon 202DRD donde anti-CD8 no inhibe dicha lisis. Esto confirma la reactividad heteroclítica de este clo con B*2702.

Tabla 11. Ensayos de inhibición con AcM de los clones del grupo III.

ANTIGENO ^a	AcM	CTL							
		139DRD		202DRD		21S69		29S15	
		4:1	1:1	4:1	1:1	4:1	1:1	4:1	1:1
B*2705	Nada	69	64	49	30	23	15	46	-
	Anti-CD3	6	5	0	0	2	6	6	-
	Anti-CD4	57	43	23	20	19	14	32	-
	Anti-CD8	0	0	0	0	7	6	1	-
	ME1	1	0	0	0	5	-	3	-
	EDU-1	61	50	31	21	24	-	37	-
B*2702	Nada	37	32	55	50	57	-	18	13
	Anti-CD3	8	7	7	3	22	-	-	-
	Anti-CD4	32	34	45	27	39	-	-	-
	Anti-CD8	6	3	55	54	0	-	-	-
	ME1	11	14	19	13	0	-	0	0
	EDU-1	37	31	47	32	57	-	23	16

^a Los valores numéricos representan % de lisis específica. Se usaron las siguientes LCL B*2705⁺: R69 con los clones 139DRD y 202DRD, R15 con 21S69 y R70 con 29S15 mientras que las LCL B*2702⁺ fueron R56 (clones 139DRD y 202DRD) y R34 (clones 21S69 y 29S15).

El clon 172DRF presenta valores de lisis con el subtipo B*2702 bastante reducidos frente a dos LCL y valores negativos con otra diana. La reactividad anti-B*2702 fue confirmada por ensayos de lisis con el transfectante Hmy-2C1R-B*2702 (177). La diferente reactividad observada con la LCL NW (Tabla 10) frente a las otras líneas B*2702 podría ser debida a una alteración del epítipo reconocido

en esta célula por parte de este clon. Este fenómeno se ha observado con otros clones como el 202DRD donde la lisis de NW es significativamente inferior y se comentará mas detalladamente (apartado 4.9).

GRUPO IV

Los clones pertenecientes a este grupo presentan reactividad frente a los subtipos B*2705 y B*2703. Dentro de este grupo se encuadran 18 clones que se han dividido en dos subgrupos atendiendo a su capacidad de lisar otras dianas HLA-B27⁻. Dentro del primero se clasifican 9 clones que únicamente reaccionan con B*2705 y B*2703: 144DRF de DL; 31GRK, 74GRK, GM7, 135GRK y 5A2 de GM y 12SRF, 33.8S15 y 23SRC de SR. El ensayo de panel de estos clones se resume en la Tabla 12. Cuatro de ellos (144DRF, GM7, 135GRK y 5A2) lisan significativamente tanto a dianas B*2705⁺ como a dianas B*2703⁺, mientras que el resto presentan valores de lisis de alguna diana B*2703⁺ inferiores a las dianas B*2705⁺ sobre todo a la relación E:D menor. El clon 144DRF se ha considerado que no reconoce al subtipo B*2702 ya que aunque lisa marginalmente a la célula R34 (16% de lisis a E:D 4:1), la otra célula B*2702⁺ probada (R56) presenta valores de lisis <10%. En cambio, se ha considerado que los clones 31GRK, 74GRK y 12SRF reconocen a B*2703 puesto que aunque los valores de lisis son bajos, son >10% en las dos LCL usadas y esta debil reactividad fue confirmada por ensayos de inhibición con AcM.

El ensayo de inhibición de los clones de este subgrupo con AcM se resume en la Tabla 13. En todos los casos ensayados se observó una disminución importante de la lisis en presencia del AcM ME1 pero no con EDU-1. Para los clones 5A2 y 23SRC no se realizaron ensayos de inhibición con AcM anti-HLA con dianas B*2703. En el caso del clon 5A2 la molécula reconocida es B*2703 ya que los únicos antígenos que comparten las líneas CH y LAR son HLA-A31 y B*2703 y la lisis de otra célula A31⁺ (VEN) es negativa. El estudio del clon 23SRC fue muy limitado y su clasificación es tentativa atendiendo únicamente a su similitud con el resto de los clones descritos en este apartado. En todos los casos se observó una importante disminución de la lisis con anti-CD3, y en general, pero no siempre con anti-CD8.

Tabla 13. Ensayos de inhibición con AcM de los clones del grupo IV.

		CTL									
ANTIIGENO ^a	AcM	<u>144DRF</u>		<u>31GRK</u>		<u>74GRK</u>		<u>GM7</u>		<u>135GRK</u>	
		4:1	1:1	4:1	1:1	4:1	1:1	4:1	1:1	4:1	1:1
B*2705	Nada	58	28	-	-	40	24	60	50	80	70
	Anti-CD3	22	11	-	-	-	0	17	20	55	44
	Anti-CD4	58	24	-	-	-	21	46	44	83	77
	Anti-CD8	26	6	-	-	-	10	8	9	76	64
	ME1	10	6	-	-	8	-	0	4	0	0
	EDU-1	50	31	-	-	38	-	55	51	77	70
B*2703	Nada	28	11	18	-	17	14	36	35	65	53
	Anti-CD3	4	0	-	-	-	3	3	10	53	40
	Anti-CD4	33	13	-	-	-	15	55	55	87	72
	Anti-CD8	19	0	-	-	-	2	0	4	71	72
	ME1	0	0	2	-	5	-	0	0	8	11
	EDU-1	33	8	19	-	19	-	65	56	61	48
		<u>5A2</u>		<u>12SRF</u>		<u>33S15</u>		<u>23SRC</u>			
		4:1	1:1	4:1	1:1	4:1	1:1	4:1	1:1		
B*2705	Nada	55	40	55	42	54	15	46	21		
	Anti-CD3	9	0	12	7	-	4	-	-		
	Anti-CD4	57	39	48	29	-	20	-	-		
	Anti-CD8	54	36	1	0	-	9	-	-		
	ME1	5	3	0	0	7	-	13	9		
	EDU-1	42	39	60	52	50	-	34	17		
B*2703	Nada	37	20	46	20	37	13	-	-		
	Anti-CD3	13	9	11	-	13	4	-	-		
	Anti-CD4	29	16	45	-	31	16	-	-		
	Anti-CD8	18	12	0	-	1	0	-	-		
	ME1	-	-	2	0	0	0	-	-		
	EDU-1	-	-	60	25	48	24	-	-		

^a Los valores numéricos representan % de lisis específica. Las dianas B*2705⁺ fueron: LG15 (144DRF y GM7), R69 (74GRK, 135GRK, 5A2 y 23SRC) y R15 (12srf y 33S15) y las B*2703⁺ fueron LAR en todos los casos excepto con GM7 y 135GRK donde se utilizó CH.

El segundo subgrupo consta de otros 9 clones que además de lisar dianas B*2705 y B*2703

reconocen también antígenos HLA-B40 (B60/61) (Tabla 14). Todos ellos provienen del respondedor SR, fueron generados en tres clonajes distintos y forman un grupo muy homogéneo, puesto que todos ellos lisan a las dianas B*2705⁺ sobre un 40-60% de lisis específica y a las dianas B*2703⁺ entre 15 y 30%. Además, 8 de los 9 clones lisan dianas HLA-B60⁺ y sólo uno de ellos (13SLG) reconoce a una diana HLA-B61⁺. La lisis del clon 13SLG hacia la LCL SWEIG está mediada por HLA-B61 ya que el otro antígeno de clase I presente (HLA-A29) se descarta porque el respondedor SR posee dicho antígeno. La lisis de las dianas B60/B61, excepto en el caso del clon 11S15, es mayor o igual a la del antígeno B*2703. Es importante resaltar que ninguno de los clones es capaz de reconocer a la vez a ambos antígenos.

En 8 de los 9 clones se pudieron realizar ensayos de inhibición con AcM (Tabla 15) donde se puede concluir que en la mayoría de los casos las lisis son inhibidas específicamente con los AcM α CD3, anti-CD8, ME1 y W6/32 y no con los AcM anti-CD4 y EDU-1. Solo se diferencian de este comportamiento general los clones 11S15 y 13SLG ya que no inhiben de forma apreciable el AcM anti-CD8 con las dianas B*2703⁺ y B61⁺ respectivamente.

Table 14. Especificidad fina de los clones del grupo IV (cont.): Ensayo de panel^a.

CELULA	HLA				CTL																	
	A	B	C	DR	<u>18.8SRY</u>		<u>12SLG</u>		<u>48SLG</u>		<u>59SLG</u>		<u>60SLG</u>		<u>62SLG</u>		<u>4S15</u>		<u>11S15</u>		<u>13SLG</u>	
					4:1	1:1	4:1	1:1	4:1	1:1	4:1	1:1	4:1	1:1	4:1	1:1	4:1	1:1	4:1	1:1	4:1	1:1
LG16	32	*2705	2	1	-	-	<u>30(2)</u>	<u>19(2)</u>	<u>64(1)</u>	<u>39(1)</u>	-	<u>42(4)</u>	<u>29(9)</u>	<u>43(3)</u>	<u>27(3)</u>	-	-	-	-	<u>44(3)</u>	<u>23(2)</u>	
R69	3, 24	*2705, 7	-	3, 5	<u>50(4)</u>	<u>36(2)</u>	<u>47(3)</u>	<u>29(2)</u>	<u>43(5)</u>	<u>38(4)</u>	<u>25(1)</u>	<u>48(3)</u>	<u>41(3)</u>	<u>43(2)</u>	<u>49(2)</u>	<u>36(1)</u>	-	<u>33(4)</u>	<u>37(3)</u>	<u>44(2)</u>		
R70	3, 24	*2705, 7	-	3, 5	-	-	-	-	<u>43(2)</u>	<u>26(2)</u>	-	-	-	-	-	<u>57(3)</u>	<u>47(1)</u>	<u>49(2)</u>	<u>65(2)</u>	-		
R.S	3	*2705, 35	-	-	<u>45(6)</u>	<u>44(4)</u>	<u>54(4)</u>	<u>35(3)</u>	<u>42(3)</u>	<u>29(3)</u>	<u>46(2)</u>	<u>57(5)</u>	<u>43(5)</u>	<u>63(2)</u>	<u>41(3)</u>	<u>58(6)</u>	<u>35(3)</u>	<u>54(3)</u>	<u>46(4)</u>	-		
LH	24	*2701, 8	1, 7	3, 4	2(3)	2(2)	0(2)	2(2)	6(2)	0(2)	0(1)	4(2)	5(2)	3(2)	7(2)	6(3)	5(1)	5(2)	0(2)	0(2)		
R34	2, 24	*2702, 18	-	-	6(1)	-	4(3)	0(1)	7(1)	1(1)	0(1)	6(2)	6(2)	6(1)	5(1)	7(1)	-	0(2)	5(3)	2(1)		
R36	2, 11	*2702, 14	-	-	0(1)	0(1)	0(2)	-	0(1)	0(1)	7(1)	0(1)	0(1)	13(1)	10(1)	9(2)	0(1)	0(1)	8(2)	-		
CHR	2, 3	*2702, 35	2, 4	1, 5	-	-	-	-	0(1)	0(1)	-	0(1)	0(1)	0(1)	0(1)	-	-	-	0(1)	-		
NW	3, 33	*2702, 8	-	-	0(1)	0(1)	9(1)	7(1)	0(1)	0(1)	-	0(2)	4(2)	2(2)	4(2)	-	-	-	5(2)	-		
CH	31, 32	*2703, 18	2, 7	8, 11	<u>22(3)</u>	11(3)	<u>32(2)</u>	<u>21(2)</u>	<u>39(2)</u>	<u>19(3)</u>	-	<u>30(2)</u>	<u>25(2)</u>	<u>39(3)</u>	<u>28(3)</u>	<u>23(2)</u>	-	<u>16(2)</u>	<u>16(1)</u>	-		
LAR	23, 31	*2703, 53	2, 4	-	<u>15(4)</u>	11(2)	<u>29(3)</u>	<u>17(3)</u>	<u>24(3)</u>	<u>19(2)</u>	<u>26(1)</u>	<u>21(3)</u>	<u>13(3)</u>	<u>20(2)</u>	-	<u>36(2)</u>	11(1)	<u>21(3)</u>	<u>36(2)</u>	<u>31(1)</u>		
R42	2, 9	*2704, *2706	-	-	0(2)	0(1)	0(1)	0(1)	0(1)	10(1)	-	0(1)	1(1)	0(1)	0(1)	0(1)	-	0(1)	2(1)	2(1)		
Wewaki	11, 24	*2704, 62	2, 4	2	1(2)	0(1)	0(1)	6(1)	0(1)	5(1)	0(1)	4(1)	3(1)	3(1)	3(1)	1(1)	-	0(1)	0(1)	1(1)		
KNE	1, 24	*2704, 8	-	2, 3	0(1)	4(1)	2(1)	1(1)	0(1)	-	5(1)	5(1)	6(1)	8(1)	7(1)	0(1)	0(1)	0(1)	6(1)	7(1)		
JSL	11	*2704, 48	2	-	-	-	-	-	9(1)	-	-	0(1)	0(1)	6(1)	8(1)	-	-	-	-	-		
LIE	2, 11	*2706, 54	-	12	0(1)	0(1)	0(1)	0(1)	0(1)	0(1)	6(1)	0(2)	0(2)	0(1)	0(1)	0(1)	-	0(2)	4(1)	3(1)		
PAR	11, 24	*2706, 48	-	2, 11	0(3)	0(1)	0(1)	0(1)	0(2)	0(2)	-	0(1)	0(1)	0(3)	1(3)	0(1)	0(1)	0(1)	5(2)	0(1)		
JY	2	7	-	4, 6	7(2)	-	1(1)	3(1)	0(1)	0(1)	-	0(1)	2(1)	6(2)	6(2)	3(1)	0(1)	0(1)	0(2)	-		
LB	28	60	3	6	<u>46(5)</u>	<u>33(3)</u>	<u>41(4)</u>	<u>29(3)</u>	<u>39(3)</u>	<u>17(3)</u>	<u>38(2)</u>	<u>51(6)</u>	<u>35(2)</u>	<u>37(3)</u>	<u>17(4)</u>	<u>20(2)</u>	10(1)	<u>13(1)^b</u>	3(2)	-		
SIA	2, 24	*2704, 60	4	3, 5	10(2)	3(1)	<u>17(3)</u>	<u>15(1)</u>	<u>34(3)</u>	<u>28(2)</u>	<u>19(1)</u>	<u>50(4)</u>	<u>34(2)</u>	<u>46(1)</u>	<u>19(1)</u>	<u>31(2)</u>	<u>19(2)</u>	<u>18(1)</u>	0(1)	-		
OT	2, 24	74, 60	-	-	<u>25(2)</u>	<u>26(1)</u>	<u>17(3)</u>	-	<u>25(2)</u>	<u>15(2)</u>	<u>27(2)</u>	<u>24(2)</u>	<u>17(2)</u>	<u>33(2)</u>	<u>22(1)</u>	<u>25(4)</u>	<u>16(3)</u>	<u>30(3)</u>	0(1)	-		
SWEIG	29	61	2	11	1(2)	-	0(1)	2(1)	6(2)	5(1)	-	6(1)	6(1)	4(1)	0(1)	0(1)	0(1)	0(1)	<u>50(4)</u>	-		
TTL	11, 33	51, 54	1, 3	2, 6	0(2)	-	6(1)	0(1)	2(1)	0(1)	-	1(2)	6(2)	0(1)	5(1)	0(1)	0(1)	0(1)	3(2)	-		
VEN	3, 31	18, 55	3, 5	-	0(3)	0(1)	0(1)	4(1)	5(1)	6(1)	-	0(1)	8(1)	0(1)	0(1)	2(1)	5(1)	0(1)	3(2)	-		
VOO	1, 3	8, 56	1	-	4(2)	-	0(1)	0(1)	0(1)	0(1)	-	0(1)	0(1)	0(1)	0(1)	2(1)	1(1)	0(1)	1(2)	-		

^a Ver Tabla 3 ^b La lisis frente a HLA-B60 se consideró positiva ya que todas las LCL usadas fueron lisadas con valores >10%.

Tabla 15. Ensayos de inhibición con AcM de los clones del grupo IV (Cont.).

		CTL							
ANTIGENO ^a	AcM	<u>18.8SRY</u>		<u>12SLG</u>		<u>48SLG</u>		<u>60SLG</u>	
		4:1	1:1	4:1	1:1	4:1	1:1	4:1	1:1
B*2705	Nada	76	55	58	43	33	20	58	33
	Anti-CD3	12	14	2	0	4	1	8	3
	Anti-CD4	92	42	41	28	28	11	38	31
	Anti-CD8	7	7	0	2	0	0	3	1
	ME1	4	3	0	0	0	0	20	6
	EDU-1	60	56	43	35	41	26	46	38
B*2703	Nada	21	16	26	18	20	15	31/18	28/10
	Anti-CD3	0	-	0	0	-	14	0/-	0/-
	Anti-CD4	22	-	24	7	-	17	16/-	10/-
	Anti-CD8	0	-	0	0	-	0	0/-	0/-
	ME1	0	0	1	0	0	-	-/0	-/0
	EDU-1	25	18	18	17	19	-	-/15	-/15
B60	Nada	49	41	19	15	37	16	56/29	46/13
	Anti-CD3	-	-	1	7	-	-	-/13	-/6
	Anti-CD4	-	-	20	16	-	-	-/21	-/13
	Anti-CD8	-	-	4	8	-	-	-/0	-/0
	W6/32	6	4	-	0	4	0	2/-	10/-
	EDU-1	57	45	-	17	38	20	55/-	42/-
B*2705		<u>62SLG</u>		<u>4S15</u>		<u>11S15</u>		<u>13SLG</u>	
		4:1	1:1	4:1	1:1	4:1	1:1	4:1	1:1
	Nada	50/67	38/58	55	34	56	-	67	44
	Anti-CD3	-/18	-/19	26	12	2	-	13	-
	Anti-CD4	-/49	-/49	68	30	51	-	48	-
	Anti-CD8	-/8	-/3	10	4	0	-	4	-
ME1	0/-	7/-	2	-	3	-	1	0	
EDU-1	40/-	30/-	65	-	51	-	59	42	
B*2703	Nada	24/45	14/48	32	11	27	-	17	-
	Anti-CD3	-/0	-/2	2	0	6	-	-	-
	Anti-CD4	-/40	-/35	31	16	25	-	-	-
	Anti-CD8	-/0	-/0	2	0	21	-	-	-
	ME1	0/-	0/-	0	-	0	-	0	-
	EDU-1	29/-	25/-	27	-	19	-	25	-
B60 ^b	Nada	38	22	29	15	44	-	69	22
	Anti-CD3	-	-	6	-	-	-	-	5
	Anti-CD4	-	-	21	-	-	-	-	20
	Anti-CD8	-	-	0	-	-	-	-	22
	W6/32	0	5	2	0	14	-	31	-
	EDU-1	32	22	30	34	44	-	62	-

^a Los valores numéricos representan % de lisis específica. La LCL B*2705⁺ en todos los casos fue R15

excepto con los clones 18.8SRY y 12SLG, la LCL B*2703⁺ fue LAR excepto en los clones 12SLG, 48SLG, 60SLG y 62SLG donde se utilizó CH y las células B60⁺ fueron LB excepto con el clon 12SLG donde se usó SIA y los clones 62SLG y 4S15 donde las dianas fueron OT.

^b La célula diana usada con el clon 13SLG es HLA-B61⁺ (SWEIG).

Con algunos de los clones de la Tabla 14 se realizaron ensayos de inhibición fría con dianas representativas de los antígenos HLA-B60 (LB), B61 (SWEIG) y B48 (PAR)(Figura 4). Este último antígeno se consideró porque sólo se diferencia de B61 en 7 posiciones, localizadas en el extremo N-terminal de la molécula. En general, los clones que lisan dianas B60⁺ ó B61⁺ no reconocen al otro antígeno ni a B48 aunque existen algunas excepciones:

* Con el clon 13SLG, la lisis del subtipo B*2705 es parcialmente inhibida por células HLA-B48⁺ pero no por la B60⁺ (Figura 4B).

* Células B48⁺ compiten con una eficiencia intermedia con dianas B*2705⁺ marcadas en el caso del clon 4S15 (Figura 4I).

La inhibición por la LCL PAR (B*2706, B48) se consideró mediada por B48 ya que se usó en los ensayos de inhibición fría otra célula B*2706⁺ (R42) para diferenciar la posible influencia de este subtipo en la inhibición observada (R42 no inhibió la lisis en ningún caso). Además estos experimentos demuestran la naturaleza monoclonal de la especificidad anti-B27/B60/B61.

4.5.5.- GRUPO V

Se han caracterizado dos clones (16S15 y 41S15) que reaccionan con B*2705, B*2701 y B*2702. Estos dos últimos subtipos presentan como característica común el compartir dos de los tres cambios que ambos presentan en su estructura con respecto a B*2705 (N77A81). El resumen del estudio de panel de dichos clones se muestra en la Tabla 16. Se observa que todos los antígenos de clase I distintos de HLA-B27, y los antígenos ligados serológicamente presentes en las LCL que son lisadas por estos clones (HLA-A1, 2, 3, 11, 24, 31 y B8, 14, 18) también se encuentran en otras LCL que no son reconocidas por estos clones (CH, LAR, WI, LIE, etc.) por lo que son descartados como responsables de la especificidad observada.

El clon 16S15 no lisa la célula NW (B*2702), pero sí otras dos LCL B*2702⁺ (R34 y R56). NW

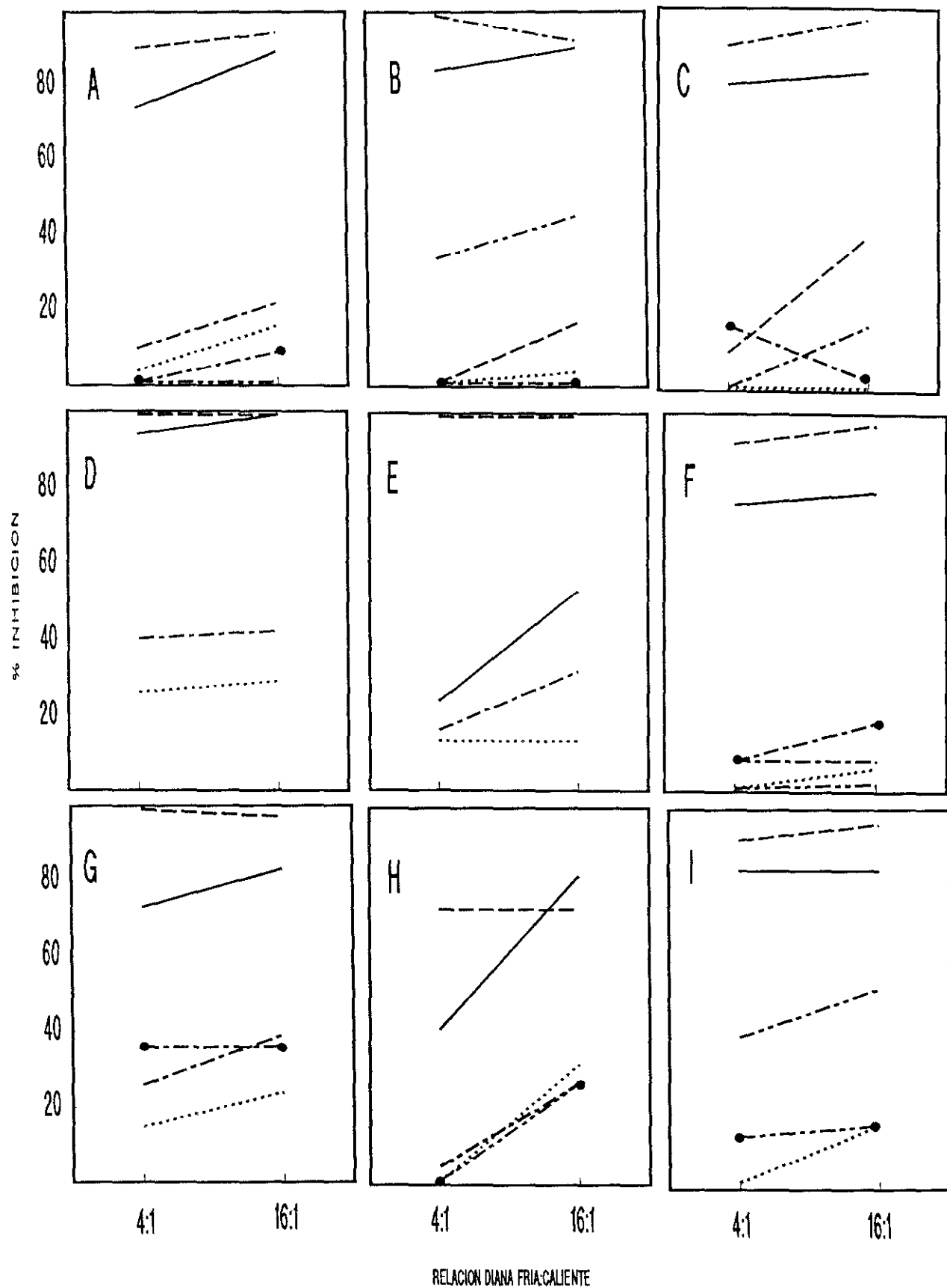


Figura 4. Inhibición fría de la citotoxicidad de los clones 12SLG (panel A), 13SLG (B y C), 48SLG (D y E), 60SLG (F), 62SLG (G y H) y 4S15 (I) frente a células diana marcadas R69 (B*2705) (paneles A, B, D, F, G e I), SWEIG (B61) (C) y LB (B60)(E y H). La relación E:D usada en todos los casos fue 4:1. Los porcentajes de liberación específica de ^{51}Cr en ausencia de células competidoras fueron: 50, 63, 30 65, 38, 66, 92, 22 y 75% respectivamente. Se usaron como células competidoras las siguientes LCL: R69 (—), LB (— —), SWEIG (— • —), PAR (— • • —), R42 (●—•—●) y JY (● ●).

Tabla 16. Especificidad fina de los clones del grupo V: Ensayo de panel^a

<u>CELULA</u>	<u>HLA</u>				<u>CTL</u>	
	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>DR</u>	<u>16S15</u>	<u>41S15</u>
<u>DIANA</u>					<u>4:1</u>	<u>4:1</u>
LG15	32	*2705	2	1	-	-
R69	3, 24	*2705, 7	-	3, 5	<u>32(2)</u>	<u>21(1)</u>
R70	3, 24	*2705, 7	-	3, 5	<u>33(4)</u>	<u>18(1)</u>
R15	3	*2705, 35	-	-	<u>29(4)</u>	<u>33(1)</u>
LH	24	*2701, 8	1, 7	3, 4	<u>25(3)</u>	<u>21(1)</u>
R34	2, 24	*2702, 18	-	-	<u>21(4)</u>	<u>49(1)</u>
R56	2, 11	*2702, 14	-	-	<u>35(2)</u>	<u>44(1)</u>
NW	3, 33	*2702, 8	-	-	4(5)	<u>24(1)</u>
CH	31, 32	*2703, 18	2, 7	8, 11	0(1)	0(1)
LAR	23, 31	*2703, 53	2, 4	-	6(2)	4(1)
R42	2, 9	*2704, *2706	-	-	0(1)	10(1)
Wewak I	11, 24	*2704, 62	2, 4	2	0(1)	-
KNE	1, 2,4	*2704, 8	-	2, 3	0(2)	0(1)
JSL	11	*2704, 48	2	-	-	-
LIE	2, 11	*2706, 54	-	12	0(1)	0(1)
PAR	11, 24	*2706, 48	-	2, 11	0(1)	-
JY	2	7	-	4, 6	0(1)	-
LB	28	60	3	6	0(1)	-
SIA	2, 24	*2704, 60	4	3, 5	-	-
OT	2, 24	7,4, 60	-	-	-	-
SWEIG	29	61	2	11	0(1)	-
TIL	11, 33	51, 54	1, 3	2, 6	0(1)	-
VEN	3, 31	18, 55	3, 5	-	<u>33(3)</u>	-
VOO	1, 3	8, 56	1	-	<u>18(2)</u>	-

^a Ver Tabla 3.

ha sido descrita como defectiva en la presentación de ciertos péptidos restringidos. En el presente estudio se han detectado otros clones que presentan este comportamiento diferencial con esta célula y cuyas implicaciones se discutirán más detalladamente (apartado 4.9).

El clon 16S15 que pudo estudiarse más detalladamente presentó una apreciable reactividad con las dianas VEN y VOO. Ensayos de inhibición con AcM (Tabla 17) confirmaron que la reactividad de ambos clones con B*2705, B*2702 y, en el caso del clon 16S15, HLA-B56.

Tabla 17. Ensayos de inhibición con AcM de los clones del grupo V.

		CTL			
ANTIIGENO ^a	AcM	16S15		41S15	
		4:1	1:1	4:1	1:1
B*2705	Nada	31	26	33	-
	Anti-CD3	11	4	-	-
	Anti-CD4	28	18	-	-
	Anti-CD8	8	6	-	-
	ME1	11	-	0	-
	EDU-1	39	-	24	-
B*2702	Nada	30	10	49	24
	Anti-CD3	3	0	-	-
	Anti-CD4	22	7	-	-
	Anti-CD8	0	0	-	-
	ME1	0	-	5	4
	EDU-1	29	-	54	28
B56	Nada	13	-	-	-
	Anti-CD3	-	-	-	-
	Anti-CD4	-	-	-	-
	Anti-CD8	-	-	-	-
	ME1	7	-	-	-
	EDU-1	14	-	-	-

^a Los valores numéricos representan % de lisis específica. Las LCL usadas fueron: R15 (B*2705), R34 (B*2702) y VOO (B56).

4.5.6.- GRUPO VI

Este grupo consta de un único clon, 33S69, del respondedor SR, capaz de lisar dianas de los subtipos B*2705, B*2701 y B*2703 (Tabla 18). Los valores de lisis frente a B*2701 sugieren un posible reconocimiento heteroclítico de este subtipo. Este clon no presentó reactividad adicional con ningún otro antígeno ensayado.

El análisis de inhibición con AcM (Tabla 19) confirmó que las estructuras reconocidas en las dianas eran los distintos subtipos de HLA-B27 ya que la lisis fue inhibida por el AcM ME-1. El efecto heteroclítico observado con B*2701 fue corroborado por una menor inhibición de la lisis de LH con los AcM anti-CD3 y anti-CD8 (Tabla 19).

Tabla 19. Ensayos de inhibición con AcM del clon 33S69 del grupo VI.

<u>ANTIGENO^a</u>	<u>E:D</u>	<u>33S69</u>					
		<u>Nada</u>	<u>Anti-CD3</u>	<u>Anti-CD4</u>	<u>Anti-CD8</u>	<u>ME1</u>	<u>EDU-1</u>
B*2705	4:1	62/52	-/9	-/32	-/4	2/-	56/-
	1:1	21	5	16	4	-	-
B*2701	4:1	86/71	-/49	-/61	-/48	6/-	78/-
	1:1	31	37	42	36	-	-
B*2703	4:1	23/21	8/-	41/-	13/-	-/0	-/29

^a Los valores numéricos representan % de lisis específica. Las LCL usadas fueron: R15 (B*2705), LH (B*2701) y LAR (B*2703).

Tabla 18. Especificidad fina del clon 33S69 del grupo VI: Ensayo de panel*

CELULA	HLA				CTL	
	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>DR</u>	<u>33S69</u>	
<u>DIANA</u>					<u>4:1</u>	<u>1:1</u>
LG15	32	*2705	2	1	-	-
R69	3, 24	*2705, 7	-	3, 5	<u>35(2)</u>	-
R70	3, 24	*2705, 7	-	3, 5	<u>51(1)</u>	-
R15	3	*2705, 35	-	-	<u>57(3)</u>	<u>21(1)</u>
LH	24	*2701, 8	1, 7	3, 4	<u>73(3)</u>	<u>31(1)</u>
R34	2, 24	*2702, 18	-	-	1(2)	-
R56	2, 11	*2702, 14	-	-	6(1)	-
NW	3, 33	*2702, 8	-	-	0(1)	0(1)
CH	31, 32	*2703, 18	2, 7	8, 11	<u>19(2)</u>	-
LAR	23, 31	*2703, 53	2, 4	-	<u>29(3)</u>	12(1)
R42	2, 9	*2704, *2706	-	-	0(1)	-
Wewak I	11, 24	*2704, 62	2, 4	2	6(2)	-
KNE	1, 2.4	*2704, 8	-	2, 3	0(1)	0(1)
LIE	2, 11	*2706, 54	-	12	0(1)	-
PAR	11, 24	*2706, 48	-	2, 11	0(1)	0(1)
JY	2	7	-	4, 6	0(1)	0(1)
LB	28	60	3	6	0(2)	0(1)
SIA	2, 24	*2704, 60	4	3, 5	7(1)	-
OT	2, 24	7.4, 60	-	-	2(1)	-
SWEIG	29	61	2	11	4(1)	0(1)
TTL	11, 33	51, 54	1, 3	2, 6	0(1)	-
VEN	3, 31	18, 55	3, 5	-	2(1)	-
VOO	1, 3	8, 56	1	-	1(1)	-

* Ver Tabla 3.

4.5.7.- GRUPO VII

Este grupo está definido por el clon 58GRK (del respondedor GM). Este CTL reconoce B*2705 y B*2704 de forma muy similar y con menor avidez a B*2701 (Tabla 20). Este es el patrón de reacción clonal más sencillo entre los que incluyen a los subtipos B*2704 ó B*2706. El clon no presentó ninguna otra reactividad con los antígenos distintos de HLA-B27 ensayados.

La Tabla 21 presenta los ensayos de inhibición con AcM de este clon frente a 3 dianas representativas de los tres subtipos lisados.

Tabla 21. Ensayos de inhibición con AcM del clon 58GRK del grupo VII.

