

TESIS DOCTORAL

C. SUSANA ROJO GOZALO



\* 5 3 0 9 5 8 3 3 2 9 \*

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

**BASES MOLECULARES DE LA ANTIGENICIDAD DE HLA-B27:  
ESTUDIOS CON PEPTIDOS SINTETICOS, VARIANTES NATURALES  
Y MUTAGENESIS DIRIGIDA.**

**DIRECTOR: DR. D. JOSE ANTONIO LOPEZ DE CASTRO**

**DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS  
PROFESOR DE INVESTIGACION DEL C.S.I.C.  
DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGIA  
FUNDACION JIMENEZ DIAZ**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA  
MADRID, 1991**

V<sup>o</sup> B<sup>o</sup>

*J. A. Lopez de Castro*

*C. Susana Rojo*

# FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ

CLINICA DE NUESTRA SEÑORA DE LA CONCEPCION

Avda. Reyes Católicos, 2 (Ciudad Universitaria)  
28040-MADRID

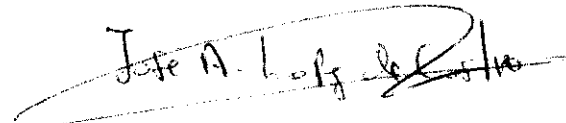
TELEFONOS:  
2441600 2441700  
2440100 5491007  
5491100  
FAI-5494764

José Antonio López de Castro Alvarez, Doctor en Ciencias y Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

CERTIFICO que C. Susana Rojo Gozalo, Licenciada en Ciencias Biológicas, ha llevado a cabo bajo mi dirección el trabajo que se expone en la presente Tesis Doctoral titulada: "Bases moleculares de la antigenicidad de HLA-B27: Estudios con péptidos sintéticos, variantes naturales y mutagénesis dirigida".

Y para que conste donde proceda firmo la presente.

Madrid, 15 de febrero de 1991.

A handwritten signature in black ink, reading "José A. López de Castro", written over a horizontal line.

Fdo.: José Antonio López de Castro.

**A mis padres**

Quiero expresar mi agradecimiento a todas las personas que han contribuido a que la realización de esta Tesis Doctoral fuera posible. Gracias Jose Antonio por todo lo que he aprendido a lo largo de estos años. Gracias Dr. Ortiz Masllorens que hizo posible que pudiera trabajar en este laboratorio. Gracias a todos mis compañeros del lab 5: Angel y Miguel, que siempre estuvieron dispuestos a echarme una mano; Rafa y Victor que me enseñaron muchas cosas durante el tiempo que estuve trabajando con ellos; Nieves y Raúl, compañeros de fatigas durante todos estos años. Gracias a los que ya se fueron: Dolores, Jesús, José Luis y Kiko; a los que todavía continúan Begoña, Daniel, Jose Alberto y Pilar y a los que empiezan ahora: Domingo, Fernando y Rosa. Gracias al resto del laboratorio, especialmente a los vecinos del lab 4.

Gracias Luis por tu ayuda y comprensión en todo momento, especialmente durante el tiempo que he tardado en escribir esta Tesis. Gracias M<sup>a</sup> Aurelia y Oscar por vuestro apoyo constante.

Por último quiero agradecer al Dr. J. Gavilanes el haber aceptado ser el tutor de esta Tesis.

1.-	INTRODUCCION	1
1.1.	El sistema principal de histocompatibilidad.	1
1.2.	Organización genética del MHC y estructura de los genes de clase I.	2
1.3.	Estructura tridimensional de los antígenos HLA.	5
1.3.1.-	HLA-A2.	5
1.3.2.-	HLA-Aw68.	8
1.4.-	Polimorfismo de los antígenos de Clase I.	8
1.5.-	Subtipos naturales de los antígenos HLA.	15
1.6.-	Determinantes serológicos de los antígenos HLA.	15
1.6.1.-	Caracterización de determinantes serológicos mediante péptidos sintéticos.	16
1.6.2.-	Reactividad de anticuerpos anti-HLA con variantes naturales y mutantes.	17
1.7.-	Residuos implicados en el reconocimiento por CTL.	18
1.7.1.-	Variantes naturales.	18
1.7.2.-	Mutantes.	19
1.8.-	Evolución de los antígenos MHC.	20
1.9.-	HLA-B27.	23
1.9.1.-	Detección de los subtipos de HLA-B27.	24
1.9.1.1.-	Subdivisión de B27 con Acm.	24
1.9.1.2.-	Reactividad de B27 con CTL alogénicos.	24
1.9.1.3.-	Comportamiento de B27 en sistemas de restricción.	24
1.9.1.4.-	Patrón de los subtipos de B27 en electroenfoque.	25
1.9.2.-	Frecuencia de los subtipos de B27 y distribución étnica.	25
1.9.3.-	Análisis estructural de los subtipos de B27.	28
1.9.4.-	Localización de los determinantes serológicos de HLA-B27.	29
1.9.5.-	Epítomos de HLA-B27 reconocidos por CTL.	29
1.9.6.-	Asociación entre HLA-B27 y la espondilítis anquilosante.	31
1.10.-	Papel de los antígenos MHC en el reconocimiento por la célula T.	33
1.10.1.-	Receptor del antígeno de la célula T.	33

1.10.2.- Reconocimiento del complejo MHC/péptido por el TCR.	34
1.10.3.- Reconocimiento restringido: presentación de péptidos	35
1.10.4.- Reconocimiento alorreactivo.	39
1.11.- Moléculas de adhesión.	41
1.12.- Reconocimiento de antígenos MHC en transfectantes murinos.	45
2.- OBJETIVOS.	47
3.- MATERIALES Y METODOS.	49
3.1.- Líneas celulares.	49
3.2.- Linfocitos T citolíticos anti-B27.	49
3.3.- Anticuerpos monoclonales.	51
3.4.- Citotoxicidad mediada por complemento.	51
3.4.1.- Inhibición de la citotoxicidad por péptidos libres o conjugados péptido-proteína portadora.	54
3.4.2.- Inhibición de la citotoxicidad por Acm.	54
3.5.- Citotoxicidad mediada por CTL.	54
3.5.1.- Inhibición de la citotoxicidad por Acm.	55
3.6.- Papel de la región hipervariable 63-84 en la aloespecificidad serológica de HLA-B27: Generación de anticuerpos contra el péptido sintético 63-84.	55
3.6.1.- Síntesis de péptidos.	55
3.6.2.- Acoplamiento péptido-proteína portadora.	55
3.6.3.- Análisis de aminoácidos.	56
3.6.4.- Inmunización de animales.	57
3.6.5.- Detección de anticuerpos.	57
3.7.- Caracterización estructural de los subtipos de B27.	58
3.7.1.- Marcaje metabólico.	58
3.7.2.- Purificación de las cadenas pesadas de HLA-B27.	58
3.7.3.- Mapas peptídicos.	60
3.7.4.- Digestiones adicionales de los péptidos: proteasa V8 y quimotripsina	62
3.7.5.- Análisis de secuencia de los péptidos.	63
3.7.6.- Electroenfoque de HLA-B27.	63

3.8.-	Mutagénesis dirigida de HLA-B27.	63
3.8.1.-	Endonucleasas de restricción.	63
3.8.2.-	Preparación de oligonucleótidos mutagénicos.	64
3.8.3.-	Construcción de mutantes.	64
3.8.4.-	Transformaciones bacterianas y detección de colonias portadoras de la mutación.	68
3.8.5.-	Obtención del DNA del plásmido.	69
3.8.6.-	Southern blot.	70
3.8.7.-	Secuenciación del DNA.	70
3.9.-	Transfección y expresión de genes de HLA-B27.	72
3.9.1.-	Transfección en células humanas.	72
3.9.2.-	Transfección en células murinas.	72
3.9.3.-	Citometría de flujo.	73
4.-	RESULTADOS	74
4.1.-	Papel de los residuos 63-84 en la aloespecificidad serológica de HLA-B27: Generación de anticuerpos contra el péptido 63-84.	74
4.1.1.-	Especificidad de los anticuerpos generados contra el péptido 63-84.	74
4.1.2.-	Reconocimiento de B27 por el antisuero anti-péptido.	74
4.1.3.-	Especificidad de los anticuerpos generados frente al péptido 63-84.	77
4.1.4.-	Especificidad de los anticuerpos anti-péptido frente a B27.	79
4.1.5.-	Discusión.	79
4.2.-	Caracterización estructural de subtipos de B27.	84
4.2.1.-	Análisis estructural del subtipo B*2701	84
4.2.2.-	Análisis estructural del subtipo B*2703.	100
4.2.3.-	Los subtipos B27b y B27c son indistinguibles entre sí y de B*2704	119
4.2.4.-	Discusión: Evolución del polimorfismo de HLA-B27.	119
4.3.-	Reactividad de CTL alorreactivos anti-B27 con transfectantes murinos.	129
4.3.1.-	Transfección de HLA-B27 en células murinas.	129
4.3.2.-	Especificidad y avidéz de los CTL alorreactivos anti-B27.	131
4.3.3.-	Análisis de la reactividad de los CTL humanos con transfectantes murinos.	131

4.3.4.-	Inhibición de la citotoxicidad de los transfectantes por Acm anti-CD8.	134
4.3.5.-	Discusión.	134
4.4.-	Análisis de la reactividad de CTL alorreactivos con mutantes de B27.	137
4.4.1.-	Construcción de mutantes.	137
4.4.2.-	Especificidad de los CTL con los subtipos de B27 y otros aloantígenos.	138
4.4.3.-	Diversidad clonal.	131
4.4.4.-	Complejidad de los epítomos. Cambios compensatorios.	141
4.4.5.-	Significado de los cambios individuales.	144
4.4.6.-	Efecto diferencial de las sustituciones en una posición o en posiciones cercanas espacialmente.	144
4.4.7.-	Reactividad heteroclítica.	146
4.4.8.-	Asimetría en la localización de las posiciones que afectan al alorreconocimiento.	146
4.4.9.-	Discusión.	148
4.5.-	Conservación y alteración de los epítomos reconocidos por CTL anti-HLA-B27 en células murinas.	152
4.5.1.-	Reconocimiento de HLA-B27 por CTL alorreactivos en células humanas y murinas.	152
4.5.2.-	Conservación de los epítomos reconocidos por CTL aloespecíficos, tras la expresión de HLA-B27 en células murinas.	155
4.5.3.-	Alteración de la especificidad del CTL 5A2 frente a HLA-B27 expresado en células murinas.	158
4.5.4.-	Discusión.	162
5.-	SUMARIO Y DISCUSION	167
6.-	CONCLUSIONES.	174
7.-	BIBLIOGRAFIA	177

**ABREVIATURAS**

aa	Aminoácido
Acm	Anticuerpo monoclonal
APC	Célula presentadora de antígeno
AS	Espondilitis anquilosante
ATP	Adenosín trifosfato
$\beta_2m$	$\beta_2$ -microglobulina
BSA	Albúmina de suero bovino
CTL	Linfocito T citolítico
CDR	Región determinante de la complementariedad
CPM	Cuentas por minuto
DNA	Acido desoxirribonucleico
DMEM	"Dulbecco's Modification of Eagle's Medium"
DMF	Dimetil formamida
DPM	Desintegraciones por minuto
DTT	Ditiotreitol
EBV	Virus de Epstein-Barr
ELISA	Enzimoimmunoensayo
EDTA	Acido etilén-diamino-tetra-acético
H-2	MHC murino
HLA	MHC humano
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulinas
Kb	Kilobase
Kd	Kilodalton
KLH	Hemocianina de lapa
LCL	Línea celular linfoblástica
MBS	Ester maleimido-benzoyl-N-hydroxy-succinimida
MHC	Sistema principal de histocompatibilidad

NK	"Natural killer"
NP-40	Nonidet P-40
OVA	Ovoalbúmina
PM	Peso molecular
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PKC	Proteín-quinasa C
PAPA	p-amino-fenil-acético
PMSF	fluoruro de fenilmetil-sulfonilo
Prot A	Proteína A de <i>Staphilococcus aureus</i>
RE	Retículo endoplásmico
RFLP	Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción
SDS	Dodecil sulfato sódico
STFi	Suero de ternera fetal inactivado
TA	Temperatura ambiente
TCR	Receptor del antígeno de la célula T
TPCK-tripsina	Tripsina tratada con N-tosil-L-fenilalanil-clorometil cetona
TLC	Cromatografía en capa fina
Tm	Temperatura de fusión

## **1.- INTRODUCCION**

## 1.1. EL SISTEMA PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD

El Sistema Principal de Histocompatibilidad (MHC) está constituido por un conjunto de loci, estrechamente ligados, codificantes de un grupo de moléculas que contribuyen al reconocimiento de antígenos por los linfocitos T (1,2). El término histocompatibilidad hace referencia a que estas moléculas son las responsables del rechazo de los transplantes de tejidos, debido a la generación, por parte del huésped, de respuestas de linfocitos B y T dirigidas contra los antígenos MHC no propios (3). Este complejo parece estar presente en todos los Vertebrados, aunque la mayor parte de los estudios se han centrado en los sistemas murino (H-2) y humano (HLA). Entre las proteínas codificadas por el MHC se incluyen dos tipos de moléculas: las de Clase I y las de Clase II, que difieren en sus características funcionales, serológicas y estructurales, así como en su distribución tisular. Los antígenos de Clase I están constituidos por dos cadenas polipeptídicas, unidas no covalentemente: la cadena pesada, que es una glicoproteína de unos 350 aminoácidos, con un PM de 44 Kd y la cadena ligera, denominada  $\beta_2$ -microglobulina ( $\beta_2m$ ), que consta de 100 aminoácidos y posee un PM de 12 Kd (4,5). La cadena pesada es altamente polimórfica, mientras que la ligera es invariante en humanos. La cadena pesada se divide en tres regiones: extracelular que incluye 280 aminoácidos (aa), transmembrana (25 aa) e intracitoplásmica (30 aa). La porción extracelular consta de tres dominios:  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  y  $\alpha_3$ , cada uno de los cuales está constituido por 90 aa aproximadamente (6). El dominio  $\alpha_1$  se encuentra en la región N-terminal y posee una porción glicídica de 3,3 Kd, unida por un enlace N-glicosídico a la Asn 86 (7). En ratón existe un sitio adicional de glicosilación en el residuo N176, y en algunos casos un tercero en N256 (8). Los dominios  $\alpha_2$  y  $\alpha_3$  contienen un puente disulfuro intracatenario entre las Cys 101-164 y 203-259, respectivamente (9). Los dominios  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  poseen una débil homología entre sí pero no con  $\alpha_3$ . A su vez,  $\alpha_3$  es considerablemente homólogo a los dominios constantes de las inmunoglobulinas. La región transmembrana es de naturaleza apolar y abarca los residuos 281-307. La región intracitoplásmica se extiende entre los residuos 309-340, aunque su longitud puede variar en diferentes antígenos, y está constituida mayoritariamente por aminoácidos hidrofílicos (10). En su región C-terminal posee un grupo de aminoácidos básicos que probablemente interaccionan con los grupos fosfato de los fosfolípidos de membrana. Esta región contiene residuos, como la Ser en posición 335, susceptibles de fosforilación (11,12) y se ha implicado en la interacción con el citoesqueleto (13) y en la internalización de la molécula (14).

La  $\beta_2m$  presenta una considerable homología con  $\alpha_3$  y los dominios constantes de las inmunoglobulinas (15,16). La asociación entre la cadena pesada y la  $\beta_2m$  es indispensable para la expresión de la molécula en la superficie celular (17).

Existen 3 loci que codifican antígenos de Clase I, denominados A, B y C en humanos y D, K y L en ratón (18). Se han descrito otros loci, cuyos productos pueden asociarse con la  $\beta_2m$ , denominados E, F y G en humanos (19) y Qa y TLa en ratón (20), aunque no está claro si son moléculas equivalentes en ambas especies. Los antígenos HLA-A,B,C están presentes en todas las células somáticas y constituyen menos del 1% de las proteínas de membrana, existiendo diferencias cuantitativas dependiendo del tejido. En fibroblastos y células del sistema nervioso se encuentran en baja proporción, mientras su concentración es relativamente alta en células pertenecientes al sistema inmune (linfocitos B y T, y macrófagos).

Los antígenos de Clase II constan de dos cadenas:  $\alpha$  con un PM de 33-35 Kd y  $\beta$  de PM 26-29 Kd (21). Ambas están insertadas en la membrana celular y presentan un sitio de glicosilación en una posición equivalente. Cada una de ellas consta de dos dominios extracelulares ( $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  o  $\beta_1$  y  $\beta_2$ ), una región transmembrana, conectada a los anteriores por un péptido hidrofílico, y un segmento intracitoplásmico, que termina en un grupo de aminoácidos cargado positivamente.  $\beta_1$  posee un puente disulfuro intracatenario entre los residuos 15 y 79, mientras que  $\alpha_1$  no contiene Cys. Los dominios  $\alpha_2$  y  $\beta_2$  tienen una fuerte homología de secuencia con las inmunoglobulinas. En ratón existen dos subregiones de Clase II: I-A e I-E, mientras que en humanos se han definido tres: DR, DP y DQ (22). Las cadenas  $\beta$  de estos antígenos son polimórficas, mientras que las  $\alpha$  poseen un grado de polimorfismo variable. La distribución de estas moléculas es más restringida que las de Clase I, expresándose en macrófagos, linfocitos B y linfocitos T activados en algunas especies, aunque su expresión puede inducirse por interferon- $\tau$  (IFA- $\tau$ ) en muchos otros tipos celulares. En general, no se hará ulterior mención a los antígenos de clase II ya que los objetivos de esta tesis se han centrado en el estudio de los antígenos de clase I.

## **1.2. ORGANIZACION GENETICA DEL MHC Y ESTRUCTURA GENERAL DE LOS GENES DE CLASE I**

El complejo MHC está localizado en el brazo corto del cromosoma 6 en humanos y en el cromosoma 17 en ratón. El gen que codifica la  $\beta_2m$  se encuentra en el cromosoma 15 en humanos y en el 2 en ratón. El MHC humano comprende un segmento cromosómico de

aproximadamente 3500 Kb, incluyendo 1600 Kb la región de Clase I, 900 Kb la de clase II y 1200 Kb el segmento comprendido entre ambas (23,24). Existen de 17 a 20 loci de Clase I y al menos 15 genes de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de Clase II (25). En cuanto a su disposición, se ha determinado mediante análisis de haplotipos HLA recombinantes que los loci de Clase I (HLA-A, B y C) están situados en una región más cercana al telómero que los de Clase II. La región que se extiende entre los genes HLA-DR y HLA-B abarca un conjunto de genes, que incluyen los que codifican ciertas proteínas del Sistema del Complemento (también denominados antígenos de Clase III): C4A, C4B, Bf y C2, y los genes de la 21-hidroxilasa (21-OHA y 21-OHB), TNF $\alpha$  y  $\beta$ , B144, HSP70 ("heat shock protein"), RD y BAT 1-9 (transcritos asociados al locus HLA-B) (23,24,26,27). La disposición de estos genes se muestra en la Fig. 1. Los loci B y C están separados por 130 Kb y los loci A y C por 600 Kb, aproximadamente (23). Mediante análisis de ligamiento se determinó un mapa físico de esta región que proponía una distancia de 3.2 cM entre HLA-A y HLA-DP. HLA-A, B y C están contenidos en un segmento de 1cM, siendo la distancia de B a C de 0,2 cM y la de C a A de 0,8 (19).

Los genes que codifican los antígenos de clase I constan de 8 exones (en algunos antígenos 7) separados por 7 intrones (28,29). El primer exón codifica una región 5' de 18 nucleótidos, aproximadamente, que no se traduce en los genes humanos, seguida de los codones que codifican los 24 aminoácidos del péptido señal. Los exones 2 (270 nucleótidos), 3 y 4 (276 nucleótidos) codifican los dominios  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  y  $\alpha_3$ , respectivamente. El exón 5 (117 nucleótidos) codifica el segmento transmembrana y las regiones que lo flanquean, incluyendo 5 aminoácidos hidrofílicos que forman parte del segmento intracitoplásmico. Los exones 6 (33 nucleótidos) y 7 (48 nucleótidos) codifican el resto de los aminoácidos intracitoplásmicos. El exón 8 es el de mayor tamaño (cerca de 400 nucleótidos) pero sólo contiene dos nucleótidos codificantes en su extremo 5', que junto con el último nucleótido del exón 7 forman el codón del último aminoácido de la molécula. A continuación, presenta la señal de terminación, codificando el resto del exón el segmento 3' no traducido que incluye la señal de poliadenilación AATAAA (30). En algunos antígenos, como B7, B27 y Bw58 el codón de terminación se halla en el exón 7 (29,31,32). La comparación de distintas secuencias muestra una alta variabilidad en el extremo 5' del gen (exones 1 a 3) y una relativa conservación en el extremo 3'. Los intrones de diferentes genes exhiben una baja homología, sobre todo cuando se comparan distintas especies, constituyendo una posible excepción los extremos 5' de los intrones 1, 3 y 4 (29).

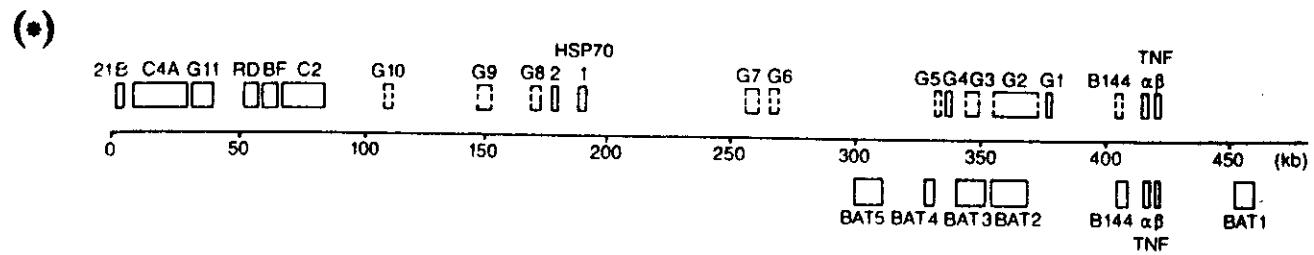
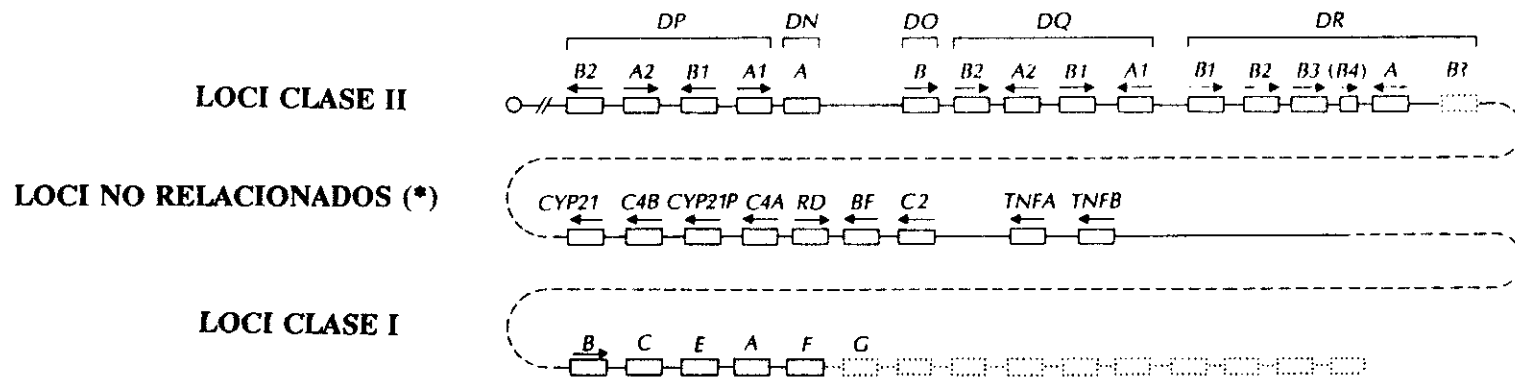


Figura 1. Organización genética del MHC. (\*) Detalle correspondiente a la región de los loci no relacionados.

Las secuencias de iniciación de la transcripción "CAT box" y "TATA box" se encuentran a una distancia del extremo 5' del primer exón de 80 y 55 pb, respectivamente (33). Los genes murinos presentan la secuencia TATAAA clásica, al igual que el antígeno HLA-E (34). Sin embargo, los otros genes humanos, incluyendo los antígenos HLA-F y G, poseen en su lugar la secuencia TCTAAA (29,34). En Cw3 la primera A de esta secuencia se halla sustituido por una G. La transcripción de los genes de Clase I está controlada por varios elementos reguladores, situados en la región promotora: ICS ("IFN consensus sequence"), descrita en algunos genes de Clase I y Clase II, así como en el gen de  $\beta_2m$ , controla la inducción de genes de clase I en respuesta a IFN (35); "enhancer A" o CRE ("Class I regulatory element") (36-38) y "enhancer B", descrito en el sistema murino (39). CRE une dos factores nucleares que están involucrados en el aumento de la transcripción: H2TF1 y KBF1 (40). Esta actividad "enhancer" se observa en células que expresan altos niveles de genes de Clase I. Existen datos que muestran la existencia de regulación génica de los genes de Clase I durante el desarrollo embrionario, en distintos tejidos y en respuestas a varias linfocinas y virus.

### 1.3. ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE LOS ANTIGENOS HLA

#### 1.3.1. HLA-A2

Bjorkman et al. (41,42) determinaron la estructura tridimensional de la porción extracelular (dominios  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  y  $\beta_2m$ ) del antígeno HLA-A2 procedente de la línea linfoblástica (LCL) JY (HLA-A2, B7), por difracción de rayos X. Los resultados mostraron que los dominios  $\alpha_3$  y  $\beta_2m$  están próximos a la membrana celular, probablemente con una orientación horizontal. Ambos tienen una estructura similar y constan de dos láminas  $\beta$  antiparalelas, conectadas por puentes disulfuro, una compuesta por 4 cadenas  $\beta$  y la otra por 3 (Fig. 2A). Aunque su estructura es semejante a la de los dominios de inmunoglobulinas (Ig) presentan un apareamiento diferente.  $\alpha_3$  y  $\beta_2m$  están conectados a través de la lámina  $\beta$  de 4 cadenas pero se disponen formando un ángulo de  $146^\circ$ , con un desplazamiento adicional de la  $\beta_2m$ , hacia  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ , de  $13 \text{ \AA}$ . Sin embargo, los dominios constantes de Ig forman un ángulo de  $180^\circ$ .  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  poseen una estructura prácticamente idéntica y se hallan relacionadas por un eje de simetría binario. Su región N-terminal está plegada formando una lámina  $\beta$  antiparalela, constituida por 4 cadenas  $\beta$ , mientras que la C-terminal tiene una configuración de hélice  $\alpha$  (Fig. 2A). En  $\alpha_1$  la región helicoidal consta de una hélice pequeña (residuos 50-55), seguida por una hélice  $\alpha$  curvada de mayor



tamaño (58-84), dispuestas con un ángulo de  $110^\circ$ . En  $\alpha_2$  también hay una hélice de menor tamaño (138-148) que precede a la mayor (151-173), formando un ángulo de  $130^\circ$ . La hélice principal está girada en el residuo 162. Este dominio posee, además, otra hélice corta (177-180) en la zona de conexión con  $\alpha_3$  (Fig.2B). El residuo 101, localizado en la cadena  $\beta$  N-terminal de  $\alpha_2$ , está conectado por un puente disulfuro con el residuo 164, situado en la hélice  $\alpha$  de mayor tamaño. Las 8 cadenas  $\beta$  de los dominios  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  están agrupadas simétricamente formando una única lámina  $\beta$  antiparalela. Las dos hélices  $\alpha$  atraviesan esta plataforma por su parte superior y están separadas en su parte central por una distancia de  $18 \text{ \AA}$  (Fig. 2C y D). Estos dos dominios están conectados por puentes de hidrógeno entre las cadenas  $\beta$  N-terminales, situadas en el centro de la lámina, y por contactos entre la región C-terminal de cada hélice  $\alpha$  y residuos de la lámina  $\beta$  del otro dominio.  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  están dispuestos en la región distal a la membrana celular, por encima de  $\alpha_3$  y  $\beta_{2m}$ . La  $\beta_{2m}$  interacciona con los tres dominios de la cadena pesada, estableciendo contactos con las cadenas  $\beta$  centrales de  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  y con los segmentos que conectan la lámina  $\beta$ . Esto explica el papel esencial de la  $\beta_{2m}$  en la estabilización de la conformación de la cadena pesada. La Asn<sub>86</sub>, a la que está unido el carbohidrato, está situada en un bucle que conecta  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ , en uno de los extremos de la cavidad existente entre las dos hélice  $\alpha$ .

Una de las características más importantes de la estructura tridimensional de HLA-A2 es la presencia de una hendidura entre las dos hélices  $\alpha$ , cuyas paredes están constituidas por las cadenas laterales de algunos de los residuos que componen dichas hélices y su base por las pertenecientes a las cadenas  $\beta$  centrales. Las características de esta cavidad, junto con su localización en la superficie de la molécula, sugieren que es la estructura encargada de unir el antígeno extraño para su posterior reconocimiento por el receptor de la célula T (TCR). Sus dimensiones, aproximadamente  $25 \text{ \AA}$  de largo,  $10 \text{ \AA}$  de ancho y  $11 \text{ \AA}$  de profundidad, son compatibles con la presentación de una forma procesada del antígeno, probablemente un péptido. Esta hipótesis está corroborada por la presencia en este sitio de un material denso a los electrones, que no pertenece a la cadena peptídica de HLA-A2. La densidad de este material sugiere que es de naturaleza proteica, probablemente un péptido o mezcla de péptidos, pero el nivel de resolución y su probable heterogeneidad, no permiten determinar su estructura.

### 1.3.2. HLA-Aw68

Posteriormente se determinó la estructura de HLA-Aw68 por cristalografía de rayos X, con una resolución de 2,6 Å (43). Este antígeno difiere de HLA-A2 en 13 posiciones, 10 de las cuales se hallan en el sitio de reconocimiento del antígeno. A pesar de estas diferencias la estructura general de las dos moléculas es similar, aunque ambas moléculas difieren significativamente en la estructura fina y en la carga del sitio de unión. La característica más sobresaliente de Aw68 es la presencia de una cavidad cargada negativamente, que se extiende por debajo de la hélice  $\alpha$  del dominio  $\alpha_1$ , originada por la sustitución de un residuo de His por uno de Asp en posición 74. Esta cavidad podría ser un subsitio para el reconocimiento de una cadena cargada positivamente o del extremo N-terminal del péptido. La hendidura entre las dos hélices  $\alpha$  de HLA-Aw68 está ocupada, como en HLA-A2, por un material denso a los electrones que en este caso se extiende hasta la cavidad cargada negativamente. Los datos de secuencia de otros antígenos HLA indican la probable existencia de una cavidad similar en otras moléculas HLA-A y B. Otras características diferenciales de HLA-Aw68 son la presencia de otra cavidad en la lámina  $\beta$  del dominio  $\alpha_2$ , provocada por un cambio de Asp a Tyr en posición 116, y de una elevación que atraviesa la base del sitio en su parte central. HLA-AW68 y HLA-A2 tienen en común la presencia de una cavidad prominente, de naturaleza hidrofóbica, que se extiende debajo de la hélice  $\alpha$  del dominio  $\alpha_1$ , y tiene por base el residuo M45.

Brown et al (44) determinaron el patrón de residuos conservados y polimórficos de 26 secuencias de antígenos de Clase I y 54 de Clase II. Mediante esta comparación, y basándose en la estructura tridimensional del antígeno HLA-A2, construyeron un modelo hipotético del plegamiento de los antígenos de Clase II. Este modelo proponía la existencia de un sitio de unión del antígeno con características estructurales similares, en general, al sitio de unión presente en los antígenos de clase I. Los dominios  $\alpha_2$  y  $\beta_2$  podrían adoptar una estructura similar a  $\alpha_3$  y  $\beta_{2m}$  en los antígenos de Clase I.

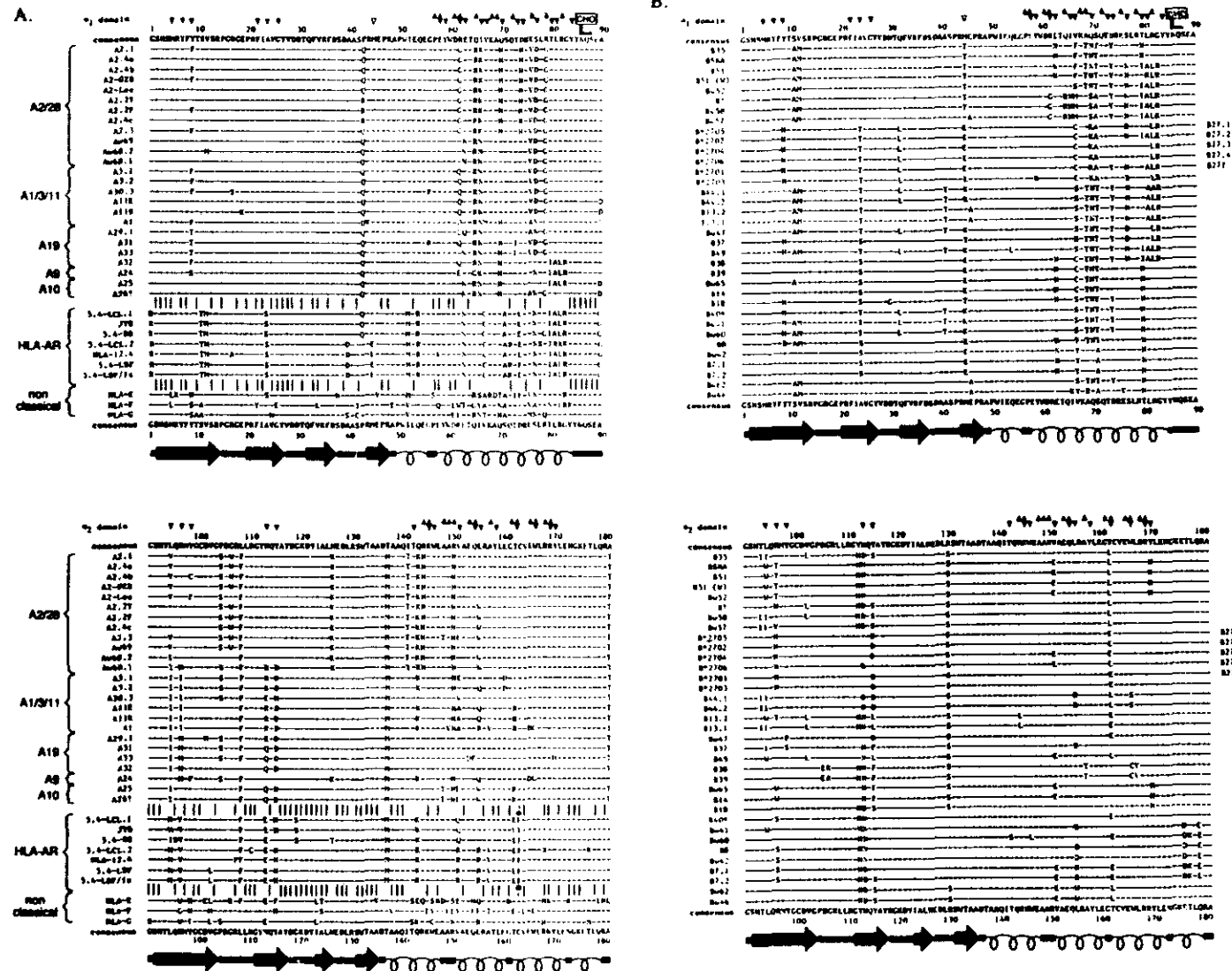
### 1.4. POLIMORFISMO DE LOS ANTIGENOS DE CLASE I

Los antígenos HLA de Clase I presentan un gran polimorfismo, cuyo patrón es complejo y difiere considerablemente del que muestran otras familias de proteínas polimórficas. Estas familias presentan habitualmente un limitado número de variantes que difieren de un subtipo predominante en uno o dos aminoácidos. Sin embargo, los loci HLA-A, B y C no presentan, en

general, alelos predominantes, con la excepción de HLA-A2, y sus secuencias difieren unas de otras en múltiples diferencias. Hasta el momento se han detectado 20 antígenos HLA-A, 40 HLA-B y 10 HLA-C, expresados a frecuencias significativas en la población humana (45). Sin embargo, estas cifras subestiman probablemente el número total de antígenos HLA presentes en la población, ya que continuamente se detectan nuevos alelos a medida que se aplican métodos más sensibles para el tipaje HLA. Las primeras secuencias se determinaron por secuenciación proteica de la cadena pesada, obtenida tras la solubilización de las moléculas con papaína. Así, se obtuvo la secuencia de los dominios  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  y  $\alpha_3$  de B7 (6), B27 (46), A2 (47), A28 (48) y Bw60 (49). Posteriormente, se determinaron las secuencias de otros antígenos utilizando técnicas bioquímicas diferentes o por la secuenciación del DNA que las codifica. Hasta el momento se conocen 25 secuencias de antígenos HLA-A, 35 HLA-B y 18 HLA-C (Fig. 3), cuya comparación ha permitido asociar algunas de sus características estructurales y funcionales.

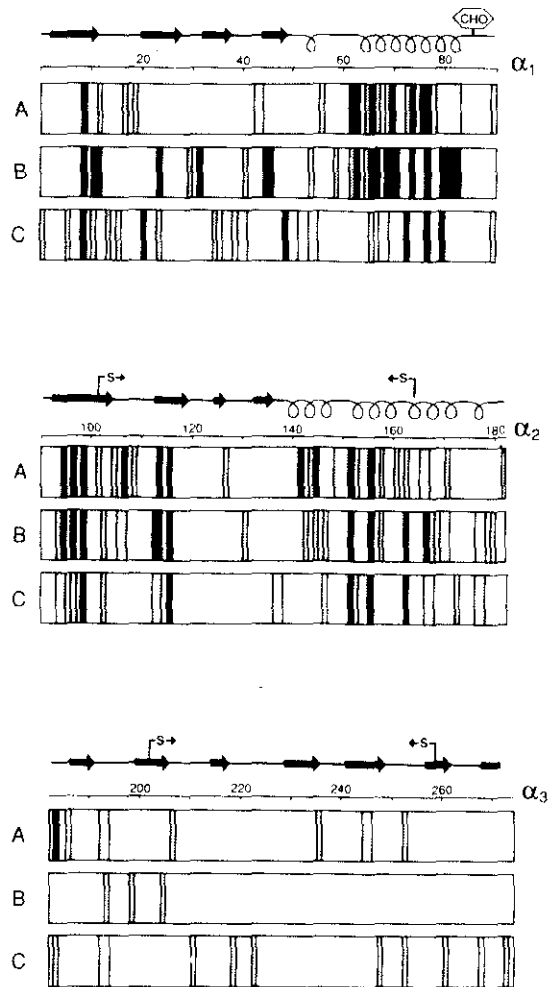
La comparación de las secuencias de los antígenos MHC ha mostrado la existencia de 31 residuos específicos de locus, 22 de los cuales se hallan en los dominios transmembrana e intracitoplásmico. Los antígenos HLA-A, B y C difieren también en el tamaño de estos dominios. Un análisis de las diferencias de aminoácidos entre pares de secuencias HLA ha mostrado una mayor semejanza entre productos de un mismo locus que entre los correspondientes a loci distintos. El loci C presenta un mayor parecido al B que al A (50).

El polimorfismo se extiende a lo largo de toda la molécula pero se concentra principalmente en los dominios  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ . La variabilidad en el dominio  $\alpha_3$  es menor, especialmente en los productos del locus B, de forma que 26 de las 35 secuencias conocidas son idénticas en este dominio. Las moléculas A y C poseen un grado de variación mayor. Un análisis de la variabilidad por el método de Wu & Kabat ha permitido detectar algunos residuos con un alto índice de variabilidad (50). Estos residuos exhiben de 3 a 6 aminoácidos distintos y corresponden generalmente a cambios drásticos, mientras que, en la mayor parte de los de baja variabilidad solo se han detectado dos aminoácidos y los cambios son más conservativos. Se han detectado regiones de alta variabilidad en secuencias pertenecientes a los tres loci aunque su número y distribución es diferente (Fig. 4). Las 20 posiciones con mayor grado de diversidad se encuentran en el sitio de unión del antígeno y, por su disposición, 16 de ellas podrían interactuar con el péptido, dos con el TCR y dos se hallan en posiciones intermedias, de



**Figura 3.** Secuencias de aminoácidos conocidas de las cadenas pesadas de antígenos HLA de clase I (50). – indica identidad con la secuencia consenso. Los símbolos representan: ▼ residuos de interacción con péptidos; ▲ residuos de interacción con el TCR; ◆ residuos que podrían interactuar con péptidos y con el TCR. ● residuos de interacción con CD8. CHO indica el sitio de glicosilación. En la parte inferior de la figura está representada la estructura secundaria de la molécula. Las barras verticales señalan los aminoácidos conservados en todas las secuencias HLA-A, B y C.





**Figura 4.** Comparación de la variabilidad en la secuencia de aminoácidos de los dominios extracelulares de los antígenos HLA de clase I. Los parámetros de variabilidad se calcularon, según el método de Wu y Kabat, en tres grupos de secuencias: 25 HLA-A, 35 HLA-B y 18 HLA-C. Los sombreados representan:  posiciones de alta variabilidad ( $V \geq 4,0$ );  posiciones de variabilidad intermedia ( $3,0 \leq V < 4,0$ );  posiciones con baja variabilidad ( $1,0 < V < 3,0$ ). Las regiones que no muestran variabilidad ( $V=1$ ) están sin sombreadar. En la parte superior está representada la estructura secundaria de cada dominio.

**Tabla I. Posiciones de alta variabilidad de las moléculas HLA-A, B y C**

Posición	Variabilidad <sup>a</sup>			Contacto Potencial <sup>b</sup>
	HLA-A	HLA-B	HLA-C	
$\alpha_1$				
9	9,1	4,8	10,0	Péptido
24		7,0		Péptido
45		10,0		Péptido
62	13,9			TCR + Péptido
63	4,2			Péptido
67		13,5		Péptido
69		4,8		TCR
70		6,4		Péptido
77		6,2		Péptido
80		7,0		Péptido
81		5,0		Péptido
82		5,5		TCR
$\alpha_2$				
95	5,4	5,0		Péptido
97	5,8	14,0		Péptido
99			5,2	Péptido
114	8,3	6,2		Péptido
116	6,3	15,9	10,2	Péptido
152	5,9		5,5	Péptido
156	8,3	5,6	10,3	Péptido
163		8,1		TCR + Péptido

<sup>a</sup> Variabilidad determinada por Bjorkman y Parham mediante el método de Wu y Kabat (50). Se han considerado como posiciones de alta variabilidad aquellas que tienen un índice mayor de 4,0.

<sup>b</sup> Contacto potencial de acuerdo con su localización en la estructura tridimensional (41,42)

forma que pueden ser relevantes en los dos sentidos (Tabla I). La posición 45, que es altamente polimórfica, constituye la base de una cavidad que es una continuación del sitio de unión del péptido y podría ser importante para que éste tenga lugar. La comparación de las secuencias HLA indica la conservación de esta cavidad en todos los antígenos HLA-A, con excepción de A1, mientras que en los B habría sufrido una diversificación considerable (43). Las estructuras de Aw68 y A2 demuestran el efecto del polimorfismo en la forma y en la distribución de las cargas en el sitio de unión del antígeno (41-43). De esta forma, se crearían o alterarían subsitios que podrían servir para la unión de cadenas laterales del péptido. Esto sugiere que los cambios estructurales son los responsables de la especificidad de los antígenos HLA por péptidos antigénicos.

Aunque muchos residuos del sitio de unión del antígeno muestran algún grado de diversidad, una serie de residuos (M5, F22, G26 en todos los antígenos e Y7 y A24 en los A), localizados en las láminas B del dominio  $\alpha_1$  están completamente conservados. Esto contrasta con que los residuos pertenecientes a  $\alpha_2$  que forman parte de la base del sitio se encuentran entre los de mayor variabilidad. También se han detectado diferencias significativas entre los productos de los tres loci HLA en cuanto a la distribución de la diversidad en las hélices  $\alpha$ . La hélice  $\alpha$  del dominio  $\alpha_1$  presenta una gran diversidad en los productos del locus B, pero está altamente conservada en los antígenos C, y en los A presenta una variabilidad intermedia. Sin embargo, la hélice  $\alpha$  del dominio  $\alpha_2$  es más variable en las moléculas A que en las B y C.

Destaca la conservación de varios residuos aromáticos, entre los que se incluyen un grupo de tirosinas, cuya situación permitiría su interacción con péptidos antigénicos. Otra peculiaridad del sitio de unión del antígeno de las moléculas de Clase I es un puente salino que enlaza el extremo N-terminal de la hélice  $\alpha_1$  y el extremo C-terminal de la hélice  $\alpha_2$ . Los residuos que forman este enlace (E55 y R170) están conservadas en todas las secuencias de Clase I, con excepción de Cw3, E y G. Además, este extremo se encuentra relativamente cerrado por la presencia de una serie de residuos aromáticos, conservados en su mayoría. El extremo opuesto del sitio se halla parcialmente bloqueado por una Tyr conservada en posición 84.

Las sustituciones de los antígenos de Clase I pueden alterar el repertorio de péptidos y de TCR que interaccionan funcionalmente con estas moléculas. Muchas de las posiciones de  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  y  $\alpha_3$  que no están en el sitio de unión del péptido muestran baja variabilidad. Este polimorfismo podría afectar, mediante influencias indirectas sobre el sitio de unión, la afinidad

por péptidos y/o TCR. El hecho de que el polimorfismo de los antígenos HLA-A, B y C sea diferente sugiere la existencia de una posible diversificación funcional entre los productos de estos loci.

### **1.5. SUBTIPOS NATURALES DE LOS ANTIGENOS HLA**

Los distintos antígenos HLA se han detectado principalmente por su reactividad diferencial con los antisueros de serología clásica, procedentes de mujeres multíparas y de sujetos politransfundidos. Mediante estos antisueros se han definido un gran número de especificidades HLA. Sin embargo, el análisis de la reactividad de estos antígenos con CTL alogénicos o restringidos, con Acm, así como la utilización de técnicas bioquímicas, tales como el electroenfoque, ha revelado la existencia de una diversidad adicional. Por ejemplo, se han detectado variantes de los antígenos HLA-A2, A3, A11, Aw68, B7, B13, B27, B44, B51, Cw2 y Cw6 (50). La mayoría de ellos difieren en un número reducido de sustituciones que generalmente se encuentran localizadas en el sitio de unión del antígeno. El análisis molecular de estos subtipos ha permitido establecer una correlación entre algunos cambios de aminoácido y el comportamiento funcional de determinados antígenos.

Entre los subtipos mejor estudiados se encuentran los del antígeno HLA-A2. Hasta el momento se han caracterizado, por secuenciación proteica o de DNA, 10 subtipos del antígeno HLA-A2, que difieren entre sí en 1 a 6 residuos (51 y R. Castaño, manuscrito en preparación). El antígeno HLA-B27 presenta 6 subtipos y en el resto de los antígenos sólo se han detectado dos subtipos.

### **1.6. DETERMINANTES SEROLOGICOS DE LOS ANTIGENOS HLA**

La comparación de secuencias de antígenos HLA que son reconocidos por un Acm determinado ha permitido correlacionar algunos patrones de posiciones polimórficas con la distribución de un epítipo particular (52). No obstante, este análisis presenta una serie de limitaciones debido a que la mayoría de las especificidades HLA difieren en múltiples sustituciones, repartidas en distintos segmentos de la molécula y que posiblemente no contribuyen de la misma forma al reconocimiento. Además, un epítipo dado puede resultar de una combinación única de residuos variables, cada uno de ellos común a otros antígenos. Esto ha conducido a la aplicación de otras aproximaciones experimentales, encaminadas a delimitar las áreas de la molécula involucradas en los epítipos serológicos, entre las que se encuentran

la utilización de péptidos sintéticos y el análisis de la reactividad de variantes y mutantes.

### **1.6.1. Caracterización de determinantes serológicos mediante péptidos sintéticos**

Otra aproximación utilizada para definir las regiones implicadas en el reconocimiento serológico ha sido la generación de anticuerpos contra péptidos sintéticos, derivados de la secuencia de una proteína. La principal limitación de esta técnica es que la mayoría de los anticuerpos reconocen epítomos formados por regiones que, a pesar de su proximidad conformacional, pueden ser discontinuas en la secuencia lineal. Aunque no se conocen con precisión las bases del reconocimiento de proteínas nativas por este tipo de anticuerpos (53), esta aproximación ha sido útil para la obtención de antisueros de especificidad predeterminada y para el mapeo de epítomos de relevancia funcional en algunos antígenos MHC (54-59).

Así, se generaron anticuerpos contra un péptido, que comprendía los residuos 39-50 de HLA-B7, capaces de reaccionar con las cadenas pesadas de antígenos HLA-A y B en ensayos de transferencia a membranas de nitrocelulosa. Sin embargo, no inmunoprecipitaban el complejo HLA/ $\beta_2m$  de lisados celulares (55). Posteriormente, se detectó que un péptido derivado de la secuencia 61-83 de B7 inducía anticuerpos que reconocían específicamente la cadena pesada de HLA-B7 sólo o acoplada con la  $\beta_2m$  (56). Estas observaciones sugerían que el péptido mimetizaba un sitio aloantigénico expresado en B7 que era independiente de  $\beta_2m$ . Un Acn generado contra el péptido que reproducía la secuencia de un antígeno de Clase I de conejo en el segmento 61-73, reaccionaba específicamente con células que expresaban dicho antígeno (57). Recientemente, Bouillot et al.(58) han generado 9 antisueros específicos de péptidos sintéticos que mimetizan las regiones con mayor índice de polimorfismo e hidrofilia de los antígenos HLA-A2 y B7. Determinaron la especificidad de estos antisueros frente a las moléculas HLA-A1, A2, A3, B7 y B27 purificadas, en ensayos de ELISA. Dos de ellos (A2.170-185 y B7.99-118) reconocían al péptido inmunizante pero no a la molécula HLA. Los péptidos A2.139-159 y B7.65-82 eran los que mostraban mayor especificidad frente a las moléculas HLA de las que procedía su secuencia. El último había sido obtenido con anterioridad y mostraba reacción cruzada con Bw60 (59). El péptido B7.164-187 aunque reaccionaba preferencialmente con B7, reconocía parcialmente a B27 y A3. Los antisueros generados contra el resto de los péptidos (A2.56-69, A2.68-85, A2.98-113 y B7.138-157) reaccionaban cruzadamente con varias moléculas HLA.

### 1.6.2. Reactividad de anticuerpos anti-HLA con variantes naturales y mutantes

El análisis de la reactividad de Acm con variantes naturales ha permitido delimitar con mayor precisión algunas regiones de la molécula que intervienen en los determinantes serológicos, debido al limitado número de sustituciones que presentan.

La contribución de segmentos cortos de la molécula y de posiciones individuales a los epítomos reconocidos por Acm se ha definido mediante la construcción de mutantes, generados por mutagénesis dirigida, y de moléculas recombinantes de distintos antígenos HLA. En la mayoría de estos estudios las mutaciones se han introducido en posiciones polimórficas, algunas de las cuales varían en diferentes subtipos. Mediante esta aproximación se han identificado tres epítomos serológicos no solapantes en HLA-A2, uno de los cuales está localizado entre los residuos 62 y 67, el segundo implicaría al residuo 107 y el tercero no se altera por sustituciones en las posiciones anteriores (60). Esta última región podría incluir el segmento 140-150, previamente definida por comparación de secuencias (52). El examen de mutantes en posiciones individuales ha revelado que la posición 149 de HLA-A2 está implicada en los determinantes reconocidos por algunos Acm, mientras que la contribución de las posiciones 152 y 156 de este antígeno sería considerablemente menor (61,62). La región 70-80 también posee relevancia serológica, ya que la sustitución de los residuos de A2 en este segmento por los que presenta B7, genera el determinante serológico supertípico Bw6 (60). Aunque la región 62-80 está implicada en los determinantes reconocidos por algunos Acm, la mayoría de las sustituciones en este segmento no ejercen un gran efecto en la especificidad serológica de la molécula.

El estudio de las posiciones involucradas en los epítomos serológicos, mediante la construcción de moléculas híbridas A2/A3 (63), ha mostrado que las posiciones 142 y/ó 145 y la 152 contribuyen a los determinantes serológicos reconocidos por algunos Acm específicos de A2. Los residuos 127, 152 y 161 forman parte los epítomos reconocidos por Acm específicos de A3. La utilización de moléculas híbridas B7/B27 mostró que la mayoría de los determinantes antigénicos de B7 estaban localizados en el dominio  $\alpha_1$  de la molécula. En este estudio se definieron 4 áreas importantes: residuos 82 y 83, asociados con el determinante Bw6; posiciones 63, 67 y 70; segmento 177-180 y posición 9, definida mediante un aloantisuero humano (64).

La comparación de secuencias y los estudios realizados con variantes y mutantes, han mostrado que la mayoría de los residuos implicados en el reconocimiento por Acm están localizados en las hélices  $\alpha$  de los dominios  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ . En cada epítomo, al menos uno de los

residuos que lo constituyen se encuentra expuesto hacia el solvente, lo que explica su accesibilidad. No obstante, no se puede excluir que algunas sustituciones provoquen cambios conformacionales en otros residuos que afecten a la unión del Ac. Generalmente, los residuos localizados en la base del sitio de reconocimiento del antígeno no parecen ser críticos para el reconocimiento de las moléculas de Clase I por Ac (42). La mayor parte de los determinantes serológicos implican posiciones de un solo dominio,  $\alpha_1$  o  $\alpha_2$ , lo que contrasta con los epítomos reconocidos por CTL, que generalmente requieren aminoácidos de los dos dominios (65,66).

## **1.7. RESIDUOS IMPLICADOS EN EL RECONOCIMIENTO POR CTL**

### **1.7.1. Variantes naturales**

La mayoría de los cambios ocurridos en los subtipos se encuentran localizados en el sitio de unión del antígeno, lo que explica su reconocimiento diferencial por CTL y muestra su relevancia funcional. En algunos casos un único cambio puede alterar críticamente el epítomo reconocido por la célula T, variando la especificidad antigénica del subtipo. Las sustituciones de los subtipos se pueden englobar en tres categorías por su localización en la estructura tridimensional (41,42): 1) residuos orientados hacia el sitio de unión del antígeno, situados en las hélices  $\alpha$  y en las láminas  $\beta$ . Estos residuos estarían parcial o totalmente tapados, especialmente los que se encuentran en las láminas  $\beta$ , por la unión del antígeno. Su efecto en el reconocimiento por CTL se debería, fundamentalmente, a su efecto sobre la unión de péptidos antigénicos; 2) residuos localizados en el sitio de reconocimiento que apuntan hacia su exterior. La sustitución de estas posiciones podría afectar, principalmente, la interacción con el TCR; 3) residuos situados fuera del sitio. Algunos de ellos podrían interactuar con el TCR y otros, por el contrario, podrían no ser relevantes para el reconocimiento. La mayoría de las variantes que poseen este tipo de sustituciones, presentan generalmente al menos otro cambio en el sitio de unión.

La mayor parte de los datos de reconocimiento de variantes por CTL provienen de los estudios realizados en A2, A3, B7 y B27. Todos los subtipos del antígeno HLA-A2, incluyendo aquellos que presentan una única sustitución, como la variante A2-OZB cuyo único cambio se encuentra en el dominio  $\alpha_1$ , son reconocidos de forma diferencial por CTL alorreactivos. El polimorfismo en los subtipos de A2 altera también los determinantes de restricción de antígenos virales o antígenos menores de histocompatibilidad (rev. en 51). Del mismo modo, los dos

subtipos del antígeno HLA-A3, que difieren en las posiciones 152 y 156, tienen un comportamiento distinto frente a CTL alogénicos (67) y restringidos (68).

El análisis de la reactividad de subtipos con CTL ha mostrado que los residuos incluidos en los segmentos 77-80 y 146-160 se encuentran entre los de mayor relevancia en el reconocimiento por CTL. Estos resultados concuerdan con los obtenidos con los mutantes de H-2 (69).

### 1.7.2. Mutantes

Mediante la construcción de mutantes se obtuvo una información más precisa acerca de la relevancia de posiciones polimórficas en los epítomos reconocidos por CTL alorreactivos. Un gran número de estos estudios se han centrado en el antígeno HLA-A2. Las principales características del reconocimiento por CTL alorreactivos, determinadas mediante mutantes de este antígeno HLA, son:

- 1.- La contribución de las posiciones localizadas en las hélices  $\alpha$  del sitio de reconocimiento del antígeno. Entre éstas destacan la 152 y la 156 (61,62,70). Aunque el efecto ocasionado por una sustitución depende del aminoácido introducido, la posición 152 parece crítica en todos los casos, mientras que la 156 tiene efectos variables (61). La construcción de mutantes de HLA-A3 ha mostrado, también, que el residuo 152 es esencial para el reconocimiento de este antígeno por CTL alogénicas y restringidas (71,72). Las posiciones del segmento 62-83, en  $\alpha_1$ , juegan también un papel importante (66). Algunas posiciones, como la 66 y 62-63, son más relevantes que otras, como la 70 y 74.
- 2.- El TCR no reconoce necesariamente la superficie total de las dos hélices  $\alpha$ , según sugiere el que ciertas posiciones que apuntan hacia el TCR, como la 65 y 76, no afecten a la reactividad de todos los CTL (66).
- 3.- La importancia de posiciones situadas en la lámina B que forma la base del sitio de reconocimiento del antígeno, entre las que se encuentran la 9 y la 95 (66,70). Esto se debe probablemente a la modulación de la unión de péptidos antigénicos. Las sustituciones individuales en los residuos 43 y 107, que se encuentran en un bucle fuera del sitio de unión del antígeno, no tienen ningún efecto en el reconocimiento por CTL alogénicos o restringidos (66,71,72)
- 4.- Los CTL pueden reconocer una gran diversidad de epítomos, muchos de los cuales implican posiciones distantes en la molécula (66,70).

5.- Los determinantes serológicos y los reconocidos por CTL no implican necesariamente los mismos residuos. Así, la posición 149, que es importante en los determinantes serológicos, tiene una contribución menor en los epítomos reconocidos por CTL (61,62). La mayor trascendencia de las posiciones 152 y 156 puede deberse a que se hallan orientadas hacia el interior del sitio, mientras que la 149 se extiende fuera de él (42).

Existe un claro paralelismo entre las posiciones relevantes en el reconocimiento alogénico y en el restringido, ya que ambos involucran posiciones que están orientadas hacia el interior del sitio de unión (73-76). El reconocimiento por CTL específicas de determinados péptidos virales, en el contexto de mutantes de HLA-A2, ha destacado la importancia de las posiciones 152 y 156 y la intrascendencia del residuo 149 (75). Estos estudios han mostrado también una contribución diferencial de distintos residuos, dependiendo del péptido contra el que va dirigida la respuesta (74,76). Esto sugiere que la localización exacta de distintos péptidos en el sitio de unión del antígeno no es la misma en todos los casos.

El análisis de los epítomos reconocidos por células T mediante mutagénesis dirigida de antígenos de clase II humanos (77,78), así como de antígenos H-2 (65,79-81), han conducido a unas conclusiones similares a las obtenidas con los mutantes de HLA-A2.

### 1.8. EVOLUCION DE LOS ANTIGENOS MHC

La relación estructural y funcional de los antígenos MHC de Clase I y II sugiere su origen por duplicación de una secuencia ancestral común. El antecesor común estaría constituido por una sola cadena polipeptídica, semejante a las de los antígenos de Clase II actuales (82). Los distintos loci habrían surgido por duplicaciones posteriores.

El polimorfismo MHC es peculiar ya que la variabilidad no está repartida de forma homogénea a lo largo de la molécula, concentrándose principalmente en los dominios  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  (83). La mayor parte de las sustituciones en los exones codificantes de estos dominios suponen un cambio de aminoácido, lo que contrasta con la situación en el otro extremo del gen, en el que predominan las mutaciones silenciosas (84). El extremo 5' del gen posee, además, una alta frecuencia del dinucleótido CpG, mientras que en el extremo 3' este se encuentra en la misma proporción que en el resto de los genes eucariotas (85). Se ha sugerido que los fenómenos de conversión génica podrían ocurrir esencialmente en esta región rica en CpG (86), contribuyendo este dinucleótido a la delimitación de los eventos de conversión (84). Estas características

sugieren la actuación de un proceso de selección positiva en la generación de la variabilidad de los antígenos de Clase I, probablemente correlacionado con la función de estas moléculas. Los dominios  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  constituyen el sitio de unión de péptidos antigénicos (42), por lo que un alto grado de diversidad en esta región sería ventajoso para hacer frente a la gran variedad de patógenos existentes. El mantenimiento del polimorfismo en una población podría deberse a una ventaja de la heterocigosis (87). Dada la función de los antígenos MHC, los individuos heterocigotos serían ventajosos debido a que la expresión de diferentes moléculas multiplicaría su capacidad presentadora de péptidos (82). La selección de un nuevo alelo tendría lugar si supusiera una mejora de la respuesta inmune frente a un antígeno o patógeno prevaeciente en ese momento en la población.

Una de las principales cuestiones sin resolver en la evolución de los antígenos MHC es la tasa en la que el polimorfismo entra en la población. El punto de vista tradicional sostiene que el polimorfismo se adquiere por divergencia de la proteína original, durante el periodo de tiempo en el que existe la especie (88). Las especies nuevas se originarían a partir de un pequeño número de individuos que expresan una determinada variante que posteriormente se convertiría en mayoritaria en la población. La extensión de esta teoría a los antígenos MHC supondría los siguientes puntos: 1) la mayoría de la variabilidad encontrada en una especie se habría generado en individuos de esa especie; 2) distintas especies no compartirían generalmente el mismo polimorfismo; 3) la actuación de mecanismos mutacionales específicos sobre los genes MHC.

Klein et al. (88,89) han propuesto un modelo de evolución transespecies que contradice muchos de los puntos asumidos en el punto de vista tradicional. Este modelo se basa en las siguientes consideraciones: 1) una especie nueva heredaría de sus antecesores un conjunto de alelos MHC; 2) diferentes especies compartirían muchos de los elementos de variabilidad encontrados en las moléculas MHC; 3) la acumulación de nueva diversidad en los alelos MHC sería lenta y no se debería a mecanismos hipermutacionales dirigidos específicamente contra ellos.

Una de las evidencias mas fuertes a favor de la evolución transespecies es la homología existente entre algunos antígenos de Clase I humanos y de chimpancés. La secuenciación de 9 cDNA, correspondientes a cadenas pesadas de antígenos de Clase I de chimpancé (*Pan troglodites*) (ChLA), mostró un patrón de sustituciones específicas de locus, semejante al que

presentan los loci HLA (90,91). Así, 5 de ellas se podían encuadrar en el locus ChLA-B, tres en el ChLA-A, una en el ChLA-C y una en el ChLA-F. No se han detectado secuencias características de especie que permitan distinguir los antígenos HLA de los ChLA; sin embargo, ambos se pueden diferenciar de alelos de otras especies más alejadas evolutivamente. Estos resultados, junto con los obtenidos en ensayos de "Southern blot", sugieren una organización y un número de genes MHC similar en las dos especies. El hecho de que determinados alelos humanos estén más relacionados con algunos de chimpancé que con otros de la misma especie, sugiere que las bases estructurales de esta familia de alelos se establecieron en un antecesor común a humanos y chimpancés, de forma que la evolución posterior sólo añadiría pequeñas modificaciones (84,90,91). En este sentido, mediante comparación de secuencias, se ha estimado, asumiendo un origen común de sustituciones idénticas, que menos del 20% de las sustituciones que presentan los antígenos de Clase I contemporáneos son posteriores a la divergencia entre ambas especies (84).

En primates menos evolucionados, como los del Nuevo Mundo (*Sanguinus oedipus*), los antígenos MHC presentan un escaso polimorfismo, detectándose 11 genes de Clase I en un panel de 79 individuos no relacionados. La secuenciación de estos genes reveló su estrecha relación con antígenos de Clase I no clásicos, 10 de ellos con HLA-G, y el restante con HLA-F (92).

La comparación de alelos de clase II de primates y de roedores sugiere que la evolución es lenta y que el polimorfismo se ha acumulado por diversificación dentro de cada especie y transmisión a la siguiente durante la especiación (93,94).

Se han propuesto diferentes mecanismos para la generación de diversidad en los antígenos MHC. La conversión génica es el mecanismo que ha operado, probablemente, en la generación de la mayoría de los mutantes de H-2K<sup>b</sup> (69). La comparación de la secuencia de nucleótidos de estos mutantes sugiere la transferencia no recíproca de fragmentos cortos de DNA de otros genes de clase I, incluyendo algunos no clásicos, al gen de H-2K<sup>b</sup>. En la especie humana también actúan estos mecanismos, pero la transferencia entre alelos del mismo locus es más frecuente que entre loci distintos (84,95), como ocurre en ratón.