<u>ANTIGENO^a</u>	<u>E:D</u>	<u>AcM</u>					
		<u>Nada</u>	<u>Anti-CD3</u>	<u>Anti-CD4</u>	<u>Anti-CD8</u>	<u>ME1</u>	<u>EDU-1</u>
B*2705	4:1	58/66	8/-	50/89	-/5	5/-	47/-
	1:1	47/52	1/-	34/65	-/4	0/-	34/-
B*2704	4:1	55	15	80	0	0	60
	1:1	29	11	83	2	0	26
B*2701	4:1	17	1	11	0	6	20

^a Los valores numéricos representan % de lisis específica. Las LCL usadas fueron: R69 (B*2705), Wewaki (B*2704) y LH (B*2701).

Los AcM anti-CD3, anti-CD8 y ME1 inhiben significativamente la lisis de la respectiva célula diana, mientras que anti-CD4 y EDU-1 no presentan inhibición apreciable de la lisis.

Se efectuaron ensayos de inhibición fría entre los subtipos B*2705 y B*2704 para confirmar la naturaleza monoclonal de la especificidad de este clon (Figura 5). Ambas células se inhibieron mutuamente con una eficiencia comparable. Ello indica que ambos subtipos son reconocidos por el mismo clon.

Se realizó asimismo un análisis de la reactividad de este clon con varios mutantes de HLA-B27 que mimetizaban cambios presentes en los subtipos. Todas estas mutaciones se encontraban ubicadas en las hélices α del antígeno de histocompatibilidad. También se ensayó la reactividad contra la

Tabla 20. Especificidad fina del clon 58GRK del grupo VII: Ensayo de panel*

<u>CELULA</u>	<u>HLA</u>				<u>CTL</u>	
	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>DR</u>	<u>58GRK</u>	
					<u>4:1</u>	<u>1:1</u>
LG15	32	*2705	2	1	49(2)	27(2)
R69	3, 24	*2705, 7	-	3, 5	62(16)	50(12)
LH	24	*2701, 8	1, 7	3, 4	18(6)	15(5)
R34	2, 24	*2702, 18	2,5	3,5	0(1)	0(1)
R56	2, 11	*2702, 14	-	-	4(2)	2(2)
NW	3, 33	*2702, 8	-	-	0(1)	0(1)
CH	31, 32	*2703, 18	2, 7	8, 11	6(2)	7(2)
LAR	23, 31	*2703, 53	2, 4	-	1(1)	3(1)
R42	2, 9	*2704, *2706	-	-	42(6)	22(6)
WEI	11,24	*2704, 62	2, 4	2	42(6)	23(4)
KNE	1, 2	*2704, 8	-	2, 3	43(1)	22(1)
LIE	2, 11	*2706, 5	3	12	0(1)	0(1)
PAR	11, 24	*2706, 48	-	2, 11	2(3)	0(3)
JY	2	7	-	4, 6	1(1)	3(1)
LB	28	60	3	6	6(2)	3(2)
SWEIG	29	61	2	11	5(1)	0(1)
TTL	11, 33	51, 54	1, 3	2, 6	0(1)	0(1)
VEN	3, 31	18, 55	3, 5	-	1(1)	6(1)
VOO	1, 3	8, 56	1	-	8(2)	2(2)
FJO	2, 3	7, 16	-	2	5(1)	3(1)

* Ver Tabla 3.

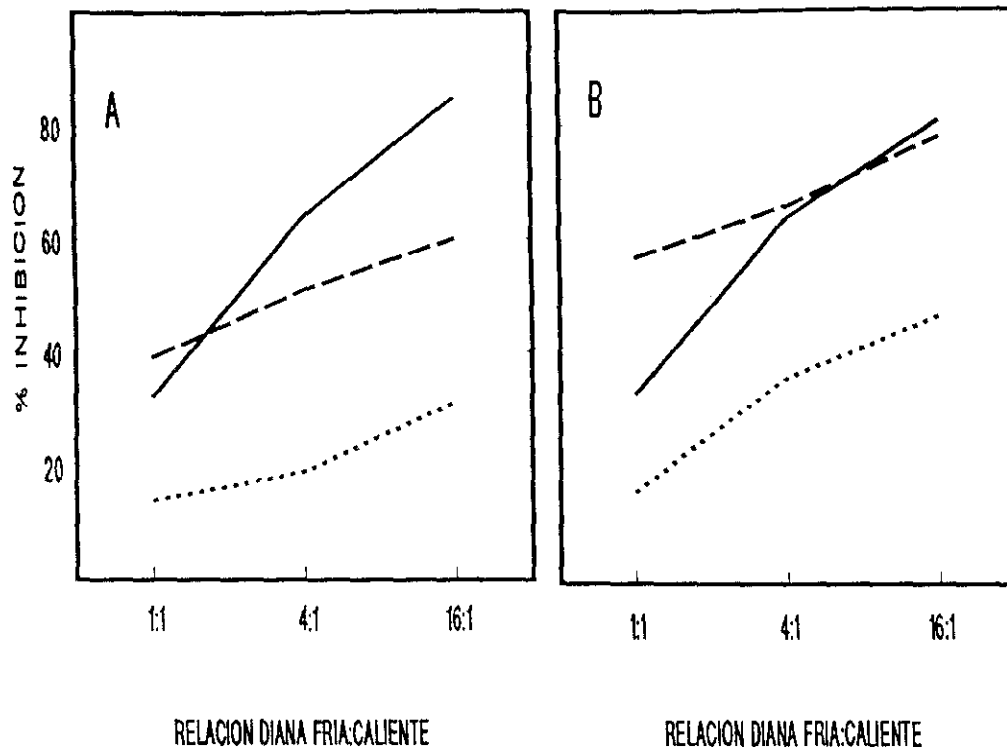


Figura 5. Inhibición fría de la citotoxicidad del clon 58GRK frente a células diana marcadas R69 (B*2705) (panel A) y WewakI (B*2704)(B). La relación E:D usada en ambos casos fue 4:1. Los porcentajes de liberación específica de ^{51}Cr en ausencia de células competidoras fueron: 72 y 58% respectivamente. Se usaron como células competidoras las siguientes LCL: R69 (—), WewakI (— →) y JY (• • •).

mayoría de los subtipos transfectados en la misma célula, HMy2.C1R (Figura 6). Como controles positivo y negativo se utilizaron los transfectantes que expresaban B*2705 y pSV2neo respectivamente. Los resultados indican, en primer lugar un comportamiento sorprendente de este clon con los transfectantes E152 y S77 que reproducen los cambios entre B*2705 y B*2704. El clon reconoce ambos antígenos (Tabla 20) pero los transfectantes intermedios, E152 y S77, no son lisados. Este hecho indica un efecto compensatorio mutuo de ambos cambios en el reconocimiento de B*2704 por el clon 58GRK. Además este clon no reconoce al subtipo B*2706 pero lisa al transfectante Y116 de forma similar al control positivo B*2705, lo que implica un efecto del cambio en la posición 114 de B*2704, que no está expuesta directamente al TCR, sobre la reactividad de este clon. Estos resultados sugieren que el epítipo que reconoce el clon 58GRK en estos subtipos es muy dependiente de péptidos. En segundo lugar, el cambio N77 destruye el epítipo reconocido por el clon, y ello explica su no reactividad con B*2702. En cambio la mutación Y74 además de ser tolerada compensa la destrucción del epítipo por N77 como lo demuestra la lisis del doble transfectante Y74N77 y el del subtipo B*2701. Este resultado sugiere nuevamente una modulación de estas posiciones en la unión de peptido(s) implicado en el epítipo reconocido por este clon.

4.5.8.- GRUPO VIII

Dos clones, 11.8SLG y 27S69, provenientes del individuo SR reconocen los subtipos B*2705, B*2702 y B*2703 (Tabla 22). Ambos clones lisan de forma similar los subtipos B*2705 y B*2703 pero se diferencian en su capacidad de lisar dianas B*2702⁺, ya que mientras 11.8SLG reconoce muy residualmente a dicho subtipo, 27S69 lisa a estas dianas de forma muy eficiente, probablemente de forma heteroclítica. Otra diferencia entre ambos clones es que 11.8SLG y 27S69 reconocen dianas B60⁺ y B61⁺ respectivamente.

Los ensayos de inhibición con AcM en estos clones se resumen en la Tabla 23. La reactividad de ambos, con los antígenos reconocidos fue inhibida con los AcM ME1 ó W6/32. La Tabla 23 también muestra que los AcM anti-CD3 y anti-CD8, pero no anti-CD4 inhiben significativamente la reactividad de 11.8SLG. Para el clon 27S69, únicamente la inhibición de α -CD3 y α -CD8 no fue total, confirmándose la reactividad heteroclítica de este clon por B*2702.

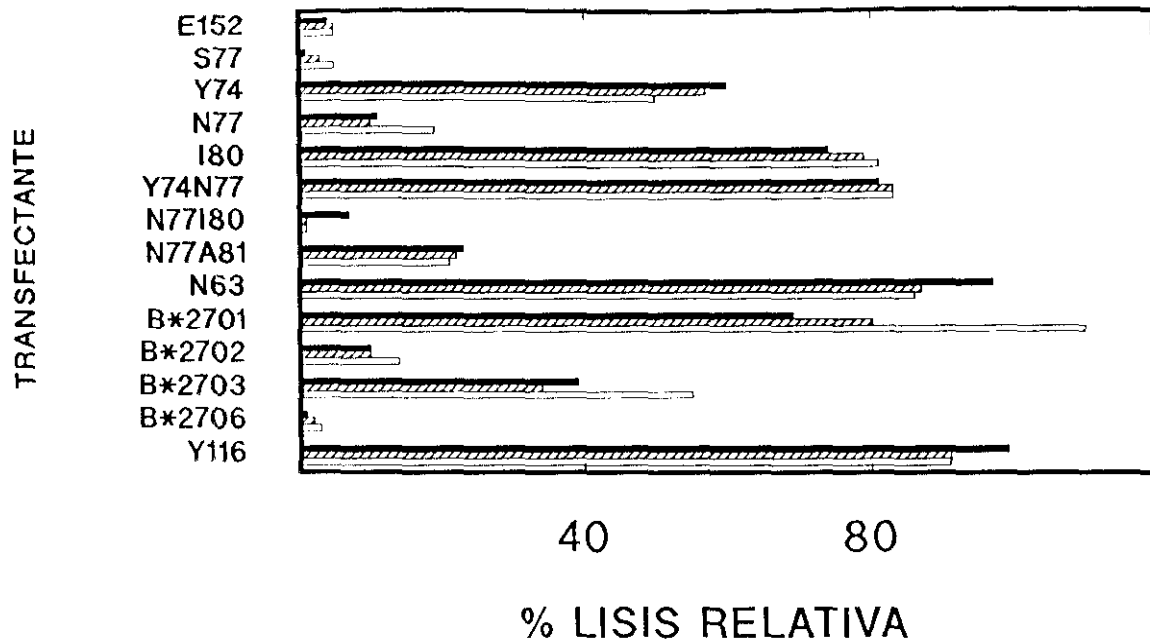


Figura 6. Citotoxicidad del clon 58GRK frente a transfectantes HMy2.C1R que expresan mutantes HLA-B27. Los mutantes fueron designados con el código de una letra del aminoácido introducido seguido del correspondiente número de la posición en la secuencia de HLA-B*2705. Los resultados se expresan como % de lisis relativa con respecto al transfectante de B*2705 a la misma relación E:D. Los resultados se obtuvieron a las relaciones E:D de 4:1 (barras negras), 1:1 (barras ralladas) y 0.5:1 (barras blancas). La lisis específica del transfectante B*2705⁺ a las tres relaciones E:D fue: 70, 62 y 42%. Como control negativo se usaron las células HMy2C1R transfectadas con el gen pSV2neo cuya lisis fue siempre inferior al 5%.

Tabla 22. Especificidad fina de los clones del grupo VIII: Ensayo de panel*

CELULA	HLA				CTL			
	A	B	C	DR	11.8SLG		27S69	
					4:1	1:1	4:1	1:1
LG15	32	*2705	2	1	<u>56(6)</u>	<u>40(5)</u>	-	-
R69	3, 24	*2705, 7	-	3, 5	<u>58(10)</u>	<u>47(8)</u>	<u>37(1)</u>	<u>34(1)</u>
R70	3, 24	*2705, 7	-	3, 5	<u>52(1)</u>	<u>29(1)</u>	<u>32(2)</u>	-
R15	3	*2705, 35	-	-	<u>55(5)</u>	<u>42(4)</u>	<u>43(4)</u>	<u>33(3)</u>
LH	24	*2701, 8	1, 7	3, 4	3(4)	5(3)	0(3)	0(3)
R34	2, 24	*2702, 18	-	-	<u>16(6)</u>	11(5)	<u>76(2)</u>	<u>58(2)</u>
R56	2, 11	*2702, 14	-	-	<u>14(2)</u>	8(2)	<u>71(1)</u>	-
CHR	2, 3	*2702, 35	2, 4	1, 5	<u>13(2)</u>	0(1)	-	-
NW	3, 33	*2702, 8	-	-	0(1)	0(1)	<u>49(2)</u>	<u>33(2)</u>
CH	31, 32	*2703, 18	2, 7	8, 11	<u>47(2)</u>	<u>47(2)</u>	<u>32(2)</u>	<u>20(2)</u>
LAR	23, 31	*2703, 53	2, 4	-	<u>66(2)</u>	<u>55(2)</u>	<u>46(3)</u>	<u>37(2)</u>
R42	2, 9	*2704, *2706	-	-	1(2)	3(2)	0(1)	0(1)
Wewak I	11, 24	*2704, 62	2, 4	2	2(2)	0(2)	5(2)	7(1)
KNE	1, 2.4	*2704, 8	-	2, 3	1(2)	2(1)	4(1)	0(1)
JSL	11	*2704, 48	2	-	0(1)	0(1)	-	-
LIE	2, 11	*2706, 54	-	12	0(1)	0(1)	0(2)	0(1)
PAR	11, 24	*2706, 48	-	2, 11	0(2)	3(2)	0(1)	0(1)
JY	2	7	-	4, 6	5(1)	0(1)	0(1)	0(1)
LB	28	60	3	6	<u>51(9)</u>	<u>32(7)</u>	2(1)	0(1)
SIA	2, 24	*2704, 60	4	3, 5	<u>49(4)</u>	<u>30(3)</u>	4(1)	0(1)
OT	2, 24	7.4, 60	-	-	<u>14(4)</u>	<u>10(1)</u>	1(1)	0(1)
SWEIG	29	61	2	11	0(1)	0(1)	<u>40(3)</u>	<u>35(3)</u>
TTL	11, 33	51, 54	1, 3	2, 6	2(1)	0(1)	0(1)	0(1)
VEN	3, 31	18, 55	3, 5	-	9(1)	0(1)	0(1)	0(1)
VOO	1, 3	8, 56	1	-	0(1)	0(1)	0(1)	0(1)

* Ver Tabla 3.

Tabla 23. Ensayos de inhibición con AcM de los clones del grupo VIII.

ANTIGENO ^a	AcM	CTL			
		11.8SLG		27S69	
		4:1	1:1	4:1	1:1
B*2705	Nada	64/86	53/64	44/48	31
	Anti-CD3	-/23	-/7	-/5	1
	Anti-CD4	-/63	-/46	-/35	26
	Anti-CD8	-/0	-/0	-/6	8
	ME1	0/-	0/-	3/-	-
	EDU-1	59/-	46/-	44/-	-
B*2702	Nada	20	16	73/79	46/69
	Anti-CD3	-	-	-/37	-/27
	Anti-CD4	-	-	-/76	-/60
	Anti-CD8	-	-	-/44	-/17
	ME1	4	0	0/-	0/-
	EDU-1	26	19	84/-	54/-
B*2703	Nada	91/53	82/26	26/35	10/24
	Anti-CD3	-/11	-/10	-/8	-/6
	Anti-CD4	-/43	-/21	-/32	-/29
	Anti-CD8	-/3	-/3	-/8	-/0
	ME1	20/-	10/-	0/-	0/-
	EDU-1	66/-	84/-	29/-	19/-
B60/B61 ^b	Nada	55/53	31/21	26	22
	Anti-CD3	-/0	-/2	1	0
	Anti-CD4	-/42	-/11	27	24
	Anti-CD8	-/0	-/0	2	0
	W6/32	8/-	5/-	4	0
	EDU-1	50/-	24/-	36	32

^a Los valores numéricos representan % de lisis específica. Las LCL usadas fueron: R69 (B*2705⁺ con clon 11.8SLG), R15 (B*2705⁺ con 27S69), R34 (B*2702), LAR (B*2703) y LB (B60).

^b El antígeno reconocido por el clon 27S69 es HLA-B61 y la diana usada SWEIG.

Se realizaron ensayos de inhibición fría con ambos clones (Figura 7) para corroborar la naturaleza monoclonal de la reactividad con B60 ó B61. Así cuando se enfrentó el clon 11.8SLG a una diana B60⁺ marcada (Figura 7B) se observó una inhibición parcial pero significativa de la diana PAR

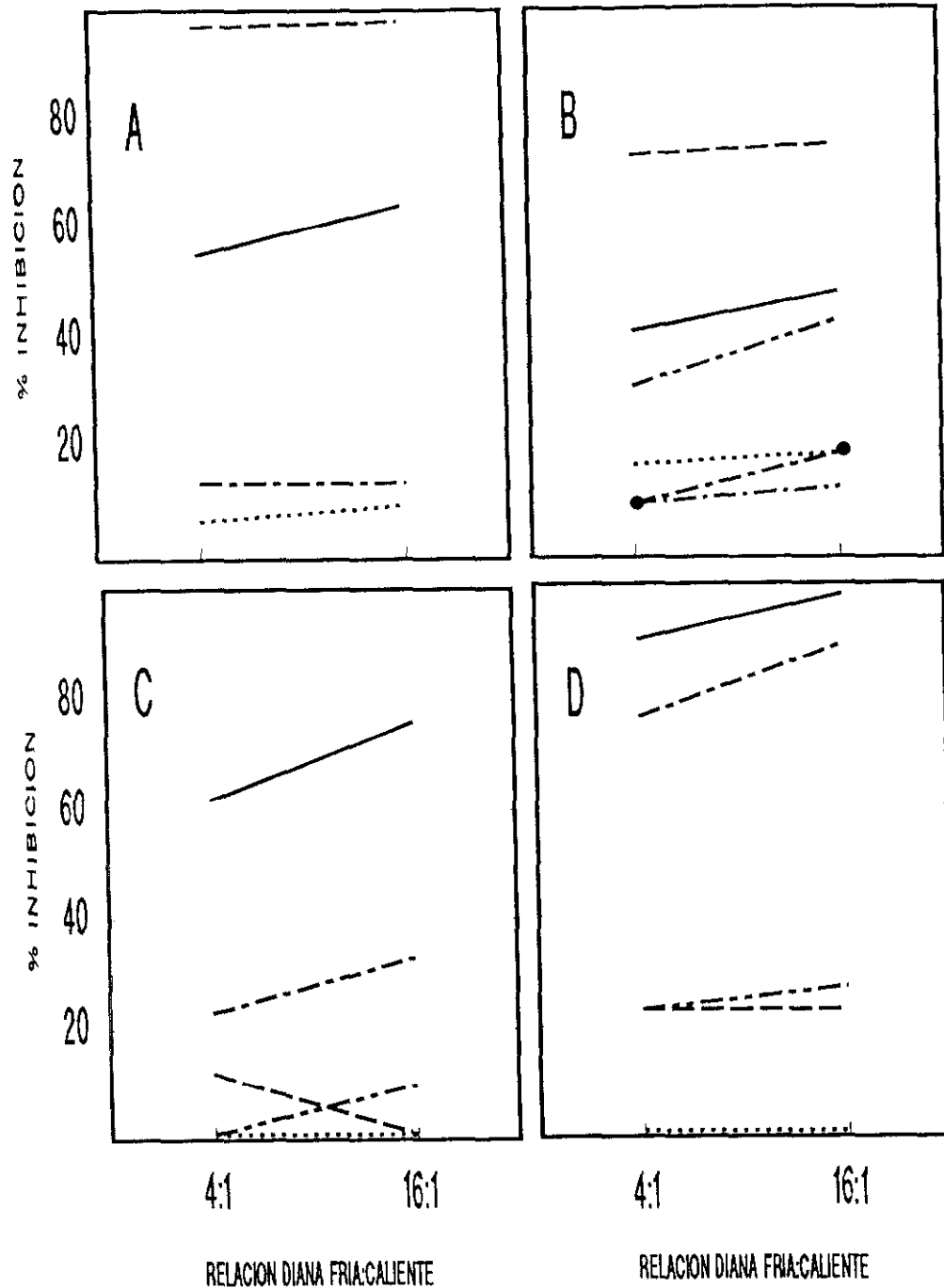


Figura 7. Inhibición fría de la citotoxicidad de los clones 11.8SLG (paneles A y B) y 27S69 (C y D) frente a células diana marcadas R69 (B*2705) (paneles A y C), LB (B60) (B) y SWEIG (B61) (D). La relación E:D usada en todos los casos fue 4:1. Los porcentajes de liberación específica de ^{51}Cr en ausencia de células competidoras fueron: 58, 59, 74 y 56% respectivamente. Se usaron como células competidoras las siguientes LCL: R69 (—), LB (— →), SWEIG (— • —), PAR (— • • —), R42 (• — • —) y JY (• •).

(B*2706, B48) pero no con R42 (B*2704, B*2706). Esto indica un reconocimiento significativo del antígeno B48 por este clon. Con el clon 27S69 (Figura 7C y D) las células PAR y LB inhibieron la lisis de la célula marcada por encima del control negativo, JY sugiriendo un reconocimiento de B48 y B60.

4.5.9.- GRUPO IX

El clon que define este grupo es el 13SRB (del donante SR) y como se observa en la Tabla 24, este clon reconoce:

- * Las 4 LCL B*2705⁺ ensayadas.
- * Dos de las 4 líneas B*2702⁺ estudiadas con valores de lisis positivos pero muy bajos.
- * La línea B*2704⁺ KNE, pero no otras cuatro LCL que expresan dicho subtipo.

Para determinar las moléculas reconocidas en las líneas lisadas se realizaron ensayos de inhibición con AcM anti-HLA (Tabla 25). Este estudio demuestra que en las líneas reconocidas el antígeno responsable es el correspondiente subtipo de HLA-B27 (B*2705, B*2702 y B*2704) debido a la inhibición observada con el AcM ME1. Además en los dos subtipos mejor lisados (B*2705 y B*2704) los AcM anti-CD3 y anti-CD8 inhibieron la lisis mientras que anti-CD4 no presentaba ningun efecto detectable. Ello confirmaría el reconocimiento de antígenos de clase I por parte de este clon.

Tabla 25. Ensayos de inhibición con AcM del clon 13SRB del grupo IX.

<u>ANTIGENO^a</u>	<u>E:D</u>	<u>13SRB</u>					
		<u>AcM</u>					
		<u>Nada</u>	<u>Anti-CD3</u>	<u>Anti-CD4</u>	<u>Anti-CD8</u>	<u>ME1</u>	<u>EDU-1</u>
B*2705	4:1	57	-	-	-	0	53
	1:1	30/29	-/11	-/38	-/4	0/-	35/-
B*2702	4:1	12	-	-	-	0	21
	1:1	10	-	-	-	0	8
B*2704	4:1	27/30	-/6	-/35	-/0	7/-	34/-
	1:1	11/12	-/2	-/18	-/0	2/-	19/-

^a Los valores numéricos representan % de lisis específica. Las LCL usadas fueron: LG15 (B*2705), R34 (B*2702) y KNE (B*2704).

Se realizaron ensayos de inhibición fría con dianas representativas, lisadas y no lisadas, de los subtipos B*2705, B*2702 y B*2704 (Figura 8). Los resultados indican que las líneas R69 y LG15, (ambas B*2705⁺) y KNE (B*2704⁺) son las mejores competidoras frente a dianas B*2705⁺ marcadas, lo que está en concordancia con los datos de panel (Tabla 24). La línea WewakI representativa de las células B*2704⁺ pero no lisada por este clon, inhibió significativamente, pero menos que KNE la lisis del clon. Inhibiciones positivas, pero menores, se observaron también con dianas frías B*2702⁺, ya fueran éstas lisadas (R34), ó no (NW). Además una diana B*2706⁺ (PAR) se usó también en este ensayo demostrándose un reconocimiento específico pero marginal comparable a la de las distintas dianas B*2702⁺. La línea JY (HLA-B7⁺, B27⁻) fue usada como control negativo del experimento. Estos resultados demuestran claramente que las diferencias observadas en los valores de lisis de este clon frente a dianas del mismo subtipo son solo cuantitativas y sugieren que el epítipo reconocido se expresa de forma diferente en las distintas dianas B*2702 y B*2704. Los resultados son consistentes con el reconocimiento de péptido(s) polimórfico(s) en el contexto de varios subtipos de HLA-B27, que solo se expresa en cantidad suficiente en algunas células diana.

4.5.10.- GRUPO X

Este grupo de reacción está definido por el clon 3SRF, del individuo SR. Este clon reconoce los subtipos B*2705, B*2704 y B*2706 (Tabla 26). Este es el patrón más sencillo que incluye los subtipos B*2704 y B*2706. La especificidad anti-HLA-B27 fue confirmada por ensayos de inhibición por AcM (Tabla 27) ya que ME1, pero no EDU-1 inhibe la lisis frente a los 3 subtipos. Además la lisis de dianas B*2705⁺ también fue inhibida específicamente por los AcM anti-CD3 y anti-CD8.

Tabla 24. Especificidad fina de los clones del grupo IX: Ensayo de panel*

CELULA	HLA				CTL	
	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>DR</u>	<u>13SRB</u>	
<u>DIANA</u>					<u>4:1</u>	<u>1:1</u>
LG15	32	*2705	2	1	<u>43(7)</u>	<u>23(4)</u>
R69	3, 24	*2705, 7	-	3, 5	<u>62(4)</u>	<u>35(4)</u>
R70	3, 24	*2705, 7	-	3, 5	<u>42(1)</u>	<u>32(1)</u>
R15	3	*2705, 35	-	-	<u>48(1)</u>	<u>38(1)</u>
LH	24	*2701, 8	1, 7	3, 4	3(2)	0(2)
R34	2, 24	*2702, 18	-	-	<u>15(4)</u>	9(4)
R56	2, 11	*2702, 14	-	-	<u>14(2)</u>	5(2)
CHR	2, 3	*2702, 35	2, 4	1, 5	1(2)	1(2)
NW	3, 33	*2702, 8	-	-	2(2)	0(2)
CH	31, 32	*2703, 18	2, 7	8, 11	0(2)	0(1)
LAR	23, 31	*2703, 53	2, 4	-	6(2)	4(2)
R42	2, 9	*2704, *2706	-	-	6(2)	0(1)
Wewak I	11, 24	*2704, 62	2, 4	2	3(4)	3(3)
SIA	2, 24	*2704, 60	4	3, 5	1(2)	4(2)
JSL	11	*2704, 48	2	-	1(2)	0(1)
KNE	1, 2.4	*2704, 8	-	2, 3	<u>25(5)</u>	<u>17(4)</u>
LIE	2, 11	*2706, 54	-	12	1(2)	0(1)
PAR	11, 24	*2706, 48	-	2, 11	2(2)	3(2)
JY	2	7	-	4, 6	0(1)	9(1)
LB	28	60	3	6	4(1)	1(2)
SWEIG	29	61	2	11	5(2)	4(2)
TTL	11, 33	51, 54	1, 3	2, 6	3(1)	0(1)
VEN	3, 31	18, 55	3, 5	-	8(1)	7(1)
VOO	1, 3	8, 56	1	-	9(1)	3(1)

* Ver Tabla 3.

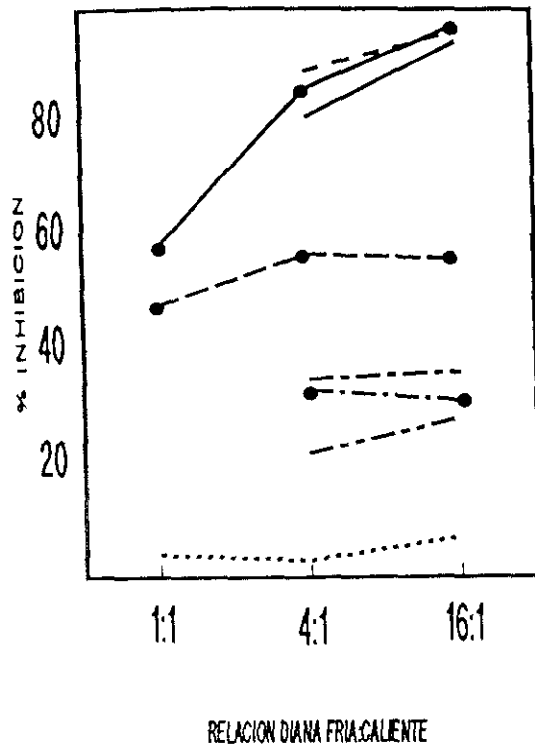


Figura 8. Inhibición fría de la citotoxicidad del clon 13SRB frente a células diana marcadas R69 (B*2705). La relación E:D usada en todos los casos fue 4:1. El porcentaje de liberación específica de ^{51}Cr en ausencia de células competidoras fue del 48%. Se usaron como células competidoras las siguientes LCL: R69 (—), LG15 (●—●), KNE (— —), Wewaki (● — ●), R34 (— ● —), NW (● — ●), PAR (—●●—), y JY (• • •).

Tabla 26. Especificidad fina de los clones del grupo X: Ensayo de panel*

CELULA	HLA				CTL	
	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>DR</u>	<u>3SRF</u>	
					<u>4:1</u>	<u>1:1</u>
LG15	32	*2705	2	1	32(1)	21(1)
R69	3, 24	*2705, 7	-	3, 5	37(5)	16(3)
R15	3	*2705, 35	-	-	26(1)	20(1)
LH	24	*2701, 8	1, 7	3, 4	6(1)	3(1)
R34	2, 24	*2702, 18	-	-	9(1)	2(1)
R56	2, 11	*2702, 14	-	-	0(1)	-
CH	31, 32	*2703, 18	2, 7	8, 11	-	-
LAR	23, 31	*2703, 53	2, 4	-	0(1)	0(1)
R42	2, 9	*2704, *2706	-	-	58(2)	12(1)
Wewak I	11, 24	*2704, 62	2, 4	2	43(3)	34(1)
SIA	2, 24	*2704, 60	4	3, 5	73(2)	-
KNE	1, 2.4	*2704, 8	-	2, 3	56(1)	37(1)
LIE	2, 11	*2706, 54	-	12	22(1)	-
PAR	11, 24	*2706, 48	-	2, 11	56(3)	13(1)
JY	2	7	-	4, 6	6(2)	-
LB	28	60	3	6	7(2)	-
SWEIG	29	61	2	11	8(2)	-
TTL	11, 33	51, 54	1, 3	2, 6	4(2)	-
VEN	3, 31	18, 55	3, 5	-	1(2)	-
VOO	1, 3	8, 56	1	-	5(2)	-

* Ver Tabla 3.

Tabla 27. Ensayos de inhibición con AcM del clon 3SRF del grupo X.

<u>ANTIGENO^a</u>	<u>E:D</u>	<u>3SRF</u>					
		<u>Nada</u>	<u>Anti-CD3</u>	<u>Anti-CD4</u>	<u>Anti-CD8</u>	<u>ME1</u>	<u>EDU-1</u>
B*2705	4:1	21/26	-/2	-/33	-/3	1/-	21/-
	1:1	10/20	-/0	-/17	-/5	0/-	16/-
B*2704	4:1	21/54	-	-	-	4/5	44/59
B*2706	4:1	76/77	-	-	-	6/12	72/76

^a Los valores numéricos representan % de lisis específica. Las LCL usadas fueron: R69 (B*2705⁺ con ME1 y EDU-1), R15 (B*2705⁺ con CD3, CD4 y CD8), WewakI (B*2704) y PAR (B*2706).

4.5.11.- GRUPO XI

Este grupo está formado por 4 clones, 72DRF de DL y 7.8SRY, 47S69 y 2SRZ de SR que reconocen B*2705, B*2701, B*2702 y B*2703 (Tabla 28). Los clones 72 DRF y 7.8SRY lisan de forma muy similar a los 4 subtipos mientras que 47S69 lisa dianas B*2703⁺ marginalmente y 2SRZ es menos efectivo frente al subtipo B*2702 que frente al resto de los subtipos. Ninguno de ellos reconoce líneas HLA-B27⁻. Los cuatro fueron ensayados con los AcM ME1 y EDU-1 (Tabla 29) frente a los cuatro subtipos reconocidos, confirmandose su reactividad anti-HLA-B27 en todos los casos.

Tabla 28. Especificidad fina de los clones del grupo XI: Ensayo de panel*

CELULA DIANA	HLA				CTL							
	A	B	C	DR	72DRF		7.8SRV		47S69		2SR2	
					4:1	1:1	4:1	1:1	4:1	1:1	4:1	1:1
LG15	32	*2705	2	1	<u>73(3)</u>	<u>43(3)</u>	<u>20(1)</u>	-	ND	-	<u>70(2)</u>	<u>49(1)</u>
R69	3, 24	*2705, 7	-	3, 5	<u>73(8)</u>	<u>58(8)</u>	<u>30(3)</u>	<u>18(3)</u>	<u>35(3)</u>	-	<u>61(5)</u>	<u>44(2)</u>
R70	3, 24	*2705, 7	-	3, 5	<u>41(1)</u>	<u>33(1)</u>	<u>41(1)</u>	<u>30(1)</u>	<u>53(1)</u>	-	ND	-
R15	3	*2705, 35	-	-	<u>48(1)</u>	<u>31(1)</u>	<u>37(5)</u>	<u>27(5)</u>	<u>54(3)</u>	<u>34(1)</u>	<u>62(3)</u>	<u>39(4)</u>
LH	24	*2701, 8	1, 7	3, 4	<u>72(3)</u>	<u>44(3)</u>	<u>36(3)</u>	<u>17(3)</u>	<u>30(3)</u>	<u>16(1)</u>	<u>57(4)</u>	<u>44(3)</u>
R34	2, 24	*2702, 18	-	-	<u>55(2)</u>	<u>33(2)</u>	<u>35(2)</u>	<u>27(2)</u>	<u>29(3)</u>	-	<u>43(4)</u>	<u>29(3)</u>
R56	2, 11	*2702, 14	-	-	<u>42(1)</u>	<u>34(1)</u>	<u>55(2)</u>	<u>42(2)</u>	<u>57(1)</u>	-	<u>16(2)</u>	6(2)
CHR	2, 3	*2702, 35	2, 4	1, 5	-	-	<u>58(1)</u>	<u>44(1)</u>	-	-	<u>28(1)</u>	<u>15(1)</u>
NW	3, 33	*2702, 8	-	-	-	-	<u>53(2)</u>	<u>37(1)</u>	<u>30(2)</u>	-	<u>28(2)</u>	<u>37(1)</u>
CH	31, 32	*2703, 18	2, 7	8, 11	<u>38(4)</u>	<u>23(4)</u>	<u>17(4)</u>	11(4)	<u>12(1)</u>	-	<u>75(2)</u>	<u>72(1)</u>
LAR	23, 31	*2703, 53	2, 4	-	<u>60(4)</u>	<u>45(4)</u>	<u>36(7)</u>	<u>20(7)</u>	<u>14(2)</u>	3(1)	<u>66(3)</u>	<u>38(3)</u>
R42	2, 9	*2704, *2706	-	-	2(1)	2(1)	1(1)	0(1)	0(1)	-	7(2)	2(1)
Wewak I	11, 24	*2704, 62	2, 4	2	0(1)	0(1)	0(1)	0(1)	1(2)	-	4(3)	0(1)
KNE	1, 2,4	*2704, 8	-	2, 3	3(1)	7(1)	5(1)	3(1)	0(1)	0(1)	8(4)	6(3)
JSL	11	*2704, 48	2	-	3(1)	6(1)	10(2)	1(2)	ND	-	6(1)	-
LIE	2, 11	*2706, 54	-	12	5(1)	3(1)	0(1)	2(1)	0(1)	-	0(3)	0(1)
PAR	11, 24	*2706, 48	-	2, 11	0(1)	0(1)	5(2)	2(2)	0(1)	0(1)	7(3)	2(1)
JY	2	7	-	4, 6	1(1)	0(1)	0(1)	1(1)	0(2)	1(1)	3(2)	3(1)
LB	28	60	3	6	2(1)	0(1)	1(1)	0(1)	0(2)	0(1)	0(2)	0(1)
SIA	2, 24	*2704, 60	4	3, 5	-	-	-	-	-	-	0(2)	-
SWEIG	29	61	2	11	0(1)	2(1)	1(1)	1(1)	3(2)	4(1)	0(2)	8(1)
TTL	11, 33	51, 54	1, 3	2, 6	1(1)	0(1)	0(1)	1(1)	1(1)	3(1)	0(2)	5(1)
VEN	3, 31	18, 55	3, 5	-	0(1)	0(1)	2(1)	0(1)	0(3)	-	3(3)	0(1)
VOO	1, 3	8, 56	1	-	0(1)	0(1)	1(1)	0(1)	2(2)	4(1)	5(2)	8(2)

* Ver Tabla 3.

Tabla 29. Ensayos de inhibición con AcM de los clones del grupo XI.

		CTL							
ANTIGENO*	AcM	72DRF		7.8SRY		47S69		2SRZ	
		4:1	1:1	4:1	1:1	4:1	1:1	4:1	1:1
B*2705	Nada	48	27	40/66	22/53	59/51	34	60/77	38/50
	Anti-CD3	18	12	-/14	-/6	-/9	11	-/39	-/21
	Anti-CD4	44	30	-/50	-/58	-/52	27	-/58	-/42
	Anti-CD8	25	16	-/14	-/4	-/2	2	-/52	-/32
	ME1	0	0	12/-	0/-	3/-	-	4/-	2/-
	EDU-1	57	50	37/-	20/-	60/-	-	59/-	39/-
B*2701	Nada	88	45	43/29	16/22	30/28	16	68	20
	Anti-CD3	49	-	-/21	-/8	-/3	8	-	0
	Anti-CD4	68	32	-/33	-/20	-/32	22	-	22
	Anti-CD8	12	6	-/14	-/12	-/7	2	-	1
	ME1	12	11	7/-	1/-	-/0	-	0	3
	EDU-1	66	36	50/-	23/-	-/29	-	63	25
B*2702	Nada	75	34	32	22	28	11	55	47
	Anti-CD3	47	40	22	10	-	0	17	12
	Anti-CD4	63	51	28	23	-	16	53	48
	Anti-CD8	9	9	18	6	-	4	12	0
	ME1	1	6	10	6	0	-	0	0
	EDU-1	53	51	34	24	29	-	65	57
B*2703	Nada	45	28	40	21	47	13	67	21
	Anti-CD3	26	13	26	12	12	-	-	5
	Anti-CD4	40	27	45	21	49	-	-	24
	Anti-CD8	18	8	0	3	52	-	-	0
	ME1	9	4	22	-	-	0	0	-
	EDU-1	34	36	38	21	-	14	60	-

* Los valores numéricos representan % de lisis específica. Las LCL usadas fueron: R69 (B*2705⁺ con los clones 72DRF y 2SRZ), R15 (B*2705⁺ con 7.8SRY y 47S69), LH (B*2701), R34 (B*2702) con todos los clones excepto 7.8SRY donde se usó R56 y CH (B*2703) en todos los casos excepto con el clon 7.8SRY donde se utilizó LAR.

También se comprobó la influencia de anti-CD3 y anti-CD8 en la lisis de los distintos subtipos (Tabla 29). Anti-CD8 a ambas relaciones E:D, y anti-CD3 solo a la mayor, inhibieron

significativamente la lisis de los 4 subtipos en el caso del clon 72DRF. Un comportamiento similar se observó con 7.8SRY aunque se pudo detectar una menor inhibición por anti-CD3 en todos los casos excepto con dianas B*2705⁺. La lisis por el clon 47S69 se inhibió con anti-CD3 y anti-CD8 para todos los subtipos excepto B*2703, en donde sólo anti-CD3 inhibió la lisis. Con el clon 2SRZ anti-CD3 y anti-CD8 inhibieron la lisis frente a B*2702 y mucho menos frente a B*2705, confirmando la débil reacción cruzada con B*2702, observada en el análisis de panel (Tabla 28).

GRUPO XII

El reconocimiento de los subtipos B*2705, B*2701, B*2703 y B*2704 está representado por el clon 112.8GRK, del individuo GM (Tabla 30). Los valores de lisis de los subtipos B*2705, B*2703 y B*2704 oscilan alrededor del 40-50% mientras que la lisis del subtipo B*2701 es algo menor (cercano al 20%). Entre las dianas HLA-B27⁻ sólo se observó lisis positiva con SWEIG (HLA-B60⁺). El panel de la Tabla 30 permite descartar que la reactividad de este clon con las dianas HLA-B27⁺ sea debida a otros antígenos: las líneas CH y LAR solo comparten el antígeno B*2703 y HLA-A31, que está también presente en la línea VEN, que no es lisada por este clon. Análogamente las 3 líneas B*2704⁺ comparten únicamente este antígeno.

La lisis mediada por B*2705 y B*2701 fue confirmada por inhibición con AcM (Tabla 31). De los tres AcM usados contra moléculas de superficie de la célula efectora solo anti-CD3 produjo una inhibición significativa de la lisis de dianas B*2705⁺.

Tabla 30. Especificidad fina del clon 112.8GRK del grupo XII: Ensayo de panel^a

<u>CELULA</u>	<u>HLA</u>				<u>CTL</u>	
	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>DR</u>	<u>112.8GRK</u>	
<u>DIANA</u>					<u>4:1</u>	<u>1:1</u>
R15	3	*2705, 35	-	-	<u>43(1)</u>	-
R69	3, 24	*2705, 7	-	3, 5	<u>54(5)</u>	<u>29(4)</u>
LH	24	*2701, 8	1, 7	3, 4	<u>20(1)</u>	<u>16(1)</u>
R34	2, 24	*2702, 18	2,5	3,5	13(2)	10(2)
NW	3, 33	*2702, 8	-	-	9(3)	5(2)
CH	31, 32	*2703, 18	2, 7	8, 11	<u>23(1)</u>	6(1)
LAR	23, 31	*2703, 53	2, 4	-	<u>47(2)</u>	<u>28(2)</u>
R42	2, 9	*2704, *2706	-	-	<u>30(1)</u>	-
WEI	11,24	*2704, 62	2, 4	2	<u>57(2)</u>	<u>30(2)</u>
ET	2, 11	*2704 ,38	-	4	-	-
KNE	1, 2	*2704, 8	-	2, 3	<u>58(2)</u>	<u>38(2)</u>
LIE	2, 11	*2706, 5	3	12	4(2)	0(2)
PAR	11, 24	*2706, 48	-	2, 11	-	-
JY	2	7	-	4, 6	11(1)	7(1)
LB	28	60	3	6	0(1)	0(1)
SWEIG	29	61	2	11	<u>32(1)</u>	-
TTL	11, 33	51, 54	1, 3	2, 6	0(1)	0(1)
VEN	3, 31	18, 55	3, 5	-	0(1)	0(1)
VOO	1, 3	8, 56	1	-	0(1)	0(1)
FJO	2, 3	7, 16	-	2	-	-

^a Ver Tabla 3.

Tabla 31. Ensayos de inhibición con AcM del clon 112.8GRK del grupo XII.

<u>ANTIGENO</u>	<u>E:D</u>	<u>112.8GRK</u>					
		<u>AcM</u>					
		<u>Nada</u>	<u>Anti-CD3</u>	<u>Anti-CD4</u>	<u>Anti-CD8</u>	<u>ME1</u>	<u>EDU-1</u>
B*2705	4:1	71	27	59	67	25	66
	1:1	39	15	29	34	18	35
B*2701	4:1	20	-	-	-	0	46
	1:1	16	-	-	-	0	32

^a Se eligió una diana representativa de cada antígeno HLA (R69 para B*2705 y LH para B*2701). Los valores numéricos representan % de lisis específica.

4.5.13.- GRUPO XIII

El clon 122GRK (Tabla 32) reconoce dianas pertenecientes a los subtipos B*2705, B*2702, B*2704 y B*2706, no reconoce B*2703 y el ensayo con el subtipo B*2701 no pudo realizarse por lo que la asignación de este clon al denominado grupo XIII es tentativa. Además este clon es capaz de reconocer también a las LCL SWEIG y VOO que expresan en sus respectivos haplotipos los antígenos HLA-B61 y B56 entre otros.

Los 6 antígenos lisados fueron probados en ensayos de inhibición con AcM (Tabla 33) demostrándose que la lisis está mediada en todos los casos por los antígenos nominales previamente sugeridos por el panel de la Tabla 30.

Tabla 32. Especificidad fina del clon 122GRK del grupo XIII: Ensayo de panel^a

<u>CELULA</u>	<u>HLA</u>				<u>CTL</u>	
	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>DR</u>	<u>122GRK</u>	
<u>DIANA</u>					<u>4:1</u>	<u>1:1</u>
LG15	32	*2705	2	1	<u>38(1)</u>	<u>26(2)</u>
R69	3, 24	*2705, 7	-	3, 5	<u>70(5)</u>	<u>48(6)</u>
LH	24	*2701, 8	1, 7	3, 4	-	-
R34	2, 24	*2702, 18	2,5	3,5	<u>40(1)</u>	<u>20(3)</u>
R56	2, 11	*2702, 14	-	-	<u>54(1)</u>	<u>42(1)</u>
NW	3, 33	*2702, 8	-	-	-	-
CH	31, 32	*2703, 18	2, 7	8, 11	11(1)	2(1)
LAR	23, 31	*2703, 53	2, 4	-	1(1)	0(1)
R42	2, 9	*2704, *2706	-	-	<u>81(1)</u>	<u>50(2)</u>
WEI	11,24	*2704, 62	2, 4	2	<u>37(2)</u>	<u>22(3)</u>
KNE	1, 2	*2704, 8	-	2, 3	<u>25(2)</u>	<u>18(2)</u>
LIE	2, 11	*2706, 5	3	12	<u>83(1)</u>	<u>50(2)</u>
PAR	11, 24	*2706, 48	-	2, 11	<u>54(2)</u>	<u>42(2)</u>
JY	2	7	-	4, 6	4(1)	0(1)
LB	28	60	3	6	10(4)	4(6)
SWEIG	29	*4002	2	11	<u>15(5)</u>	<u>11(7)</u>
TTL	11, 33	51, 54	1, 3	2, 6	0(1)	0(1)
VEN	3, 31	18, 55	3, 5	-	2(1)	0(1)
VOO	1, 3	8, 56	1	-	<u>38(5)</u>	<u>26(8)</u>
FJO	2, 3	7, 16	-	2	0(1)	2(2)

^a Ver Tabla 3.

Tabla 33. Ensayos de inhibición con AcM del clon 122GRK del grupo XIII.

<u>ANTIGENO^a</u>	<u>E:D</u>	<u>122GRK</u>					
		<u>AcM</u>					
		<u>Nada</u>	<u>Anti-CD3</u>	<u>Anti-CD4</u>	<u>Anti-CD8</u>	<u>ME1^b</u>	<u>EDU-1</u>
B*2705	4:1	56	0	26	0	0	23
	1:1	36	0	21	0	0	29
B*2702	4:1	40/23	-/19	-/24	-/0	9/-	53/-
	1:1	24/15	-/15	-/19	-/1	5/-	34/-
B*2704	4:1	27/34	-	-	-	0/1	35/32
	1:1	16/14	-	-	-	0/2	23/16
B*2706	4:1	29	2	27	2	0	26
	1:1	16	4	19	3	0	21
B56	4:1	40/21	-	-	-	24/1	43/16
	1:1	33/16	-	-	-	15/2	40/16
B61	2:1	12	-	-	-	6	21

^a Se eligió una diana representativa de cada antígeno HLA (R69 para B*2705, R34 para B*2702, KNE para B*2704, PAR para B*2706, VOO para B56 y SWEIG para B61) . Los valores numéricos representan % de lisis específica.

^b El AcM usado frente al antígeno B61 fue W6/32.

Además con los subtipos B*2705 ,B*2702 y B*2706 se produjo una inhibición significativa con los AcM anti-CD8 y anti-CD3 excepto en el caso de B*2702 con anti-CD3.

Con este clon también se realizaron ensayos citotoxicidad frente a mutantes en posiciones polimórficas entre los subtipos de HLA-B27 (Figura 9). Se observó concordancia general entre la

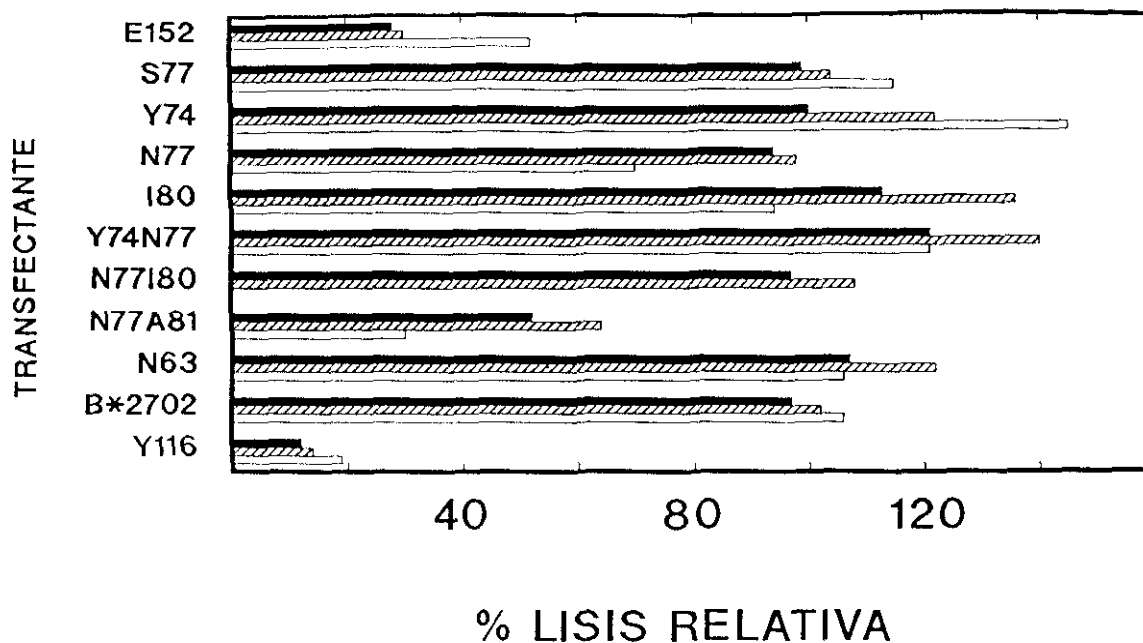


Figura 9. Citotoxicidad del clon 122GRK frente a los transfectantes HMy2.C1R que expresan B*2702 o mutantes específicos de HLA-B27. Estos fueron designados con el código de una letra del aminoácido introducido seguido del número de la posición en la estructura de HLA-B*2705. Los resultados se expresan como % de lisis relativa con respecto al transfectante equivalente de B*2705 a la misma relación E:D. Los resultados se obtuvieron a las relaciones E:D de 4:1 (barras negras), 1:1 (barras ralladas) y 0.5:1 (barras blancas). La lisis específica del transfectante B*2705⁺ a las tres relaciones E:D fue: 67, 50 y 33% respectivamente. Como control negativo se usaron las células HMy2.C1R transfectadas con el gen pSV2neo cuya lisis fue siempre inferior al 10%.

reactividad frente a mutantes y el patrón de reacción con los subtipos de HLA-B27. La única excepción fue que este clon no lisa a Y116 pero sí al subtipo B*2706 que posee tres cambios adicionales (E152, S77, D114) por lo que probablemente estas posiciones compensarían el efecto del cambio Y116.

3.4.14.- GRUPO XIV

Este grupo consta del clon 37SLG (del respondedor SR) que reconoce todos los subtipos de HLA-B27 excepto (Tabla 34). La lisis de los subtipos B*2701, B*2702 y B*2704 son marcadamente inferiores (20-30%) que las del subtipo estimulador (70-80%) siendo la lisis del subtipo B*2703 intermedia (40-50%). Este clon también es capaz de lisar células HLA-B60⁺ (LB, OT) observándose que la lisis de la diana S1A (doble positiva HLA-B*2704, -B60) es marcadamente superior a la correspondiente a cada uno de los antígenos B que posee por separado.

En la Tabla 35 se resumen los ensayos de inhibición con AcM de este clon frente a una diana representativa de cada uno de los antígenos reconocidos.

Tabla 34. Especificidad fina del clon 37SLG del grupo XIV: Ensayo de panel*

<u>CELULA</u>	<u>HLA</u>				<u>CTL</u>	
	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>DR</u>	<u>37SLG</u>	
<u>DIANA</u>					<u>4:1</u>	<u>1:1</u>
R15	3	*2705, 35	1, 4	1	<u>74(6)</u>	<u>56(5)</u>
R70	3, 24	*2705, 7	-	3, 5	<u>83(2)</u>	<u>38(1)</u>
R69	3, 24	*2705, 7	-	3, 5	<u>75(3)</u>	<u>61(2)</u>
LH	24	*2701, 8	1, 7	3, 4	<u>24(2)</u>	<u>24(2)</u>
R34	2, 24	*2702, 18	2,5	3,5	<u>26(4)</u>	<u>21(2)</u>
R56	2, 11	*2702, 14	-	-	<u>21(2)</u>	<u>22(2)</u>
NW	3, 33	*2702, 8	-	-	<u>18(1)</u>	<u>16(1)</u>
CH	31, 32	*2703, 18	2, 7	8, 11	<u>52(1)</u>	<u>61(1)</u>
LAR	23, 31	*2703, 53	2, 4	-	<u>48(3)</u>	<u>44(2)</u>
WEI	11,24	*2704, 62	2, 4	2	<u>26(4)</u>	<u>14(2)</u>
SIA	2, 24	*2704, 60	4	3, 5	<u>73(2)</u>	<u>61(2)</u>
KNE	1, 2	*2704, 8	-	2, 3	<u>18(2)</u>	-
LIE	2, 11	*2706, 5	3	12	0(2)	0(1)
PAR	11, 24	*2706, 48	-	2, 11	6(3)	0(2)
JY	2	7	-	4, 6	8(1)	12(1)
LB	28	60	3	6	<u>38(2)</u>	<u>30(2)</u>
OT	2, 24	7, 60	-	-	<u>59(1)</u>	<u>14(1)</u>
SWEIG	29	61	2	11	6(1)	4(1)
TTL	11, 33	51, 54	1, 3	2, 6	0(1)	0(1)
VEN	3, 31	18, 55	3, 5	-	8(4)	7(2)
VOO	1, 3	8, 56	1	-	0(1)	0(1)

* Ver Tabla 3.

Tabla 35. Ensayos de inhibición con AcM del clon 37SLG del grupo XIV.

<u>ANTIGENO^a</u>	<u>E:D</u>	<u>37SLG</u>					
		<u>Nada</u>	<u>Anti-CD3</u>	<u>Anti-CD4</u>	<u>Anti-CD8</u>	<u>ME1</u>	<u>EDU-1</u>
B*2705	4:1	58/100	-/46	-/89	-/13	10/-	38/-
	1:1	52	-	-	-	10/-	62/-
B*2701	4:1	36	-	-	-	16	23
	1:1	29	-	-	-	11	20
B*2702	4:1	34	-	-	-	5	20
	1:1	21	0	10	0	-	-
B*2703	4:1	50	-	-	-	0	43
	1:1	44	-	-	-	1	38
B*2704	4:1	42	13	39	8	8	33
B60 ^b	4:1	45	-	-	-	12	54
	1:1	31	-	-	-	9	35

^a Se eligió una diana representativa de cada antígeno HLA (R69 para B*2705, LH para B*2701, R34 para B*2702, LAR para B*2703, WewakI para B*2704 y LB para B60). Los valores numéricos representan % de lisis específica.

^b El AcM usado frente al antígeno B60 es W6/32 y no ME1.

Los resultados corroboran la especificidad del clon 37SLG por los subtipos de HLA-B27, y por B60. Ocasionalmente (con los subtipos B*2705, B*2702 y B*2704) se ensayó la influencia de CD3, CD4 y CD8 en el reconocimiento observándose que los AcM anti-CD3 y anti-CD8 pero no anti-CD4 inhiben dicha lisis, aunque la inhibición de sólo el 54% con anti-CD3 en dianas B*2705 estaría en consonancia con la mayor lisis observada hacia este subtipo (Tabla 34).

4.5.15.- GRUPO XV

Este grupo está formado por el clon 20.8GRK que reconoce todos los subtipos de HLA-B27 excepto B*2704 (Tabla 36). Este clon diferencia a la LCL B*2702⁺ NW de otras LCL que expresan este subtipo. Ello, unido a que también diferencia a los subtipos B*2704 y B*2706, que únicamente difieren en las posiciones 114 y 116, ubicadas en la lámina β y no accesibles al TCR, sugiere que el epítipo reconocido por este clon implica peptidos.

La especificidad por los cinco subtipos de HLA-B27 fue confirmada por ensayos de inhibición con los AcM ME1 y EDU-1 (Tabla 37).

También se probó que el transfectante que contenía el cambio Y116 dentro del contexto de B*2705 era específicamente reconocido por parte de este clon.

Los AcM anti-CD3 y anti-CD8 inhibieron específicamente la lisis mediada por todos los subtipos ensayados, excepto en el caso de anti-CD8 y B*2703 lo que concuerda con la mayor lisis de la correspondiente diana LAR.

Tabla 36. Especificidad fina del clon 20.8GRK del grupo XV: Ensayo de panel^a

<u>CELULA</u>	<u>HLA</u>				<u>CTL</u>		
	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>DR</u>	<u>20.8GRK</u>	<u>4:1</u>	<u>1:1</u>
LG15	32	*2705	2	1	<u>51(1)</u>	<u>37(1)</u>	
R69	3, 24	*2705, 7	-	3, 5	<u>44(11)</u>	<u>29(9)</u>	
LH	24	*2701, 8	1, 7	3, 4	<u>62(2)</u>	<u>36(2)</u>	
R34	2, 24	*2702, 18	2,5	3,5	<u>39(3)</u>	<u>21(3)</u>	
R56	2, 11	*2702, 14	-	-	<u>38(2)</u>	<u>23(2)</u>	
NW	3, 33	*2702, 8	-	-	5(2)	-	
CH	31, 32	*2703, 18	2, 7	8, 11	<u>24(2)</u>	<u>22(2)</u>	
LAR	23, 31	*2703, 53	2, 4	-	<u>71(4)</u>	<u>35(4)</u>	
R42	2, 9	*2704, *2706	-	-	<u>35(3)</u>	<u>23(3)</u>	
WEI	11,24	*2704, 62	2, 4	2	12(6)	7(6)	
KNE	1, 2	*2704, 8	-	2, 3	6(3)	9(3)	
LIE	2, 11	*2706, 5	3	12	<u>42(2)</u>	<u>30(2)</u>	
PAR	11, 24	*2706, 48	-	2, 11	<u>65(5)</u>	<u>43(4)</u>	
JY	2	7	-	4, 6	0(1)	0(1)	
LB	28	60	3	6	0(1)	0(1)	
SWEIG	29	61	2	11	10(7)	5(6)	
TTL	11, 33	51, 54	1, 3	2, 6	0(1)	0(1)	
VEN	3, 31	18, 55	3, 5	-	0(1)	4(1)	
VOO	1, 3	8, 56	1	-	6(2)	2(2)	
FJO	2, 3	7, 16	-	2	0(1)	6(1)	

^a Ver Tabla 3.

Tabla 37. Ensayos de inhibición con AcM del clon 20.8GRK del grupo XV.

<u>ANTIGENO^a</u>	<u>E:D</u>	<u>20.8GRK</u>					
		<u>Nada</u>	<u>Anti-CD3</u>	<u>Anti-CD4</u>	<u>Anti-CD8</u>	<u>ME1</u>	<u>EDU-1</u>
B*2705	4:1	58	9	58	18	18	64
	1:1	38	0	28	3	2	25
B*2701	4:1	63/67	-	-	-	3/7	51/73
	1:1	14/-	-	-	-	0/-	40/-
B*2702	4:1	50	15	55	21	8	65
	1:1	30	5	30	13	4	45
B*2703	4:1	81/68	0	69	64	19	79
	1:1	50/51	0	45	43	12	52
B*2706	4:1	73	27	66	24	25	82
	1:1	56	15	48	11	13	63
B*2705-Y116 ^b	2:1	58/62	14/-	51/-	12/-	14/13	51/53
	1:1	39/49	12/-	34/-	10/-	10/7	37/38

^a Se eligió una diana representativa de cada antígeno HLA (R69 para B*2705, LH para B*2701, R34 para B*2702, LAR para B*2703 y PAR para B*2706). Los valores numéricos representan % de lisis específica.

^b Esta diana es el transfectante de HMy2.C1R que expresa el gen de HLA-B*2705 con el cambio Y116 correspondiente a B*2706.

Como este clon es el único que diferencia los subtipos B*2704 y B*2706, se realizaron ensayos de inhibición fría usando líneas B*2705⁺ y B*2706⁺ como dianas marcadas (Figura 10). Este ensayo corrobora, además de la naturaleza monoclonal de la especificidad, la similitud en el reconocimiento

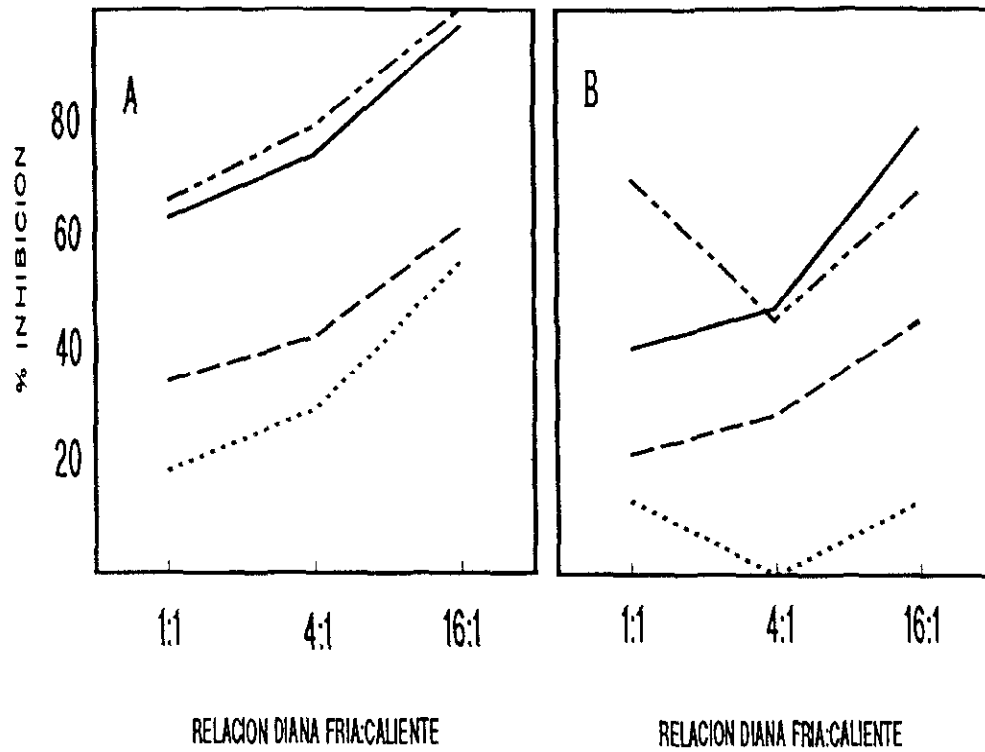


Figura 10. Inhibición fría de la citotoxicidad del clon 20.8GRK frente a células diana marcadas R69 (B*2705) (A) y PAR (B*2706)(B). La relación E:D usada en ambos casos fue 4:1. Los porcentajes de liberación específica de ^{51}Cr en ausencia de células competidoras fueron: 38 y 47% respectivamente. Se usaron como células competidoras las siguientes LCL: R69 (—), Wewaki (— —), PAR (—••—) y JY (•••).

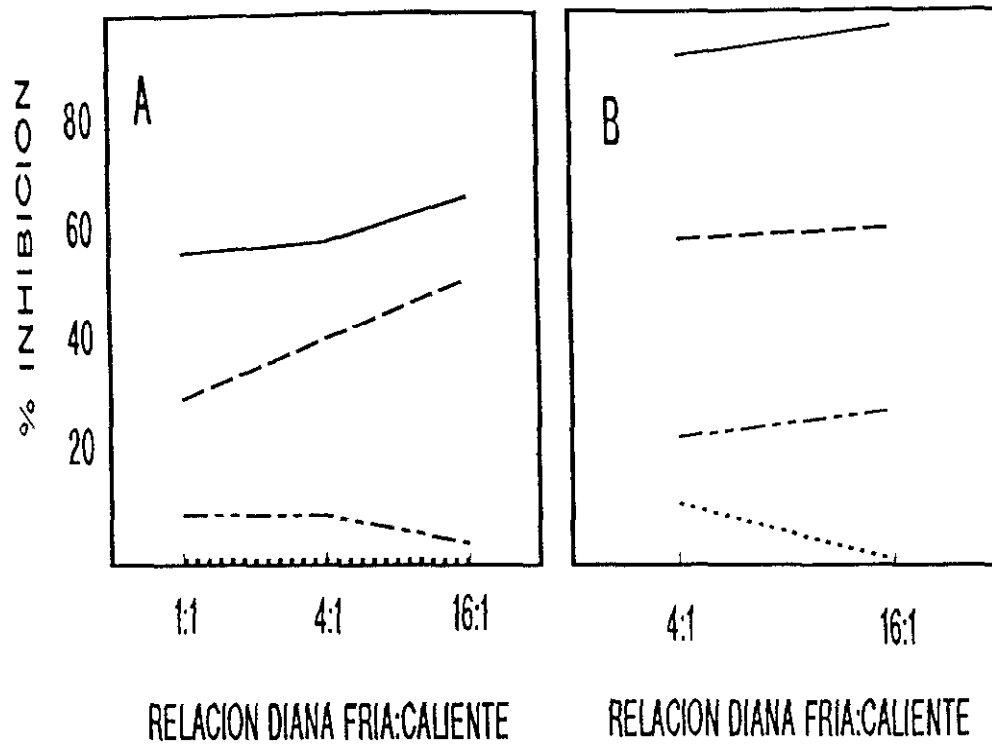


Figura 11. Inhibición fría de la citotoxicidad del clon 20.8GRK frente a células diana marcadas R69 (B*2705) (panel A) y R34 (B*2702)(B) por células competidoras R69 (—), R34 (- -), NW (B*2702) (-••-) y JY (•••). La relación E:D usada en ambos casos fue 4:1. Los porcentajes de liberación específica de ^{51}Cr en ausencia de células competidoras fueron: 52 y 64% respectivamente.