Entre los mecanismos que pueden contribuir a la generación del polimorfismo de los antígenos de Clase I se encuentran (82):

1.- Recombinación homóloga. Por ejemplo, la generación del antígeno HLA-Bw42, detectado

en Negros africanos, ha podido ocurrir por un proceso de recombinación entre B7 y B8 ya que es idéntico al primero en los exones 1 y 2 y al segundo en los exones 3-8. Una situación similar se da en HLA-Aw69, proviniendo sus exones 1 y 2 de HLA-Aw68.1 y 3-8 de HLA-A2.1.

- 2.- Conversión génica entre alelos. Así se habría originado, por ejemplo, el subtipo mongoloide HLA-B13.1 que difiere en 3 residuos (94, 95 y 97) del subtipo caucasoide B13.2, provocados por 6 sustituciones de nucleótidos. Las secuencias de estos subtipos son similares a otros alelos del locus B en esta región, lo que sugiere su generación por conversión alélica. Del mismo modo el subtipo mongoloide HLA-A2.3 se habría originado por una donación de los codones 149 a 156 de HLA-A10 a HLA-A2.1.
- 3.- Conversión génica entre loci. Un mecanismo de este tipo explicaría que ciertos alelos HLA-A y B compartan la secuencia 79-83, que determina el epítipo serológico Bw4. Del mismo modo, se ha detectado que el segmento que codifica los residuos 53-96 del dominio  $\alpha_1$  de HLA-Bw46 deriva claramente de HLA-Cw11.
- 4.- Mutación puntual. Por ejemplo, HLA-B14 presenta una única sustitución en el codón 11 respecto de Bw65, probablemente provocada por un mecanismo de este tipo. En el caso de los subtipos de A2, las sustituciones en las posiciones 43, 95 y 156 de los subtipos A2.2F, A2.2Y y A2.4C, respectivamente, podrían haberse generado por mutaciones puntuales. Este podría ser el caso también de los cambios en la posición 99 de A2.4b, 66 de A2.4c y 236 de A2-OZB.
- 5.- La generación de la mayoría de los antígenos probablemente requiere una combinación de varios eventos genéticos. Por ejemplo, HLA-Bw41 es idéntico a Bw60 en el dominio  $\alpha_1$ , mientras que en el dominio  $\alpha_2$  difiere de B8 en dos sustituciones contiguas en los residuos 95 y 97. Su origen se explicaría por una recombinación entre Bw60 y B8, seguida por una transferencia de un segmento corto de DNA o por una doble mutación puntual.

### 1.9. HLA-B27

La especificidad serológica HLA-B27 posee una relevancia especial debido a su fuerte asociación con la espondilitis anquilosante, el síndrome de Reiter y otras espondiloartropatías (96,97), una de las mayores detectadas entre un antígeno HLA y una enfermedad. El análisis de la reactividad de este antígeno con Acm, de su movilidad en electroenfoque y de su

reconocimiento por CTL alogénicos y restringidos, puso de manifiesto la existencia de un conjunto de moléculas diferentes englobadas dentro de lo que anteriormente se había considerado como una especificidad HLA única.

### **1.9.1. Detección de los subtipos de HLA-B27**

#### **1.9.1.1. Subdivisión de B27 con Acm**

Grumet et al generaron un Acm frente a B27 denominado B27M2 (98), cuyo determinante sólo estaba presente en un 87% de los individuos B27+. Mediante estudios de familia se comprobó que las moléculas B27M2+ y B27M2- constituían variantes de este antígeno, ya que su reactividad no estaba asociada a ningún otro antígeno HLA. Posteriormente, se detectó la existencia de un tercer grupo de células B27 que presentaban una reactividad intermedia con este Acm (99,100).

#### **1.9.1.2. Reactividad de B27 con CTL alogénicos**

La generación de CTL alogénicos en sistemas en los que las células estimuladoras y respondedoras eran ambas B27+, pero pertenecientes a distintos individuos, puso de manifiesto la existencia de dos variantes de este antígeno: W y K (101). Un estudio posterior mostró que los CTL generados frente a estos subtipos se dirigían contra dos tipos de determinantes, uno común a ambos y otro específico de subtipo (102). Con un panel de individuos más amplio se demostró la existencia de un tercer subtipo al que se denominó C y que se encontraba predominantemente en individuos orientales (103). Algunas células B27+ no eran lisadas por CTL específicos de cada uno de estos tres subtipos, permitiendo definir una cuarta variante de este antígeno, B27D (104).

Otros estudios mostraron también el comportamiento diferencial de estos subtipos frente a clones de CTL. Así, un clon de CTL específico de B7 presentaba capacidad lítica frente a dianas B27K pero no frente a las B27W (105). También se describió un clon anti-B27 que sólo reconocía a las células B27+M2+ (106).

#### **1.9.1.3. Comportamiento de B27 en sistemas de restricción**

Varios estudios han analizado el comportamiento de B27 en respuestas antivirales. Toubert et al (100) generaron CTL, restringidas por B27, específicas del virus A de la influenza y del virus de Epstein-Barr (EBV). De acuerdo con la reactividad de los CTL anti-EBV, definieron tres subgrupos de B27. El subgrupo 1 estaba constituido por las moléculas B27 que reaccionaban con el Acm M2 y parecía correlacionarse con la variante W, definida por CTL alogénicos. El

subgrupo 2 incluía las células B27+M2- y era equivalente al K. El subgrupo 3 correspondía a las células B27+ con reactividad intermedia con el Acm M2, hallándose predominantemente en individuos orientales, lo que hacía suponer que equivalía al C. Sólo pudieron generar respuestas anti-influenza A restringidas por B27 en el 35% de los individuos y, debido a este bajo nivel de respuesta, únicamente se obtuvieron CTL frente a los grupos 1 y 2, pero no frente al 3.

#### 1.9.1.4. Patrón de los subtipos de B27 en electroenfoque

Mölders et al (107) analizaron la movilidad de los subtipos W y K en geles bidimensionales, observando que el pI del subtipo K era más básico que el del W. Un estudio posterior mostró que los subtipos W, K, C y D eran distinguibles por electroenfoque (108), siendo el pI de C semejante al de W, mientras que el D poseía un pI más ácido.

El examen por electroenfoque de las moléculas HLA-B27 de 68 individuos no relacionados (109) reveló la existencia de seis variantes de B27. Estos subtipos se denominaron: *a*, *b*, *c*, *d*, *e* y *f*. Tres de ellos (*a*, *b* y *c*) tenían un pI semejante, mientras que el resto eran más básicos. Los subtipos *e* y *d* diferían aproximadamente en una unidad de carga respecto del *a*, y *f* en dos. Mediante estudios de familia se estableció que los subtipos *b*, *e* y *f* estaban determinados genéticamente. Estos subtipos tenían una reactividad distinta frente a un panel de antisueros y Acm que reconocían epítomos asociados a B27, y presentaban una distribución étnica distinta (Tabla II). La reactividad con el Acm M2, la frecuencia y el patrón de movilidad en IEF sugerían que el subtipo *a* correspondía al W, *e* al K y *b* y *c* al C, constituyendo el *d* y el *f* dos nuevos subtipos.

Posteriormente se unificó la nomenclatura de los subtipos de B27 denominándose como B\*2701 a B\*2706 según su pI (110) (Tabla III). Esta nomenclatura es la que utilizaremos en la exposición de este trabajo.

#### **1.9.2. Frecuencia de los subtipos de B27 y distribución étnica**

La frecuencia del antígeno HLA-B27 es aproximadamente del 3,4% en caucasoides, del 1,9% en negros americanos y del 1,6% en orientales. En algunas poblaciones como negros africanos su proporción es muy baja, mientras que en otras, como indios americanos y esquimales, es muy alta (111). Existe, además, una distribución diferencial de los subtipos de B27 en distintos grupos étnicos (103,104,109). En la población caucasiana, el 90% de los individuos B27+

**Tabla II. Reactividad serológica de los subtipos de B27<sup>a</sup>**

Subtipo <sup>b</sup>	Patrón en IEF	Acm				Aloantisuero KC-MJA
		P7.1	B27M1	P56.1	B27M2	
B27a	0 <sup>c</sup>	+	+	+	+	+
B27b	0	+	+	-	+/-	+
B27c	0	+	+	-	+/-	+
B27d	+1	+	+	+	+	-
B27e	+2	+	+	+	-	-
B27f	+2	+	+	+	-	+

<sup>a</sup> Los datos de esta Tabla se han extraído de Choo et al (109).

<sup>b</sup> Para nomenclatura actual de los subtipos de HLA-B27 ver Tabla IV

<sup>c</sup> El número de cargas está referido al subtipo B27a.

**Tabla III. Nomenclaturas de los subtipos de HLA-B27**

	Acm M2	CTL alogénicos	CTL restringidos	IEF
B*2701*	—	—	—	B27f
B*2702	B27M2-	B27K	B27.2	B27e
B*2703	—	—	—	B27d
B*2705	B27M2+	B27W	B27.1	B27a
B*2704	B27M2+/-	B27C	B27.3	B27b,c
B*2706	—	B27D	—	—

\* Nomenclatura adoptada en el 10º "Workshop" de Histocompatibilidad (110).

pertenecen al subtipo B\*2705. Los subtipos B\*2701 y B\*2702 parecen exclusivos de esta población, el primero de los cuales sólo se ha detectado en dos individuos, mientras que el segundo se presenta con una frecuencia del 10% entre los B27+. B\*2704 es un subtipo minoritario en caucasianos, siendo su frecuencia menor del 1%. Sin embargo, en la población oriental predomina el subtipo B\*2704 (55%) aunque B\*2705 está presente en una alta proporción (45%). B\*2706 parece un subtipo minoritario, detectado únicamente en individuos orientales, pero no hay estudios de población fiables. Los dos únicos representantes del subtipo B\*2703 pertenecen a Negros americanos. Recientemente, mediante la técnica de PCR ("polymerase chain reaction"), utilizando una sonda específica de B27 que incluía los nucleótidos codificantes de los aminoácidos 66-71, se ha detectado que 11 de 18 individuos B27+ de una población del Oeste de Africa (Gambia) pertenecían al subtipo B\*2703. Estos resultados indican que este subtipo, extremadamente raro o ausente en otros grupos étnicos, es común en los individuos B27+ del Oeste de Africa (112).

### 1.9.3. Análisis estructural de los subtipos de B27

Mediante secuenciación proteica se determinó la secuencia de aminoácidos de la porción extracelular de HLA-B\*2705, subtipo mayoritario en la población (46). Posteriormente se determinó la secuencia de nucleótidos del gen codificante de esta molécula (31,113,114). La secuencia de los subtipos B\*2702 (115), B\*2704 (116) y B\*2706 (117) se determinó mediante la realización de mapas peptídicos comparativos con B\*2705 y análisis de secuencia radioquímica. B\*2702 difiere en tres aminoácidos de B\*2705 que corresponden a un cambio de Asp por Asn en posición 77, uno de Thr por Ile en el residuo 80 y uno de Leu por Ala en el residuo 81. Posteriormente la secuencia de nucleótidos del gen de B\*2702 confirmó que no existía ninguna sustitución adicional (31). B\*2704 difiere de B\*2705 en los residuos 77 y 152 en los que se ha reemplazado un Asp por una Ser y una Val por Glu, respectivamente. B\*2706 posee los mismos cambios que B\*2704 y dos sustituciones adicionales en los residuos 114 y 116. La primera corresponde a un cambio de His a Asp y la segunda a uno de Asp por Tyr. Por comparación con la estructura tridimensional de HLA-A2, todos los residuos en que varían estos subtipos están situados en el sitio de unión del péptido, con sus cadenas laterales orientadas hacia la cavidad (41,42). Los residuos 77, 80 y 81 se encuentran en la hélice  $\alpha$  del dominio  $\alpha_1$ , 152 se encuentra en la de  $\alpha_2$  y 114 y 116 están situadas en las láminas  $\beta$  del

dominio  $\alpha_2$ , que constituyen la base del sitio.

#### **1.9.4. Localización de los determinantes serológicos de HLA-B27**

Se han descrito ciertos aloantisueros que distinguen algunos de los subtipos de B27, aunque la mayoría de ellos no poseen esta capacidad discriminatoria. Uno de ellos, el KC-MJA (109) puede distinguir a B\*2702 y B\*2703 del resto de los subtipos. El estudio de una serie de aloantisueros, procedentes de mujeres embarazadas, ha mostrado la existencia de múltiples epítomos serológicos en el segmento 77-81 (118). La reactividad de algunos de ellos depende del polimorfismo en el residuo 77, mientras que en otros casos son críticas las posiciones 80 y 81. Mediante ensayos de absorción de un aloantisuero humano, específico de B27, con transfectantes que expresaban moléculas híbridas B7/B27, se ha determinado que el dominio  $\alpha_1$  sería el responsable de la aloespecificidad serológica de B27 (64). Estos estudios han permitido distinguir dos epítomos en este dominio, uno asociado a los residuos 82 y 83 y otro al residuo 9.

Se han utilizado varias aproximaciones para establecer la localización de los determinantes de B27 reconocidos por Acm. La correlación de la estructura de los subtipos B\*2702 y B\*2704 con la reactividad del Acm M2 ha sugerido que el residuo 77 es crítico para el reconocimiento por este Acm (115,116). El análisis de la reactividad de híbridos B7/B27 con el Acm TM1 ha demostrado la contribución de los residuos 77 y 80 en el determinante reconocido por dicho Acm (64). Este tipo de ensayos han permitido definir también una asociación del determinante Bw4/Bw6 con los residuos R82 y/o G83. La reactividad de una serie de mutantes, en los que se reemplazó el residuo de Cys en posición 67, con los Acm ME1, GS145.2 y GSP5.3 guardaba una relación directa con el tamaño de la cadena lateral del aminoácido introducido (119). Estos Acm reaccionan con B27 y con otras especificidades B que no comparten el mismo aminoácido en esta posición, por lo que no parece que la Cys 67 participe en los epítomos reconocidos por estos Acm, aunque es probable su proximidad espacial a ellos. La comparación de las secuencias de las especificidades HLA reconocidas por el Acm ME1 (B27, B7, Bw42 y Bw22) sugiere la participación de los residuos 69 y 71 en el determinante reconocido por este Acm (52).

#### **1.9.5. Epítomos de HLA-B27 reconocidos por CTL**

La primera evidencia del reconocimiento diferencial de los subtipos de B27 por CTL alogénicos procede de los trabajos iniciales en los que se distinguieron estos subtipos por líneas

policlonales de CTL (100,104,105). Mediante estos estudios se detectó la existencia de varias moléculas B27 diferentes incluidas dentro de lo que se había considerado una especificidad serológica única. Sin embargo, no permitían definir la heterogeneidad ni la especificidad fina de las respuestas alorreactivas anti-B27. Posteriormente, varios trabajos realizados en nuestro laboratorio han analizado la reactividad frente a estos subtipos de un conjunto de CTL monoclonales, obtenidos por estimulación de linfocitos de sangre periférica (PBL) B27-, con células B\*2705+. En un primer estudio se aisló un clon que diferenciaba los subtipos B\*2702, B\*2704 y B\*2705 y presentaba una reactividad débil con Bw60 (120). La correlación de su patrón de reacción con la estructura de los subtipos reveló las principales características de los epítomos de CTL específicos de B27: 1) la complejidad estructural; 2) el efecto modulador del polimorfismo en el segmento 74-81 y 3) la importancia crítica del residuo 152. Estudios posteriores de la reactividad de 18 clones, generados contra B\*2705 en un mismo respondedor, pusieron de manifiesto una considerable heterogeneidad clonal, detectándose al menos 7 patrones de reacción diferentes frente a los subtipos de B27 (121,122). Las características generales de estos clones fueron: 1) algunos epítomos eran particulares de B\*2705; 2) inesperadamente, algunos clones presentaban reacción cruzada con un subgrupo de antígenos HLA-DR2. También, se detectaron algunos clones que reconocían a B40\* (B\*4002); 3) algunos clones presentaban una reactividad diferencial con los subtipos B\*2701 y B\*2703, indicando por primera vez la relevancia funcional de estos subtipos; 4) B\*2702 era reconocido por todos los clones con menor eficiencia que B\*2705; 5) ninguno de los clones generados tenía capacidad lítica frente a dianas que expresaban los subtipos B\*2704 o B\*2706, que comparten las sustituciones en los residuos 77 y 152. Esto sugería que estos residuos formaban parte de una estructura inmunodominante en el antígeno HLA-B\*2705. La baja respuesta de CTL obtenida cuando se utilizó el subtipo B\*2704 como estimulador apoyaba esta observación (123). En estos ensayos, sólo se pudo obtener un clon frente a B\*2704, que se caracterizaba por reconocer a todos los subtipos de B27, con excepción de B\*2703.

Existen pocos datos referentes al comportamiento de B27 como elemento de restricción, aunque se ha descrito que este antígeno actúa como un elemento de restricción especialmente eficiente en respuestas antivirales (124). B\*2702, B\*2704 y B\*2705 tienen un comportamiento diferencial en las respuestas citotóxicas frente al virus de la influenza y de EBV (100). Además, B\*2702 y B\*2705 son distinguibles por CTL anti-virales (influenza A y Sendai), restringidas por

B27, procedentes de ratones transgénicos (125). No se ha examinado el papel como elemento de restricción de los subtipos B\*2701, B\*2703 y B\*2706. Se han identificado dos péptidos virales que pueden ser presentados por HLA-B27, siendo reconocida esta combinación por CTL específicos. Uno corresponde a los residuos 265-279 de la proteína gag del virus HIV-1 (126) y otro que incluye los residuos 384-394 de la nucleoproteína del virus A de la gripe (127).

#### **1.9.6. Asociación entre HLA-B27 y la espondilitis anquilosante**

El 96% de los individuos que padecen espondilitis anquilosante (AS) en la población caucásica son B27+. Sin embargo, sólo un 2% de los B27, aproximadamente, padecen la enfermedad cuando no existe un historial familiar. En estos casos, la incidencia de la enfermedad puede ser superior al 20% (96). Existe una variabilidad en la susceptibilidad a esta enfermedad en distintas poblaciones, de forma que en negros norteamericanos sólo el 50% de los individuos espondilíticos poseen el gen de B27 (128). No se conocen las causas de esta asociación, aunque se descarta que sea debida a cambios estructurales entre las moléculas B27 de individuos sanos y enfermos, puesto que éstas no presentan ninguna diferencia a este nivel (114,129). Se han sugerido varias hipótesis para explicar esta asociación.

Se ha propuesto que la susceptibilidad a la enfermedad podría estar ocasionada por un gen en desequilibrio de ligamiento con el de B27 (128). Sin embargo, no se ha detectado ningún gen de susceptibilidad distinto a B27 en diversos estudios genéticos (130) y en estudios de polimorfismo de fragmentos de restricción (RFLP)(131). Además, esta hipótesis parece improbable a la vista de resultados recientes que han mostrado una relación directa entre la expresión de HLA-B27 en ratas transgénicas y el desarrollo de trastornos inflamatorios con características semejantes a las enfermedades asociadas a HLA B27 (132).

Geczy et al propusieron que la AS podría estar determinada por un factor proteico de origen bacteriano que modificara específicamente a B27 (133). Entre las principales evidencias experimentales que sustentan esta hipótesis se encuentran: 1) la reactividad cruzada que presentan algunos Acm generados frente a bacterias entéricas, como *Klebsiella*, con células B27+ de individuos enfermos; 2) la adquisición de las características de las células de individuos con AS, tras la incubación de células de individuos sanos con filtrados procedentes de cultivos bacterianos; 3) la generación de una respuesta de CTL por estimulación de células B27+ de individuos sanos con células procedentes de espondilíticos, HLA idénticos (134). No obstante,

estos hallazgos son polémicos ya que no han podido reproducirse en otros laboratorios.

La hipótesis del mimetismo molecular propone que determinados antígenos bacterianos compartirían alguna característica estructural con B27, de forma que la respuesta generada frente a una infección bacteriana podría dirigirse contra B27, causando daño tisular. Esta hipótesis se basa en la reactividad de algunos antisueros generados contra *Klebsiella pneumoniae*, *Yersinia pseudotuberculosis* o *Shigella psudotuberculosis* con B27 (135-137). Mediante comparación de secuencias se ha detectado la existencia de regiones de homología entre algunos antígenos bacterianos y varios segmentos comprendidos entre los residuos 61-84 de B27, situados en la región de hélice  $\alpha$  del dominio  $\alpha_1$  (138). El hecho de que antisueros generados contra péptidos sintéticos, que reproducen determinadas secuencias bacterianas, reaccionen con B27 sugiere la existencia de epítomos comunes en ambos tipos de proteínas. Toubert et al (139) han detectado que el Acm Ye-3, que reconoce un determinante en la región 77-81 de B27, reacciona con una proteína de *Y. pseudotuberculosis*. Recientemente, Ewing et al (140) han descrito la existencia de anticuerpos en sueros procedentes de individuos espondilíticos B27+ que se unen a péptidos procedentes de HLA-B27 y de la nitrogenasa de *K. pneumoniae*. Estos Ac reconocen dos epítomos (I y II) en el segmento 68-82 de B27. Los autores sugieren que la reacción cruzada entre B27 y *Klebsiella* podría deberse al segmento que define el epítomo I (residuos 68-75).

Los subtipos mayoritarios de B27 (B\*2702, 04, 05 y 06) se correlacionan de forma similar con la AS (141), lo que sugiere que la asociación con esta enfermedad podría estar determinada por una característica estructural común a todos ellos y específica de B27. Benjamin y Parham (142) proponen que la susceptibilidad a la enfermedad podría ser el resultado de una reacción de células T dirigida contra un péptido específico, generado en el transcurso de la enfermedad, con capacidad de unión a B27. Proponen que una cavidad proxima al residuo 45 ("pocket 45"), descrito en las estructuras tridimensionales de los antígenos HLA (43), jugaría un papel importante en la unión de este péptido, ya que presenta una combinación de residuos característica de B27, que está conservada en todos los subtipos. Además, uno de los residuos que lo componen, la Cys 67, podría proporcionar un punto de contacto con el péptido, por la formación de un enlace covalente a través de su grupo -SH. El hecho de que la enfermedad se restrinja a unos órganos determinados podría explicarse por la unión a B27 de un péptido

específico de tejido.

## 1.10. PAPEL DE LOS ANTIGENOS MHC EN EL RECONOCIMIENTO POR LA CELULA T

### 1.10.1. Receptor del antígeno de la célula T

El TCR es la estructura encargada del reconocimiento del complejo MHC/péptido. Se han descrito dos tipos de receptores, cada uno de ellos formados por dos cadenas unidas por un puente disulfuro:  $\alpha/\beta$  y  $\tau/\delta$  (143,144). Estas cadenas poseen regiones constantes y variables como las inmunoglobulinas y su región citoplasmática esta cargada positivamente. Ambos receptores están asociados no covalentemente con el complejo CD3 que consta al menos de cuatro cadenas no polimórficas:  $\tau$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  y  $\zeta$ , cargadas negativamente en su región intracitoplasmática. Recientemente, se ha descrito que dos cadenas más coprecipitan con CD3 en células tratadas con digoxina (145). Todas las cadenas de CD3 pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas, presentan una alta homología y contienen puentes disulfuro intracatenarios. Las cargas positivas de las cadenas del TCR podrían ser importantes para la interacción con CD3. Las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  (o  $\tau$  y  $\delta$ ) forman la estructura de reconocimiento del antígeno, mientras que el complejo CD3 está implicado en la transmisión de señales intracelulares.

El tipo de receptor más estudiado, y del que mejor se conoce su función, es el constituido por las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$ . Estas contienen secuencias V, D (cadena  $\beta$ ) y J, homólogas a las que constituyen el dominio variable de las Ig. Estos segmentos se reordenan en el proceso de maduración formando la región V, adyacente a una región constante (C) particular. Los genes que codifican el receptor  $\tau/\delta$ , cuya función es desconocida, poseen también secuencias V, D (en el caso de  $\delta$ ), J y C (144). En las Ig los puntos principales de contacto con el antígeno (regiones determinantes de la complementariedad o CDR) están constituidas por las tres regiones hipervariables (146). El TCR presenta una alta variabilidad en las tres regiones equivalentes a las de Ig, pero se concentra sobre todo en la correspondiente a CDR3 (147). En el TCR, como en Ig, las regiones equivalentes a CDR1 y CDR2 están codificadas por el gen V, mientras que CDR3 esta formado por la asociación de V y J (en  $\alpha$  y  $\tau$ ) y de V, D y J (en  $\beta$  y  $\delta$ ). Dada la similitud entre ambos grupos de moléculas, es probable que las regiones constantes de las cadenas de TCR estén plegadas en dominios como las de Ig. No obstante, existen características diferenciales entre estos dos receptores. El TCR generalmente utiliza un número

menor de segmentos V que las Ig, aunque presenta una mayor diversidad en la región V-J. La diversidad en esta región del TCR es debida a varios factores: diversificación en las regiones N, mayor número de segmentos J, flexibilidad en el punto de unión en el extremo 3' de las cadenas V y traducción de las regiones D en las tres fases de lectura posibles. Sin embargo, los efectos de hipermutación somática parecen ser específicos de Ig (147).

### 1.10.2. Reconocimiento del complejo MHC/péptido por el TCR

En las Ig las regiones variables de las cadenas pesada y ligera están apareadas de forma que las tres regiones CDR de cada dominio están agrupadas en los extremos de los brazos Fab de la molécula, generando el sitio de unión del antígeno (146). El sitio combinante de las Ig, visto desde la dirección del antígeno, está dispuesto de forma que las regiones CDR1 y CDR2 de  $V_L$  están separadas de las de  $V_H$ , alojándose las regiones CDR3 de los dos dominios en el espacio central (147). El análisis de complejos Fab/antígeno ha mostrado que las cadenas laterales de las seis regiones CDR interactuarían con el antígeno, consistiendo la interfase de unión en una superficie plana con depresiones y protuberancias que se acoplarían a la superficie del antígeno (148). Los datos de secuencia, la predicción de la estructura del TCR y la conservación de algunos residuos clave, sugieren que los dominios V del TCR y de las Ig están plegadas de forma semejante. Así, los sitios combinantes de  $V\alpha/V\beta$  y  $V\tau/V\delta$  del TCR serían similares a los de  $V_H/V_L$  en Ig (149). En base a esto, se ha propuesto un modelo de reconocimiento del complejo MHC/péptido por el TCR (147,149,150). La estructura del complejo MHC con un péptido unido en su superficie sería relativamente plana. Las hélices  $\alpha$  de MHC están separadas por una distancia equivalente ( $18 \text{ \AA}$ ) a la existente entre las regiones CDR1 y CDR2 de  $V_H$  y  $V_L$ . Así, si las estructuras del TCR e Ig fueran similares, las regiones equivalentes a CDR1 y CDR2 de  $V\alpha$  y  $V\beta$  interactuarían con las cadenas laterales de las hélices  $\alpha$  de MHC, permitiendo que la región central del TCR, equivalente a CDR3, contactara con el péptido. Esta región está constituida por los segmentos de mayor variabilidad de la molécula (V/J y V/D/J), lo que explicaría la capacidad de reconocimiento por parte del TCR de una gran variedad de péptidos, incluidos en una estructura de mayor tamaño y menor diversidad, como es el MHC. Podrían existir otras formas de interacción alternativas, pero esta parece la más probable a la vista de la correlación detectada, en algunos sistemas, entre secuencias V y determinados antígenos MHC (151). No obstante, no es esperable que en todos

los casos haya una correlación entre los residuos J y la restricción de un péptido particular, ya que los cambios de residuos del MHC pueden afectar la conformación del péptido unido y, posiblemente, su orientación en el sitio. Además, la superficie del complejo MHC es suficientemente grande para permitir la interacción del TCR con una disposición diferente a lo largo de las hélices  $\alpha$ . Así, los segmentos V $\alpha$  y V $\beta$  utilizados por las células T restringidas por la misma molécula MHC podrían ser diferentes.

### 1.10.3. Reconocimiento restringido: presentación de péptidos

Las células T reconocen a los antígenos extraños en el contexto de moléculas MHC propias, fenómeno que se denomina restricción (152). En general, aunque hay excepciones, las moléculas de Clase II actúan como elemento de restricción en las respuestas de linfocitos T cooperadores (153), mientras que las de Clase I restringen las respuestas de linfocitos T citolíticos (154).

Las proteínas antigénicas son degradadas en el interior de la célula, presentando las moléculas MHC los péptidos resultantes a las células T (154). El procesamiento de antígenos puede ser suplantado por incubación de las células diana con péptidos sintéticos o fragmentos de proteínas obtenidos por digestión con CNBr. Mediante ensayos *in vitro*, se ha demostrado la unión directa de péptidos sintéticos a moléculas de Clase II solubilizadas (155, 156) y se ha detectado una correlación entre dicha unión y la especificidad de las células T frente al complejo. No obstante, se ha observado unión de algunos péptidos a determinadas especificidades MHC, aunque su combinación no era reconocida por CTL (157).

Las primeras evidencias directas de unión de péptidos a antígenos de Clase I *in vitro* fueron proporcionadas por Chen y Parham (158) y Bouillot et al. (159). Como en el caso de Clase II, los péptidos se unían con mayor afinidad a sus elementos de restricción correspondientes, aunque puedan unirse a otras especificidades HLA. El estudio de Chen estimaba que menos del 0,3% de las moléculas HLA expresadas en la membrana podían asociarse a péptidos. Recientemente, mediante la aplicación del sistema descrito por Bouillot (159), se ha analizado la capacidad de unión de varias series de péptidos a distintos antígenos de Clase I (160-162). En estos ensayos, se ha estimado que del 10 al 25% de las moléculas HLA unirían péptidos. Los resultados han mostrado que la mayoría de los péptidos pueden unirse a varios antígenos HLA de Clase I, aunque la combinación resultante no sea reconocida por CTL específicos. Estos datos sugieren que la unión de péptidos sería permisiva y que la restricción en el

reconocimiento por CTL se debería, probablemente, a que algunos de estos péptidos no se generarían por los mecanismos de procesamiento naturales de la célula o a los procesos de selección del repertorio de células T.

La constante de asociación de péptidos a antígenos MHC, tanto de Clase I como de Clase II, es baja, pero una vez que se ha formado el complejo MHC/péptido este se disocia con dificultad. Esto contrasta con la capacidad de presentación de un gran número de péptidos distintos por las moléculas MHC. Se ha estimado (163) que es suficiente con 210-240 complejos Clase II/péptido en la superficie de una célula presentadora de antígeno (APC), para que tenga lugar la activación de células T, lo que supone un 0,1% de las moléculas de Clase II que restringen la respuesta. Esto indica que una célula puede presentar un gran número de péptidos distintos simultáneamente.

Numerosos estudios han mostrado que la longitud mínima de los péptidos reconocidos por CTL estaría en un rango de 5-20 aminoácidos (155,156,164-166). Las dimensiones del sitio de unión podrían acomodar un péptido en  $\alpha$ -hélice de 20 residuos, o uno de 8 si su conformación fuera extendida (42). Uno de los extremos del surco (cerca del residuo 77) está abierto, lo que permitiría que péptidos de mayor tamaño se extendieran fuera de él. Probablemente es necesario que el péptido tenga una longitud mínima que proporcione la conformación requerida para la interacción. Recientemente, se han aislado los péptidos asociados a antígenos de Clase I murinos en células infectadas con virus (167,168). Estos péptidos naturales se corresponden con los definidos previamente como mayoritarios por análisis con péptidos sintéticos, aunque su tamaño es menor, 8 residuos en un caso (167) y 9 en otro (168). La longitud similar de estos dos péptidos podría reflejar las dimensiones del sitio de unión del antígeno y sugiere que su conformación sería extendida. Además, dichos péptidos eran específicos de alelo, de forma que sólo se aislaron en células que expresan el elemento de restricción correspondiente. Dado que un antígeno MHC puede acomodar péptidos distintos en el mismo sitio de unión, es posible que la mayoría de ellos compartan algunas características estructurales. Se han propuesto distintos métodos de predicción de determinantes antigénicos, asociándose en algunos casos con motivos estructurales en la secuencia (169) y en otros con la capacidad de los péptidos para adquirir una conformación de  $\alpha$ -hélice anfipática (170). Sin embargo, las características del sitio de reconocimiento indican que no se requiere una estructura anfipática, ya que contiene residuos polares y cargados, así como aminoácidos no polares, y su forma permitiría la

interacción del péptido tanto con las hélices  $\alpha$ , como con las láminas  $\beta$  de la base y no con una sola superficie (42). La aplicación de modelos informáticos ha mostrado que es difícil acoplar péptidos con una conformación helicoidal en el sitio de unión del antígeno (150). En cuanto a los motivos lineales propuestos, se ha observado que péptidos que no los contienen pueden ser reconocidos por células T (171).

El repertorio de las células T frente a muchas proteínas va dirigido contra un número limitado de sitios dominantes y no contra todos los segmentos de la cadena polipeptídica. En general, el número de epítomos reconocidos en el contexto de Clase I es menor que en el caso de Clase II. La homología estructural entre los antígenos de Clase I y II (44), y el hecho de que son reconocidos por TCR similares (147), sugiere que los mecanismos de presentación de antígeno son equivalentes en ambos sistemas. Además, se han identificado motivos estructurales comunes en péptidos restringidos por Clase I y II (172).

Otros estudios se han encaminado a definir las posiciones del péptido que interaccionan con el MHC y con el TCR, mediante la sustitución sistemática de aminoácidos a lo largo de un péptido determinado. Los efectos de las sustituciones son variables y en muchos casos dependen del aminoácido introducido y de la especificidad fina del clon de CTL particular (154). En algunas ocasiones se ha analizado la presentación de estas series de péptidos análogos por moléculas MHC con sustituciones concretas en los dominios  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ . Generalmente los residuos localizados en el sitio de unión del antígeno, o que son accesibles al TCR, resultan en una pérdida o alteración del reconocimiento del péptido. Muchos de estos cambios tienen efectos diferenciales en clones de CTL individuales (74,76).

Otra cuestión sin resolver es donde y cuando se forman los complejos MHC/péptido. Generalmente los péptidos procedentes de proteínas solubles extracelulares se unen a antígenos de Clase II, mientras que los procedentes de proteínas sintetizadas en el interior de la célula, como las expresadas en la infección por virus o las codificadas por antígenos menores de histocompatibilidad, se unen a los de Clase I (154). No parece necesaria la expresión de las proteínas antigénicas, reconocidas en el contexto de Clase I, en la superficie celular (173), existiendo sin embargo, una correlación entre su tasa de degradación en el citoplasma de la célula infectada y el reconocimiento de epítomos por células T (174). Las vías de procesamiento y presentación de los antígenos reconocidos en el contexto de Clase I y II son distintas. Las proteínas extracelulares serían captadas por la célula y transportadas a un compartimento

endosomal periférico, donde tendría lugar su procesamiento (175,176). Los antígenos de Clase II alcanzarían este compartimento desde el retículo endoplásmico (RE) (176), y se unirían a los péptidos generados en el procesamiento. Durante el trayecto desde el RE hasta la membrana celular, las moléculas MHC están asociadas transitoriamente con una proteína denominada cadena invariante (177). La cadena invariante previene la asociación de péptidos en el RE y el Golgi y dirige el transporte intracelular de los antígenos de clase II hasta el compartimento endosómico, donde se disocia y degrada, posibilitando la unión de péptidos a clase II (178,179). No obstante, en situaciones excepcionales podría haber una unión de péptidos a Clase II en el RE (180). Los péptidos que se asocian con moléculas de Clase I procederían de proteínas procesadas en el citoplasma celular, aunque en algunos casos la degradación podría ocurrir en el RE (181). Los péptidos serían transportados hasta el RE, donde se unirían a las moléculas de Clase I, siendo transportados los complejos resultantes a la superficie celular. Recientemente se han secuenciado una serie de genes, localizados en la región MHC de ratón (182,183), rata (184) y humanos (185) que podrían ser los responsables del transporte de péptidos desde el citoplasma hasta el RE. Estos genes parecen codificar proteínas pertenecientes a la superfamilia "ABC" (ATP-binding-cassette), que incluye una serie de proteínas encargadas del transporte de iones, moléculas de pequeño tamaño y péptidos a través de membranas. Se ha propuesto la existencia de una proteína en el RE con capacidad de unión a moléculas de Clase I, de forma semejante a la cadena invariante, cuya función fuera retener a dichas moléculas hasta que estuvieran asociadas con péptidos (186). Recientemente, se ha observado que la asociación con péptidos es necesaria para el plegamiento correcto de las moléculas de Clase I, su asociación con la  $\beta_2m$  y su transporte a la membrana celular (187). El ensamblaje de moléculas MHC de Clase I en lisados de células solubilizadas por detergentes depende de las concentraciones de péptido y de  $\beta_2m$  (188). Además, se ha demostrado que la asociación del antígeno HLA-B27 con la  $\beta_2m$ , en sistemas de traducción de mRNA libres de células, depende de un péptido específico, siendo necesaria la presencia de vesículas microsomales que mimeticen las membranas del RE (189). No obstante, podría haber un transporte de moléculas de Clase I, libres de péptido, hasta la superficie celular, si bien estas son degradadas rápidamente a la temperatura fisiológica (190). Estas moléculas pueden estabilizarse por la adición de péptidos exógenos.

#### 1.10.4. Reconocimiento alorreactivo

La estimulación de linfocitos con células que expresan antígenos MHC diferentes provoca una respuesta de células T, tanto cooperadoras como citotóxicas, dirigida contra estos antígenos extraños, que se denomina alorreactividad. No se conocen las bases moleculares que determinan estas respuestas, aunque se ha propuesto que podrían implicar el reconocimiento de motivos polimórficos en el aloantígeno intacto. En este caso el reconocimiento podría ser independiente de los péptidos unidos, o podría implicar moléculas MHC "vacías" (191). Otra hipótesis sugiere que las respuestas alorreactivas estarían mediadas, análogamente a las restringidas, por péptidos unidos al aloantígeno (192,193). Estos péptidos procederían de proteínas degradadas en el metabolismo celular. La presencia de una gran variedad de péptidos diferentes, asociados con el aloantígeno, explicaría la alta frecuencia de precursores de células T activados en las respuestas alorreactivas (194), en contraposición con lo que ocurre en las restringidas, en las que la frecuencia de precursores contra un antígeno dado es menor. La teoría alternativa propone que la alta frecuencia de precursores alorreactivos se debería a que un gran número de clones de CTL poseerían TCR con capacidad para unirse débilmente a todas las moléculas de Clase I, independientemente de si están o no asociadas con péptidos. Estos CTL lisarían eficientemente a las células diana debido a que la alta densidad del ligando compensaría la baja afinidad del TCR (195).

Existe evidencia de unión de péptidos propios a moléculas MHC (196), lo que indica que, probablemente, no existen mecanismos para distinguir lo propio de lo no propio a nivel de unión de péptidos a moléculas MHC. Esta discriminación ocurriría en el timo mediante la selección del repertorio de TCR mediada por los antígenos MHC, con péptidos endógenos unidos constitutivamente a ellos.

Un gran número de estudios sugieren que el reconocimiento alogénico está mediado por péptidos:

- 1.- La preincubación de CTL específicos de A2 con péptidos derivados de la secuencia de este antígeno, correspondientes a los residuos 98-113 del dominio  $\alpha_2$  (197) y del segmento 56-59 en el dominio  $\alpha_1$  (198), inhibían el reconocimiento de dianas A2+. Además, células diana Aw69+ se sensibilizaban a la lisis por uno de los clones cuando se incubaban con el péptido A2<sub>56-59</sub>, sugiriendo que la combinación Aw69-péptido reconstituía el epítipo reconocido por el clon en A2. El péptido incluía tres de los seis residuos de diferencia entre A2 y Aw69,

todos ellos localizados en el dominio  $\alpha_1$ . El péptido podría adoptar una estructura en  $\alpha$ -hélice, semejante a la adoptada por dicha secuencia en la proteína nativa, resultando su unión con Aw69 en la yuxtaposición de dos hélices  $\alpha$  equivalentes a los dominios  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  de A2. Los trabajos de Song et al. (199) y Olson et al. (200) en ratón llegan a unas conclusiones semejantes. Este conjunto de datos puede interpretarse como evidencias de que péptidos derivados de antígenos HLA mimetizarían la región del antígeno HLA intacto que es reconocida por el TCR. Sin embargo, la interpretación alternativa a estos resultados sería que, al menos en algunos casos, el reconocimiento por CTL alorreactivos podría constituir un caso especial de restricción por MHC en el que las moléculas degradadas de antígenos de Clase I asumirían el papel de antígeno extraño y las intactas el de elemento de restricción.

- 2.- Maryanski et al. (201) generaron respuestas específicas de HLA-Cw3 y A24, restringidas por el antígeno murino H-2K<sup>b</sup>, por estimulación con células P815 transfectadas con estos antígenos. Estos CTL tenían capacidad lítica frente a células P815 sin transfectar, incubadas con péptidos sintéticos, correspondientes al extremo C-terminal del dominio  $\alpha_2$  (202,203). Aunque este sistema constituye un caso de reconocimiento restringido, muestra que péptidos derivados de antígenos MHC pueden ser presentados por otros antígenos MHC y sugieren que en algunos casos estos péptidos podrían estar implicados en las respuestas alorreactivas.
- 3.- Algunos péptidos, derivados de antígenos de Clase II, tienen capacidad para unirse al mismo antígeno MHC del que procede su secuencia y a otra molécula de Clase II distinta (204). En ocasiones, se han detectado clones de células T alogénicas que reconocen péptidos derivados de antígenos de Clase I en el contexto de Clase II (205).
- 4.- Arnold et al (206) realizaron una serie de estudios en ratones transgénicos que expresaban una molécula de H-2K<sup>k</sup> que era secretada. Sus resultados implicaban la presencia de dos poblaciones de CTL alorreactivas, una pequeña fracción reconocerían al aloantígeno como un péptido antigénico presentado por otras moléculas de Clase I, mientras que la mayoría de ellas requerirían la expresión del aloantígeno intacto.
- 5.- Algunas células T alogénicas parecen reconocer péptidos específicos de tejido, derivados de una proteína particular o de un procesamiento diferencial (207-209). Sherman et al (210) proporcionaron una evidencia directa de que el reconocimiento por parte de algunos clones de CTL alogénicos implicaría péptidos derivados de proteínas citoplasmáticas. Estos péptidos

parecían específicos de ciertas líneas celulares y su tamaño aproximado era de 10-15 aminoácidos. Buus et al (211) aislaron un material de bajo peso molecular asociado a complejos de Clase II murinos (Ia), que era de naturaleza peptídica y podía inhibir específicamente la unión de péptidos a antígenos Ia. La gran heterogeneidad en el tamaño e hidrofilia de estos péptidos endógenos sugería su procedencia de múltiples proteínas diferentes.

### 1.11. MOLECULAS DE ADHESION

La interacción de los linfocitos T con las células diana requiere, además del reconocimiento del complejo MHC/péptido por el TCR específico, la participación de una serie de moléculas de adhesión. Los experimentos realizados por Spits et al (212) sugieren que en una etapa previa a la interacción del TCR se establecen contactos inespecíficos entre CTL y diana. Dicha etapa puede tener lugar en ausencia del antígeno relevante, es dependiente de  $Mg^{2+}$  y se inhibe por Acm dirigidos contra una serie de moléculas expresadas en la superficie del CTL: LFA-1, HLA de Clase I, CD8 y CD2 (212-214). La fuerza de esta adhesión inicial depende del número de moléculas expresadas en la célula diana y del estado de activación de las células T. En una segunda etapa se estabilizan los conjugados mediante la interacción del TCR con el complejo MHC/péptido. Esta fase es dependiente de  $Ca^{2+}$  y se inhibe por Acm dirigidos contra el TCR, CD3, HLA de Clase I, CD8 y CD4 (212,215,216). La interacción del TCR conduce a la generación de una serie de señales que desencadenan la liberación de los mediadores de la lisis celular. La señal lítica requiere la ocupación con el antígeno específico de un número suficiente de receptores, aunque ésta no es la única condición necesaria para la activación. Si la concentración de antígeno es limitante, se precisaría el estímulo adicional de otras interacciones que podría ser proporcionado por las mismas moléculas que median el proceso de adhesión (217).

Estudios posteriores identificaron los ligandos de estas moléculas de adhesión en la célula diana. LFA-1 se puede unir a dos moléculas distintas: ICAM-1 e ICAM-2 (218,219), mientras el único ligando descrito para CD2 es LFA-3 (220). El TCR se une al complejo MHC/péptido y CD8 y CD4 se unen a zonas constantes de los antígenos MHC de Clase I y II, respectivamente (221). Las moléculas de adhesión podrían jugar también un papel importante en la transmisión de señales, ya que los Acm dirigidos contra ellas pueden modular la función

de los linfocitos T (217,221,222).

LFA-1 pertenece a la familia de las integrinas, mientras que el resto de las moléculas de adhesión pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas (223). Consta de dos cadenas:  $\alpha$  (CD18), de 180 Kd y  $\beta$  (CD11a), de 95 Kd. CD11a tiene un dominio de 200 aa que no comparte con otras integrinas y posee tres sitios de unión para cationes divalentes. CD18 posee un dominio extracelular rico en Cys. LFA-1 se encuentra en leucocitos y parece jugar un papel crítico en la activación de linfocitos T (224).

ICAM-1 (CD54) consta de cinco dominios y su PM oscila entre 90 a 114 Kd. Es una proteína muy glicosilada (tiene 7 sitios de N-glicosilación) y presenta una heterogeneidad de glicosilación en distintos tipos celulares. Se ha detectado en una amplia gama de tipos celulares y su expresión es mayor en determinados estados de diferenciación o después de la exposición de las células a mediadores de la inflamación. Es inducible por IL-1, IFN- $\gamma$  y TNF (224,225). La expresión de ICAM-1 es de crucial importancia para la activación de células T, en condiciones limitantes de expresión de antígenos MHC (226). ICAM-2 consta de dos dominios homólogos a los dos dominios N-terminales de ICAM-1, que parecen ser los responsables de su unión a LFA-1. Tiene un PM de 28 Kd y posee 6 sitios de N-glicosilación. Se encuentra en diversos tipos celulares y su expresión no es inducible por citoquinas. El modo de actuación de ICAM-1 e ICAM-2 es diferente en cuanto a sus sitios de acción y su forma de regulación (217,219).

CD2 tiene un PM de 40-45 Kd y presenta 3 sitios de N-glicosilación. Su porción intracitoplásmica es larga y contiene una región rica en Pro y en residuos básicos, altamente conservada entre distintas especies, lo que sugiere que podría ser importante para su función (217,221,223). Se ha detectado en timocitos, linfocitos T y en la mayoría de las células NK ("natural killer"). CD2 puede transmitir una señal que aumenta o actúa sinérgicamente con las señales del TCR. Las combinaciones de algunos Acm dirigidos contra determinados epítomos de esta molécula, o de uno de estos anticuerpos y LFA-3, provocan la activación de células T. Sin embargo la interacción de CD2 y LFA-3 no parece ejercer este efecto (223,224).

LFA-3 (CD58) es una proteína muy glicosilada, de 55-70 Kd que se expresa prácticamente en todas las células (221). Se han descrito dos formas de esta molécula, generadas por un procesamiento alternativo de su mRNA. Una está anclada a la célula por una región transmembrana convencional y posee un segmento citoplásmico de 12 aa, mientras que la otra

estaría unida mediante un enlace fosfatidil-inositol. Ambas formas median la adhesión dependiente de CD2 y están implicadas en el funcionamiento de la célula T (223).

La interacción entre LFA-1 e ICAM-1 es dependiente de la temperatura y de  $Mg^{2+}$  y requiere que el citoesqueleto este intacto, mientras que la de CD2 y LFA-3 no depende de estos factores (217). Las características diferenciales entre estos dos tipos de interacciones sugiere que, aunque ambos pueden ocurrir simultáneamente, la contribución de cada uno de ellos puede variar según las circunstancias. Estas moléculas contribuyen a la formación de conjugados e incrementan la capacidad de las células activadas para interactuar in vivo, aunque también podrían contribuir a la generación de una señal de transducción para la activación celular.

Recientemente se ha descrito que la estimulación de células T con ésteres de forbol, o con Acm dirigidos contra el TCR (227), CD2 o CD3 (228) provoca la transformación de LFA-1 a un estado de alta avidéz, que no implica un aumento de la densidad de esta molécula en la superficie celular. Este estado de activación de LFA-1 es transitorio, excepto cuando el estímulo se debe a Acm anti-CD2, en cuyo caso es permanente. Esto sugiere que en ausencia de antígeno, el equilibrio favorece que los linfocitos estén libres y móviles. El contacto del TCR con el antígeno generaría señales intracelulares que inducirían un estado de alta avidéz en LFA-1, incrementando específicamente su interacción con ICAM-1. Así, se desencadenaría un mecanismo de amplificación de la adhesión que podría incrementar la avidéz de las interacciones celulares, requiriéndose un número menor de interacciones TCR-antígeno. El hecho de que este estado sea transitorio proporcionaría un mecanismo para regular la deadhesión de los linfocitos. Como los ésteres de forbol, los Acm anti-CD2 y CD3 inducen la activación de la proteín-quinasa C (PKC)(229,230), por lo que se ha propuesto que estas moléculas podrían ser las responsables de la generación de la señal requerida para la activación de LFA-1, mediante la fosforilación de la cadena  $\beta$  de LFA-1 (231) o de alguna proteína del citoesqueleto, como la talina (232).

CD8 se describió inicialmente como un homomultímero de una subunidad de 34 Kd (cadena  $\alpha$ ), identificándose posteriormente una segunda cadena ( $\beta$ ) que parece expresarse simultáneamente con la  $\alpha$  en células de sangre periférica (233). No se conoce la proporción de homomultímeros o heteromultímeros de CD8 en la superficie celular, no obstante la transfección de la cadena CD8 $\alpha$  sería suficiente para la actividad biológica de la molécula (234).

CD8 y CD4 poseen dominios N-terminales semejantes a las regiones variables (V) de las cadenas ligeras de inmunoglobulinas y contienen un segmento citoplásmico básico. Estas proteínas no son polimórficas y su función parece similar, diferenciándose en que CD4 interacciona con moléculas MHC de Clase II y CD8 con MHC de Clase I (235). CD8 contacta con el dominio  $\alpha_3$  de estos antígenos, siendo críticas las posiciones 227 (236) y 245 (237) de este. Salter et al (238) han definido tres regiones de  $\alpha_3$ , comprendidas entre los residuos 223-229, 233-235, 245-247, relevantes en la unión CD8. La primera de ellas jugaría un papel dominante y corresponde a un segmento altamente conservado en los antígenos HLA, que se halla expuesto en la molécula y está cargado negativamente.

Los Acm anti-CD8 bloquean la fase de adhesión de la reacción citolítica, pero sus efectos son generalmente débiles y variables. Esto ha llevado a considerar a CD8, al igual que CD4, como moléculas de adhesión menores en comparación con CD2 y LFA-1. Se ha detectado que la susceptibilidad a la inhibición por Acm anti-CD8 depende inversamente de la densidad de su ligando (MHC de Clase I) (239), y de la concentración y estructura primaria del péptido antigénico (240). Estos datos sugieren que CD8 contribuye a la avidez de la interacción entre el CTL y la célula diana en situaciones en las que la afinidad entre el TCR y el antígeno es baja o en los casos en los que hay una concentración baja de antígeno. Además, esta capacidad inhibitoria diferencial dependería de la afinidad de unión de CD8 a la molécula MHC de Clase I (238). Los Acm anti-CD8 inhiben también la fase lítica del proceso de citotoxicidad, lo que indica una posible participación de esta molécula en la activación del CTL (216). Numerosos experimentos han sugerido que CD8 podría estar implicado en la transmisión de señales intracelulares que actúen, bien sinérgicamente con las proporcionadas por el complejo TCR/CD3, o bien de forma negativa (221,222,235). Además, se ha observado que el tratamiento de CTL con Acm anti-TCR solubles activa la adhesión de CD8 a antígenos de Clase I, resultando en la generación de una señal necesaria para iniciar la respuesta cuando los niveles de ocupación del TCR son bajos (241). Estos procesos podrían estar regulados por la fosforilación de CD8 (242) y por su asociación con la protein-quinasa P56<sup>lck</sup> (243). Múltiples evidencias sugieren que CD8 se une al mismo complejo MHC/péptido que el TCR formando un complejo trimolecular que sería crítico para la activación de la célula T (244,245). CD8 podría proporcionar una señal que contribuyera a la activación o podría funcionar como

elemento de asociación para estabilizar la interacción del TCR y MHC/péptido.

### **1.12. RECONOCIMIENTO DE ANTIGENOS MHC EN TRANSFECTANTES MURINOS**

En muchas ocasiones se han tratado de estudiar los requerimientos para el reconocimiento de células diana por linfocitos T mediante la transfección de genes HLA en células murinas. Sin embargo, en general, las líneas celulares empleadas en estos estudios no eran susceptibles a la lisis por CTL humanos. Así, en la mayoría de los casos los transfectantes en células L murinas no son sensibles a lisis (246-248) o son lisados con una eficiencia baja (249), incluso cuando el grado de expresión del antígeno HLA es alto o están cotransfectados con  $\beta_2m$  humana (247,248). Sólo se ha descrito un caso en el que la citotoxicidad era eficiente (67). La línea celular P815-HTR, seleccionada a partir del mastocitoma murino P815, por su alta eficiencia de transfección (250), muestra una mayor sensibilidad a la lisis por CTL humanos. Así, células P815 transfectadas con diferentes antígenos HLA son reconocidas eficientemente, tanto por CTL alogénicos (249, 251) como restringidos (252). No obstante, se ha observado una heterogeneidad considerable en la capacidad de clones de CTL alogénicos para lisar células P815 transfectadas con HLA-A2 (253). La falta de reconocimiento de estos transfectantes se ha correlacionado con una interacción menos eficiente entre las moléculas de adhesión de ambas especies o con la ausencia de alguna de ellas. Del mismo modo, se ha correlacionado la incapacidad para lisar transfectantes en otros tipos celulares murinos con la aidez del clon (254).

Varios estudios sugieren que la línea P815 expresa un ligando para LFA-1, como son la inhibición por Acm anti-LFA-1 de la formación de conjugados inespecíficos (212) o de la citotoxicidad de transfectantes en P815 por CTL humanos (253). Este ligando podría ser el homólogo murino de ICAM-1, ya que se ha observado reactividad de células P815 con un Acm dirigido contra esta molécula (255). Además, ICAM-1 murino puede interaccionar con LFA-1 humano (256). No se ha detectado inhibición de la lisis de transfectantes murinos por Acm anti-CD2, lo que hace suponer que no existe un ligando para estas moléculas en las células de ratón (253,254).

Bernhard et al (257) observaron una correlación entre la capacidad lítica de una serie de clones de CTL anti-HLA-A2 o B7 frente a células EL-4, transfectadas con estos antígenos, y la especificidad del clon. Los resultados sugerían que en algunos transfectantes se habrían

alterado o perdido, tras su expresión en la célula murina, los epítomos reconocidos por el clon. En algunos casos esta falta de reconocimiento xenogénico podría motivada por el reconocimiento por parte del clon de un péptido específico de tejido (210).

## **2.- OBJETIVOS**

## 2. OBJETIVOS

- 1.- Análisis de la contribución de la región hipervariable 63-84 en la aloespecificidad serológica del antígeno HLA-B27. Este segmento es uno de los de mayor hidrofilia de la molécula y está expuesto en la superficie de ésta, formando parte de una de las hélices  $\alpha$ . Este estudio se realizó mediante la generación de antisueros dirigidos contra el péptido 63-84, derivado de la secuencia de B\*2705, y el examen posterior de su reactividad frente a un panel de líneas celulares B27- y B27+, expresando los distintos subtipos de este antígeno.
- 2.- Caracterización estructural de los subtipos B\*2701 (B27f) y B\*2703 (B27d) mediante mapas peptídicos comparativos y análisis de secuencia radioquímica. Estos subtipos se distinguen funcionalmente de B\*2705, ya que son reconocidos de forma diferencial por algunos anticuerpos específicos de B27 y por CTL alogénicos. La determinación de las posiciones en que difieren los subtipos nos permite definir qué regiones de la molécula de B27 son funcionalmente relevantes. Además, nos aporta información acerca de los mecanismos de diversificación que han actuado en su generación, y sobre la importancia inmunológica del polimorfismo de subtipos.
- 3.- Análisis de la contribución de la avidéz de CTL humanos en el reconocimiento y lisis de células murinas que expresan el antígeno HLA-B\*2705. Se realizó mediante el análisis de la reactividad de siete CTL monoclonales anti-B\*2705 frente a la línea murina P815, cotransfectada con los genes de B\*2705 y  $\beta_2m$  humana, en función de la especificidad fina y de la avidéz de dichos CTL.
- 4.- Análisis de la relevancia de cada una de las posiciones polimórficas de los subtipos de B27 en el reconocimiento por CTL. Para ello se analizó el patrón de reactividad de 21 clones de CTL alorreactivos específicos de B27 frente a una serie de transfectantes en la línea humana HMy2.CIR, que expresaban distintos mutantes de dicho antígeno. Los mutantes reproducían, individualmente o en algunas combinaciones, los cambios de los subtipos de B27. Este estudio se centró en determinar tres puntos concernientes a la respuesta alorreactiva anti-B27: A) la diversidad de las especificidades clonotípicas; B) las características estructurales

de los epítomos reconocidos por dichos clones; C) el papel de las posiciones individuales en el reconocimiento diferencial de los subtipos de B27.

- 5.- Examen de la conservación y alteración de los epítomos reconocidos por CTL específicos de B27, tras la expresión de este antígeno en células murinas. Se llevó a cabo mediante la comparación de la reactividad de cinco clones de CTL anti-B27 con dos series de transfectantes, en la línea humana HMy2.CIR y en la murina P815, que expresaban distintos mutantes de HLA-B27. El propósito de este estudio fue: A) determinar qué grado de variación en la estructura de los epítomos era compatible con el reconocimiento de antígenos HLA expresados en células murinas y B) determinar si dichos epítomos implicaban la presencia de péptidos unidos a HLA-B27.

### **3.- MATERIALES Y METODOS**

### 3. MATERIALES Y METODOS

#### 3.1. LINEAS CELULARES

Para la determinación de la especificidad de antisueros generados contra un péptido sintético se utilizó un amplio panel de líneas linfoblásticas (LCL) que incluía líneas B27- y B27+ que expresaban los distintos subtipos de este antígeno. El tipaje HLA de dichas LCL se detalla en la Tabla IV.

Como fuente de material para la purificación radioquímica de HLA-B\*2701, B\*2703 y B\*2705, se utilizaron las LCL LH (A24,24; B\*2701,8), CH (A31,32; B\*2703,18) y LG2 (A2,2; B\*2705, \*2705), respectivamente.

Las líneas celulares empleadas para transfecciones fueron HMy2 CIR (258) y P815-HTR (250). La primera es de origen humano y procede de la línea LICR.LON.HMy2 tras irradiación gamma y selección con Acm anti-HLA de Clase I y complemento. Debido a esta selección, presenta un bajo nivel de antígenos HLA de Clase I endógenos, motivo por el cual fue elegida para nuestros ensayos. P815-HTR es una línea, seleccionada por su alta eficiencia de transfección, procedente del mastocitoma murino P815.

Todas las LCL se cultivaron en RPMI 1640 conteniendo 10% (v/v) de suero de ternera fetal, cuyo complemento había sido inactivado por calentamiento a 56°C durante 30 min (STFi), glutamina 2 mM, 5 UI/ml de Penicilina y 20 µg/ml de Estreptomicina (Flow Laboratories). Tanto las líneas empleadas para la transfección, como los transfectantes posteriores, fueron mantenidos en cultivo en "Dulbecco's Modification of Eagle's Medium" (DMEM) (Flow Lab.) suplementado con 10% de STFi y Glutamina 2 mM. Durante el periodo de selección, el medio de cultivo se suplementó también con 1,5 mg/ml de G418 (Gibco). Los pocillos seleccionados para los ensayos se mantuvieron un mes más en medio selectivo, cultivándose posteriormente en medio normal. Todas las líneas se mantuvieron en estufa a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>.

#### 3.2. LINFOCITOS T CITOLITICOS ANTI-HLA-B27

En este estudio se ha utilizado un conjunto de clones de linfocitos T citolíticos alorreactivos anti-HLA-B27. Parte de ellos habían sido caracterizados con anterioridad y fueron generados por estimulación de células B27- con la línea linfoblástica LG15, que expresa el subtipo B\*2705 (121,122), o bien con la LCL KNE, que expresa el subtipo B\*2704 (123). Otro grupo de clones, recientemente caracterizado, fueron obtenidos por estimulación de distintos respondedores B27-

**Tabla IV. Panel de líneas celulares analizadas con el antisuero anti-péptido 63-84.**

HLA-B27-		HLA-B27+		
Línea celular	Fenotipo	Línea celular	Subtipo	Fenotipo
JY	(A2,2;B7,7)	MT	B*2705	(A2,2;B27,27)
MEIN	(A1,3;B7,w57)	LG-2	B*2705	(A2,2;B27,27)
OT	(A2,24;B7,w60)	LG15	B*2705	(A32,32;B27,27)
LB	(A28,28;Bw60,w60)	R15	B*2705	(A3,3;B27,35)
SWEIG	(A29,29;B40,40)	R16	B*2705	(A19,2,26;B17,27)
DK-1	(A2,33;B40,44)	R69	B*2705	(A3,24;B7,27)
JAH	(A2,2;Bw62,w62)	WIJT	B*2705	(A2,11;B27,35)
CLA	(A2,3;B8,w35)	ZOE	B*2705	(A2,3;B27,35)
B8N	(A3,9;B8,15)			
IDF	(A26,28;B18,38)	AP	B*2702	(A24,26;B13,27)
K562	(No expresa HLA)	R34	B*2702	(A2,9;B18,27)
		R56	B*2702	(A2,11;B14,27)
		389	B*2702	(A24,28;B27,40)
		CHR	B*2702	(A2,3;B27,35)
		KRIJ	B*2702	(A2,11;B27,35)
		LH	B*2701	(A24,24;27,8)
		WEWAK-1	B*2704	(A11,24;27,w62)
		SIA	B*2704	(A2,24;27,w60)
		LIE	B*2706	(A2,11;B5,27)

con las líneas B\*2705+, LG15 y R69 (D. López, resultados no publicados). La especificidad de los clones está detallada en las Tablas V y VI. Los clones se crecieron en RPMI 1640 suplementado con 10% de suero humano del grupo AB y 20 UI/ml de interleukina-2 recombinante (Hoffman-La Roche). Se mantuvieron en estufa a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> y se reestimularon periódicamente con LCL B\*2705+ y PBL B27- (como células "feeder") irradiadas a 6000 y 4000 Rads, respectivamente.

### 3.3. ANTICUERPOS MONOCLONALES

Los Acm empleados fueron: W6/32, dirigido contra un determinante monomórfico de los antígenos HLA de Clase I (259), ME1 (anti-HLA-B7+B27+B22) (260), PA2.1 (anti HLA-A2) (261), B2.62.2 (262) y BBM.1 (263) (anti- $\beta_2m$  humana), SPV-T3b (anti-CD3) (264), Bear-1 (anti-CD11b) (265) y B9/4 (anti-CD8) (266). Se utilizó también un antisuero de conejo anti-cadena pesada de HLA de Clase I (anti-H) (267).

Los Acm W6/32 y BBM.1, utilizados en los ensayos de citotoxicidad mediada por complemento y en citometría de flujo, respectivamente, procedían de sobrenadantes de cultivo de las células del hibridoma. En el resto de los ensayos todos los Acm se usaron a diluciones apropiadas de líquido ascítico. El Acm PA2.1 se purificó por precipitación de la fracción gamma-globulina del líquido ascítico con (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M. Su concentración, determinada espectrofotométricamente, era de 14,6 mg/ml. El antisuero anti-H se empleó sin diluir.

### 3.4. CITOTOXICIDAD MEDIADA POR COMPLEMENTO

Para la realización de estos ensayos, se marcaron las distintas LCL, a una concentración de de 2-3 x 10<sup>6</sup> células en 100  $\mu$ l de STFi, con 100  $\mu$ Ci de cromato sódico (<sup>51</sup>Cr) (Amersham). Después de 1h, las células marcadas se lavaron 4 veces con RPMI 1640 suplementado con 5% de STFi y una con medio solo, resuspendiéndose posteriormente en medio de cultivo + 10% STFi a una concentración de 3 x 10<sup>4</sup> células en 40  $\mu$ l. Los ensayos se realizaron en placas de 96 pocillos de fondo plano (Sterilin), añadiendo en cada pocillo 40  $\mu$ l de la suspensión celular junto con 20  $\mu$ l de distintas diluciones de los antisueros, cuyo complemento había sido inactivado previamente (56°C, 30 min). Tras una incubación de 30 min a temperatura ambiente (TA) con el antisuero, se añadieron 20  $\mu$ l de complemento de conejo (Behring) diluido 1/2 (v/v), que se dejó actuar durante 1 h a TA. Transcurrido este tiempo se añadieron 120  $\mu$ l de RPMI en cada pocillo y se centrifugaron las placas a 120 x g durante 5 min. El nivel de lisis se determinó por

**Tabla V. Especificidad fina de los clones de CTL anti-B\*2705, utilizados en el análisis de transfectantes P815-B27 +**

CTL	Antígeno expresado en la célula diana						
	B*2705	B*2701	B*2702	B*2703	B*2704	B*2706	B40*
1	+++	—	++	+++	—	—	—
26	+++	—	++	+++	—	—	—
29	+++	—	++	+++	—	—	—
2	+++	+++	—	—	—	—	+
15	+++	+++	—	—	—	—	+
48	+++	+++	+	+	—	—	+++
40	+++	—	—	—	—	—	—

Los datos de esta Tabla se han extraído de Aparicio et al (126).