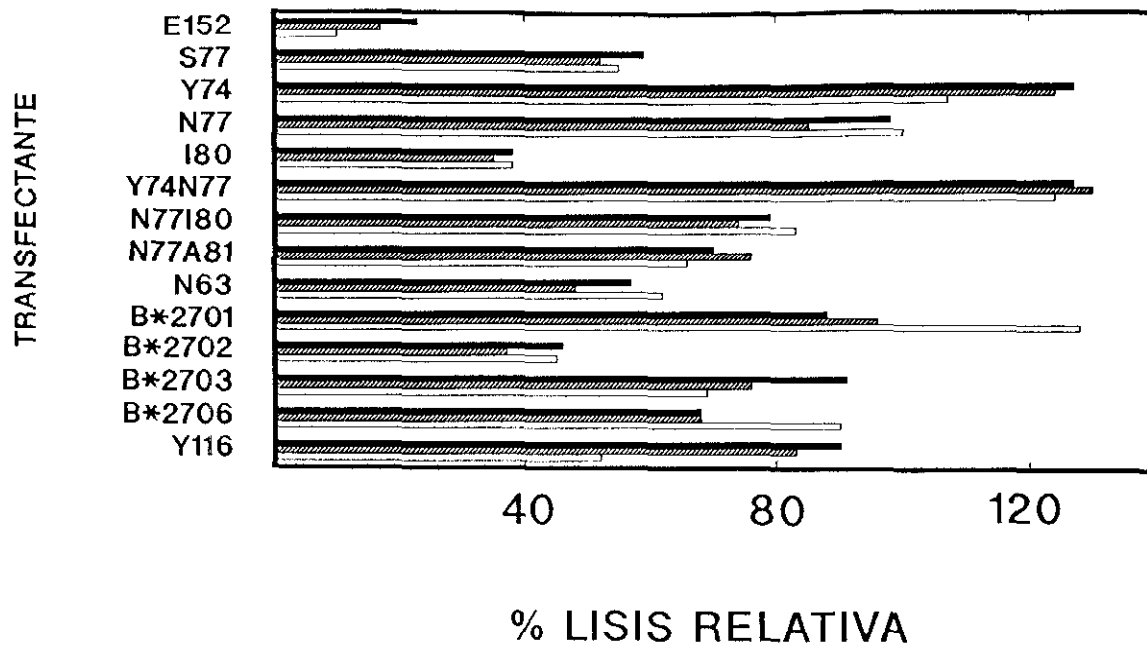


Figura 12. Citotoxicidad del clon 20.8GRK frente a los transfectantes HMy2.C1R que expresan los antígenos correspondientes a todos los subtipos excepto B*2704 o mutantes específicos de HLA-B27. Los mutantes fueron designados con el código de una letra del aminoácido introducido seguido del correspondiente número de orden que representa la posición en la estructura de HLA-B*2705. Los resultados se expresan como % de lisis relativa con respecto al transfectante equivalente de B*2705 a la misma relación E:D. Los resultados se obtuvieron a las relaciones E:D de 4:1 (barras negras), 1:1 (barras ralladas) y 0.5:1 (barras blancas). La lisis específica del transfectante B*2705⁺ a las tres relaciones E:D fue: 56, 46 y 29%. Como control negativo se usaron las células HMy2C1R transfectadas con el gen pSV2neo cuya lisis fue siempre inferior al 6%.

de los subtipos B*2705 y B*2706 observado en el ensayo de panel (Tabla 36) ya que ambas células compiten con eficiencia similar. Se observó una debil inhibición con la línea B*2704⁺ usada como competidora no marcada con dianas B*2705⁺ radioactivas y, bastante mas claramente cuando la célula marcada es B*2706⁺. Esto indica un debil reconocimiento del subtipo B*2704.

El clon 20.8GRK, es de todos los estudiados, el que diferencia más claramente a la línea NW del resto de las B*2702⁺ (Tabla 36) ya que mientras que lisa eficientemente a R34 y R56 la lisis frente a NW es negativa. Esta diferencia fue confirmada en ensayos de inhibición fría (Figura 11), donde sólo R34 pero no NW es capaz de competir eficientemente frente a dianas marcadas B*2705⁺ ó B*2702⁺. Este experimento implica una ausencia casi total del epitopo reconocido por el clon 20.8GRK en NW.

El ensayo de citotoxicidad frente a mutantes de HLA-B27 (Figura 12) indica que:

- * Existe correlación entre la nula lisis del subtipo B*2704 con la destrucción del epitopo en E152 y su alteración parcial en S77.
- * El reconocimiento algo menor del subtipo B*2702 con respecto a B*2705 se correlaciona con la ligera alteración del epitopo en los transfectantes N77A81, N77I80. El efecto de la mutación I80 es parcialmente compensado por el cambio N77.
- * Existe una correlación entre el eficiente reconocimiento de B*2701 (Tabla 36) y de los mutantes que contienen el cambio Y74, presente en ese subtipo.
- * El reconocimiento de B*2706 se correlaciona con la eficiente lisis del transfectante Y116.

4.5.16.- GRUPO XVI

El clon 100GRK, del individuo GM, reconoce todos los subtipos de HLA-B27 excepto B*2703 (Tabla 38). La lisis del subtipo B*2703 fue considerada negativa ya que, aunque era capaz de lisar muy marginalmente a la línea LAR, no presentaba valores de lisis apreciables con la línea CH. El resto de los subtipos eran lisados con valores tambien bastante bajos por lo que no puede descartarse un reconocimiento residual del subtipo B*2703. Además de todas las LCL HLA-B27⁻ probadas se observó lisis positiva frente a las LCL SWEIG y VOO, en ambos casos con valores similares a los obtenidos frente a dianas B27⁺.

Tabla 38. Especificidad fina del clon 100GRK del grupo XVI: Ensayo de panel^a

<u>CELULA</u>	<u>HLA</u>				<u>CTL</u>	
	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>DR</u>	<u>100GRK</u>	
					<u>4:1</u>	<u>1:1</u>
R15	3	*2705, 35	1, 4	1	<u>43(1)</u>	<u>20(1)</u>
R69	3, 24	*2705, 7	-	3, 5	<u>31(4)</u>	<u>15(2)</u>
LH	24	*2701, 8	1, 7	3, 4	<u>14(2)</u>	6(2)
R34	2, 24	*2702, 18	2,5	3,5	<u>22(2)</u>	<u>12(1)</u>
R56	2, 11	*2702, 14	-	-	<u>10(2)^b</u>	8(2)
CHR	2, 3	*2702, 8	6	2, 7	<u>19(1)</u>	8(1)
CH	31, 32	*2703, 18	2, 7	8, 11	2(2)	2(2)
LAR	23, 31	*2703, 53	2, 4	-	<u>15(2)</u>	7(1)
WEI	11,24	*2704, 62	2, 4	2	<u>32(2)</u>	<u>16(1)</u>
SIA					-	-
KNE	1, 2	*2704, 8	-	2, 3	<u>27(3)</u>	<u>24(2)</u>
LIE	2, 11	*2706, 5	3	12	<u>22(1)</u>	-
PAR	11, 24	*2706, 48	-	2, 11	<u>15(1)</u>	-
JY	2	7	-	4, 6	-	-
LB	28	60	3	6	8(1)	-
SWEIG	29	61	2	11	<u>17(1)</u>	-
TTL	11, 33	51, 54	1, 3	2, 6	0(1)	-
VEN	3, 31	18, 55	3, 5	-	3(1)	-
VOO	1, 3	8, 56	1	-	<u>30(1)</u>	-

^a Ver Tabla 3.

^b La lisis del subtipo B*2702 se consideró positiva ya que las 3 LCL usadas presentaron valores >10% a E:D 4:1.

Los ensayos de inhibición con AcM (Tabla 39) permitieron corroborar la especificidad anti-B27 en el caso de tres subtipos (B*2705, B*2701 y B*2704). Asimismo, la citotoxicidad de este clon frente a dianas B*2705⁺ fue inhibida por los AcM anti-CD3 y anti-CD8 (Tabla 39).

Tabla 39. Ensayos de inhibición con AcM del clon 100GRK del grupo XVI.

<u>ANTIGENO^a</u>	<u>E:D</u>	<u>100GRK</u>					
		<u>Nada</u>	<u>Anti-CD3</u>	<u>Anti-CD4</u>	<u>Anti-CD8</u>	<u>ME1</u>	<u>EDU-1</u>
B*2705	4:1	33/21	-/12	-/26	-/0	3/4	24/22
	1:1	18/12	-/7	-/16	-/4	2/3	25/13
B*2701	4:1	23	-	-	-	1	18
	1:1	14	-	-	-	2	9
B*2704	4:1	30	-	-	-	12	29

^a Se eligió una diana representativa de cada antígeno HLA (R69 para B*2705, LH para B*2701 y Wewakl para B*2704). Los valores numéricos representan % de lisis específica.

4.5.17.- GRUPO XVII

El clon 21S15 reconoce los subtipos B*2705, B*2701, B*2703, B*2704 y B*2706 del donante SR (Tabla 40). Células B*2702⁺ así como las que expresan antígenos del grupo de reacción serológico de HLA-B27 (B7, B60/61 y Bw22) no presentaron reactividad detectable con este clon.

El estudio con AcM anti-HLA (Tabla 41) demostró, en las cinco LCL representativas usadas para cada uno de los subtipos de HLA-B27 reconocidos por el clon 21S15, que la especificidad estaba mediada por HLA-B27 en todos los casos. Asimismo, anti-CD3 y anti-CD8 inhibieron significativamente la lisis frente a B*2705.

Tabla 40. Especificidad fina del clon 21S15 del grupo XVII: Ensayo de panel^a

<u>CELULA</u>	<u>HLA</u>				<u>CTL</u>
	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>DR</u>	<u>21S15</u>
					<u>4:1</u>
R70	3, 24	*2705, 7	-	3, 5	<u>31(1)</u>
R15	3	*2705, 35	1, 4	1	<u>43(1)</u>
R69	3, 24	*2705, 7	-	3, 5	<u>51(4)</u>
LH	24	*2701, 8	1, 7	3, 4	<u>49(3)</u>
R34	2, 24	*2702, 18	2,5	3,5	0(1)
R56	2, 11	*2702, 14	-	-	5(1)
CH	31, 32	*2703, 18	2, 7	8, 11	<u>19(3)</u>
LAR	23, 31	*2703, 53	2, 4	-	<u>31(3)</u>
R42	2, 9	*2704, *2706	-	-	<u>82(1)</u>
WEI	11,24	*2704, 62	2, 4	2	<u>42(5)</u>
KNE	1, 2	*2704, 8	-	2, 3	<u>78(3)</u>
LIE	2, 11	*2706, 5	3	12	<u>47(3)</u>
PAR	11, 24	*2706, 48	-	2, 11	<u>55(2)</u>
JY	2	7	-	4, 6	7(2)
LB	28	60	3	6	2(2)
SWEIG	29	61	2	11	5(2)
TTL	11, 33	51, 54	1, 3	2, 6	0(2)
VEN	3, 31	18, 55	3, 5	-	6(2)
VOO	1, 3	8, 56	1	-	6(2)

^a Ver tabla 3.

Tabla 41. Ensayos de inhibición con AcM del clon 21S15 del grupo XVII.

<u>ANTIGENO^a</u>	<u>E:D</u>	<u>21S15</u>					
		<u>Nada</u>	<u>Anti-CD3</u>	<u>Anti-CD4</u>	<u>Anti-CD8</u>	<u>ME1</u>	<u>EDU-1</u>
B*2705	4:1	58/80	18/-	66/-	2/-	-/12	-/82
B*2701	4:1	49	-	-	-	11	30
B*2703	4:1	42	-	-	-	12	46
B*2704	4:1	42/61	-	-	-	6/11	34/64
B*2706	4:1	39/71	-	-	-	0/14	53/37

^a Se eligió una diana representativa de cada antígeno HLA (R69 para B*2705, LH para B*2701, LAR para B*2703, WewakI para B*2704 y PAR para B*2706). Los valores numéricos representan % de lisis específica.

4.5.18.- GRUPO XVIII

Finalmente el grupo XVIII está formado por aquellos clones (37GRK y 123.8GRK del respondedor GM) capaces de reconocer a los seis subtipos de HLA-B27 usados en este estudio (Tabla 42). El clon 37GRK presenta valores elevados de citotoxicidad frente a todos los subtipos. El clon 123.8GRK presenta el mismo comportamiento, si bien las lisis obtenidas en este caso son más reducidas. El clon 37GRK es capaz de lisar dos LCL HLA-B27⁻ (HOM-1 y TTL) con valores de citotoxicidad próximos al 30%, que es aproximadamente la mitad de la lisis obtenida frente a dianas HLA-B27⁺, mientras que el clon 123.8GRK no lisa a las LCL mencionadas. Ninguno de ambos clones es capaz de lisar a otras dianas HLA-B27⁻ probadas en este ensayo de panel. La amplia especificidad

Tabla 42. Especificidad fina de los clones del grupo XVIII: Ensayo de panel^a

CELULA DIANA	HLA				CTL			
	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>DR</u>	<u>37GRK</u>		<u>123.8GRK</u>	
					<u>4:1</u>	<u>1:1</u>	<u>4:1</u>	<u>1:1</u>
LG15	32	*2705	2	1	<u>64(2)</u>	<u>40(2)</u>	<u>30(6)</u>	<u>21(1)</u>
R69	3, 24	*2705, 7	-	3, 5	<u>55(18)</u>	<u>46(12)</u>	<u>34(7)</u>	<u>19(6)</u>
R15	3	*2705, 35	1,4	1	-	-	<u>49(3)</u>	<u>33(3)</u>
LH	24	*2701, 8	1, 7	3, 4	<u>53(2)</u>	<u>26(2)</u>	<u>29(5)</u>	<u>17(5)</u>
R34	2, 24	*2702, 18	2, 5	3, 5	<u>82(3)</u>	<u>51(2)</u>	<u>42(4)</u>	<u>21(4)</u>
CHR	2, 3	*2702, 35	6	2, 7	-	-	<u>37(2)</u>	<u>50(1)</u>
R56	2,11	*2702,14	-	-	<u>79(3)</u>	<u>59(3)</u>	<u>59(4)</u>	<u>46(4)</u>
NW	3, 33	*2702, 8	-	-	<u>73(2)</u>	<u>37(1)</u>	<u>44(1)</u>	<u>41(1)</u>
CH	31, 32	*2703, 18	2, 7	8, 11	<u>41(4)</u>	<u>21(4)</u>	<u>19(2)</u>	<u>11(1)</u>
LAR	23, 31	*2703, 53	2, 4	-	<u>61(1)</u>	<u>42(1)</u>	<u>35(4)</u>	<u>20(4)</u>
R42	2, 9	*2704, *2706	-	-	<u>86(3)</u>	<u>62(3)</u>	<u>21(3)</u>	<u>11(2)</u>
WEI	11, 24	*2704, 62	2, 4	2	<u>75(7)</u>	<u>64(3)</u>	<u>30(5)</u>	<u>18(4)</u>
JSL	11	*2704, 48	6	2	-	-	<u>17(2)</u>	-
ET	2, 11	*2704, 38	-	4	<u>77(1)</u>	<u>70(1)</u>	-	-
KNE	1, 2	*2704, 8	-	2, 3	<u>62(1)</u>	<u>30(1)</u>	<u>38(2)</u>	<u>19(1)</u>
SIA	2, 24	*2704, 60	4	3, 5	-	-	-	<u>22(1)</u>
LIE	2, 11	*2706, 5	-	12	<u>74(3)</u>	<u>54(3)</u>	<u>15(2)</u>	<u>20(2)</u>
PAR	11, 24	*2706, 48	-	2, 11	<u>55(7)</u>	<u>57(3)</u>	<u>35(5)</u>	<u>22(5)</u>
HOM-1	3	7	7	2	<u>29(2)</u>	<u>19(4)</u>	2(2)	-
TTL	11, 33	51, 54	1, 3	2, 6	<u>23(12)</u>	<u>13(5)</u>	2(3)	0(1)
JY	2	7	-	4, 6	5(1)	0(1)	0(3)	-
LB	28	60	3	6	0(1)	1(1)	0(1)	0(1)
SWEIG	29	61	2	11	8(4)	1(4)	1(1)	0(1)
VEN	3, 31	18, 55	3, 5	-	3(2)	0(2)	0(1)	-
VOO	1, 3	8, 56	1	-	6(4)	4(4)	3(1)	5(1)
FJO	2, 3	7, 16	-	2	9(4)	7(4)	0(1)	0(1)

^a Ver Tabla 3.

con subtipos de HLA-B27 deducida de la Tabla 42 en ambos casos, fue corroborada por inhibición con AcM (Tabla 43). En todos los casos la molécula reconocida fué el correspondiente subtipo de HLA-B27 ya que la citotoxicidad hacia cada LCL se inhibió por el AcM ME1 y no por EDU-1.

Se realizaron también ensayos de inhibición con AcM específicos de CD3, CD4 y CD8 (Tabla 43) observándose que el AcM α -CD8 inhibió la lisis en todos los casos. Con el AcM anti-CD3 se observó una inhibición parcial frente a dianas B*2706 y mucho menor frente a dianas B*2702 ó B*2704. Estos datos sugieren una reactividad algo mayor de 37GRK frente a B*2702 y B*2704.

En experimentos análogos con el clon 123.8GRK el comportamiento de ambos AcM anti-CD3 y anti-CD8 es muy similar y en todos los casos la inhibición producida por los mismos es significativa. En ambos clones el AcM α -CD4 no presentó un efecto inhibitorio significativo.

Tabla 43. Ensayos de inhibición con AcM de los clones del grupo XVIII.

ANTIGENO ^a	AcM	CTL			
		37GRK		123.8GRK	
		4:1	1:1	4:1	1:1
B*2705	Nada	84	64	48/55	26/37
	Anti-CD3	14	4	-/2	-/2
	Anti-CD4	71	56	-/52	-/31
	Anti-CD8	7	6	-/0	-/2
	ME1	7	4	19/-	14/-
	EDU-1	76	60	49/-	32/-
B*2701	Nada	50	23	24/36	17
	Anti-CD3	-	-	-/0	2
	Anti-CD4	-	-	-/15	21
	Anti-CD8	-	-	-/0	0
	ME1	4	0	0/0	4
	EDU-1	26	19	20/37	19
B*2702	Nada	89	66	42/63	18/40
	Anti-CD3	57	36	-/18	-/10
	Anti-CD4	75	62	-/64	-/51
	Anti-CD8	12	8	-/10	-/5
	ME1	7	5	0/-	0/-
	EDU-1	79	62	49/-	21/-
B*2703	Nada	62	46	35/44	29
	Anti-CD3	7	6	-/15	10
	Anti-CD4	57	33	-/51	42
	Anti-CD8	3	3	-/5	9
	ME1	4	8	14/-	-
	EDU-1	66	37	32/-	-
B*2704	Nada	83	75	31/33	16/26
	Anti-CD3	71	37	-/6	-/4
	Anti-CD4	72	66	-/37	-/24
	Anti-CD8	16	10	-/9	-/0
	ME1	10	7	4/-	4/-
	EDU-1	87	62	37/-	24/-
B*2706	Nada	87	63	43	26/22
	Anti-CD3	38	25	0	0/-
	Anti-CD4	78	54	46	34/-
	Anti-CD8	3	0	0	6/-
	ME1	0	0	-	-/0
	EDU-1	98	60	-	-/23

^a Los valores numéricos representan % de citotoxicidad. Se usaron las siguientes LCL: R69 (B*2705 con 37GRK), R15 (B*2705 con 123.8GRK), LH (B*2701), R56 (B*2702), CH (B*2703 con 37GRK), LAR (B*2703 con 123.8GRK), WewakI (B*2704), LIE (B*2706 con 37GRK) y PAR (B*2706 con 123.8GRK).

El hecho de que el clon 37GRK fuera capaz de lisar dos dianas HLA-B27⁻ que no presentaban ningún antígeno de clase I en común (Tabla 42) sugirió la posibilidad de que este clon pudiera poseer una reactividad adicional α -clase II. Por ello se realizó un ensayo de panel con dianas representativas de los antígenos HLA-DR de estas LCL (DR2, 6) que se resume en la Tabla 44. El panel incluía además de las dianas DR6⁺ varias LCL representativas de los cuatro subtipos de DR2 (Dw2, Dw12, Dw21 y Dw22). De este estudio se deduce que el clon 37GRK reconoce específicamente dianas homocigotas HLA-DR2Dw2⁺ pero no a aquellas que expresaban los otros subtipos de DR2. De las dos LCL HLA-DR2Dw2 heterocigotas estudiadas solo fué lisada una de ellas (TTL). Las tres dianas Dw2⁺ reconocidas presentan valores de lisis aproximadamente intermedios a los obtenidos con dianas B*2705⁺, usadas como controles. Además dos subclones derivados de 37GRK por dilución límite mantuvieron el mismo patrón de reacción dual anti-clase I y -II, indicando que esta reactividad está mediada por un único clon.

La citotoxicidad de 37GRK se ensayó en presencia de AcM anti-HLA frente a dos dianas DR2Dw2⁺ (Tabla 45). En ambos casos la lisis fué totalmente inhibida por los AcM EDU-1 (anti-clase II monomórfico) y HB55 (anti-HLA-DR monomórfico) no presentando influencia alguna los monoclonales W6/32 (monomórfico anti-clase I), B72.1 (monomórfico anti-HLA-DP) y Genox1 (anti-HLADQ1).

También se estudió el papel de CD3 y CD8 en la citotoxicidad de 37GRK hacia las dianas DR2Dw2⁺. Como se observa en la Tabla 45 la lisis de ambas LCL solo fué inhibida con el AcM α -CD3 obteniéndose valores de lisis similares con los AcM α -CD4, α -CD8 y en ausencia de AcM. Este resultado es consistente con la no participación de CD8 en la lisis dirigida contra antígenos de clase II.

Tabla 44. Especificidad fina del clon 37GRK del grupo XVIII (Cont.): Ensayo de panel^a

DIANA	HLA										1:1
	A	B	Cw	DR	Dw	DQ	4:1	37GRK			
LG15	32	*2705	2	1	-	-	63(6)	41(2)			
R69	3, 24	*2705, 7	-	3, 5	-	-	60(18)	45(11)			
HOMI	3	7	7	2	2	1	29(2)	19(4)			
BBF	1	37	2	2	2	1	30(7)	24(4)			
KT7	11, 24	52	-	2	12	1	2(1)	0(1)			
TOK	24	52	-	2	12	1	3(2)	1(2)			
FJO	2, 3	7, 16	-	2	21	1	7(3)	7(3)			
BAS	2	51	-	2	22	3	4(2)	2(2)			
I2w9	2, 26	57, 66	6	2	22	-	0(3)	0(2)			
TTL	11, 33	51, 54	1, 3	2, 6	2, -	1	23(12)	13(5)			
VIV	2, 3	35, 44	-	1, 2	1, 2	1	6(2)	3(1)			
JY	2	7	-	4, 6	-	-	4(3)	0(1)			
LB	28	60	3	6	-	-	0(2)	0(2)			
SWEIG	29	*4002	2	11	-	7	8(4)	3(4)			
VEN	3, 31	18, 55	3, 5	-	-	-	3(2)	6(2)			
VOO	1, 3	8, 56	1	-	-	-	6(4)	4(4)			
WT49	2	17	-	3	3	2	4(1)	-			

^a Ver Tabla 3.

Tabla 45. Ensayos de inhibición con AcM del clon 37GRK del grupo XVIII (Cont.).

<u>DIANA^a</u>	<u>E:D</u>	<u>37GRK</u>					
		<u>AcM</u>					
		<u>Nada</u>	<u>Anti-CD3</u>	<u>Anti-CD4</u>	<u>Anti-CD8</u>	<u>W6/32</u>	<u>EDU-1</u>
TTL	4:1	36	5	34	31	-	-
HOM-1	4:1	29	2	24	26	20	3

	<u>E:D</u>	<u>AcM</u>					
		<u>Nada</u>	<u>W6/32</u>	<u>EDU-1</u>	<u>HB55</u>	<u>B72.1</u>	<u>GENOX1</u>
TTL	4:1	21	13	1	1	21	23
HOM-1	1:1	19	23	1	4	21	16

^a Se eligió una diana representativa de LCL DR2Dw2⁺ tanto de células homocigotas (HOM-1) como heterocigotas (TTL). Los valores numéricos representan % de lisis específica.

La naturaleza monoclonal de este patrón de reacción fué analizada en ensayos de inhibición fría (Figura 13). Las 3 LCL HLA-B27⁺ usadas (B*2705, B*2704 y B*2706) se inhiben mutuamente de forma eficiente. Además la célula B*2704⁺ fué la ma's eficiente competidora en los tres casos (observándose la mayor diferencia de inhibición cuando la línea marcada con ⁵¹Cr es la propia célula B*2704). Estos datos están en consonancia con los valores de la Tabla 43 donde se observaba una muy baja inhibición con el AcM α -CD3 y sugireren que las células B*2704⁺ son las más eficientemente reconocidas.

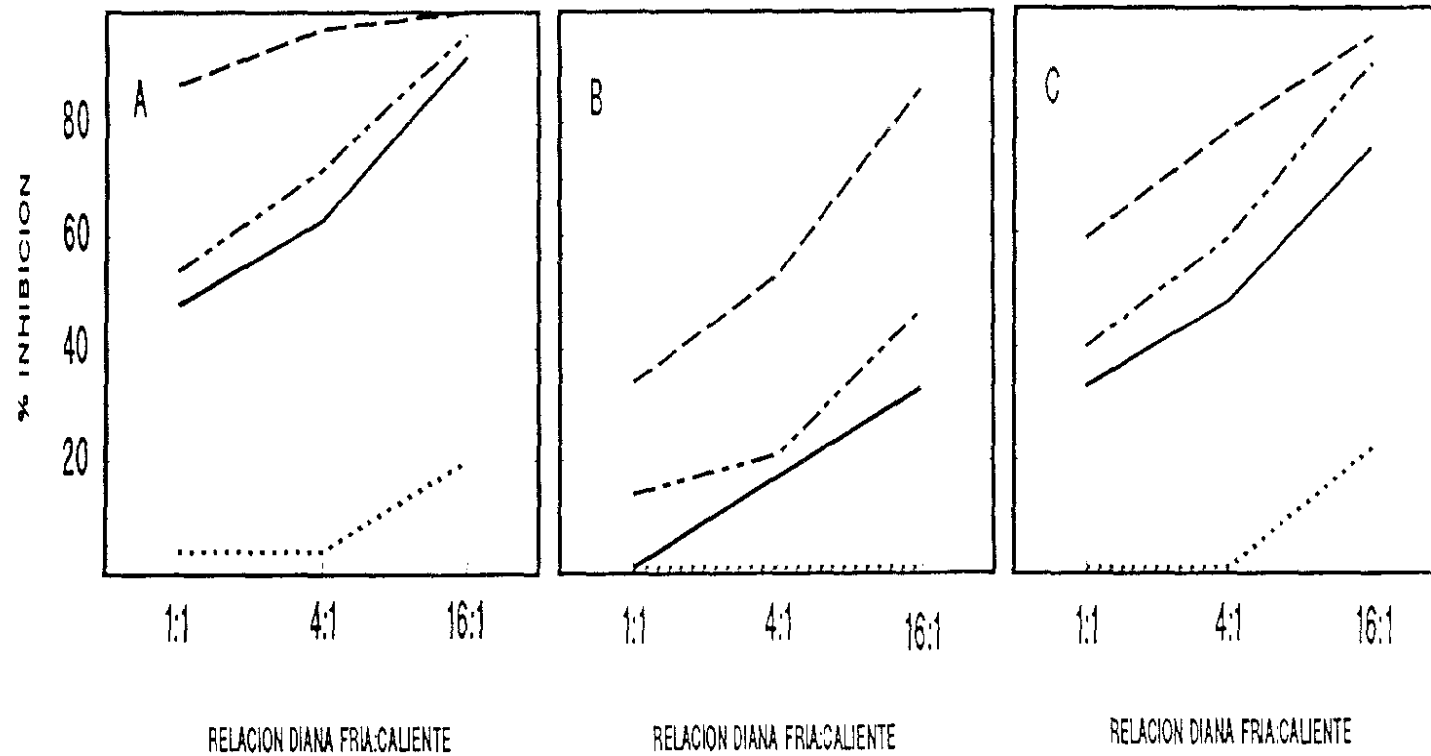


Figura 13. Inhibición fría de la citotoxicidad del clon 37GRK frente a células diana marcadas R69 (B*2705) (panel A), WewakI (B*2704)(B) y PAR (B*2706)(C). La relación E:D usada fué 4:1. Los porcentajes de liberación específica de ⁵¹Cr en ausencia de células competidoras fueron: 71, 70 y 73% respectivamente. Se usaron como células competidoras las siguientes LCL: R69 (—), WewakI (— · —), PAR (— · · —) y JY (· · ·).

Un estudio similar se realizó con dianas representativas de los distintos subtipos de HLA-DR2 (Figura 14A). La lisis de dianas B*2705⁺ fué parcial pero significativamente inhibida por células DR2Dw2⁺, lo que está en consonancia con los datos de panel de la Tabla 42 donde se observa una lisis inferior de dianas DR2Dw2⁺ que de dianas HLA-B27⁺. La inhibición fué similar con células homocigotas o heterocigotas. Las células representativas del resto de los subtipos de HLA-DR2 (Dw12, Dw21 y Dw22) no inhibieron de forma significativa la lisis de la diana B*2705⁺. El ensayo complementario (Figura 14B) con una célula diana HLA-DR2Dw2⁺ como diana marcada demostró que las células B*2705⁺ seguían siendo competidoras más eficientes que las correspondientes Dr2Dw2⁺.

El hecho de que existiera un segundo clon con un patrón similar de reconocimiento de los distintos subtipos de HLA-B27 (Tabla 42) y que presentara valores de lisis bastante inferiores sugirió que también podría reconocer, aunque marginalmente, dianas DR2⁺. Para comprobar esta posibilidad se realizaron ensayos de inhibición fría con el clon 123.8GRK (Figura 15) donde la célula marcada era una LCL B*2705 y se ensayaron células representativas de todos los subtipos de HLA-DR2 como dianas frías. El ensayo demostró un alto grado de inhibición con la diana DR2Dw2⁺ bastante similar al obtenido con el control B*2705⁺. Ninguna otra competidora produjo inhibición detectable. Además la inhibición por parte de la LCL HOM-1 (Dw2⁺) fué específica del subtipo mencionado ya que la línea FJO, usada en el ensayo, incluye en su genotipo todos los antígenos de histocompatibilidad de la LCL HOM-1, excepto el subtipo de DR2 (FJO era Dw21⁺ y HOM-1 Dw2⁺) como se observa en la Tabla 42.

Para determinar cual de los dos heterodímeros, que se expresan normalmente en células DR2Dw2⁺, era el reconocido por el clon 37GRK se realizaron ensayos de citotoxicidad con transfectantes de células L murinas que expresaban separadamente los dos heterodímeros en cuestión: $\alpha\beta$ (B5*0101) y $\alpha\beta$ (B1*1501). Ambos transfectantes coexpresaban también la molécula de adhesión humana ICAM-1. El resultado del experimento se expresa en la Figura 16 donde se observa que sólo el transfectante que expresa el producto génico B5*0101 fué lisado de forma significativa aunque en mucha menor medida que una LCL humana Dw2⁺ usada como control positivo, mientras que el correspondiente transfectante con el producto B1*1501 no fué reconocido. El menor grado de lisis de

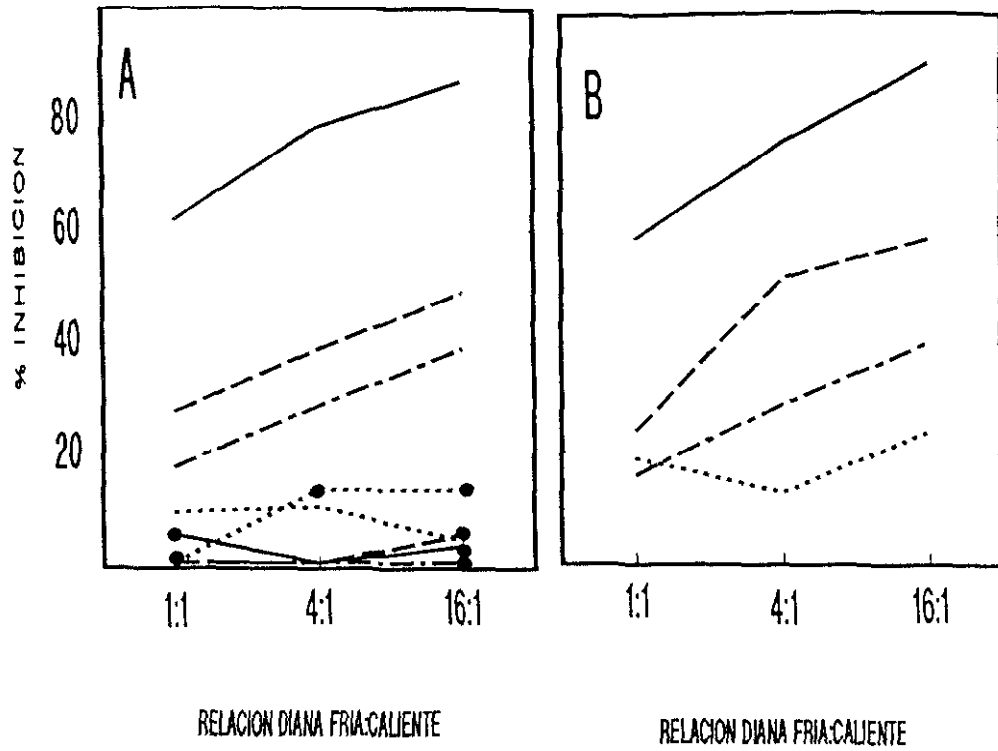


Figura 14. Inhibición fría de la citotoxicidad del clon 37GRK frente a dianas HLA-B27⁺ (A) o DR2⁺ (B). La relación E:D usada en ambos casos fue 4:1. Los porcentajes de liberación específica de ⁵¹Cr en ausencia de células competidoras fueron: 54 y 40% respectivamente. Se usaron como células competidoras R69 (—), BBF (- -), VIV (-•-), JY (•••), FJO (●—●), I2w9 (●—●—●), KT7 (●—•—●), y BAS (••••).