Tabla VI. Patrón de reacción de los clones de CTL anti-B\*2705, utilizados en el análisis de mutantes, con los subtipos de B27 <sup>a</sup>

Patrón	CTL	B*2705	B*2701	B*2702	B*2703	B*2704	B*2706
A	23 <sup>b</sup>	+++ <sup>d</sup>	-	-	-	-	-
	40	+++	-	-	-	-	-
	64DRF	++	-	-	-	-	-
	102DRF <sup>c</sup>	+	-	-	-	-	-
	212DRD	+	-	-	-	-	-
	17A2	++	-	-	-	-	-
	B54	++	-	-	-	-	-
	G36	+	-	-	-	-	-
B	46	++	-	-	++	-	-
	GM7	+++	-	-	++	-	-
	5A2	++	-	-	+	-	-
C	2 <sup>c</sup>	++	++	-	-	-	-
D	28	++	-	+	-	-	-
	172DRF	+	-	+	-	-	-
	139DRD	++	-	++	-	-	-
	202DRD	+	-	++	-	-	-
E	7	+++	-	++	+++	-	-
	26	++	-	+	+	-	-
	29	+++	-	++	+++	-	-
F	72DRF	+++	++	++	+	-	-
	64.8P	+++	+	+++	-	+	+

<sup>a</sup> Se ha incluido para su comparación el patrón de clon anti-B\*2704, CTL 64.8P (123).

<sup>b</sup> CTL 23 presenta reactividad cruzada con HLA-DR2.

<sup>c</sup> Los clones CTL 2 y 102DRF presentan reactividad cruzada con HLA-B40\* (B\*4002).

<sup>d</sup> La Tabla representa el % de citotoxicidad del clon frente a LCL que expresan los distintos subtipos: - (0-10%); + (11-30%); ++ (31-50%); +++ (51-100).

contaje de la radiactividad liberada en 100  $\mu$ l del sobrenadante, correspondiente a cada pocillo, en un contador mini gamma 1275 de Packard Instruments Co, Inc. Todos los ensayos se realizaron por triplicado, incluyéndose siempre como controles negativo y positivo la reactividad de las células con un suero de conejo no inmune y con el Acm W6/32, respectivamente. El porcentaje de lisis mediada por complemento se determinó como:

$$\% \text{ de lisis específica} = \frac{\text{LE (cpm)} - \text{CC (cpm)}}{\text{LM (cpm)} - \text{CC (cpm)}} \times 100$$

donde LE es la liberación experimental de  $^{51}\text{Cr}$ ; CC representa la radiactividad liberada en presencia de complemento únicamente y LM es la liberación máxima obtenida por tratamiento de las células con HCl 10 mM.

La lisis de las células diana por suero no inmune y por W6/32 fue siempre menor del 10% y mayor del 75%, respectivamente.

#### **3.4.1. Inhibición de la citotoxicidad por péptidos libres o conjugados péptido-proteína portadora**

Previamente a los ensayos de citotoxicidad, se incubaron varias preparaciones del antisuero con distintas cantidades de los conjugados péptido-proteína portadora, de péptido libre o de proteína portadora. El factor de dilución del antisuero al añadir el competidor era de 1/10 (v/v). Estas soluciones se incubaron 2h a 37°C y 1h a 4°C. Transcurrido este tiempo se realizaron los ensayos de citotoxicidad con 20  $\mu$ l del antisuero tratado. La concentración final de los distintos competidores estaba incluida en un rango de  $10^9$  y  $10^2$  M.

#### **3.4.2. Inhibición de la citotoxicidad por Acm**

Las células diana marcadas se incubaron antes del ensayo de citotoxicidad con distintas diluciones (1/5 a 1/500) de líquido ascítico del Acm ME-1 (anti-B27) y de una preparación purificada del Acm PA2.1 (como control negativo). Esta preincubación era de 30 min a TA, realizándose a continuación el ensayo de citotoxicidad. La concentración de Acm ME-1 en la ascitis se estimó en 9,5 mg/ml y la de PA2.1 en la preparación purificada de 14,6 mg/ml.

### **3.5. CITOTOXICIDAD MEDIADA POR CTL**

Para su realización se marcaron  $5 \times 10^5$  células diana con 50  $\mu$ Ci de  $^{51}\text{Cr}$ , en 100  $\mu$ l de STFi, durante 1 h a 37°C. Tras 5 lavados con RPMI 1640 + 5% de STFi, las células se resuspendieron

a una concentración de  $2-3 \times 10^3$  células en  $50 \mu\text{l}$  de RPMI+10% STFi. El número de células por pocillo estaba siempre en este rango y dependía de la eficiencia de marcaje de las células en cada experimento, de forma que siempre hubiera como mínimo 500 cpm en cada pocillo. Los ensayos se realizaron por duplicado en placas de 96 pocillos de fondo en "V" (Costar) en un volumen de  $150 \mu\text{l}$ , por incubación de las células efectoras con las dianas marcadas, a las relaciones efector:diana de 0,5:1, 1:1 y 2:1. Las placas se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  durante 4 h y, tras una centrifugación de 5 min a  $120 \times g$ , se recogieron  $100 \mu\text{l}$  del sobrenadante, contándose su radioactividad en un contador gamma. El porcentaje de lisis específica se obtuvo por:

$$\% \text{ de citotoxicidad} = \frac{\text{LEx} - \text{LEs}}{\text{LM} - \text{LEs}} \times 100$$

donde LEx es la radiactividad liberada por las células diana incubadas con las efectoras; LEs es la liberación espontánea en presencia de medio de cultivo y LM son las cpm totales al incubar las dianas con  $100 \mu\text{l}$  de HCl 10 mM. La LEs nunca fue superior al 20% de la LM.

### 3.5.1. Inhibición de la citotoxicidad por Acm

Se efectuaron por una incubación, previa al ensayo de citotoxicidad, de las células efectoras con una dilución 1/250 de líquido ascítico de los Acm anti-CD3, -CD8 y -CD11b. Después de 30 min a TA, el ensayo continuó normalmente por la adición de las células diana.

## 3.6. PAPEL DE LA REGION HIPERVARIABLE 63-84 EN LA ALOESPECIFICIDAD SEROLOGICA DE HLA-B27: GENERACION DE ANTICUERPOS CONTRA EL PEPTIDO SINTETICO 63-84

### 3.6.1. Síntesis de péptidos

Los péptidos se sintetizaron manualmente en nuestro laboratorio según el método de Merrifield (268). Después de la síntesis, los péptidos se purificaron por filtración en una columna de Sephadex G-25 ( $100 \times 2,5 \text{ cm}$ ), equilibrada con  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  10mM. Mediante HPLC y análisis de aminoácidos se determinó su pureza, presentando todos ellos una composición de aminoácidos que se ajustaba a la esperada ( $\pm 5\%$ ). En algunos casos, durante el proceso de síntesis, se acopló al péptido ácido p-amino-fenil-acético (PAPA).

### 3.6.2. Acoplamiento péptido-proteína portadora

El acoplamiento a la proteína portadora se realizó siguiendo tres procedimientos distintos:

- 1.- Los péptidos a los que se había acoplado PAPA se disolvieron en HCl 2N frío y, tras la adición de una mezcla acuosa de  $\text{NaNO}_2$  0,1M, mantenida en hielo, se añadieron sobre una solución de hemocianina de lapa (KLH-Keyhole limpet hemocianin) o de albúmina de suero bovino (BSA) disueltas en  $\text{NaHCO}_3$  0,5M. El pH se mantuvo a 8,5 a lo largo del proceso mediante la adición de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,1M. La relación molar péptido:proteína estaba incluida en el rango de 20:1 a 140:1 para BSA y de 2500:1 a 5000:1 para KLH. Tras una incubación durante toda la noche a 4°C, la muestra se dializó frente a  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  10 mM y se liofilizó.
- 2.- Se mezclaron 6 mg de KLH, disueltos en 375  $\mu\text{l}$  de tampón  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10 mM, pH 7,2, con 1 mg de éster maleimido-benzoyl-N-hydroxy-succinimida (MBS) en dimetil formamida (DMF). Esta operación se realizó por adición del MBS gota a gota, para evitar que la concentración local de DMF fuera demasiado alta, ya que la KLH es insoluble a una concentración de este compuesto superior al 30%. La mezcla se agitó durante 30 min a TA. Para eliminar el MBS libre, el producto de reacción KLH-MB se pasó a través de una columna de Sephadex G-25, equilibrada con tampón  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  50 mM, pH 6. Al complejo KLH-MB purificado se le acoplaron 7,5 mg de péptido disueltos en 1ml de PBS, ajustando el pH a 7-7,5 y agitando la mezcla durante 3h a TA. Posteriormente, los conjugados se dializaron frente a  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  10 mM y se liofilizaron.
- 3.- La KLH se resuspendió en PBS y se mezcló con un exceso molar de péptido disuelto en agua destilada. La reacción de acoplamiento comenzó por la adición de 1-etil-3 (3-dimetilaminopropil) carbodiimida a una concentración molar 5 veces superior a la del péptido. La mezcla de reacción se agitó durante toda la noche a TA, se dializó frente a  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  10 mM y se liofilizó.

El rendimiento de los acoplamientos fue generalmente del 80%, y la cantidad de péptido presente en los conjugados, determinada por análisis de aminoácidos, fué generalmente de 25 moles de péptido (en un rango de 17 a 35) por mol de BSA y de 1600 a 2700 por mol de KLH.

### 3.6.3. Análisis de aminoácidos

Para su realización el péptido se liofilizó y se hidrolizó durante 24 h a 110°C en HCl 5,7 N (Pierce), en presencia de 2% de 2-mercaptoetanol y 0,1 % de fenol. Los análisis se realizaron en un analizador Durrum D50.

#### 3.6.4. Inmunización de animales

Con el fin de generar anticuerpos dirigidos contra el péptido sintético se inmunizaron conejos por inyección intradérmica, en distintos puntos del lomo del animal, de 1mg de conjugado en adyuvante completo de Freund. Los animales se inmunizaron mensualmente, sangrándose por primera vez dos semanas después de la segunda inyección y, posteriormente, a intervalos de un mes.

#### 3.6.5. Detección de anticuerpos

La detección de anticuerpos en el suero de los animales inmunizados se realizó mediante enzimoimmunoensayo (ELISA). Este se realizó en placas de poliestireno de 96 pocillos (Costar), incubadas previamente con 100  $\mu$ l/pocillo de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,1 M, pH 9,5, conteniendo 0,05% de glutaraldehído, durante 2h a 56°C. La presencia de glutaraldehído facilitaba la unión del péptido a la placa, dificultada por el pequeño tamaño del mismo. Después de tres lavados con agua destilada, las placas se mantuvieron toda la noche a 4°C con 1  $\mu$ g de péptido, disuelto en 100  $\mu$ l de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,1M, pH 9,5, por pocillo. El péptido no unido a la placa se eliminó mediante tres lavados con PBS ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,2) conteniendo 0,075% de Tween 20 (v/v) y un lavado adicional con agua destilada. Posteriormente, se añadieron 200  $\mu$ l de gelatina al 0,2% en cada pocillo, con el fin de bloquear los sitios libres de la placa y evitar la adsorción inespecífica. Tras una incubación de 1h a 37°C las placas se sometieron a tres lavados con PBS conteniendo gelatina al 0,05% y una con agua destilada. A continuación, se analizaron los antisueros mediante la adición de 100  $\mu$ l/pocillo de varias diluciones seriadas de cada uno de ellos. Los anticuerpos se dejaron reaccionar con el péptido acoplado a la placa, durante 90 min a 37°C, eliminándose el exceso de anticuerpo mediante un nuevo ciclo de lavados (3x PBS+Tween 20, 1x  $\text{H}_2\text{O}$  destilada). Los complejos péptido-anticuerpo, unidos a la placa, se detectaron por incubación, durante 90 min a TA, con 100  $\mu$ l/pocillo de una dilución 1/500 de Proteína A (Prot A) conjugada con Peroxidasa de rábano. El conjugado no ligado se lavó como en el caso anterior y se procedió al revelado del ensayo mediante la adición de 100  $\mu$ l/pocillo del sustrato de la enzima, que consistía en una disolución de 40 mg de o-fenil-diamina y 40  $\mu$ l de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30%, en 100 ml de un tampón  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  50 mM/ácido cítrico 25 mM, pH 5,0. La reacción enzimática se paró por adición de 100  $\mu$ l de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  3N, cuantificándose, a continuación, por medida de la absorbancia a 492 nm en los espectrofotómetros "Titertek Multiskan" (Flow

Laboratories) o "SLT 210 Kontron analytical" (Kontron).

### 3.7. CARACTERIZACION ESTRUCTURAL DE LOS SUBTIPOS DE B27

El procedimiento seguido para la purificación de las cadenas pesadas de HLA y para la realización de los mapas peptídicos comparativos se halla esquematizado en la Fig. 5.

#### 3.7.1. Marcaje metabólico

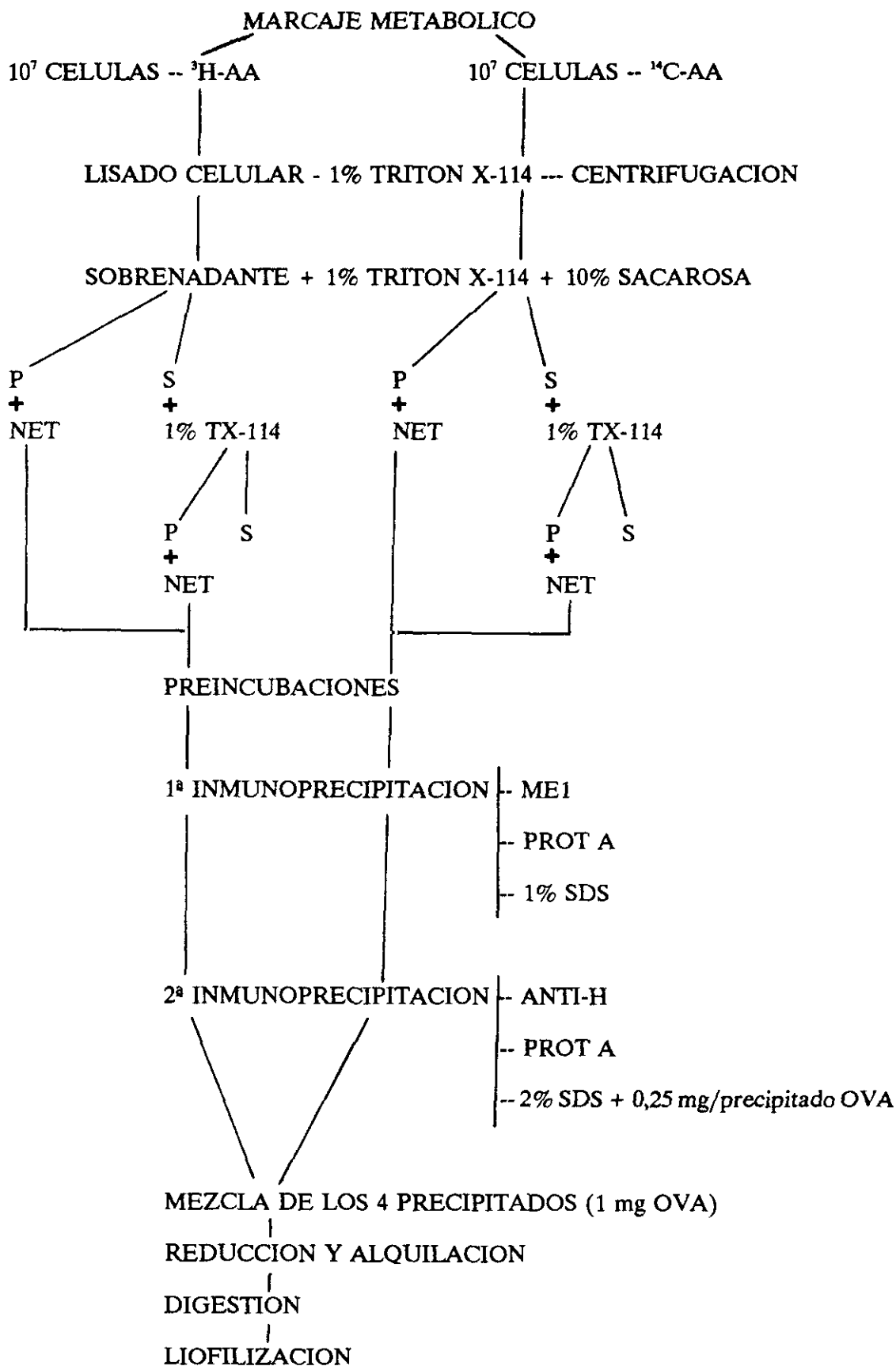
Se incubaron  $10^7$  células con un determinado aminoácido marcado con 1 mCi de  $^3\text{H}$  o 250  $\mu\text{Ci}$  de  $^{14}\text{C}$  (Amersham), en medio mínimo esencial deficiente en dicho aminoácido (Flow laboratories y Gibco), durante toda la noche en estufa a  $37^\circ\text{C}$  y 5% de  $\text{CO}_2$  (269).

Los aminoácidos radiactivos utilizados fueron: L-[2,3- $^3\text{H}$ ]-Ala, L-[U- $^{14}\text{C}$ ]-Ala, L-[2,3- $^3\text{H}$ ]-Asp, L-(G- $^3\text{H}$ )-Gln, L-[G- $^3\text{H}$ ]-Glu, L-[U- $^{14}\text{C}$ ]-Asn, L-[2,5- $^3\text{H}$ ]-His, L-[U- $^{14}\text{C}$ ]-His, L-[4,5- $^3\text{H}$ ]-Ile, L-[U- $^{14}\text{C}$ ]-Ile, L-[4,5- $^{14}\text{C}$ ]-Ile, L-[4,5- $^3\text{H}$ ]-Leu, L-[U- $^{14}\text{C}$ ]-Leu, L-[4,5- $^3\text{H}$ ]-Lys, L-[U- $^{14}\text{C}$ ]-Lys, L-[2,3,4,5- $^3\text{H}$ ]-Pro, L-[U- $^{14}\text{C}$ ]-Pro, L-[3- $^3\text{H}$ ]-Ser, L-[U- $^{14}\text{C}$ ]-Ser, L-[3- $^3\text{H}$ ]-Thr, L-[U- $^{14}\text{C}$ ]-Thr, L-[5- $^3\text{H}$ ]-Trp, L-[2,3,5,6- $^3\text{H}$ ]-Tyr, L-[U- $^{14}\text{C}$ ]-Tyr.

Los isótopos de  $^{14}\text{C}$  y  $^3\text{H}$ -Trp se liofilizaron antes de su uso.

#### 3.7.2. Purificación de las cadenas pesada de HLA-B27

Después del cultivo, las células se lavaron dos veces con tampón Tris/HCl 10 mM, NaCl 0,15 M, pH 7,4, conteniendo 0,1 mM de fluoruro de fenilmetil-sulfonilo (PMSF) (Sigma). Posteriormente se solubilizaron por incubación en hielo, durante 1h, en 1ml del mismo tampón conteniendo 1% (v/v) de Triton X-114 (Sigma) y PMSF 0,1 mM. El material insoluble se precipitó por centrifugación a  $7900 \times g$ , durante 15 min a  $4^\circ\text{C}$ . El sobrenadante se dividió en dos alícuotas que se trataron de forma semejante, independientemente. Cada una ellas se añadió sobre 0,25 ml del tampón anterior conteniendo un 1% de Triton X-114 y 10% de sacarosa. La incubación de esta mezcla a  $37^\circ\text{C}$  durante 3 min permitió separar, tras una centrifugación de 3 min a  $4000 \times g$  en una microfuga Beckman, la fase del detergente, conteniendo las proteínas de membrana, de la acuosa, debido a que a esa temperatura precipita el Triton X-114 (270). La fase del detergente se resuspendió en 0,2 ml de tampón NET (Tris/HCl 0,05 M, NaCl 0,15 M, EDTA 5 mM, 0,02% de  $\text{NaN}_3$ , pH 7,4). A la fase acuosa del sobrenadante se le añadieron 50  $\mu\text{l}$  de Triton X-114 al 10% (v/v) y después de una incubación de 3 min a  $0^\circ\text{C}$  y otra de 3 min a  $37^\circ\text{C}$ , la preparación se centrifugó como en el caso anterior, resuspendiéndose la fase del



**Figura 5.** Estrategia utilizada para el aislamiento de las cadenas pesadas de HLA B27.

detergente en 0,2 ml de NET. Posteriormente, se juntaron las dos fases de detergente resuspendidas en NET y se desprecipó la fase acuosa. En esta fase de detergente se recogió, generalmente, el 20% de la radiactividad total presente en el lisado celular.

Esta preparación se sometió a una serie de preincubaciones con el fin de limpiar la preparación y evitar las uniones inespecíficas. La primera de ellas consistió en la adición de 100  $\mu\text{l}$  de un preparado de Prot A de *Staphylococcus aureus* al 10% (Laboratorios Llorente) (271). Después de 20 min a 0°C, las muestras se centrifugaron a 4000 x g, recogiendo el sobrenadante, que era nuevamente incubado durante 1h a 0°C con 10  $\mu\text{l}$  de suero de conejo normal (SCN). A continuación se añadió Prot A por segunda vez y tras centrifugación se recogió el sobrenadante. Las proteínas solubilizadas en cada una de las alícuotas se inmunoprecipitaron con 1  $\mu\text{l}$  del Acm ME1. Pasada 1 h a 0°C, los complejos HLA-B27-ME1 se precipitaron por la adición de 40  $\mu\text{l}$  de un antisuero de conejo anti-IgG de ratón, seguida por una incubación con 200  $\mu\text{l}$  de Prot A. Esta segunda inmunoprecipitación era necesaria, ya que el Acm ME1 no es capaz de unir Prot A. Los inmunoprecipitados se sometieron a cinco lavados, para eliminar uniones inespecíficas, con varias soluciones de distinta fuerza iónica (2 x NET + 0,5 Nonidet P-40 (NP-40) + 1/10 de NaCl saturado; 2 X NET + 0,5 NP-40 + 1/20 de NaCl saturado y 1 x NET + 0,5 NP-40). Las moléculas de HLA-B27 se separaron de la Prot A por ebullición, durante 5 min, en 100  $\mu\text{l}$  de dodecil sulfato sódico (SDS) al 1% (p/v), descartando el material insoluble por centrifugación a 11600 x g. Posteriormente se aisló la cadena pesada de B27 de esta preparación por incubación con 5  $\mu\text{l}$  del antisuero anti-H, al menos durante 4h a 0°C, seguida por la adición de 200  $\mu\text{l}$  de Prot A. El precipitado de prot A se sometió a un ciclo de lavados semejante al descrito anteriormente.

### 3.7.3. Mapas peptídicos

Las cadenas pesadas de HLA, incluidas en los inmunoprecipitados, se extrajeron mediante ebullición, durante 5 min, en 200  $\mu\text{l}$  de SDS al 2% (p/v) conteniendo 0,25 mg de Ovoalbumina (OVA), descartándose la fracción insoluble por centrifugación a 11600 x g. Las cadenas pesadas de HLA marcadas con  $^3\text{H}$  y  $^{14}\text{C}$  se mezclaron y se precipitaron con cinco volúmenes de acetona, siendo posteriormente reducidas con Ditiotreitól (DTT) (Bio Rad) 10 mM en tampón Tris/HCl 350 mM, EDTA 5 mM, SDS al 2% (p/v), pH 8 (2 h a 37°C) y alquiladas con Iodoacetamida (Bio Rad) 25 mM en el mismo tampón (30 min en oscuridad a TA). Tras una precipitación con

cinco volúmenes de acetona y medio volumen de ácido tricloroacético al 45% (p/v) en H<sub>2</sub>O, se procedió a la digestión con TPCCK-tripsina (Worthington) en tampón NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 50 mM, pH 8,5. En primer lugar se realizó una incubación de 1h a 37°C a una relación enzima:sustrato de 1:20 (p/p), sobre la cantidad de OVA añadida; seguidamente se efectuó una segunda adición de enzima a una relación de 1:40, incubando en esta ocasión durante 3h, también a 37°C. Después de la digestión las muestras se liofilizaron inmediatamente. Para la realización de algunos mapas se utilizaron condiciones de digestión más exhaustivas, empleando relaciones de enzima:sustrato de 1:10 y 1:20, y 1:5 y 1:10.

Los péptidos trípticos se separaron mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC) en un cromatógrafo Waters equipado con una columna  $\mu$ BondaPak C18 (0,39 x 30 cm). La muestra se cargó en esta columna, equilibrada en un tampón acetato amónico 10 mM, pH 6,5, y se sometió a un gradiente lineal de 0 a 30% de acetonitrilo (Scharlau) en el mismo tampón. La duración de este gradiente fue de 55 min a un flujo de 1,5 ml/min, recogiendo fracciones de 0,6 ml. 20 fracciones se recogieron en las condiciones iniciales y otras 20 en las finales, inmediatamente antes y después del gradiente. Al finalizar la cromatografía, la columna se sometió a un lavado con acetonitrilo al 100%, recolectándose otras 20 fracciones en este periodo. El número total de fracciones en cada mapa fue de 220.

En algunas ocasiones, con el fin de purificar mezclas de péptidos no resueltas en las condiciones cromatográficas detalladas anteriormente, se utilizaron dos procedimientos alternativos. Uno de ellos consistía en una cromatografía en HPLC utilizando la misma columna que en otras ocasiones, equilibrada con una solución acuosa de ácido trifluoroacético al 0,16% (v/v). Se empleó un gradiente lineal de 0 a 40% de una solución de acetonitrilo conteniendo 0,10% (v/v) de ácido trifluoroacético, pH 2,1. El gradiente transcurrió en un tiempo de 55 min con un flujo constante de 1 ml/min. Se recogieron fracciones de 0,6 ml. Inmediatamente antes y después del gradiente se recogieron 12 fracciones, en las condiciones iniciales y finales, respectivamente.

El otro método de repurificación consistió en una cromatografía de intercambio iónico. Se utilizó una resina intercambiadora de cationes Tipo AA-20 (Beckman) en columna de 0,3 x 25 cm, termostaticada a 56°C, y un gradiente de piridina y ácido acético con un flujo constante de 1ml cada 7 min. La columna se equilibró inicialmente con un tampón de piridina 0,05 M / ácido acético, pH 1,8. La muestra se resuspendió en esta solución y tras pasar por la columna

20 ml de ella (recogiéndose 20 fracciones de 1 ml), se comenzó el gradiente. Este se formó en un sistema de cuatro vasos comunicantes, conteniendo cada uno de ellos 50 ml de los siguientes tampones: vaso I - piridina 0,05 M, ác. acético, pH 2,45; vasos II y III - piridina 0,3 M, ác. acético, pH 3,75; vaso IV - piridina 1,2 M, ác. acético, pH 5. Finalmente la columna se lavó con 20 ml de piridina 2 M, recogiéndose en esta etapa otras 20 fracciones de 1 ml.

En ambos procedimientos antes de cromatografiar los péptidos radiactivos, se añadieron 0,5-1 mg de un digerido tríptico de OVA, para evitar la unión inespecífica de péptidos a la columna.

La detección de péptidos se realizó por conteo de alícuotas de 1/3 ó 1/2 de cada fracción, a las que se añadieron 4 ml de Aquasol (New England Nuclear). Para ello se utilizó un contador de centelleo líquido Beckman LS-2800, usando un doble canal para  $^3\text{H}$  y  $^{14}\text{C}$ , con un corrector automático de fondo. Las fracciones incluidas en cada pico fueron recogidas y liofilizadas.

#### **3.7.4. Digestiones adicionales de los péptidos: proteasa V8 y quimotripsina**

Algunos péptidos trípticos de gran longitud se sometieron a una segunda digestión enzimática con la proteasa V8 de *Staphylococcus aureus* (Miles Laboratories). Para ello se resuspendieron los péptidos en 350  $\mu\text{l}$  de tampón acetato amónico 50 mM, pH 4, junto con 100  $\mu\text{g}$  de un digerido tríptico de OVA. La enzima se añadió a una relación enzima:sustrato (sobre la cantidad de proteína añadida) de 1:2,5 (p/p) y se incubó durante 20 h a 37°C. Transcurrido este tiempo se realizó una segunda adición de la misma cantidad de enzima y la reacción continuó 20 h más a 37°C. Estas condiciones permitían una rotura selectiva en el extremo C-terminal de la mayoría de los residuos de ác. glutámico, aunque no de todos (272). Después de la digestión, se añadieron 400  $\mu\text{g}$  de un digerido tríptico de OVA en un volumen de 150  $\mu\text{l}$ . La mezcla se liofilizó y se cromatografió utilizando las mismas condiciones que en el caso de los péptidos trípticos.

En otras ocasiones los péptidos se sometieron a la acción de la quimotripsina (Worthington). Para ello, el péptido se resuspendió en 200  $\mu\text{l}$  de tampón  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  50 mM, pH 8,5, junto con 1mg de OVA previamente reducida y alquilada. La digestión tuvo lugar durante 30 min a TA, a una relación enzima:sustrato de 1:200 (p/p). Finalizado el proceso, la muestra se liofilizó y cromatografió en las condiciones habituales.

### 3.7.5. Análisis de secuencia de los péptidos

Las determinaciones de secuencia se realizaron siempre en péptidos radiactivos purificados. Se utilizaron, bien un secuenciador de fase líquida Beckman 890C (en presencia de polibreno en un programa de Quadrol 0,1M), o bien uno de fase gaseosa 470A de Applied Biosystems (programa MAC de secuenciación). Los péptidos se disolvieron en 0,25 a 0,5 ml de trietilamina al 2%, en presencia de 10 nM de apomioglobina. Las fracciones, tal como se liberaban en el secuenciador, se secaron, se disolvieron en 100  $\mu$ l de acetato de etilo, y se contaron con 4 ml de Aquasol en un contador Beckman LS-255 o en un contador Beckman LS-2800, programados para el conteo simultáneo de  $^3\text{H}$  y  $^{14}\text{C}$ . En ambos casos se realizaron correcciones de fondo de acuerdo con los valores obtenidos con controles apropiados de  $^3\text{H}$  y  $^{14}\text{C}$ .

### 3.7.6. Electroenfoque de HLA-B27

Para su realización, las células se marcaron metabólicamente con 0,5-1 mCi de  $^{35}\text{S}$ -Met. El procedimiento de lisis celular e inmunoprecipitación seguido fue el descrito anteriormente en 3.7.2. Las cadenas pesadas de B27 se extrajeron de los precipitados con anti-H, mediante ebullición en 100  $\mu$ l de tampón de muestra, conteniendo urea 8 M, 1% de NP-40, 10% de 2-mercaptoetanol y 4% (p/v) de una mezcla de anfollinas (LKB) de distintos pH: 3,5 a 10; 4 a 6 y 6 a 8, en una relación de 1: 4: 4. La muestra se centrifugó a 11600 x g, durante 3 min, eliminándose el material insoluble por centrifugación. Posteriormente se realizó el electroenfoque (273) a una intensidad constante de 10 mA y un voltaje máximo de 400 V, durante 18h. Los geles estaban compuestos por 4,5% de acrilamida/bisacrilamida a una relación de 29,4% (p/v)/0,6% (p/v), 1,7% de NP-40, 8 M de urea, 2% de la mezcla de anfollinas (a la misma relación que en el tampón de muestra). Finalizado el electroenfoque los geles se fijaron en una mezcla de  $\text{H}_2\text{O}$ : metanol: ác. acético (10:4:1) y se analizaron por autorradiografía con una película Kodak X-OMAT GRS.

## 3.8. MUTAGENESIS DIRIGIDA DE HLA-B27

### 3.8.1. Endonucleasas de restricción

En la estrategia de mutagénesis seguida se usaron las endonucleasas *Eco RI*, *Hind III*, *Kpn I*, *Sma I*, *Bgl II*, *Bam HI* y *Sac I*. Todas ellas eran de Boehringer Mannheim y se utilizaron según las especificaciones del fabricante, generalmente a una dosis de 2 u/ $\mu$ g de DNA.

### 3.8.2. Preparación de oligonucleótidos mutagénicos

Los oligonucleótidos se sintetizaron en un sintetizador automático (Applied Biosystems). Después de la síntesis, se desprendieron de su soporte sólido mediante incubación con  $\text{NH}_4\text{OH}$  concentrado a 55-60°C durante 14-16 h y se liofilizaron. Antes de su utilización se purificaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 20 %, a 600 V, durante 2-3 h. El oligonucleótido se detectó por proyección de la banda correspondiente sobre una placa de gel de sílice (cromatografía en capa fina TLC, Sigma), al hacer incidir sobre el gel luz ultravioleta. Tras cortar la banda, se eluyó el oligonucleótido por incubación con 1,5 ml de NaAc 0,3 M, EDTA 1 mM, durante 14-16 h a 37°C. Posteriormente, se precipitó a -20°C con 2 volúmenes de etanol, determinándose espectrofotométricamente su concentración y pureza.

La secuencia de los oligonucleótidos utilizados se muestra en la Tabla VII. Previamente a la realización de la mutagénesis, se sometieron 200 pmoles del oligonucleótido a la acción de 10 u de la enzima polinucleótido kinasa en 30  $\mu\text{l}$  de tampón Tris HCl 100 mM, pH 8,  $\text{MgCl}_2$  13,3 mM, DTT 6,6 mM y ATP 1mM, durante 30-45 min a 37°C, con el fin de fosforilar su extremo 5'. La enzima se inactivó posteriormente por incubación a 65°C, durante 10 min.

### 3.8.3. Construcción de mutantes

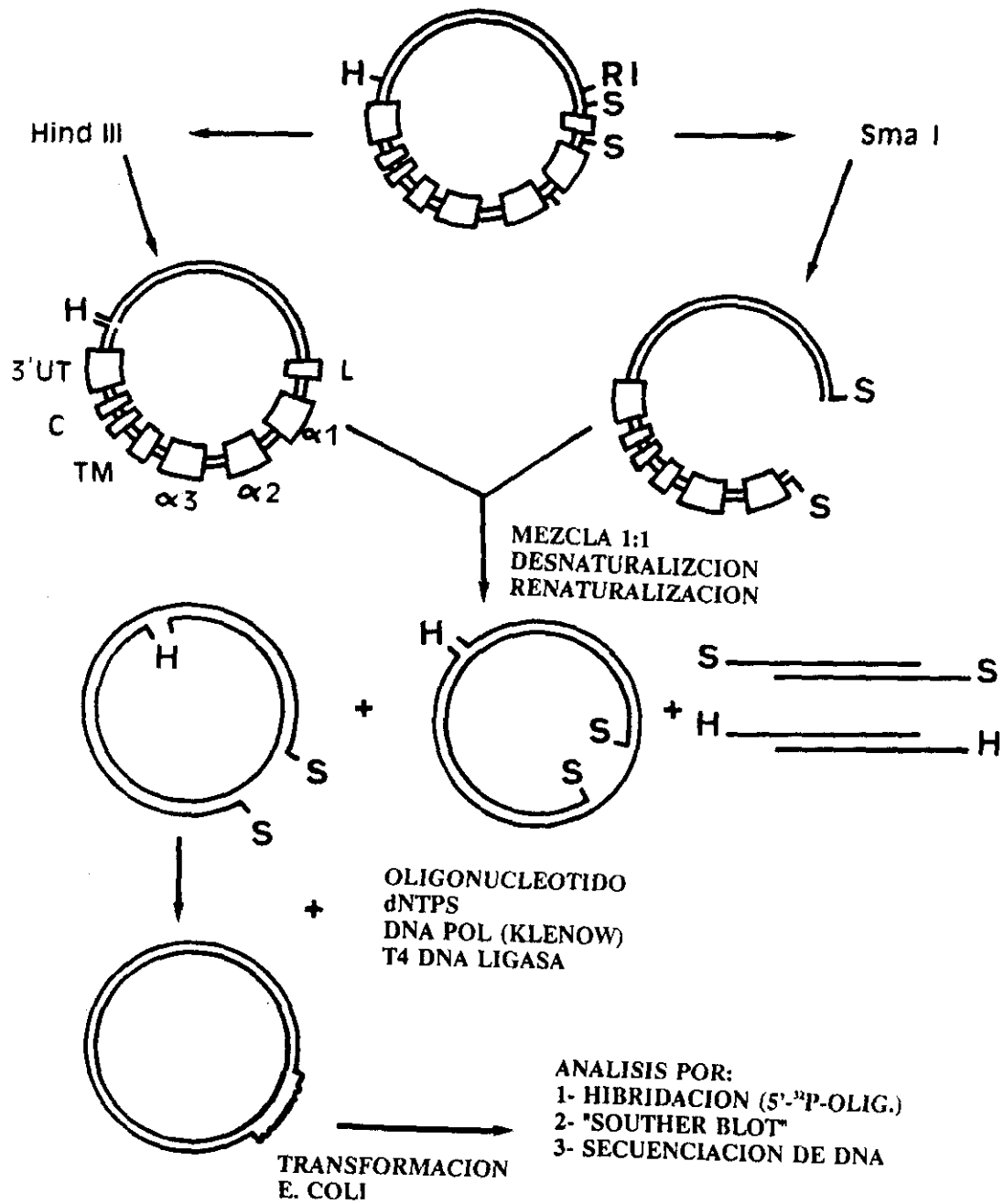
El material de partida para la construcción de los mutantes fue el gen de B\*2705 (114), que estaba incluido en un fragmento de DNA de 6,5 Kb, clonado en el sitio *Eco RI* del vector pBR322. Para los mutantes en el dominio  $\alpha_1$ , se extrajo este fragmento del vector mediante digestión con *Eco RI* y tras rellenar sus extremos protuberantes por la acción del fragmento Klenow de la DNA pol I de *E. coli*, se insertó en el sitio *Sma I* del vector pUC18. Las mutaciones se introdujeron en el gen de B27 por hibridación de éste con un oligonucleótido sintético, portador de la mutación. Todos los mutantes, con excepción del Y74N77, habían sido construídos previamente en nuestro laboratorio.

El procedimiento seguido para la realización de la mutagénesis (274) está esquematizado en la Fig. 6 y se detalla a continuación. En primer lugar se procedió a la digestión del plásmido que contenía el gen de B27 con *Sma I*, en el caso de los mutantes en el dominio  $\alpha_1$  y con *Kpn I* en el mutante de  $\alpha_2$  (ver mapa de restricción en la Fig. 7). De este modo se cortaba el gen de B\*2705 sólo en el dominio en el que se quería introducir la mutación. Paralelamente se linearizó otra preparación del plásmido correspondiente con la enzima *Hind III*. Ambos

**Tabla VII. Cambios introducidos en los mutantes de B27 y oligonucleótidos utilizados**

Posición	Sustitución	Oligonucleótido
63	Glu Asn	<sup>5</sup> GG GAC CGG <u>AAC</u> ACA CAG AT <sup>3</sup>
74	Asp Tyr	<sup>5</sup> CA CAG ACT <u>TAC</u> CGA GAG <sup>3</sup>
77	Asp Asn	<sup>5</sup> AC CGA GAG <u>AAC</u> CTG CGG A <sup>3</sup>
77	Asp Ser	<sup>5</sup> CT GAC CGA GAG <u>AGC</u> CTG CGG ACC C <sup>3</sup>
80	Thr Ile	<sup>5</sup> AC CTG CGG <u>ATC</u> CTG CTC CG <sup>3</sup>
81	Leu Ala	<sup>5</sup> AC CTG CGG ACC <u>GCG</u> CTC CGC TAC T <sup>3</sup>
152	Val Glu	<sup>5</sup> G GCC CGT <u>GAG</u> GCG GAG C <sup>3</sup>

## MUTAGENESIS DIRIGIDA



**Figura 6.** Estrategia de mutagenésis dirigida utilizada para la generación de mutantes de HLA-B27.

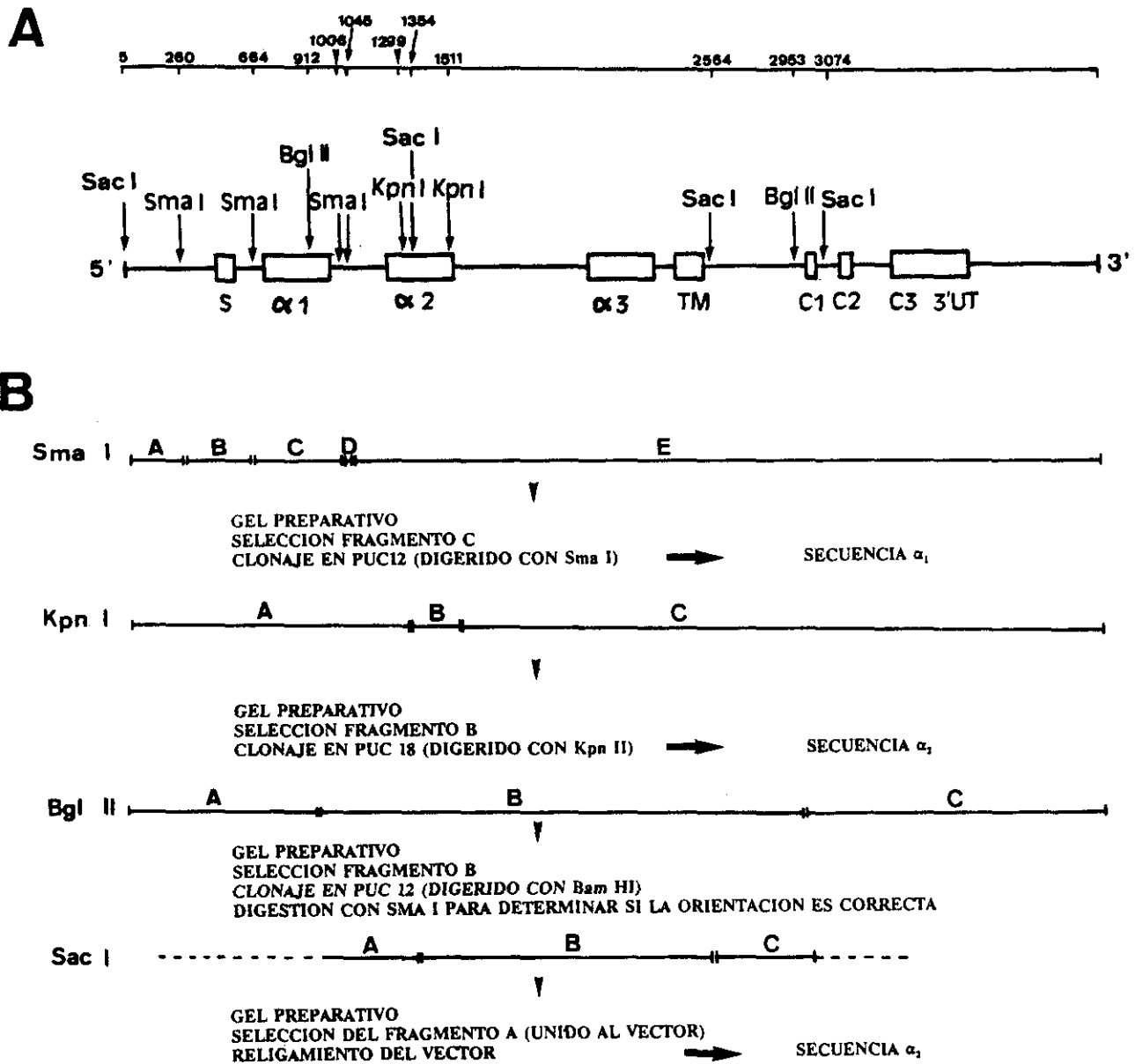


Figura 7. A) Mapa de restricción del gen codificante de HLA-B27. B) Estrategia utilizada para la secuenciación de los mutantes por el método de Maxam y Gilbert (279).

digeridos se mezclaron en cantidades equimolares (generalmente 1 pM) junto con un exceso molar 20 veces superior del oligonucleótido sintético fosforilado, en un volumen final de 20  $\mu$ l de tampón HB (Tris HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 50 mM, EDTA 1 mM). Posteriormente, se procedió a la desnaturalización de la preparación a 100°C y a su posterior renaturalización a 10°C por debajo de la  $T_m$  del oligonucleótido. De esta forma se permitió la hibridación de éste con la zona correspondiente del gen de B27. A continuación, se realizaron las reacciones de polimerización por extensión con 5-10 u del fragmento Klenow de la DNA pol I de *E. coli* (Boehringer), y ligamiento por la acción de 7u de la ligasa del fago T4 (Boehringer). Ambas se llevaron a cabo conjuntamente a 14°C durante 15 h, en un volumen final de 80  $\mu$ l de tampón Tris HCl 50 mM, pH 7,8, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, DTT 20 mM, ATP 1 mM, 50  $\mu$ g/ml de BSA, junto con una mezcla de dNTPs 0,6 mM. De esta forma se obtuvieron moléculas de plásmido con el gen de B\*2705 en una de sus cadenas y el mutado en la otra.

#### **3.8.4. Transformaciones bacterianas y detección de colonias portadoras de la mutación**

La mezcla de ligamiento se utilizó para transformar bacterias *E. coli* DH-5, en estado competente por tratamiento con CaCl<sub>2</sub> 50 mM (275). La transformación se llevó a cabo por incubación, a 0°C durante 30 min, de 200  $\mu$ l de la suspensión bacteriana con distintas cantidades (habitualmente 5, 10 y 20  $\mu$ l) de la mezcla de ligamiento. Posteriormente, la preparación se sometió a un choque térmico a 42°C durante 2 min y tras añadir 1ml de medio LB (1% de Bactotripton, 0,5% de Extracto de levadura y 1% de NaCl), se incubó a 37°C durante 45 min. Pasado este tiempo las bacterias se centrifugaron, se resuspendieron en 100  $\mu$ l de medio LB y se extendieron sobre placas Petri, conteniendo medio LB, 1,4% de Agar y 150  $\mu$ g/ml de ampicilina. Las placas se incubaron durante 14-16 h a 37°C.

Las colonias portadoras del gen mutado se detectaron mediante hibridación con el mismo oligonucleótido utilizado para introducir la mutación, marcado con <sup>32</sup>P- $\gamma$ ATP (276). Para ello, las bacterias crecidas en las placas, se transfirieron simétricamente a dos placas Petri, una de las cuales contenía en su superficie una membrana de nylon Biodine (Pall BioSupport Division). Tras permitir el crecimiento bacteriano durante 14-16 h a 37°C, se procedió al tratamiento de las bacterias crecidas en la membrana, almacenando la otra placa a 4°C, para crecer posteriormente la colonia seleccionada a partir de ella. El tratamiento de las bacterias consistió en una etapa de lisado con NaOH 0,5 M durante 15 min, seguida por dos lavados con Tris/HCl

1 M, pH 7,6, y una etapa de neutralización con Tris/HCl 0,5 M, pH 7,6, NaCl 1,5 M, durante 5 min. El DNA bacteriano se fijó a la membrana por una incubación de 1-2 h a 80°C procediéndose a continuación, a la prehibridación de la misma durante 2-3 h y a su posterior hibridación con el oligonucleótido marcado con  $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ ATP, durante 14-16 h, a una temperatura de 10°C por debajo de la  $T_m$  del oligonucleótido. La solución de hibridación consistió en 6xNET (1x=Tris HCl 15 mM, pH 8,3, NaCl 1,15 M, EDTA 1 mM), conteniendo 0,1% de SDS y 10% de la solución de Denhardt (1x=0,02% de BSA, 0,02% de PVP-40 y 0,02% de Ficoll). Las membranas hibridadas se lavaron con 6xSSC (1x=NaCl 0,15 M, citrato sódico 15 mM, pH 7,2) y 0,05% de pirofosfato sódico. En primer lugar, se llevaron a cabo tres lavados de 10 min a TA realizándose, posteriormente, lavados sucesivos incrementando la temperatura hasta un valor igual o superior a la  $T_m$ . Después de cada lavado, las membranas se expusieron a una película Kodak X-OMAT S, utilizando dos pantallas intensificadoras.

Las colonias que hibridaron con el oligonucleótido después del lavado a la temperatura superior se crecieron, obteniéndose posteriormente DNA del plásmido contenido en ellas, que era utilizado para un nuevo ciclo de transformación. Este proceso se repitió sucesivamente hasta conseguir una colonia conteniendo moléculas de plásmido con el gen de B27 mutado en sus dos cadenas. La localización correcta de la mutación se confirmó mediante análisis por "Southern blot" (277).

### **3.8.5. Obtención del DNA del plásmido**

Las colonias positivas se sembraron en 3 ml de medio LB conteniendo 150  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de ampicilina. Después de 14-16 h en un baño a 37°C, las bacterias se centrifugaron y se lisaron con 5 mg/ml de lisozima en 200  $\mu\text{l}$  de TE-sacarosa (Tris/HCl 25 mM, pH 8, EDTA 10 mM, sacarosa 25 mM), durante 15 min a TA y 5 min a 4°C. Posteriormente, se añadieron 400  $\mu\text{l}$  de la solución de lisis (NaOH 0,2 N y 1% de SDS) que se dejó actuar 5 min a 4°C. A continuación, tras añadir 300  $\mu\text{l}$  de KAc 3M, pH 4,8 frío y de incubar 15 min a 4°C, la preparación se centrifugó a 17400 x g durante 30 min a 4°C. El DNA contenido en el sobrenadante se precipitó por incubación con 400  $\mu\text{l}$  de isopropanol durante 15 min a TA y posterior centrifugación a 17400 x g, 15 min a TA. Tras eliminar el sobrenadante, el precipitado se lavó con etanol y se secó a vacío. Seguidamente, se resuspendió en 50  $\mu\text{l}$  de tampón y se trató con 10 u/ $\mu\text{l}$  de RNAasa T1 y 10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de RNAasa A. Con el fin de eliminar las proteínas, la preparación se

trató dos veces con Fenol-Sevag (fenol saturado en TE:cloroformo:alcohol isoamílico en una relación 25:24:1) y una vez con cloroformo (278). Posteriormente, se realizó una segunda precipitación del DNA, esta vez con 1/10 del volumen de NaAc 3M, pH 7,2 y 2 volúmenes de etanol, y se resuspendió en 20  $\mu$ l de 0,1 x TE.

### 3.8.6. Southern blot

Se realizó digiriendo tres preparaciones de DNA, procedente de cada colonia positiva en la hibridación, con *Kpn I*, *Sma I* y *Bgl II*, respectivamente. Los fragmentos de DNA se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% en tampón TAE (Tris-acetato 0,04M y EDTA 0,002M) durante 2-3 h, con una corriente constante de 100 mA y se transfirieron a una membrana de Biodine. Previamente a la transferencia, el gel se sometió a un tratamiento de 30 min con la mezcla de desnaturalización: NaCl 1,5 M, NaOH 0,5 M, seguido por una incubación de 30 min con la solución: NaCl 3 M, Tris/HCl 0,5 M, pH 6,8). Posteriormente el gel se sumergió en HCl 0,25 M durante 10 min y se realizó la transferencia, durante 14-16 h, en tampón 20xSSC (NaCl 3 M, citrato sódico 0,3 M, pH 7,2). La fijación del DNA a la membrana se llevó a cabo a 80°C durante 2 h, sufriendo a continuación un proceso de prehibridación, hibridación y lavados, semejante al descrito anteriormente para las colonias. El último lavado tenía lugar cuando desaparecían las bandas correspondientes al gen de B27 sin mutar (incluido como control), permaneciendo las correspondientes al mutado.

### 3.8.7. Secuenciación del DNA

Todos los mutantes, exceptuando N63, fueron secuenciados por el método de Maxam y Gilbert (279), para confirmar la presencia exclusiva de la mutación pretendida. El mutante N63 se secuenció, tras ser subclonado en el vector M13mp19, por el método de "dideoxy chain reaction", usando "sequenase" (280). En el caso de los mutantes N77, S77, Y74, Y74N77 y N77A81, se obtuvo la secuencia correspondiente a los dominios  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ , pero dado que el DNA sólo se abría en el dominio en el que se quería introducir la mutación, en los mutantes generados posteriormente (N63, I80, N77I80 y E152), se secuenció únicamente el dominio correspondiente a la mutación.

La estrategia utilizada para la secuenciación está esquematizada en la Fig. 7. Tras la digestión de tres preparaciones de DNA con las enzimas *Sma I*, *Bgl II* y *Kpn I*, respectivamente, las muestras se sometieron a electroforesis en geles de agarosa de bajo punto de fusión al 1%

en tampón TAE. Las bandas correspondientes a los fragmentos que nos interesaban (el que contiene  $\alpha_1$  en la digestión con *Sma I* y los que contienen  $\alpha_2$  en las digestiones con *Bgl II* y *Kpn I*), se cortaron del gel y se extrajo el DNA de ellas (278). Los fragmentos se ligaron con los vectores pUC12, en el caso de *Sma I* y *Bgl II*, y pUC18, en el caso de *Kpn I*, cortados previamente con las enzimas correspondientes y tratados con fosfatasa para evitar su religamiento. Después de una incubación de 14-16 h a 14°C, se procedió a la transformación de bacterias JM83 con las distintas mezclas de ligamento, seleccionándose las colonias portadoras del inserto (blancas) frente a las que carecen de él (azules), en placas de agar con 2% de x-gal (278). La orientación correcta del inserto se comprobó por medio de digestiones con diversas enzimas de restricción. El plásmido conteniendo el fragmento *Bgl II*, se digirió con la enzima *Sac I*, reclinándose de nuevo el fragmento obtenido.

El proceso de secuenciación se inició por digestión de dos alícuotas de los plásmidos portadores de los insertos, con las enzimas *Eco RI* y *Hind III*, respectivamente. Los digeridos se trataron con ARNasas y fosfatasa, como se describió anteriormente, y seguidamente se sometieron a un tratamiento para eliminar las proteínas con proteinasa K, fenolizando posteriormente las preparaciones (278). A continuación el DNA se purificó por una minicolumna de Sephadex G-50. Tras precipitación con etanol se procedió a su marcaje con  $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP, eliminándose el exceso de isótopo mediante otra minicolumna. Posteriormente, la preparación tratada con *Eco RI* anteriormente, se digirió con la enzima *Hind III*, y viceversa. Los fragmentos de DNA se aislaron a partir de las bandas correspondientes, tras electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1%. A continuación, se realizaron las reacciones específicas para la determinación de cada una de las bases (279). Estas consistieron en un tratamiento con dimetilsulfato para las G, piridina para G + A, una solución de hidrazina en H<sub>2</sub>O para las T + C y de hidrazina en NaCl 5M para las C. Estas reacciones se pararon por congelación rápida en N<sub>2</sub> líquido y tras precipitación se trataron con piperidina. Las muestras se liofilizaron y se resuspendieron en el tampón de muestra, compuesto por 80% de formamida desionizada, NaOH 10mM, EDTA 1mM y los colorantes xilencianol al 0,1% (p/v) y azul de bromofenol 0,1% (p/v). La electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida al 8%, conteniendo 44% de urea, y se llevó a cabo a 40 W. Después de la electroforesis, se secó el gel y se expuso a una película Kodak X-OMAT.

### 3.9. TRANSFECCION Y EXPRESION DE GENES DE HLA-B27

#### 3.9.1. Transfección en células humanas

Cada uno de los plásmidos conteniendo los genes de B\*2705, B\*2702 o los genes mutantes, se transfectó, junto con el plásmido de selección pSV2neo (281), en la línea celular HMy2 CIR mediante electroporación (282). Este plásmido incluye el gen *neo* que confiere resistencia a neomicina (G418). Previamente los plásmidos se linearizaron por digestión con *Eco RI* en el caso de pUC18 y con *Hind III* en el caso de pBR322. Las células se diluyeron en medio de cultivo el día anterior y 5 h antes de la transfección. Posteriormente se resuspendieron  $10^7$  células en 1 ml de un tampón Hepes 20 mM conteniendo NaCl 137 mM, KCl 5 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,7 mM, dextrosa 6 mM, pH 7,05, junto con 10  $\mu\text{g}$  de DNA correspondiente al gen mutado y 1  $\mu\text{g}$  del plásmido de resistencia. La electroporación se realizó a 300 V y 950  $\mu\text{F}$ . Tras permanecer la preparación 10 min en reposo, se añadieron 20 ml de medio de cultivo DMEM que contenía 10% de STF y Glutamina 2 mM. Después de una incubación de 72 h a 37°C, las células se resuspendieron en el medio de cultivo suplementado con 1,5 mg/ml de G418 y se sembraron en dos placas de 24 pocillos (Costar). Aproximadamente un mes después se analizó la expresión de HLA-B27 en la superficie de las células, correspondientes a cada uno de los pocillos que mostraron crecimiento celular.

#### 3.9.2. Transfección en células murinas

Las células se diluyeron previamente como en el caso anterior. Los plásmidos que incluían los genes de HLA-B\*2705, B\*2702 o los distintos genes mutantes, se transfectaron junto con el gen de la  $\beta_2\text{m}$  humana y el plásmido de resistencia pSV2neo en la línea murina P815-HTR. El método utilizado en este caso fue el del fosfato cálcico de Wigler et al. (283), modificado por Van Pel et al. (250). Para su realización se procedió a la formación de un precipitado de DNA-fosfato cálcico que contenía 10-15  $\mu\text{g}$  de la mezcla de plásmidos, en un volumen de 0,5 ml. En algunos casos se transfectaron únicamente los plásmidos de B\*2705 y pSV2neo, utilizando una relación molar de 20:1; sin embargo, en general, se incluyó, junto con los anteriores, el plásmido de la  $\beta_2\text{m}$  humana, siendo la relación en este caso de 20:20:1. Esta misma relación se mantuvo para el resto de los genes de B27. La transfección se llevó a cabo diluyendo los DNA en una solución de  $\text{CaCl}_2$  250 mM, procediéndose a continuación a la formación del precipitado por adición de 250  $\mu\text{l}$  de esta preparación, gota a gota y con agitación, sobre un volumen

equivalente de 2xHBS (NaCl 280 mM, Hepes 50 mM, fosfato sódico 1,5 mM, pH  $7,1 \pm 0,05$ ). Después de 60 min a 20°C, el precipitado se disgregó por agitación suave y se incubó con  $10^6$  células, durante 30 min a 37°C. Transcurrido este tiempo se añadieron 4,5 ml de DMEM+10% de STFi, permaneciendo la preparación 48 h en una estufa a 37°C. Posteriormente, las células se lavaron dos veces con medio de cultivo, con el fin de eliminar el  $\text{CaCl}_2$ , y se sembraron en dos placas de 24 pocillos, conteniendo cada uno de ellos 1 ml del medio de selección (DMEM+10% STFi+1,5 mg/ml de G-418 sulfato). Aproximadamente 15 días después se analizó la expresión de B27 y  $\beta_2\text{m}$  humana sobre la superficie de las células resistentes. En algunas transfecciones las poblaciones obtenidas se clonaron por dilución límite, seleccionándose los transfectantes C10, 1-7E, 1-10E y 2-5A, por su nivel de expresión elevado y homogéneo. Estos transfectantes se seleccionaron entre las placas sembradas a 0,3 células/pocillo y correspondían a los clonajes de B\*2705 (con y sin  $\beta_2\text{m}$ ), B\*2702 y N77 respectivamente. En el resto de los mutantes se seleccionaron directamente los pocillos que crecieron después de la transfección y que tenían una buena expresión, homogénea y estable, de HLA-B27.

### 3.9.3. Citometría de flujo

La expresión de HLA-B27 sobre la superficie de las células transfectadas se determinó por citometría de flujo. Las células se incubaron con los Acm ME1, W6/32, B2.62.2 o BMM.1. Este proceso se realizó a 4°C durante 30 min, en un volumen de 100  $\mu\text{l}$  de una dilución 1/100 de líquido ascítico y, en el caso de BMM.1, de una dilución 1/2 del sobrenadante de cultivo del hibridoma. Posteriormente, las células se sometieron a tres lavados para eliminar el exceso de anticuerpo y se incubaron otros 30 min a 4°C con 100  $\mu\text{l}$  de una dilución 1/50 de una preparación  $\text{F(ab')}_2$  de cabra anti-IgG de ratón fluoresceínada (Kallestad). De nuevo se lavaron las células tres veces y se determinó la fluorescencia incorporada sobre  $5 \times 10^3$  células viables mediante un citómetro de flujo EPICS C (Coulter Electronics Inc.).

## **4.- RESULTADOS**

## 4. RESULTADOS

### 4.1. PAPEL DE LOS RESIDUOS 63-84 EN LA ALOESPECIFICIDAD SEROLOGICA DE HLA-B27: GENERACION DE ANTICUERPOS CONTRA EL PEPTIDO 63-84

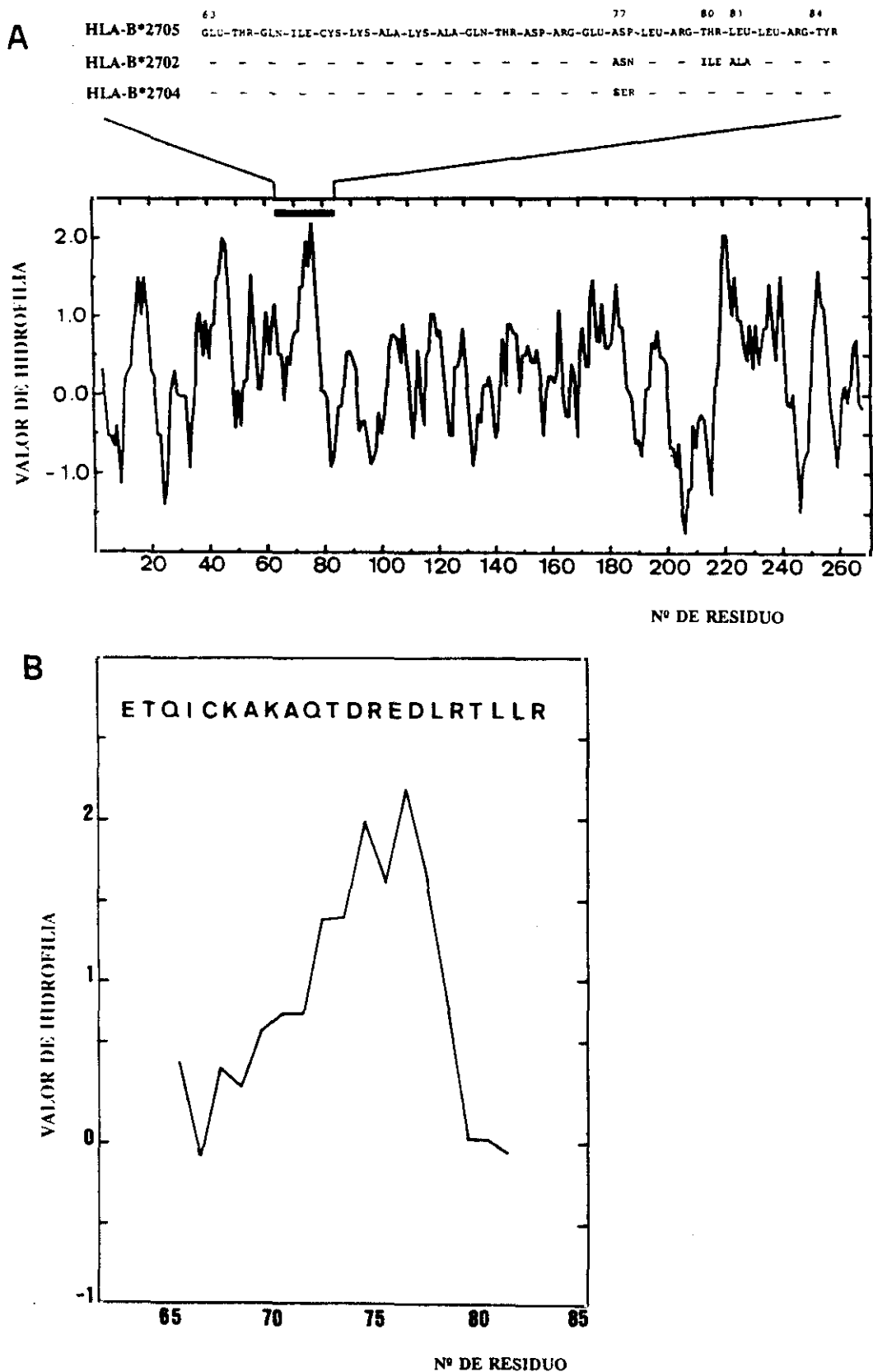
Con el fin de determinar la relevancia de la región 63-84 en la aloespecificidad del antígeno HLA-B27, construimos un péptido sintético que reproducía la secuencia de B\*2705 en dicho segmento. La elección de este péptido para nuestro estudio se realizó en base a tres criterios: 1) Corresponde a una de las zonas de mayor variabilidad entre los antígenos HLA de Clase I; 2) En esta región se encuentra el grupo de diferencias más significativo entre HLA-B27 y los antígenos HLA-B7 y HLA-B40 (Bw60), serológicamente relacionados. Además, los subtipos de B27, con excepción de B\*2703, presentan una o más sustituciones en esta región; 3) El segmento 63-84 posee el valor local de hidrofilia mayor de toda la molécula (284) (Fig. 8A). En general, existe una mayor probabilidad de que las regiones con mayor hidrofilia estén expuestas en la superficie de la molécula y formen parte de determinantes antigénicos. La localización de este segmento en la superficie de la molécula fue confirmada posteriormente por la estructura tridimensional de los antígenos HLA.

#### 4.1.1. Especificidad de los anticuerpos generados contra el péptido 63-84

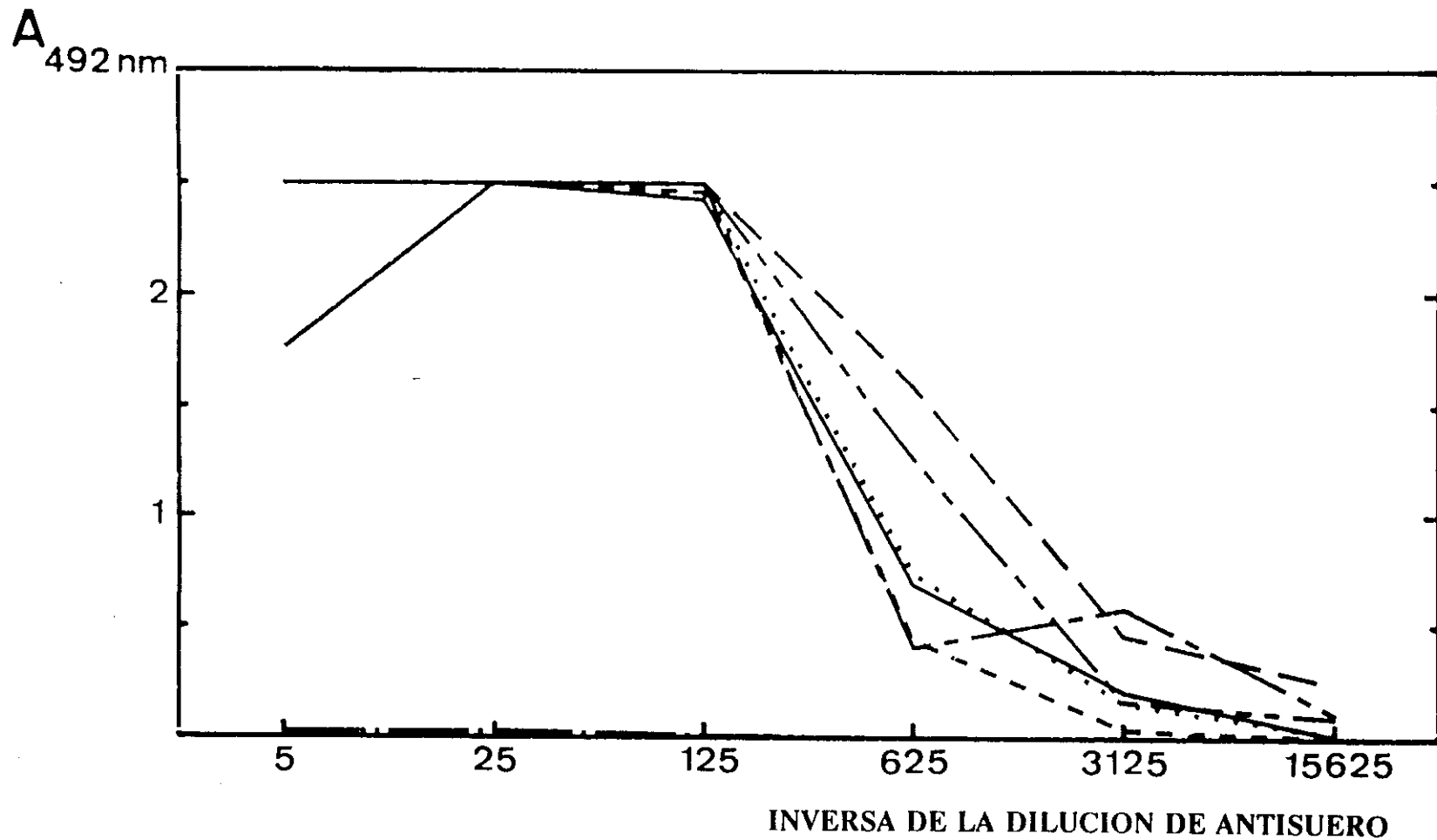
El péptido se acopló a la proteína KLH, por los tres procedimientos descritos en 3.6.2, inmunizándose dos conejos con cada una de las preparaciones. La presencia de anticuerpos específicos en los sueros de estos animales se detectó por ELISA, utilizando placas previamente recubiertas con el péptido. Los resultados, representados en la Fig. 9, muestran que todos los antisueros reaccionaron de forma semejante con el péptido inmunizante e indican que la cantidad de anticuerpos dirigidos contra éste era comparable en todos ellos.

#### 4.1.2. Reconocimiento de B27 por el antisuero anti-péptido

La presencia de anticuerpos reactivos con la molécula nativa de HLA-B27 en estos sueros se detectó por ensayos de citotoxicidad mediada por complemento. Aunque todos los antisueros contenían anticuerpos anti-péptido, únicamente tres de ellos (S2, S4 y S6) reconocieron a B27 expresado sobre la superficie de las células LG2. Estos tres antisueros se obtuvieron por inmunización con los complejos KLH-MBS-péptido, KLH-PAPA-péptido y KLH-carbodiimida-péptido, respectivamente, lo que indica una eficacia similar de los tres tipos de conjugados en la generación de anticuerpos.



**Figura 8.** A) Perfil de hidrofiliya de la porción extracelular de HLA-B27, determinado según el método de Hopp y Wood (284). La barra indica la localización del segmento 63-84. En la parte superior están representadas las secuencias de los subtipos B\*2705 (46), B\*2702 (115) y B\*2704 (116). El valor de máxima hidrofiliya, centrado en el residuo 76, es de 2,2 en B\*2705 y disminuye a 1,7 por los cambios ocurridos en los subtipos B\*2702 y B\*2704. B) Perfil de hidrofiliya del péptido 63-84.



**Figura 9.** Titulación, mediante ensayos de ELISA, de la cantidad de anticuerpos anti-péptido-63-84 presente en el suero de distintos animales inmunizados. S1 (—), S2 (- - -), S3 (- · - · -), S4 (.....), S5 (- · -), S6 (- · -). Se incluyó como control suero de conejo no inmune (- · -).

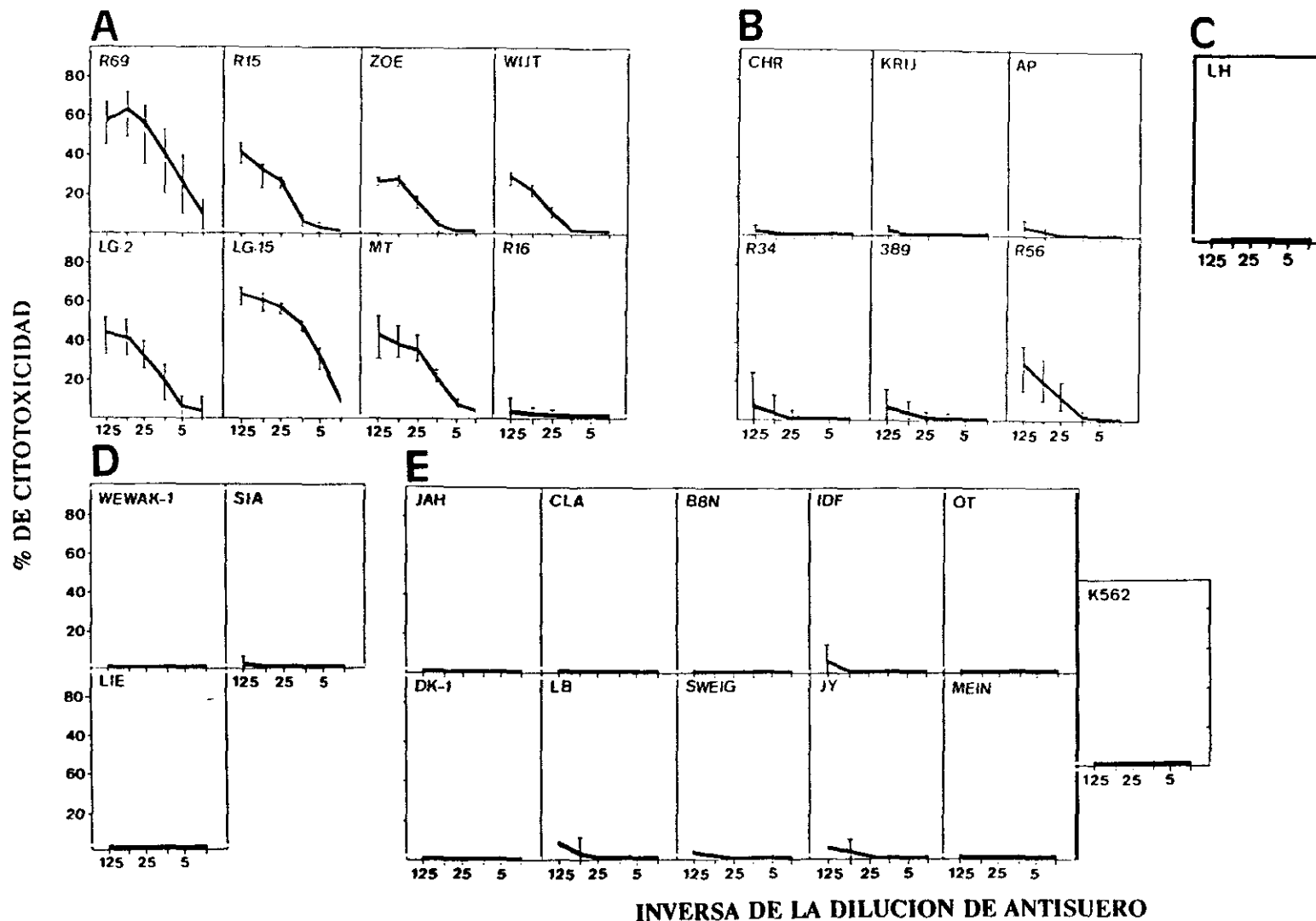
Posteriormente se determinó la reactividad del antisuero S2, que era el más eficiente en citotoxicidad, con 28 líneas celulares, cuyos tipajes HLA se muestran en la Tabla IV. Una de ellas, K562, procedente de un tumor eritroblastoide humano, no expresaba antígenos HLA en su superficie, mientras que las restantes, de origen linfoblastoide, incluían 10 líneas B27- y 18 B27+. Entre estas últimas una correspondía al subtipo B\*2701, seis a B\*2702, dos a B\*2704, ocho a B\*2705 y una a B\*2706. En la Fig. 10 están representadas las curvas obtenidas al analizar la capacidad citotóxica del antisuero a seis diluciones distintas. Los anticuerpos contenidos en S2 reconocieron, únicamente, a las células que expresaban el subtipo B\*2705 (Fig. 10A) y no a las líneas B27- (Fig. 10D), ni a las que expresaban los restantes subtipos de B27 (Fig. 10B y C). No obstante, se detectaron dos excepciones constituídas por las líneas R16, que no fue lisada a pesar de ser B\*2705+, y R56 que, expresando el subtipo B\*2702, fue lisada parcialmente. El Acm W6/32, monomórfico de Clase I, indujo la citotoxicidad de todas la LCL eficientemente, lo que descartó una mayor resistencia a la lisis de algunas de ellas.

Dos hechos sugieren que la resistencia a la lisis de R16 no es debida a la presencia de un nuevo subtipo de HLA-B27 en esta célula: 1) La movilidad en electroenfoque del antígeno B27 inmunoprecipitado de esta línea celular y la del subtipo B\*2705, obtenido a partir de la línea LG2, fueron idénticas. 2) Se llevaron a cabo mapas peptídicos comparativos entre ambas moléculas, tras el marcaje metabólico de las líneas R16 y LG2 con Leu, Thr y Lys marcados con  $^3\text{H}$  y  $^{14}\text{C}$ , respectivamente. Con estos aminoácidos se detectaban todos los péptidos trípticos posibles de la región 63-84, además de cubrir el 77% de la molécula. Los mapas fueron idénticos. No se puede descartar, sin embargo, la existencia de algún cambio, fuera de la zona examinada, que no provoque una alteración de la carga de la molécula.

Asimismo, es improbable que la lisis residual de la línea R56 producida por el antisuero, refleje la expresión en su superficie de un nuevo subtipo de B27, ya que la molécula B27 presente en esta línea celular se comporta como B\*2702 frente a CTL alogénicos (120-122) y restringidos (100) anti-B27.

#### **4.1.3. Especificidad de los anticuerpos generados frente al péptido 63-84**

Para comprobar que los anticuerpos anti-péptido estaban dirigidos contra el péptido y que la citotoxicidad no era producto de una reacción cruzada de los anticuerpos anti-proteína portadora con B27, se realizaron ensayos de inhibición de la lisis por el péptido inmunizante,



**Figura 10.** Capacidad citolítica, mediada por complemento, del antisuero anti-63-84, S2. El panel de LCL analizadas incluyó: A) células B\*2705+; B) B\*2702+; C) B\*2701+; D) B\*2704+ (Wewak-1 y SIA) y B\*2706+ (LIE); E) B27-. En la Tabla IV se halla el fenotipo HLA de estas líneas. Los valores experimentales representan la media de 3 a 8 experimentos independientes. Las barras verticales indican los valores máximo y mínimo obtenidos en cada punto.

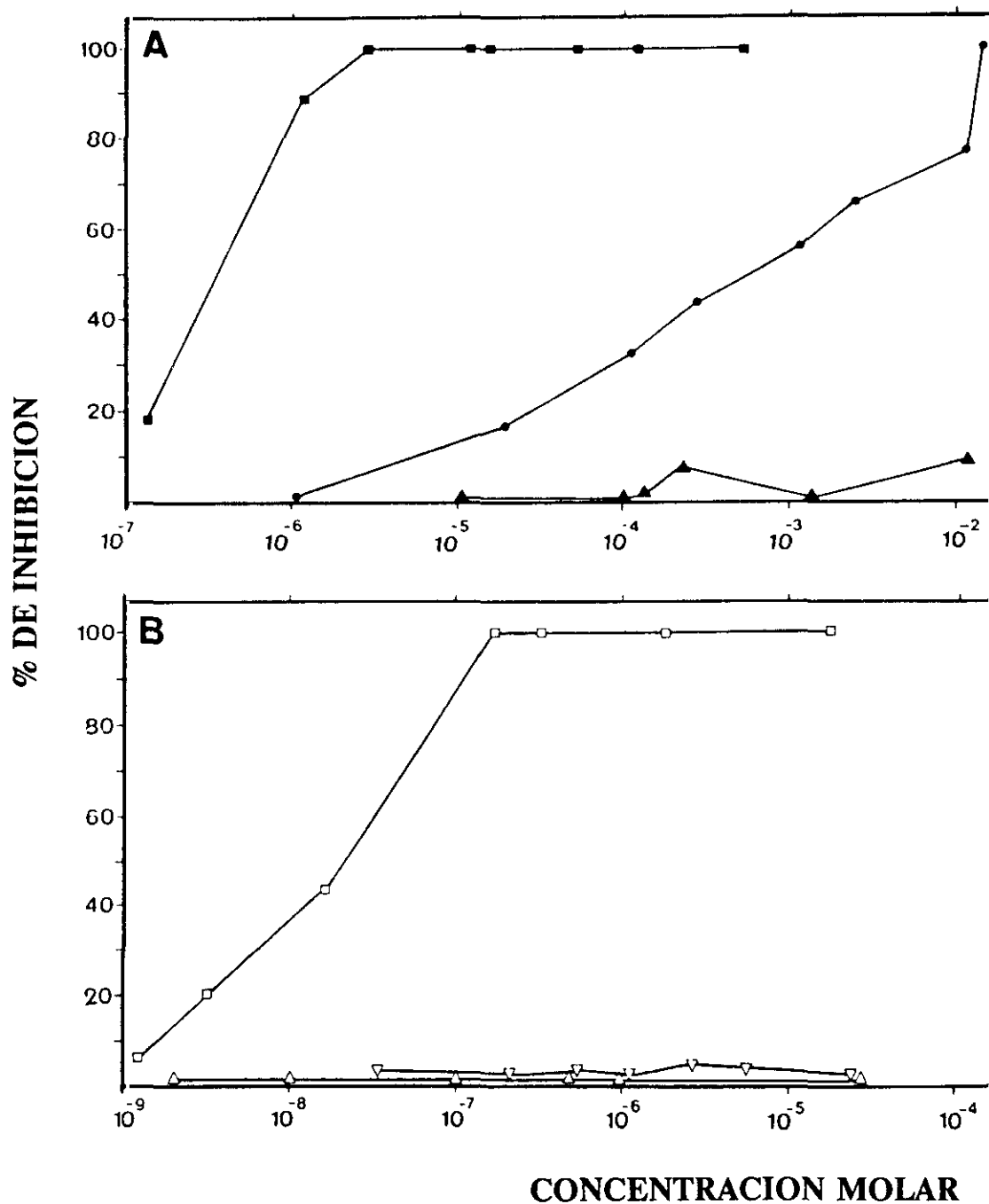
tanto libre como acoplado a una proteína portadora distinta de la utilizada en la inmunización (BSA). Como control se analizó la inhibición por un péptido irrelevante (A2<sub>175-187</sub>) y por BSA. Los resultados (Fig 11) mostraron que únicamente se inhibía la citotoxicidad por el péptido 63-84, y no por el irrelevante. Del mismo modo, el complejo BSA-PAPA-B27<sub>63-84</sub> bloqueó la lisis, mientras que no lo hicieron ni la BSA, ni el complejo BSA-PAPA-A2<sub>175-187</sub>. Además, se observó inhibición por el péptido 73-84, de menor tamaño que el inmunizante, pero que compartía su secuencia en estos residuos. No obstante, se requería una concentración molar  $10^2$  a  $10^3$  veces superior de este péptido para obtener un grado de inhibición comparable a la del péptido 63-84. La concentración molar del complejo BSA-péptido a la que se obtenía inhibición de la citotoxicidad, fue de 50 a 100 veces menor que la necesaria para una inhibición equivalente con el péptido solo. No obstante, la cantidad de péptido en ambos casos es del mismo orden de magnitud, debido a que hay acoplados, por término medio, alrededor de 25 moles de péptido por mol de BSA.

#### **4.1.4. Especificidad de los anticuerpos antipéptido frente a B27**

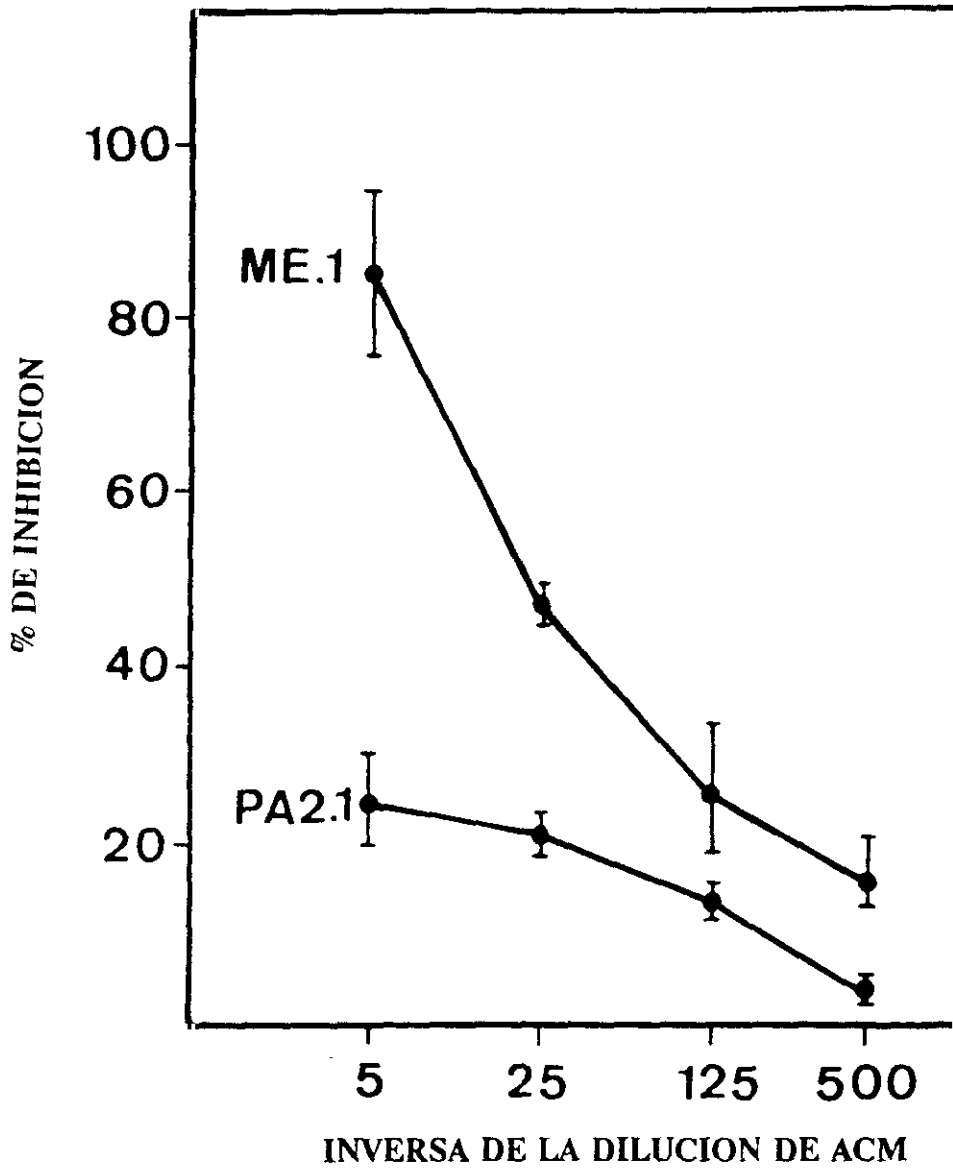
Para demostrar que la citotoxicidad inducida por el antisuero anti-péptido 63-84 era debida a su unión al antígeno HLA-B27 expresado en la superficie celular, se trató de inhibir la lisis de la línea B27+, LG2, por el Acm ME1, dirigido contra dicho antígeno. Como control negativo se analizó la capacidad inhibitoria del Acm irrelevante PA2.1, específico de HLA-A2. Ambos anticuerpos eran adecuados para nuestros ensayos debido a que ninguno de ellos puede fijar complemento, lo que les incapacita para inducir lisis celular. Los resultados mostraron (Fig 12) que sólo se producía inhibición tras la adición del Acm ME1 y no de PA2.1. No obstante, las concentraciones de ME1 requeridas para la inhibición total fueron relativamente altas.

#### **4.1.5. Discusión**

El antisuero generado contra el péptido 63-84 de HLA-B27 es capaz de reconocer exclusivamente al subtipo B\*2705, lo que indica que dicho péptido mimetiza un sitio aloantigénico de la molécula. El carácter alorreactivo de estos antisueros queda establecido, al menos, por tres criterios: 1) estos anticuerpos no provocan la lisis de células B27-, incluyendo las que expresan B7 o B40; 2) la lisis de dianas B27+ se inhibe selectivamente por el péptido 63-84. La menor capacidad inhibitoria del péptido 73-84 podría deberse a que su menor longitud no permitiría la estabilización en solución de una conformación semejante a la



**Figura 11.** Inhibición de la citotoxicidad mediada por complemento de la línea R69 (B\*2705+), inducida por el antisuero S2, por incubación con: A) péptido B\*2705<sub>63-84</sub> (■), péptido B\*2705<sub>73-84</sub> (●); péptido A2<sub>175-187</sub> (▲); B) conjugado BSA-PAPA-péptido B\*2705<sub>63-84</sub> (□); conjugado BSA-PAPA-A2<sub>175-187</sub> (▽); BSA (Δ)



**Figura 12.** Inhibición de la citotoxicidad mediada por complemento de la línea LG-2 (B\*2705+), inducida por el antisuero S2, por incubación con los Acm ME1 y PA2.1.

adoptada por la proteína nativa. 3) la citotoxicidad se inhibe específicamente por un Acm anti-B27. Además, este resultado indica que los anticuerpos antipéptido se unen a la molécula HLA-B27 nativa, expresada en la superficie celular.

Los anticuerpos anti-péptido no son capaces de inmunoprecipitar la molécula de B27 en lisados celulares, lo que sugiere que su unión a ella es débil y no resiste los lavados a que se someten los inmunoprecipitados. Sin embargo, para conseguir la inhibición de la citotoxicidad provocada por el antisuero, se requieren concentraciones elevadas del Acm ME1, cuya unión a B27 es mucho más fuerte. Esto sería explicable si, en determinadas circunstancias, la unión de los anticuerpos a un número de sitios relativamente bajo fuera suficiente para provocar la citotoxicidad mediada por complemento, produciéndose la inhibición sólo en el caso de que todos los sitios de unión posibles estuvieran bloqueados. Esto ocurriría, por ejemplo, en el caso de que cantidades no saturantes de Acm ocasionaran una alteración de la distribución de las moléculas de B27 en la superficie celular, de forma que aumentara la eficiencia lítica de los anticuerpos antipéptido. La inhibición podría deberse a un bloqueo del acceso de los anticuerpos antipéptido a la molécula debida a la unión de ME1 a B27. Esta explicación es la más probable, ya que el residuo 67 parece estar espacialmente próximo al determinante reconocido por este Acm (119), y se ha sugerido la participación en él de los residuos 69 y 71 (52), todos ellos incluidos en la secuencia del péptido. Otra posible interpretación es que la unión de ME1 induzca cambios conformacionales que alteren los epítomos reconocidos por dichos anticuerpos (285).

Los subtipos de B27 analizados en estos ensayos difieren en un número variable de sustituciones en la región de la secuencia reproducida por el péptido. El cambio en el residuo 77 es común a todos ellos, e implica la pérdida de una carga negativa. Además, esta sustitución reduce en los subtipos B\*2702 y B\*2704 el valor local de hidrofilia en ese segmento de la molécula (Fig. 8A). El máximo valor local de hidrofilia del péptido 63-84 está centrado en el Asp 77 (Fig. 8B), lo que sugiere una inmunodominancia de este residuo (114). Así, la respuesta antipéptido iría dirigida mayoritariamente contra el Asp 77, lo que explicaría el fallo del antisuero para reconocer a los subtipos que varían en esta posición. Se han descrito casos semejantes a éste, en los que anticuerpos generados contra un péptido sintético son capaces de distinguir entre variantes alotípicas de una proteína que diferían tan solo en un aminoácido (286).

El Acm M2, dirigido contra B27, es capaz de distinguir los distintos subtipos, por lo que se ha sugerido que la posición 77 sería crucial para su reconocimiento. Este residuo parece crítico igualmente para la reactividad de un antisuero que reconoce únicamente al subtipo B\*2705 (118). Estos datos, junto con los de nuestro antisuero, resaltan la importancia del residuo 77 en la aloantigenicidad de HLA-B27. La mayoría de los antígenos HLA secuenciados difieren de B27, bien por la pérdida del Asp en posición 77, o bien por una sustitución de Glu a Val en la posición 76 (50). Ambas sustituciones representan una pérdida local de carga negativa en esa región y podrían ejercer efectos similares, alterando la carga de aquellos epítomos en los que participan.

Nuestros resultados, junto con los obtenidos en un estudio en el que obtienen anticuerpos que reconocen específicamente a HLA-B7 por inmunización con el péptido 63-84 de éste (56), confirman las hipótesis previas que proponían que la región 63-84 constituiría uno de los sitios aloantigénicos de mayor importancia de los antígenos HLA de Clase I (46-49). El hecho de que el antisuero anti-péptido 63-84 reaccione exclusivamente con B\*2705 sugiere que los determinantes responsables de la especificidad serológica B27, que engloba a todos los subtipos de B27, implicarían residuos localizados en otras áreas polimórficas de la molécula. No obstante, el segmento 63-74, común a todos los subtipos, también podría contribuir a ellos.

Los estudios con antisueros generados contra péptidos sintéticos son informativos, pero parecen estar limitados a algunas secuencias determinadas, ya que anticuerpos generados contra las regiones 39-50, 99-118, 168-186 y 215-232 de HLA-B7 (55,56,59) no fueron capaces de reconocer al antígeno HLA-B7 nativo. Del mismo modo, nosotros hemos obtenido anticuerpos inmunizando con los péptidos que reproducían las secuencias 146-160 de HLA-B7, 175-187 de HLA-Bw60 y HLA-B7 y 175-187 de HLA-A2 y HLA-A28, correspondientes a regiones altamente polimórficas de la molécula. Ninguno de los antisueros reconocía a los antígenos HLA correspondientes. En algunos casos, se han obtenido anticuerpos antipéptido que reaccionan con las proteínas intactas pero no son aloespecíficos (59). Recientemente, se han generado 9 antisueros frente a péptidos sintéticos correspondientes a distintas regiones polimórficas de los antígenos HLA-A2 y B7, 3 de los cuales son aloespecíficos (58). Los antisueros frente a los péptidos A2.170-185 y B7.99-118 no reconocían a la molécula HLA correspondiente, en concordancia con los resultados expuestos previamente. Otros péptidos de este análisis solapaban parcialmente con los utilizados en estudios anteriores y que no habían

dado lugar a antisueros reactivos con la molécula HLA. Los autores proponen que, además del grado de variabilidad e hidrofilia de la secuencia, la longitud del péptido sería crítica, de forma que los péptidos menores de 14 aminoácidos no inducirían eficientemente anticuerpos anti-HLA, mientras que los de más de 20 generarían una buena respuesta. Adicionalmente, la falta de reconocimiento de la proteína nativa por algunos anticuerpos anti-péptido puede deberse al grado de exposición o a la conformación de la secuencia correspondiente dentro de la molécula. Por otra parte, entre las diversas conformaciones que puede adoptar un péptido en solución (287), la mayoritaria no tendría por qué coincidir necesariamente con la adoptada por esa secuencia en la proteína.

## **4.2. CARACTERIZACION ESTRUCTURAL DE LOS SUBTIPOS DE B27**

### **4.2.1. Análisis estructural del subtipo B\*2701**

Las cadenas pesadas de B27 correspondientes al subtipo B\*2701, cuya secuencia se quería determinar, y B\*2705, de secuencia conocida y frente al que se realizó la comparación, se inmunoprecipitaron a partir de lisados celulares procedentes de las líneas LH y LG2, respectivamente. Se empleó la estrategia experimental utilizada con anterioridad para la caracterización de otros subtipos (115-117). En primer lugar, se llevaron a cabo los mapas trípticos comparativos correspondientes a los marcajes con Lys, Ser, Leu, Ala y Tyr. Con estos aminoácidos se marcaron péptidos solapantes que cubrían el 97% de la molécula. Cualquier diferencia entre las dos moléculas se debía reflejar en un pico de diferencia en los mapas peptídicos, consistente en una variación en la altura o la amplitud del pico, en su desaparición o en un cambio en el tiempo de retención en la columna. Los mapas de Lys y Ser (Fig. 13 y 14) resultaron idénticos, indicando la ausencia de variaciones en los péptidos que contenían estos aminoácidos. En el caso del marcaje con Ser se realizó, paralelamente al mapa comparativo entre los dos subtipos, un mapa comparando la molécula de B\*2705 marcada con  $^3\text{H}$  y  $^{14}\text{C}$ . Con este mapa control se identificaron los picos de diferencia debidos a la conversión metabólica de Ser a Gly.

El mapa de Leu presentó 5 picos de diferencia entre las dos moléculas, que se denominaron: L1, L2, L3, L4 y L9, de acuerdo con su fracción de elución en el cromatograma (Fig 15A). L1 y L9 estaban marcados con  $^{14}\text{C}$  y L2 con  $^3\text{H}$ , mientras que en L3 y L4 se observó una diferencia en la altura de los picos correspondientes a ambos isótopos. Estos últimos se recromatografiaron

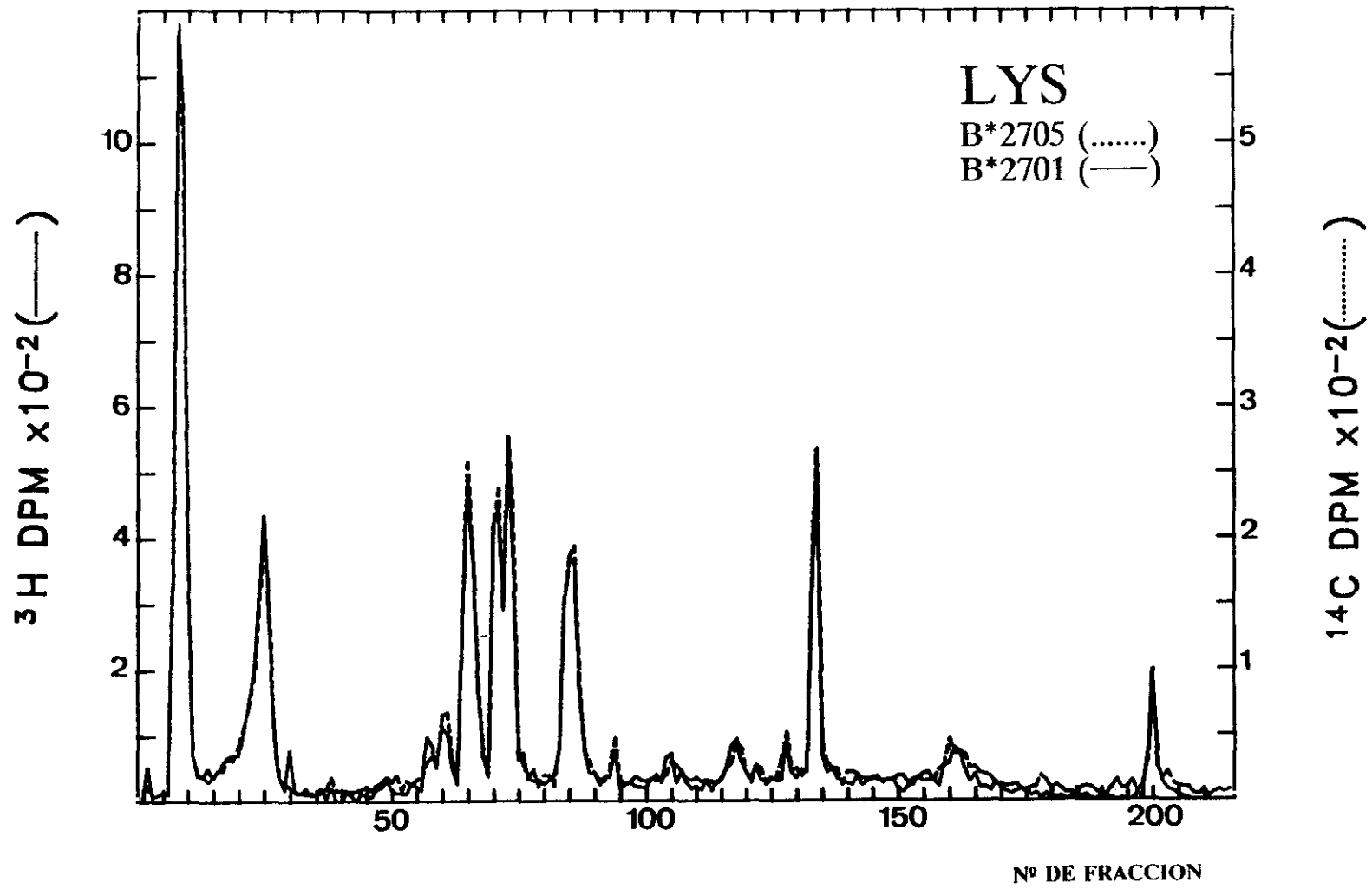
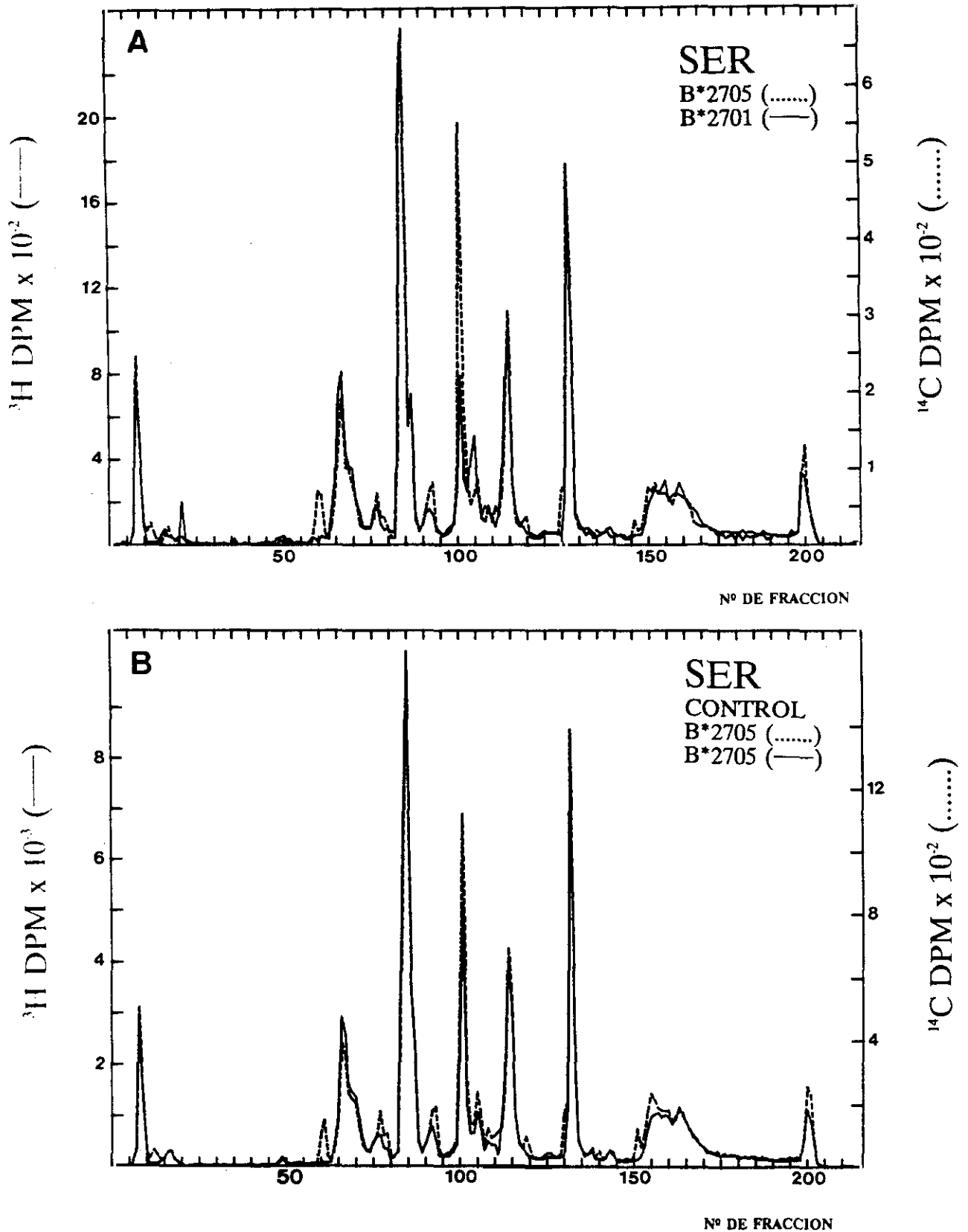


Figura 13. Mapa trípico comparativo entre los subtipos B\*2701 ( $^3\text{H}$ ) y B\*2705 ( $^{14}\text{C}$ ) correspondiente al marcaje con Lys.

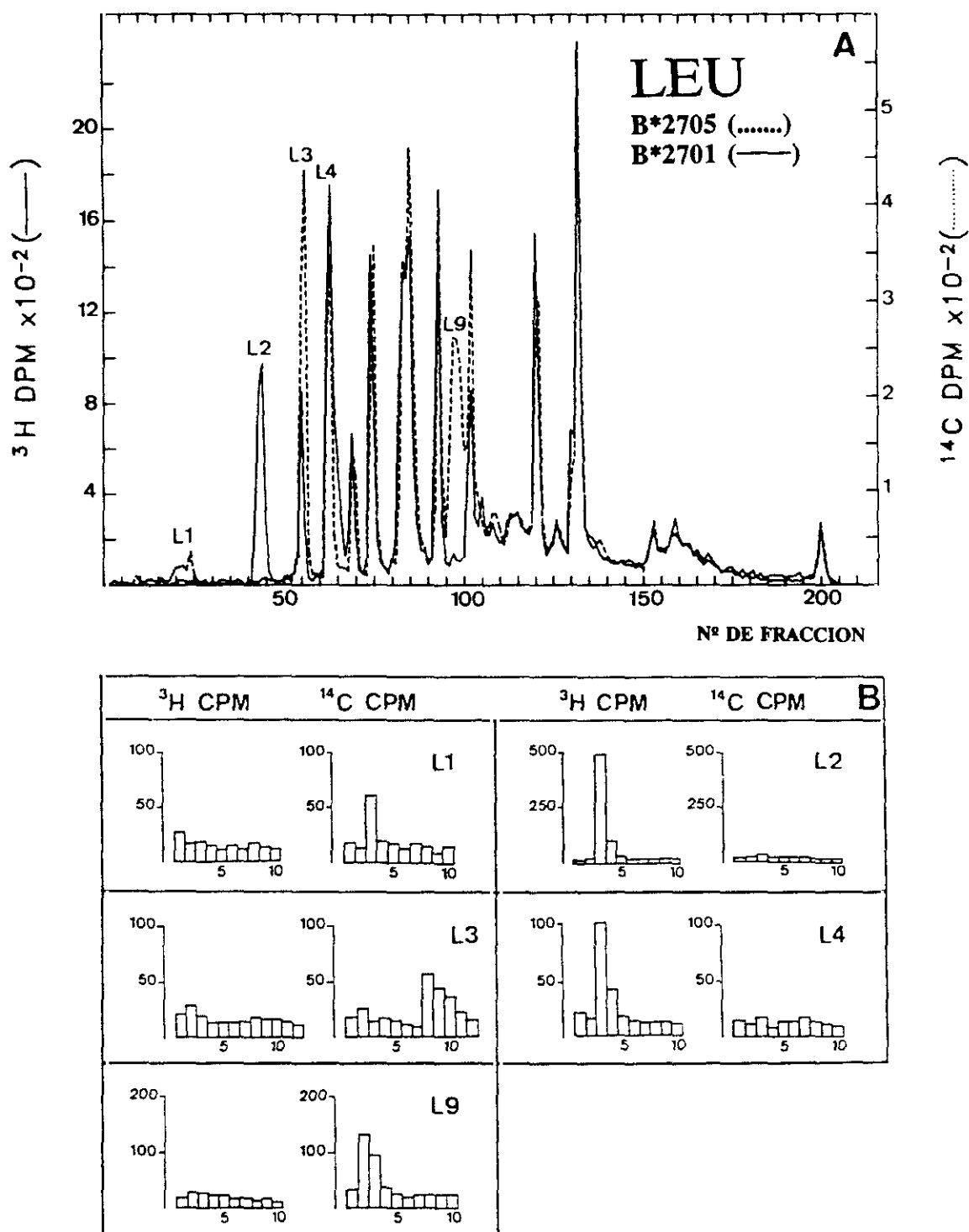


**Figura 14.** A) Mapa tríptico comparativo entre los subtipos B\*2701 ( $^3\text{H}$ ) y B\*2705 ( $^{14}\text{C}$ ), correspondiente al marcaje con Ser. B) Mapa control para la detección de los picos de diferencia debidos a interconversión metabólica, en el que se comparan la molécula de B\*2705 marcada con  $^3\text{H}$ -Ser y la misma molécula marcada con  $^{14}\text{C}$ -Ser.

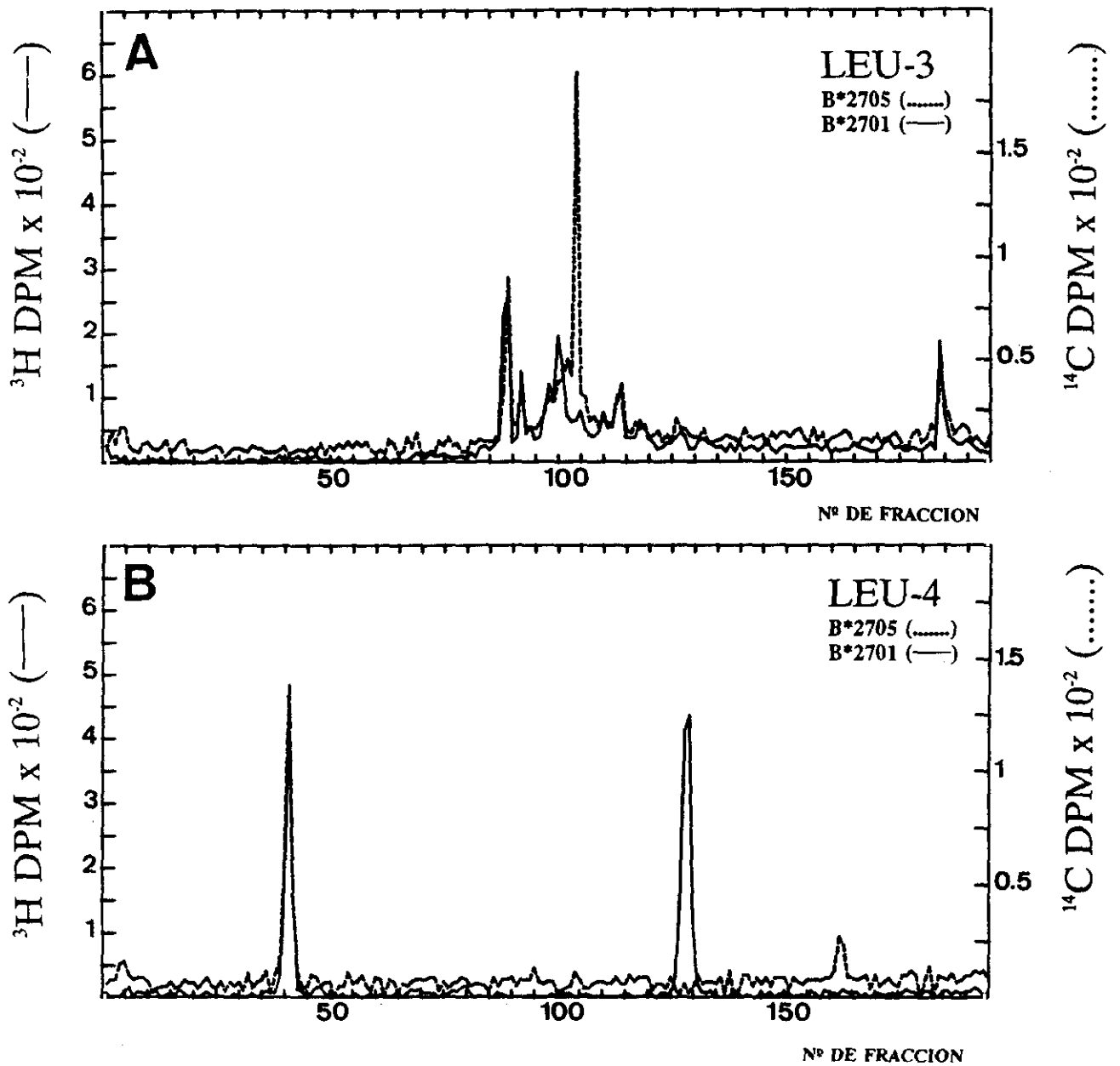
en un sistema de intercambio iónico (Fig. 16A y B), para separar la mezcla de péptidos incluida en ellos. En ambos casos se aisló un péptido de diferencia, que estaba marcado con  $^{14}\text{C}$  en L3 y con  $^3\text{H}$  en L4. Las secuencias radioquímicas de los picos de diferencia de  $^{14}\text{C}$ , pertenecientes a B\*2705, presentaron radiactividad en los ciclos: 3 en L1, 8 en L3 y 2 y 3 en L9 (Fig. 15B). Estos resultados, junto con la posición de elución de los picos (115,116), sugerían que L1 era el péptido 76-79 (EDLR), L3 el 71-79 (AQTDREDLR), generado por digestión parcial en R75-E76, y L9 el 80-83 (TLLR). La secuenciación de los picos L2 y L4, marcados con  $^3\text{H}$ , mostró radioactividad en el ciclo 3 en ambos casos, indicando la posibilidad (como se comprobará en mapas posteriores) de que dichos péptidos fueran la contrapartida de L1 y L9, respectivamente. No obstante, la presencia de radiactividad en los ciclos 2 y 3 en L9 y únicamente en el ciclo 3 en L4, indicaba que, si realmente ambos picos correspondían al péptido 80-83, en B\*2703 habría desaparecido la Leu que B\*2705 posee en el residuo 81. Además, la ausencia del péptido de digestión parcial 71-79 en la molécula variante sugería la posibilidad de un cambio en este péptido que facilitara la digestión trípica.

En el mapa de Ala se detectaron tres picos de diferencia: A4, A5 y A11 (Fig. 17A). A4 se identificó como el péptido 71-79 de B\*2705, debido a su posición en el cromatograma y a la presencia de  $^{14}\text{C}$  en el ciclo 1 de su secuencia (Fig. 17C). El pico A5 tuvo que ser purificado por cromatografía de intercambio iónico, detectándose dos péptidos de diferencia en el marcaje de  $^3\text{H}$ , denominados A5.3 y A5.4, además de algunos péptidos contaminantes idénticos (Fig. 17B). A5.3 contenía radiactividad en los ciclos 1 y 2, mientras que A5.4 solo la presentaba en el ciclo 1 (Fig. 17C). La radiactividad en el ciclo 1 en A5.3 se debía, como se verá en mapas posteriores, a una separación incompleta de los dos péptidos en las condiciones cromatográficas utilizadas. El hecho de que A5 eluyera en las mismas fracciones que L4, unido a su secuencia, concordaba con que el péptido A5.3 fuera el 80-83 en el que la Leu en posición 2 habría cambiado a Ala. La secuencia del pico A11 también exhibía radiactividad en el ciclo 2, sugiriendo que este péptido podría ser un producto de degradación intermedio que, tras digestión completa, daría lugar al A5.3. El péptido A5.4, que contenía Ala en posición 1, podría consistir en un péptido de B\*2701 que comenzase en la posición 71 (posiblemente el equivalente a AQTDR de B\*2705).

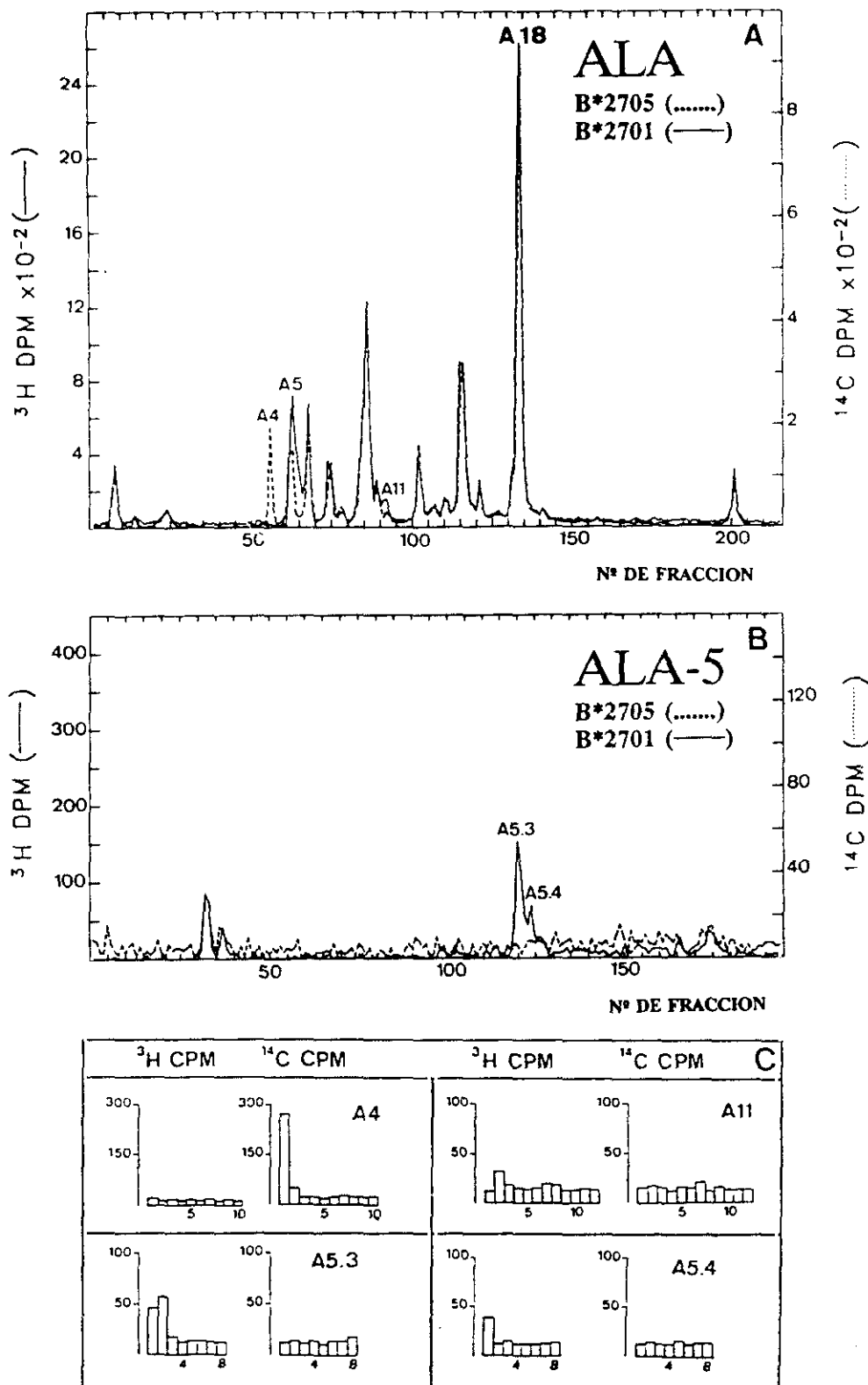
El mapa de Tyr presentó dos picos de diferencia en el marcaje de  $^3\text{H}$ : Y1 e Y6, no observándose sus contrapartidas de  $^{14}\text{C}$  (Fig. 18A). La secuencia de Y1 (Fig.18B) mostró



**Figura 15.** A) Mapa tríptico comparativo entre los subtipos B\*2701 ( $^3\text{H}$ ) y B\*2705 ( $^{14}\text{C}$ ), correspondiente al marcaje con Leu. Los picos se han numerado según su posición de elución. Los péptidos de diferencia contenidos en L3 y L4 se purificaron mediante cromatografía de intercambio iónico. B) Secuencia radioquímica de los picos de diferencia. En el eje Y está representada la radiactividad de  $^3\text{H}$  y  $^{14}\text{C}$  y en el X el número de ciclo.



**Figura 16.** Purificación de la mezcla de péptidos contenida en los picos L3 (A) y L4 (B) por cromatografía de intercambio iónico.



**Figura 17.** A) Mapa trípico comparativo entre los subtipos B\*2701 ( $^3\text{H}$ ) y B\*2705 ( $^{14}\text{C}$ ), correspondiente al marcaje con Ala. B) Purificación de la mezcla de péptidos contenida en el pico A5 mediante cromatografía de intercambio iónico. C) Secuencia radioquímica de los picos de diferencia.

radiactividad en el ciclo 4. Esto, unido a su posición de elución coincidente con la del pico A5, indicó la presencia en dicho pico del mismo péptido que se había denominado A5.4 en el mapa de Ala y que correspondería al que comienza en posición 71 de B\*2701. Estos resultados sugerían que en Y1 habría ocurrido una sustitución del residuo de Asp en posición 74, presente en B\*2705, por una Tyr. El pico de diferencia aparente Y6, reveló radiactividad en los ciclos 1 y 2 en los marcajes de  $^3\text{H}$  y de  $^{14}\text{C}$  (Fig. 18B). Tanto por su secuencia como por su posición de elución, Y6 se identificó como el glicopéptido, que se extiende entre los residuos 83-108 y que contiene la molécula de carbohidrato unida a N86. Dicho péptido eluía, generalmente, como dos péptidos consecutivos en el cromatograma (Y5 e Y6). Como se ha observado en otras ocasiones (288), la discrepancia de altura en Y6, a pesar de ser un péptido idéntico entre ambas moléculas, se debería a diferencias entre líneas celulares en la proporción relativa de especies moleculares del antígeno con distinto grado de sialización. No obstante, para descartar una posible diferencia no detectada dada la considerable longitud del péptido, Y5 se sometió a digestión con quimotripsina (Fig. 18C). También, se digirió el pico correspondiente al glicopéptido en el marcaje de Val. En ambos casos, no se pudo encontrar ninguna diferencia adicional en los péptidos de menor tamaño generados.

La realización de los mapas peptídicos, anteriormente descritos, condujo a la detección de tres péptidos de diferencia: 80-83 que habría sufrido un cambio en posición 81 de Leu a Ala; el que comenzaba en posición 71, con una sustitución del Asp en 74 por Tyr; y 76-79 cuyo cambio estaba sin determinar. Con el fin de averiguar que cambio había sucedido en este péptido, y de completar la secuencia de los péptidos de diferencia por si hubiera algún cambio adicional en ellos, se realizaron nuevos marcajes con Thr, Gln y Asn.

Mediante el marcaje de Thr se estableció la presencia de este aminoácido en las posiciones 73 y 80 de B\*2701 (Fig. 19). Se detectaron 4 picos de diferencia: T1 y T8, marcados con  $^{14}\text{C}$  y T3 y T6, marcados con  $^3\text{H}$ . El pico T1 tuvo que ser repurificado ya que presentaba contaminación por dos péptidos idénticos, que eluían en la misma posición en el sistema de purificación empleado (Fig. 19A). Las condiciones de la segunda cromatografía, en HPLC, consistieron en un gradiente lineal de TFA y acetonitrilo. La secuencia del pico de diferencia obtenido, correspondiente a B\*2705 dio como resultado radiactividad en el ciclo 3 (Fig. 19C). Este péptido, por su posición de elución, análoga a la de los picos L3 y A4, se asignó como el 71-79 de B\*2705. La secuencia de T8 mostró  $^{14}\text{C}$  en el ciclo 1 y, puesto que coincidía con L9

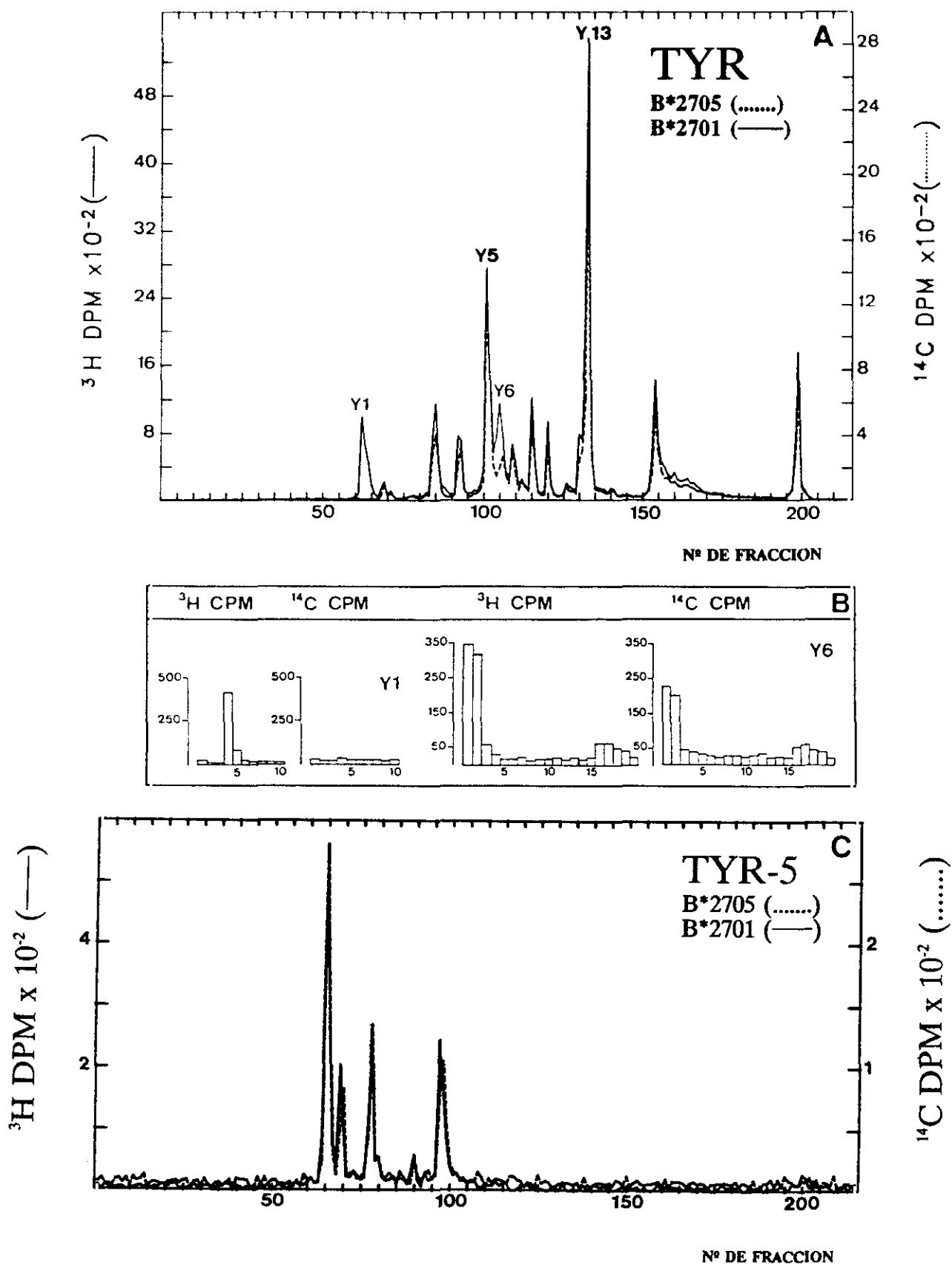
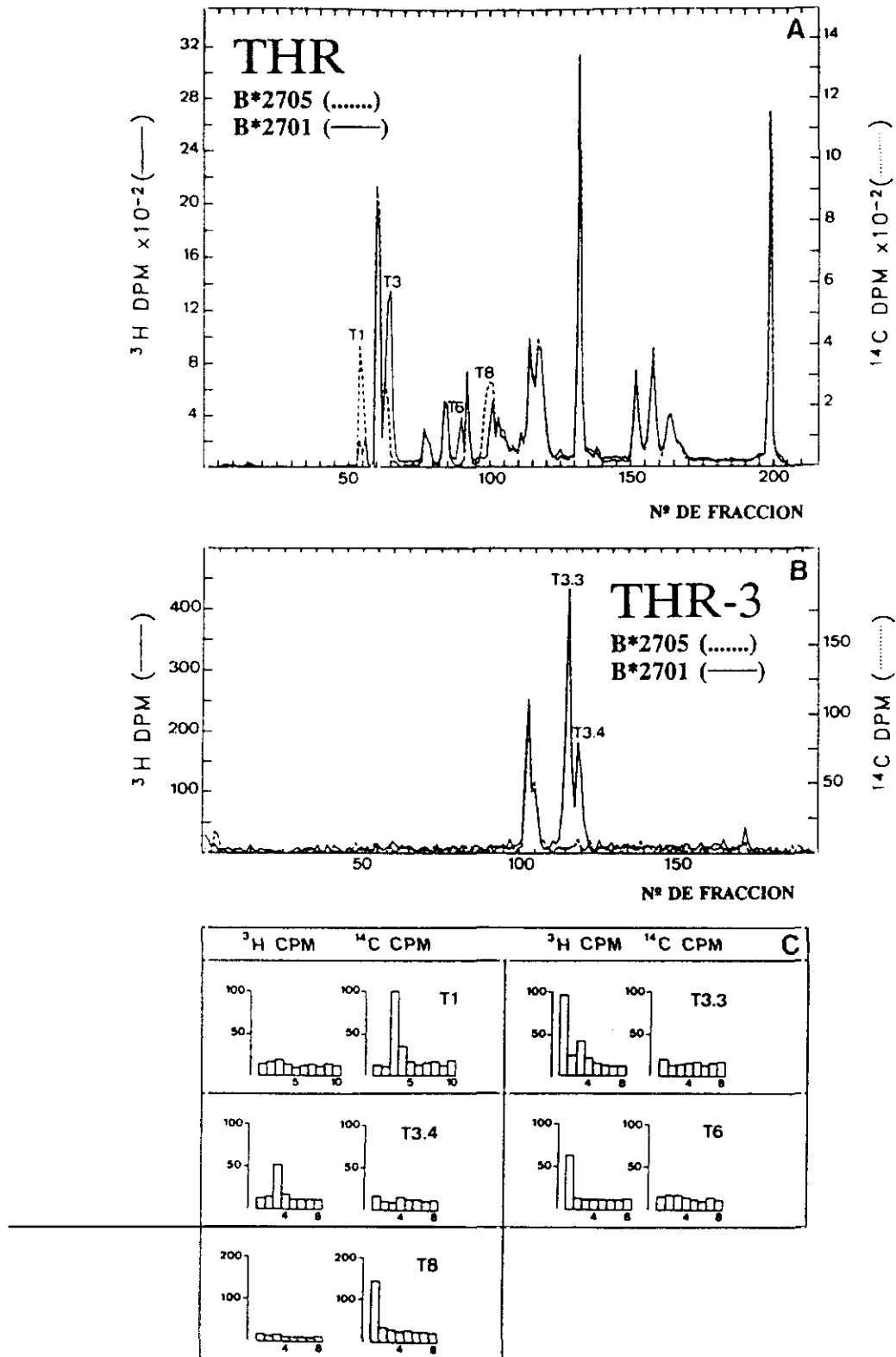


Figura 18. A) Mapa tríptico comparativo entre los subtipos B\*2701 ( $^3\text{H}$ ) y B 2705 ( $^{14}\text{C}$ ), correspondiente al marcaje con Tyr. B) Secuencia radioquímica de los picos de diferencia. C) Digestión quimotríptica del pico Y5 y separación de los péptidos resultantes por HPLC.