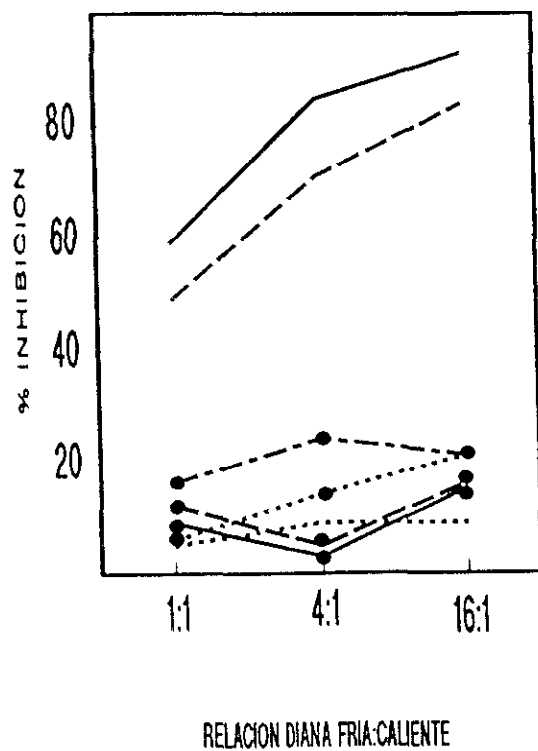


Figura 15. Inhibición fría de la citotoxicidad del clon 123.8GRK frente a dianas HLA-B27⁺. La relación E:D usada fue 4:1. El porcentaje de liberación específica de ⁵¹Cr en ausencia de células competidoras fue del 38%. Se usaron como células competidoras LG15 (—), HOM-1 (- -), VIV (- • -), JY (• • •), FJO (●—●), I2w9 (●—●—●), KT7 (●—●—●), y BAS (● • • •).

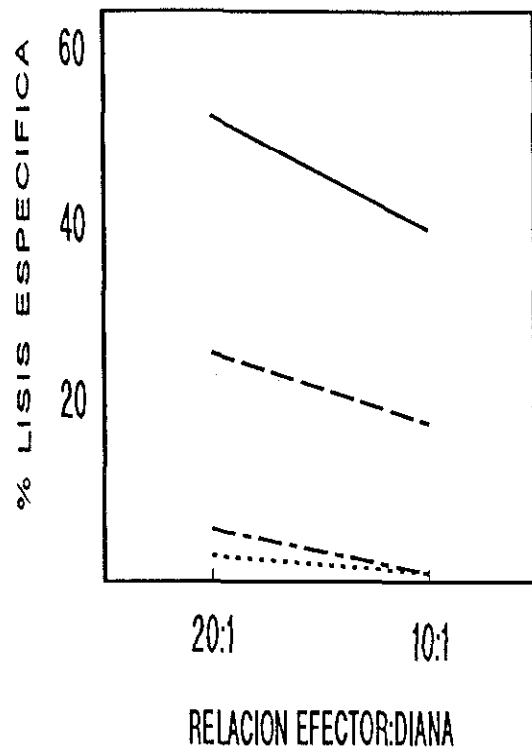


Figura 16. Citotoxicidad del clon 37GRK frente a las dianas HOM-1 (DR2Dw2)(—), 5B6 21 (B5*0101+ICAM-1)(- -), 3B4 F10 (B1*1501+ICAM-1)(- • -) Y DAP-3 (células L sin transfectar) (• • •). Los datos están expresados como % de liberación específica de ^{51}Cr .

las células murinas $\alpha\beta$ (B5*0101) respecto a las linfoblastoides DR2Dw2⁺ humanas se explica por la menor expresión de moléculas de clase II en el transfectante murino y por la menor eficiencia de las interacciones xenogénicas que implican moléculas de adhesión. También se realizaron ensayos de inhibición fría con las células murinas (Figura 17) como dianas competidoras. Así la lisis de una célula B*2705⁺ fue inhibida por el transfectante L B5*0101⁺ + ICAM-1 tan eficientemente como una célula humana Dw2⁺ usada como control. Además el correspondiente transfectante murino que sólo contenía el heterodímero $\alpha\beta$ (B5*0101) pero sin la molécula de adhesión ICAM-1 también inhibía la lisis aunque menos eficientemente. Los transfectantes del producto génico B1*1501 con o sin ICAM-1 no inhibieron. La lisis de células murinas Dw2B5*0101⁺ fué específicamente inhibida por el AcM anti-DR (a E:D 20:1 la lisis del transfectante $\alpha\beta$ (B5*0101) se inhibía en un 80% con el AcM anti-HLA-DR y no con el AcM anti-HLA-clase I).

Para profundizar en la caracterización del epítipo reconocido por el clon 37GRK se realizaron estudios de citotoxicidad frente a una serie de mutantes cuyos cambios se localizaban en posiciones específicas de las hélicas α o de la lámina β de HLA-B27. La Figura 18 muestra que ninguna de las mutaciones analizadas en las hélices α destruyen el reconocimiento por este clon. Por tanto este clon no se afecta significativamente por cambios en las hélices α de la molécula de HLA-B27. Este clon lisa a todos los transfectantes de los distintos subtipos de HLA-B27 con gran efectividad.

Entre las mutaciones de la lámina β (Figura 19) únicamente el cambio Y116 ya fuese en solitario o junto con la mutación D114 produjo una destrucción del epítipo (ambas posiciones mimetizan los cambios presentes en el subtipo B*2706 con respecto a B*2704). Este efecto está en consonancia con los ensayos de inhibición fría (Figura 13) donde se observa que el efecto heteroclíptico en la competición por el subtipo B*2704 desaparecía en el subtipo B*2706. Un estudio paralelo con el clon 123.8GRK mostró un patrón similar con los mutantes de lámina β al obtenido con el clon 37GRK, pero las lisis correspondientes fueron menos eficientes (Figura 19).

Ensayos de inhibición fría con los distintos mutantes de la lámina β (Figura 20) mostraron que Y116 fué capaz de inhibir la lisis de dianas S97 y D114, indicando que este mutante es reconocido, aunque con muy poca eficiencia por el clon 37GRK.

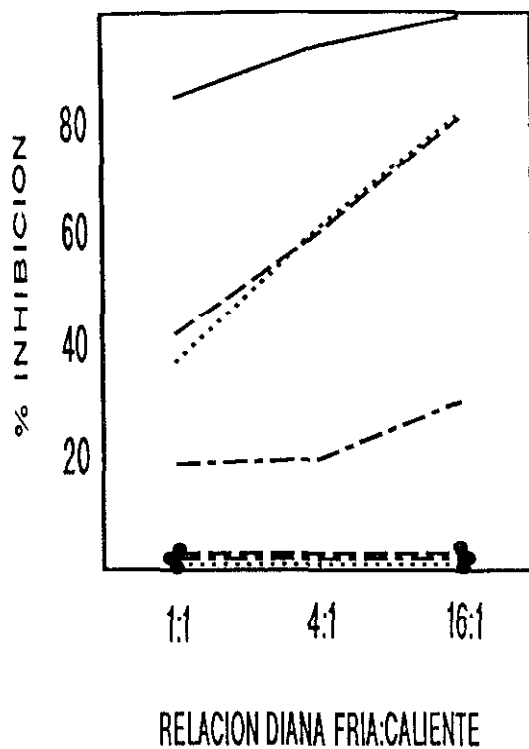


Figura 17. Inhibición fría de la citotoxicidad del clon 37GRK frente a dianas R69 (HLA-B27⁺). La relación E:D usada fue 4:1. El porcentaje de liberación específica de ⁵¹Cr en ausencia de células competidoras fue 84%. Se usaron como células competidoras R69 (—), HOM-1 (- -), 5B6 (B5*0101) (- • -), 5B6 21 (• •), 3B4 (B1*1501)(•- • -), 3B4 F10 (•• ••), y DAP-3 (•- •).

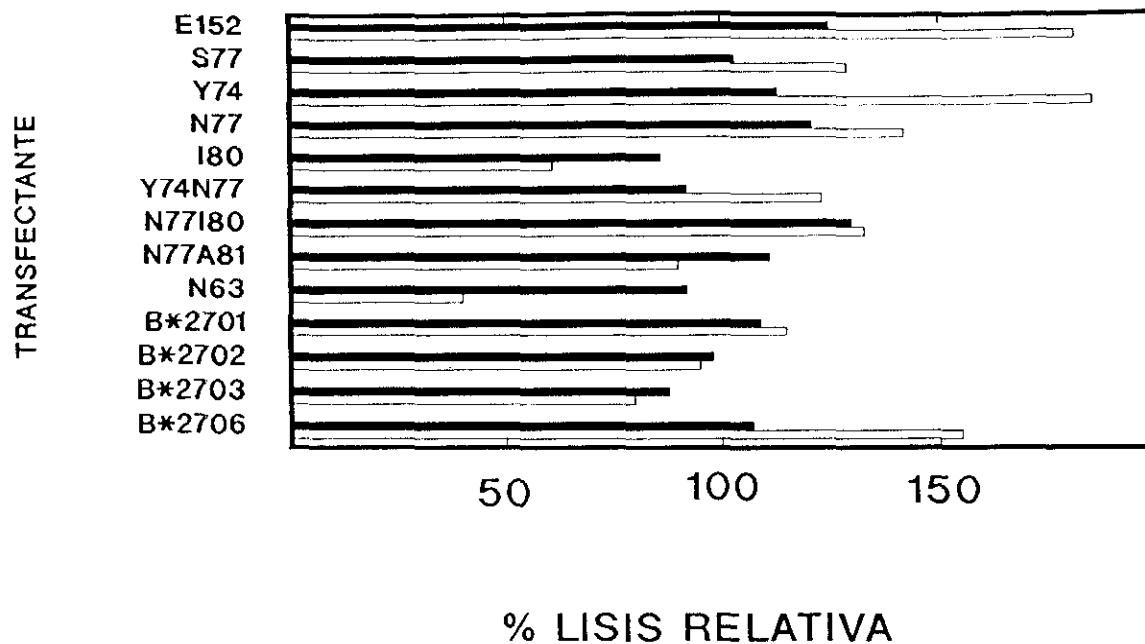


Figura 18. Citotoxicidad del clon 37GRK frente a los transfectantes HMy2.C1R que expresan los subtipos de HLA-B27, excepto B*2704, o mutantes específicos en posiciones de la hélice α de éste antígeno. Los mutantes fueron designados con el código de una letra del aminoácido introducido seguido del correspondiente número de orden que representa la posición en la estructura de HLA-B*2705. Los resultados se expresan como % de lisis relativa con respecto al transfectante equivalente de B*2705 a la misma relación E:D. Los resultados se obtuvieron a las relaciones E:D de 2:1 (barras negras) y 1:1 (barras rayadas). La lisis específica del transfectante B*2705⁺ a las tres relaciones E:D fue: 37 y 20%. Como control negativo se usaron las células HMy2C1R transfectadas con el gen pSV2neo cuya lisis fué inferior al 5%.

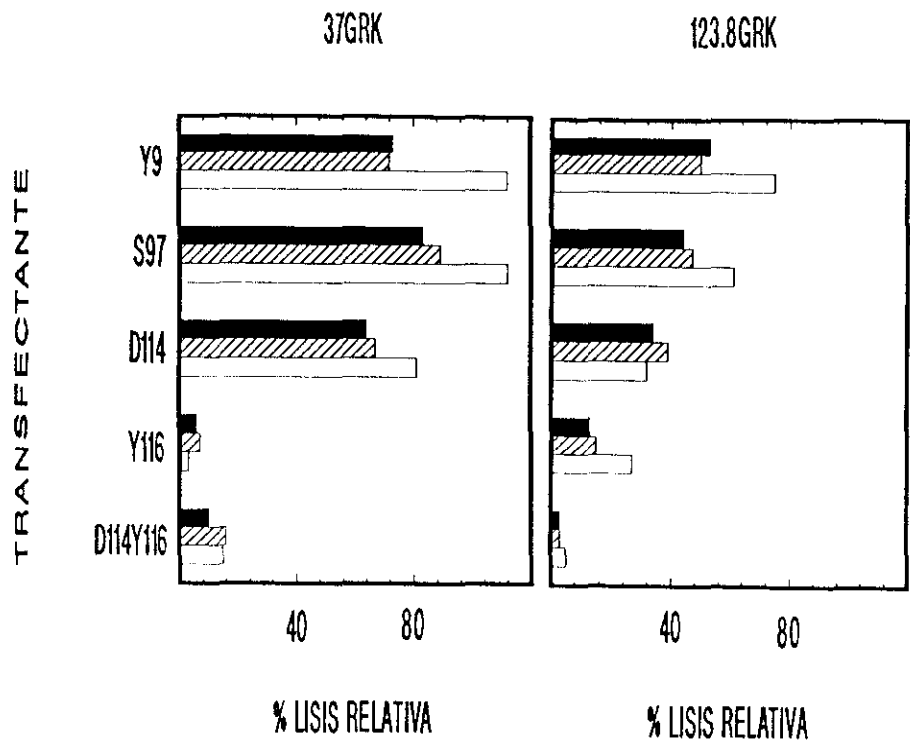


Figura 19. Citotoxicidad de los clones 37GRK y 123.8GRK frente a los transfectantes HMy2.C1R que expresan mutantes específicos en posiciones de la lámina B de HLA-B27. Los resultados se expresan como en Figura 18. La lisis específica del clon 37GRK frente al transfectante B*2705⁺ a las tres relaciones E:D fue: 60, 44, 27% respectivamente y la equivalente del clon 123.8GRK: 39, 30 y 22% respectivamente. Como control negativo se usaron las células HMy2C1R transfectadas con el gen pSV2neo cuya lisis fué inferior al 1%.

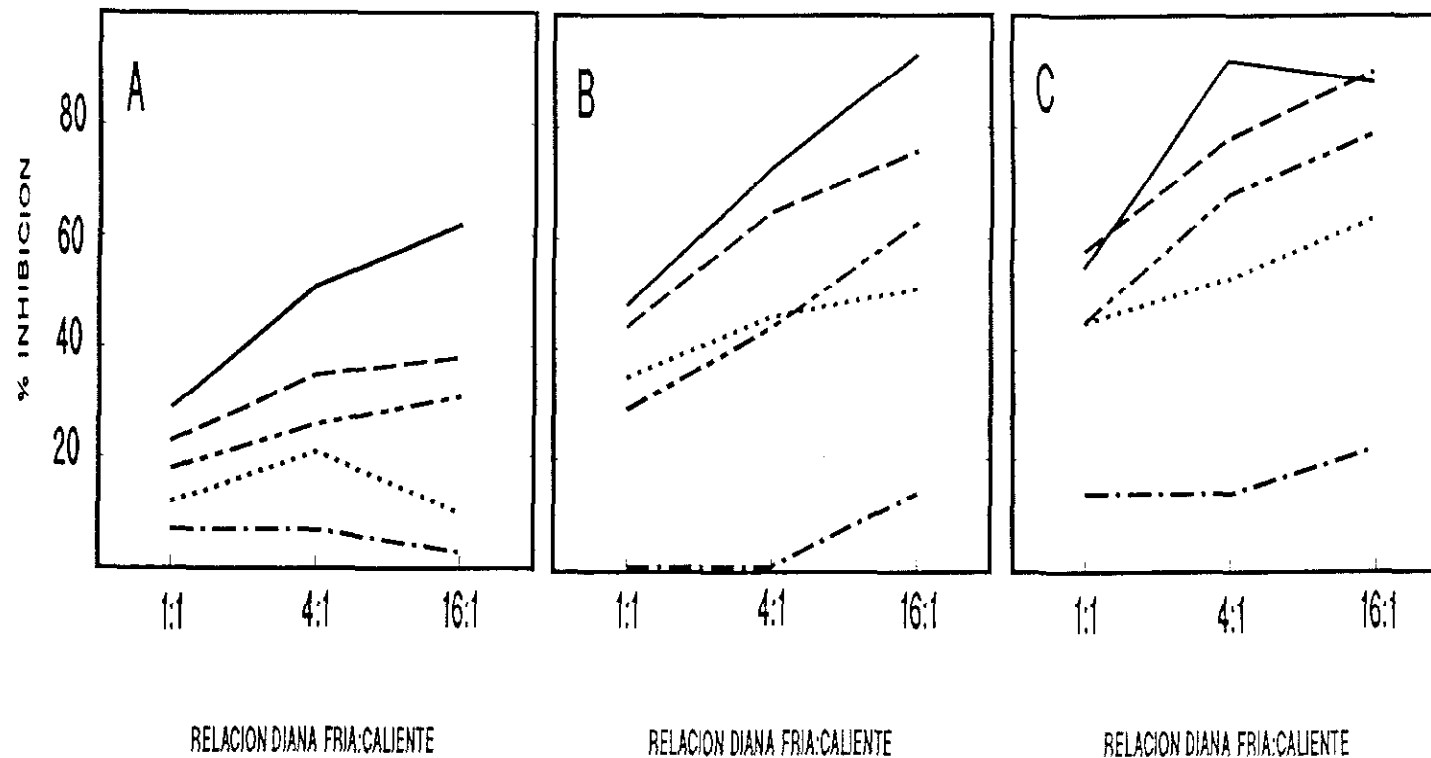


Figura 20. Inhibición fría del clon 37GRK frente a mutantes de lámina β de HLA-B27. Las células marcadas fueron los correspondientes transfectantes de HMy2.C1R que expresan: B*2705 (panel A), S97 (B) y D114 (C). La liberación específica de ^{51}Cr a la relación E:D usada (4:1) en ausencia de células competidoras fue de 77, 42 y 39% respectivamente. Las células competidoras usadas fueron los transfectantes de HMy2.C1R que expresan B*2705 (—), S97 (— —), D114 (—••—), Y116 (•••) y pSV2neo (—•—).

4.6.- EPÍTOPOS DE CELULAS T COMPARTIDOS POR LOS SUBTIPOS DE HLA-B27.

Los resultados anteriores sobre los patrones de reacción de los 66 clones citolíticos anti-B*2705 de los tres respondedores estudiados se resumen en la Tabla 46. De ella pueden resaltarse los siguientes hechos:

* Se observa reactividad compartida entre los 6 subtipos de HLA-B27 estudiados, aunque epítomos reconocidos por células T comunes a los 6 subtipos son muy raros (clones 37GRK y 123.8GRK, del grupo XVIII). En cambio, aparecen más frecuentemente reactividades compartidas entre diferentes grupos de subtipos. Este hecho indica que los subtipos de HLA-B27 comparten, en diferente grado, epítomos aloespecíficos reconocidos por células T.

* Aparece una clara jerarquía en el grado de reactividad de los distintos subtipos de HLA-B27 con B*2705, que se correlaciona con la estructura de los subtipos. Así, B*2703, que se diferencia de B*2705 únicamente en el residuo 59, fue el subtipo con el que más frecuentemente reaccionan los clones anti-B*2705. B*2701 y B*2702, que presentan cambios en los segmentos 74-81 y 77-81 respectivamente, presentan un grado similar de reactividad cruzada con B*2705 aunque menor que B*2703. Finalmente, B*2704 que posee cambios en los residuos 77 y 152, y B*2706, que presenta dos cambios adicionales en 114 y 116 fueron los subtipos antigénicamente más distantes de B*2705.

* Existen diferencias significativas entre los distintos respondedores, por ejemplo, no se observaron clones que reconocieran a los subtipos B*2704 y/o B*2706 en DL mientras que los otros dos individuos si eran capaces de generar clones de estas características. Se obtuvieron clones que reconocían a B*2701, B*2702 y B*2703 en los tres donantes estudiados aunque con marcadas diferencias en cuanto a su frecuencia en lo que respecta a la reactividad con B*2701 y B*2703 marcadamente inferior en el individuo DL que en los otros dos.

Tabla 46. Reactividad de clones anti-B*2705 con los subtipos HLA-B27 : Diferencias individuales en la reactividad con subtipos^a

<u>Subtipo</u>	<u>Clones reactivos de Respondedores Individuales</u>									
	<u>DL</u>		<u>GM</u>		<u>SR</u>		<u>TOTAL</u>			
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
B*2705	15	100	18	100	33	100	66	100	66	100
B*2701	2	13	8	47^b	11	33	21	32	21	32
B*2702	4	27	5	28	11	33	20	30	20	30
B*2703	2	13	9	50	20	61	31	47	31	47
B*2704	0	0	6	33	4	12	10	15	10	15
B*2706	0	0	5	28	2	6	7	11	7	11

^a Se estudiaron un total de 66 clones derivados de tres respondedores. Los datos representan el numero (N) y el porcentaje (%) de clones que reconocen cada subtipo.

^b Este porcentaje fue calculado teniendo en cuenta que el clon 122GRK no fue probado con el subtipo B*2701.

4.7.- REACTIVIDAD CON OTROS ANTIGENOS HLA.

Otro punto importante que se desprende del estudio de los patrones de reacción clonales se refiere a reactividades adicionales con otros antígenos HLA. Estas se resumen en la Tabla 47. La mayoría están ligadas a antígenos HLA-B pertenecientes al grupo de reacción serológico de HLA-B27. Así, se observaron clones reactivos con HLA-B61 en los individuos GM (100GRK, 112.8GRK y 122GRK) y SR (13SLG y 27S69) y con HLA-B60 únicamente en el respondedor SR (un total de 10 de los 30 clones probados frente a dicho antígeno). Es remarcable la nula reactividad con HLA-B48, aun teniendo en cuenta su similitud estructural con B60.

Con una frecuencia aproximadamente de la mitad se observaron clones, en todos los individuos, que reaccionan con dianas Bw22⁺ (B54, B55 y B56). Así el clon 2DLE del individuo DL y los clones 7S15 y 16S15 de SR reconocen HLA-B55. Los clones 100GRK y 122GRK de GM y el clon 16S15 lisan a la diana VOO (B56⁺) habiéndose confirmando dicho reconocimiento en ensayos de inhibición con monoclonales con los dos últimos clones. El clon 36SRC reconoce a la diana TTL (B54⁺). No se obtuvieron clones que presentaran reactividad cruzada frente a otros antígenos de clase I, -A ó -B. Sin embargo dos clones fueron capaces de reconocer específicamente dianas HLA-DR2Dw2⁺, que es estructural y funcionalmente más diferente a HLA-B27 que cualquier antígeno de clase I.

Tabla 47. Reactividad de clones anti-B*2705 con antígenos HLA-B27^a

<u>ANTIGENO</u>	<u>RESPONDEDOR</u>									
	<u>DL</u>		<u>GM</u>		<u>SR</u>		<u>TOTAL</u>			
	<u>N</u>	<u>%</u>	<u>N</u>	<u>%</u>	<u>N</u>	<u>%</u>	<u>N</u>	<u>%</u>		
B61	0/15	0	3/16	19	2/29	7	5/60	8		
B60	0/14	0	0/16	0	10/30	33	10/60	17		
B54	0/14	0	0/16	0	1 ^b /28	4	1 ^b /58	2		
B55	1/13	8	0/16	0	2 ^b /28	7	3 ^b /57	5		
B56	0/14	0	2 ^b /16	13	1/27	4	3 ^b /57	5		
DR2 ^c	0		2		0		2			

^a Los datos representan el número de clones reactivos con el antígeno particular/número total de clones testados con cada antígeno. Además se indica el correspondiente porcentaje.

^b La confirmación formal de la reactividad con los antígenos HLA-B22 por inhibición con monoclonales no pudo llevarse a cabo en todos los casos.

^c La reactividad con los antígenos HLA-DR2 no se analizó de forma sistemática para todos los clones. Por tanto, no se muestra el porcentaje estimado.

4.8.- DIVERSIDAD Y FRECUENCIA DE LOS PATRONES DE REACCIÓN DE LOS CLONES ALOREACTIVOS ANTI-B*2705.

La distribución de los patrones de reacción clonales, para cada uno de los individuos estudiados, se resume en la Tabla 48. En ella también se muestra el resumen de un análisis similar, que fue previamente realizado en el laboratorio (208) donde se obtuvieron 18 clones anti-B*2705 de un único respondedor (PA).

De los 32 patrones de reacción posibles entre los distintos subtipos de HLA-B27 únicamente 18 fueron detectados en el total de los clones analizados. Este dato refleja la baja frecuencia de los patrones de reacción clonal que incluyen a los subtipos B*2704 y/o B*2706.

De todos los patrones de reacción, los grupos I (clones que sólo reconocen al subtipo estimulador) y IV (clones que además reaccionan con el subtipo B*2703) contienen el 51% del total de clones y están presentes en los 4 individuos estudiados. Además estos patrones están relacionados entre sí, para cada respondedor, de forma inversa ya que un porcentaje mayor de uno de ellos implica un menor porcentaje del otro grupo. Esta relación no se encuentra con otros grupos de reacción. Los otros patrones similares al grupo IV, es decir, aquellos que presentan reactividad con un subtipo adicional al estimulador se encuentran en un porcentaje mucho menor (6-7% para los grupos II y III y total ausencia con los correspondientes grupos que implicaran B*2704 y B*2706).

Los patrones II, III, VIII y XI son los más abundantes después de los grupos I y IV y se encuentran en frecuencias que oscilan entre el 5% y el 10% estando presentes en: los cuatro individuos (grupo II), en tres de ellos (grupos III y XI) o en sólo dos de ellos (grupo VIII). El resto de los grupos se encuentra únicamente en dos de los respondedores estudiados (GM y SR) por lo que se deduce que los individuos DL y el previamente estudiado PA no presentan patrones propios de reacción clonales o los presentarían en muy bajas frecuencias, es decir, todas las especificidades encontradas en estos casos están también presentes en los individuos GM y SR.

La frecuencia de epítomos compartidos entre los distintos subtipos puede ser establecida de la Tabla 48, donde se expresan las frecuencias globales de los patrones de reacción individuales. Así, el 27% de los epítomos aloespecíficos son propios del subtipo estimulador (patrón de reacción I).

Epítomos compartidos entre B*2705 y algún otro subtipo (excepto B*2704 y B*2706) dan cuenta del 39% de los clonotipos detectados, oscilando entre el 7 y el 24% (patrones de reacción II, III y IV), siendo los epítomos compartidos entre B*2703 y B*2705 (patrón IV) los mas frecuentes. Dentro de los epítomos compartidos entre tres subtipos (patrones de reacción V-X), que suman el 18% de los clonotipos, el patrón predominante es el VIII (reactividad entre B*2705, B*2702 y B*2703). Los epítomos comunes a más de tres subtipos (patrones XI-XVIII) representan el 15% del total de clonotipos siendo el patrón más frecuente en este grupo el XI (6%) que incluye epítomos compartidos entre todos los subtipos estudiados excepto B*2704 y B*2706. Unicamente el 13% de los clonotipos implican patrones de reacción que incluyen a los subtipos B*2704 y/o B*2706 (grupos VII, IX, X, XII, XIII, XIV, XV y XVI).

Tabla 48. Patrones de reacción de los clones ANTI-B*2705 con los subtipos de HLA-B27^a

PATRON DE REACCION		RESPONDEDOR ^c				TOTAL
		PA	DL	GM	SR	
NUMERO	SUBTIPOS ^b					
I	5	6 (33%)	9 (60%)	4 (22%)	4 (12%)	23 (27%)
II	5, 1	2 (11%)	1 (7%)	2 (11%)	2 (6%)	7 (8%)
III	5, 2	1 (6%)	3 (20%)		2 (6%)	6 (7%)
IV	5, 3	2 (11%)	1 (7%)	5 (28%)	12 (36%)	20 (24%)
V	5, 1, 2				3 (9%)	3 (4%)
VI	5, 1, 3				1 (3%)	1 (1%)
VII	5, 1, 4			1 (6%)		1 (1%)
VIII	5, 2, 3	6 (33%)			2 (6%)	8 (10%)
IX	5, 2, 4				1 (3%)	1 (1%)
X	5, 4, 6				1 (3%)	1 (1%)
XI	5, 1, 2, 3	1 (6%)	1 (7%)		3 (9%)	5 (6%)
XII	5, 1, 3, 4			1 (6%)		1 (1%)
XIII	5, 2, 4, 6			1 (6%)		1 (1%)
XIV	5, 1, 2, 3, 4				1 (3%)	1 (1%)
XV	5, 1, 2, 3, 6			1 (6%)		1 (1%)
XVI	5, 1, 2, 4, 6			1 (6%)		1 (1%)
XVII	5, 1, 3, 4, 6				1 (3%)	1 (1%)
XVIII	5, 1, 2, 3, 4, 6			2 (11%)		2 (2%)
PATRONES DE REACCION		6	5	9	12	18
TOTAL DE CLONES		18	15	18	33	84
RAZON		0,33	0,33	0,50	0,36	0,21

^a Aquellos clones que presentan el mismo patrón de reacción con los subtipos de HLA-B27 pero que difieren en sus reactividades con antígenos HLA-B27⁺ se agrupan juntos.

^b Los numeros indican los subtipos de HLA-B27 que son reconocidos por los clones en cada grupo de reacción clonal.

^c El número indica la cantidad de clones que se encuadran en cada grupo. En paréntesis se expresa el porcentaje, relativo al número total clones analizados de cada donante. Los datos del respondedor PA provienen de la referencia (194) y se muestran únicamente a efectos de comparación.

4.9.- RECONOCIMIENTO ALOGENICO DE LA LINEA CELULAR NW, CON ANOMALIAS EN LA PRESENTACION DE ANTIGENO POR HLA-B27.

La línea NW (B*2702⁺) es incapaz de presentar al menos tres péptidos virales restringidos en el contexto de B*2702 (209). El defecto está ligado genéticamente y se ha sugerido que puede estar relacionado con la unión de péptidos, en el retículo endoplásmico, distintos de los presentados por otras dianas B*2702⁺. Para examinar la posibilidad de que esta línea celular presentara un repertorio de péptidos endógeno drásticamente diferente al de otras células B*2702⁺ dicha línea se incluyó sistemáticamente en los ensayos de panel. Así, fueron ensayados:

* 23 de los 46 clones (50%), que no lisaban a otras células B*2702⁺, perteneciente a 6 grupos de reacción clonales.

* Los siguientes clones capaces de reconocer a otras dianas B*2702⁺:

- Los cinco clones del grupo III.
- Los clones 16S15 y 41S15 del grupo V.
- Los dos clones integrantes del grupo VIII (11.8SLG y 27S69).
- 13SRB (grupo IX).
- Todos los clones del grupo XI excepto el 72DRF.
- 37SLG (grupo XIV).
- 20.8GRK (grupo XV).
- 37GRK y 123.8GRK (grupo XVIII).

Así, del total de 20 clones que lisaban dianas B*2702⁺ se ensayaron frente a NW 17 (85%), procedentes de tres individuos y de todos los grupos de reacción excepto el XVI.

La Tabla 49 resume los valores de lisis obtenidos por los distintos clones ensayados frente a NW, procedentes de los respectivos ensayos de panel de los correspondientes grupos de reacción clonales. La mayoría de los clones probados (12 de 17: 71%) presentan lisis significativa tanto frente a NW como a las otras dos LCL B*2702⁺ usadas como controles. La mayoría de ellos lisan de forma similar a las tres células aunque algunos clones (202DRD, 27S69, 21S69 y 41S15) reconocen con menor eficiencia a NW. Este hecho no implica una peculiaridad de esta línea ya que también varios clones son capaces de lisar a las células R34 y R56 con distinta eficiencia. Por lo tanto, las células NW expresan una gran parte de los epítomos aloespecíficos de HLA-B*2702 expresados en el resto de las

dianas. Tres clones (13SRB, 172DRF y 11.8SLG) reconocen marginalmente tanto a R34 como a R56 presentando a su vez valores de lisis nulos frente a NW. Esto no implica necesariamente un reconocimiento diferencial de NW ya que como se observa con el clon 13SRB (Fig.8) las células NW compiten con analoga eficiencia a R34.

Unicamente dos clones: 16S15 y 20.8GRK reconocen a las LCL R34 y R56 pero no a células NW. Posteriores ensayos de inhibición fría confirmaron que el clon 20.8GRK sólo reconoce muy marginalmente a las dianas NW (Figura 11), confirmando los datos de citotoxicidad. Estos datos indican claramente que los epítomos reconocidos por el clon 20.8GRK y probablemente por 16S15 en las células B*2702 están casi totalmente ausentes en.

Tabla 49. Reactividad de clones anti-B27 con líneas HLA-B*2702⁺

<u>CTL</u>	<u>LCL*</u>		
	<u>R34</u>	<u>R56</u>	<u>NW</u>
37GRK	82 (3)	79 (3)	73 (2)
7.8SRY	51 (1)	55 (2)	53 (2)
139DRD	33 (3)	37 (2)	31 (1)
37SLG	29 (3)	21 (2)	18 (1)
29S15	25 (2)	21 (1)	20 (3)
2SRZ	40 (2)	16 (2)	28 (2)
47S69	38 (2)	66 (2)	30 (2)
202DRD	43 (3)	82 (2)	25 (2)
27S69	76 (2)	71 (1)	49 (2)
123.8GRK	42 (4)	59 (5)	44 (1)
21S69	66 (2)	66 (1)	31 (2)
41S15	49 (1)	44 (1)	24 (1)
172DRF	15 (5)	22 (6)	4 (1)
11.8SLG	16 (6)	14 (2)	0 (1)
13SRB	15 (4)	14 (2)	2 (2)
16S15	21 (4)	35 (2)	4 (5)
20.8GRK	23 (2)	38 (2)	5 (2)

* Los datos estan expresados como % de lisis especifica a E:D 4:1 y son medias del número de experimentos indicado entre parentesis.

4.10.- ANALISIS ESTRUCTURAL DE LAS CADENAS α Y β DE LOS RECEPTORES DE CLONES CITOLITICOS ALOREACTIVOS ANTI-HLA-B27.

Dentro del contexto general del estudio de la respuesta citolítica aloreactiva anti-HLA-B27 se llevó a cabo la caracterización estructural de las cadenas α y β del TCR para un grupo de clones anti-B*2705 y un clon anti-B*2704 (64.8P, ref. 210). La estrategia usada se basó en la amplificación específica, mediante el uso de oligonucleótidos específicos para cada familia $V\alpha$ ó $V\beta$ descrita, y posterior secuenciación directa de los diferentes cDNA amplificados de ambas cadenas. Ello permitió conocer la secuencia nucleotídica, y por inferencia la proteica, de una región variable (que dependía de la zona de hibridación de cada oligonucleótido en la secuencia del segmento V correspondiente) para cada clon de aproximadamente unos 300 nucleótidos. Dicha región incluía parte del segmento $V\beta$ (ó $V\alpha$), las regiones N+D β y J β (ó N+J α) completas y el extremo más 5' de las región constante de la cadena B (ó α).