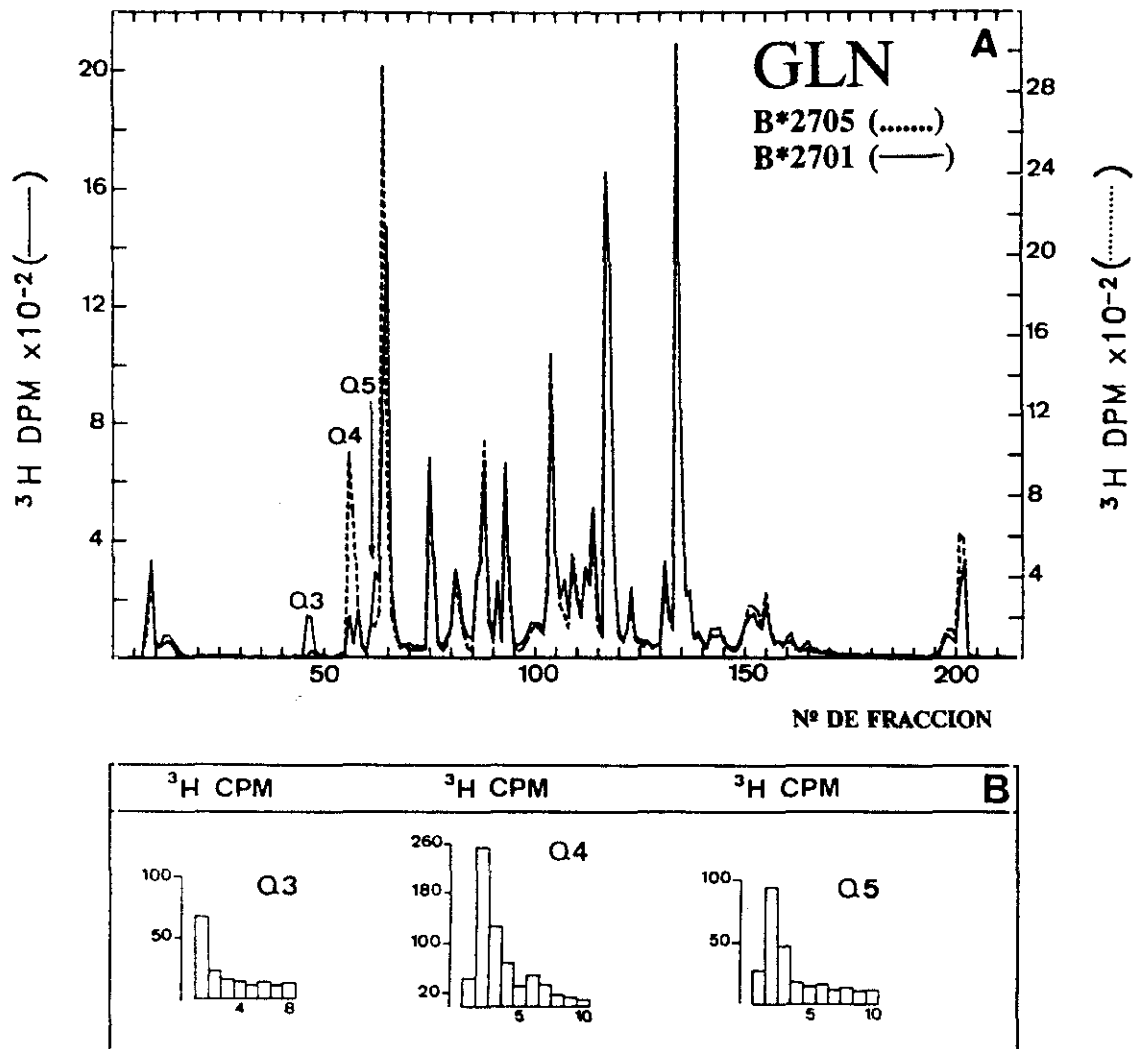


**Figura 19.** A) Mapa trípico comparativo entre los subtipos B\*2701 (<sup>3</sup>H) y B\*2705 (<sup>14</sup>C), correspondiente al marcaje con Thr. B) Purificación de la mezcla de péptidos contenida en el pico T3 mediante cromatografía de intercambio iónico. C) Secuencia radioquímica de los picos de diferencia.

en el cromatograma, se identificó como el péptido 80-83 de B\*2705. El pico T3 que eluía en la misma posición que A5, se repurificó por cromatografía de intercambio iónico (Fig. 19B). Dio lugar a un pico idéntico y a dos marcados con  $^3\text{H}$ , denominados T3.3 y T3.4. Estos picos coincidían con A5.3 y A5.4. La secuencia de T3.3 presentó radiactividad en 1 y 3. La radiactividad en 3 era debida a una separación incompleta de T3.3 y T3.4 (Fig. 19C). La presencia de Thr en posición 1, junto con la de Ala en 2 en A5.3 y la de Leu en 3 en L4, todos ellos con una posición de elución idéntica, concordaba con que este péptido fuera el 80-83 de B\*2701, en el que el residuo 81 se habría sustituido por una Ala. La secuencia de T3.4 mostró que el aminoácido marcado se hallaba en posición 3, confirmando que este péptido era el que tenía su origen en la posición 71, como se había identificado previamente por secuenciación de A5.4 e Y1. La posición de T6 coincidía con la de A11, y sus secuencias exhibían marcaje de  $^3\text{H}$  en los ciclos 1 y 2, respectivamente. Esto apoyaba la posibilidad de que este péptido comenzara en el residuo 80 como consecuencia de una degradación parcial.

A continuación se marcaron metabólicamente, tanto B\*2705 como B\*2701, con  $^3\text{H}$ -Gln. Para ello, se utilizó un medio carente en Gln y Glu, marcando de esta forma ambos residuos por interconversión metabólica. Con este mapa se detectaron los péptidos 18-21 y 45-48, completando así el mapeo de la porción extracelular de B27. Los digeridos trípticos correspondientes a las dos moléculas se cromatografiaron independientemente, debido a que estaban marcadas con el mismo isótopo. En la Fig. 20A están representados ambos mapas conjuntamente para facilitar su comparación. Q4 era el único pico de diferencia correspondiente a B\*2705. Su secuencia, con radiactividad en los ciclos 2 y 6, identificaba este péptido como el 71-79 (Fig. 20B). Los picos de diferencia de B\*2701 fueron Q3 y Q5. La secuencia de Q3 presentó radiactividad en el ciclo 1, y su situación en el cromatograma, idéntica a la de L2, indicó que era el péptido 76-79. En Q5, el aminoácido marcado estaba en posición 2 y su posición de elución, coincidente con la de los picos A5, Y1 y T3, sugirió que se trataba del péptido cuyo comienzo era la posición 71.

Faltaba por determinar una sustitución en el péptido 76-79. La secuenciación de L2 y Q3 (Fig. 15B y 20B) eliminaba la posibilidad de sustitución en las posiciones 76 y 78 por lo que el único residuo susceptible a un cambio era el 77. Este residuo varía de Asp a Ser o Asn en otros subtipos de B27. Además, la Asn es frecuente en otros antígenos HLA en esta posición. El cambio a Ser quedaba descartado ya que este mapa mostró una identidad absoluta entre ambas



**Figura 20.** A) Mapa tríptico comparativo entre los subtipos B\*2701 ( $^3\text{H}$ ) y B\*2705 ( $^3\text{H}$ ), correspondiente al marcaje con Gln. El digerido tríptico de cada una de las moléculas se cromatografió independientemente, representándose los resultados conjuntamente. B) secuencia radioquímica de los péptidos de diferencia.

moléculas. Por lo tanto, procedimos al marcaje de las moléculas normal y variante con  $^{14}\text{C}$ -Asn. Tras ser cromatografiadas independientemente, se realizó una representación conjunta de los mapas (Fig. 21A), detectándose dos picos de diferencia pertenecientes al subtipo B\*2701: N2 y N3. La localización de N2 en el cromatograma correspondía al péptido 76-79 y la presencia de radioactividad en el ciclo 2 confirmaba la existencia de un cambio en posición 77 de Asp a Asn (Fig. 21B). El pico N3 coincidía con los picos A11 y T6 y su secuencia, con radioactividad en el ciclo 7, era compatible con que este péptido se hubiera generado en B\*2701, como consecuencia de una rotura parcial del péptido que comenzaba en posición 80. Su secuencia sería: TALRYYNQSE..., aunque no se sabe con exactitud su extensión. La rotura tríptica incompleta del enlace  $\text{R}_{83}\text{-Y}_{84}$  en B\*2701 podría ser el resultado de la proximidad del carbohidrato, unido a la Asn 86.

Para descartar un cambio adicional en el péptido 122-145, enmascarado debido a su gran tamaño, realizamos digestiones quimotrípticas de los picos A18 e Y13, correspondientes a dicho péptido en los mapas de Ala y Tyr, respectivamente (Fig. 22A y B). No se detectó ninguna diferencia adicional en los péptidos generados.

La Fig. 23 resume la asignación efectuada por secuenciación de los aminoácidos de diferencia entre B\*2701 y B\*2705. Todos los cambios se hallan localizados en tres péptidos consecutivos: 71-75; 76-79 y 80-83. En B\*2701 se obtiene con un alto rendimiento el péptido 71-75 (al que se hace referencia a lo largo de la exposición como el que comienza en posición 71), mientras que en B\*2705 es prácticamente indetectable (se genera el parcial 71-79). Esta diferencia se debe a que la tripsina actuaría con menor eficiencia sobre la R75 de B\*2705, debido a la presencia de tres residuos ácidos en su proximidad: D74, E76 y D77. Las sustituciones de los residuos 74 y 77 en B\*2701 por aminoácidos no cargados aumentaría la susceptibilidad del residuo R75 a la acción de la enzima. Un efecto similar, aunque menos acusado, se detectó en B\*2702, donde únicamente D77 fue sustituido por un residuo no cargado (115).

Mediante el mapeo llevado a cabo, se determinaron los péptidos de diferencia y se obtuvo la secuencia de todos los residuos que los constituían, con excepción de las Arg carboxi-terminales. La única sustitución posible en estos residuos sería por una Lys, ya que había rotura tríptica en estas posiciones. Sin embargo, esta posibilidad queda descartada debido a que el

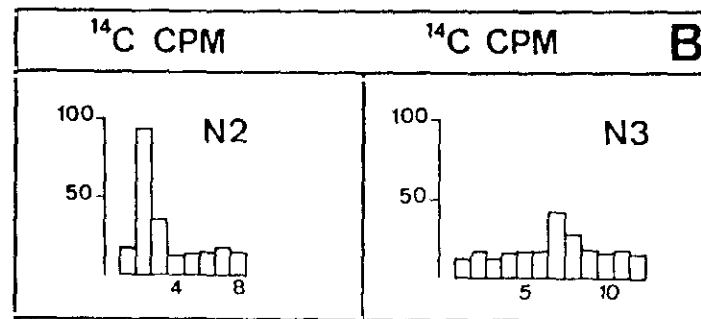
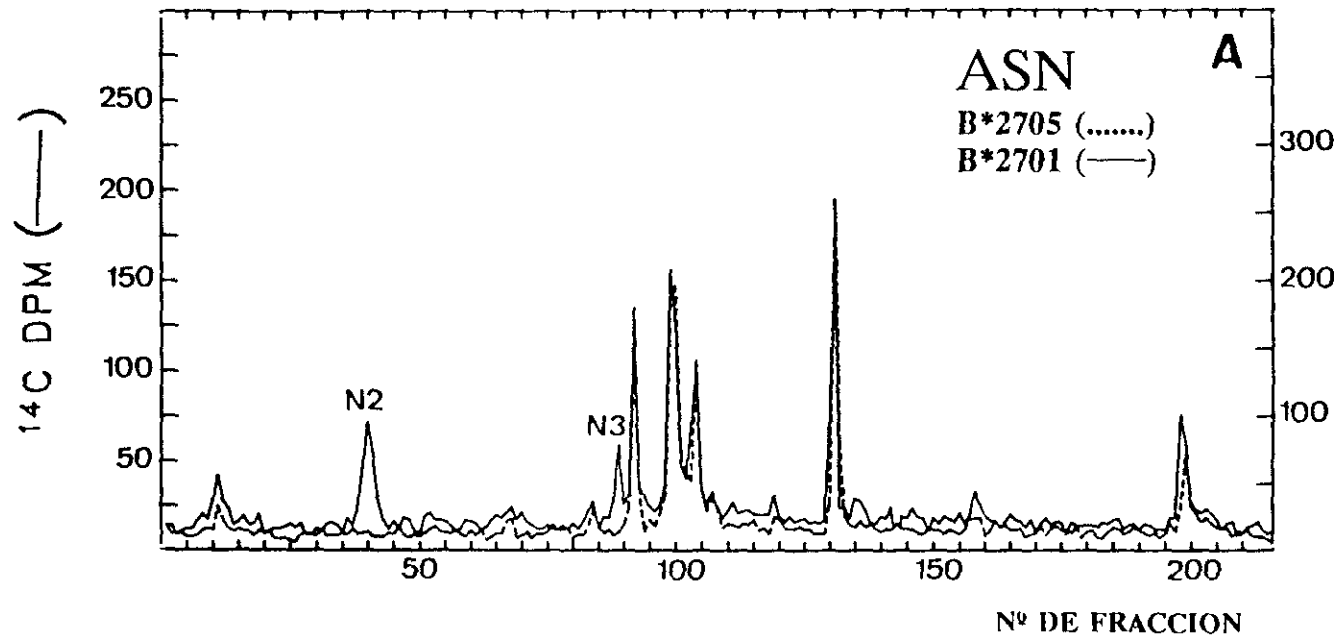


Figura 21. A) Mapa trípico comparativo entre los subtipos B\*2701 ( $^{14}\text{C}$ ) y B\*2705 ( $^{14}\text{C}$ ), correspondiente al marcaje con Asn. El digerido trípico de cada una de las moléculas se cromatógrafió independientemente, representándose los resultados conjuntamente. B) Secuencia radiquímica de los picos de diferencia.

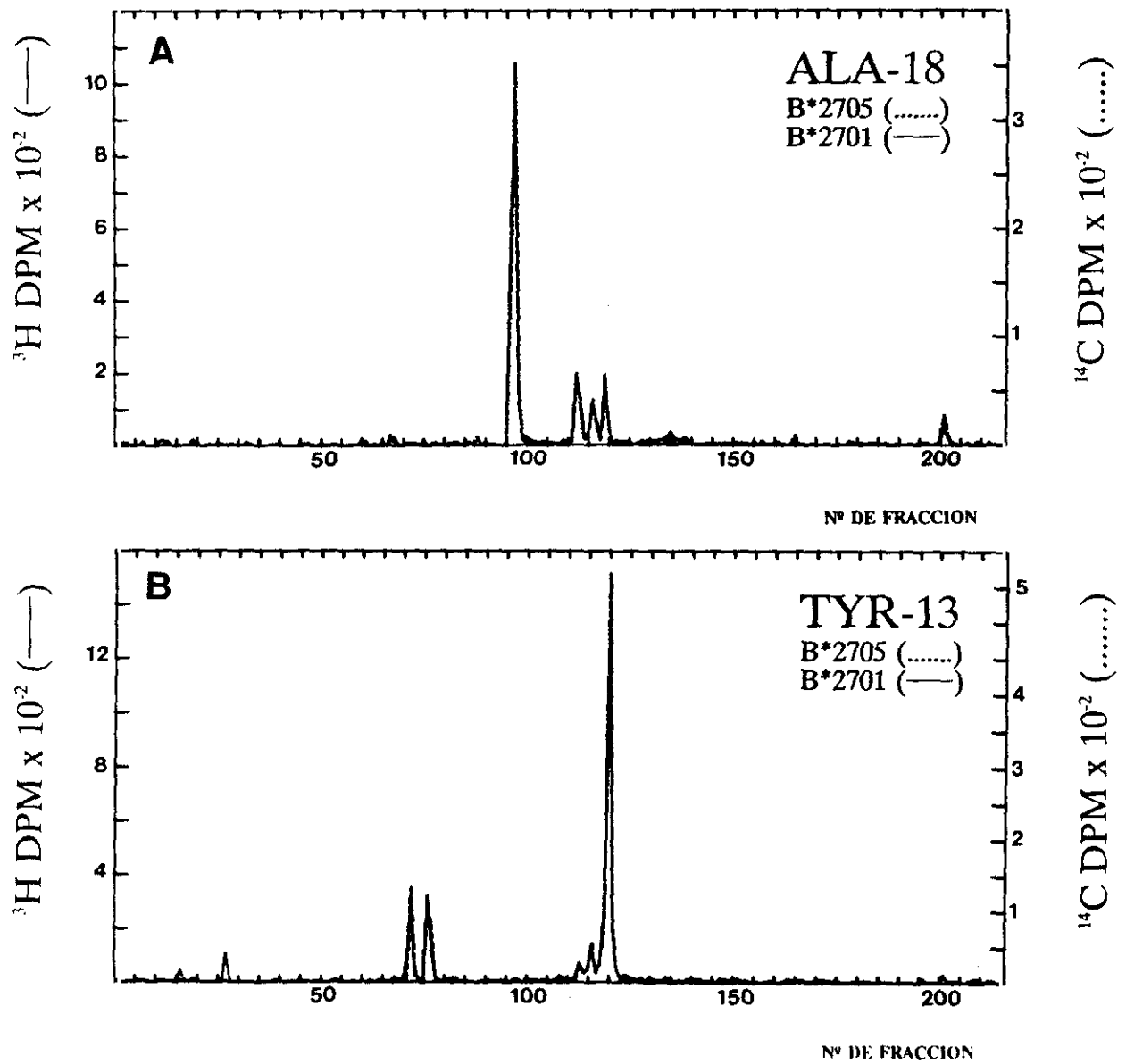


Figura 22. Digestión quimotráctica de los picos A18 (A) e Y13 (B) y separación de los péptidos resultantes por HPLC, utilizando las condiciones cromatográficas habituales.



mapa correspondiente al marcaje con Lys fue idéntico.

#### 4.2.2. Análisis estructural del subtipo B\*2703

Para la caracterización estructural del subtipo B\*2703 se siguió la misma estrategia utilizada con B\*2701, partiendo de la línea celular CH (B\*2703+). Como en el caso anterior, B\*2705 se extrajo de la línea LG2. Los primeros mapas realizados: Leu, Tyr y Ala cubrieron el 91% de la porción extracelular de HLA-B27.

El mapa de Leu (Fig. 24) resultó idéntico, salvo por unas pequeñas diferencias en los picos L11, L13 y L23. Las fracciones en las que se detectó L11 coincidían con las habituales de elución del glicopéptido en HLA-B27. La purificación de L13 y L23 por un sistema cromatográfico que consistía en un gradiente de TFA y acetonitrilo, no puso de manifiesto ningún pico de diferencia.

Con el marcaje de Tyr se detectaron tres picos de diferencia: Y5, Y7 e Y8 (Fig. 25A). Y5 estaba marcado con  $^3\text{H}$  y eluía en la posición del glicopéptido. Los picos Y7 e Y8, marcados con  $^{14}\text{C}$  y, por tanto, pertenecientes a B\*2705, mostraron radiactividad en el ciclo 11 (Fig. 25C). Y7 estaba contaminado con un pico idéntico entre ambas moléculas por lo que se sometió a una repurificación, previa a la secuenciación, en el sistema de TFA y acetonitrilo (Fig. 25B). Un examen de los péptidos trípticos de B27 reveló que el único con Tyr en posición 11 era el 49-62. El segundo de los picos de diferencia se habría generado por una digestión parcial en R62 que daría lugar al péptido 49-68. Este residuo de Tyr estaba localizado en la posición 59. El hecho de que no se detectara la contrapartida de estos picos en el marcaje de  $^3\text{H}$  sugería una pérdida de este residuo en el nuevo subtipo.

La His era un posible candidato para sustituir a la Tyr 59 en el subtipo B\*2703, debido a que en los antígenos HLA de Clase I, los cambios de Tyr a His son relativamente frecuentes y, además, la presencia de este residuo explicaría la movilidad de B\*2703 en electroenfoque. El mapa correspondiente presentó tres picos de diferencia: H3, H4 y H5 (Fig. 26A). Los picos H4 y H5 fueron repurificados mediante un gradiente de TFA y acetonitrilo, obteniéndose en ambos casos varios picos, marcados por igual con los dos isótopos, y un pico de  $^3\text{H}$  (Fig. 26B y C). Las secuencias de los picos de diferencia, denominados H4.3 y H5.2, respectivamente, mostraron radioactividad en posición 11 (Fig. 26B y C). Estos datos de secuencia, junto con la ausencia de contrapartidas de estos péptidos en el marcaje de  $^{14}\text{C}$  y con su situación en el

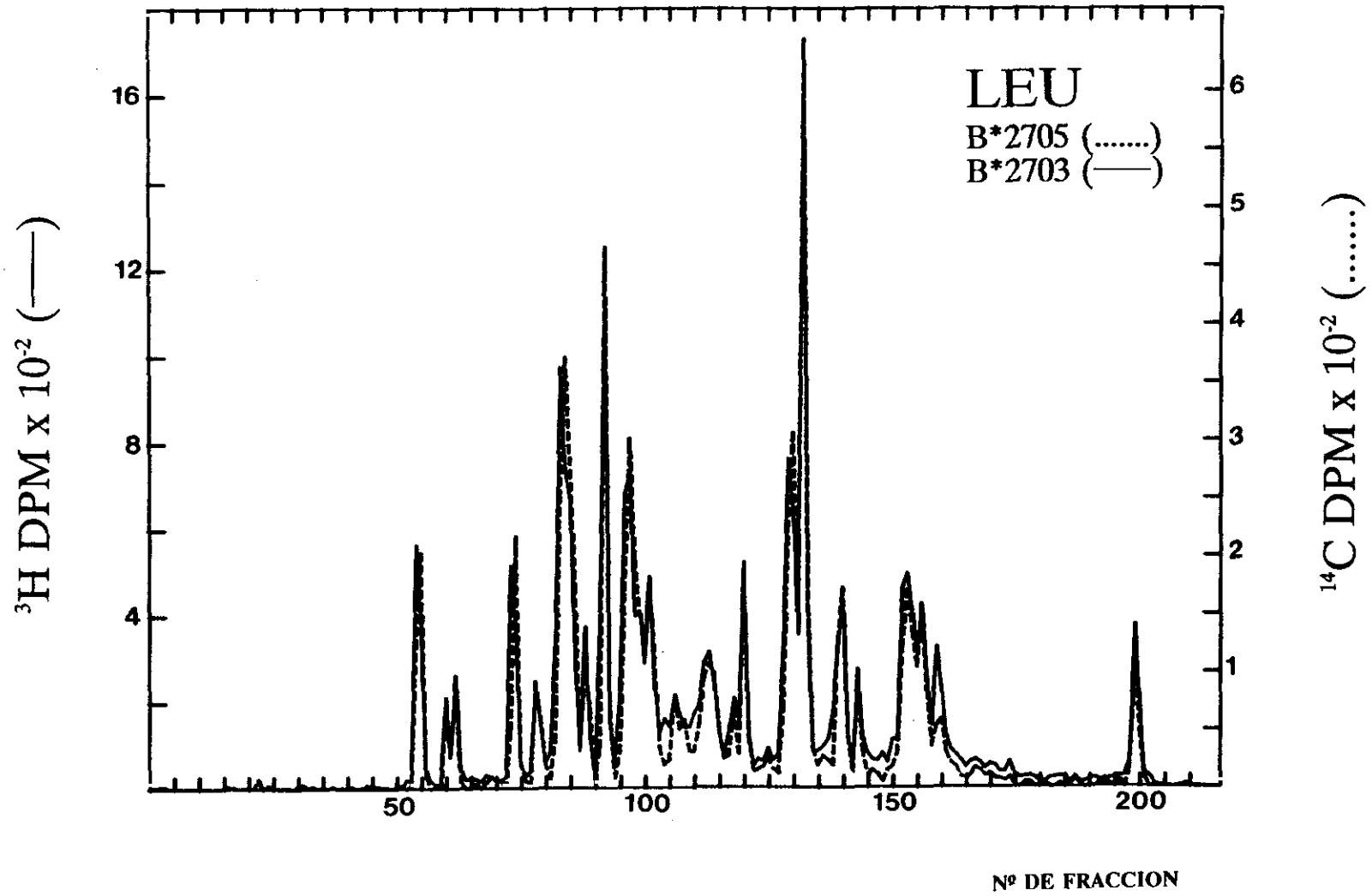


Figura 24. Mapa tríptico comparativo entre los subtipos B\*2703 ( $^3\text{H}$ ) y B\*2705 ( $^{14}\text{C}$ ), correspondiente al marcaje con Leu.

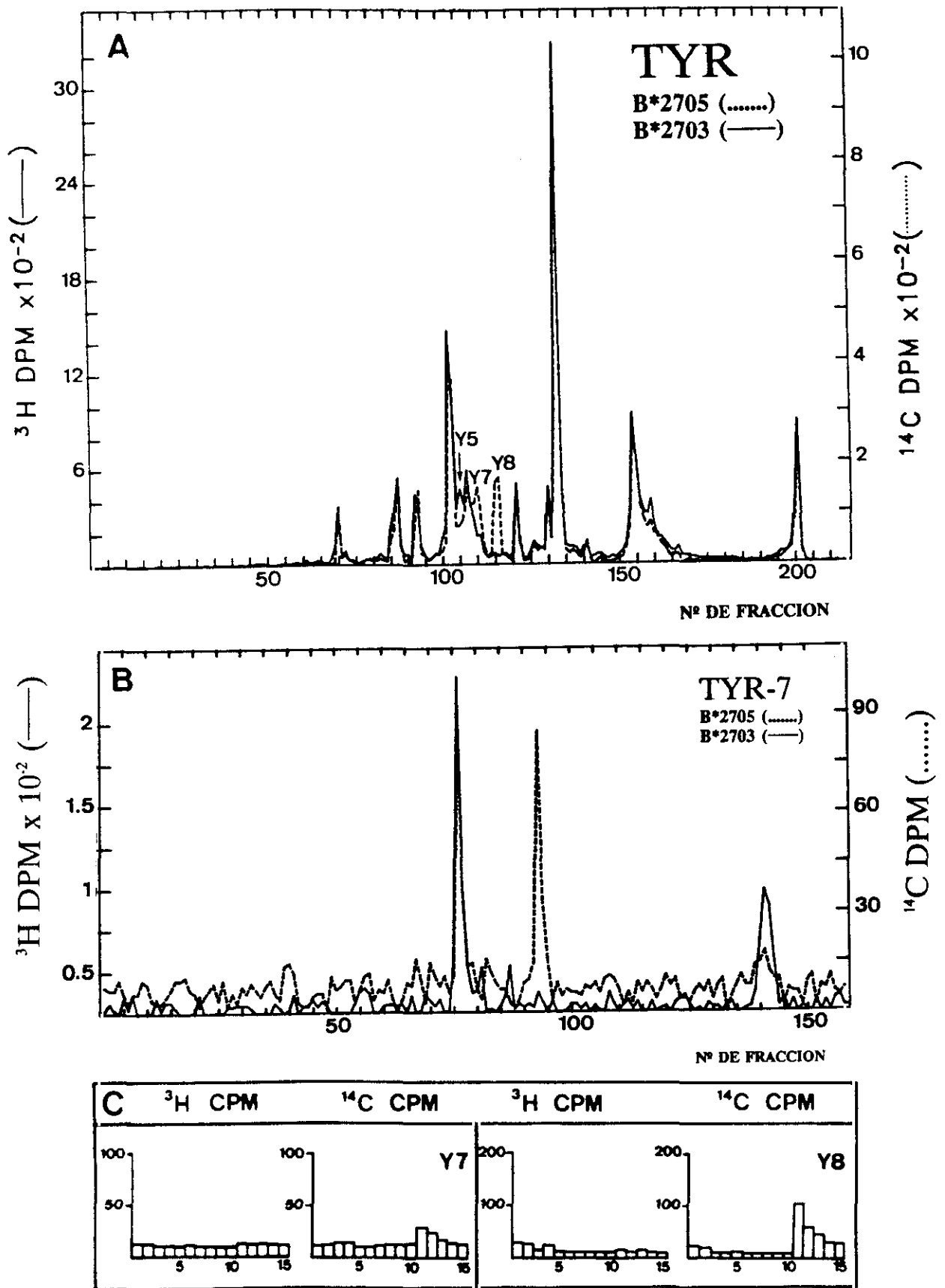


Figura 25. Mapa tríptico comparativo entre los subtipos B\*2703 ( $^3\text{H}$ ) y B\*2705 ( $^{14}\text{C}$ ), correspondiente al marcaje con Tyr. B) Purificación del pico Y7 mediante cromatografía de HPLC, utilizando un gradiente de TFA y acetonitrilo. C) Secuencia radioquímica de los péptidos de diferencia.

cromatograma, semejante a la de Y7 e Y8, indicaron una sustitución de la Tyr que B\*2705 posee en posición 59, por una His en B\*2703. Por tanto, los picos de  $^3\text{H}$  en el mapa de His eran la contrapartida de los de  $^{14}\text{C}$  en el mapa de Tyr. La posición de H3, tercero de los picos de diferencia detectados, coincidía con la de L11 e Y5, confirmando la presencia de radiactividad en el ciclo 10 en su secuencia que estos picos correspondían al glicopéptido (Fig. 26D). Probablemente, la ausencia de  $^{14}\text{C}$  en esta secuencia sea debida al menor nivel de marcaje obtenido con este isótopo.

Posteriormente, con el fin de descartar cambios adicionales en el péptido se realizaron los marcajes metabólicos necesarios para determinar su secuencia completa. El mapa de Ile generó cuatro picos de diferencia: I2, I3, I4 e I5 (Fig. 27A). Los picos I2 e I3, marcados con  $^3\text{H}$  y  $^{14}\text{C}$ , respectivamente, correspondían al péptido 49-62. Su secuenciación mostró radiactividad en el ciclo 4 en ambos casos, lo que excluía un cambio en este aminoácido (Fig. 27B). La secuencia del pico I1 presentó radiactividad de ambos isótopos en el ciclo 4, identificándose como el péptido 63-68 (ETQICK). La confirmación de que los picos I4 e I5 contenían el producto intermedio 49-68 de ambos subtipos, se realizó por digestión de ambos picos con tripsina en condiciones energéticas (ver 3.7.3), resultando dos péptidos de diferencia cuyas posiciones coincidían con I2 e I3, y un pico idéntico que eluía en la posición de I1 (Fig. 28A). La digestión de los picos I2 e I3 (obtenidos a partir de un segundo mapa) con la proteasa V8 de *Staphylococcus aureus* (Fig. 28B), en condiciones de ruptura por residuos de Glu (272), dio lugar a un pico idéntico mayoritario cuya secuencia exhibía radiactividad en el ciclo 4 y que posteriormente se identificó como el péptido 49-53 (APWIE). Este resultado excluía la posibilidad de un cambio en ese segmento.

El marcaje con Lys aportó una información semejante al de Ile, detectándose en él dos picos de diferencia, K16 y K17, cuya posición de elución coincidía con la del producto de degradación parcial 49-68 (Fig. 29A). El péptido 49-62, originado por digestión total, no tenía Lys y por tanto no se observó en el mapa. No se llevó a cabo la secuenciación de estos péptidos, debido a que la presencia en ellos de Lys en el extremo C-terminal dificultaba el proceso. Los picos K16 y K17 se sometieron a una segunda digestión con tripsina (ver 3.7.3), generándose un pico idéntico que correspondía al 63-68, por su situación en el cromatograma (Fig. 29B).

El mapa de Ala era aparentemente idéntico, salvo por un pequeño pico de  $^3\text{H}$  denominado A11 (Fig. 30A). Su secuencia reveló Ala en posición 5 en el canal de  $^3\text{H}$  y en 1 y 7 en el canal

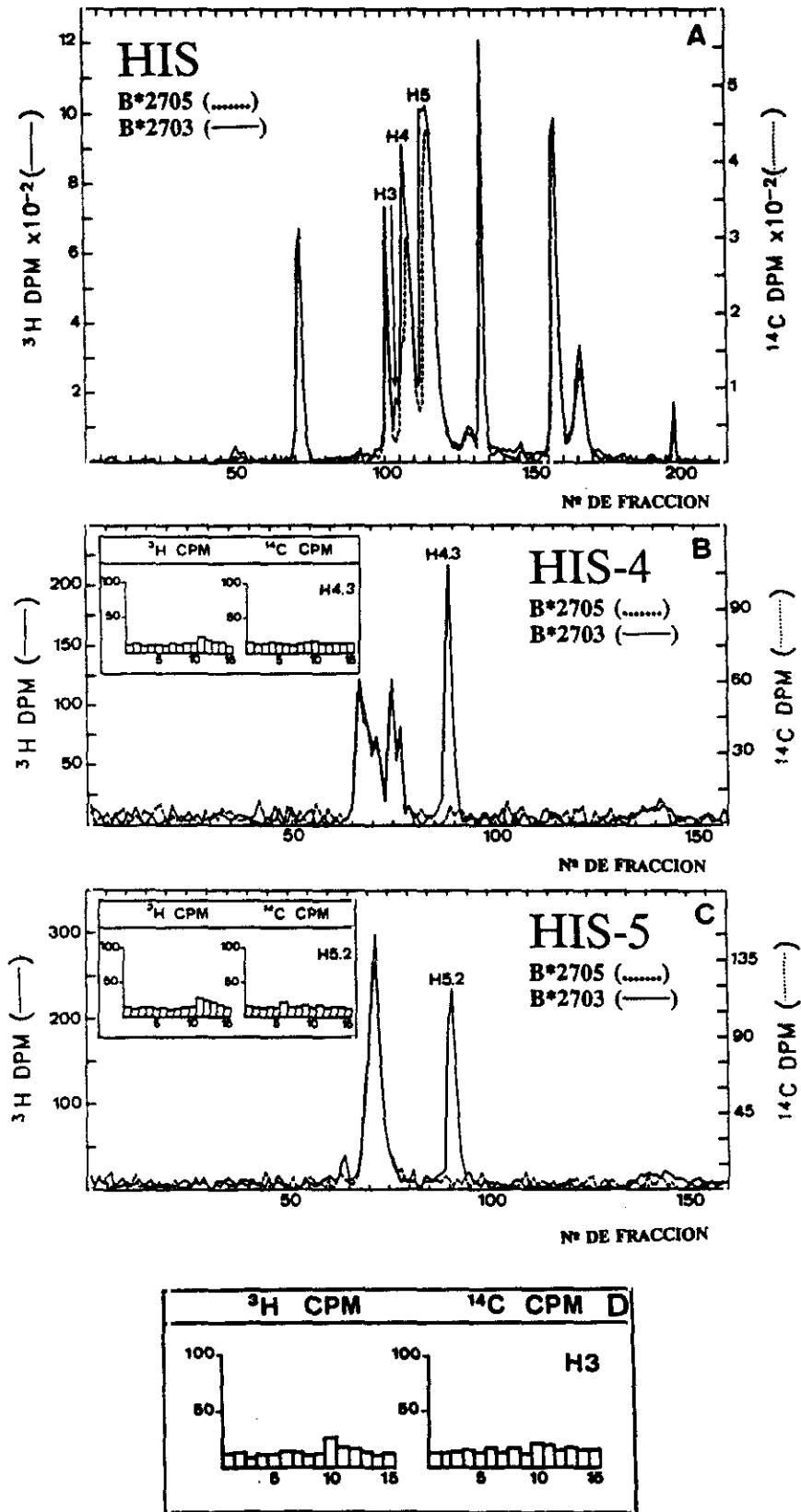


Figura 26. A) Mapa tríptico comparativo entre los subtipos B\*2703 ( $^3\text{H}$ ) y B\*2705 ( $^{14}\text{C}$ ), correspondiente al marcaje con His. B) Purificación del pico H4 mediante cromatografía de HPLC, utilizando un gradiente de TFA y acetonitrilo. El pico de diferencia resultante, H4.3, se sometió a secuencia radiquímica. C) El pico H5 se fraccionó siguiendo el mismo sistema cromatográfico, secuenciándose posteriormente el péptido de diferencia H5.2. D) Secuencia radioquímica del pico H3

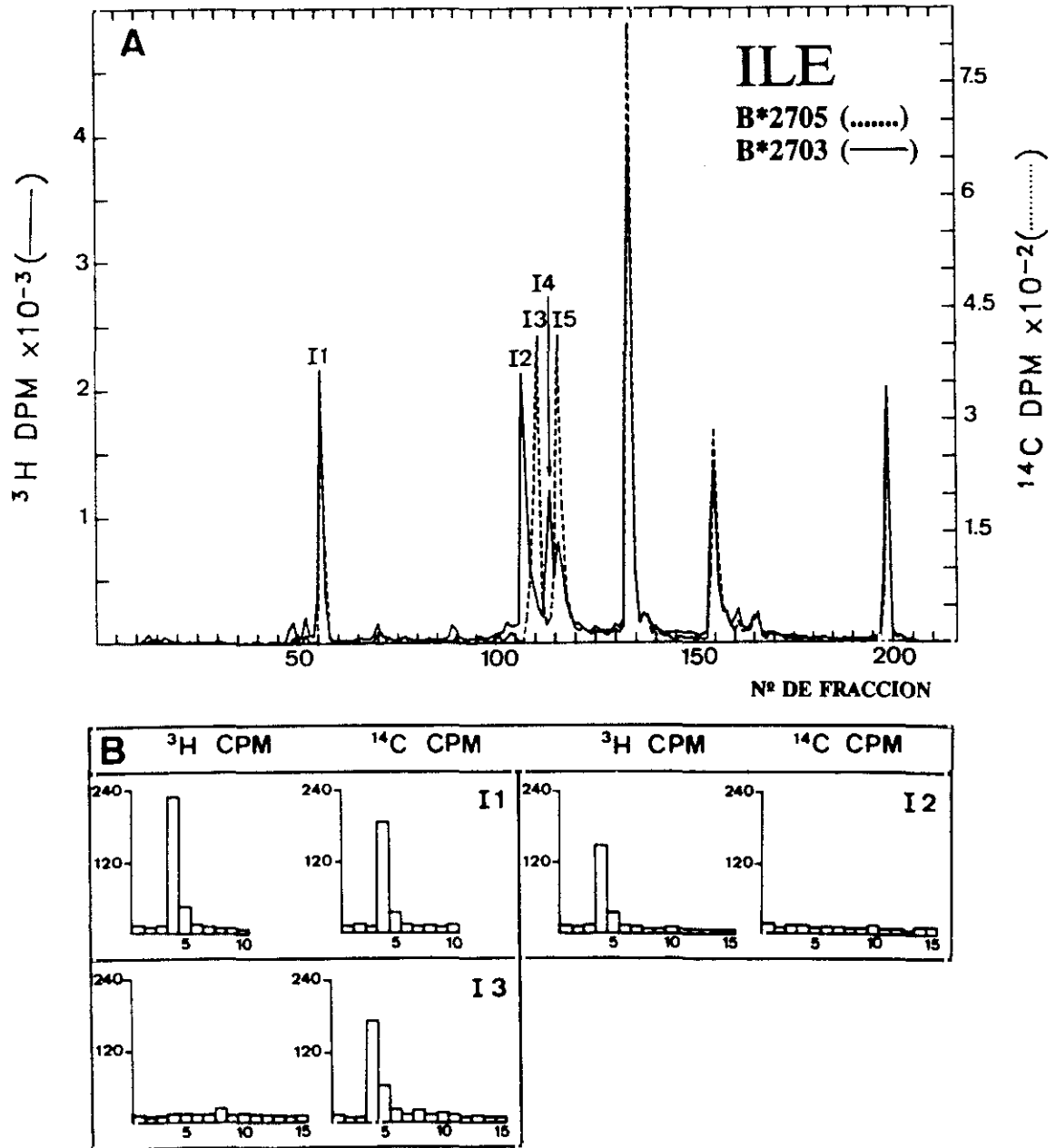
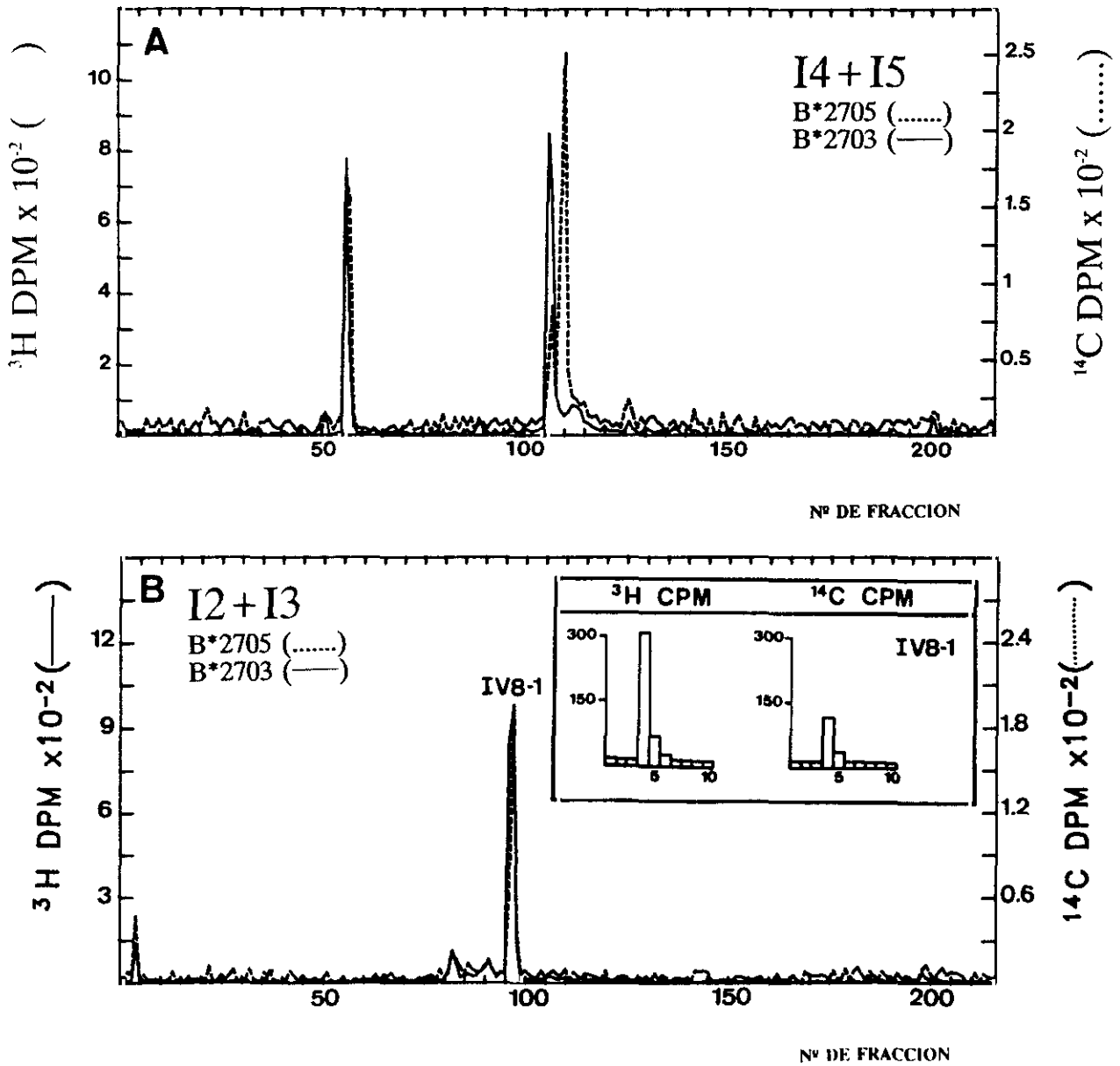
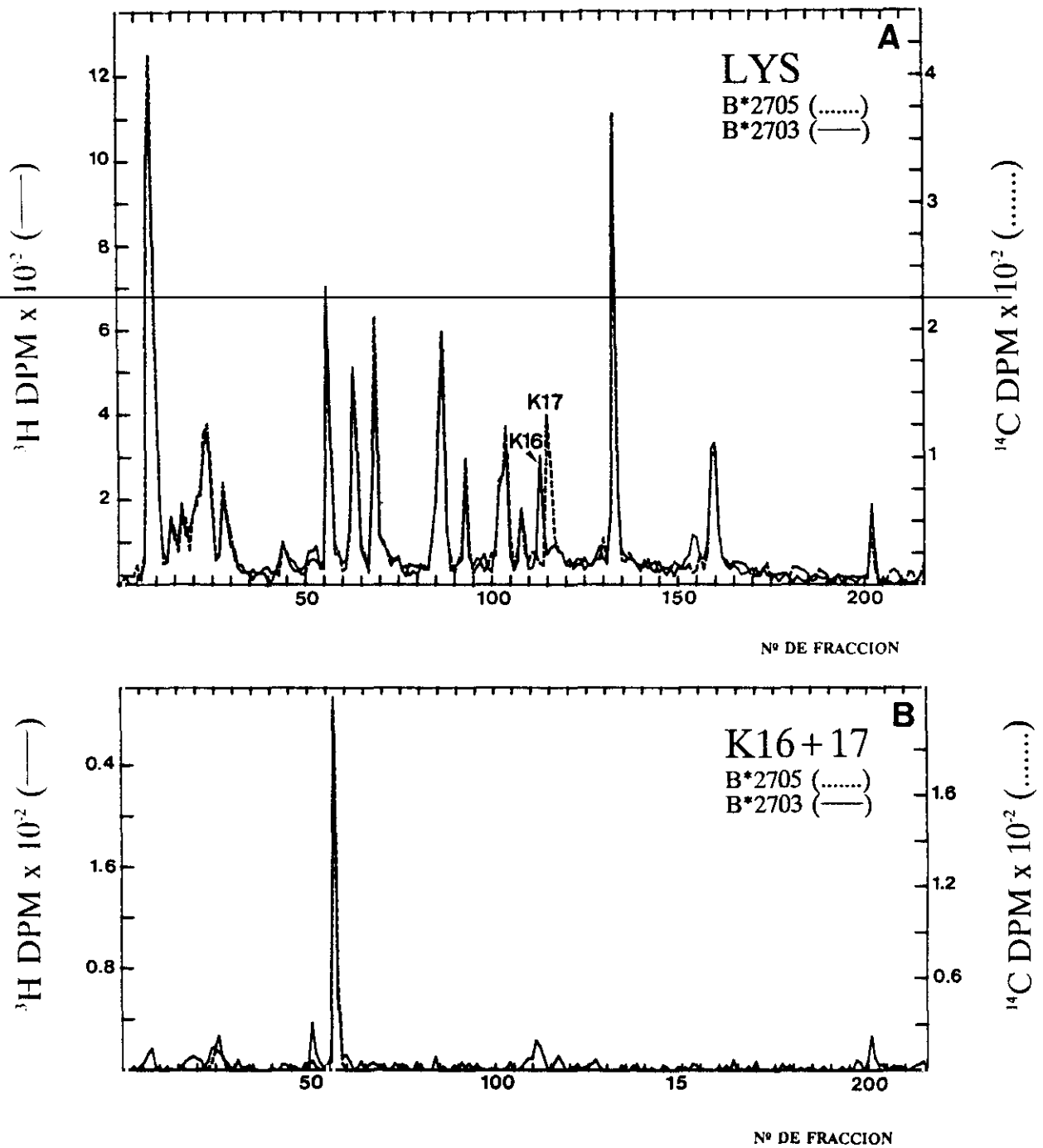


Figura 27. A) Mapa tríptico comparativo entre los subtipos B\*2703 ( $^3\text{H}$ ) y B\*2705 ( $^{14}\text{C}$ ), correspondiente al marcaje con Ile. B) Secuencia radioquímica del pico I1, idéntico entre ambas moléculas, y de los picos de diferencia I2 e I3.



**Figura 28.** A) Digestión exhaustiva con tripsina (dos adiciones de enzima a las relaciones de enzima/sustrato de 1/20 y 1/10) de los picos I4 e I5 y posterior fraccionamiento por HPLC, utilizando las condiciones cromatográficas habituales. B) Digestión de los picos I2 e I3, obtenidos a partir de un segundo mapa, con la proteasa V8 y separación de los picos por HPLC. El pico mayoritario IV8-1 se sometió a secuencia radioquímica.



**Figura 29.** A) Mapa tríptico comparativo entre los subtipos B\*2703 ( $^3\text{H}$ ) y B\*2705 ( $^{14}\text{C}$ ), correspondiente al marcaje con Lys. B) Los picos de diferencia K16 y K17 se sometieron a una segunda digestión con tripsina (dos adiciones de enzima a las relaciones enzima/sustrato de 1/5 y 1/10).

de  $^{14}\text{C}$ . Probablemente, el péptido 49-62, originado con bajo rendimiento, fuera el responsable de la presencia de  $^{14}\text{C}$  en el ciclo 1. La  $^{14}\text{C}$ -Ala hallada en el ciclo 7 podía deberse al glicopéptido que, como se ha advertido en otras ocasiones, puede estar englobado en distintos picos en esa zona del cromatograma. No se observaron en el mapa las contrapartidas de los péptidos anteriores en el marcaje de  $^3\text{H}$ . La considerable amplitud del pico A12 y su localización, coincidente con la Y8, H5 e I5, apuntaban la posibilidad de que los picos de diferencia estuvieran contenidos en su interior. La repurificación de A12 descubrió dos picos de diferencia: A12.2 y A12.3, en los marcajes de  $^3\text{H}$  y  $^{14}\text{C}$ , respectivamente (Fig. 30B). La secuencia de A12.2 mostró radioactividad en el ciclo 1, sugiriendo que se trataba del péptido 49-68 (Fig. 30C). Sin embargo, la presencia de  $^{14}\text{C}$  en los ciclos 1 y 5 en A12.3 indicaba que este pico incluía dos picos distintos, uno de los cuales sería contrapartida de A12.2, mientras que el otro lo sería de A11. Dado que no existe ningún péptido tríptico de B27 con Ala en posición 5, estos péptidos derivaban, probablemente, de una digestión tríptica incompleta en el residuo R48 que ocasionaría la formación del péptido EEPRAPWIE.... El hecho de que el péptido 49-62 se haya generado con muy baja eficiencia en el mapa de Ala, apoya esta posibilidad de una rotura tríptica incompleta.

La presencia de Gln y de Glu, se determinó mediante dos mapas, comparando en uno de ellos las moléculas normal y variante y en el otro B\*2705 consigo mismo, como control para la localización de los picos de interconversión metabólica (Fig. 31A y B). Se detectaron cuatro picos de diferencia: Q13, Q14, Q15 y Q16 que, como en otros mapas, correspondían a los péptidos 49-62 y 49-68 de ambos subtipos. Para facilitar la secuenciación de los residuos de Glu, previsiblemente marcados con poca eficiencia, se acortó la longitud de los péptidos por digestión con la proteasa V8 (Fig. 32A). La digestión conjunta de Q13 y Q14 generó varios picos idénticos entre las dos moléculas y tres de diferencia: QV8.1, QV8.4 y QV8.5. La secuencia de QV8.4 mostró  $^3\text{H}$  en el ciclo 1, mientras que, QV8.1 y QV8.5 presentaron  $^{14}\text{C}$  en el mismo ciclo (Fig. 32B). Posiblemente QV8.4 y QV8.5 fueran péptidos equivalentes de los dos subtipos, cuyo comienzo sería Q54 (probablemente, QEGPEYWDR). QV8.1, correspondiente al marcaje de  $^{14}\text{C}$ , empezaría en la misma posición pero tendría menor tamaño (QEGPE). Sin embargo, este pico no tenía contrapartida de  $^3\text{H}$ , lo que sugería una interferencia del cambio ocurrido en B\*2703 en la acción de la enzima. A pesar de que los residuos de Gln se marcaron eficientemente, los de Glu, marcados por conversión metabólica, eran indetectables por lo que

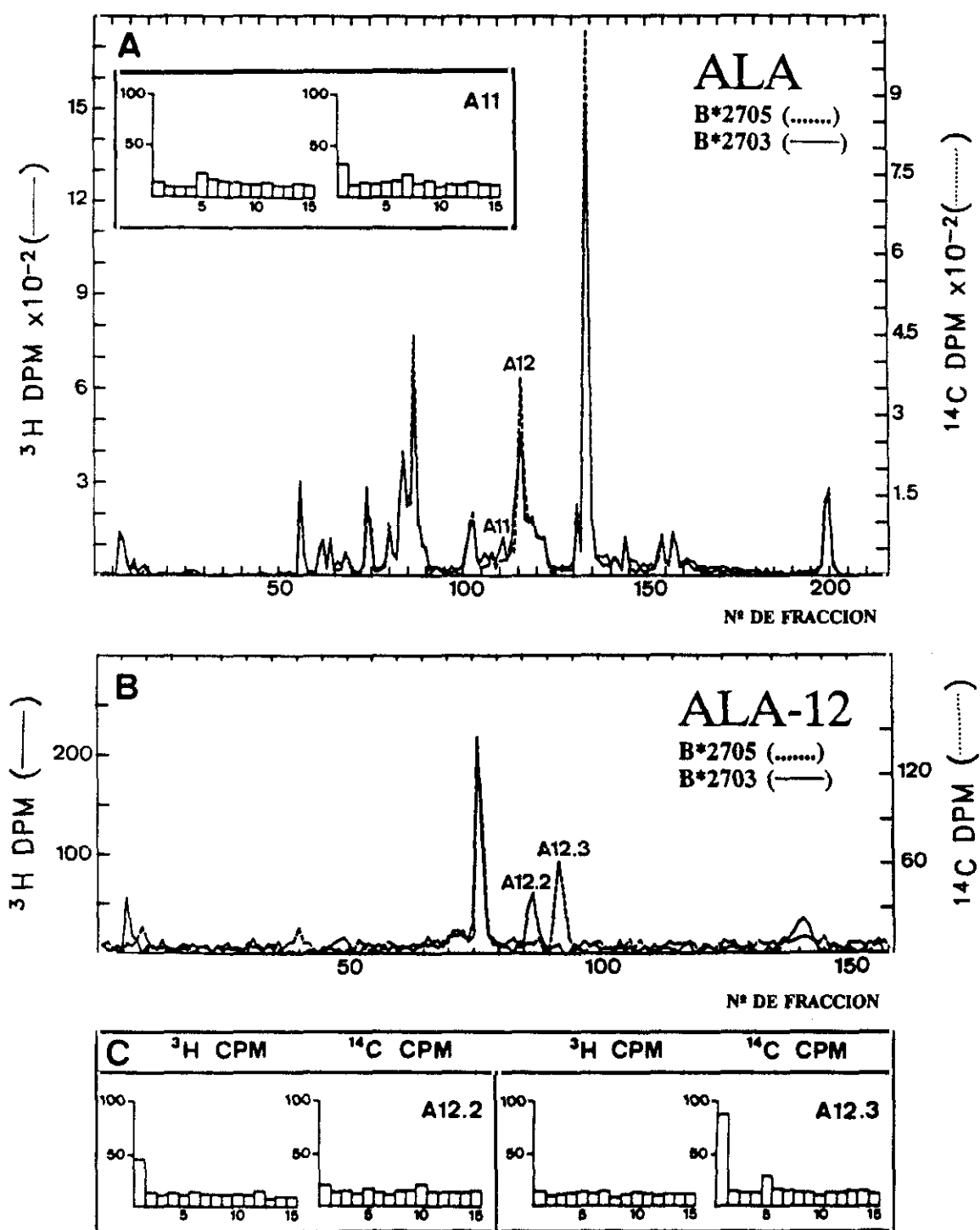


Figura 30. A) Mapa trípico comparativo entre los subtipos B\*2703 ( $^3\text{H}$ ) y B\*2705 ( $^{14}\text{C}$ ), correspondiente al marcaje con Ala. El pico A11 se sometió a secuencia radioquímica. B) Purificación del pico A12 por HPLC, utilizando un gradiente de TFA y acetonitrilo. C) Secuencia radioquímica de los picos de diferencia obtenidos en este fraccionamiento, A12.2 y A12.3, marcados con  $^3\text{H}$  y  $^{14}\text{C}$ , respectivamente.

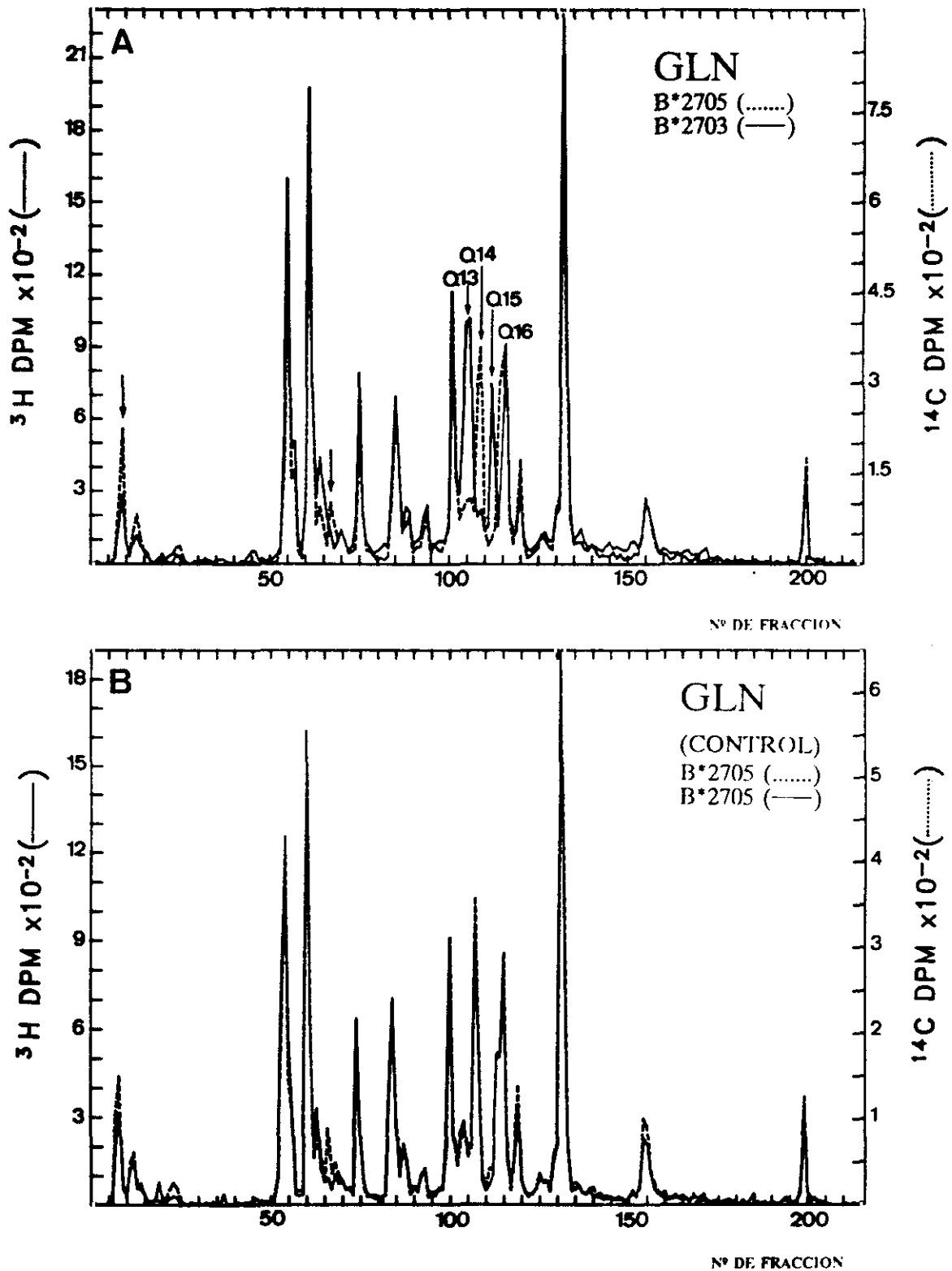


Figura 31. A) Mapa tríptico comparativo entre los subtipos B\*2703 ( $^3\text{H}$ ) y B\*2705 ( $^{14}\text{C}$ ), correspondiente al marcaje con Gln. B) Mapa control para la detección de los picos de diferencia debidos a interconversión metabólica, en el que se comparan la molécula de B\*2705 marcada con  $^3\text{H}$ -Gln y la misma molécula marcada con  $^{14}\text{C}$ -Gln.

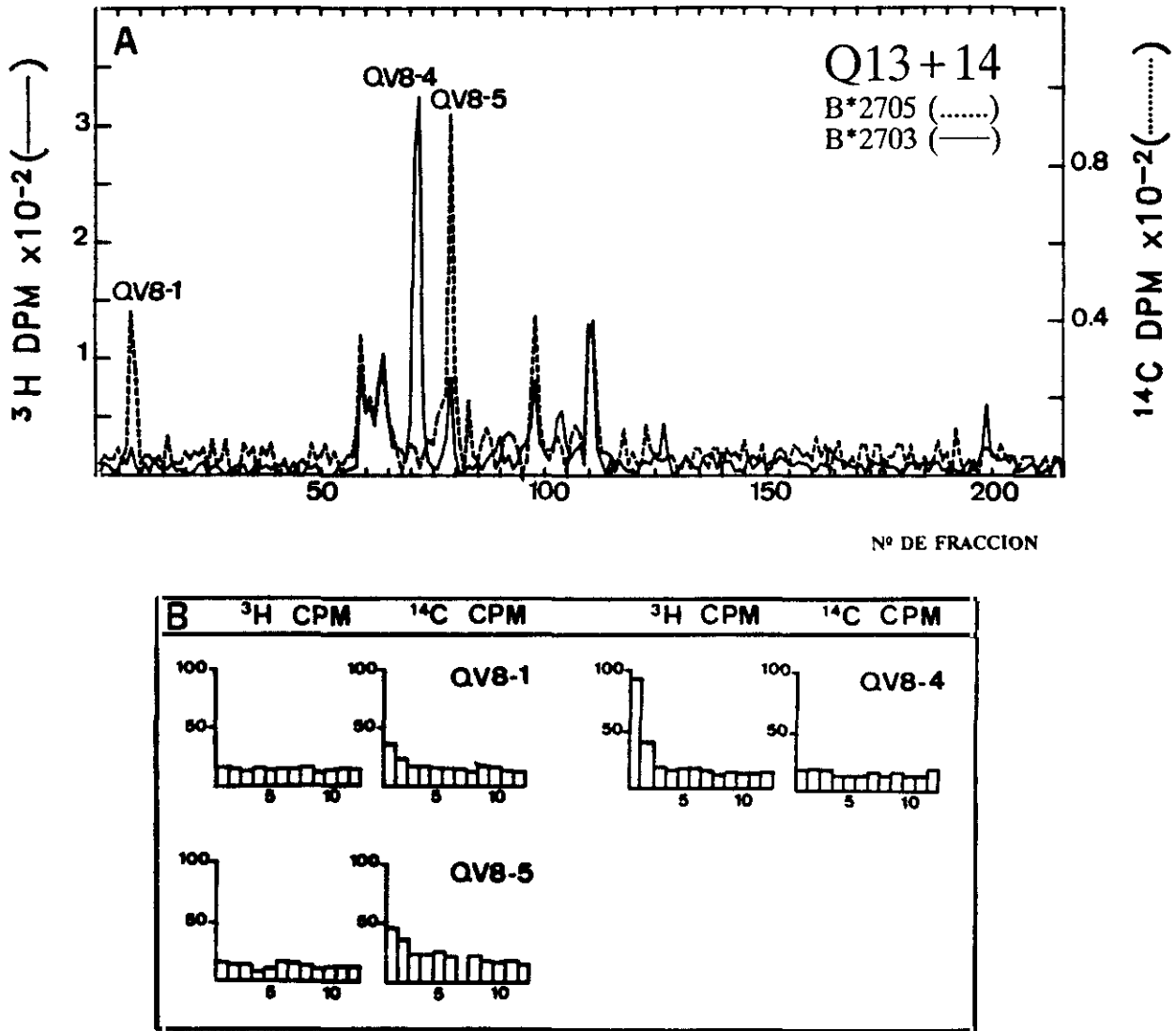


Figura 32. A) Fraccionamiento en HPLC de los péptidos Q13 + Q14 digeridos con la proteasa V8. B) Secuenciación radioquímica de los picos de diferencia QV8-1, QV8-4 y QV8-5.

se procedió a la realización del mapa en otras condiciones.

En el segundo mapa para la detección de estos residuos, se llevó a cabo un marcaje con  $^3\text{H}$ -Gln y  $^3\text{H}$ -Glu, conjuntamente, en ausencia de los aminoácidos fríos correspondientes (Fig. 33). Como en otras ocasiones, los mapas se representaron en la misma gráfica para facilitar su comparación. Se detectaron cuatro picos de diferencia: Q11, Q12, Q13 y Q14. La posición de Q11, semejante a la de Y5 y H3, indicaba que en este pico estaba incluido el glicopéptido (la resolución en esta zona del cromatograma fue mejor en este mapa que en el anterior en el que coelúan el glicopéptido y el péptido 49-62). Q12 y Q13, pertenecientes a B\*2703 y B\*2705, respectivamente, poseían la misma localización que el péptido 49-62 en otros cromatogramas. Los picos Q12 y Q13 tenían una secuencia idéntica, con radioactividad en los ciclos 2, 5, 6, 7 y 10 (Fig 33). Este resultado concordaba con la secuencia de B\*2705 que posee Gln en posición 54 y Glu en los residuos 53, 55 y 58. La mayor parte de la radioactividad de  $^3\text{H}$  se encontraba en el residuo de Gln, debido a que este aminoácido se incorpora en la célula con mayor eficiencia que el Glu (269). La presencia de marcaje en posición 2 se debería a la conversión metabólica de  $^3\text{H}$ -Glu a Pro (269). El hecho de que las secuencias de los dos subtipos fueran idénticas excluía un cambio en estos residuos. El pico Q14, que por su posición debía englobar los productos intermedios 49-68, no fue analizado puesto que ya se habían obtenido las secuencias del péptido de diferencia.

A continuación se realizó el marcaje con Pro, obteniéndose tres picos de diferencia: P7, P8 y P9 (Fig. 34A). P7 y P8 eran contrapartidas del péptido 49-62 en los marcajes de  $^3\text{H}$  y  $^{14}\text{C}$ , respectivamente. La secuencia de ambos resultó idéntica, con radioactividad en los ciclos 2 y 9. Esto demostraba que los residuos de Pro se habían mantenido en B\*2703 en las mismas posiciones que en B\*2705. P9, que por su posición de elución contenía los productos intermedios de ambos subtipos, no fue analizado.

Los mapas de Trp de las dos moléculas se representaron conjuntamente, tras marcar ambas con  $^3\text{H}$ -Trp (Fig. 34B). Como en otras ocasiones, se obtuvieron 3 picos de diferencia: W3, W4 y W5. La secuencia de W3 correspondiente a B\*2703, exhibió radioactividad en los ciclos 3 y 12, lo que concordaba con la secuencia de B\*2705. La secuencia del pico W4, contrapartida del pico anterior en el subtipo B\*2705, sólo se pudo determinar hasta el ciclo 10 y presentó radioactividad en el ciclo 3.

A continuación, se marcaron tanto el subtipo normal, como el variante con  $^3\text{H}$ -Asp (Fig.

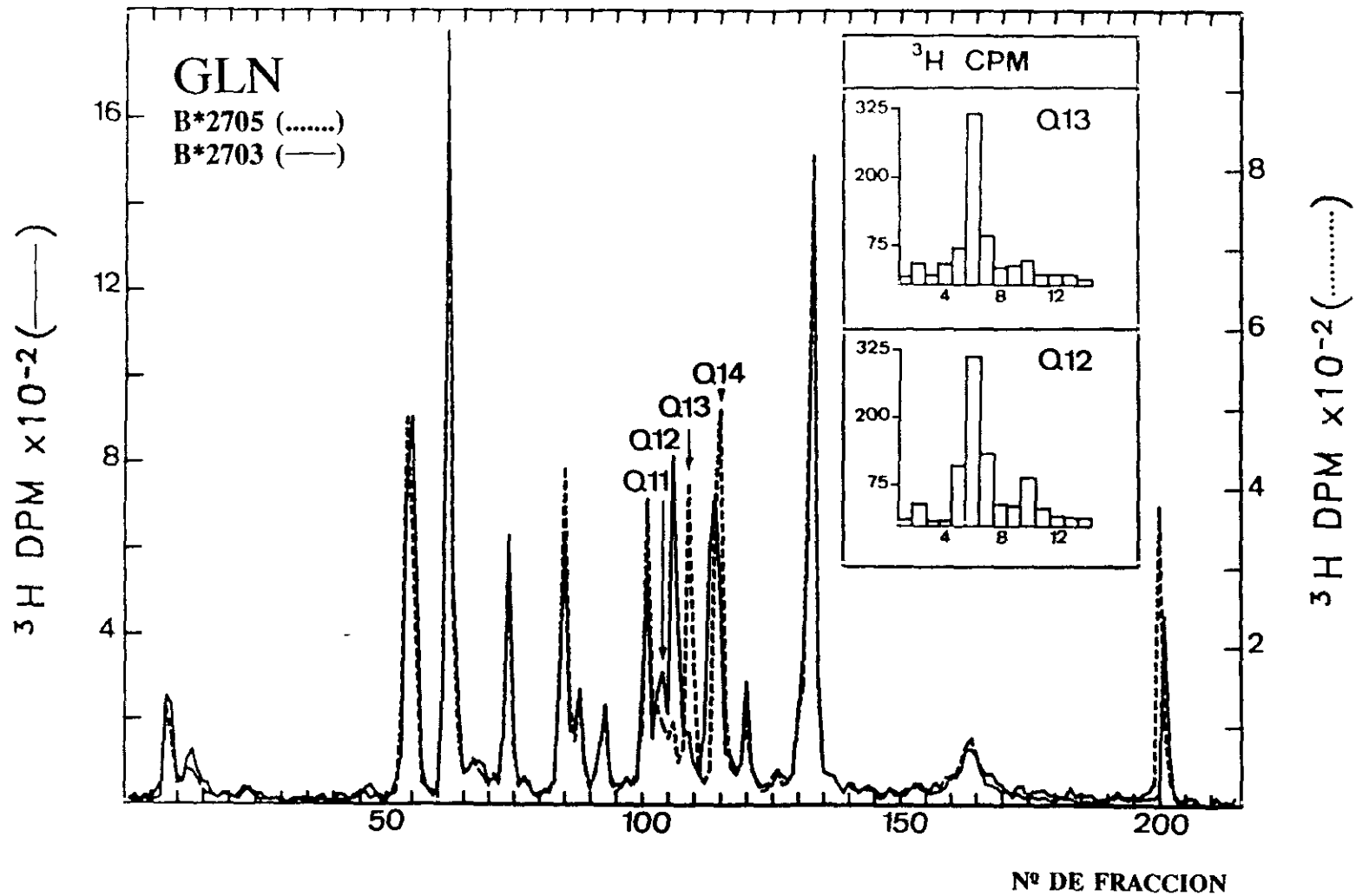


Figura 33. Mapa trípico comparativo entre los subtipos B\*2703 ( $^3\text{H}$ ) y B\*2705 ( $^3\text{H}$ ), correspondiente al marcaje con Gln y Glu. El digerido trípico de cada una de las moléculas se cromatografió independientemente, representándose los resultados conjuntamente. Los picos de diferencia Q11 y Q12 se sometieron a secuencia radioquímica.

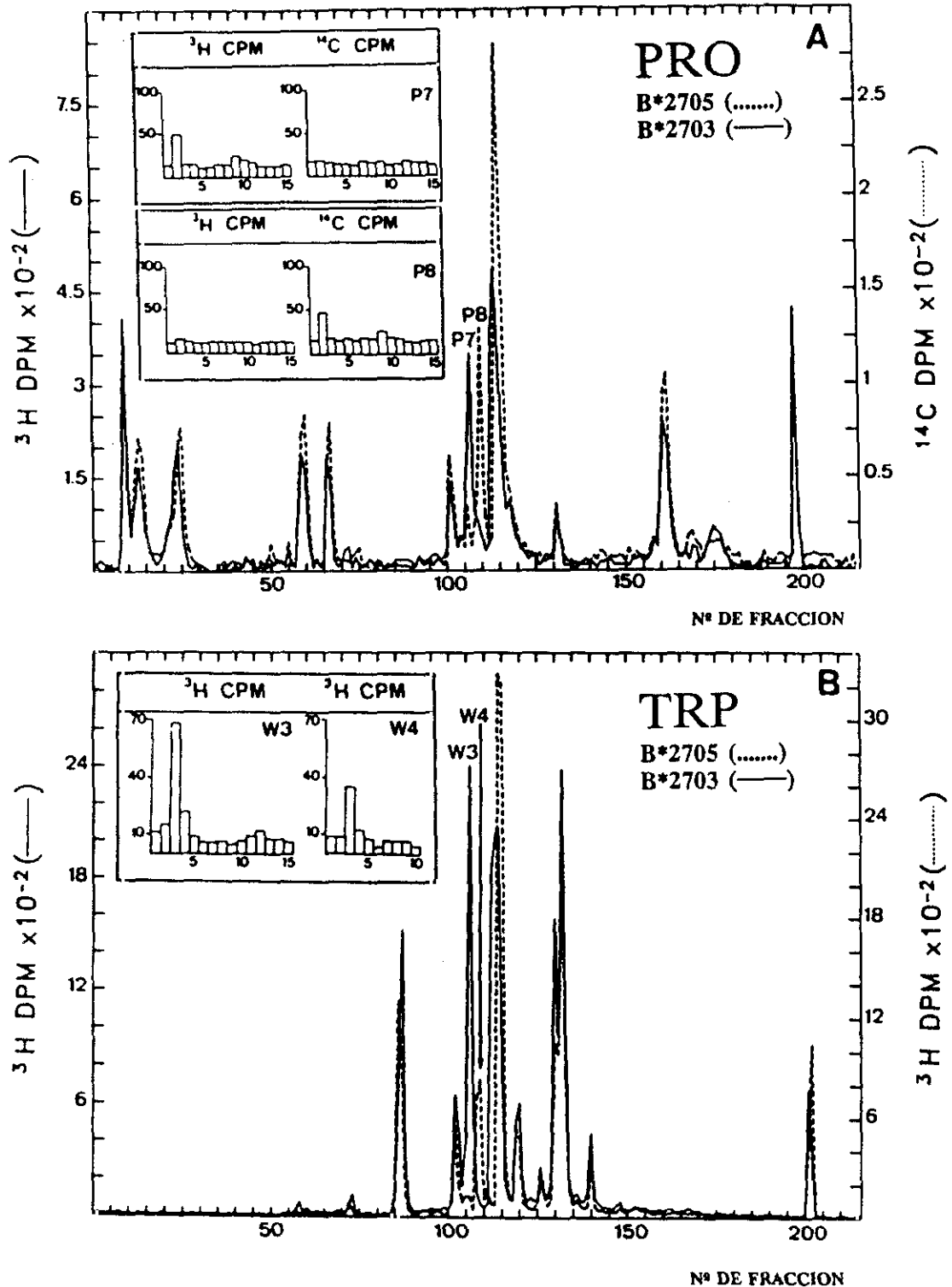


Figura 34. A) Mapa tríptico comparativo entre los subtipos B\*2703 ( $^3\text{H}$ ) y B\*2705 ( $^{14}\text{C}$ ), correspondiente al marcaje con Pro. Los picos de diferencia P7 y P8 se sometieron a secuencia radioquímica. B) Mapa peptídico comparativo entre las moléculas de B\*2703 y B\*2705, ambas marcadas con  $^3\text{H}$ -Trp. El digerido tríptico de cada una de las moléculas se cromatografió independientemente, representándose los resultados conjuntamente. Se incluyen las secuencias de los picos W3 y W4.

35A). De nuevo, se obtuvieron 3 picos de diferencia: D7, D8 y D9. Los picos D7 y D8 se digirieron independientemente con la proteasa V8, observándose en la comparación conjunta de los dos mapas, dos picos de diferencia mayoritarios: DV8.1 y DV8.2 (Fig. 35B). DV8.2 mostró radiactividad en el ciclo 3, tratándose, probablemente, del péptido YWDR. DV8.1 presentó  $^3\text{H}$  en el ciclo 8, lo que sugería que era el péptido QEGPEYWDR. La susceptibilidad diferencial de los dos subtipos a la acción de la V8, que ya se había observado en el mapa de Gln, podría deberse al cambio ocurrido en B\*2703. La secuenciación del pico D9, correspondiente a B\*2703, reveló radiactividad en el ciclo 13 (Fig. 35A), lo que corroboraba el resultado obtenido con DV8.1 y confirmaba la presencia de Asp en posición 61 en dicho subtipo.

El residuo de Gly en posición 62 se marcó por conversión metabólica a partir de  $^{14}\text{C}$ -Ser. Se efectuaron dos mapas peptídicos, comparando en uno de ellos las moléculas normal y variante marcadas con  $^3\text{H}$ -Ser y  $^{14}\text{C}$ -Ser, respectivamente; y en el otro la molécula de B\*2703 marcada con ambos isótopos (Fig. 36A y B). De esta forma, los picos de conversión de  $^{14}\text{C}$ -Ser, presentes en el segundo mapa y que no coincidieran con los del primero, corresponderían a picos de diferencia entre ambas moléculas. Sin embargo, no se detectó ninguno de estos picos. Dado que la incorporación de radioactividad por interconversión metabólica ocurre con baja eficiencia, los picos de diferencia no serían de gran tamaño y podrían estar ocultos en el interior de alguno de los que aparece como idéntico. La posición habitual del péptido 49-62 coincidiría con la del pico S11 en el mapa que compara B\*2703 marcado con los dos isótopos. Este pico se digirió con la proteasa V8 para acortar la longitud del péptido y facilitar su secuenciación, generándose un único pico de diferencia en el marcaje de  $^{14}\text{C}$ : GV8 (Fig. 36C). Su posición de elución coincidía con la de QV8.4 y DV8.1 y su secuencia, con radioactividad en el ciclo 3 (Fig. 36D), indicaba que era el péptido QEGPEYWDR. Así, se confirmó la presencia de una Gly en posición 56. Los picos de diferencia en el marcaje de  $^3\text{H}$  detectados en este mapa, se deben probablemente a contaminación con el glicopéptido que eluye en esa zona del cromatograma.

Como en el caso del subtipo B\*2701, se realizó una digestión quimotriptica del pico Y12, correspondiente al péptido 122-145, debido a que su gran tamaño podría enmascarar la presencia de una sutitución en él (Fig. 37). No se encontró ninguna diferencia en los péptidos generados.

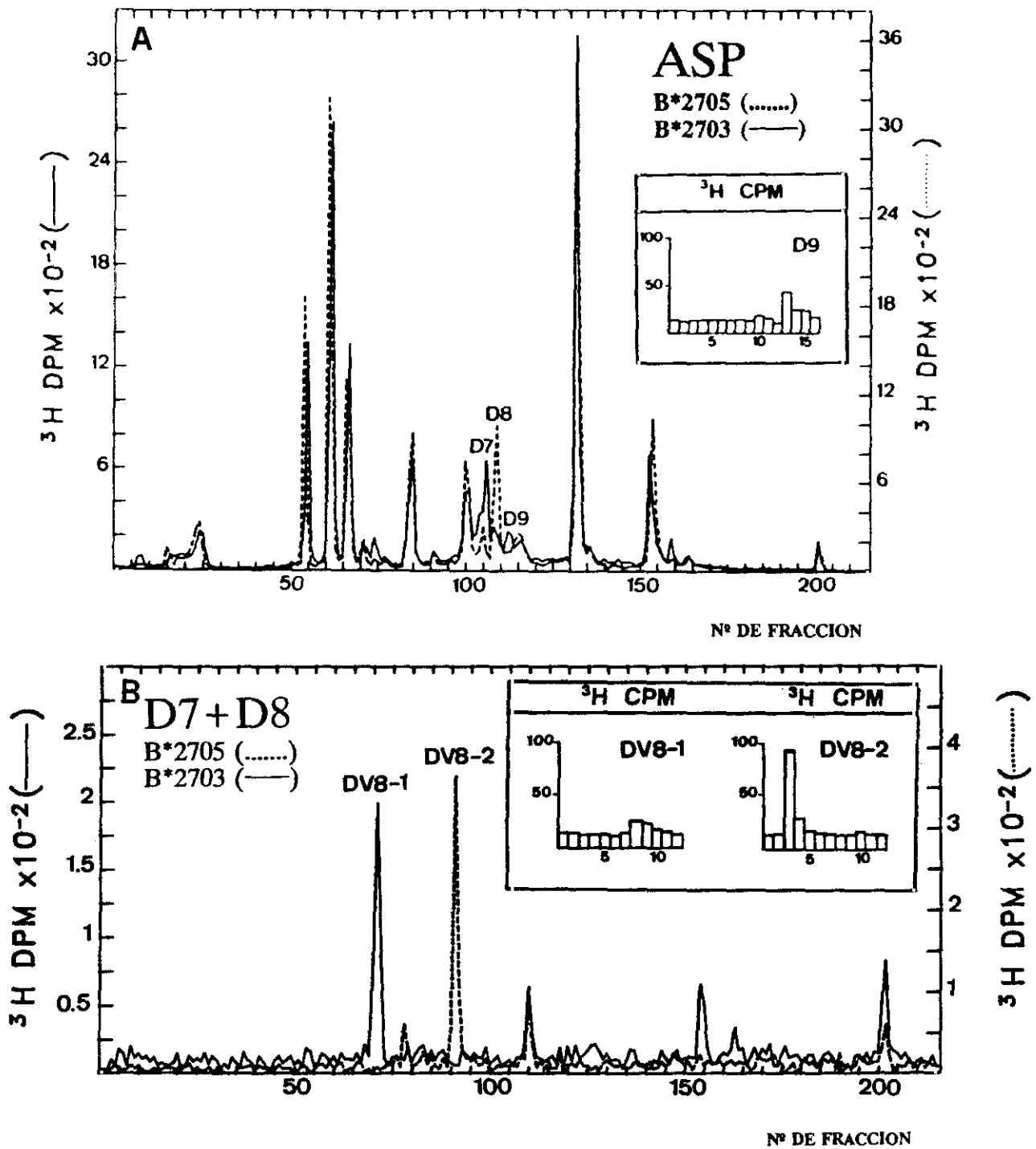
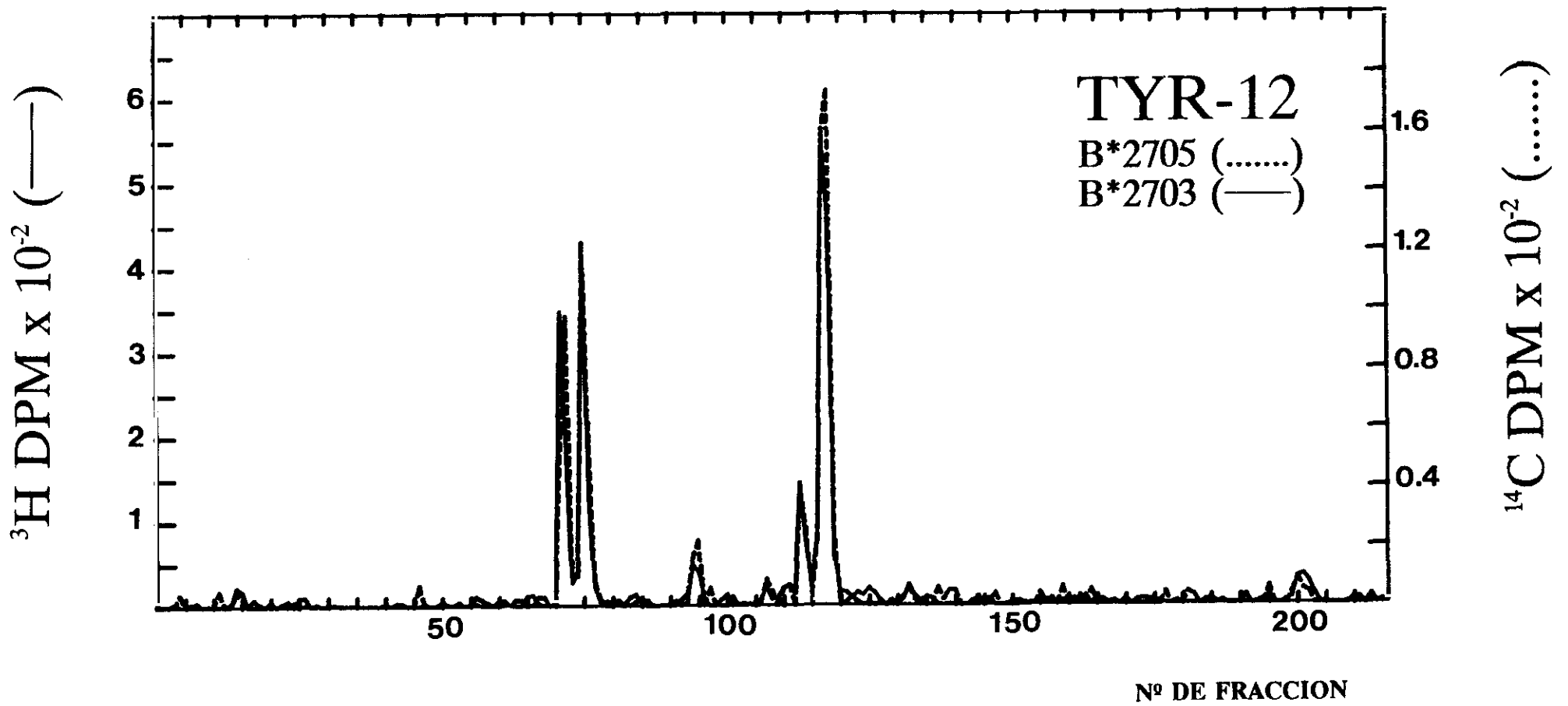


Figura 35. A) Mapa tríptico comparativo entre los subtipos B\*2703 ( $^3\text{H}$ ) y B\*2705 ( $^{14}\text{C}$ ), correspondiente al marcaje con Asp. El digerido tríptico de cada una de las moléculas se cromatografió independientemente, representándose los resultados conjuntamente. El pico D9 se sometió a secuencia radioquímica. B) Fraccionamiento en HPLC de los péptidos D7 y D8 digeridos con la proteasa V8. Se incluyen las secuencias de los picos DV8.1 y DV8.2.





**Figura 37.** Digestión quimotrófica del pico Y12 y separación de los péptidos resultantes por HPLC, utilizando las condiciones cromatográficas habituales.

Con esta serie de mapas se identificaron por secuenciación directa todos los residuos que componían el péptido 49-62, con excepción de la Arg C-terminal. La generación de un péptido por rotura trípica en esa posición indicaba que el único cambio posible sería por una Lys. Este cambio quedó descartado debido a que el mapa de Lys era idéntico entre ambas moléculas. En la Fig. 38, que resume las asignaciones hechas en este análisis, están representados los péptidos secuenciados y la situación del aminoácido marcado en cada uno de ellos.

#### **4.2.3. Los subtipos B27b y B27c son indistinguibles entre sí y de B\*2704**

En un estudio previo se detectaron 6 variantes de B27 por su movilidad diferencial en electroenfoque (109). Cinco de los patrones detectados eran claramente distinguibles, pero la diferencia entre las moléculas *b* y *c* (Tabla II) era sutil. Por este motivo, se procedió al análisis de estas moléculas en nuestro sistema de electroenfoque. Como se había predicho, el pI del subtipo *a* coincidía con el de B\*2705 y el de *e* con B\*2702. Sin embargo, no se reprodujo la diferencia entre *b* y *c*, siendo equivalente la movilidad de ambos a la de B\*2704. No obstante, se realizaron mapas peptídicos comparativos de las moléculas B27 procedentes de las líneas celulares JSL (*b*) y ET (*c*), tras el marcaje con Leu, Lys, Ala y Tyr. No se detectó ninguna diferencia en estos mapas (Fig.39), que cubrían el 94% de la porción extracelular de B27, lo que apoyaba la identidad de las dos moléculas.

#### **4.2.4. Discusión: Evolución del polimorfismo de HLA-B27**

El análisis estructural mediante mapas peptídicos comparativos permite una detección eficiente de las diferencias presentadas por un determinado subtipo. Formalmente, esta técnica no permite excluir la presencia de un cambio extremadamente conservativo que no altere el perfil de elución de los péptidos. Además puede ser difícil la detección de un péptido generado con un rendimiento muy bajo. No obstante, estas restricciones no invalidan la técnica como lo corrobora el hecho de que la secuenciación de DNA de algunos subtipos, como A3 (289) y B\*2702 (31), ha confirmado los resultados obtenidos previamente por mapas peptídicos (290,115). Además, la secuenciación posterior del DNA de B\*2703 (291), confirmó nuestros resultados obtenidos por mapas peptídicos.

B\*2701 es el más básico de los subtipos de B27, difiriendo de B\*2705 en dos unidades de carga, como consecuencia de la pérdida de dos residuos ácidos en las posiciones 74 y 77. B\*2703 es una unidad de carga más básico que B\*2705, igual que B\*2702; sin embargo la naturaleza



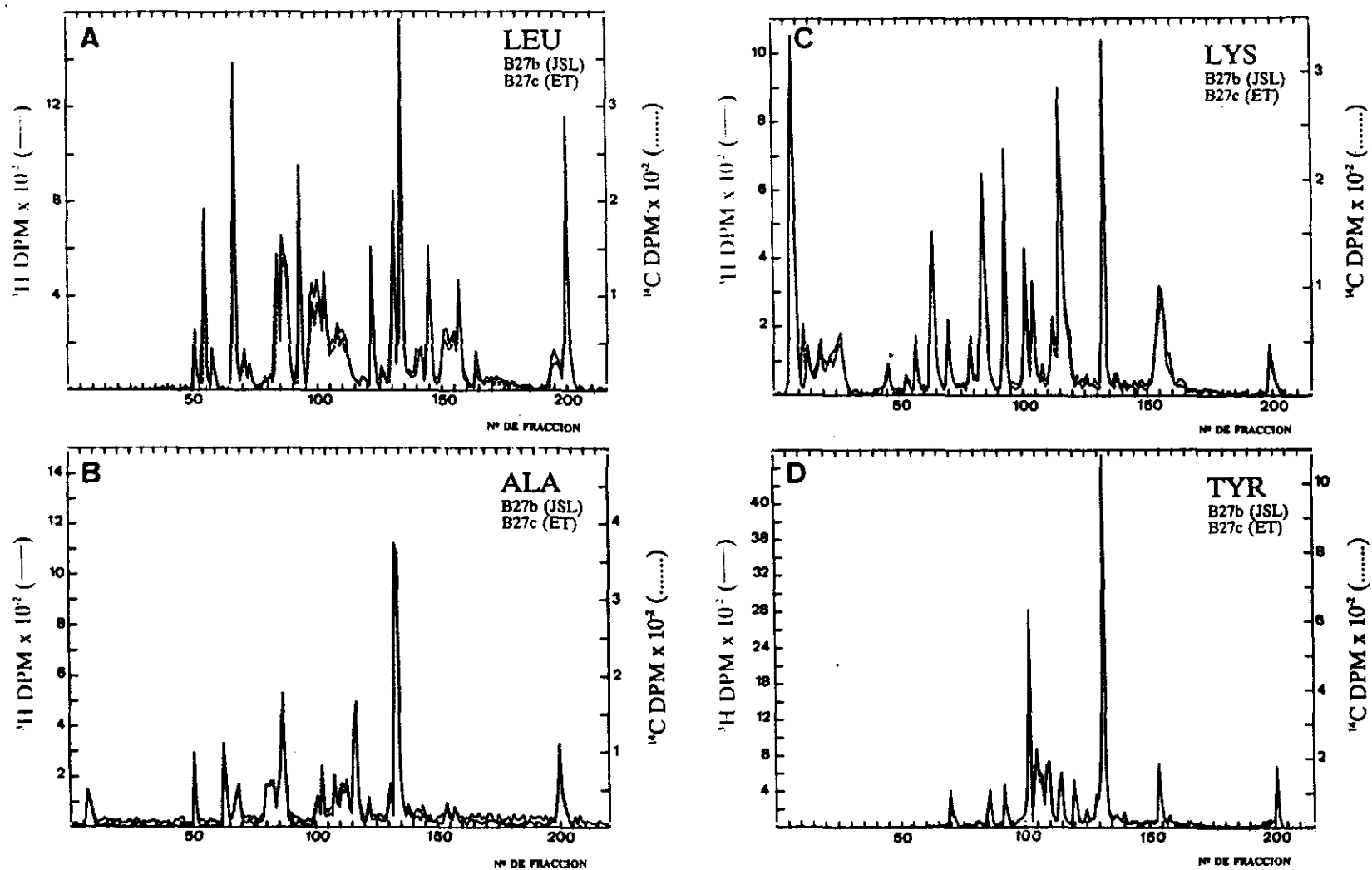


Figura 39. Mapas peptídicos comparativos entre las moléculas B27b ( $^3\text{H}$ ) y B27c ( $^{14}\text{C}$ ) tras el marcaje con Leu(A); Ala (B); Lys (C) y Tyr (D).

del cambio es distinta y ambos subtipos pueden distinguirse en electroenfoque. La diferencia de carga en B\*2703 se debe a su única sustitución, consistente en un cambio de la Tyr en posición 59 por una His. La diferencia de carga puede explicarse ya que el punto isoeléctrico de B\*2703, y en general de todos los subtipos de B27, es menor que el pK del grupo imidazol de la His. Así, cuando B27 alcanza su pI en electroenfoque, es de esperar que la cadena lateral de la His esté protonada, resultando en un cambio de carga.

Algunos clones de CTL alogénicos generados contra B\*2705 no reconocen, o lo hacen con baja eficiencia, a los subtipos B\*2701 y B\*2703 (121,122), lo que indica que se comportan como antígenos funcionalmente diferentes. Las posiciones en las que varían estos subtipos: 59, 74, 77 y 81 (Tabla VIII), están localizadas, en base al modelo tridimensional de los antígenos HLA-A2 y HLA-Aw68 (41-43), en una de las hélices  $\alpha$  que componen el sitio de unión del péptido antigénico y se hallan orientados, además, hacia el interior de dicho sitio (Fig. 40). Esta localización crítica explicaría el diferente comportamiento funcional de estos subtipos, a pesar de que difieren de B\*2705 en un número muy bajo de sustituciones. No existen datos del comportamiento de B\*2701 y B\*2703 en restricción viral. Los restantes subtipos de B27 caracterizados también poseen sustituciones en posiciones que apuntan hacia el interior del sitio. Las posiciones en las que difiere B\*2702, 77, 80 y 81, están localizadas en el dominio  $\alpha_1$ , en la región plegada en hélice  $\alpha$ ; las de B\*2704, 77 y 152, se encuentran en las regiones en hélices  $\alpha$  de los dominios  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ , respectivamente; por último las dos sustituciones adicionales que presenta B\*2706 respecto de B\*2704: 114 y 116, pertenecientes al dominio  $\alpha_2$ , se hallan en una de las láminas  $\beta$  que componen la base del sitio. Estas sustituciones podrían alterar la unión de péptidos antigénicos. El residuo 59 se halla localizado en uno de los extremos de este sitio y forma parte del grupo de residuos, orientados hacia su interior, que se hallan más conservados. Se ha propuesto que estos residuos podrían estar interaccionando con una característica constante de los antígenos procesados o del TCR (42,50). La sustitución del residuo 59 no parece alterar de forma absoluta el reconocimiento de B\*2703 por células T, ya que este subtipo es reconocido eficientemente por algunos CTL alogénicos anti-B27.

Aunque la mayoría de los antiseros utilizados como reactivos de tipaje en serología clásica no distinguen entre los subtipos de B27, algunos anticuerpos reaccionan de forma diferencial con ellos. Así, el anticuerpo M2 no reconoce a los subtipos B\*2702 y B\*2701 y reacciona parcialmente con los subtipos B\*2704 y B\*2706 (99,109). El residuo 77 debe estar formando

**Tabla VIII. Aminoácidos de diferencia entre los subtipos de HLA-B27\***

Posición	B*2705	B*2701	B*2702	B*2703	B*2704	B*2706
59	Tyr	—	—	His	—	—
74	Asp	Tyr	—	—	—	—
77	Asp	Asn	Asn	—	Ser	Ser
80	Thr	—	Ile	—	—	—
81	Leu	Ala	Ala	—	—	—
114	His	—	—	—	—	Asp
116	Asp	—	—	—	—	Tyr
152	Val	—	—	—	Glu	Glu

\* — indica identidad con B\*2705 en esa posición.

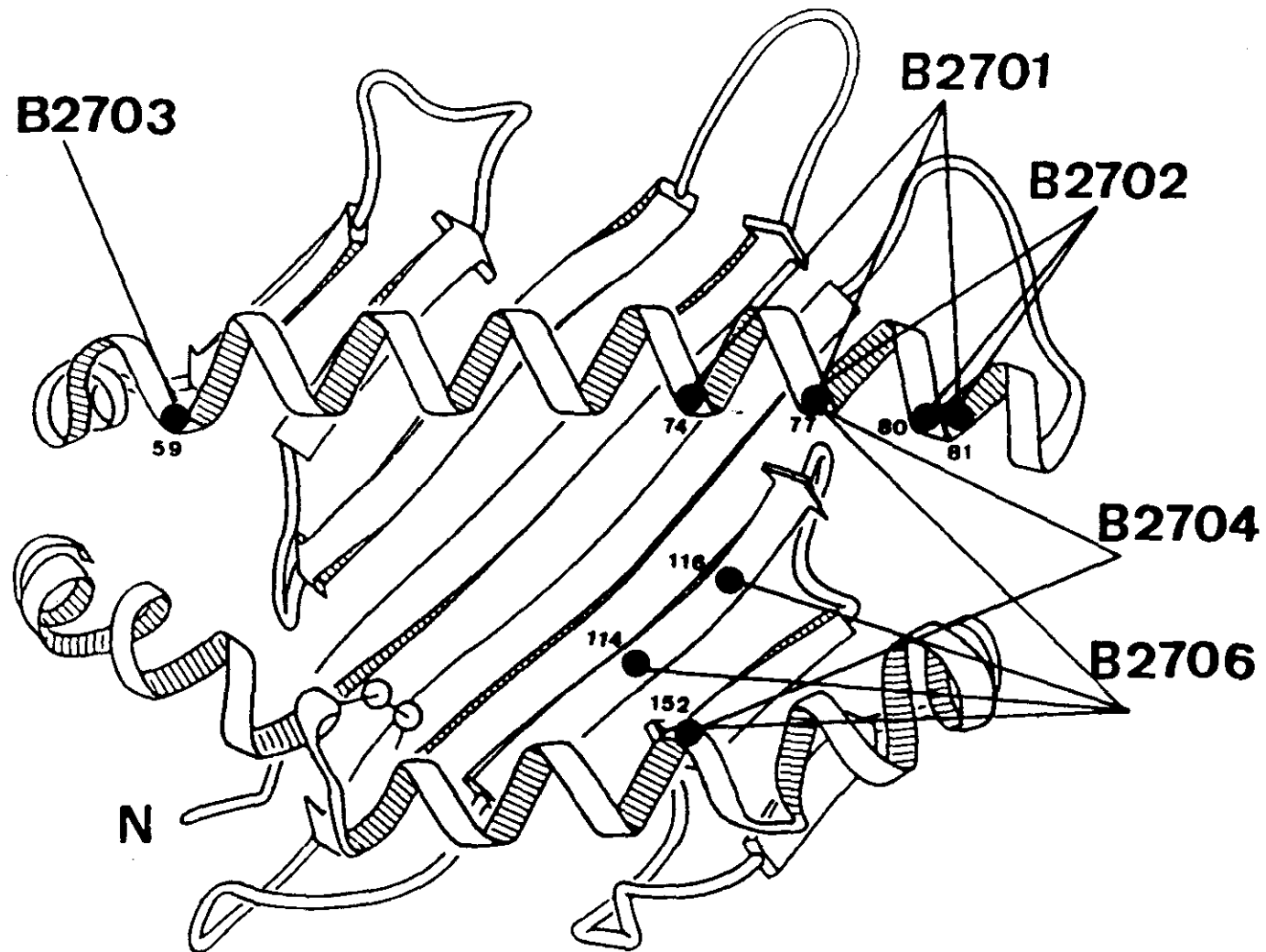


Figura 40. Localización de los cambios ocurridos en los subtipos de HLA-B27 en la estructura tridimensional de los antígenos HLA (41,42).

parte del determinante antigénico reconocido por este anticuerpo, ya que es la única posición que varía en todos ellos. Las diferencias de reactividad vendrían dadas por el distinto aminoácido que presentan en esa posición (Asp en B\*2705, Asn en B\*2702 y B\*2701 y Ser en B\*2704 y B\*2706). B\*2703, que tiene su única sustitución en el otro extremo del sitio, reacciona eficientemente con este anticuerpo. Sin embargo, este subtipo pierde la reactividad con el antisuero KC-MJA (109). Es difícil definir las posiciones que intervienen en el epítipo reconocido por este antisuero, ya que los cambios ocurridos en B\*2702 también alteran su reconocimiento. El antisuero que generamos contra el péptido 63-84 de B\*2705 es específico de este subtipo y no reconoce al resto de los subtipos con sustituciones en ese segmento de la molécula. El Acm p56.1 no reconoce a los subtipos con una sustitución en la posición 152, lo que indica que este residuo es crítico en el determinante reconocido por este Acm. La mayor parte de los anticuerpos generados contra B27 reaccionan con todos los subtipos, por lo que deben estar dirigidos contra una región polimórfica, característica de este antígeno, común a todos ellos.

Las sustituciones del subtipo B\*2701 se encuentran agrupadas en un segmento corto de la molécula, uno de los de mayor variabilidad de los antígenos HLA. Esta concentración de sustituciones en una región restringida de la molécula es semejante a la que presenta B\*2702 (115), compartiendo ambos subtipos las sustituciones en las posiciones 77 y 80. Sería improbable la generación de esta diversidad por acumulación de mutaciones puntuales, algunas de ellas recurrentes, precisándose para ello al menos 4 cambios de base en un segmento de 24 nucleótidos. El origen de estos subtipos podría explicarse por un mecanismo de conversión génica interalélica, existiendo un cierto número de secuencias potencialmente donadoras para B\*2701 y B\*2702, pertenecientes a distintos antígenos HLA (Tabla IX), ya que comparten su secuencia con B27 en ese segmento. El único cambio sufrido por el subtipo B\*2703, en la posición 59, requeriría un cambio de base, por lo que se podría haber generado por una mutación puntual. Esto ha sido confirmado por la posterior secuenciación del DNA de este subtipo (112). No obstante, se detectaron 15 diferencias más en regiones no codificantes. Este subtipo es excepcional debido a que ninguno de los antígenos MHC secuenciados hasta el momento posee una sustitución en el residuo 59.

Los subtipos de B27 tienen una distribución étnica diferencial. B\*2705 se ha detectado en el 90% de los individuos B27+ caucásicos y en un 45% de los orientales. De los otros dos

Tabla IX. Secuencia de varios antígenos HLA de Clase I en el segmento 72-83\*

	72								83			
B*2705	Q	T	D	R	E	D	L	R	T	L	L	R
B*2701	—	—	Y	—	—	N	—	—	—	A	—	—
B*2702	—	—	—	—	—	N	—	—	I	A	—	—
A32	—	—	—	—	—	S	—	—	I	A	—	—
A25	—	—	—	—	—	S	—	—	I	A	—	—
A24	—	—	—	—	—	N	—	—	I	A	—	—
BSNA	—	—	Y	—	—	N	—	—	I	A	—	—
Bw52	—	—	Y	—	—	N	—	—	I	A	—	—
B?	—	—	Y	—	—	N	—	—	I	A	—	—
Bw57	—	—	Y	—	—	N	—	—	I	A	—	—
BW58	—	—	Y	—	—	N	—	—	I	A	—	—
B38	—	—	Y	—	—	N	—	—	I	A	—	—
B49	—	—	Y	—	—	N	—	—	I	A	—	—
B44.1	—	—	Y	—	—	N	—	—	—	A	A	—
B44.2	—	—	Y	—	—	N	—	—	—	A	—	—
B13.2	—	—	Y	—	—	N	—	—	—	A	—	—
B13.1	—	—	Y	—	—	N	—	—	—	A	—	—
5.4-LCL.1 <sup>b</sup>	—	—	E	—	—	N	—	—	I	A	—	—
JY8 <sup>b</sup>	—	—	E	—	—	N	—	—	I	A	—	—
HLA-12.4b <sup>b</sup>	—	—	E	—	—	N	—	—	I	A	—	—
5.4-LBF <sup>b</sup>	—	—	E	—	—	N	—	—	I	A	—	—
5.4-LBF/FS <sup>b</sup>	—	—	E	—	—	N	—	—	I	A	—	—
ChLA-B1 <sup>c</sup>	—	—	—	—	—	N	—	—	I	A	—	—
Ch39 <sup>c</sup>	—	—	—	—	—	N	—	—	I	A	—	—

\* — indica identidad con B\*2705 en esa posición. Las secuencias se han extraído de Bjorkman y Parham (50).

<sup>b</sup> Este grupo de moléculas están codificadas por el gen HLA-AR. Su estructura está estrechamente relacionado con HLA-A, pero no son funcionales por la presencia de dos mutaciones deletéreas (82).

<sup>c</sup> Están incluidas dos secuencias de antígenos de Clase I de chimpancé para su comparación (94,95).

subtipos hallados en la población caucasiana, B\*2702 esta presente en un 10% de los individuos B27+, mientras que B\*2701 se ha encontrado únicamente en dos individuos incluidos en este grupo étnico (uno de ellos es un indio asiático). Cada uno de estos dos subtipos podrían haberse generado a partir de B\*2705 en una sola etapa, consistente en un proceso de conversión génica. Esta hipótesis está apoyada por el hecho de que no se detecta ninguna diferencia adicional entre las secuencias genómicas de B\*2702 y B\*2705, excepto el segmento de nucleótidos que da lugar a los residuos 77, 80 y 81 (31). La presencia, casi exclusiva, de B\*2702 en la población caucasiana y la ausencia de un cambio de base adicional sugieren que este subtipo se ha generado recientemente, posiblemente después de la separación de los grupos étnicos oriental y caucasiano, fijándose en una fracción de esta última. Esto también sería aplicable al subtipo B\*2701, aunque el escaso número de individuos en los que se ha detectado no permite determinar si está fijado en la población. La relación entre los subtipos B\*2704 y B\*2706 sería semejante a la descrita anteriormente. B\*2704 está presente en el 55% de los individuos orientales y es raro en la población caucasiana, mientras que B\*2706 se ha detectado en unos pocos individuos de la población oriental y no se ha encontrado en caucasicos. Así, B\*2706 podría haberse generado a partir de B\*2704 por un proceso de conversión génica. Esto habría tenido lugar recientemente, tras la separación de los grupos étnicos oriental y caucasiano. En la Fig. 41 está representado un modelo hipotético de la evolución de los distintos antígenos HLA-B27. Se ha considerado a B\*2705 como originario en este modelo por que es el mayoritario en la población caucasiana, se halla presente en un alto porcentaje en orientales y se encuentra en todos los grupos étnicos examinados (103,109). Para la generación de B\*2704 a partir de B\*2705, serían necesarias al menos dos etapas genéticas, que podrían consistir en una conversión génica y en una mutación puntual. B\*2703 formaría una rama independiente del resto de los subtipos. Se ha detectado en dos individuos pertenecientes a la población negra americana (109). El antígeno B27 está virtualmente ausente en la población negra africana, y se cree que su presencia en esta población se debe a la penetración del gen caucasiano. B\*2703 no ha sido detectado en ningún individuo caucasiano y podría constituir una rama evolutiva distinta, generada por mutación puntual del gen de B27 en la población negra. Recientemente, se ha detectado que 11 de 18 individuos HLA-B27+ analizados, pertenecientes a una población del Oeste de Africa, pertenecen al subtipo B\*2703 (112). Esto indicaría que este subtipo es común entre los individuos HLA-B27 del Oeste de Africa, a pesar de estar prácticamente

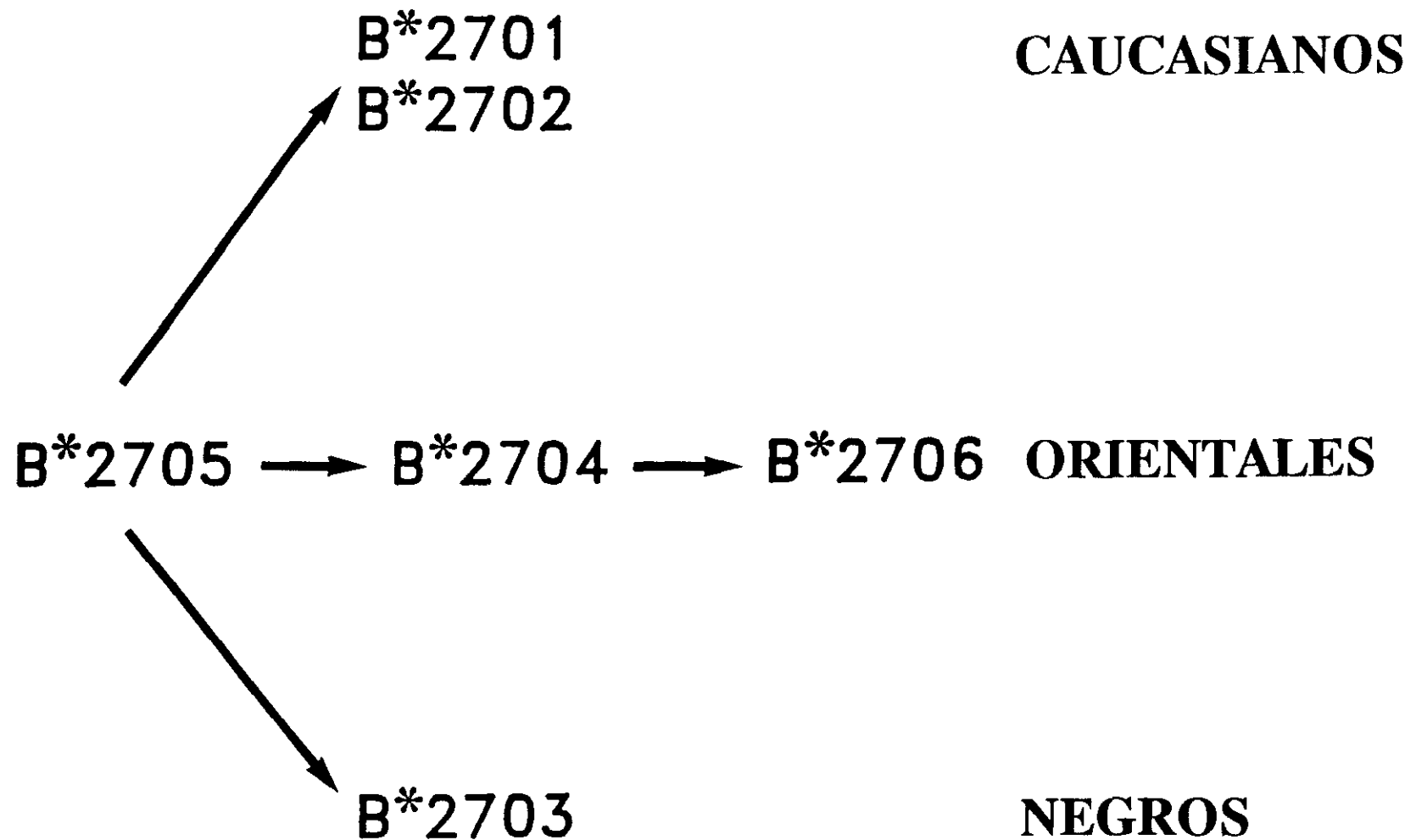


Figura 41. Esquema hipotético de la evolución de los subtipos de HLA-B27.

ausente en otras poblaciones, y apoyaría la hipótesis de su origen en la población negra.

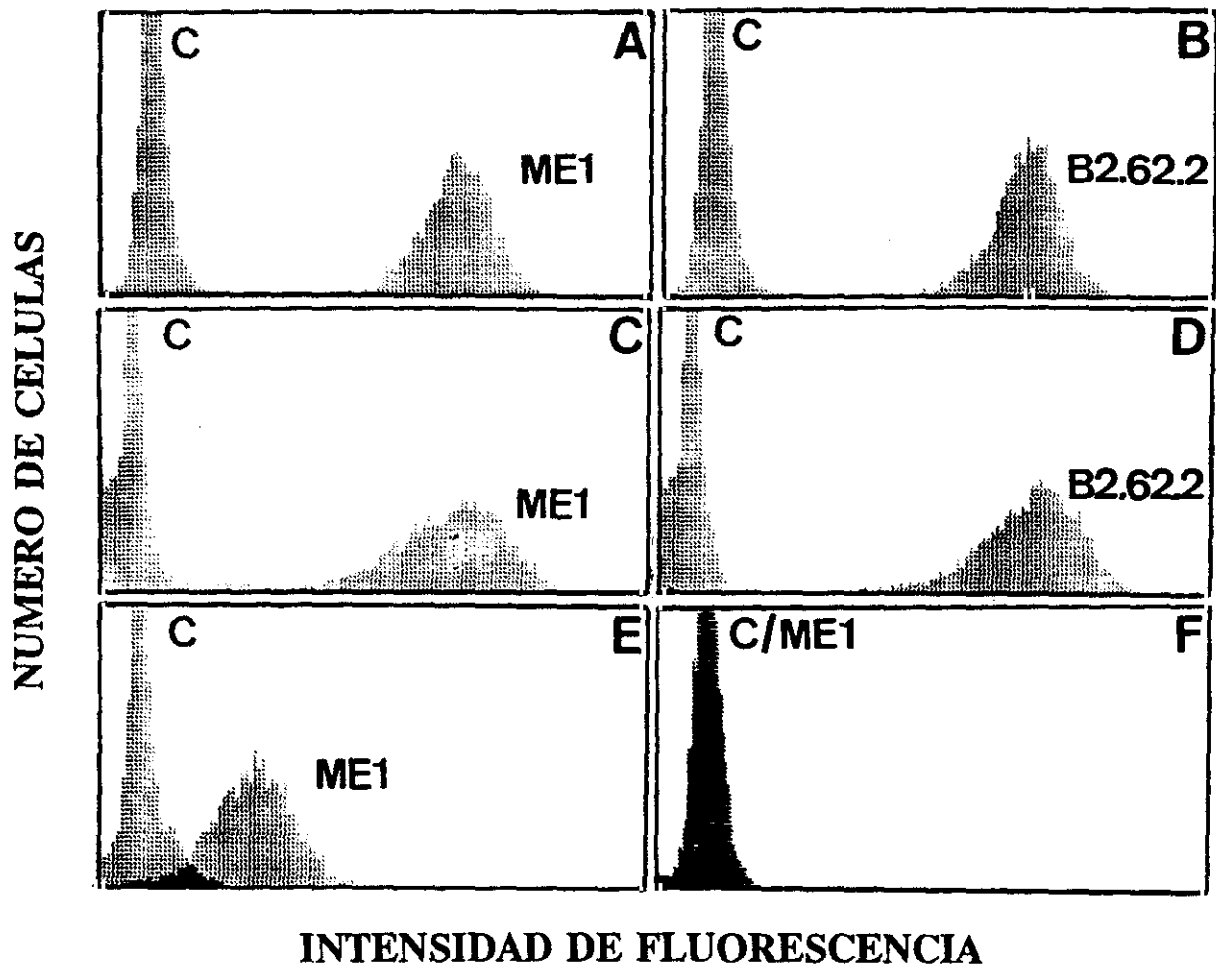
El reconocimiento diferencial de los distintos subtipos de B27 por CTL (120-123) sugiere que esta diversificación tiene un significado biológico. Los subtipos de B27, tras su generación, estarían sometidos a presiones selectivas diferenciales que podrían determinar su posterior fijación en la población. La estructura tridimensional de los antígenos HLA, muestra que la variabilidad de estos antígenos se acumula en el sitio de unión del péptido y que el polimorfismo puede alterar considerablemente la forma y la carga de dicho sitio (41-43). Estas diferencias en el sitio sugieren que distintos antígenos podrían unir diferentes grupos de péptidos. Se ha descrito en muchas ocasiones que ciertos antígenos HLA, incluyendo B27, actúan como elementos de restricción para determinados epítomos de proteínas virales (126,127). Además, el aislamiento de péptidos virales unidos constitutivamente a antígenos MHC ha mostrado una gran especificidad en la unión del péptido a su elemento de restricción (167,168). Estos resultados apoyarían que el polimorfismo de HLA afecta al repertorio de CTL generado frente a un determinado antígeno. Los cambios individuales introducidos tanto en los péptidos (154) como en los antígenos MHC (73-76) pueden afectar drásticamente la interacción entre ambos, así como el posterior reconocimiento del complejo por los linfocitos T. Por tanto un repertorio dinámico de antígenos HLA permitiría hacer frente a una gran variedad de patógenos, capaces, a su vez, de experimentar variaciones adaptativas. La presencia en las distintas poblaciones de patógenos diferentes podría favorecer una distribución étnica diferencial de los antígenos HLA, incluidos los subtipos de HLA-B27.

#### **4.3. REACTIVIDAD DE CTL ALORREACTIVOS ANTI-B27 CON TRANSFECTANTES MURINOS**

Este estudio se realizó con el fin de establecer las características del reconocimiento de HLA-B\*2705, expresado en la superficie de células murinas, por CTL específicos y de determinar la contribución que tiene la avidéz de los CTL humanos en dicho reconocimiento.

##### **4.3.1. Transfección de HLA-B27 en células murinas**

El gen de B\*2705 se transfectó, solo o junto con el de la  $\beta_2m$  humana, en la línea murina P815-HTR. La población 1-7E (Fig 42A y B), cotransfectada con ambos genes, presentaba niveles de expresión de HLA-B27 y  $\beta_2m$  comparables a los de una LCL B\*2705+ (Fig 42C y D). Sin embargo, la cantidad de B27 expresada por la línea C10, no cotransfectada con el gen



**Figura 42.** Expresión de HLA-B27 y  $\beta_2m$  en la superficie de transfectantes murinos, determinada mediante citometría de flujo. En cada pico de fluorescencia positivo se especifica el Acme utilizado. El pico de fluorescencia negativo (C) se midió en cada experimento, por incubación de las células con el segundo anticuerpo fluoresceinado, únicamente. A y B muestran la fluorescencia del transfectante murino 1-7E tras incubación con los Acms ME1 y B2.62.2, respectivamente. C y D corresponden a la incubación de la LCL LG15 con los mismos Acms. E muestra la fluorescencia de las células P815 sin cotransfectar con el gen de  $\beta_2m$  (C10). Los transfectantes murinos analizados en este ensayo procedían de poblaciones clonadas por dilución límite. F representa la fluorescencia de células P815 sin transfectar, incubadas con el Acme ME1. No se observó fluorescencia al incubar C10 y la línea P815 con el Acme B2.62.2.

de  $\beta_2m$  (Fig 42E), era apreciablemente inferior al de la LCL. Como control, la línea P815 sin transfectar no expresa ninguna de estas moléculas en su superficie (Fig 42F).

#### **4.3.2. Especificidad y avidéz de CTL alorreactivos anti-B27**

Posteriormente, se analizó la reactividad de varios clones de CTL con el transfectante 1-7E. Estos clones se habían descrito con anterioridad (122) y fueron generados por estimulación con una LCL B\*2705+. La Tabla V muestra que el patrón de reactividad de estos clones con los subtipos de B27 era diferente. Ninguno de ellos reconocía a los subtipos B\*2704 y B\*2706 que comparten las mismas sustituciones en las posiciones 77 y 152. CTL 1, 26 y 29 tenían la misma reactividad por este criterio, reconociendo a los subtipos B\*2702, B\*2703 y B\*2705. CTL 2 y 15 eran semejantes y reaccionaban con los subtipos B\*2701 y B\*2705, presentando una reactividad adicional con B40\* (B\*4002). CTL 48 se podía incluir en el mismo grupo de reacción que los dos anteriores, ya que las diferencias que presentaba respecto a ellos parecían ser cuantitativas más que cualitativas. CTL 40 tenía un patrón distinto del resto, reaccionando únicamente con el subtipo B\*2705, contra el que fue generado.

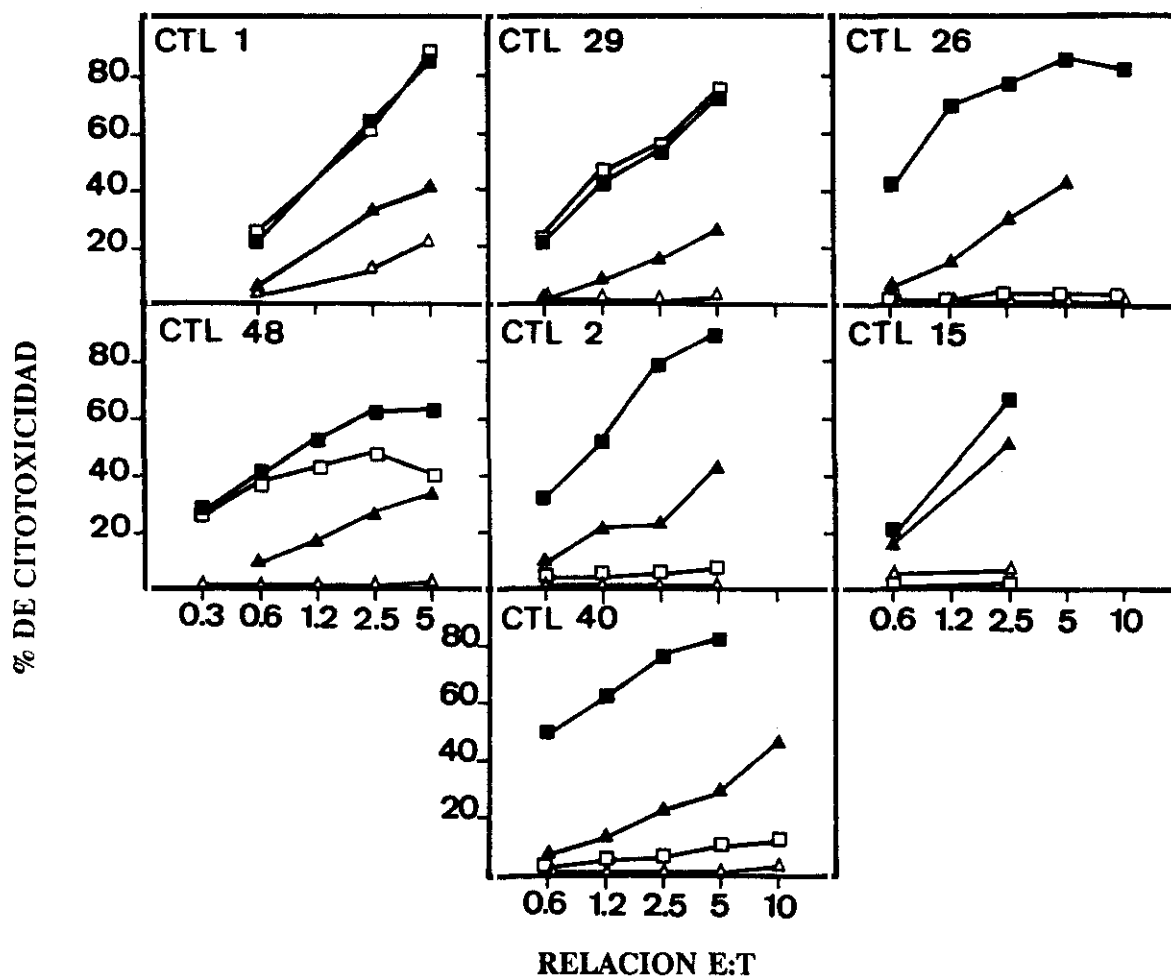
Los clones con el mismo patrón de reactividad se distinguían por la inhibición diferencial de su citotoxicidad con un Acm anti-CD8 (Tabla X), lo que constituía una estimación de la avidéz de su interacción con la célula diana. También era diferente la inhibición con anticuerpos anti-CD3. La citotoxicidad por CTL 1 y 29 no se inhibía por Acm anti-CD8 y sólo se eliminaba parcialmente por los anti-CD3. Sin embargo, la lisis por CTL 26, con una reactividad semejante a los anteriores, se inhibía totalmente por ambos anticuerpos. Dentro del otro grupo de clones con reactividad semejante, la citotoxicidad por CTL 2 y 15 se bloqueaba tanto por anticuerpos anti-CD8 como anti-CD3, mientras que la de CTL 48 sólo se anulaba parcialmente. La lisis por CTL 40 se inhibía completamente por Acm anti-CD8. Así, de acuerdo con este criterio, CTL 1, 29 y 48 poseerían una avidéz mayor por sus respectivas dianas que CTL 26, 2, 15 y 40.

#### **4.3.3. Análisis de la reactividad de los CTL humanos con transfectantes murinos**

En la Fig. 43 están representados los resultados obtenidos al enfrentar los siete clones descritos con el transfectante 1-7E. En estos ensayos se analizó, como control positivo, la citotoxicidad de la línea LG15 y de blastos B\*2705+, obtenidos por estimulación con PHA. Todos los clones fueron capaces de provocar la citotoxicidad de la LCL y de los blastos, pero únicamente los clones 1, 29 y 48 lisaron al transfectante 1-7E. Estos 3 clones eran los de mayor

**Tabla X. Inhibición de la citotoxicidad de LCL B\*2705+ con Acm específicos de la célula T**

CTL	Acm	Célula diana			
		LG15		R69	
		E/T	% lisis	E/T	% lisis
1	—	0,5/1	48		ND
	Anti-CD3		18		ND
	Anti-CD8		36		ND
	Anti-CD7		43		ND
29	—	0,5/1	31		ND
	Anti-CD3		8		ND
	Anti-CD8		24		ND
	Anti-CD7		28		ND
26	—	1/1	31		ND
	Anti-CD3		3		ND
	Anti-CD8		0		ND
	Anti-CD7		31		ND
	Anti-clase II		27		ND
2	—		ND	1/1	30
	Anti-CD3		ND		2
	Anti-CD8		ND		3
	Anti-CD7		ND		31
15	—		ND	5/1	84
	Anti-CD3		ND		17
	Anti-CD8		ND		8
	Anti-CD7		ND		ND
	Anti-CD11b		ND		60
48	—	1/1	54	1/1	87
	Anti-CD3		14		25
	Anti-CD8		30		68
	Anti-CD7		42		79
	Anti-clase II		35		80
40	—	3/1	74		ND
	Anti-CD3		ND		ND
	Anti-CD8		7		ND
	Anti-CD7		ND		ND
	Anti-clase II		77		ND



**Figura 43.** Citotoxicidad específica obtenida al incubar 7 clones de CTL alorreactivos anti-B\*2705 con: el transfectante murino 1-7E (□); la LCL humana LG15 (■); blastos B27+, obtenidos por estimulación con PHA (▲); células P815 sin transfectar (△).

avidez ya que su capacidad lítica frente a LCL B\*2705+ no se inhibía significativamente por Ac anti-CD8 (Tabla X). No se detectó ninguna correlación entre la especificidad de los CTL y su capacidad para lisar a las células 1-7E.

#### **4.3.4. Inhibición de la citotoxicidad de los transfectantes por Acm anti-CD8**

Aunque los anticuerpos anti-CD8 no inhibían la capacidad lítica de los clones 29 y 48 frente a LCL B\*2705+, se analizó su efecto en la citotoxicidad de los transfectantes murinos. En la Tabla XI se muestran los resultados de un experimento representativo, observándose que el Acm anti-CD8 bloqueaba la citotoxicidad del transfectante, sin alterar la de una LCL. También, se pudo apreciar en este experimento que el Acm anti-CD3, SPV-T3b, provocaba la lisis, en lugar de suprimirla, como ocurre en el caso de la LCL, tanto de las células P815-HTR como del transfectante. Este fenómeno ya se ha descrito con anterioridad (253) usando el Ac OKT3, dirigido contra la misma molécula.