Como se observa en las Figuras 21 a 23 existe un uso preferente de ciertos segmentos $V\beta$ que en algunos casos también se asocian a determinadas regiones J β . Además aparecen algunos motivos estructurales recurrentes dentro de la región N+D β como son series de residuos no polares y/o la presencia de un residuo de Ala en el triplete de unión D β -J β . En cambio en el estudio similar de la cadena α se observa una clara ausencia de restricciones estructurales similares a las observadas en las cadenas β tanto en el uso de segmentos $V\alpha$ como de patrones estructurales recurrentes en las regiones N+J α . Ello conllevaría una contribución asimétrica de las cadenas α y β del TCR al reconocimiento alogénico en los distintos clones analizados, aunque debe tenerse en cuenta que éstos representan sólo una fracción de los clones obtenidos, en la que predominan clones del grupo I.

A

	V β	N+D β	J β
67DRF	A S S GCC AGC AGT	P T T S V R CCC ACG ACA AGC GTT CCG	Q P CAG CCC
212DRD	A S S GCC AGC AGT	S S Q G R L S P G TCT TCC CAG GGG CGA CTC TCC CCG GGG TT	F N Y G AAC TAT GGC
40	A S S GCC AGC AGT	F L A A G V TTT TTA GCG GCA GGG GTA G	D T CA GAT ACC
G36	A S S GCC AGC AGT	E S R Q I GAA TCC GGC CAG ATA G	E CT GAA
17A2	A S S GCC AGC AGT	P G H A Y CCA GGG ATG GCG TAC G	E CT GAA
2DLE	A S GCC AGC	R D R T AGG GAC GGG ACA GCT	H T E AAC ACT GAA
22DAG	A S S GCC AGT AGT	I G A I ATC GGG GCG ATA GG	T G E ACC GGG GAG
64DRF	S V E AGC GTT GAA	G L A G GGG CTA GCG GGA GC	N E AAT GAG
102DRF	S V E AGC GTT GAA	E Q G F V G G GAG CAA GGT TTT GTG GGG GGA GC	E T A GAG ACC
B			
5A2	A T S GCC ACC AGT	D L T GAT TTG ACG	D T GAT ACC
GM7	A S GCC AGC	K R T Q G AAA AGG ACA CAG GGG AG	S S Y E C TCC TAC GAG
C			
28	S AGC	V A G P L GTA GCG GGG CCT CTA AT	N E AAT GAG
172DRF	S AGC	Y S S T G V TAT TCC TCG ACA GGC GTC C	H E AC GAG
139DRD	A GCC	I R S Q ACC AGG TCC CAA	H T E AAC ACT GAA
D			
168DRF	A S S GCC AGC AGT	Y R T G T S TAC AGG ACT GGA ACC TCT GCC	E T GAG ACC
64.8P	A S S Q GCC AGC AGC CAA	H R G G CAC AGG GGG GGG AG	S S G A N V C TCT GGG GCC AAC GTC

B

ALANINE AT DJ JUNCTION				NON-POLAR JUNCTIONAL REGION			
anti-B27 CTL				anti-B27 CTL			
Control (N=63)	Total (N=15)	Group A (N=9)	Others (N=6)	Control (N=63)	Total (N=15)	Group A (N=9)	Others (N=6)
13%	47%	67%	17%	9.5%	33%	44%	17%

Figura 21. A) Secuencia de nucleotidos y su correspondiente traducción a aminoácidos de las regiones de unión de las cadenas β del TCR y motivos estructurales recurrentes en las regiones de unión de los mismos. B) Frecuencia de los motivos de unión recurrentes en los CTL anti-HLA-B27 estudiados comparados con un grupo aleatorio de 63 secuencias de diferentes clones.

	V α	N	J α
102DR1	D S A V Y F C A L GAC TCA GCG GTG TAC TTC TGT GCT CTG		R M D S S Y K L I F G AGG ATG GAT AGC AGC TAT AAA TTG ATC TTC GGG
212DRD	D S A S Y L C A GAC TCT GCC TCT TAC CTC TGT GCT		V T G A G S Y Q E T F G GTG ACC GGG GCT GGG AGT TAC CAA CTC ACT TTC GGG
22DAG	D T G L Y L C A GAT ACA GCG CTC TAC CTC TGT GCA		E M S G Y S T L I F G GAA AAT TCA GGA TAC AGC ACC CTC ACC TTT GGG
20LE	D S A I Y F C A E GAC TEA GCT ATC TAC TTC TGT GCA GAG		I L M T G F Q K L V F G ATT CTG AAC ACA GGC TTT CAG AAA CTT GTA TTT GGA
17A2	D S A M Y F C A GAC TCA GCA ATG TAT TTC TGT GCA		M R E G P G N Q F Y F G ATG AGA GAG GGA CCC GGT AAC CAG TTC TAT TTT GGG
40	D T A E Y F C A V GAC ACG GCT GAG TAC TTC TGT GCT CTG	S A V A M A G G T S Y G K L T F G	AGT GCC GTT GCC AAT GCT GGT GGT ACT AGC TAT GGA AAG CTG ACA TTT GGA
5A2	D T A M Y F C A GAC ACT GCG ATG TAT TTC TGT GCT		G P L N G Y A L N F G GGT CCC CTT AAC GGG TAT GCA CTC AAC TTC GGC
GN7	D S A V Y F C A GAC TCA GCG GTG TAC TTC TGT GCT		P L S S A S K I I F G CCC CTC AGC AGT GCT TCC AAG ATA ATC TTT GGA
139DRD	D S A T Y L C A V GAC TCA GCG ACT TAT CTC TGT GCT CTG		H V Y S S A S K I I F G CAT GTC TAC AGC AGT GCT TCC AAG ATA ATC TTT GGA
139DRD	D S A S Y L C A GAC TCT GCC TCT TAC CTC TGT GCT		R G D R D D K I I F G AGA GGG GAC AGA GAT GAC AAG ATC ATC TTT GGA
28	D T A E Y F C A V GAC ACG GCT GAG TAC TTC TGT GCT CTG		I L L G P H D M R F G ATC CTT TTG GGC CCG CAT GAC ATG CGC TTT GGA
64.8P	D S A V Y F C A L GAC TCA GCA GTA TAC TTC TGT GCT CTG	S G L T M S G Y A L R F G	AGC GGC CTT ACA AAT TCC GGG TAT GCA CTC AAC TTC GGC

B

V α	J α
22	AB17
7	HAVT01
10	AD17
15	AE24A
6	HAVP01
1	HAVT06
14	IGRJa12
22	PY14
23t	PY14
7	139DRD/7
1	IGRJa10
12	IGRJa12

Figura 22. Secuencia de nucleótidos y su correspondiente traducción a aminoácidos de las regiones de unión de las cadenas α productivas del TCR. B) Resumen de las cadenas α usadas por cada clon citotóxico anti-HLA-B27 estudiado.

Reactivity Pattern	CTL CLONE	V β HOMOLOGY SUBGROUP					J β	V α in correct transcript HOMOLOGY SUBGROUP								J α	V α in aberrant transcript HOMOLOGY SUBGROUP								J α
		1	2	3	4	5		1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8	
A B2705	102DRF	4					2.5	22								AB17	11								HAVP49
	64DRF	4					2.1	N.T.								N.T.	N.T.								N.T.
	212DRD	14					1.2	7								HAVT01									
	67DRF	14					1.5										4								67DRF/4
	22DAG	17					2.2	10								AD17									
	2DLE	13					1.1	15								AE24A	2								IGRJa10
	17A2	13					1.1	6								HAVP01									
	G 36	13					1.1	N.T.								N.T.	N.T.								N.T.
40	14					2.3	1								HAVT06										
B B2705 B2703	5A2	15					2.3	14								IGRJa12	9								HAVP44
	GM7	3					2.7	22								PY14									
C B2705 B2702	139DRD	5					1.1	7 23t								139DRD/7 PY14									
	172DRF	4					2.7	N.T.								N.T.	N.T.								N.T.
	28	4					2.1	1								IGRJa10									
D B2705 B2701	168DRF	13					2.5	N.T.								N.T.	N.T.								N.T.
ALL SUPTYPES BUT B2703	64.8P	7					2.6	12								IGRJa12	23t								64.8P23

Figura 23. Resumen de los TCR usados y patrón de reacción de cada clon.

5.- DISCUSSION

5.1.- LISIS DIFERENCIAL ENTRE LOS SUBTIPOS B*2704 Y B*2706.

Estudios previos con células T alorreactivas y restringidas por HLA-B27 demuestran los subtipos B*2704 y B*2706 son los más diferentes funcionalmente, al subtipo principal B*2705 (208,211-214). La baja reactividad con ambos subtipos puede relacionarse con el drástico efecto que provoca sobre el alorreconocimiento el cambio en la posición 152 (Glu>Val) presente en B*2704 y B*2706 (192).

En este estudio se han obtenido 11 clones anti-B*2705 que son capaces de reconocer dianas B*2704 y/o B*2706: siete clones del individuo GM y cuatro clones de SR. Estos resultados contribuyen en tres aspectos principales al conocimiento de las propiedades antigénicas de HLA-B27. En primer lugar se demuestra que para algunos respondedores las diferencias entre B*2705 y B*2704/B*2706 no son barreras críticas para el alorreconocimiento. Segundo, algunos patrones de reacción clonales indican que existen claras diferencias funcionales entre B*2704 y B*2706. En tercer lugar la especificidad fina con el panel de LCL y el comportamiento frente a mutantes, sugieren diferencias en los péptidos presentados por estos subtipos y una implicación de éstos en el alorreconocimiento por células T.

La aparentemente alta frecuencia obtenida en las respuestas de los individuos SR (13% del total) y sobre todo GM (39%), indican que estos clones no son clonotipos raros obtenidos por selección aleatoria, sino el resultado de las respuestas particulares de estos donantes. Por tanto, las diferencias individuales pueden alterar profundamente el repertorio de las especificidades clonales en respuestas citolíticas anti-HLA-B27.

La existencia de estos clones implica también que B*2705, B*2704 y B*2706 presentarían epítomos comunes a células T. Esto sugiere, puesto que los epítomos reconocidos por células T alorreactivas implican péptidos (179,180), la existencia de péptidos con suficiente similitud para poder ser presentados por estos tres subtipos a células T citolíticas. Este resultado posee implicaciones para los modelos de asociación de HLA-B27 a EA, ya que se ha propuesto que esta enfermedad podría estar originada por una respuesta mediada por células T hacia un péptido(s) presentado específicamente en el contexto de HLA-B27 en las articulaciones (215). Esta hipótesis implica que el

peptido(s) artritogénico(s) debería poder ser presentado por varios subtipos ya que al menos B*2705 y B*2704 están igualmente ligados a la EA (186,215). la presentación de un péptido o péptidos similares por multiples subtipos es sugerido por los patrones de reacción clonales presentados en este estudio y ha sido parcialmente demostrado recientemente (216) con la observación de que un mismo péptido del patógeno humano EBV puede ser presentado por los subtipos B*2705, B*2702 y B*2704.

Algunos indicios previos de distinción funcional entre B*2704 y B*2706 están basados en la reactividad de líneas policlonales de un individuo B*2705⁺ frente a B*2704, donde se observó una disminución de la eficiencia lítica de 2 a 4 veces frente a dianas B*2706⁺ con respecto al subtipo estimulador (212) y en otro estudio sobre frecuencias de precursores anti-B*2702 (217) donde aparecían diferencias en las reactividades con B*2704 y B*2706. En ambos casos la naturaleza de los epítomos implicados no fue definida. También en un trabajo previo en el laboratorio (210) se obtuvo una muy débil respuesta citolítica anti-HLA-B*2704 donde sólo pudo generarse un único clon que reaccionaba con todos los subtipos de HLA-B27 excepto B*2703. Los patrones de reacción de los clones 20.8GRK, 58GRK, 112.8GRK y 37SLG demuestran que los subtipos B*2704 y B*2706 pueden ser distinguidos claramente por células T citolíticas y son, por tanto, funcionalmente distintos. Por ello, y como es general en otros antígenos de clase I, la diversificación entre los subtipos B*2704 y B*2706 implica cambios inmunologicamente relevantes.

La interpretación de los patrones de reacción clonales a nivel molecular sugiere la implicación de distintos péptidos en los correspondientes epítomos aloespecíficos:

* Los clones 58GRK, 112.8GRK y 37SLG reconocen al subtipo B*2704 pero no a B*2706. Ello implica que las dos diferencias existentes entre ambos subtipos (posiciones 114 y 116), que se encuentran ubicadas en la lámina β del sitio de unión de péptido y muy probablemente inaccesibles al TCR, son capaces de destruir el epítomo reconocido en B*2704.

* En consonancia con lo anterior el mutante Y116, que mimetiza un cambio del subtipo B*2706, no es reconocido por los clones 122GRK, 37GRK y 123.8GRK.

* El clon 13SRB (grupo IX) diferencia claramente en el ensayo de panel a la línea celular KNE (B*2704⁺) de otras cuatro LCL que presentaban el mismo subtipo. Los ensayos de inhibición fría demostraron que las diferencias entre dianas B*2704⁺ eran únicamente cuantitativas, sugiriendo el

reconocimiento de un epítipo modulado por un péptido polimórfico o que se expresa con mayor densidad en KNE que en el resto de las células B*2704⁺. Además este clon diferencia KNE (B*2704⁺) de dos LCL B*2706⁺ presentando, por tanto, un comportamiento similar a los clones citados más arriba.

* Asimismo, el reconocimiento de B*2706 pero no de B*2704 por parte del clon 20.8GRK y, en menor medida, la diferencia de lisis sobre dianas B*2704 y B*2706 con el clon 122GRK (mayor lisis contra B*2706) implicaría que los cambios ubicados en la lámina β son capaces de revertir la destrucción del epítipo producida por cambios en la hélice α .

* El clon 58GRK reconoce a los subtipos B*2704 y B*2705 pero no a ninguno de los dos mutantes intermedios entre ambas estructuras (S77 y E152). Ello es difícil de explicar mediante una interacción directa entre el TCR y las regiones mencionadas de HLA-B27 especialmente porque ambas posiciones están orientadas hacia el sitio de unión de péptido (14). Por otra parte, los mutantes Y116, D114 y el doble mutante D114Y116 (193) que mimetizan cambios inaccesibles al TCR son eficientemente lisados, mientras que B*2706, que presenta frente a B*2705 los cambios S77, D114, Y116 y E152, no es reconocido. La explicación más plausible de este sorprendente comportamiento donde aparecen múltiples efectos compensatorios es que este clon reconoce un epítipo modulado por la presencia de un péptido o de péptidos suficientemente similares que permitieran su unión a los distintos subtipos o mutantes y un reconocimiento similar por parte de células T.

La observación de reactividad cruzada frecuente con un subtipo pero no con los mutantes de estructura intermedia indica que muchos epítipos requieren de múltiples cambios para conservarse y que, paradójicamente se pierden en mutantes más similares a B*2705. Esto sugiere una selección evolutiva de los subtipos de HLA-B27 para la conservación de algunas de sus propiedades presentadoras de antígeno.

Las consideraciones precedentes están en consonancia con la idea generalmente aceptada de que la mayoría de las células T alorreactivas reconocen péptidos unidos al antígeno de histocompatibilidad alogénico. Esto múltiples evidencias indirectas, junto con la confirmación de que una gran mayoría (60-70%) de clones alorreactivos anti-H-2K^b son péptido-dependientes, habiendo sido identificada la fracción péptidica separada por HPLC (179,180). Este porcentaje sería probablemente

un valor mínimo, debido a la naturaleza de los ensayos estudiados.

5.2.- RECONOCIMIENTO ALOGENICO DE LA LINEA CELULAR NW.

Como ya se ha mencionado anteriormente es probable que la mayoría de los clones aloreactivos se influencien, de distinta manera, por péptidos unidos al aloantígeno (179,180). En 12 de 15 clones presentados en la Tabla 49, el aloreconocimiento mediado por HLA-B27 fue eliminado por cambios no accesibles a interacción directa con el TCR como son el residuo 45 y varios cambios en la lámina B del aloantígeno (218, 219 y Villadangos et al. manuscrito en preparación) sugiriendo que estos clones pueden reconocer péptidos unidos a HLA-B27. El porcentaje (12/15: 80%) es muy similar al obtenido en los ensayos de detección de péptidos nominales reconocidos por clones alorreactivos anti-H-2K^b (179,180). Por tanto, en la medida en que el reconocimiento de B*2702 en distintas dianas por un determinado clon refleja la presentación del mismo o de un péptido muy similar, el que la mayoría de los clones no diferencian NW de otras células B*2702⁺ implica que se está presentando en todas ellas un conjunto de péptidos endógenos lo suficientemente similares para poder ser reconocidos por dichos clones. La ausencia de lisis de NW por los clones 16S15 y 20.8GRK sugiere que los correspondientes epítomos estarían ausentes o muy disminuídos o parcialmente alterados en NW.

Por otra parte, los perfiles de HPLC de los péptidos unidos a B*2702 en las tres LCL usadas son muy similares (220) sugiriendo que las células NW no presentan una alteración general en el repertorio de péptidos presentados por B*2702, aunque puedan existir algunos péptidos diferentes.

5.3.- SIMILITUD DESETOPICA ASOCIADA A PRESENTACION PEPTIDICA ENTRE HLA-B27 Y HLA-DR2

Los clones del grupo XVIII reconocen los 6 subtipos de HLA-B27 junto con el heterodímero $\alpha\beta$ de HLA-DR2Dw2 (B5*0101). Estos resultados demostraban que HLA-B27 y HLA-DR2 comparten epítomos de células T. El hecho de que previamente se hayan descrito tres clones citolíticos anti-HLA-B27, originarios de un individuo no relacionado con GM, que reconocen dianas DR2⁺ de varios

subtipos (221) implica que estos hallazgos no son fortuitos. Estos clones presentaban un patrón de reacción clonal completamente distinto a los descritos en esta Tesis, ya que lisaban células B*2705⁺, pero no del resto de los subtipos de HLA-B27, y tres de los cuatro subtipos de HLA-DR2, excepto Dw12). En ambos casos la reactividad anti-clase II, pero no la anti-HLA-B27, fué independiente de CD8 lo que implicaba una mayor contribución del TCR a la avidéz total del reconocimiento de células HLA-DR2⁺ frente a las -B27⁺.

Se correlacionó la estructura de los subtipos de HLA-B27 y -DR2 con la reactividad de 37GRK intentando encontrar motivos estructurales comunes a los antígenos reconocidos por este clon. En primer lugar se analizaron las diferencias entre el producto génico DRB5 de DR2Dw2 con las cadenas β de DR2 no reconocidas (Tabla 50). De la comparación de secuencias puede deducirse que las posiciones D30, D37 y L38 son las únicas específicas de la cadena DRB5*0101. Estos residuos son equivalentes a los residuos 116, 123 y 124 respectivamente de la molécula de clase I y se localizan todos ellos en la lámina β que actúa de base del sitio de unión de péptido. Los residuos 123 y 124 están conservados en todos los antígenos de clase I secuenciados (Tyr e Ile respectivamente) y son diferentes de D37 y L38 del producto génico DRB5*0101. En cambio, el residuo 116 es altamente polimórfico en los antígenos de clase I y únicamente HLA-B27 y -B44 poseen Asp en esta posición. El residuo D116 se encuentra conservado en todos los subtipos de HLA-B27 excepto en B*2706 donde existe el cambio Y116 que como se ha demostrado (Fig.19 y 20) es crítico en el reconocimiento alógeno por parte de este clon. Análogamente la posición 30 es también muy polimórfica en las cadenas β de los antígenos DR2, siendo D30 un residuo único del producto DRB5*0101. Por tanto la comparación de secuencias sugiere que el residuo D30 de la cadena β de DRB5*0101 puede ser necesario para el reconocimiento específico de dianas DR2Dw2⁺.

Posteriormente se compararon las secuencias de HLA-B27 y -DR2Dw2 (B5*0101) siguiendo el alineamiento de secuencias de clase I y II publicado previamente (222) y a la similitud de las correspondientes estructuras cristalográficas (14, 17). Existen once residuos en hélices α conservados entre HLA-B27 y -DR2, pero que presentan poca o nula variabilidad dentro de las cadenas β de los antígenos DR y no forman una combinación única a B27 y DR2, por lo que no dan cuenta de la reactividad cruzada entre estos antígenos.

Tabla 50. Residuos polimorficos entre los subtipos HLA-DR2*

HLA	β1															β2									
	6	9	11	13	28	30	31	37	38	47	67	70	71	85	86	96	104	105	108	120	133	135	142	157	191
DRB5*0101	R	Q	D	Y	H	D	I	D	L	Y	F	D	R	V	G	E	A	R	T	N	R	S	V	T	Q
DRB5*0102						G		N	V																
DRB5*0201	C					G		N	V		I	Q	A	A	V							G		I	
DRB5*0202	C					G		N	V		I	Q	A	A	V							G		I	
DRB1*1501	R	W	P	R	D	Y	F	S	V	F	I	Q	A	V	V	Q	S	K	P	S	L	G	M	T	R
DRB1*1502															G										
DRB1*1601										Y	F	D	R		G										
DRB1*1602										Y	L	D	R		G										

* Se han comparado separadamente los productos alélicos DRB5 y DRB1. Los residuos que son invariantes en cada serie alélica no se señalan. Blancos indican identidad con la correspondiente secuencia de referencia (B5*0101 ó B1*1501)

En cambio de los cinco residuos idénticos entre HLA-B27 y -DR2 en láminas β adyacentes, tres de ellos forman parte del sitio de unión de péptido. Estos son Y13, H28 y D30 de la cadena B5*0101 que corresponderían a los residuos 99, 114 y 116 respectivamente de HLA-B27. De los otros dos residuos, el correspondiente a la posición 10 está orientado en la lámina β hacia fuera del sitio de unión de péptido, mientras que Y32 corresponde a Y118 de clase I y, aunque este residuo no es accesible a sondas de solvente (11), puede contribuir en contactos con residuos de la α_1 hélice, sobre todo con el residuo 81, e influenciar por tanto la unión de péptidos. Ninguno de los cuatro residuos orientados hacia el sitio de unión de péptido es único a HLA-B27 o -DR2Dw2 (B5*0101) pero, en base a su polimorfismo, la combinación de los mismos es única a todos los subtipos de HLA-B27 (excepto B*2706) y el mencionado subtipo de DR2. Además un residuo de la hélice α de la cadena β (W61), que es equivalente a W147 de los antígenos de clase I, se incluyó en el motivo común debido tanto a su proximidad espacial con los cuatro mencionados previamente como a su ubicación hacia el sitio combinante. Los residuos E55 y D66 están ubicados hacia el sitio de unión de péptido y aunque pueden contribuir al motivo estructural común entre B27 y DR2 no se incluyen porque son monomórficos en todos los productos DR y además los correspondientes residuos en HLA-B27 (59 y 63) no afectan al reconocimiento del clon 37GRK (Fig.12 y Tabla 40). Un esquema del motivo estructural común entre HLA-B27 y -DR2 se presenta en la Figura 24.

La ubicación de dicho motivo en la zona más interna el sitio de unión de péptido, en un lugar inaccesible a contactos con el TCR, sugiere que el patrón de reactividad dual anti-clase I y -II puede estar relacionado con el reconocimiento de péptidos que requerirían el motivo estructural definido. Algunas de las posiciones definidas como epítipo común entre B27 y DR2 como son 13, 28 y 30 en clase II equivalentes a 99, 114 y 116 en clase I son posiciones claramente definidas en ambos sistemas como ubicadas en algunos de las subcavidades que determinan la especificidad de unión de cadenas laterales peptídicas (14, 17).

La secuencia las cadenas α y β de los TCR de los clones 37GRK y 123.8GRK (193), mostró cierta similitud estructural entre las regiones N-D-J β de dichos clones con los de otras células T específicas de HLA-DR2 (223), hecho que puede correlacionarse con un reconocimiento de motivos

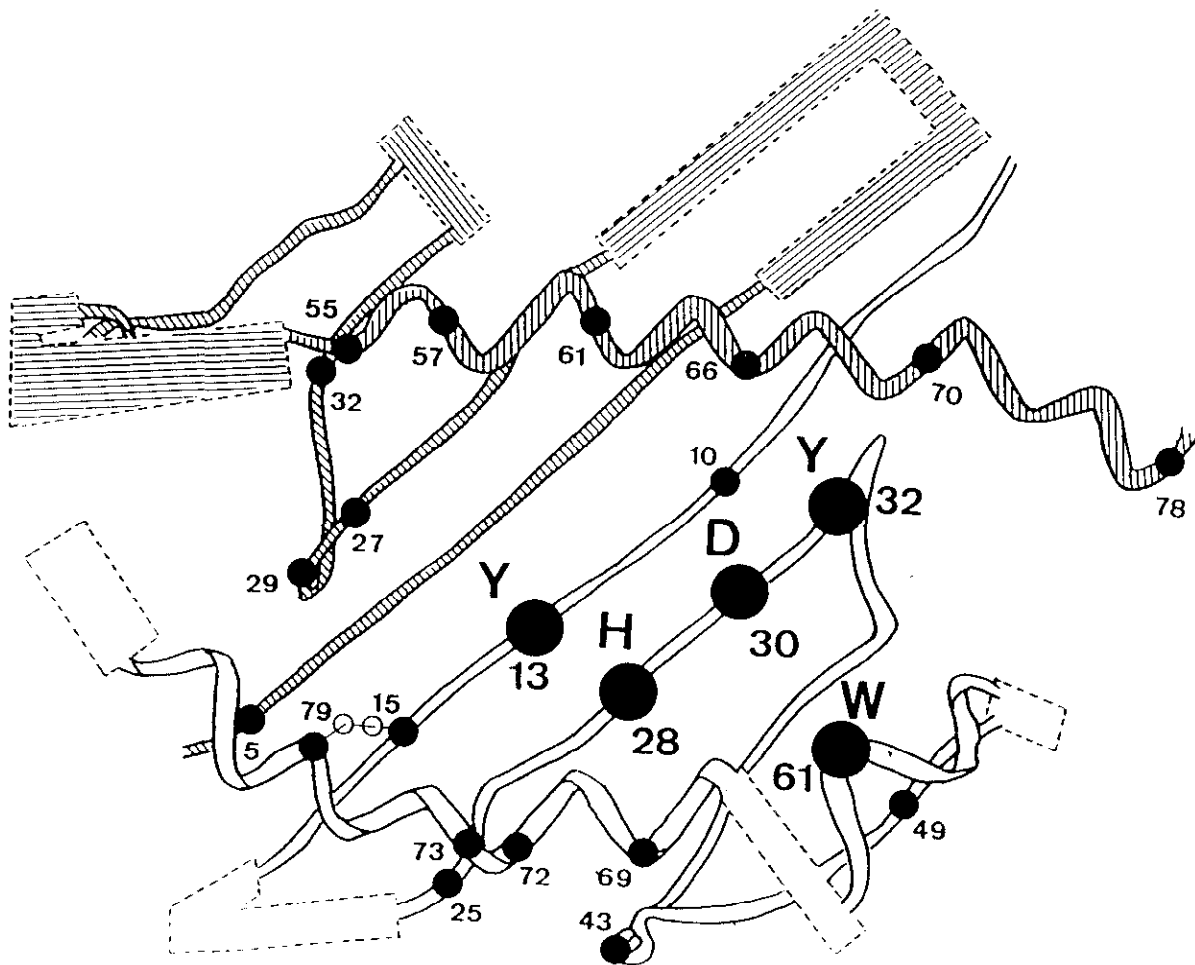


Figura 24. Semejanzas estructurales entre HLA-B27 y HLA-DR2. Se compararon las secuencias de los dominios α_1 y α_2 de HLA-B27 con los equivalentes α_1 y β_1 de DRB5*0101 usando como base las estructuras cristalográficas de HLA-B27 y HLA-DR1. Las posiciones idénticas entre ambas estructuras se muestran como puntos numerados. Los puntos grandes representan aquellos residuos que se han propuesto que contribuyen al motivo estructural compartido entre ambos antígenos.

péptidicos comunes ya que estas regiones están críticamente implicadas en el reconocimiento peptídico (73).

Es posible que el mismo péptido pueda unirse tanto a HLA-B27 como a -DR2 ya que algunos péptidos pueden ser presentados tanto por antígenos de clase I como de clase II en determinados sistemas de restricción viral (224-228). No obstante, la reactividad cruzada B27/DR2 no implica necesariamente el reconocimiento del mismo péptido en los dos antígenos, sino solamente de péptidos con ciertos motivos estructurales comunes que les permitan unirse al desetopo común descrito y ser reconocidos con suficiente avidez total.

El ligamiento de HLA-B27 a la EA, enfermedad que puede presentar ciertos componentes autoinmunes, deja abierta la cuestión de si las propiedades de presentación peptídica similares entre HLA-B27 y HLA-DR2 pueden relacionarse con la susceptibilidad a la enfermedad. Por otra parte, se ha descrito la existencia de un péptido viral que provoca una respuesta citolítica inmodominante mediada por clase I que puede unirse también a ciertos antígenos de clase II induciendo la aparición de células Th restringidas por clase II que contribuye a aumentar la respuesta citolítica anti clase I frente al mismo péptido (227). Las espondiloartropatías asociadas a HLA-B27 pueden ser el producto de una respuesta autoinmune mediada por células T contra péptidos específicos de tejido presentados específicamente por HLA-B27 en las articulaciones (215). Por tanto, es concebible que, en aquellos individuos que presenten el apropiado(s) antígeno(s) de clase II, ciertos péptidos bacterianos que mimetizan un péptido(s) endógeno(s) "artritogénico(s)" puedan ser presentados por las moléculas de clase II a células Th en condiciones de infección y aumentar la respuesta proliferativa. Esta podría estimular a los precursores citolíticos que presentarían reactividad cruzada con HLA-B27 en el tejido articular. Así sería interesante evaluar los datos de asociación a la enfermedad teniendo en cuenta la posibilidad de que la presencia concomitante de HLA-B27 y ciertos subtipos de DR2 pudiera implicar un riesgo relativo mayor en el desarrollo de la enfermedad que la existencia única de HLA-B27. Así, el estudio realizado en pacientes con tuberculosis osteoarticular (229) podría estar en consonancia con lo anteriormente citado.

5.4.- REACTIVIDAD CRUZADA CON ANTIGENOS DE LA FAMILIA DE HLA-B40.

En el presente estudio se han definido 15 clones que reaccionan con antígenos HLA-B40: cinco clones, 3 de ellos de GM y dos de SR, lisan células HLA-B61⁺ y diez clones, todos ellos del donante SR, reconocen HLA-B60. Ninguno de estos clones es capaz de lisar células HLA-B48⁺ a pesar de la relativa semejanza estructural de este antígeno con HLA-B60. Esta reactividad cruzada con B40 fué la más frecuentemente observada con los CTL anti-HLA-B27.

Los antígenos HLA-B60 y B61 presentan estructuras muy relacionadas. HLA-B61 difiere de B*2705 en 16 residuos (Tabla 51). B60 se diferencia de B*2705 en los mismos cambios que B61 en 7 posiciones adicionales. En la posición 97 los tres antígenos son diferentes: Asn en B27, Ser en B61 y Arg en B60. Por tanto, se esperaría una reactividad cruzada de clones anti-B27 mayor con B61 que con B60. Este comportamiento es el observado en el individuo GM (Tabla 48) y en un estudio previo de nuestro laboratorio con un donante distinto (208). Sorprendentemente, de 12 clones del respondedor SR que mostraron reacción cruzada con HLA-B40, 10 reconocían HLA-B60 y dos HLA-B61. Puesto que GM y SR comparten HLA-B7 y difieren en el otro antígeno HLA-B (B8 para GM y B44 para SR) es concebible que la influencia de los antígenos HLA-B en la selección clonal de células T podría relacionarse con las diferencias observadas en la reactividad de estos individuos frente a HLA-B40. La comparación de secuencias de los antígenos HLA-B de los respondedores que mostraban reacción cruzada con HLA-B40 con HLA-B27, -B60, -B61 y -B48 se muestra en la Tabla 52, donde se han diferenciado los residuos implicados en la formación de la subcavidad B del resto de posiciones polimórficas, por la especial implicación de ésta en la interacción con el residuo Arg2 de los péptidos unidos a HLA-B27 que es un motivo mayoritario de éstos. En contraste con B8 (GM) y B35, 39 (PA) los residuos de la subcavidad B son idénticos entre B44 (SR), B60 y B61 excepto en la posición 9. Por tanto es posible que el repertorio de péptidos endógenos unidos a B44 sea parcialmente solapante con correspondientes a B60 y B61. Ello podría inducir una selección positiva, mediada por B44, de células T anti-HLA-B27 reactivas con B40 en el respondedor SR. Además en el resto de las posiciones polimórficas de HLA-B40, el antígeno B44 es el más homólogo a B60, incluyendo la posición 97 donde B44 y B60 presentan Arg mientras que B61 y B48 poseen Ser. Esta

Tabla 52

aa	B27	B61	B60	B48	B35	B39	B8	B7	B44
----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	----	----	-----

Cavidad B

9	H	-	-	Y	Y	Y	Q	Y	Y
24	T	-	-	S	A	S	S	S	-
45	E	K	K	-	M	-	-	-	K
63	E	-	-	-	N	N	N	N	-
67	C	S	S	S	F	-	F	Y	S
70	K	N	N	N	N	N	N	Q	N

Otras Posiciones

11	S	-	A	-	A	-	A	-	A
12	V	-	M	-	M	-	M	-	M
32	L	-	-	Q	-	-	-	-	-
41	A	T	T	-	-	-	-	-	T
97	N	S	R	S	R	R	S	S	R
177	E	-	D	D	-	-	-	D	-
178	T	-	K	K	-	-	-	K	-
180	Q	-	E	E	-	-	-	E	-

Comparación de secuencias de HLA-B27, -B60, -B61 y -B48 (las posiciones indicadas son las polimórficas entre éstos antígenos) con los antígenos HLA-B de los respondedores que presentan clones reactivos con algún antígeno B40⁺: GM (B7, 8), SR (B7, 44) y PA (B35, 39). Este último respondedor fue previamente estudiado (208) y se muestra sólo a efectos comparativos. (-) Indica identidad con HLA-B27. Las posiciones idénticas a HLA-B60 se indican recuadradas. aa: Aminoácido.