#### **4.3.5. Discusión**

La expresión de un antígeno HLA en la superficie de una célula murina permite determinar la contribución de esta molécula en el reconocimiento y lisis de la célula diana. Estos experimentos tienen algunas limitaciones, como es el que algunos CTL no pueden lisar a los transfectantes, incluso cuando la línea utilizada para la transfección es una buena diana frente a CTL humanos. Ello se ha atribuido a la carencia de moléculas de adhesión apropiadas (253,254) o la alteración del epítipo al expresarse en la célula murina (257). En este estudio se ha analizado la reactividad de clones de CTL anti-B\*2705 con células P815 transfectadas con los genes de B\*2705 y  $\beta_2m$  humana. La cantidad de B27 en la superficie del transfectante 1-7E, que expresaba  $\beta_2m$  humana, es considerablemente superior a la del transfectante C10, que no presentaba esta molécula. Esta reducida expresión de B27 cuando no está asociado con la  $\beta_2m$  humana ya se había detectado en estudios previos (292). La presencia del gen de  $\beta_2m$  humano evita posibles alteraciones de epítipos como consecuencia del acoplamiento de B27 con la  $\beta_2m$  murina.

Mediante el análisis de la reactividad de estos 7 clones con el transfectante 1-7E, extendimos a HLA-B27 la heterogeneidad clonal detectada en el reconocimiento de otros aloantígenos expresados en P815. En nuestro caso, existe una clara correlación entre la avidez del clon y su capacidad lítica frente al transfectante murino, de forma que sólo los clones con mayor avidez,

**Tabla XI. Inhibición de la citotoxicidad de los transfectantes P815-B\*2705+ por Acm específicos de la célula T**

CTL	Acm	Célula diana					
		1-7E		P815-HTR		LG15	
		E/T	% lisis	E/T	% lisis	E/T	% lisis
29	—	1/1	77	1/1	0	1/1	76
	Anti-CD3		70		39		51
	Anti-CD8		16		0		76
	Anti-CD11b		72		0		81
48	—	1/1	55	1/1	2	1/1	61
	Anti-CD3		50		50		21
	Anti-CD8		2		1		52
	Anti-CD11b		53		0		65

entre CTL de especificidad fina similar con subtipos, provocan su lisis. Esto contrasta con un examen realizado por Bernhard et al (257) de un amplio panel de clones murinos y humanos, específicos de HLA-A2, en el que la heterogeneidad clonal en el reconocimiento de células murinas EL-4-A2.1+, se correlacionaba con la especificidad de los CTL y no con su avidéz. Sin embargo, dicha especificidad estaba determinada de forma incompleta, ya que su estudio se basaba en el análisis de la reactividad de los CTL con sólo tres subtipos de A2 (A2.1, A2.2 y A2.3) en el caso de los clones murinos, y con dos (A2.1 y A2.3) en el caso de los humanos. Además, no realizaron una estimación de la avidéz de los clones humanos. Así, aunque de estos estudios se deduce una correlación entre la especificidad de los clones y su capacidad lítica, nuestros resultados muestran que, al menos para algunos epítomos determinados, las diferencias en avidéz de clones de especificidad semejante determina la capacidad lítica de los transfectantes murinos.

Todos los clones tenían una eficiencia lítica semejante, lo que contrasta con las diferencias de avidéz existentes entre ellos; esto puede deberse a que el ensayo de citotoxicidad directa no posea la sensibilidad suficiente para detectar tales diferencias. Posiblemente para que tenga lugar la lisis, se requiere que la interacción entre las células efectora y diana alcance un umbral de avidéz determinado. La interacción de la mayoría de los clones con su célula diana, en ausencia de Acm anti-CD3 y anti-CD8, tendría la avidéz suficiente para permitir la lisis, no detectándose diferencias entre ellos. Sin embargo, para una fracción de los clones, la adición de anticuerpos contra estas dos moléculas podría dificultar algunas de las interacciones necesarias para la estabilización de los conjugados, de forma que no se alcanzase la avidéz mínima requerida para la lisis. Esto podría afectar drásticamente la eficiencia lítica.

Existe una reducción de la avidéz de la interacción al enfrentar CTL humanos con dianas murinas que se refleja en una mayor dependencia de CD8. En el caso de células humanas, la interacción entre CD2 y LFA-3 parece contribuir significativamente a la estabilización de los conjugados, de forma que la lisis puede ser bloqueada por la adición de Ac dirigidos contra estas dos moléculas (224). Sin embargo, en el caso de dianas murinas, los Ac anti-CD2 no inhiben la lisis (67,253), lo que sugiere que esta molécula no juega un papel importante en la interacción. Esto se correlaciona con que no se ha detectado serológicamente LFA-3 en la superficie de las células murinas. De esta forma la avidéz de la interacción entre CTL humano y diana murina sería más dependiente de LFA-1 y CD8 para fortalecer la unión. Es probable

que LFA-1 contribuya a la interacción diana murina/CTL humano, ya que la línea P815 parece expresar el homólogo murino de ICAM-1 (255). LFA-1 humano puede interactuar con ICAM-1 murino (256), aunque probablemente con menor eficiencia que con su ligando natural, como lo muestra el que la transfección de células murinas con ICAM-1 humano restablezca el reconocimiento por células T, cuando los niveles de antígenos MHC son bajos (226).

La ausencia de un acoplamiento adecuado entre las moléculas de adhesión de las dos especies podría conducir, en el caso de las células murinas, a una contribución más significativa del TCR a la avidéz de la interacción. Esto provocaría que dentro de los clones que reconocen epítomos relacionados, únicamente aquellos con mayor nivel de expresión y/o mayor afinidad intrínseca de sus receptores, tendrían la avidéz requerida para lisar a los transfectantes murinos. La avidéz mínima requerida para la lisis de dianas murinas por un clon podría ser dependiente de su especificidad. Algunos determinantes reconocidos por CTL podrían cambiar o perderse por la expresión de la molécula HLA en la superficie de las células murinas, mientras que otros podrían permanecer inalterados (257). La existencia de una modificación podría provocar una disminución de la afinidad de interacción con su TCR específico. Por este motivo, muchos epítomos alterados podrían requerir mayor avidéz por parte de los correspondientes CTL, para su reconocimiento sobre la superficie de células murinas, que los que permanecen sin variación, o incluso no ser reconocidos en absoluto. Así, los requerimientos para la lisis de transfectantes murinos entre clones con diferente especificidad puede diferir considerablemente. La lisis de los transfectantes murinos podría ser relativamente más dependiente, al menos en algunos casos, de la afinidad del TCR y, por tanto, más susceptible a alteraciones de la estructura de los epítomos reconocidos.

#### **4.4. ANALISIS DE LA REACTIVIDAD DE CTL ALORREACTIVOS CON MUTANTES DE B27**

El polimorfismo del antígeno HLA-B27 afecta al reconocimiento por CTL. Con el fin de determinar la relevancia de cada una de las posiciones que varían en los subtipos en el reconocimiento por CTL, se construyeron una serie de moléculas mutantes de B27 y se analizó su reactividad con un conjunto de clones de CTL alorreactivos.

##### **4.4.1. Construcción de mutantes**

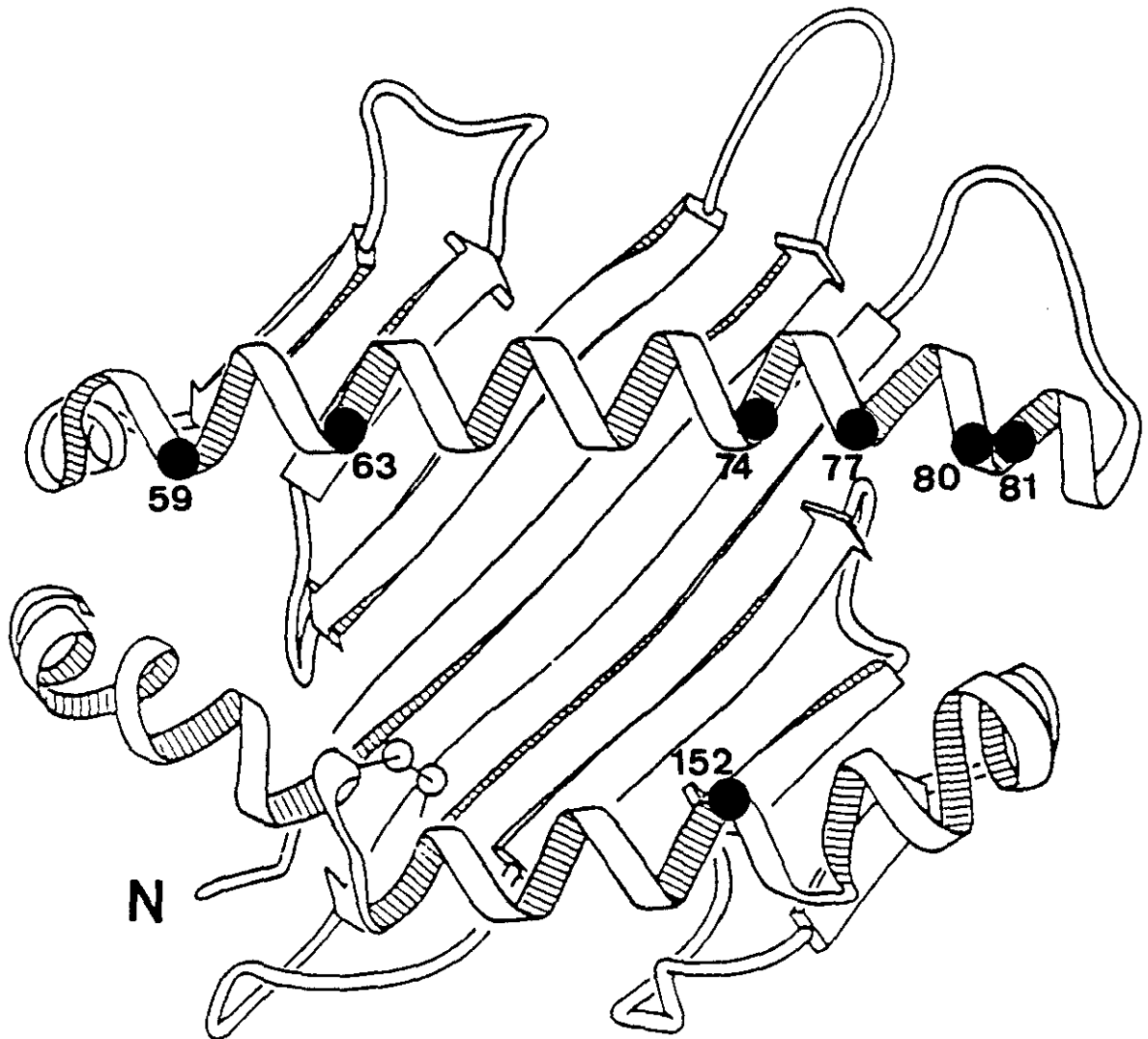
Se construyeron ocho mutantes del antígeno HLA-B27, introduciendo en cinco de ellos

cambios aislados en residuos que varían entre los subtipos naturales y en tres sustituyendo simultáneamente dos de estas posiciones. Todos los residuos mutados se hallan localizados en las hélices  $\alpha$  que componen el sitio de unión del antígeno (41-43) y están agrupados en uno de sus extremos, exceptuando el residuo 59, que se encuentra en el lado opuesto (Fig. 44). Con el fin de determinar la influencia de sustituciones en esta región, se introdujo un cambio en el residuo 63, separado del 59 por una vuelta de la  $\alpha$ -hélice. Los nuevos aminoácidos presentes en los mutantes son los encontrados en los subtipos naturales. La posición 63 es constante en todos ellos, por lo que se introdujo una Asn, que es el aminoácido alternativo al Glu (residuo presente en B27) en otros antígenos HLA (50).

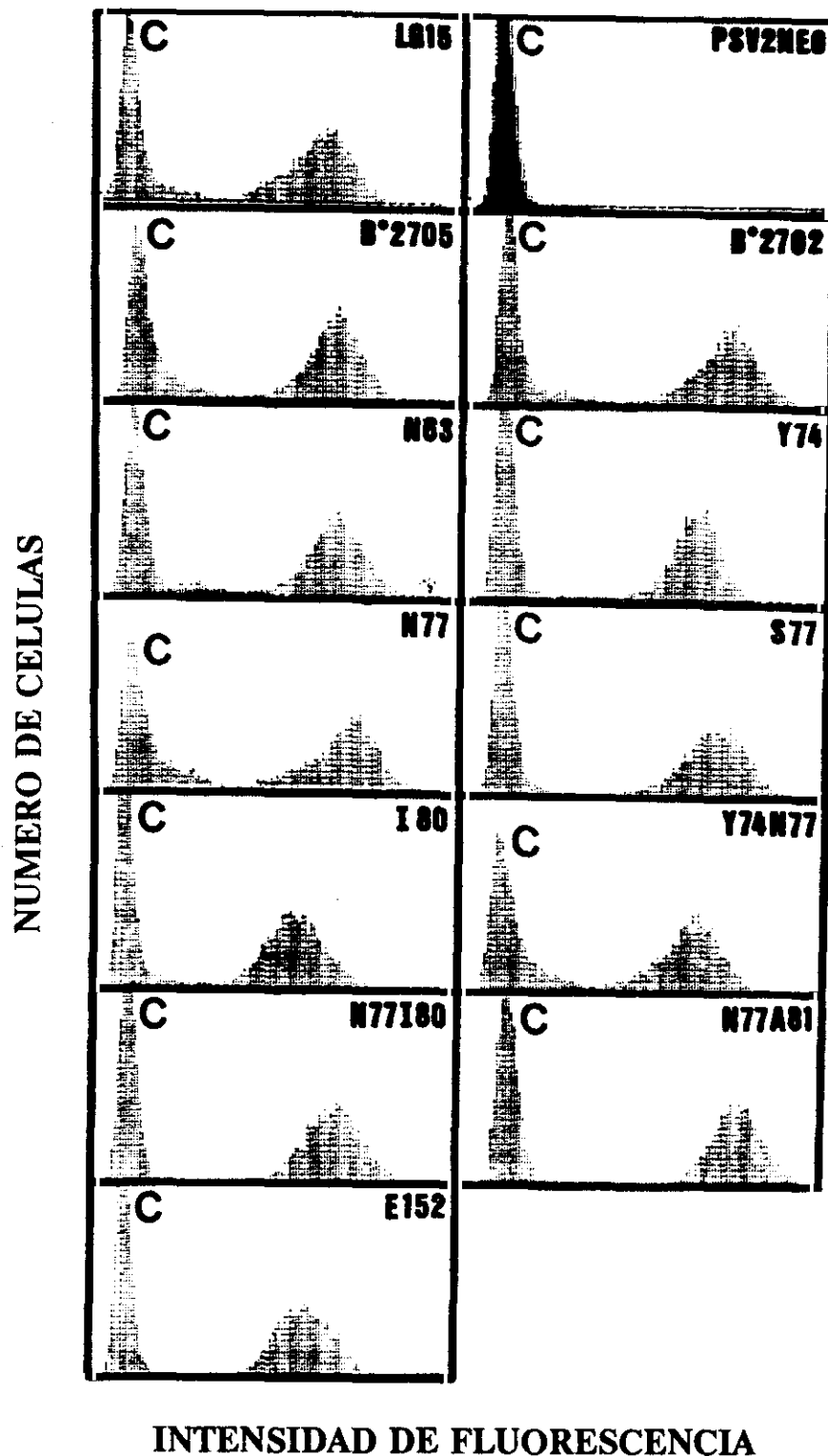
Cada uno de los mutantes se transfectó por separado en la línea HMy2 CIR, junto con el plásmido de selección pSV2neo. También, se transfectaron, como control, los genes de B\*2705 y B\*2702. Mediante citometría de flujo se seleccionaron poblaciones de transfectantes cuya expresión de HLA-B27 era comparable a la encontrada en la línea linfoblástica LG15 (Fig. 45). La homogeneidad y estabilidad de la expresión se comprobó por periódicamente por FACS.

#### **4.4.2. Especificidad de los CTL con los subtipos de B27 y otros aloantígenos**

Los nueve mutantes construidos se enfrentaron con un panel de 21 clones de CTL alorreactivos (Tabla VI). Veinte de ellos se habían generado por estimulación de PBL de distintos respondedores con LCL B\*2705+ y se clasificaron en seis grupos por su reactividad con los subtipos de B27 (122). Los clones incluidos dentro de cada grupo presentaban algunas características diferenciales: 1) pueden apreciarse diferencias en su eficiencia lítica frente a dianas B\*2705+; 2) su citotoxicidad relativa frente células que expresaban los distintos subtipos no era la misma; 3) algunos clones presentaban reactividad con otros antígenos HLA, como B40\* (B\*4002) y DR2. Independientemente del grupo en el que se incluyeran, todos los clones manifestaban una serie de características comunes: 1) ninguno de ellos reconocía a los subtipos B\*2704 y B\*2706, con cambios comunes en los residuos 77 y 152; 2) 19 de los 20 clones no reconocían al menos uno de los subtipos B\*2701 o B\*2702, que difieren de B\*2705 en tres posiciones, localizadas en el segmento 74-81, y comparten las sustituciones en los residuos 77 y 81; 3) 7 de estos clones (35%) no reaccionaban con el subtipo B\*2703, con un único cambio en posición 59. El clon restante se generó frente a B\*2704 y su patrón de reacción difería considerablemente de los anteriores, reconociendo a todos los subtipos de B27, con excepción



**Figura 44.** Localización espacial de los residuos mutados en la molécula de HLA-B\*2705, en la estructura tridimensional de los antígenos HLA (41,42).



**Figura 45.** Expresión de las moléculas de B27 mutadas en la superficie de los transfectantes en la línea humana HMy2.CIR, tras incubación con el Acm ME1. El pico de fluorescencia negativo (C) se midió en cada experimento, por incubación de las células con el segundo anticuerpo fluoresceinado, únicamente. Los paneles superiores representan la fluorescencia de la LCL LG15 y de la línea HMy2 CIR transfectada con el plásmido de resistencia, pSV2neo, incubadas con el mismo Acm. También se muestra la expresión de los transfectantes B\*2705+ y B\*2702+. Se realizó un análisis similar incubando con el Acm W6/32 para excluir la posibilidad de que alguna de las mutaciones alterase la expresión en superficie de B27. Los resultados fueron similares a los obtenidos con el Acm ME1, con excepción del transfectante pSV2neo, que mostraba un pico de fluorescencia ligeramente positivo. Esto se debe a que la línea Hmy2.CIR tiene una baja expresión de antígenos de clase I endógenos.

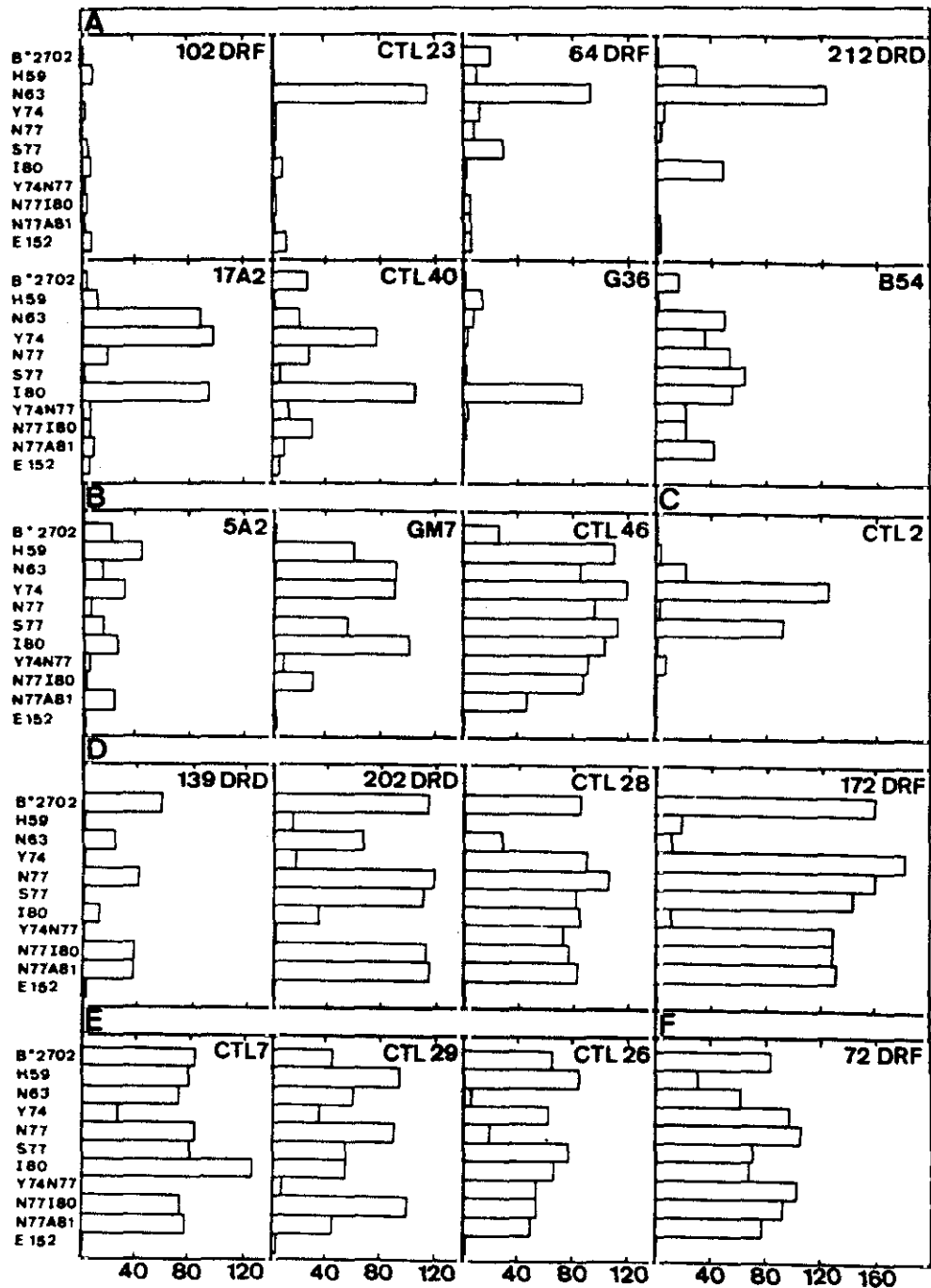
de B\*2703.

#### 4.4.3. Diversidad Clonal

El análisis de la reactividad de los 21 clones con los mutantes mostró que todos ellos tenían una especificidad diferente, independiente de la clasificación previa en base a su reactividad con los subtipos de B27 (Fig. 46). Los únicos clones con un patrón semejante eran CTL 23 y 64DRF, pertenecientes al grupo A, pero se diferenciaban en que el primero presentaba reacción cruzada con DR2, lo que indicaba que reconocían un epítipo distinto. La aparente dificultad para detectar un denominador común dentro de cada grupo venía dada por el efecto diferencial de los distintos cambios sobre cada clon. A pesar de la gran diversidad existente, la reactividad de los clones con los mutantes se ajustaba a la que tenían con los subtipos, en cuanto a que siempre se alteraba por alguno de los cambios presentados por los subtipos a los que no reconocía. La falta de reacción de todos los clones anti-B\*2705 con los subtipos B\*2704 y B\*2706 podía explicarse, como veremos posteriormente, por el cambio E152. Los clones del grupo A, específico del subtipo estimulador B\*2705, generalmente no reconocían a la mayoría de los transfectantes, especialmente a los que expresaban mutantes dobles. Los clones incluidos en este grupo, junto con los del grupo B, caracterizados por no reaccionar con LCL B\*2701+ y B\*2702+, se afectaban por alguno de los cambios ocurridos en estos subtipos, o por una combinación de varios de ellos. El mutante N77 era el que alteraba la reactividad de un mayor número de clones, mientras que el efecto del A81 sólo se pudo determinar claramente en CTL 46. En los grupos D y E, que contenían clones que reconocían a B\*2702 pero no a B\*2701, predominaban aquellos que se alteraban por la presencia del cambio Y74, específico del último de los subtipos, o por el cambio doble Y74N77. La reactividad del clon 72DRF, que presentaba capacidad citotóxica frente a los subtipos B\*2701 y B\*2702, no se afectaba significativamente por ninguna de las sustituciones de estos subtipos.

#### 4.4.4. Complejidad de los epítopos. Cambios compensatorios

En contraposición con lo expuesto anteriormente, la reactividad de algunos clones con el panel de mutantes no explicaba el patrón que adoptaban con los subtipos. En algunos casos se detectaron efectos compensatorios al introducir ciertos cambios en distintas combinaciones, de tal forma que una mutación podía modificar el reconocimiento por un clon, mientras que este era restablecido cuando se introducía una segunda mutación en su proximidad.



**% DE LISIS RELATIVA**

Figura 46. Citotoxicidad de los transfectantes, en la línea Hmy2.CIR, por clones de CTL anti-B\*2705. Los resultados están expresados como % de lisis relativa, en la que la lisis de cada diana está expresada como un % de la citotoxicidad específica de HMy2.CIR-B\*2705 a la misma relación efector:diana. Los datos representan la media de dos o tres experimentos, excepto en el caso de los CTL B54, 7 y 23, en los que no se pudo obtener un número de células suficiente que permitiera realizar varios ensayos. Cada experimento se realizó a las relaciones efector:diana de 0,5:1, 1:1 y 2:1, aunque para simplificar, sólo están representados los resultados obtenidos a la relación 2:1. La lisis relativa obtenida a las tres relaciones fue similar. Con el fin de evaluar el efecto de una determinada mutación, los valores de eficiencia lítica relativa se dividieron en 4 grupos: <30%, 30-70%, 70-130% y >130%. Los porcentajes comprendidos dentro de cada uno de estos rangos se consideraron equivalentes. La clasificación de los clones en diversos grupos (A-F) se realizó de acuerdo a su reactividad con los subtipos de B27 (Tabla VII). El % de lisis del transfectante B\*2705+ por cada uno de los clones oscilaba entre el 40 y el 100%. En esta figura está representada la lisis de la LCL CH (B\*2703) para su comparación. Este subtipo está designado aquí como H59 para resaltar su único cambio, respecto de B\*2705. En este caso, el % de lisis relativa está referido a la citotoxicidad específica de la LCL LG15 (B\*2705) a la relación E:D de 1:1, que variaba del 13 al 86% dependiendo del clon.

Parte de los clones del grupo B, caracterizado por no reconocer a los subtipos con varias sustituciones en el segmento 74-81, reconocían moléculas con mutaciones en posiciones individuales incluídas en esta región y, en ocasiones, se observaron cambios compensatorios. Así, la reactividad del clon GM7, que se perdía frente a N77, se restablecía parcialmente al introducir un cambio en el residuo 80, provocando que el mutante doble N77I80 fuera reconocido, aunque con una eficiencia muy baja. No obstante, este clon no lisaba LCL que expresaban el subtipo B\*2702, el cual posee estas dos sustituciones junto con una adicional en posición 81. El hecho de que este clon no reconozca a B\*2701 es compatible con la falta de reconocimiento de los mutantes dobles Y74N77 y N77A81. El clon 46 reaccionaba con todos los mutantes, tanto sencillos como dobles, en residuos incluídos en el segmento 74-81; sin embargo, no reconocía a los subtipos B\*2701 y B\*2702, portadores de tres de estas sustituciones. Destaca el hecho de que la presencia de la mutación A81 junto con la N77 disminuya apreciablemente la lisis.

CTL 2, único representante del grupo C incluído en nuestro panel, reconocía LCL que expresaban el subtipo B\*2701, con cambios en las posiciones 74, 77 y 81, y a los transfectantes Y74 y S77; sin embargo, no reconocía a los transfectantes que expresaban el mutante sencillo N77, ni los dobles Y74N77 y N77A81. Aunque los mutantes y el subtipo están expresados en líneas celulares diferentes, los resultados sugieren que los tres cambios introducidos *conjuntamente reproducirían el epítipo reconocido por este clon en B\*2705*, alterándose al introducir cualquiera de las sustituciones en diferente combinación. Por dificultades técnicas no se pudo obtener el mutante en la posición 81, por tanto, no sabemos la relevancia de este residuo de forma aislada.

En el grupo D, definido por su capacidad para lisar a los subtipos B\*2705 y B\*2702, se detectaron efectos compensatorios en los clones 202DRD y 172DRF. La mutación I80 reducía la lisis por ambos clones, restableciéndose cuando se introducía un segundo cambio en posición 77. En la Fig. 46 se puede apreciar que el mutante N77I80 era lisado con la misma eficiencia que el N77 y que el subtipo B\*2705. Por otra parte, los clones 172DRF y CTL28 muestran un efecto complejo, inverso al observado en el clon CTL2, debido a que, careciendo de capacidad citotóxica frente a B\*2701, reconocían a los mutantes que reproducían las sustituciones de dicho subtipo: Y74, N77, Y74N77 y N77A81. Esto sugiere, aunque se trata de líneas diferentes, que se necesitarían los tres cambios simultáneamente para destruir el epítipo reconocido por estos

dos clones.

Dentro del grupo E, el clon 26 mostraba cierto parecido con los clones 172DRF y CTL28 del grupo D, en cuanto a que reconocía a los mutantes Y74N77 (la mutación Y74 compensaría la baja eficiencia de reconocimiento de la N77) y N77A81, mientras que no lisaba al subtipo B\*2701 que incluía los tres cambios.

Estos resultados indican que los efectos de cambios individuales en el reconocimiento clonal no son acumulativos, sino que pueden tener efectos interdependientes que, en algunos casos, pueden compensarse parcialmente.

#### **4.4.5. Significado de los cambios individuales**

Cada una de las posiciones mutadas tenía efectos significativos en el reconocimiento de B27 por CTL (Tabla XII). El cambio introducido en la posición 152 era el más drástico, puesto que eliminaba el reconocimiento por parte de los 20 clones generados contra B\*2705. Las restantes mutaciones eran menos relevantes, aunque cada una de ellas ejercía efectos importantes en la reactividad del 35 al 55% de los clones y no alteraba, como máximo, la del 40%. El subtipo B\*2703, que poseía un único cambio en posición 59, influía en la capacidad lítica del 65% de los clones. Se consideró que una mutación alteraba la reactividad de un clon cuando la citotoxicidad relativa del transfectante correspondiente, respecto de B\*2705, disminuía a valores por debajo del 30% y se estimó irrelevante cuando se mantenía con valores superiores al 70%. Así, el efecto global de cada una de las mutaciones en el reconocimiento por CTL, exceptuando el cambio en posición 152, era análogo, ya que las diferencias detectadas entre ellos no son de gran magnitud.

#### **4.4.6. Efecto diferencial de las sustituciones en una posición o en posiciones cercanas espacialmente**

Los dos aminoácidos introducidos en la posición 77, Asn y Ser, ejercían efectos diferentes en la reactividad de algunos clones, como GM7, CTL2, 139DRD y CTL26 (Fig. 46). Esto indicaría que, tanto la localización como la naturaleza del cambio, contribuyen de forma sustancial a la modulación del reconocimiento por CTL. El efecto global de estas mutaciones sobre el conjunto de clones fue similar, de forma que el mutante N77 afectaba la reactividad del 55% de los clones, alterando el S77 al 45% de ellos (Tabla XII).

Las mutaciones introducidas en posiciones espacialmente próximas, como son la 59 y 63; 74

Tabla XII. Efecto de las mutaciones en la reactividad de los clones de CTL anti-B\*2705

Mutación	Citotoxicidad relativa <sup>a</sup>		
	30% Nº de clones (%)	30-70% Nº de clones (%)	70% Nº de clones (%)
H59 <sup>b</sup>	13 (65%)	3 (15%)	4 (20%)
N63	9 (45%)	4 (20%)	7 (35%)
Y74	8 (40%)	4 (20%)	8 (40%)
N77	11 (55%)	2 (10%)	7 (35%)
S77	9 (45%)	4 (20%)	7 (35%)
I80	7 (35%)	6 (30%)	7 (35%)
E152	20(100%)	0 (0%)	0 (0%)
Y74N77	15 (75%)	1 (5%)	4 (20%)
N77I80	11 (55%)	2 (10%)	7 (35%)
N77A81	10 (50%)	5 (25%)	5 (25%)

<sup>a</sup> Referida a la lisis del transfectante Hmy2.CIR-B\*2705+ a la relación E/T de 2:1.

<sup>b</sup> La citotoxicidad relativa del subtipo B\*2703, designado aquí como H59, corresponde a la lisis de la LCL CH, B\*2703+, respecto de obtenida con la LCL LG15, B\*2705+.

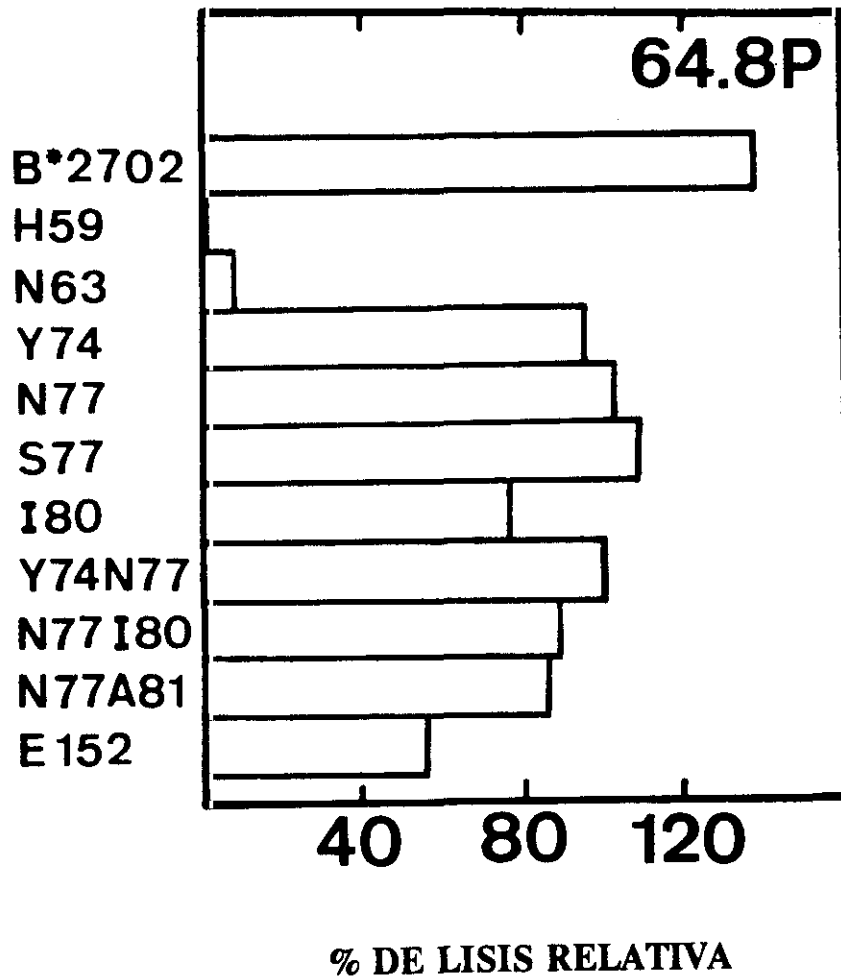
y 77; 77 y 80; y 77 y 81, separadas entre sí por una vuelta de hélice, afectan diferencialmente al reconocimiento por muchos de los clones analizados. Los cambios en las posiciones 59 y 63 tenían efectos claramente distintos en los clones: CTL23, 64DRF, 212DRD, 17A2, B54, 202DRD y CTL26 (Fig. 46). Igualmente, la mutación en la posición 77 influía de distinta forma que las mutaciones en las posiciones 74 y/ó 80 en los clones: 212DRD, 17A2, CTL40, G36, GM7, CTL2, 139DRD, 202DRD, 172DRF, CTL7, CTL26 y CTL29. Además, los cambios próximos espacialmente podían provocar efectos contrapuestos dependiendo de cada clon. Así, las sustituciones en Y74 y N77 causan un tipo de efecto en los CTL 17A2, 40, GM7, 2 y 26, mientras que ejercen el contrario en los CTL 139DRD, 202DRD, 7 y 29.

#### **4.4.7. Reactividad heteroclítica**

El clon 172DRF, a pesar de haber sido generado por estimulación con una LCL B\*2705+, lisaba con mayor eficiencia a los transfectantes que expresaban el subtipo B\*2702 y los mutantes Y74, N77 o S77. También, se observó este efecto heteroclítico en el clon 202DRD, puesto que reconoce mejor a B\*2702 que al subtipo estimulador. En este caso, el efecto se aprecia claramente cuando dicho subtipo está expresado en la superficie de una LCL (Tabla VI), pero es menos claro en los transfectantes.

#### **4.4.8. Asimetría en la localización de las posiciones que afectan al reconocimiento**

La reactividad de la mayoría de los clones se alteraba por sustituciones distribuidas en extremos opuestos del sitio de unión del péptido antigénico, pero en algunos casos se observaba una relevancia mayor de los cambios en uno de los extremos (Fig. 46). A esta categoría pertenecían los clones CTL 46, GM7, 7 y 29. No obstante, se diferenciaban en cuanto a las posiciones que tenían un efecto más drástico en su reconocimiento, de forma que existía una contribución mayor del residuo 81 en la reactividad de CTL 46, del 77 en la de GM7 y de la 74 en los CTL 7 y 29. El clon 64.8P se generó por estimulación con el subtipo B\*2704, caracterizándose por reconocer a todos los subtipos de B27, con excepción del B\*2703. Este subtipo presentaba un único cambio en la posición 59. La reactividad de este clon con los mutantes (Fig. 47) sólo se anulaba por el cambio en el residuo 63, espacialmente próximo al 59. Este clon es el único de los estudiados que es capaz de reconocer al mutante E152.



**Figura 47.** Citotoxicidad de los transfectantes por el clon de CTL 64.8P, anti-B\*2704. El % de lisis relativa se determinó como en la fig. 46. El ensayo se realizó por duplicado, siendo el % de lisis específica del transfectante B\*2705+, a la relación E:D de 2:1, de 70 y 64%, respectivamente.

#### 4.4.9. Discusión

Los estudios de la reactividad de CTL alogénicas anti-B27 con los subtipos aportaban información acerca de la diversidad clonal y de algunos de los parámetros estructurales de los determinantes reconocidos por dichos clones. Sin embargo, no permitían determinar como están constituidos los epítomos, ya que cada subtipo difiere del resto en más de un aminoácido. Mediante el análisis de la reactividad de los clones frente a los mutantes se ha podido definir la contribución individual de las posiciones polimórficas en los epítomos reconocidos por CTL y, en algunos casos, ha revelado efectos interactivos entre ellas. Además, este análisis nos ha dado una idea de la gran diversidad y de la localización de dichos epítomos.

Los subtipos y los mutantes estaban expresados en líneas celulares distintas, por lo que en todos los ensayos se analizó, como control, la reactividad de transfectantes que expresaban los subtipos B\*2705 y B\*2702. Los resultados eran reproducibles, aunque la línea HMy2.CIR era más susceptible a la lisis que la LCL LG15, lo que provocó pequeñas discrepancias en algunas ocasiones. Así, los clones CTL40, CTL 46 y 5A2 reconocían ligeramente al subtipo B\*2702 en el transfectante pero no en la LCL. Se obtuvieron resultados comparables a las tres relaciones efector: diana (0,5:1; 1:1 y 2:1) a las que se realizaron los ensayos. En el caso de los clones 102DRF, 212DRD y GM7, en los que el porcentaje de citotoxicidad a la relación 2:1 era bajo, se analizaron relaciones mayores (4:1 y 8:1), pero no se consiguieron valores de citotoxicidad superiores, ni una reactividad adicional con otros mutantes.

El rasgo más destacable de estos estudios es la distinta especificidad que poseen todos los clones con el panel de mutantes. Esto demuestra la gran complejidad de la respuesta alogénica, puesto que implicaría que cada clon reconoce un epítomo distinto. Los estudios realizados en el antígeno HLA-A2 sugieren una variabilidad similar (61,66). La diversidad observada podría ser una consecuencia de la existencia de múltiples receptores clonotípicos, distintos estructuralmente, cuya interacción con el aloantígeno podría estar mediada por diferentes tipos de contactos intermoleculares. La estructura de los genes VB de los TCR de 11 de los 21 CTL analizados es diferente (293), lo que corrobora esta explicación. Alternativamente, la diversidad clonal podría estar ocasionada por el reconocimiento de múltiples péptidos, unidos a la molécula de HLA-B27. Ambas posibilidades no son mutuamente excluyentes ya que es concebible que, en algunos casos, el reconocimiento de HLA-B27 sea independiente de péptidos. Por otra parte, un complejo MHC/péptido determinado podría ser reconocido por

múltiples TCR (294,295).

La complejidad del patrón de reconocimiento de los mutantes y, especialmente, los efectos compensatorios observados, son difícilmente explicables sin un modelo cristalográfico de HLA-B27; sin embargo, demuestran la sutileza de las interrelaciones entre los residuos polimórficos en la modulación del reconocimiento por células T. Los cambios compensatorios indicarían que, frente a determinados clones, dos moléculas pueden estar menos distanciadas antigénicamente con dos sustituciones que con una. Esto podría deberse a una recuperación de la conformación del epítipo al introducir un segundo cambio. Una interpretación alternativa a estos resultados sería la presencia de múltiples péptidos unidos a B27. Así, una sustitución podría modificar la molécula de tal forma que alterase la unión de determinados péptidos, lo que evitaría el reconocimiento por parte de los clones correspondientes. Un cambio de un aminoácido en la secuencia de un péptido es suficiente para evitar su unión a antígenos MHC (154,203). Probablemente, esto es extrapolable a un cambio en el sitio de unión del antígeno. Sin embargo, al introducir varios cambios conjuntamente se podría reconstituir la capacidad de unión de ciertos péptidos. Este tipo de efectos podrían ser los responsables de la reacción cruzada de algunos clones con DR2 y B40\* (B\*4002)(296). Aunque las secuencias de estos antígenos y la de B27 difieren considerablemente, el sitio de unión del péptido de ambos podría poseer algunas características comunes que permitan la unión del mismo péptido, o de uno semejante que sea reconocido por el mismo clon. Destaca el hecho de que los clones con este tipo de reactividad adicional no reconozcan a la mayoría de los mutantes, lo que sugiere que una combinación de cambios distinta destruiría la naturaleza del sitio.

El reconocimiento por parte de ciertos clones parece requerir la presencia simultánea de todas las sustituciones presentes en un determinado subtipo, alterando cualquier otra combinación de estos cambios la configuración del epítipo. Esto explicaría las aparentes contradicciones detectadas entre la reactividad de algunos clones, como CTL 2, con mutantes y subtipos. Sin embargo, puesto que la línea celular en la que se expresan los mutantes y los subtipos es distinta, no se puede descartar que las diferencias observadas se deban a una característica propia de la célula diana, como la presencia de un péptido procedente de una proteína específica o generado por un procesamiento diferencial.

El efecto heteroclítico detectado sugiere un aumento en la afinidad del reconocimiento de algunos TCR como consecuencia de los cambios estructurales ocurridos en HLA-B27. Este

efecto podría ser debido a un mejor acoplamiento, como consecuencia de la mutación, entre el determinante antigénico y la estructura encargada de su reconocimiento, al igual que se ha descrito en el caso de los anticuerpos (148). Otra explicación posible sería que una determinada mutación favoreciera la unión de algún péptido endógeno, de forma que incrementara el número de moléculas presentadoras de dicho péptido en la superficie celular. Esto podría resultar en un aumento de la avidéz del clon por la célula diana, con el consiguiente incremento de su capacidad lítica. En el caso del clon 172 DRF no se puede descartar que el efecto esté originado por diferencias (cuantitativas y/o cualitativas) en un péptido generado por un procesamiento diferencial entre la línea celular HMy y la LCL.

La falta de reconocimiento de los subtipos B\*2704 y B\*2706 por parte de los 20 clones anti-B\*2705 examinados, queda explicada por el hecho de que ninguno de ellos reaccione con el mutante en la posición 152. No obstante, las otras posiciones que varían en estos subtipos, como la 77, deben estar contribuyendo de forma importante en el perfil antigénico específico de estas moléculas. El residuo 152 posee una gran relevancia en otros antígenos HLA, como A3 (71,72) o A2 (61,62,66). La extrema importancia de esta posición podría deberse a su implicación en contactos inter-moleculares críticos, cuya alteración eliminaría el reconocimiento por la mayoría de los clones. Estos contactos podrían establecerse directamente con TCR o un elemento constante presente en los posibles péptidos que interaccionen con B27. En este sentido apunta también la información aportada por un estudio realizado en A2 (61), en el que introduciendo distintos aminoácidos en esta posición comprueban que todas las sustituciones, incluso las más conservativas, tienen efectos substanciales.

Todas las posiciones mutadas son relevantes en el reconocimiento por CTL, aunque el peso individual de cada una de ellas en la constitución de los epítomos reconocidos por los distintos clones es diferente. La transcendencia equivalente que poseen los residuos polimórficos de los subtipos de B27, exceptuando el 152, contrasta con los estudios de HLA-A2 (61,62) en los que se aprecia que algunas posiciones, como la 149, son claramente menos relevantes que otras. La diferencia puede deberse a que la cadena lateral de este residuo no parece estar dirigida hacia el interior del sitio de unión del péptido, a pesar de estar situado en una de las hélices  $\alpha$  que lo componen. La comparación con los modelos tridimensionales sugiere que todos los residuos mutados en B27 estarían orientados hacia este sitio, aunque la disposición de las cadenas laterales podría variar de unos antígenos HLA a otros. Sin embargo, el hecho de que todos

ellos afecten al reconocimiento por CTL, y lo hagan de un modo semejante, apoya que esta sea, realmente, la orientación correcta. El efecto global análogo de todas las sustituciones sugiere que el perfil antigénico específico de cada subtipo de B27 no depende de un residuo concreto, sino de la particular combinación de cambios de cada uno de ellos.

Los datos relativos al efecto diferencial de los dos mutantes generados en posición 77 concuerdan con los obtenidos en un estudio realizado en HLA-A2 (61), tras introducir distintos aminoácidos en varias posiciones de la molécula. Estos resultados, junto con las diferentes alteraciones sufridas por muchos clones al mutar posiciones próximas, revelan la precisión de los requerimientos estereoquímicos de los epítomos reconocidos por CTL. Aunque no se conoce la orientación exacta de las cadenas laterales de los residuos sustituidos, éstos parecen hallarse en el mismo plano de la hélice  $\alpha$ , ya que la distancia entre ellos es aproximadamente equivalente a la de una vuelta de hélice, que comprendería 3,6 residuos, y relacionaría los residuos  $i$  e  $i+3$  ó  $i+4$ . El hecho de que cada una de estas posiciones próximas llegue a ejercer efectos opuestos en los diferentes clones, sugiere que las alteraciones inducidas por una mutación dada son debidas a una interrupción de contactos intermoleculares específicos, más que a una distorsión de la conformación local de la molécula de HLA.

El patrón de reactividad del CTL 64.8P, generado por estimulación con B\*2704, con los subtipos sugiere que el epítomo reconocido por este clon es independiente del extremo de la molécula en el que se encuentran los residuos 77 y 152 (123). Los datos con los mutantes concuerdan con esta interpretación, puesto que el único cambio que ejerce un efecto drástico en su reactividad es el residuo 63, situado en el lado opuesto del sitio.

El hecho de que posiciones situadas en los dos extremos del sitio puedan influir en el reconocimiento por CTL, sugiere que los epítomos reconocidos podrían incluir dicho sitio en su totalidad, lo que concordaría con los modelos hipotéticos de unión del TCR a los antígenos de clase I (147,149,150). Las dimensiones del epítomo serían entonces, al menos similares a las del sitio, esto es, aproximadamente  $25\text{\AA} \times 10\text{\AA}$  (41,43). Estas dimensiones son menores que las descritas para los epítomos reconocidos por anticuerpos que pueden ser hasta de  $750\text{\AA}^2$  (148). Sin embargo, en algunos casos los residuos cruciales de ciertos epítomos no parecen estar distribuidos a lo largo de todo el sitio, sugiriendo la existencia de diversidad topográfica en los epítomos reconocidos por CTL. Así, la simetría propuesta por algunos modelos (147,149,150) no tendría porqué mantenerse siempre, existiendo cierta diversidad en la posición del TCR con

respecto al sitio de unión del péptido en los antígenos HLA de Clase I. Por otra parte, si el alorreconocimiento viniera mediado por la unión de péptidos, se podría mantener la simetría, difiriendo los epítomos en la distribución espacial de los residuos que influyen su unión.

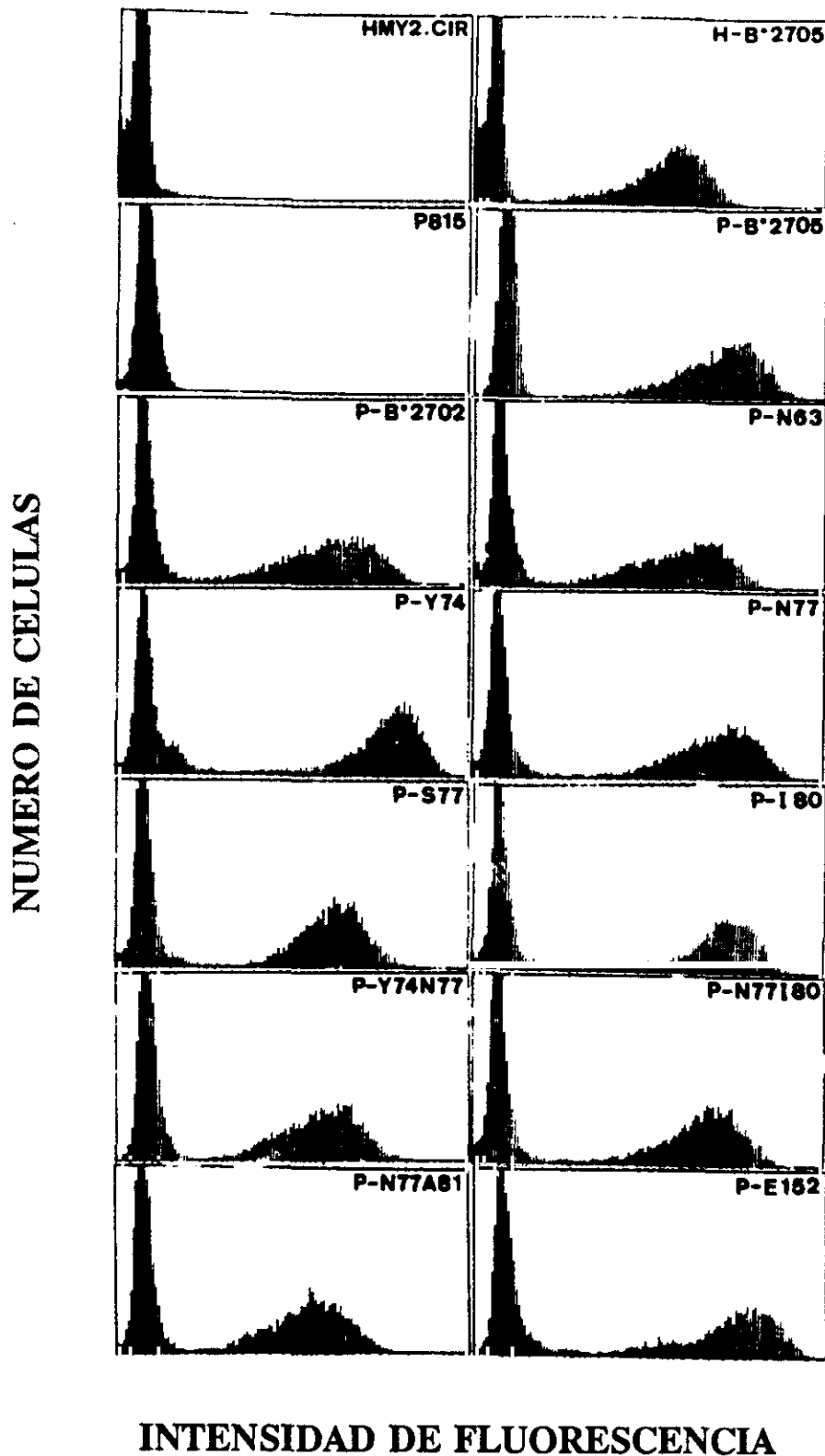
Los efectos descritos anteriormente ilustran la importancia de todas las posiciones estudiadas en el reconocimiento del antígeno HLA-B27 por CTL alógenicos. Además, demuestran que la modulación del reconocimiento por la célula T se lleva a cabo por una compleja interrelación entre cada posición polimórfica y su entorno molecular. Probablemente se podría atribuir la misma importancia a otras muchas posiciones que constituyen el sitio de unión del péptido; sin embargo, por el momento no disponemos de datos para afirmarlo.

#### **4.5. CONSERVACION Y ALTERACION DE LOS EPITOPOS RECONOCIDOS POR CTL ANTI-HLA B27 EN CELULAS MURINAS**

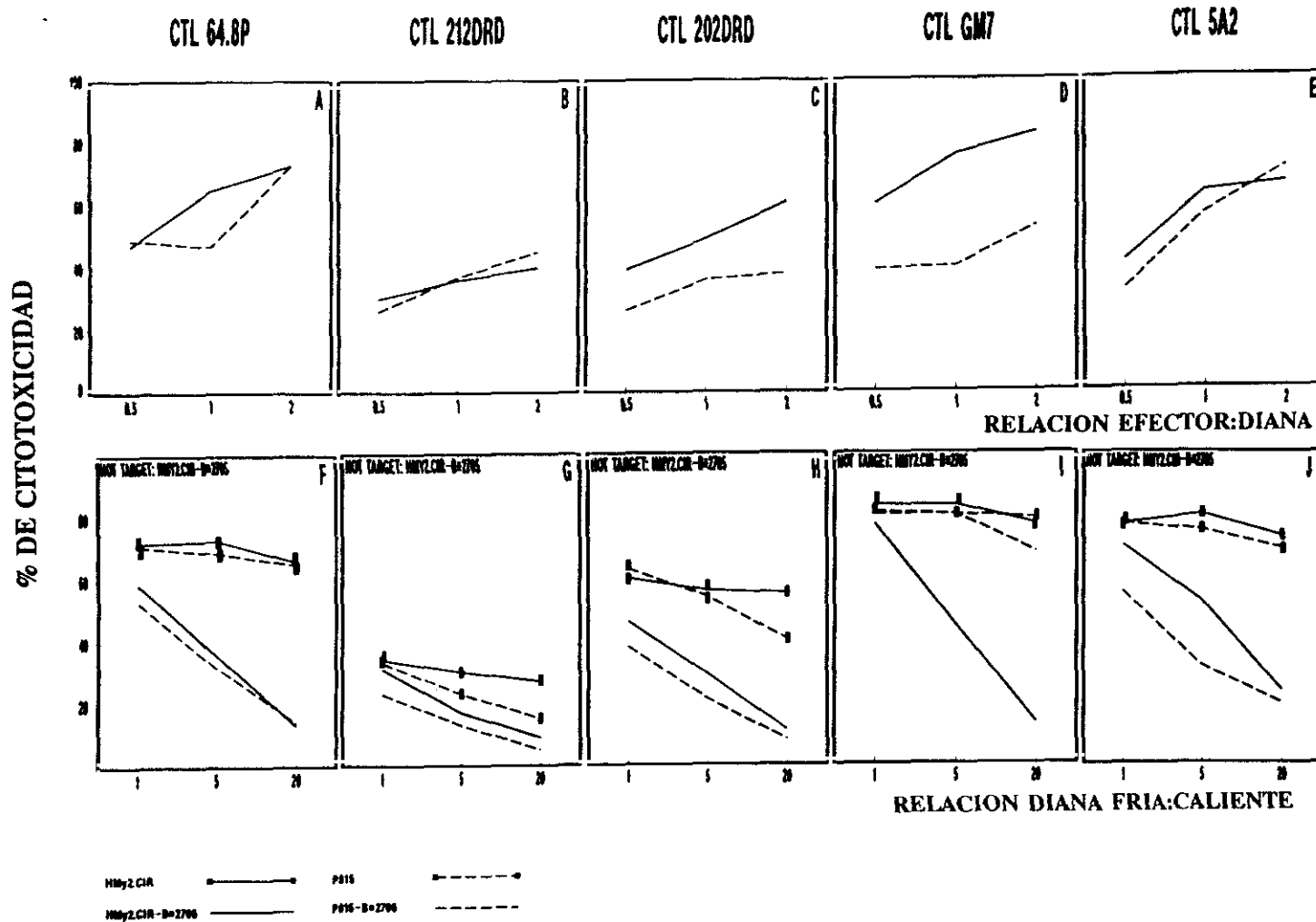
Con el fin de determinar la existencia de alteraciones en los epítomos reconocidos por CTL, tras la expresión de HLA-B27 en células murinas, realizamos un análisis comparativo de la reactividad de 5 clones de CTL, específicos de este antígeno, frente a un panel de mutantes transfectados en células humanas y murinas.

##### **4.5.1. Reconocimiento de HLA-B27 por CTL alorreactivos en células humanas y murinas**

Los mutantes de B27 se transfectaron en la línea humana HMy2CIR y en la murina P815.HTR. En el caso de las células de ratón, se cotransfectó cada uno de los genes mutantes junto con el gen de la  $\beta_2m$  humana. Tras seleccionar poblaciones con un nivel de expresión semejante (Fig.45 y 48), se comparó su reactividad con cinco clones de CTL anti-B27. En primer lugar, se examinó la capacidad lítica de los clones frente a los transfectantes humano y murino que expresaban el subtipo B\*2705 (Fig. 49A-E), observándose que los clones CTL 64.8P, 212DRD y 5A2 presentaban un comportamiento similar frente a ambos, mientras que los clones CTL 202DRD y GM7 lisaban con más eficiencia al humano. Posteriormente se determinó, mediante ensayos de competición con dianas frías, la avidéz relativa de los clones frente a células de las dos especies (Fig. 49F-J). La lisis del transfectante HMy2.CIR-B\*2705 por los CTL 64.8P, 212DRD y CTL 202DRD se afectó de forma similar por la presencia de dianas frías B\*2705+ humanas o de ratón. Este dato indicaba que estos tres clones reconocían a los dos transfectantes con una eficiencia similar, incluso en el caso del clon 202DRD que mostraba una menor citotoxicidad de las células de ratón. Sin embargo, la capacidad lítica del



**Figura 48.** Expresión de las moléculas de B27 mutadas en los transfectantes en la línea murina P815, tras incubación con el Acm ME1. El pico de fluorescencia negativo se midió en cada experimento, por incubación de las células con el segundo anticuerpo fluoresceinado, únicamente. Los paneles superiores representan la fluorescencia de la línea P815 transfectada con el plásmido de resistencia pSV2neo y del transfectante HMy2.CIR-B\*2705, para su comparación. También se muestra la expresión de las células P815 sin transfectar y de los transfectantes B\*2705+ y B\*2702+. Se realizó un análisis similar incubando con un Acm anti- $\beta_2m$  humana (BBM.1) para determinar la expresión de está molécula en los transfectantes murinos. Los picos de fluorescencia eran comparables a los obtendios con el Acm ME1.



**Figura 49.** A-E) Citotoxicidad específica de 5 clones de CTL anti-B27 frente a los transfectantes HMy2.CIR-B\*2705 y P815-B\*2705. Los resultados representan la media de, al menos, tres experimentos independientes. La lisis de las células no transfectada fue inferior al 7% a la relación E:D de 2:1. F-J) Experimentos de competición de la lisis del transfectante HMy2.CIR-B\*2705 con dianas frías, humanas y murinas, que expresaban B\*2705. La relación efector:diana caliente fue de 1:1, representando los resultados la media de, al menos, dos experimentos independientes, con excepción del CTL 202DRD (H) con el que sólo se pudo realizar un experimento. La lisis de las células diana en ausencia de competidoras frías fue: 65% (F), 38% (G), 52% (H), 86% (I) y 66% (J).

clon GM7 frente al transfectante humano no se inhibió por las células murinas, lo que confirmaba el resultado obtenido en citotoxicidad directa. Por el contrario, se observó una inhibición ligeramente superior de la citotoxicidad del clon 5A2 por el transfectante murino que por el humano.

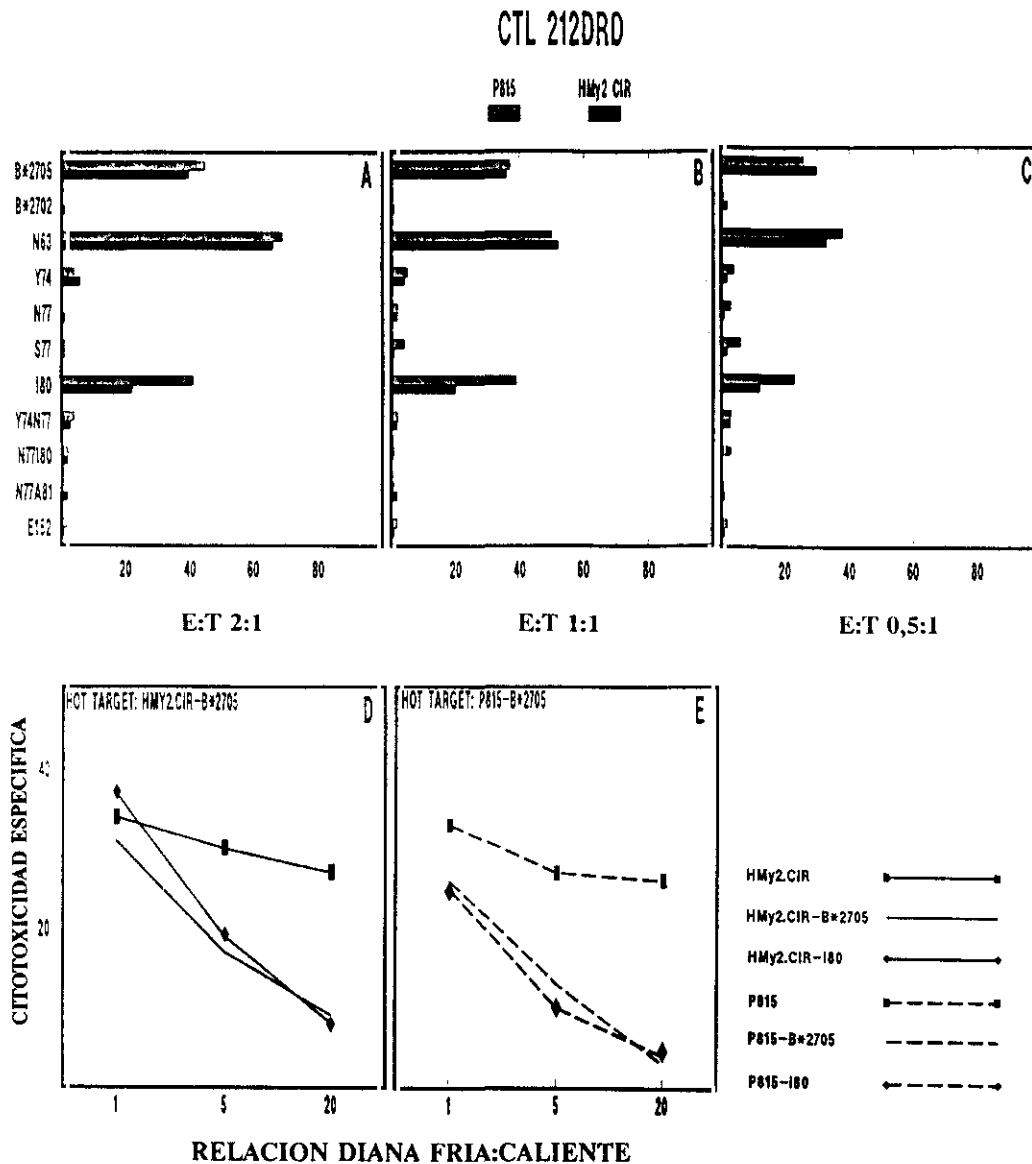
La citotoxicidad de cuatro de los clones frente a los dos tipos de transfectantes se bloqueó por Acm anti-CD8. Sin embargo, la lisis por CTL 5A2 sólo se inhibió por este Acm en el caso de las células murinas.