última posición es especialmente *significativa* porque es la única de todas las reseñadas anteriormente que se encuentra en la lámina β del sitio de unión antigénica y en una localización bastante central, modulando la conformación de la subcavidad C-E-F, que son también importantes en la selección del repertorio de péptidos unidos a cada antígeno de histocompatibilidad. Este hecho podría explicar la mayor reactividad de SR hacia B60, por el efecto de B44 en la selección positiva del repertorio de células T anti-B27.

La virtual ausencia de reactividad frente a HLA-B48, también estaría relacionada principalmente con las diferencias en la estructura de la cavidad B y de la posición 97 en relación a HLA-B60 y B61 serían suficientes para explicar el pobre reconocimiento.

Es interesante resaltar que existe un aumento de la susceptibilidad a la EA cuando HLA-B60 está presente en individuos HLA-B27⁺ (230). Es posible que ello se relacione con las semejanzas antigénicas entre estas dos especificidades como demuestran los datos anteriores.

5.5.- RELACION ESTRUCTURA-FUNCION EN LA RESPUESTA CITOLITICA ANTI-HLA-B27

El estudio descrito sobre determinación de la estructura de los TCR de clones citolíticos anti-HLA-B27 incluyó 16 clones de los cuales 12 de ellos han sido caracterizados funcionalmente en esta Tesis, pertenecen a los grupos de reacción más específicos (grupos I al IV) y provienen de dos respondedores (9 clones de DL y 3 clones de GM). Los otros 4 clones proceden de otros tres respondedores distintos y fueron caracterizados anteriormente en el laboratorio (210, 213). A la vista de los datos de las Figuras 21 y 22 son resaltables dos hechos:

* Existe una clara asimetría en cuanto al uso de segmentos $V\alpha$ y $V\beta$ en esta respuesta ya que de los 16 clones estudiados 14 presentan segmentos $V\beta$ integrantes de únicamente dos subgrupos de homología (10 de los cuales pertenecen al subgrupo 4), mientras que el uso de segmentos $V\alpha$ no presenta ningún sesgo aparente.

* Dentro de las regiones N+DB y JB aparecen dos motivos estructurales recurrentes que se asocian claramente a los clones citolíticos anti-HLA-B27 pertenecientes al grupo de reacción I

(aquellos que no reconocen a ningún otro subtipo excepto el estimulador): la existencia de regiones N+D β de entre 5 y 7 residuos apolares y la existencia de una Ala en el triplete de unión entre las regiones N+D β y J β . Es decir, ambos motivos pueden correlacionarse con la especificidad fina dentro del conjunto de la respuesta citolítica anti-HLA-B27.

Estos resultados pueden interpretarse en el contexto de los modelos de interacción entre MHC y TCR (231) que postulan que los segmentos variables interaccionan principalmente con residuos en las α -hélices de la molécula de histocompatibilidad mientras que las regiones N+D y J se relacionarían principalmente con los péptidos unidos al antígeno. Una interpretación del uso asimétrico de segmentos V α y V β compatible con este modelo, implica que las posiciones polimórficas en las α -hélices de HLA-B27 interaccionan separadamente con los segmentos V de una de las cadenas del TCR. Además, las diferencias de accesibilidad y variabilidad de los residuos de aminoácidos entre las dos α -hélices de la molécula de MHC pueden implicar diferentes requerimientos en su interacción con el TCR. Por otra parte la existencia de motivos estructurales en las regiones N+D β J β asociados a los clones del grupo I (aquellos que solo reconocen dianas del subtipo estimulador) podría sugerir que las mismas estarían interaccionando con los motivos conservados de los péptidos reconocidos en B*2705 por clones de esta especificidad fina.

5.6.- DISCUSION GENERAL

El presente estudio es la primera comparación de distribución de especificidades clonales en respuestas citolíticas anti-HLA en múltiples individuos. Algunos estudios previos en ratón han analizado la influencia de factores genéticos y ambientales en los repertorios de respuestas anti-H-2K^b (232). Los únicos datos previos en humanos consisten en un estudio de diferencias individuales en las frecuencias de precursores frente a B*2702, y otros antígenos de clase I (217), en el cual se demostró una baja frecuencia de precursores anti-B*2702 reactivos frente a B*2704 y B*2706, aunque no se determinó la naturaleza de los epítomos implicados.

Dos aspectos del presente estudio son relevantes en la asociación de HLA-B27 a la enfermedad. En primer lugar, la caracterización y evaluación de los epítomos aloespecíficos

compartidos entre los distintos subtipos de HLA-B27 conlleva implicaciones en cuanto a la asociación de distintos subtipos a la EA (215). Esta enfermedad está probablemente mediada por un ataque de células T contra HLA-B27. Por ello la asociación de varios subtipos a enfermedad debe implicar que dichos subtipos comparte epítomos reconocidos por células T.

En segundo lugar, la comparación de diferencias individuales en la generación de clones T citolíticos, donde se observan diferencias en la reactividad con los subtipos, lo que indica una distinta capacidad de los repertorios individuales de células T para reconocer determinados epítomos y podría relacionarse con las diferencias en la susceptibilidad a la enfermedad en distintos individuos HLA-B27⁺.

Estudios previos han demostrado que el polimorfismo de HLA-B27 afecta al reconocimiento mediado por células T (182), tanto aloreactivas como restringidas, aunque la cuantificación de dichos efectos no fue tratada. En el presente estudio se ha definido el grado de similitud antigénica entre los distintos subtipos y su correlación con la estructura de los mismos. B*2703, que presenta únicamente una diferencia con B*2705 en la posición 59, comparte con B*2705 más epítomos comunes que el resto de los subtipos, y por inferencia, más péptidos.

Los patrones de reacción clonales que incluyen otros subtipos pero no B*2703 son menos frecuentes pero significativos. Así, los subtipos antigenicamente más distantes, B*2704 y B*2706, comparten con B*2705 el 15 y 11% de los epítomos respectivamente. Estos datos sugieren que los repertorios de péptidos presentados por los distintos subtipos de HLA-B27 son diferentes aunque parcialmente solapantes. Esta conclusión está también apoyada por un análisis comparativo de los repertorios de péptidos endógenos unidos a los subtipos de HLA-B27, llevado a cabo en el laboratorio (233). La existencia de epítomos aloespecíficos comunes entre los distintos subtipos reflejaría presentación de péptidos idénticos o similares entre ellos. Si los hipotéticos péptidos artríticos entraran en esta categoría, se explicaría la asociación de múltiples subtipos a la EA.

En cuanto a la caracterización de diferencias individuales en las respuestas anti-HLA-B27, DL es el que presenta una respuesta más restringida hacia el subtipo estimulador, ya que la mayoría de los clones analizados (53%) reconocían únicamente a dicho subtipo, sólo un clon reaccionaba con más de dos subtipos y ninguno con B*2704 ó B*2706. Este comportamiento es bastante similar al obtenido

en el estudio del donante PA (208) donde tampoco aparecieron clones reactivos con B*2704 y/o B*2706 siendo el porcentaje de células T reactivas con B*2701 y B*2702 muy similares a los obtenidos en DL. La reactividad con B*2703 (superior en PA: 50% que en DL: 13%), y una mayor complejidad de los patrones de reacción en PA diferenciaban las respuestas entre estos dos individuos.

En cambio las respuestas de los donantes SR y sobre todo GM son más amplias. Así, el número de clones reactivos frente a B*2701 o frente a antígenos no-B27 es mayor. Estos respondedores presentan también reactividad con B*2704 y B*2706, y la complejidad de los patrones de reacción clonales en SR y GM es con frecuencia mucho mayor.

Aunque otros factores pueden inducir diferencias individuales en respuestas T aloespecíficas, es razonable asumir que los antígenos de histocompatibilidad juegan un papel importante, ya que en el timo se seleccionan aquellos TCR que poseen una afinidad baja por los antígenos HLA propios (165-167). Los antígenos del mismo locus son los que presentan una mayor semejanza estructural y de epítomos comunes y por tanto son los que podrán influir o modular más directamente la selección de aquellos clones T que se van a activar en la respuesta alogénica. Dentro de este estudio, dicha influencia esta probablemente relacionada con el hecho de que los dos respondedores cuya respuesta es más restringida comparten el antígeno HLA-B39 mientras que GM y SR, con una respuesta más amplia, expresa HLA-B7. Se observó una correlación entre la naturaleza de la posición 152 en los antígenos HLA-B de los respondedores (Tabla 53) con las reactividades encontradas en cada individuo. Dentro de los antígenos de clase I el polimorfismo del residuo 152 se restringe a dos aminoácidos: Val o Glu. Los subtipos B*2701, B*2702, B*2703 y B*2705 presentan V152 mientras que B*2704 y B*2706 tienen E152. Los antígenos HLA-B de los respondedores PA (B35, 39) y DL (B39, 44) presentan V152. Todos los clones provenientes de estos individuos reconocen antígenos HLA-B con V152: B*2705, B*2701, B*2702, B*2703, B55, B60 y B61. Así mismo, no se detectó reactividad con el antígeno HLA-B7 que se encuentra serológicamente relacionado con HLA-B27 pero que posee E152. Por otra parte el respondedor PA se utilizó en un intento de generación de respuestas citolíticas anti-B*2704 (210) no obteniéndose ningún clon con dicha especificidad aunque en el experimento en paralelo con B*2705 la respuesta fue relativamente abundante ya que lograron caracterizarse 18 clones. En el mismo estudio un segundo respondedor que presentaba también V152 en sus dos antígenos HLA-B generó

tambien una respuesta citolítica anti-B*2704 muy pobre ya que sólo pudo obtenerse un clon con esta especificidad despues de numerosos intentos, lo que indicaría que la gran dificultad en obtener estos clonotipos era debida a una frecuencia mucho menor de los mismos en relación a B*2705. Además este clon poseía una especificidad que era independiente de la posición E152. Otro estudio (217) indicó que individuos con V152 en sus antígenos HLA-B generaban mayores frecuencias de precursores con respecto a HLA-B56 (V152) que anti-HLA-B7 (E152), aun cuando ambos alelos presentaban un número similar de cambios con respecto al antígeno estimulador y están relacionados serológicamente entre sí.

En cambio los individuos GM y SR, que presentan cada uno un antígeno con E152, generaron clones citolíticos capaces de reaccionar con los subtipos B*2704 y/o B*2706. Por tanto es concebible que la influencia del residuo 152 en la selección del repertorio T sea determinante. Ello sería debido a la naturaleza del cambio y a la ubicación de dicho residuo en una posición central en la α hélice del dominio α_2 orientado hacia el sitio de unión de péptido, de forma que influiría drásticamente en el repertorio de péptidos presentados. Además, S97, Y116 y R156, localizados en el entorno del residuo 152, estan presentes en los antígenos HLA-B de los respondedores GM y SR pero no en DL y PA.

Las consideraciones anteriores sugieren que el fenotipo HLA del respondedor y, en particular, ciertas características estructurales de los antígenos HLA-B influyen en el curso de la respuesta celular anti-HLA-B27 y en la frecuencia de respuesta contra epítomos específicos. Es probable que esta influencia de los antígenos HLA sobre el repertorio T influya en la susceptibilidad diferencial de individuos HLA-B27⁺ a desarrollar espondilartropatias.

6.- CONCLUSIONES

* El espectro de especificidades clonales en la respuesta celular anti-HLA-B*2705 es amplio, pero los clones pueden agruparse en base a sus patrones de reacción con los subtipos de HLA-B27.

* De los 32 posibles patrones de reacción sólo 18 han sido detectados, lo que refleja una baja frecuencia de reactividad cruzada con B*2704 y B*2706.

* De los 18 patrones de reacción detectados 6 aparecen con frecuencia apreciable y de forma recurrente en todos o la mayoría de los respondedores examinados, mientras 12 sólo se detectan con baja frecuencia y en respondedores únicos.

* El grado de relación antigénica de los subtipos de HLA-B27 respecto a B*2705 es: B*2705 > B*2703 > B*2702 > B*2701 > B*2704 > B*2706 y se correlaciona con la naturaleza de las diferencias en su secuencia de aminoácidos.

* Todos los subtipos de HLA-B27 comparten epítomos reconocidos por células T con B*2705. Esto implica que pueden presentar péptidos idénticos o con motivos estructurales comunes y se correlaciona con la asociación de múltiples subtipos a enfermedad.

* Distintos individuos difieren notablemente en su respuesta celular contra HLA-B27. Las diferencias en la naturaleza y frecuencia de los patrones de reacción clonales de cada individuo se correlacionan con diferencias estructurales en sus antígenos HLA-B tales como con la naturaleza del residuo 152 y su entorno, la estructura de la cavidad B y el aminoácido 97.

* La reactividad diferencial de los repertorios de células T de distintos respondedores hacia epítomos particulares de HLA-B27 sugiere un posible mecanismo para explicar la diferente susceptibilidad de individuos HLA-B27⁺ a la enfermedad basado en la diferente capacidad para responder a determinantes artritogénicos.

* Los subtipos B*2704 y B*2706 son funcionalmente distintos y, el efecto de su polimorfismo sobre el reconocimiento alógeno sugiere una adaptación evolutiva relacionada con la especificidad de presentación de péptidos.

* HLA-B60 y -B61 son los antígenos no-B27 más frecuentemente reconocidos por CTL anti-B*2705. B60, cuando está presente junto con HLA-B27 induce una mayor susceptibilidad a espondilitis anquilosante. Por tanto hay una correlación entre la conservación de epítomos entre ambos antígenos y su papel en espondiloartropatías.

* Se ha definido una reactividad recurrente entre HLA-B27 y HLA-DR2 que puede ser explicada por la existencia de un desdoblamiento común en ambas estructuras asociado a la modulación de la especificidad de unión de péptidos.

* El repertorio de péptidos presentados por HLA-B27 en la LCL NW no es sustancialmente diferente del de otras células B*2702⁺ aunque algunos péptidos presentados por estas últimas pueden estar ausentes o muy disminuidos en NW. Por tanto, la incapacidad de NW de presentar ciertos péptidos virales en el contexto de HLA-B27 no es debida a una alteración de carácter general en la presentación de antígeno por HLA-B27 en ésta célula.

7.- BIBLIOGRAFIA

- 1.- Ploegh, H.L., Orr, H. y Strominger, J.L. "Major Histocompatibility Complex antigens: The human (HLA-A, -B, -C) and murine (H-2K, H-2D) class I molecules. *Cell* 24:287 (1981).
- 2.- Steinmetz, M. y Hood, L. "Genes of the MHC in mouse and man". *Science* 222:727 (1983).
- 3.- Campbell, D. y Trowsdale, J. "Map of the human MHC". *Immunol.Today* 14:349 (1993).
- 4.- Koller, B.H., Geraghty, D.E., deMars, R., Duvick, L., Rich, S. y Orr, H.T. "Chromosomal organization of the human major histocompatibility complex class I gene family". *J.Exp.Med.* 169:469 (1989).
- 5.- David-Watine, B., Israël, A. y Kourilsky, P. "The regulation and expression of MHC class I genes". *Immunol.Today* 11:286 (1990).
- 6.- Zinkernagel, R. y Doherty, P.C. "MHC-restricted cytotoxic T cells: Studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigens determining T-Cell restriction-specificity, function and responsiveness". *Avd. Immunol.* 27:52 (1979).
- 7.- Williams, A.F. y Barclay, A.N. "The immunoglobulin superfamily. Domains for cell surface recognition". *Ann.Rev.Immunol.* 6:381 (1988).
- 8.- Cushley, W. y Owen, M.J. "Structural and genetic similarities between immunoglobulins and class-I histocompatibility antigens". *Immunol.Today* 4:88 (1983).
- 9.- Bjorkman, P.J., Saper, P.A., Samraoui, B., Bennett, W.S., Strominger, J.L. y Wiley, D.C. "Structure of the human class I histocompatibility antigens, HLA-A2". *Nature* 329:506 (1987).
- 10.- Bjorkman, P.J., Saper, P.A., Samraoui, B., Bennett, W.S., Strominger, J.L. y Wiley, D.C. "The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens". *Nature* 329:512 (1987).
- 11.- Saper, M. A., Bjorkman, P.J., y Wiley, D.C. "Refined structure of the human histocompatibility antigen HLA-A2 at 2.6Å resolution". *J. Mol. Biol.* 219:277 (1991).
- 12.- Garret, T.P., Saper, M.A., Bjorkman, P.J., Strominger, J.L. and Wiley, D.C. "Specificity pockets for the side chains of peptide antigen in HLA-Aw68". *Nature* 342:692 (1989).
- 13.- Jardetzky, T. S., Lane, W.S., Robinson, R.A., Madden, D.R. y Wiley, D.C. "Identification of self peptides bound to purified HLA-B27". *Nature* 353:326 (1991).
- 14.- Madden, D.R., Gorga, J.C., Strominger, J.L. y Wiley, D.C. "The three-dimensional structure of HLA-B27 at 2.1Å resolution suggest a general mechanism for tight peptide binding to MHC". *Cell* 70:1035 (1992).
- 15.- Fremont, D.H., Matsumura, M., Stura, E.A., Peterson, P.A. y Wilson, I.A. "Crystal structures of two viral peptides in complex with murine MHC class I H-2K^b". *Science* 257:919 (1992).
- 16.- Matsumura, M., Fremont, D.H., Peterson, P.A. y Wilson, I.A. "Emerging principles for the recognition of peptide antigens by MHC class I molecule". *Science* 257:927 (1992).

- 17.- Brown, J.H., Jardetzky, T.S., Gorga, J.C., Stern, L.J., Urban, R.G., Strominger, J.L. y Wiley D.C. "Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1". *Nature* 364:33 (1993).
- 18.- Cresswell, P.M., Turner, J. y Strominger, J.L. "Papain-solubilized HLA-A antigens from cultured human lymphocytes contain two peptide fragments". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70:1603 (1973).
- 19.- Goodfellow, P.N., Jones, E.A., van Heynengen, V., Solomon, E., Bobrow, M., Miggiano, V. y Bodmer, W.F. "The $\beta 2m$ gene is on chromosome 15 and not in the HLA region". *Nature* 254:267 (1975).
- 20.- Pober, J.S., Guild, B.C. y Strominger, J.L. "Phosphorilation "in vivo" and "in vitro" of human histocompatibility antigens HLA-A and -B in the carboxy-terminal intracellular domain". *P.N.A.S. USA* 75:6002 (1978).
- 21.- Guild, B.C. y Strominger J.L. "HLA-A2 antigen phosphorilation "in vitro" by cyclic AMP-dependent protein kinase". *J. Biol. Chem.* 259:13504 (1984).
- 22.- Guild, B.C., Erikson, R.L. y Strominger J.L. "HLA-A2 and HLA-B7 antigens are phosphorilated "in vitro" by Rous sarcoma virus kinase (pp60^{v-src}) at a tyrosine residue encoded in a highly conserved exon of the intracellular domain". *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 80:2894 (1983).
- 23.- Koch, G.L.E. y Smith, M.J. "An association between actin and the major histocompatibility antigen H-2". *Nature* 273:274 (1978).
- 24.- Pober, J.S., Guild, B.C., Strominger, J.L. y Veatch, W.R. "Purification of HLA-A2 antigen, fluorescent labeling of its intracellular region, and demonstration of an interaction between fluorescently labeled HLA-A2 antigen and lymphoblastoid cell cytoskeleton proteins in vitro". *Biochem.* 18:2218 (1979).
- 25.- Trowsdale, J., Young, J.A.T., Kelly, A.P., Austin, P.J., Carson, S., Meunier, H.S.A., Ehrlich, H.A., Spielman, R.S., Bodmer, J. y Bodmer, W.F. "Structure, sequence and polymorphism in the HLA-D region". *Immunol. Rev.* 85:1 (1985).
- 26.- Korman, A.J., Boss, J.M., Spies, T., Sorrentino, R., Okada, K. y Strominger, J.L. "Genetic complexity and expression of human class I histocompatibility antigens". *Immunol.Rev.* 85:45 (1985).
- 27.- Chicz, R.M., Urban R.G., Gorga, J.C., Vignali, D.A.A., Lane W.S. y Strominger, J.L. "Specificity and promiscuity among naturally processed peptides bound to HLA-DR alleles". *J.Exp.Med.* 178:27 (1993).
- 28.- Hammer, J., Valsasnini, P., Tolba, K., Bolin, D., Higelin, J., Takacs, B. y Sinigaglia, F. "Promiscuous and allele-specific anchors in HLA-DR-binding peptides". *Cell* 74:197 (1993).
- 29.- Bodmer, J.G., Marsh, S.G.E., Albert, E.D., Bodmer, W.F., Dupont, B., Erlich H.E., Mach, B., Mayr, B., Parham, P., Sasazuki, T., Schreuder, G.M.T., Strominger, J.L., Svejgaard, A. y Terasaki, P.I. "Nomenclature for factors of the HLA system, 1991". *WHO-HLA Nomenclature Committee* 63:142 (1992).

- 30.- Salter, R.D., Benjamin, R.J., Wesley, P.K., Buxton, S.E., Garrett, T.P.J., Clayberger, C., Krensky, A.M., Norment, A.M., Littman, D.R. y Parham, P. "A binding site for the T-cell co-receptor CD8 on the $\alpha 3$ domain of HLA-A2". *Nature* 345:41 (1990).
- 31.- Kornfeld, R. y Kornfeld, S. "Assembly of asparagine-linked oligosaccharides". *Ann.Rev.Biochem.* 54:631 (1985).
- 32.- Degen, E., Cohendoyle, M.F. y Williams, D.B. "Efficient dissociation of the p88 chaperone from major histocompatibility complex class-I molecules requires both $\beta 2m$ and peptide". *J.Exp.Med.* 175:1653 (1992).
- 33.- Degen, E. y Williams, D.B. "Participation of a novel 88KD protein in the biogenesis of murine class I MHC". *J.Cell.Biol.* 112:1099 (1991).
- 34.- Hochstenbach, F., David, V., Watkins, S. y Brenner, M.B. "Endoplasmic reticulum resident protein of 90KD associates with the T-cell and B-cell antigen receptors and MHC antigens during their assembly". *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 89:4734 (1992).
- 35.- Koller, B.H., Marrack, P., Kappler, J.W. y Smithies, O. "Normal development of mice deficient in $\beta 2m$, MHC class I proteins and CD8⁺ T cells". *Science* 248:1227 (1990).
- 36.- Zijlstra, M., Bix, M., Simister, N.E., Loring, J.M., Raulet, D.H. y Jaenisch, R. " $\beta 2m$ deficient mice lack CD4⁺8⁺ cytolytic T cells". *Nature* 344:742 (1990).
- 37.- Neefjes, J.J., Stollorz, V., Peters, P.J., Geuze, H.J. y Ploegh, H.L. "The biosynthetic pathway of MHC class II but not class I molecules intersects the endocytic route". *Cell* 61:171 (1990).
- 38.- Goldstein, S.A.N. y Mescher, M.F. "Carbohydrate moieties of MHC class I alloantigens are not required for their recognition by T-lymphocytes". *J.Exp.Med.* 162:1381 (1985).
- 39.- Landolfi, N.F. y Cook, R.G. "Activated T-lymphocytes express class I molecules which are hypoglycosylated compared to other lymphocyte populations". *Mol.Immunol.* 23:297 (1986).
- 40.- Lancet, D., Parham, P. y Strominger, J.L. "Heavy chains of HLA-A and HLA-B antigens are conformationally labile: a possible role for $\beta 2m$ ". *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 76:3844 (1979).
- 41.- Severinsson, L. y Peterson, P.A. " $\beta 2m$ induces intracellular transport of human class I transplantation antigen heavy chains in *Xenopus Laevis* oocytes". *J.Cel.Biol.* 99:226 (1984).
- 42.- Sege, K., Rask, L. y Peterson, P.A. "Role of the $\beta 2m$ in the intracellular processing of HLA antigens". *Biochem.* 20:4523 (1981).
- 43.- Owen, M.J., Kissonerghis, A. y Lodish, H.F. "Biosynthesis of HLA-A and -B antigens in vivo". *J.Biol.Chem.* 255:9678 (1980).
- 44.- Falk, K., Rötzschke, O., Stevanovic, S., Jung, G. y Rammensee H.G. "Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules". *Nature* 351:290 (1991).
- 45.- Gould, K.G., Scotney, H. y Brownlee, G.G. "Characterization of two distinct MHC class I K^k-restricted T-cell epitopes within the influenza A/PR/8/34 virus hemagglutinin". *J.Virol.* 65:5401 (1991).

- 46.- Hunt, D. F., Henderson, R. A., Shabanowitz, J., Sakaguchi, K., Michel, H., Sevelir, N., Cox, A.L., Appella, E. y Engelhard, V.H. "Characterization of peptides bound to the class I MHC molecule HLA-A2.1 by mass spectrometry". *Science* 255:1261 (1992).
- 47.- Rötzschke, O., Falk, K., Stevanovic, S., Jung, G. y Rammansee, H.G. "Peptide motifs of closely related HLA class I molecule encompass substantial differences". *Eur.J.Immunol.* 22:2453 (1992).
- 48.- Jardetzky, T. S., Lane, W.S., Robinson, R.A., Madden, D.R. y Wiley, D.C. "Identification of self peptides bound to purified HLA-B27". *Nature* 353:326 (1991).
- 49.- Rötzschke, O., Falk, K., Stevanovic, S., Gnau, V., Jung, G. y Rammansee, H.G. "Dominant aromatic/aliphatic C-terminal anchor in HLA-B*2702 and B*2705 peptide motifs". *Immunogenetics* 39:74 (1994).
- 50.- Falk, K., Rötzschke, O., Grahovac, B., Schendel, D., Stevanovic, S., Jung, G. y Rammansee, H.G. "Peptide motifs on HLA-B35 and -B37 molecules". *Immunogenetics* 38:161 (1993).
- 51.- Huczko, E.L., Bodnar, W.M., Benjamin, D., Sakaguchi, K., Zhu, N.Z., Shabanowitz, J., Henderson, R.A., Appella, E. y Hunt, D.F. "Characteristics of endogenous peptides eluted from the class I MHC molecule HLA-B7 determined by mass spectrometry and computer modeling". *J.Immunol.* 151:2572 (1993).
- 52.- Sutton, J., Rowland-Jones, S.L., Rosenberg, W., Nixon, D., Gotch, F., Gao, K.M., Murray, N., Spoonas, A., Driscoll, P., Smith, M., Willis, A. y McMichael, A. "A sequence pattern for peptides presented to CTL by HLA-B8 revealed by analysis of epitopes and eluted peptides". *Eru. J. Immunol.* 23:447 (1993).
- 53.- Colbert, R.A., Rowland-Jones, S.L., McMichael, A.J. y Frelinger, J.A. "Allele-specific B pocket transplant in class I major histocompatibility complex protein changes requirement for anchor residue at P2 of peptide". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6879 (1993).
- 54.- Hershko, A. "The ubiquitin system for protein degradation". *Annu.Rev.Biochem.* 61:761 (1992).
- 55.- Cerundolo V., Alexander, J., Anderson, K., Lamb, C., Cresswell, P., McMichael, A., Gotch, F. y Townsend, A. "Presentation of viral antigen controlled by a gene in the major histocompatibility complex". *Nature* 345:449 (1990).
- 56.- Deverson, E.V., Gow, I.R., Coadwell, W.J., Monaco, J.J., Butcher, G.W. y Howard, J.C. "MHC class II region encoding proteins related to the multidrug resistance family of transmembrane transporters". *Nature* 348:738 (1990).
- 57.- Monaco, J.J., Cho, S. y Attaya, M. "Transport protein genes in the murine MHC: possible implications for antigen processing". *Science* 250:1723 (1990).
- 58.- Spies, T., Bresnahan, M., Bahram, S., Arnold, D., Blanck, G., Mellins, E., Pious, D. y DeMars, R. "A gene in the human major histocompatibility complex class II region controlling the class I antigen presentation pathway". *Nature* 348:744 (1990).
- 59.- Trowsdale, J., Hanson, I., Mockridge, I., Beck, S., Townsend, A. y Kelly, A. "Sequences encoded in the class II region of the MHC related to the "ABC" superfamily of transporters". *Nature*

- 348:741 (1990).
- 60.- Ortiz-Navarrete, V., Seelig, A., Gernold, M., Frentzel, S., Kloetzel, P.M. y Hämmerling, G.J. "Subunit of the 20S proteasome (multicatalytic proteinase) encoded by the MHC". *Nature* 353:662 (1991).
 - 61.- Kelly, A., Powis, S.H., Glynne, R., Radley, E., Beck, S. y Trowsdale, J. "Second proteasome-related gene in human MHC class II region". *Nature* 353:667 (1991).
 - 62.- Martinez, C.K. y Monaco, J.J. "Homology of proteasome subunits to a MHC linked LMP gene". *Nature* 353:664 (1991).
 - 63.- Powis, S.J., Townsend, A.R., Deverson, E.V., Bastin, J., Butcher, G.W. y Howard, J.C. "Restoration of antigen presentation to the mutant cell line RMA-S by an MHC-linked transporter". *Nature* 354:528 (1991).
 - 64.- Spies, T. y R. DeMars. "Restored expression of major histocompatibility class I molecules by gene transfer of a putative peptide transporter". *Nature* 351:323 (1991).
 - 65.- Colonna, M., Bresnahan, M., Bahram, S., Strominger, J.L. y Spies, T. "Allelic variants of the human putative peptide transport involved in antigen processing". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3932 (1992).
 - 66.- Henderson, R.A., Michel, H., Sakaguchi, K., Shabanowitz, J., Appella, E., Hunt, D.F. y Engelhard, V.H. "HLA-A2.1-associated peptides from a mutant-cell line-a 2nd pathway of antigen presentation". *Science* 255:1264 (1992).
 - 67.- Powis, S.J., Deverson, E.V., Coadwell, W.J., Ciruela, A., Huskisson, N.S., Smith, H., Butcher, G.W. y Howard, J.C. "Effect of polymorphism of an MHC-linked transporter on the peptides assembled in a class I molecule". *Nature* 357: 211 (1992).
 - 68.- Rammansee, H.G., Falk, K. y Rötzschke, O. "Peptide naturally presented by MHC class I molecules". *Annu.Rev.Immunol.* 11:213 (1993).
 - 69.- Goldberg, A.L. y Rock, K.L. "Proteolysis, proteasomes and antigen presentation". *Nature* 357:375 (1992).
 - 70.- Levy, F., Gabathuler, R., Larsson, R. y Kvist, S. "ATP is required for in vitro assembly of MHC class I antigens but not for transfer of peptides across the ER membrane". *Cell* 67:265 (1991).
 - 71.- Koppelman, B., Zimmerman, D.L., Walter, P. y Brodsky, F.M. "Evidence for peptide transport across microsomal membranes". *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 89:3908 (1992).
 - 72.- Townsend, A., Rothbard, J., Gotch, F.M., Bahadur, G., Wraith, D. y McMichael, A.J. "The epitopes of influenza nucleoprotein recognized by CTL can be defined with sort synthetic peptides". *Cell* 44:959 (1986).
 - 73.- Davis, M.M. y Bjorkman, P.J. "T cell antigen receptor genes and T cell recognition". *Nature* 334:395 (1988).
 - 74.- Meuer, S.C., Fitzgerald, K.A., Hussey, R.E., Hodgdon, J.C., Schlossman, S.F. y Reinherz, E.L.

- "Clonotypic structures involved in antigen-specific human T function. Relationship to the T3 molecular complex. *J.Exp.Med.* 157:705 (1983).
- 75.- Brenner, M.B., Trowbridge, I.S. y Strominger, J.L. "Cross-linking of human TCR proteins: association between the T cell idiotype β subunit and the T3 glycoprotein heavy subunit". *Cell* 40:183 (1985).
- 76.- Inghirami, G., Zhu, B.Y., Chess, L. y Knowles, D.M. "Flow cytometric and immunohistological characterization of the gamma delta lymphocyte population in normal human lymphoid tissue and peripheral blood". *Am.J.Pathol.* 136:357 (1990).
- 77.- Brenner, M.B., McLean, J., Scheft, H., Warnke, R.A., Jones, M. y Strominger, J.L. "Characterization and expression of human α/β TCR by using a framework monoclonal antibody". *J.Immunol.* 138:1502 (1986).
- 78.- Doherty, P.C., Allan, W. y Eichelberger, M. "Role of $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cell subsets in viral immunity". *Annu.Rev.Immunol.* 10:123 (1992).
- 79.- Maddon, P.J., Litman, D.R., Godfrey, M., Maddon, D.E., Chess, L. y Axel, R. "The isolation and nucleotide sequence of a cDNA encoding the T cell surface protein T4: a new member of the immunoglobulin gene family". *Cell* 42:93 (1985).
- 80.- Parnes, J.R. "Molecular biology and function of CD4 and CD8". *Adv.Immunol.* 44:265 (1989).
- 81.- Janeway, C.A.Jr., Carding, S., Jones, B., Murray, J., Portoles, P., Rasmussen, R., Rojo, J., Saiwaza, K. y Bottomly, K. "CD4⁺ T cells: Specificity and function". *Immunol.Rev.* 101:39 (1988).
- 82.- Wang, J., Yan, Y., Garret, T.P.J., Liu, R., Rodgers, D.W., Garlick, R.L., Tarr, G.E., Husain, Y., Reinherz, E.L. y Harrison, S.C. "Atomic structure of a fragment of human CD4 containing two immunoglobulins-like domains". *Nature* 348:411 (1990).
- 83.- Ryu, S.E., Kwong, P.D., Truneh, A., Porter, T.G., Arthos, J., Rosenberg, M., Dai, X., Xuong, N.H., Axel, R., Sweet, R.W. y Hendrickson, W.A. "Crystal structure of an HIV-binding recombinant fragment of human CD4". *Nature* 348:419 (1990).
- 84.- Kupfer, A., Singer, S.J., Janeway, C.A.Jr. y Swain, S.L. "Co-clustering of CD4 (L3T4) with the TCR is induced by specific direct interaction of helper T cells and antigen-presenting cells". *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 84:5888 (1987).
- 85.- Leahy, D.J., Axel, R. y Hendrickson, W.A. "Crystal structure of a soluble form of the human T cell coreceptor CD8 at 2.6Å resolution". *Cell* 66:1145 (1992).
- 86.- O'Rourke, A.M., Rogers, J. y Mescher, M.F. "Activated CD8 binding to class I protein mediated by the TCR results in signalling". *Nature* 346:187 (1990).
- 87.- Saiwaza, K., Rojo, J. y Janeway, C.A.Jr. "Evidence for a physical association of CD4 and the CD3: α/β TCR". *Nature* 328:270 (1987).
- 88.- Bierer, B.E., Sleckman, B.P., Ratnofsky, S.E. y Burakoff, S.J. "The biological roles of CD2, CD4 and CD8 in T-cell activation". *Annu.Rev.Immunol.* 7:579 (1989).

- 89.- Rudd, C.E., Trevillyan, J.M., Dasgupta, J.V., Wong, L.L. y Schlossman, S.F. "The CD4 antigen is complexed in detergent lysates to a protein tyrosine kinase (pp58) from human T lymphocytes". *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 85:5190 (1988).
- 90.- Veillette, A., Bookman, M.A., Horak, E.M. y Bolen, J.B. "The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56^{lck}". *Cell* 43:393 (1988).
- 91.- Thomas, M.L. "The leukocyte common antigen family". *Annu.Rev.Immunol.* 9:527 (1989).
- 92.- Kupfer, A., Singer, S.J. y Dennert, G. "On the mechanism of unidirectional killing in mixtures of two CTL". *J.Exp.Med.* 163:489 (1986).
- 93.- Moss, P.A.H., Rosenberg, W.M.C. y Bell, J.I. "The human TCR in health and disease". *Annu.Rev.Immunol.* 10:71 (1992).
- 94.- Dennert, G. y Podack, E.R. "Cytolysis by H-2-specific T killer cells: Structural, immunological and functional similarities". *Science* 233:184 (1986).
- 95.- Podack, E.R. y Dennert, G. "Cytolysis of two subtypes of tubules with putative cytolytic function by cloned NK cells". *Nature* 302:442 (1983).
- 96.- Burkhardt, J.K., Hester, S. y Argon, Y. "Two proteins targeted to the same lytic granule compartment undergo very different posttranslational processing". *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 86:7128 (1989).
- 97.- Peters, P.J., Geuze, H.G., Van der Donk, H.A., Slot, J.W., Griffith, J.M., Stam, N.J., Clevers, H.C. y Borst, J. "Molecules relevant for T-cell target cell interaction are present in cytolytic granules of human T lymphocytes". *Eur.J.Immunol.* 19:1469 (1989).
- 98.- Peters, P.J., Geuze, H.G., Van der Donk y Borst, J. "A new model for lethal hit delivery by CTL". *Immunol.Today* 11:28 (1990).
- 99.- Jenne, D., Rey, C., Heafliker, J.A., Qiao, B.Y., Groscruth, P. y Tschopp, J. "Identification and sequencing of cDNA clones encoding the granule-associated serine proteases granzymes D, E, and F of CTL". *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 85:4814 (1988).
- 100.- Groscruth, P., Qiao, B.Y., Podack, E.R. y Hengartner, H. "Cellular localization of perforin 1 in murine cloned CTL". *J.Immunol.* 138:2749 (1987).
- 101.- Millard, P.J., Henkart, M.P., Reynolds, C.W. y Henkart, P.A. "Purification and properties of cytoplasmic granules from cytotoxic rat LGL tumor". *J.Immunol.* 132:3197 (1984).
- 102.- Henkart, P.A., Millard, P.J., Reynolds, C.W. y Henkart, M.P. "Cytolytic activity of purified cytoplasmic granules from cytotoxic rat large granular lymphocyte tumors". *J.Exp.Med.* 160:75 (1984).
- 103.- Podack, E.R. y Konigsberg, P.J. "CTL granules: Isolation, structural, biochemical and functional characterization". *J.Exp.Med.* 160:695 (1984).
- 104.- Podack, E.R., Young, J.D.E. y Cohn, Z.A. "Isolation and biochemical and functional

- characterization of perforin 1 from CTL granules". *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 82:8629 (1985).
- 105.- Masson, D., Corthesy, P., Nabholz, M. y Tschopp, J. "Appearance of cytolytic granules upon induction of cytolytic activity in CTL-hybrids". *EMBO J.* 4:2533 (1985).
- 106.- Young, J.D.E., Hengartner, H., Podack, E.R. y Cohn, Z.A. "Purification and characterization of a cytolytic pore-forming protein from granules of cloned lymphocytes with NK activity". *Cell* 44:849 (1986).
- 107.- Podack, E.R., Lowrey, D.M., Lichterheld, M.G., Olsen, K.J., Aebischer, T., Binder, D., Rupp, F. y Hengartner, H. "Structure, function and expression of murine and human perforin 1 (P1)". *Immunol.Rev.* 103:203 (1988).
- 108.- Podack, E.R. "Molecular composition of the tubular structure of the membrane attack complex complement". *J.Biol.Chem.* 259:8641 (1984).
- 109.- Blumenthal, R.P., Millard, P.J., Henkart, M.P., Reynolds, C.W. y Henkart, P.A. "Lysozymes as targets for granule cytotoxin from cytotoxic large granular lymphocyte tumors". *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 81:5551 (1984).
- 110.- Dourmashkin, R.R., Deteix, P., Simone, C.B. y Henkart, P.A. " Electron microscopic demonstration of lesions in target membranes associated with antibody-dependent cellular cytotoxicity". *Clin.Exp.Immunol.* 42:554 (1980).
- 111.- Young, J.D.E., Nathan, C.F., Podack, E.R., Palladino, M.A. y Cohn, Z.A. "Functional channel formation associated with CTL granules". *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 83:150 (1986).
- 112.- Young, J.D.E., Cohn, Z.A. y Podack, E.R. "The ninth component of complement and the pore-forming protein (perforin 1) from CTL: Structural, immunological and functional similarities". *Science* 233:184 (1986).
- 113.- Verret, C.R., Firmenich, A.A., Kranz, D.M. y Eisen, H.N. "Resistance of CTL to the lytic effects of their toxic granules". *J.Exp.Med.* 166:1536 (1987)
- 114.- Nagler-Anderson, C., Verret, C.R., Firmenich, A.A., Berne, M. y Eisen, H.N. "Resistance of primary CD8⁺ CTL to lysis by cytotoxic granules from cloned T cell lines". *J.Immunol.* 141:3299 (1988).
- 115.- Jiang, S., Persechini, P.M., Zychlinsky, A., Liu, C.C., Perussia, B. y Young, J.D.H. "Resistance of CTL to perforin-mediated killing. Lack of correlation with complement-associated homologous species restriction". *J.Exp.Med.* 168:2207 (1988).
- 116.- Müller-Eberhard, H.J. "The molecular basis of target cell killing by human lymphocytes and of killer cell self-protection". *Immunol.Rev.* 103:87 (1988).
- 117.- Russell, J.H. "Internal desintegration model of cytotoxic lymphocyte-induced target damage". *Immunol.Rev.* 72:97 (1983).
- 118.- Cohen, J.J. y Duke, R.C. "Glucocorticoid activation of a Ca-dependent endonuclease in thymocyte nuclei leads to cell death". *J.Immunol.* 132:38 (1984).

- 119.- Hameed, A., Olsen, K.J., Lee, M.K., Lichtenheld, M.G. y Podack, E.R. "Cytolysis by Ca-permeable transmembrane channels: Pore formation causes extensive DNA degradation and cell lysis". *J.Exp.Med.* 169:765 (1989).
- 120.- Krensky, A.M., Sanchez-Madrid, F., Robbins, E., Nagy, J.A., Springer, T.A y Burakoff, S.J. "The functional significance, distribution, and structure of LFA-1, LFA-2 and LFA-3: Cell surface antigens associated with CTL-target". *J.Immunol.* 131:611 (1983).
- 121.- Sanchez-Madrid, F., Krensky, A.M., Ware, C.F., Robbins, E., Strominger, J.L., Burakoff, S.J. y Springer, T.A. "Three distinct antigens associated with human T-lymphocyte-mediated cytolysis LFA-1, LFA-2 and LFA-3". *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 79:7489 (1982).
- 122.- Marlin, S.D. y Springer, T.A. "Purified intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for LFA-1". *Cell* 51:813 (1987).
- 123.- Staunton, D.E., Dustin, M.L. y Springer, T.A. "Functional cloning of ICAM-2 cell adhesion ligand for LFA-1 homologous to ICAM-1". *Nature* 339:61 (1989).
- 124.- De Fougerolles, A.R. y Springer, T.A. "ICAM-3, a third adhesion counter-receptor for lymphocyte function-associated molecule-1 on resting lymphocytes". *J.Exp.Med.* 175:185 (1992).
- 125.- Selvaraj, P., Plunkett, M.L., Dustin, M., Sanders, M.E., Shaw, S. y Springer, T.A. "The T lymphocyte glycoprotein CD2 binds the cell surface ligand LFA-3". *Nature* 326:400 (1987).
- 126.- Smith, K.A. "Interleukin-2". *Annu.Rev.Immunol.* 193:1007 (1976).
- 127.- Taniguchi, T. "Regulation of cytokine gene expression". *Annu.Rev.Immunol.* 6:439 (1988).
- 128.- Waldmann, T.A., Goldman, C.K., Robb, R.J., Depper, J.M., Leonard, W.J., Sharrow, S.O., Bongiovanni, K.F., Korsmeyer, S.J. y Greene, W.C. "Expression of IL-2 receptors on activated human B cells". *J.Exp.Med.* 160:1450 (1984).
- 129.- Grimm, E.A., Mazumder, A., Zhang, H.Z. y Rosenberg, S.A. "Lymphocyte-activated killer cell phenomenon: lysis of NK-resistant fresh solid tumor cells by IL-2-activated autologous human peripheral blood lymphocytes". *J.Exp.Med.* 155:1823 (1982).
- 130.- Henry, C.S., Kuribayashi, K., Kern, D.E. y Gillis, S. "IL-2 augments NK cell activity". *Nature* 291:335 (1981).
- 131.- Benvenisto, E.N. y Merrill, J.E. "Stimulation of oligodendroglial proliferation and maturation by IL-2". *Nature* 321:610 (1986).
- 132.- Lenardo, M.J. "IL-2 programs mouse $\alpha\beta$ T lymphocytes for apoptosis". *Nature* 353:858 (1991).
- 133.- Beverly, B., Kang, S.M., Lenardo, M.J. y Schwartz, R.H. "Reversal of an in vitro T cell clonal anergy by IL-2 stimulation". *Int.Immunol.* 4:661 (1992).
- 134.- Minami, Y., Kono, T., Miyazaki, T. y Taniguchi, T. "The IL-2 receptor complex: Its structure, function, and target genes". *Annu.Rev.Immunol.* 11:245 (1993).
- 135.- Leonard, W.J., Depper, J.M., Robb, R.J., Waldmann, T.A. y Greene, W.C. "Characterization

- of the human receptor for T cell growth factor". *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 80:6957 (1983).
- 136.- Robb, R.J. y Greene, W.C. "Direct demonstration of the identity of T-cell growth factor binding protein and the Tac antigen". *J.Exp.Med.* 158:1332 (1983).
- 137.- Hatakeyama, M., Minamoto, S., Uchiyama, T., Hardy, R.R., Yamada, G. y Tanguchi, T. "Reconstitution of functional receptor for human IL-2 in mouse cells". *Nature* 318:467 (1985).
- 138.- Greene, W.C., Robb, R.J., Svetlik, P.B., Rusk, G.M., Depper, J.M. y Leonard, W.J. "Stable expression of cDNA encoding the human IL-2-receptor in mouse T cells by cDNA transfection". *J.Exp.Med.* 162:363 (1985).
- 139.- Hanks, S.K., Quinn, A.M. y Hunter, T. "The protein kinase family: Conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains". *Science* 241:42 (1988).
- 140.- Sharon, M., Gnarr, J.R. y Leonard, W.J. "A 100KD protein is associated with the murine IL-2 receptor: Biochemical evidence that p100 is distinct from the α and β chains". *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 87:4869 (1990).
- 141.- Saragovi, H. y Malek, T.R. "Evidence for additional subunits associated to the mouse IL-2 receptor p55/p75 complex". *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 87:11 (1990).
- 142.- Voss, S.D., Robb, R.J., Weil-Hillman, G., Hank, J.A., Sugamura, K., Tsudo, M. y Sondel, P.M. "Increased expression of the IL-2 receptor β chain (p70) on CD56⁺ NK cells after in vivo IL-2 therapy: p70 expression does not alone predict the level of intermediate affinity IL-2 binding". *J.Exp.Med.* 172:1101 (1990).
- 143.- Saltzman, E.M., Thom, R.R. y Casnellie, J.E. "Activation of a tyrosine protein kinase is an early event in the stimulation of T lymphocytes by IL-2". *J.Biol.Chem* 263:6956 (1988).
- 144.- Farrar, W.L. y Ferris, D.K. "Two-dimensional analysis of IL-2 regulated tyrosine kinase activation mediated by the p70-75 β subunit of the IL-2 receptor". *J.Biol.Chem.* 264:12562 (1989).
- 145.- Mills, G.B., May, C., McGill, M., Fung, M., Baker, M., Sutherland, R. y Greene, W.C. "IL-2-induced tyrosine phosphorylation: IL-2 receptor β is tyrosine phosphorylated". *J.Biol.Chem.* 265:3561 (1990).
- 146.- Merida, I. y Gaulton, G.N. "Protein tyrosine phosphorylation associated with activation of the IL-2 receptor". *J.Biol.Chem.* 265:5690 (1990).
- 147.- Saltzman, E.M., White, K. y Casnellie, J.E. "Stimulation of the antigen and IL-2 receptors on T lymphocytes activates distinct tyrosine protein kinases". *J.Biol.Chem.* 265:10138 (1990).
- 148.- Hatakeyama, M., Kono, T., Kobayashi, N., Kawahara, A., Levin, S.D., Perlmutter, R.M. y Taniguchi, T. "Interaction of the IL-2 receptor with the src-family kinase p56^{lck}: identification of novel intermolecular association". *Science* 252:1523 (1991).
- 149.- Fung, M.R., Scarce, R.M., Hoffman, J.A., Peffer, N.J., Hammes, S.R., Hosking, J.B., Schmandt, R., Kuziel, W.A., Haynes, B.F., Mills, G.B. y Greene, W.C. "A tyrosine kinase physically associates with the β -subunit of the human IL-2 receptor". *J.Immunol.* 147:1253 (1991).

- 150.- Takahata, N., Klein, J. y Satta, Y. "The molecular descent of the MHC". *Annu.Rev.Immunol.* 11:269 (1993).
- 151.- Wilson, D.B., Blyth, J.L. y Nowell, P.C. "Quantitative studies on the mixed lymphocyte interaction in rats". *J.Exp.Med.* 128:1157 (1968).
- 152.- Jones, G. "The number of reactive cells in mouse lymphocyte cultures stimulated by phytohemagglutinin, concanavalin A or histocompatibility antigens". *J.Immunol.* 111:914 (1973).
- 153.- Fischer-Lindahl, K. y Wilson, D.B. "Histocompatibility antigen-activated cytotoxic T lymphocytes. II. Estimates of the frequency and specificity of precursors". *J.Exp.Med.* 145:508 (1977).
- 154.- Widmer, M.B. y MacDonald, H.R. "Cytolytic T lymphocyte precursors reactive against mutant K^b alloantigens are as frequent as those reactive against a whole foreign haplotype". *J.Immunol.* 124:48 (1980).
- 155.- Bach, F.H., Graupner, K., Dan, E. y Klostermann, H. "Cell kinetics studies in mixed leukocyte cultures: and in vitro model of homograft reactivity". *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 62:374 (1969).
- 156.- Jerne, N.K. "The somatic generation of immune recognition". *Eur.J.Immunol.* 1:1 (1971).
- 157.- Von Boehmer, H., Haas, W. y Jerne, N.K. "MHC-linked immune-responsiveness is acquired by lymphocytes of low-responder mice differentiating in thymus of high-responder mice". *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 75:2439 (1978).
- 158.- Matzinger, P. y Bevan, M.J. "Hypotesis: why do so many lymphocytes respond to MHC antigens". *Cell.Immunol.* 29:1 (1977).
- 159.- Falk, K., Rötzschke, O., Deres, K., Schild, H., Norda, M., Metzger, J., Jung, G. y Rammansee, H.G. "Identification of naturally processed viral nonapeptides allows their quantification in infected cells and suggests an allele-specific T cell epitope forecast". *J.Exp.Med.* 174:425 (1991).
- 160.- Van Bleek, G.M. y Nathenson, S.G. "Isolation of an immunodominant viral peptide from the class I H-2K^b molecule". *Nature* 348:213 (1990).
- 161.- Matis, L.A., Sorger, S.B., McElligott, D.L., Fink, P.J. y Hedrick, S.M. "The molecular basis of alloreactivity in antigen-specific MHC-restricted T cell clones". *Cell* 51:59 (1987).
- 162.- Sredni, B. y Schwatz, R.H. "All reactivity of an antigen specific T cell clone". *Nature* 287:855 (1980).
- 163.- Braciale, T., Andrew, M. y Braciale, V. "Simultaneous expression of H2 restricted and alloreactive recognition by a cloned line of influenza virus-specific cytotoxic T lymphocyte". *J.Exp.Med.* 153:1371 (1981).
- 164.- Sprent, J., Lo, D., Gao, E.K. y Ron, Y. "T cell selection in the thymus". *Immunol.Rev.* 101:174 (1988).
- 165.- Marrack, P. y Kappler, J. "The T-cell repertoire for antigen and MHC". *Immunol.Today* 9:308 (1988).

- 166.- Kisielov, P., Teh, H.S., Bluthmann, H. y Boehmer, H. "Positive selection of antigen-specific T cells in thymus by restricting MHC molecules". *Nature* 335:730 (1988).
- 167.- Sha, W.C., Nelson, C.A., Newberry, R.D., Kranz, D.M., Russel, J.H. y Loh, D.Y. "Positive and negative selection of an antigen receptor on T cells in transgenic mice". *Nature* 336:73 (1988).
- 168.- Berg, L.J., Pullen, A.M., Fazekas, B., Mathis, D., Benoist, C. y Davis, M.M. "Antigen/MHC-specific T cells are preferentially exported from the thymus in the presence of their MHC ligand". *Cell* 58:1035 (1989).
- 169.- Eckers, D.D., Gorski, J., Rothbard, J. y Lamb, J.R. "Peptide-mediated modulation of T cell allorecognition". *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 85:8191 (1988).
- 170.- Marrack, P. y Kappler, J. "T cells can distinguish between allogeneic MHC products on different cell types". *Nature* 332:840 (1988).
- 171.- Mentzer, S.J., Barbosa, J.A., Strominger, J.L., Biro, P.A. y Burakoff, S.J. "Species-restricted recognition of transfected HLA-A2 and HLA-B7 by human CTL clones". *J.Immunol.* 137:408 (1986).
- 172.- Koller, T.D., Clayberger, C., Maryanski, J.L. y Krensky, A.M. "Human allospecific CTL lysis of a murine cell transfected with HLA-A2". *J.Immunol.* 138:2044 (1987).
- 173.- Bernhard, E.J., Le, A.T., Yannely, J.R., Holterman, M.J., Hogan, P.P. y Engelhard, V.H. "The ability of CTL to recognize HLA-A2.1 or HLA-B7 antigens expressed on murine cells correlates with their epitope specificity". *J.Immunol.* 139:3614 (1987).
- 174.- Heath, W.R., Hurd, M.E., Carbone, F. y Sherman, L.A. "Peptide dependent recognition of H-2K^b by alloreactive CTL". *Nature* 341:749 (1989).
- 175.- Cerundolo, V., Alexander, J., Anderson, K., Lamb, C., Cresswell, P., McMichael, A., Gotch, F. y Townsend, A. "Presentation of viral antigen controlled by a gene in the MHC". *Nature* 345:449 (1990).
- 176.- Hosken, N.A. y Bevan, M.J. "Defective presentation of endogenous antigen by a cell line expressing class I molecules". *Science* 248:367 (1990).
- 177.- Townsend, A., Öhlén, C., Bastin, J., Ljunggren, H.G., Foster, L. y Kärre, K. "Association of class I major histocompatibility heavy and light chains induced by viral peptides". *Nature* 340:443 (1989).
- 178.- Schumacher, T.N.M., Heemels, M.T., Neefjes, J.J., Kast, W.M., Melief, C.J. y Ploegh, H.L. "Direct binding of peptide to empty MHC class I molecules on intact cells and in vitro". *Cell* 62:563 (1990).
- 179.- Heath, W. R., Kane, K.P., Mescher, M.F. y Sherman, L.A. "Alloreactive T cells discriminate among a diverse set of endogenous peptides". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:5101 (1991).
- 180.- Rötzschke, O., Falk, K., Faath, S. y Rammensee, H.G. "On the nature of peptides involved in T cell alloreactivity". *J. Exp. Med.* 174:1054 (1991).

- 181.- Alexander-Miller, M.A., Burke, K., Koszinowski, U., Hansen, T.H. y Connolly, J.M. "Alloreactive CTL generated in the presence of viral-derived peptides show exquisite peptide and MHC-specificity". *J.Immunol.* 151:1 (1993).
- 182.- López de Castro, J.A. "HLA-B27 and HLA-A2 subtypes: structure, evolution and function". *Immunol.Today* 10:239 (1989).
- 183.- Choo, S.Y., Fan, L.A. y Hansen, J.A. "A novel HLA-B27 allele maps B27 allospecificity to the region around position 70 in the α 1 domain". *J. Immunol.* 147:174 (1991).
- 184.- Brewerton, D.A., Caffrey, M., Hart, F.D., James, D.C.O., Nichols, A. y Sturrock, R.D. "Ankylosing spondylitis and HLA-27". *Lancet* i:904 (1973).
- 185.- Schlosstein, L., Terasaki, P.I., Bluestone, R. y Pearson, C.M. "High association of HLA antigen, W27, with ankylosing spondylitis". *N.Engl.J.Med.* 288:704 (1973).
- 186.- Breuer-Vriesendorp, B.S., Dekker-Saeys, A.J. y Iványi, P. "Distribution of HLA-B27 subtypes in patients with AS: the disease is associated with a common determinant of the various B27 molecules". *Ann.Rheum.Dis.* 46:353 (1987).
- 187.- Hill, A.V., Allsopp, C.E., Kwiatkowski, D., Anstey, N.M., Greenwood, B.M. y McMichael, A.J. "HLA class I typing by PCR: HLA-B27 and an african B27 subtype". *Lancet* 337:640 (1991).
- 188.- Gilliland, B.C. *Harrison's Principles of Internal Medicine* (11th Edn) 1434, McGraw Hill.
- 189.- Hammer, R.E., Maika, S.D., Richardson, J.A., Tang, J.P. y Taurog, J.D. "Spontaneous Inflammatory disease in transgenic rats expressing HLA-B27 and human β_2m : An animal model of HLA-B27 associated human disorders". *Cell* 63:1099 (1990).
- 190.- Taurog, J.D, Maika, S.D., Simmons, W.A., Breban, M. y Hammer, R.E. "Susceptibility to inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rat lines correlates with the level of B27 expression". *J.Immunol.* 150:4168 (1993).
- 191.- Oldstone, M.B.A. "Molecular mimicry and autoimmune disease". *Cell* 50:819 (1987).
- 192.- Calvo, V., Rojo, S., López, D., Galocha, B. y López de Castro, J.A. "Structure and diversity of HLA-B27-specific T cell epitopes. Analysis with site-directed mutants mimicking HLA-B27 subtype polymorphism". *J. Immunol.* 144:4038 (1990).
- 193.- López, D., Barber, D.F., Villadangos, J.A. y López de Castro, J.A. "Cross-reactive T cell clones from unrelated individuals reveal similarities in peptide presentation between HLA-B27 and HLA-DR2". *J.Immunol.* 150:2675 (1993).
- 194.- De Vries, J. E. y Spits, H. "Cloned human cytotoxic T lymphocyte (CTL) lines reactive with autologous melanoma cells. I. In Vitro generation, isolation, and analysis to phenotype and specificity". *J. Immunol.* 132:510 (1984).
- 195.- Carrera, A. C., Sanchez-Madrid, F., López-Botet, M., Bernabeu, C., y Ortíz de Landazuri, M. "Involvement of the CD4 molecule in a post-activation event on T cell proliferation". *Eur. J. Immunol.* 17:179 (1987).

- 196.- Malissen, B., Rebai, N., Liabeuf, A. y Mawas, C. "Human cytotoxic T cell structures associated with expression of cytolysis. Analysis as the clonal cell level of the cytolysis-inhibiting effect of 7 monoclonal antibodies". *Eur. J. Immunol.* 12:739 (1982).
- 197.- Barnstable, C. J., Bodmer, W.F., Brown, G., Galfre, G., Milstein, C y Williams, A.F. "Production of monoclonal antibodies to Group A erythrocytes, HLA and other human cell surface antigens. New tools for genetic analysis". *Cell* 14:9 (1978).
- 198.- Colombani, J., Lepage, V. y Kalil, J. "HLA monoclonal antibody registry: second listing". *Tissue Antigens* 22:97 (1983).
- 199.- Ellis, S.A., Taylor, C. y McMichael, M. "Recognition of HLA-B27 and related antigens by a monoclonal antibody". *Hum. Immunol.* 5:49 (1982).
- 200.- Lampson, L. A., y Levy, R. "Two populations of Ia-like molecules on a human B cell line". *J. Immunol.* 125:293 (1980).
- 201.- Watson, A. J., DeMars, R., Trowbridge, I.S. y Bach, H.F. "Detection of a novel human class II antigen". *Nature* 304:358 (1983).
- 202.- Brodsky, F. M., Parham, R. y Bodmer, W.F. "Monoclonal antibodies to HLA-DRw determinants". *Tissue Antigens* 16:30 (1980).
- 203.- Jaraquemada, D., Martí, M., Martín, R., Wagner, A., McFarland, H.F. y Rosen-Bronson, S. "Influence of ICAM-1/LFA-1 adhesion in self-restricted antigen recognition and allorecognition by class II-specific T cell clones". *Eur.J.Immunol.* en prensa (1993).
- 204.- Guillis, S., Fern, M.N., Ou, W. y Smith, K.A. "T cell growth factor: parameters of production and quantitative microassay for activity". *J.Immunol.* 120:2027 (1978).
- 205.- Guillis, S. y Smith, K.A. "Long term culture of tumor-specific CTL". *Nature* 268:154 (1977).
- 206.- Kristensen, H. "Human histocompatibility testing by T cell mediated lympholysis, a European standard CML technique". *Tissue Antigens* 16:335 (1980).
- 207.- Reiss, C.S., Hemler, M.E., Engelhard, V.H., Mier, J.W., Strominger, J.L. y Burakoff, S.J. "Development and characterization of allospecific long-term human CTL lines". *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 77:5432 (1980).
- 208.- Aparicio, P., Jaraquemada, D., Rojo, S. y López de Castro, J.A. "Clonal heterogeneity of HLA-B27 cellular allorecognition. Delineation of immunodominant sites". *Eur. J. Immunol.* 18:203 (1988).
- 209.- Pazmany, L., Rowland-Jones, S., Huet, S., Hill, A., Sutton, J., Murray, R., Brooks, J. y McMichael, A. "Genetic modulation of antigen presentation by HLA-B27 molecules". *J.Exp.Med.* 175: 361 (1992).
- 210.- Jaraquemada, D., Galocha, B., Aparicio, P., Rojo, S., Calvo, V. y López de Castro, J.A. "Modulation on immunogenicity by HLA-B27 subtype polymorphism". *Eur.J.Immunol.* 18:1945 (1988).

- 211.- Breur-Vriesendorp, B.S., Dekker, A.J., Breuning, M. y Iványi, P. "Subtypes of antigen HLA-B27 (B27W and B27K) defined by cytotoxic T lymphocytes: identification of a third subtype (B27C) prevalent in Oriental populations". In *Advances in Inflammation Research*. Vol 9: Spondylarthropathies. M. Ziff and S.B. Cohen. eds. Raven Press, New York. P.55 (1985).
- 212.- Breur-Vriesendorp, B.S., Neefjes, J.C., Huis, B., van Seventer, G.A., Ploegh, H.L. y Iványi, P. "Identification of new B27 subtypes (B27C and B27D) prevalent in Oriental populations". *Hum. Immunol.* 16:163 (1986).
- 213.- Aparicio, P., Rojo, S., Jaraquemada, D. y López de Castro, J.A. "Fine specificity of HLA-B27 cellular allorecognition. HLA-B27f is a functional variant distinguishable by cytolytic T cell clones". *J.Immunol.* 139:837 (1987).
- 214.- Toubert, A., Gomard, E., Grumet, F.C., Amor, B., Muller, J.Y. y Levy, J.P. "Identification of several functional subgroups of HLA-B27 by restriction of the activity of antiviral T killer lymphocytes". *Immunogenetics* 20:513 (1984).
- 215.- Benjamin, R.J. y Parham, P. "Guilt by association: HLA-B27 and ankylosing spondylitis". *Immunol.Today* 11:137 (1990).
- 216.- Brooks, J.M., Murray, R.J., Thomas, W.A., Kurilla, M.G. y Rickinson, A.B. "Different HLA-B27 subtypes present the same immunodominant EBV peptide". *J.Exp.Med.* 178:879 (1993).
- 217.- Breur-Vriesendorp, B.S., Vingerhoed, J., Schaasberg, W.P. y Iványi, P. "Variations in the T-cell repertoire against HLA antigens in humans". *Human Immunol.* 27:1 (1990).
- 218.- Villadangos, J.A., Galocha, B., López, D., Calvo, V. y López de Castro, J.A. "The role of binding pockets for amino-terminal peptide residues in HLA-B27 allorecognition". *J.Immunol.* 149:505 (1992).
- 219.- López, D., Rojo, S., Calvo, V. y López de Castro, J.A. "Peptide-presenting similarities among functionally distant HLA-B27 subtypes revealed by alloreactive T lymphocytes of unusual specificity". *J.Immunol.* 148:996 (1992).
- 220.- López, D., García-Hoyo, R., García, F. y López de Castro, J.A. "T cell allorecognition and endogenous HLA-B27-bound peptides in a cell line with defective HLA-B27-restricted antigen presentation" (submitted).
- 221.- Aparicio, P., Jaraquemada, D. y Lopez de Castro, J.A. "Alloreactive cytolytic T cell clones with dual recognition of HLA-B27 and HLA-DR2 antigens. Selective involvement of CD8 in their class I-directed cytotoxicity". *J.Exp.Med.* 165:428 (1987).
- 222.- Brown, J. R., Jardetzky, T., Saper, M.A., Samraoui, B., Bjorkman, P.J. y Wiley, D.C. "A hypothetical model of the foreign antigen binding site of class II histocompatibility molecules". *Nature* 332:845 (1988).
- 223.- Wilson, K.E., Ball, E., Stasny, P. y Capra, J.D. "Allorecognition of HLA DR2 and DR5 molecules by V β 8-positive T-cell clones". *Scand.J.Immunol.* 33:131 (1991).
- 224.- Sette, A., Vitiello, A., Farness, P., Furze, J., Sidney, J., Claverie, J.M., Grey, H.M. y Chesnut, R. "Random association between the peptide repertoire of A2.1 class I and several different

- DR class II molecules". *J.Immunol.* 147:3893 (1991).
- 225.- Perkins, D.L., Lai, M.Z., Smith, J.A. y Geftter, M.L. "Identical peptides recognized by MHC class I- and II-restricted T cells". *J.Exp.Med.* 170:279 (1989).
- 226.- Perkins, D.L., Berriz, G., Wang, Y.S., Smith, J.A. y Geftter, M.L. "Comparison of class I- and II-restricted T cell recognition of the identical peptide". *Eur.J.Immunol.* 21:2781 (1991).
- 227.- Takahashi, H., Germain, R.N., Moss, B. y Berzofsky, J.A.. "An immunodominant class I-restricted cytotoxic T lymphocyte determinant of human immunodeficiency virus type 1 induces CD4 class II-restricted help for itself". *J.Exp.Med.* 171:571 (1990).
- 228.- Carreño, B.M., Turner, R.V., Biddison, W.E. y Coligan, J.E. "Overlapping epitopes that are recognized by CD8⁺ HLA class I-restricted and CD4⁺ class II-restricted cytotoxic T lymphocytes are contained within an influenza nucleoprotein peptide". *J.Immunol.* 148:894 (1992).
- 229.- Nazirov, P.K. y Pospelov, L.E. "HLA antigens in patients with osteoarticular tuberculosis and chronicle hematogenic osteomyelitis". *Orthop.Travmatol.Protez.* 26:9 (1991).
- 230.- Robinson, W.P., van der Linden, S.M., Khan, M.A., Rentsch, H.U., Cats, A., Russell, A. y Thomson, G. "HLA-Bw60 increases susceptibility to ankylosing spondylitis in HLA-B27⁺ patients". *Arth. and Rheum.* 32:1135 (1989).
- 231.- Chien, Y.H. y Davis, M. "How $\alpha\beta$ T-cell receptors see peptide/MHC complex". *Immunol. Today* 14:597 (1993).
- 232.- Sherman, L.A. y Maleckar, J.R. "Genetic and environment regulation of the cytolytic T-lymphocyte receptor repertoire specific for alloantigen". *Immunol.Rev.* 101:115 (1988).
- 233.- Rojo, S., García, F., Villadangos, J.A. y López de Castro, J.A. "Changes in the repertoire of peptides bound to HLA-B27 subtypes and to site-specific mutants inside and outside pocket B". *J.Exp.Med* 177:613 (1993).