#### **4.5.2. Conservación de los epítomos reconocidos por CTL aloespecíficos, tras la expresión de HLA-B27 en células murinas**

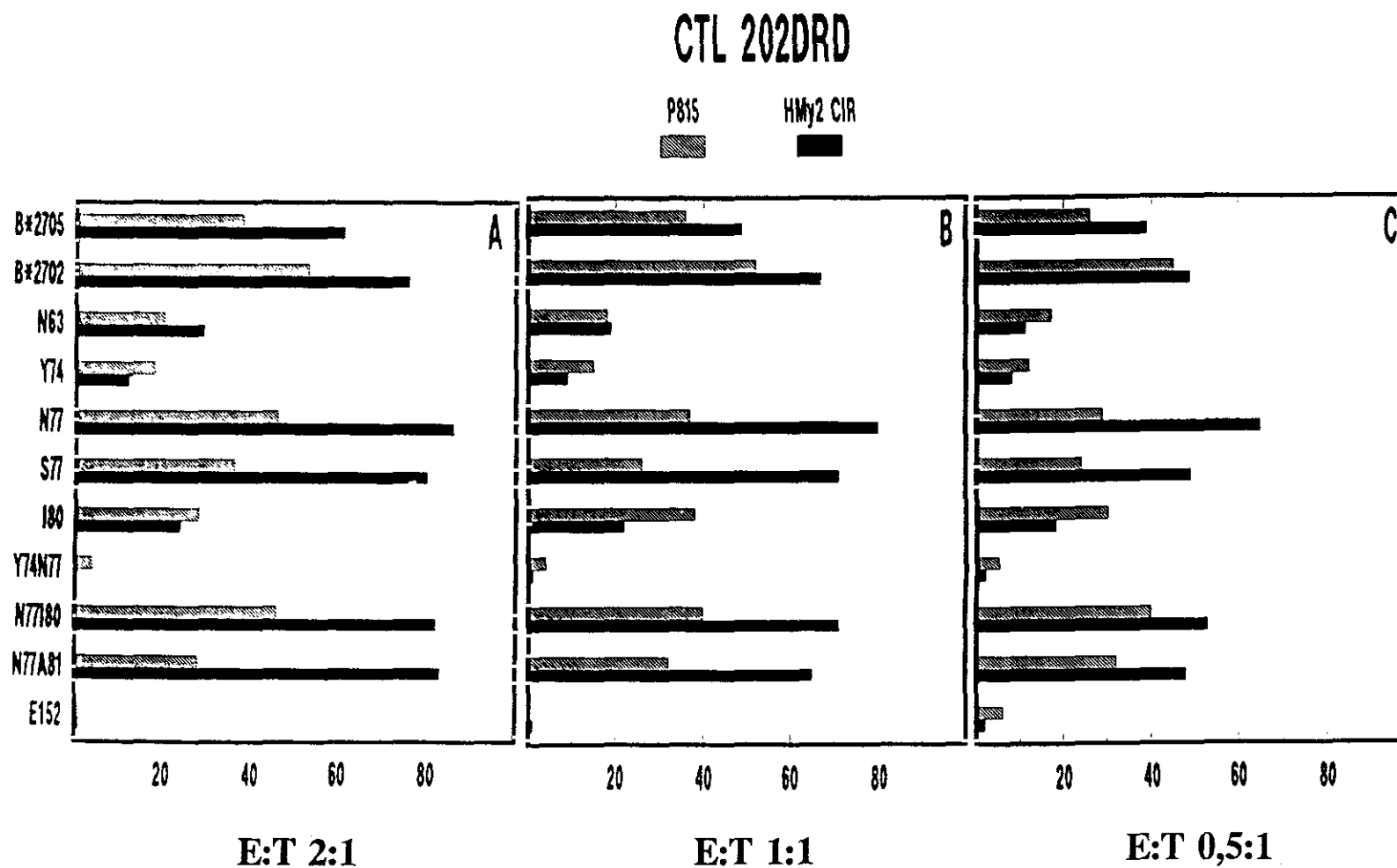
Posteriormente, se realizaron una serie de ensayos en paralelo, comparando el patrón de reactividad de los cinco clones frente a los diferentes mutantes, expresados en células humanas y murinas. La citotoxicidad de CTL 212DRD frente a las dos series de transfectantes fue idéntica, con excepción del mutante I80 (Fig. 50A-C). En este caso, la lisis de I80 era similar a la de B\*2705 en células murinas, mientras que en células humanas la citotoxicidad relativa del mutante, respecto de B\*2705, se reducía en un 50% a las tres relaciones efector:diana analizadas. Sin embargo, en experimentos de competición fría, I80 y B\*2705 tenían una capacidad inhibitoria idéntica independientemente de la línea celular en el que estuvieran expresados (Fig. 50D-E). Esto sugería que, a pesar de las diferencias observadas en citotoxicidad directa, la reactividad del clon no se alteraba significativamente por la expresión del mutante en células de ratón.

CTL 202DRD lisaba con mayor eficiencia a los transfectantes humanos que a los murinos, pero la citotoxicidad relativa de los mutantes era semejante en ambas líneas celulares (Fig. 51A-C). En el caso del mutante I80 se observó una situación similar a la de CTL 212DRD, en cuanto a que la lisis del transfectante humano era menor pero la diferencia no se sustentaba en ensayos de competición.

CTL GM7 tenía una eficiencia lítica superior frente a dianas humanas; sin embargo, el patrón de reactividad se mantenía en los transfectantes de las dos especies, con excepción del mutante Y74 (Fig. 52A-C). Este clon lisaba con la misma eficiencia a Y74 y a B\*2705, cuando estaban expresados en la línea HMy2.CIR, pero no lisaba al mutante en la línea P815. No obstante, los ensayos de competición mostraron una incapacidad del transfectante HMy2.CIR-Y74 para bloquear la citotoxicidad de B\*2705, expresado en la misma línea celular (Fig. 52D



**Figura 50.** A-C) Citotoxicidad de los transfectantes P815 y HMy2.CIR, expresando las distintas moléculas B27, por CTL 212DRD. Los resultados representan medias de, al menos, tres experimentos independientes. La lisis de las líneas P815 y HMy2.CIR sin transfectar fue 4% y 2%, respectivamente, a la relación E:D de 2:1. D y E) Experimentos de competición de la lisis de los transfectantes HMy2.CIR-B\*2705 (D) y P815-B\*2705 (E), con dianas frías que expresaban B\*2705 o el mutante 180 en el mismo tipo celular, o con células sin transfectar. Los ensayos se realizaron a la relación efector:diana caliente de 1:1, representando los resultados medias de dos experimentos independientes. La lisis de las células diana en ausencia de competidor fue de 38% (D) y 47% (E).



**Figura 51.** A-C) Citotoxicidad de los transfectantes P815 y HMy2.CIR, expresando las distintas moléculas B27, por CTL 202DRD. Los resultados representan medias de, al menos, dos experimentos independientes, con excepción de P815-Y74N77 y P815-E152 en que sólo se pudo realizar un experimento. La lisis de las líneas P815 y HMy2.CIR sin transfectar fue 1% y 2%, respectivamente.

y F). Además, dicho transfectante inhibía su propia lisis con menor intensidad que Hmy2.CIR-B\*2705 (Fig. 52E). Estos resultados indicaban un decrecimiento de la avidéz del clon frente al transfectante Y74 en comparación con B\*2705. Esta disminución de la avidéz no era suficiente para alterar la lisis del transfectante humano pero sí la del murino.

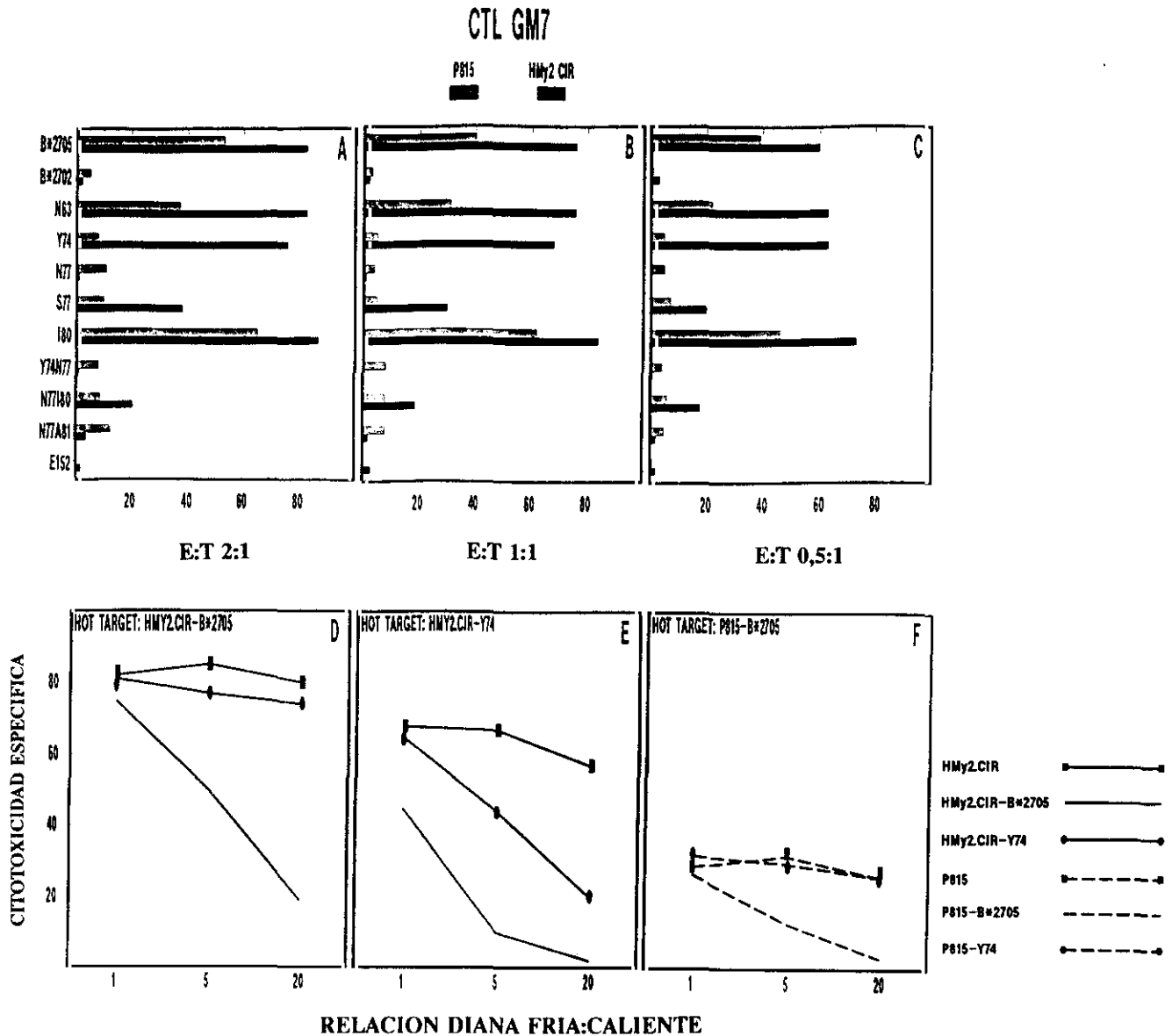
La reactividad de CTL 64.8P frente a las dos series de transfectantes era comparable, salvo en el caso de Y74N77 (Fig. 53A-C). La citotoxicidad de este mutante era similar a la de B\*2705 en células humanas, pero cuando se expresaba en células murinas su lisis se reducía considerablemente. Los experimentos de competición corroboraban estas diferencias (Fig. 53D-F) puesto que en células humanas, el mutante inhibía ligeramente menos que B\*2705 la lisis del transfectate HMy2.CIR-B\*2705 y de la misma forma la de HMy2.CIR-Y74N77 (Fig. 53D y E). Sin embargo, en células murinas la situación era diferente, no observándose inhibición de la citotoxicidad de P815-B\*2705 por el mutante (Fig. 53F). Estos datos sugieren que la avidéz relativa del clon, respecto de B\*2705, frente al mutante Y74N77 es distinta en células humanas y murinas.

Estos resultados son compatibles con que cuatro de los clones exhiban un patrón de reactividad equivalente frente a los transfectantes de ambas especies (ver discusión).

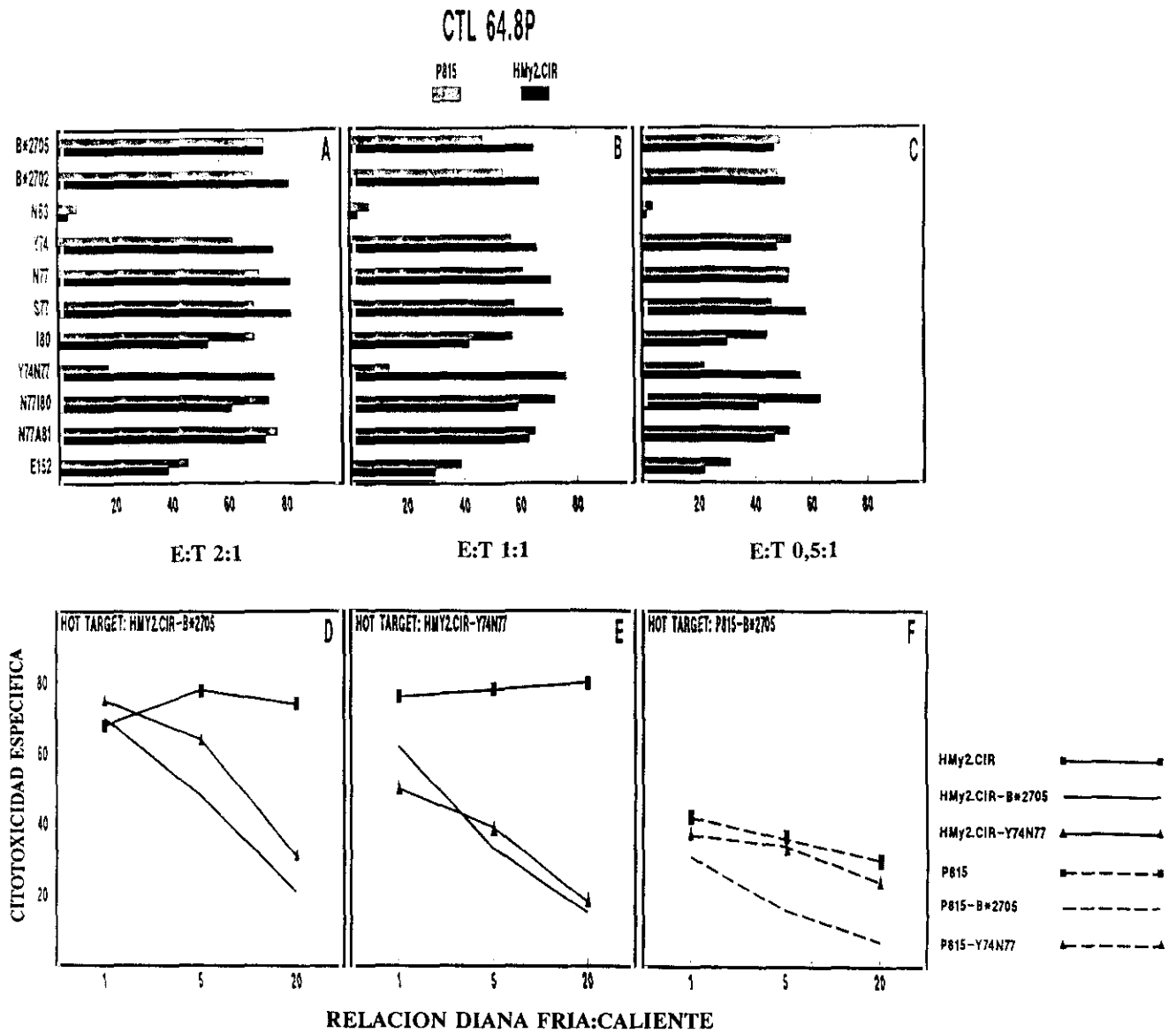
#### **4.5.3. Alteración de la especificidad fina del CTL 5A2 frente a HLA-B27 expresado en células murinas**

La citotoxicidad del CTL 5A2 frente a las dos series de transfectantes seguía tres patrones distintos (Fig. 54): 1) los mutantes Y74N77 y N77I80, transfectados en células humanas, no eran reconocidos por el clon, mientras que cuando se expresaban en células murinas eran reconocidos eficientemente; 2) la lisis relativa, respecto de B\*2705, de los transfectantes humanos N63, Y74, S77, I80 y N77A81 disminuía considerablemente, pero no se alteraba cuando estos mutantes se hallaban en células de ratón; 3) La eficiencia lítica del clon frente a B\*2705, B\*2702, N77 y E152 era similar en células de las dos especies.

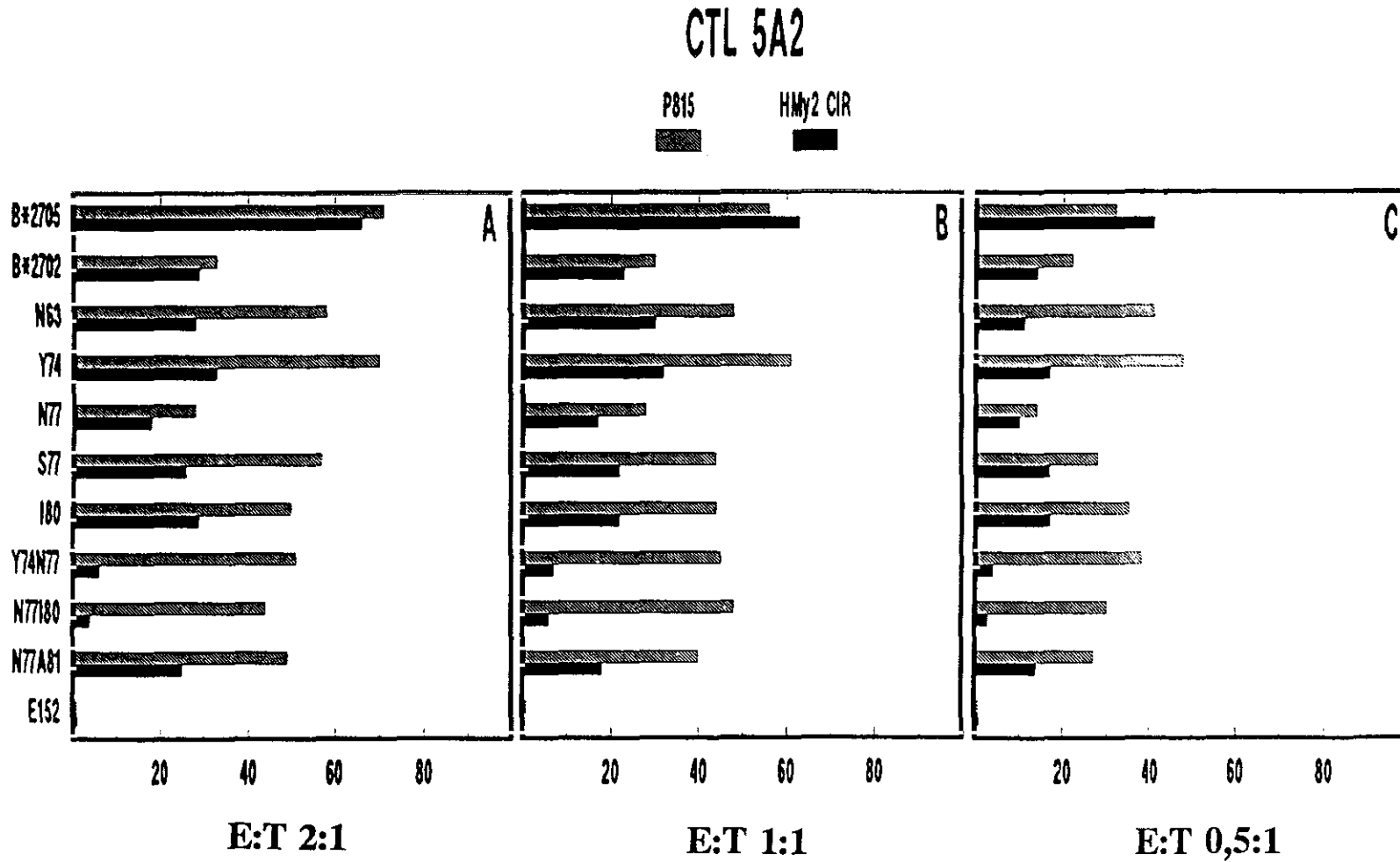
Las diferencias de citotoxicidad del mutante Y74N77 se examinaron en detalle, mediante experimentos de competición con dianas frías (Fig. 55A-F). En el caso de los transfectantes murinos, el mutante inhibía la lisis, tanto de B\*2705 (Fig. 55A) como de sí mismo (Fig. 55B), aunque con menos eficiencia que el transfectante que expresaba B\*2705. Sin embargo, HMy2.CIR-Y74N77 no inhibía la citotoxicidad de HMy2.CIR-B\*2705 (Fig. 55C). Además, el mutante expresado en células humanas no impedía la lisis de los transfectantes murinos B\*2705



**Figura 52.** A-C) Citotoxicidad de los transfectantes P815 y HMy2.CIR, expresando las distintas moléculas B27, por CTL GM7. Los resultados representan medias de, al menos, dos experimentos independientes. La lisis de las líneas P815 y HMy2.CIR sin transfectar fue 6% y 4%, respectivamente. D y E) Experimentos de competición de la lisis de los transfectantes HMy2.CIR-B\*2705 (D), HMy2.CIR-Y74 (E) y P815-B\*2705 (F), con dianas frías que expresaban B\*2705 o el mutante Y74 en el mismo tipo celular, o con células sin transfectar. Los ensayos se realizaron a la relación efector:diana caliente de 1:1, representando los resultados medias de dos experimentos independientes. La lisis de las células diana en ausencia de competidor fue de 83% (D), 70% (E) y 37% (F).



**Figura 53.** A-C) Citotoxicidad de los transfectantes P815 y HMy2.CIR, expresando las distintas moléculas B27, por CTL 64.8P. Los resultados representan medias de, al menos, tres experimentos independientes. La lisis de las líneas P815 y HMy2.CIR sin transfectar fue 5% y 4%, respectivamente. D y E) Experimentos de competición de la lisis de los transfectantes HMy2.CIR-B\*2705 (D), HMy2.CIR-Y74N77 (E) y P815-B\*2705 (F), con dianas frías que expresaban B\*2705 o el mutante Y74N77 en el mismo tipo celular, o con células sin transfectar. Los ensayos se realizaron a la relación efector:diana caliente de 1:1, representando los resultados medias de dos experimentos independientes. La lisis de las células diana en ausencia de competidor fue de 74% (D), 74% (E) y 55% (F).



**Figura 54.** A-C) Citotoxicidad de los transfectantes P815 y HMy2.CIR, expresando las distintas moléculas B27, por CTL 5A2. Los resultados representan medias de, al menos, tres experimentos independientes. La lisis de las líneas P815 y HMy2.CIR sin transfectar fue 3%.

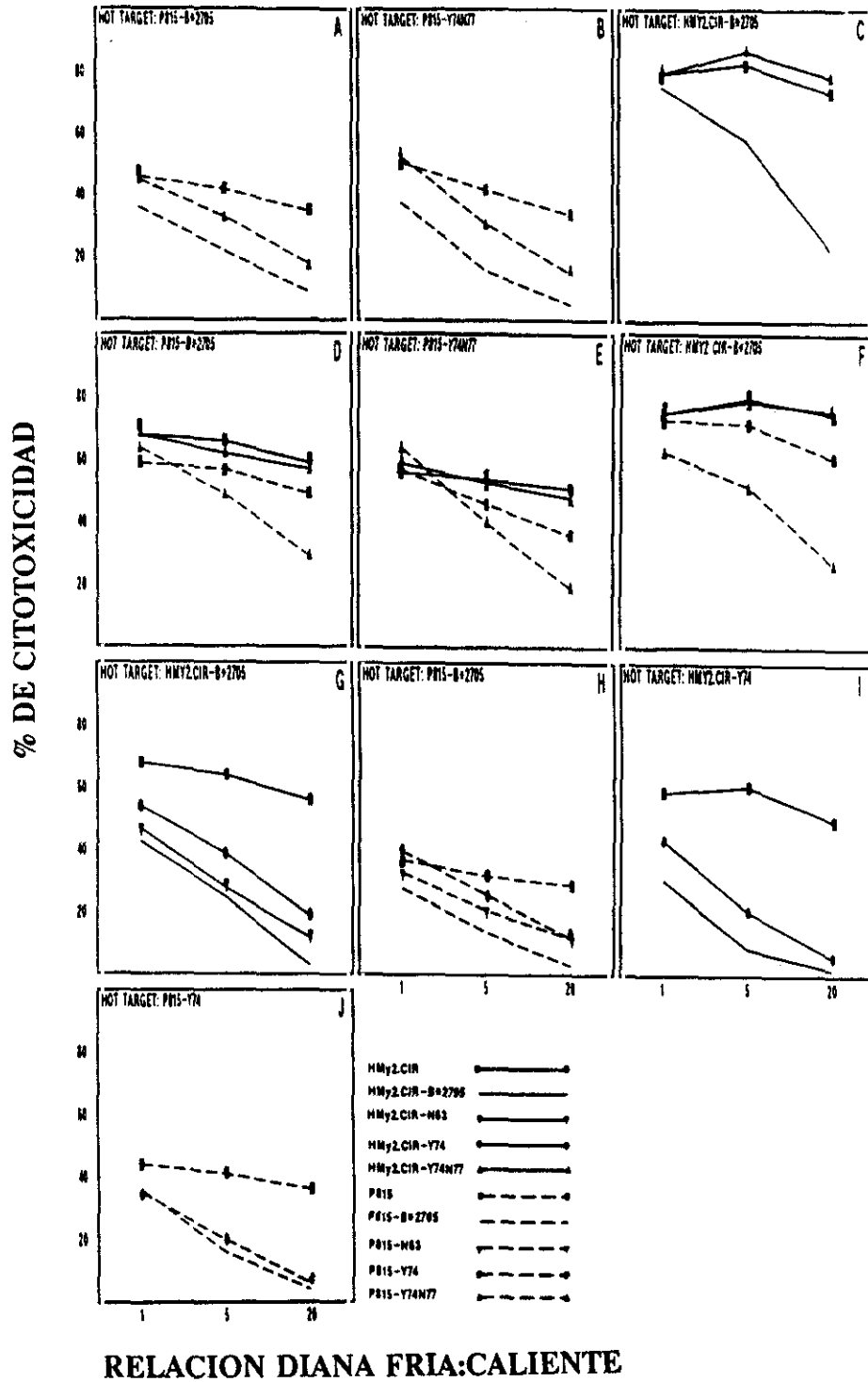
y Y74N77 (Fig 55D y E), mientras que P815-Y74N77 bloqueaba significativamente la citotoxicidad de HMy2.CIR-B\*2705 (Fig. 55F). El mutante N77I80 mostraba un comportamiento idéntico al de Y74N77. Estos resultados indican que estas mutaciones eliminan el reconocimiento de B27 por el clon 5A2 cuando se expresa en células humanas, pero apenas afectan su reconocimiento en células de ratón.

Los mutantes N63 e Y74 se comportaban de forma similar en ensayos de competición, tanto en células humanas como murinas (Fig. 55G-J). Los mutantes inhibían significativamente la citotoxicidad de las dianas calientes que expresaban B\*2705 (Fig. 55G y H), aunque su capacidad inhibitoria, sobre todo la de Y74, era inferior a la de B\*2705. Además, Y74 inhibía algo menos que B\*2705 su propia lisis, sobre todo en células humanas (Fig. 55I y J). Estos resultados indican un decrecimiento de la avidéz del CTL 5A2 frente a estos mutantes, al menos en el caso del Y74. Contrariamente a lo que ocurría en otras ocasiones, la disminución de la avidéz no alteraba la citotoxicidad de los transfectantes murinos, pero resultaba en una menor eficiencia lítica de las humanas.

#### 4.5.4. Discusión

El análisis de la reactividad de mutantes de HLA-B27 con clones de CTL alorreactivos, específicos de este antígeno, mostró la gran diversidad de epítomos reconocidos por dichos CTL. Ello sugería la presencia de una gran variedad de péptidos unidos a HLA-B27. Sólo una fracción de los clones de CTL anti-B27 pueden lisar células P815 transfectadas con el gen que codifica este antígeno. En este estudio se comparó la estructura de los epítomos reconocidos por 5 de estos clones cuando B27 estaba expresado en células humanas o murinas. Para ello se analizó la reactividad de los clones con un panel de mutantes transfectados en células de las dos especies. Los dos tipos de ensayos que se llevaron a cabo, citotoxicidad directa y ensayos de competición fría, nos proporcionaron una información complementaria. El primero depende de la integridad y del nivel de expresión del determinante antigénico correspondiente, así como de la presencia de ligandos para las moléculas de adhesión de la célula T. El segundo nos da una idea de la avidéz relativa de la interacción del clon con las células diana implicadas en la competición.

La reactividad de los clones CTL 212DRD, 202DRD, GM7 y 64.8P con las dos series de transfectantes no difería significativamente, aunque en algunos casos la citotoxicidad de las



**Figura 55.** Experimentos de inhibición con dianas frías de la lisis por CTL 5A2. A-C) Inhibición de la lisis de los transfectantes P815-B\*2705 (A), P815-Y74N77 (B) y HMy2.CIR-B\*2705 (C), con dianas frías que expresaban B\*2705 o el mutante Y74N77 en el mismo tipo celular. D-F) Inhibición de la lisis de los transfectantes especificados en cada panel por el mutante Y74N77 expresado en células humanas y murinas. G-H) Inhibición de la lisis de los transfectantes HMy2.CIR-B\*2705 (G) y P815-B\*2705 (H), con dianas frías que expresaban B\*2705 o los mutantes N63 e Y74 en el mismo tipo celular. I-J) Inhibición de la lisis de HMy2.CIR-Y74 (I) y P815.Y74 (J), con dianas frías que expresaban B\*2705 o el mutante Y74 en el mismo tipo celular. Como control negativo, se incluyó en todos los experimentos la inhibición por dianas frías sin transfectar. Los ensayos se realizaron a la relación efector:diana caliente de 1:1, representando los resultados medias de dos a cuatro experimentos independientes, excepto en I en que sólo se pudo realizar un experimento. La lisis de las células diana en ausencia de competidor fue de 59% (A), 44% (B), 69% (C), 83% (D), 48% (E), 58% (F), 78% (G), 44% (H), 51% (I) y 58% (J).

dianas murinas era inferior. La lisis de un determinado mutante con una eficiencia equivalente era una evidencia de que el efecto provocado por esa mutación en la estructura del epítipo era semejante en los dos tipos celulares.

La disminución de la capacidad lítica de los clones CTL 64.8P y GM7 frente a los transfectantes murinos Y74N77 e Y74, respectivamente, pero no frente a los humanos, podría explicarse por una menor eficiencia en la interacción de las moléculas de adhesión de las dos especies. La ausencia de un ligando de LFA-3 y de los ligandos naturales de LFA-1 humano en las células murinas, provocaría una mayor contribución del TCR y de CD8 a la avidéz de la interacción. De esta forma, un cambio sutil en la afinidad del TCR, inducido por una mutación, podría no tener ningún efecto en la avidéz global en el caso de las células humanas, pero podría afectar significativamente la lisis de las dianas murinas. Esta explicación podría ser válida para explicar la reactividad del CTL 64.8P con el mutante Y74N77, aunque no se puede descartar que este comportamiento refleje un ligero cambio en la especificidad fina de este clon por B27, dependiendo del tipo celular en el que se exprese. Del mismo modo, las discrepancias observadas en la lisis de los transfectantes P815-Y74 y HMy2.CIR-Y74 por el CTL GM7, podrían deberse a diferencias en la contribución relativa del TCR a la avidéz, dependiendo de si el CTL interacciona con células humanas o murinas. El hecho de que este clon lise con menor eficiencia a las dianas murinas en general, apoya esta interpretación. Sin embargo, es sorprendente que la gran disminución en la avidéz inducida por la mutación Y74 (Fig. 52D) no afecte la capacidad lítica del clon hacia el transfectante humano. Una hipótesis para explicar este resultado es que la disminución de la afinidad del CTL GM7 por Y74, aunque es insuficiente para alterar su lisis, podría impedir la activación de LFA-1, inducida por el TCR (227). Hay una heterogeneidad en la sensibilidad de distintos clones de CTL a la inhibición de su lisis por Acm anti-LFA-1 (257). LFA-1 no es imprescindible para la activación del CTL (297), y algunas veces no es crítico para la citotoxicidad. Además, la inducción de LFA-1 observada (227), estaba promovida por Acm anti-CD3, cuya afinidad de unión al complejo TCR/CD3 es superior a la de unión del antígeno específico al TCR. No existe una información muy detallada acerca de la activación de LFA-1 por antígeno específico y de su modulación por diferencias de afinidad. No obstante, el grado de entrecruzamiento del TCR, que en el caso de la inducción por antígeno específico podría estar influido por la afinidad, regula la activación de LFA-1 (227).

Así, el patrón de reactividad del clon GM7 con los mutantes puede explicarse por efectos diferenciales de los cambios de afinidad en la citotoxicidad y en la avidéz global. Aunque las diferencias de avidéz entre células humanas y murinas podrían dar cuenta de la menor eficiencia lítica de este clon hacia B\*2705, cuando se expresa en la línea P815, una explicación alternativa es que el determinante reconocido por el clon, aunque permanezca inalterado, podría expresarse en menor proporción en las células murinas. Ello podría deberse a una menor expresión en las células de ratón del péptido involucrado en el determinante.

La situación con CTL 5A2 era diferente, ya que la eficiencia lítica de este clon frente a las células murinas era generalmente superior que frente a las humanas. En algunos mutantes, como el Y74 y N63, las diferencias observadas eran cuantitativas y podrían explicarse por un efecto más drástico de la mutación cuando la molécula de B27 se expresaba en células humanas. A pesar de la reducida citotoxicidad del clon frente a los transfectantes humanos, estos se comportaban de forma comparable a los murinos en ensayos de competición fría. Ello se debía probablemente a una mayor contribución de las moléculas de adhesión a la avidéz global de la interacción en el caso de las células humanas. Estos resultados podrían implicar un cambio en la especificidad fina del CTL 5A2 frente a HLA-B27, dependiendo del tipo celular en el que se exprese esta molécula. Una interpretación alternativa es que el determinante reconocido por el CTL 5A2 se halle en mayor proporción en las células de ratón. Así, el efecto negativo inducido por la mutación en la afinidad del TCR podría afectar a la lisis en las células humanas, pero en las murinas se compensaría por una mayor expresión del determinante. Esto podría significar que un mayor número de sitios de unión para el TCR incrementaría su avidéz.

Las diferencias en el nivel de expresión del epítipo no serían suficientes para explicar la falta de reactividad de CTL 5A2 con los mutantes Y74N77 y N77I80 cuando están expresados en células humanas. Además, la incapacidad de estos transfectantes humanos para inhibir la citotoxicidad de los transfectantes murinos correspondientes es difícil de explicar por diferencias cuantitativas en la expresión del determinante. Este resultado podría implicar un aumento en la avidéz del TCR frente a la dianas murinas que compensara la contribución de las interacciones CD2/LFA-3 y LFA-1/ICAM-1 entre el CTL y las dianas humanas competidoras.

Otra explicación sería que la falta de reconocimiento del antígeno en la diana humana eliminara el incremento de la avidéz de LFA-1 y CD8 inducida por el TCR (227,241). Así, el comportamiento de CTL 5A2 con los mutantes Y74N77 y N77I80 debe estar reflejando un

cambio en la especificidad fina, lo que implicaría que el determinante antigénico reconocido por el clon en células murinas es estructuralmente distinto del que presentan las células humanas.

Esta alteración en la estructura y en el nivel de expresión del determinante ocurriría como consecuencia de la transfección de HLA-B27 en las células de ratón. Esta interpretación es incompatible con el reconocimiento exclusivo de la molécula HLA-B27 por CTL 5A2 y sugiere la presencia de un péptido estructuralmente distinto asociado con HLA-B27 en células humanas y murinas. Además, el péptido podría expresarse en mayor proporción en la superficie de las células de ratón. Esto podría estar ocasionado por un aumento de la síntesis y/o por un procesamiento diferencial de la proteína de la que deriva el péptido en la célula murina. También, podría deberse a un aumento de la afinidad de unión del péptido a B27. Las diferencias estructurales entre el péptido presente en células humanas y murinas deben ser suficientemente pequeñas para que haya reactividad del CTL con los dos tipos de células. Probablemente, este es el motivo de que sólo se haya observado una eliminación de la reactividad en dos mutantes. No sabemos cuál puede ser este péptido pero podría proceder de cualquier proteína, sintetizada en los dos tipos celulares, que presentara diferencias estructurales como resultado, por ejemplo, de la divergencia filogenética de proteínas homólogas en ambas especies.

La conclusión final a la que conduce este análisis de la especificidad fina de clones de CTL anti-B27 que reconocen transfectantes murinos es que, en la mayoría de los casos, el epítipo aloespecífico no se altera tras la expresión de B27 en células murinas. La disminuida eficiencia lítica observada en algunos casos, como en el CTL GM7, puede ser el resultado de una menor avididad más que de una alteración estructural del epítipo correspondiente. No obstante, en algunos clones, como el CTL 5A2, existen alteraciones en la especificidad fina de reconocimiento del aloantígeno expresado en células murinas, lo que probablemente refleja un cambio en la estructura del epítipo mediado por un péptido. No obstante, no sabemos si la falta de reactividad con los transfectantes murinos, observada en una alta proporción de clones de CTL anti-B27, se debe a alteraciones estructurales de los epítipos o simplemente a una menor avididad de interacción.

## **5.- SUMARIO Y DISCUSION**

## 5. SUMARIO Y DISCUSION

Los resultados obtenidos en esta Tesis, mediante el análisis de la reactividad del antisuero anti-péptido 63-84 y los ensayos de citotoxicidad de CTL alorreactivos anti-B27 con diversos mutantes de este antígeno, resaltan la importancia del segmento 74-81 en las características funcionales de HLA-B27. Todos los subtipos de este antígeno, con excepción de B\*2703, presentan sustituciones en este segmento, variando siempre en la posición 77. La respuesta generada contra el péptido 63-84 se centraría en este residuo principalmente, puesto que ninguno de los subtipos con cambios en esta posición son reconocidos por el antisuero. El residuo 77 también formaría parte del determinante reconocido por el Acm B27M2. Además, otros residuos del segmento 74-81 contribuyen a los determinantes reconocidos por algunos aloantisueros y Acm capaces de distinguir los distintos subtipos. La reactividad del Acm ME1 no se altera por las sustituciones de los subtipos, a pesar de que posiciones próximas al segmento 74-81 están implicadas en el determinante reconocido por este Acm (52,119). Las sustituciones fuera de este segmento serían menos relevantes para la aloespecificidad serológica de HLA-B27. No obstante, el Acm p56.1 no reconoce a los subtipos que varían en la posición 152 y algunos aloantisueros, como el KC-MJA, no reconocen al subtipo B\*2703, con un único cambio en posición 59 (109). Sin embargo, la mayor parte de los antisueros anti-B27 no diferencian a los subtipos, lo que indica que reconocerían determinantes fuera de la región 74-81.

El residuo 77 es de suma importancia para el reconocimiento por CTL, aunque los ensayos con mutantes han mostrado que su contribución individual no sería mayor que la del resto de las posiciones polimórficas de los subtipos. El residuo 152 sería absolutamente crítico, ya que la reactividad de los 20 clones analizados, generados por estimulación con B\*2705, se altera por un cambio individual en esta posición. Por comparación con la estructura tridimensional de los antígenos HLA-A2 y Aw68, todas las sustituciones de los subtipos de B27 se hayan orientadas hacia el sitio de reconocimiento del antígeno (41,42). Nuestros resultados contrastan con los obtenidos en el análisis de mutantes de HLA-A2, en el que no todas las sustituciones individuales que apuntan hacia el interior del sitio ejercen efectos similares (66). Además, la posición 152 tendría una contribución importante en el reconocimiento por CTL, pero su sustitución no sería tan drástica como en el caso de B27 (61,62,66). No obstante, la importancia de residuos en el reconocimiento por CTL podría estar influida en cierta medida por el

conjunto particular de clones estudiados. No se puede descartar que algunas de las características de los clones de CTL anti-B27 fueran diferentes si estos se hubieran obtenido por estimulación de otros respondedores que expresaran un haplotipo HLA completamente distinto. Los estudios en HLA-A2 (61,62,66) y en los mutantes murinos de H-2 (65) han mostrado que, generalmente, los residuos que intervienen en los epítomos serológicos y de CTL son distintos. En HLA-A2 se ha observado una contribución mayor de los residuos orientados hacia el interior del sitio en el reconocimiento por CTL, mientras que los expuestos hacia el solvente participarían en el reconocimiento por anticuerpos. Sin embargo, en HLA-B27 los residuos 74, 77 y 81 no están orientados hacia el exterior y son relevantes, especialmente el 77, tanto para el reconocimiento serológico como para el reconocimiento por CTL. No obstante, no se puede descartar que algunos residuos no participen directamente en los determinantes serológicos, alterando su sustitución la disposición de las cadenas laterales de residuos próximos. La presencia en B\*2705 (y B\*2703) de tres residuos ácidos próximos, 74, 76 y 77, cuya combinación no se encuentra en ningún otro antígeno HLA (50), podría provocar una repulsión de sus cadenas laterales, resultando en una mayor accesibilidad del residuo 77 para el reconocimiento directo por el anticuerpo. Alternativamente, la pérdida de una carga negativa, por sustitución del residuo 77, podría destruir las características estructurales necesarias para el reconocimiento por anticuerpos.

Los resultados obtenidos en el análisis de la reactividad de CTL con mutantes de B27 han mostrado la gran diversidad de epítomos que son reconocidos por CTL alogénicos. Esto, unido a la gran complejidad de dichos epítomos, a la presencia de efectos compensatorios y heteroclíticos y a la orientación de estas posiciones hacia el sitio de unión del antígeno, sugiere que los epítomos reconocidos por CTL involucran una gran variedad de péptidos unidos al aloantígeno. El análisis de los genes V $\beta$  del TCR de 11 de los clones incluidos en nuestros ensayos apoya esta hipótesis, ya que mostró que la mayor parte de la variabilidad se concentraba en las regiones de unión V-D-J (293). Los modelos de reconocimiento del complejo MHC/péptido por el TCR propuestos sugieren que estas regiones de unión estarían implicadas principalmente en la interacción con péptidos antigénicos (147,149,150).

Con el fin de determinar la contribución de péptidos endógenos en los epítomos reconocidos por los CTL alorreactivos anti-B27, analizamos el patrón de reactividad de 5 de estos clones con la serie de mutantes transfectados en células murinas y humanas. Los péptidos endógenos

unidos al aloantígeno podrían proceder de cualquier proteína como consecuencia del metabolismo celular. La mayoría de las proteínas, incluso las que no son polimórficas presentarían cambios estructurales debido a la divergencia filogenética. Así, es esperable que algunos de los péptidos presentados sean distintos. Además, distintas líneas celulares podrían diferir en los mecanismos de procesamiento. La utilización de una serie de moléculas, estrechamente relacionadas, que sólo difieren en una o dos posiciones, constituye un sistema sensible para la detección de cualquier alteración en la unión de un posible péptido. Los resultados obtenidos mostraron el comportamiento diferencial de uno de los clones frente a los dos tipos de transfectantes, sugiriendo fuertemente la presencia de un péptido distinto en ambos. Esto indica que, al menos, algunos de los clones alorreactivos anti-B27 implicarían el reconocimiento de péptidos. Sin embargo, no se detectaron diferencias en la reactividad de 4 de los clones que pudieran interpretarse como un cambio en la especificidad del clon. Esto podría indicar que el péptido implicado en los dos tipos celulares es idéntico, pero también podría deberse a que los epítomos reconocidos por estos clones fueran independientes de un péptido, de forma que el clon reconocería fundamentalmente cambios estructurales en la molécula de B27. No tenemos datos para discernir entre estas dos posibilidades, aunque la primera posibilidad sería más probable, dado que parece necesaria la asociación entre las moléculas de Clase I y péptidos para el ensamblaje correcto, la expresión en la superficie celular y la estabilidad de estos antígenos (187,190). No obstante, se ha descrito que una pequeña proporción de antígenos de Clase I podrían expresarse sin haber unido un péptido, y que estas moléculas "vacías" serían reconocidas en algunas ocasiones por CTL alorreactivos (298). Además, Elliot y Eisen (191) han descrito que la cadena pesada de antígenos de Clase I y la  $\beta_2m$ , separadas por filtración en gel, podrían asociarse sin la presencia de un péptido, siendo reconocidos los complejos resultantes por determinados CTL alogénicos.

La función fisiológica de los antígenos MHC es el reconocimiento restringido y no el alogénico. Los resultados obtenidos del análisis de la reactividad de los clones con mutantes, así como el patrón de reactividad diferencial del CTL 5A2 con células humanas y murinas, sugieren que el reconocimiento alogénico involucraría péptidos unidos a B27, y apoyaría el que el reconocimiento alogénico y el restringido tuvieran una base molecular análoga. El reconocimiento alogénico reflejaría la capacidad de los antígenos MHC para unir péptidos propios, lo que sería de vital importancia en los procesos de selección del repertorio de células

T en el timo, así como en los mecanismos de detección y eliminación de células que expresan proteínas propias modificadas como consecuencia de transformaciones tumorales.

El análisis comparativo de la reactividad de CTL monoclonales anti-B27 con células murinas y humanas indicaba que, entre los clones de especificidad semejante con los subtipos, el factor determinante de la lisis de transfectantes murinos HLA-B27+ era la avidéz de la interacción entre el CTL y la célula diana. Además, había una mayor contribución de CD8 cuando la diana era murina. Esto sugería que la interacción entre CTL y células de ratón sería más dependiente de CD8 y de la afinidad del TCR debido a las barreras entre las moléculas de adhesión de las dos especies. El análisis posterior de la reactividad de los clones 26 y 29 frente a mutantes mostró que, si bien su reactividad con subtipos era similar, poseían una especificidad fina diferente. Esto sugiere que en algunos casos las diferencias de avidéz observadas entre clones de especificidad semejante podrían reflejar cambios en la afinidad intrínseca del receptor por su ligando, quizás ocasionadas por que los clones reconocen péptidos distintos. Así, la reactividad de los clones cuyo TCR tuviera menor afinidad por el ligando se vería más afectada por las posibles diferencias en los péptidos presentados por las células murinas respecto de las humanas. Esta explicación es compatible con los datos existentes en la literatura que muestran que, en condiciones en las que la densidad de MHC, TCR y moléculas de adhesión permanece constante, la susceptibilidad a la inhibición de la citotoxicidad por Acm anti-CD8 sería dependiente de la concentración y de la estructura primaria del péptido presentado. Ello sugiere una mayor contribución de CD8 a la interacción CTL/diana cuando la afinidad del TCR por el complejo MHC/antígeno es baja (240). Gran parte de los clones anti-B27 no reconocen a esta molécula en la superficie de las células murinas. Esto podría deberse a que algunos clones reconocieran péptidos presentes en las células humanas, pero no en las murinas, o a que los péptidos presentados por ambas especies fueran considerablemente distintos. No obstante, no se puede descartar que esta falta de reconocimiento se deba a una interacción menos eficiente entre las moléculas de adhesión de distintas especies, al menos en algunos casos.

Los resultados obtenidos de la caracterización estructural de los subtipos de B27 y de los mutantes de este antígeno han mostrado que cualquier sustitución en las posiciones polimórficas de B27 altera las características funcionales de este antígeno. Esto sugiere que la combinación particular de sustituciones que presenta cada uno de los subtipos podría ser susceptible de selección por representar una ventaja selectiva frente a ciertos patógenos. Los datos existentes

de secuencia de antígenos MHC de distintas especies apoyan un modelo de evolución transespecie (84,90,91). Aunque una gran proporción de antígenos MHC se hayan heredado de especies antecesoras, no es esperable que todas ellas estén sometidas a los mismos patógenos o puedan hacer frente a todos ellos con el mismo grupo de moléculas. La evolución de los antígenos MHC tendría que ser un proceso dinámico que se adaptara constantemente a los continuos cambios de los patógenos. Por tanto, la función de estas moléculas las hace más susceptibles que otras proteínas polimórficas a la acción de mecanismos de selección, lo que podría explicar el polimorfismo especial que presentan. Esto parece apoyado por un predominio de mutaciones de reemplazamiento sobre silenciosas en los dominios  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ , particularmente en el sitio de unión del péptido. El hecho de que un gran número de antígenos MHC se hayan transmitido de una especie a otra podría indicar que estos antígenos poseen una gran versatilidad para unir grupos de péptidos distintos, por lo que seguirían siendo funcionales frente a diferentes patógenos. Alternativamente, podrían unir péptidos procedentes de proteínas cuya tasa de variación sea menor o cuyos cambios sólo afecten parcialmente a los péptidos que son presentados. Sin embargo, algunos antígenos con una capacidad más restringida para unir péptidos distintos podrían dejar de ser funcionales frente a péptidos con variaciones muy drásticas, y podrían ser suplantados por otros más eficaces. Esto haría posible que algunas variantes, presentes en la población en una baja frecuencia, se seleccionaran. Además de la selección ambiental, la acción diferencial de los antígenos MHC sobre la selección del repertorio de células T, también podría constituir una presión selectiva. Así, la selección de un antígeno MHC frente a un patógeno podría deberse a una selección tímica positiva que seleccione células T particulares y/o a un aumento de la capacidad de unión y presentación de péptidos antigénicos. Lawlor et al. (82) sugieren que podría haber selección positiva o negativa sobre alelos y loci MHC particulares, de forma que el MHC sería un sistema dinámico en el que genes, o alelos particulares, son seleccionados o descartados en el curso de la evolución. Probablemente, gran parte del polimorfismo de los antígenos MHC sea antiguo, en cuanto a la existencia de cambios en posiciones concretas, pero no en lo que se refiere a la combinación exacta de sustituciones presentes en cada uno de los alelos modernos (299). En este sentido, el grupo de sustituciones presentes en el antígeno B\*2702, respecto de B\*2705, se encuentra en dos antígenos de chimpancé (90,91), aunque difieren en un gran número de sustituciones en el sitio de unión. Las nuevas sustituciones en el sitio de unión del antígeno

parecen estar sometidas a una intensa selección. Las bajas frecuencias alélicas sugieren que, aunque las nuevas sustituciones pueden entrar rápidamente en la población, sólo en raras ocasiones reemplazarían a los alelos existentes. En cambio, se unirían al gran conjunto de alelos existentes en la población y su frecuencia fluctuaría durante varios millones de años. Durante este tiempo las mutaciones puntuales se combinarían con otras, por mecanismos recombinacionales, y se generarían nuevos alelos susceptibles de selección por patógenos (299). No todos los individuos de una especie están sometidos a las mismas condiciones ambientales. La presencia de patógenos específicos de distintas poblaciones sería una causa de distribución diferencial de determinadas variantes en la población. En nuestro modelo evolutivo de B\*27, hemos considerado a B\*2705 como el origen de los subtipos por ser el más ampliamente distribuido en distintos grupos étnicos, siendo el mayoritario en algunos de ellos. Si fuera un antígeno nuevo, y en ausencia de una presión selectiva dominante, no habría dado tiempo a que se encontrara en una frecuencia tan alta en la población. Los otros subtipos se habrían generado a partir de B\*2705, probablemente después de la especiación, y se mantendrían por representar ventajas en ambientes determinados. No obstante, no se puede excluir que cualquiera de los otros subtipos fuera anterior y que su baja frecuencia se deba a que está desapareciendo de la población. Destaca el caso del subtipo B\*2703, detectado en la población negra, que aunque sólo presenta un cambio en la región codificante, respecto de B\*2705, explicable por una mutación puntual, presenta 15 sustituciones más en los intrones (291). Esto contrasta con las secuencias genómicas de los subtipos B\*2705 y B\*2702 que, a pesar de diferir en tres sustituciones que dan lugar a cambios de aminoácido, no presentan ninguna variación en las regiones no codificantes (31). Esto podría indicar que B\*2703 es un subtipo relativamente antiguo, aunque permanece restringido a una población muy determinada.

El polimorfismo de HLA-B27 altera el reconocimiento por los linfocitos T y podría afectar a la unión de péptidos. La estructura precisa de un aloantígeno determinaría sus propiedades de unión de péptidos y su especificidad de presentación de antígeno. Así, es probable que las características polimórficas de B27 que están conservadas en los subtipos contribuyan a la especificidad antigénica y funcional de esta molécula. Entre estas características destacan:

1.- Los residuos de Lys en posición 70 y de Asn en 97 son únicos en los antígenos HLA-B27.

El primero está localizado en la hélice  $\alpha$  de  $\alpha_1$  y el segundo en una de las láminas B centrales, cercano a las posiciones polimórficas 74 y 116. La estructura precisa de estos 3

últimos residuos podría condicionar la formación de una cavidad local, semejante a la que presenta Aw68 (43).

2.- Los análisis cristalográficos han predicho la existencia de una gran cavidad, situada debajo de la hélice  $\alpha_1$ , en HLA-B27. Tendría en su base Glu<sub>45</sub> y estaría rodeada de Thr<sub>24</sub>, Gly<sub>26</sub>, Val<sub>34</sub> y Cys<sub>67</sub> (43). Aunque cada uno de estos residuos está presente en otros antígenos, su combinación es única en HLA-B27 (50,142) y es común a todos los subtipos. Esta característica podría conferir a HLA-B27 capacidad para establecer contactos específicos con péptidos antigénicos que fueran diferentes de los unidos por otro aloantígeno. Uno de los contactos posible podría tener lugar a través de un enlace covalente con el grupo SH libre de la Cys<sub>67</sub> (46). Esta cavidad está localizada en el extremo del sitio de unión del antígeno opuesto a la región en la que se concentran la mayoría de las posiciones polimórficas en HLA-B27.

No se ha detectado correlación alguna entre ninguno de los subtipos mayoritarios y la susceptibilidad a la espondilitis anquilosante (141). Esto hace probable que la susceptibilidad sea debida a alguna característica común a todos los subtipos de B27. La especial combinación de residuos de la cavidad que incluye la posición 45, y su probable influencia en la unión de péptidos, podría ser la característica determinante de la susceptibilidad a la enfermedad (142).

## **6.- CONCLUSIONES**

## 6. CONCLUSIONES

- 1.- El antisuero generado por inmunización con el péptido 63-84, derivado de B\*2705, era capaz de reconocer a la molécula de HLA-B27 nativa, expresada en la superficie celular. Además, era aloespecífico, ya que no reconocía a otros antígenos HLA y podía discriminar entre los distintos subtipos de B27. Estos resultados proporcionan una evidencia directa de la contribución de la región 63-84 en la especificidad aloantigénica de HLA-B27.
- 2.- B\*2701 difiere de B\*2705 en tres residuos: 74, 77 y 81 que corresponden a sustituciones de Asp por Tyr, Asp por Asn y Leu por Ala, respectivamente. B\*2703 presenta un único residuo de diferencia en la posición 59, en el que Tyr ha sido reemplazada por His. La posición 59 es invariante en todos los antígenos MHC secuenciados hasta el momento. Las posiciones en las que varían estos subtipos están localizadas en la hélice  $\alpha$  del dominio  $\alpha_1$  y apuntan hacia el sitio de reconocimiento del antígeno. Esta situación explica su reconocimiento diferencial por CTL alorreactivos y sugiere que podrían diferir en su capacidad presentadora de péptidos.
- 3.- El patrón de sustituciones de B\*2701, agrupadas en un segmento corto de la molécula, sugiere que este subtipo se ha podido generar a partir de B\*2705 en una sola etapa mediante conversión génica.
- 4.- La sustitución del subtipo B\*2703 se explica por una mutación puntual, lo que sugiere la contribución de múltiples mecanismos en la generación del polimorfismo del antígeno HLA-B27, aunque la conversión génica sea el que haya jugado un papel preponderante.
- 5.- La estructura de los subtipos de B27 y su distribución étnica diferencial sugieren que el polimorfismo de HLA-B27 se ha generado con posterioridad a la diversificación de los grandes grupos étnicos.
- 6.- El análisis de la reactividad de CTL monoclonales específicos de B27 con células murinas transfectadas con B\*2705 mostró que, entre clones con especificidad similar frente a los

subtipos, la capacidad para lisar al transfectante murino dependía de la avidéz del clon por la célula diana.

- 7.- La contribución de CD8 a la lisis de CTL humanos es mayor para células diana murinas que humanas. El mayor requerimiento de esta molécula, en el caso de las dianas murinas, se debería a que compensaría la ineficiencia de otras interacciones entre moléculas de adhesión heterólogas.
- 8.- El análisis de la reactividad de 21 clones de CTL anti-B27 con mutantes de este antígeno mostró la gran diversidad de los epítomos reconocidos por estos clones, sugiriendo que dichos epítomos podrían implicar la presencia de múltiples péptidos unidos a B27.
- 9.- Las mutaciones individuales inducen efectos complejos en los múltiples epítomos reconocidos por los CTL específicos de B27, lo que muestra la precisión de sus requerimientos estereoquímicos.
- 10.- Todas las sustituciones individuales son relevantes, alterando cada una de ellas la reactividad de una gran proporción de clones. Cada mutación influía en un grupo diferente de clones, aunque el número global de clones que se afectaban por la mayoría de los cambios era similar. Esto indica que el perfil antigénico de un subtipo está determinado por el conjunto de las sustituciones que posee y no por una de ellas en particular.
- 11.- El cambio en el residuo 152 eliminaba la reactividad de los 20 clones anti-B\*2705. El drástico efecto provocado por esta mutación explica las grandes diferencias en el comportamiento frente a CTL que presentan los subtipos B\*2704 y B\*2706, con un cambio en este residuo, respecto de B\*2705.
- 12.- La relevancia de todas las posiciones mutadas muestra la gran importancia del polimorfismo de los subtipos de HLA-B27 en el reconocimiento por células T. Los subtipos son alelos funcionalmente diferentes.

- 13.- El análisis de la reactividad de cinco clones de CTL anti-B27 con una serie de mutantes, transfectados en células murinas y humanas, mostró que los epítomos reconocidos por cuatro de los clones permanecen inalterados tras la expresión de B27 en células murinas. Ello indica que dichos epítomos son independientes de un péptido o, alternativamente, la presencia de un péptido idéntico en las dos líneas celulares.
  
- 14.- Uno de los clones reconoce a dos de los mutantes cuando están expresados en células murinas, pero no reacciona con ellos en células humanas. Esto probablemente refleja la presencia de un péptido distinto, si bien estructuralmente relacionado, en los dos tipos celulares. El aumento de la eficiencia lítica que presenta este clon frente a la mayoría de los transfectantes murinos sugiere un incremento de la expresión del péptido en las células murinas.

## **7.- BIBLIOGRAFIA**

## 7. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Gorer, P.A. The genetic and antigenic basis of tumour transplantation. *J. Pathol. Bacteriol.* 44, 691-697 (1937).
- 2.- Smell, G.D., Dausset, J. y Nathenson, S. *Histocompatibility*. New York, Academic Press (1976).
- 3.- Mason, D.W. y Morris, P.J. Effector mechanisms in allograft rejection. *Ann. Rev. Immunol.* 4, 119-146 (1986).
- 4.- Grey, H.M., Kubo, R.T., Colon, S.M., Poulik, M.D., Cresswell, P., Springer, T.A., Turner, M. y Strominger, J.L. The small subunit of HL-A antigens is  $\beta_2$ -microglobulin. *J. Exp. Med.* 138, 1608-1612 (1973).
- 5.- Silver, J. y Hood, L. Detergent-solubilized H-2 alloantigen is associated with a small molecular weight polypeptide. *Nature* 249, 764-765 (1974).
- 6.- Orr, H.T., López de Castro, J.A., Lancet, D. y Strominger, J.L. Complete amino acid sequence of a papain-solubilized human histocompatibility antigen, HLA-B7. 2. Sequence determination and search for homologies. *Biochemistry* 18, 5711-5720 (1979).
- 7.- Parham, P., Alpert, B.N., Orr, H.T. y Strominger, J.L. Carbohydrate moiety of HLA antigens. Antigenic properties and amino acid sequences around the site of glycosylation. *J. Biol. Chem.* 252, 7555-7567 (1977).
- 8.- Kimball, E.S., Maloy, W.L. y Coligan, J.E. Evidence of three carbohydrate prosthetic groups on mouse histocompatibility antigens H-2K<sup>d</sup> y H-2D<sup>b</sup>. *Mol. Immunol.* 18, 677-680 (1981).
- 9.- Ferguson, W.S., Terhorst, C.T., Robb, R.J. y Strominger, J.L. Localization of the disulfide bridges of human histocompatibility antigens. *Mol. Immunol.* 16, 23-28 (1979).
- 10.- Robb, R.J., Terhorst, C. y Strominger, J.L. Sequence of the COOH-terminal hydrophilic region of histocompatibility antigens HLA-A2 and HLA-B7. *J. Biol. Chem.* 253, 5319-5324 (1978).
- 11.- Pober, J.S., Guild, B.C. y Strominger, J.L. Phosphorylation "in vivo" and "in vitro" of human histocompatibility antigens (HLA-A and HLA-B) in the carboxy-terminal intracellular domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 6002-6006 (1978).
- 12.- Guild, B.C. y Strominger, J.L. HLA-A2 antigen phosphorylation "in vitro" by cyclic AMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 259, 13504-13510 (1984).
- 13.- Pober, J.S., Guild, B.C., Strominger, J.L., 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". *Biochemistry* 20, 5625-5633 (1981).
- 14.- Vega, M.A. y Strominger, J.L. Constitutive endocytosis of HLA class I antigens requires a specific portion of the intracytoplasmic tail that shares structural features with other endocytosed molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 2688-2692 (1989).
- 15.- Peterson, P.A., Cunningham, B.A., Berggard, I. y Edelman, G.M.  $\beta_2$ -microglobulin, a free immunoglobulin domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69, 1697-1701 (1972).
- 16.- Becker, J.W. y Reeke, G.N. Three-dimensional structure of  $\beta_2$ -microglobulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 4225-4229 (1985).

- 17.- Rosa, F., Berissi, H., Weissenbach, J., Maroteaux, L., Fellous, M. and Revel, M. The  $\beta_2$ -microglobulin mRNA in human Daudi cells has a mutated initiation codon but is still inducible by interferon. *EMBO J.* 2, 239-243 (1983).
- 18.- Steinmetz, M. y Hood, L. Genes of the major histocompatibility complex in mouse and man. *Science* 222, 727-733 (1983).
- 19.- Koller, B.H., Geraghty, D.E., DeMars, R., Duvick, L., Rich, S.S. y Orr, H.T. Chromosomal organization of the human major histocompatibility complex class I gene family. *J. Exp. Med.* 169, 469-480 (1989).
- 20.- Robinson, P.J. Structure and expression of polypeptides encoded in the mouse Qa region. *Immunol. Res.* 6, 46-56 (1987).
- 21.- Giles, R.C. y Capra, J.D. Structure, function and genetics of human class II molecules. *Adv. Immunol.* 37, 2-71 (1985).
- 22.- Kauffman, J.F., Auffray, C., Korman, A.J., Shackelford, A., Strominger, J. The class II molecules of the human and murine MHC. *Cell* 36, 1-6 (1984).
- 23.- Dunham, I., Sargent, C.A., Trowsdale, J. y Campbell, R.D. Molecular map of the human major histocompatibility complex by pulsed field gel electrophoresis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 7237-7241 (1987).
- 24.- Carrol, M.C., Katzman, P., Alicot, E.M., Koller, B.H., Geraghty, D.E., Orr, H.T., Strominger, J.L. y Spies, T. Linkage map of the human major histocompatibility complex including the tumor necrosis factor genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 8535-8539 (1987).
- 25.- Klein, J. *Natural History of the Major Histocompatibility Complex*. John Wiley & Sons (1986).
- 26.- Sargent, C.A., Dunham, I., Trowsdale, J y Campbell, R.D. Human major histocompatibility complex contains genes for the major heat shock protein HSP70. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 1968-1972 ( 1989).
- 27.- Spies, T., Bresnahan, M y Strominger, J.L. Human major histocompatibility complex contains a minimum of 19 genes between the complement cluster and HLA-B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 8955-8958 (1989).
- 28.- Malissen, M., Malissen, B. y Jordan, B.R. Exon/intron organization and complete nucleotide sequence of an HLA gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 893-897 (1982).
- 29.- Srivastava, R., Duceman, B.W., Biro, P.A., Sood, A.K. y Weissman, S.M. Molecular organization of the class I genes of human major histocompatibility complex. *Immunol. Rev.* 84, 93-121 (1985).
- 30.- Breathnack, R. y Chambon, P. Organization and expresion of eukaryotic split genes coding for proteins. *Ann. Rev. Biochem.* 50, 349-383 (1981).
- 31.- Seemann, G.H.A., Rein, R.S., Brown, C.S. y Ploegh, H.L. Gene conversion-like mechanisms may generate polymorphism in human class I genes. *EMBO J.* 5, 547-552 (1986).
- 32.- Ways, J.P., Coppin, H.L. y Parham, P. The complete primary structure of HLA-Bw58. *J. Biol. Chem.* 260, 11924-11933 (1985).
- 33.- Corden, J., Wasylyk, B., Buchwalder, A., Sassone-Corsi, P., Kedinger, C. y Chambon, P. Promoters sequences of eukaryotic protein coding genes. *Science* 209, 1406-1414 (1980).

- 34.- Orr, H.T. HLA class I gene family: characterization of genes encoding non-HLA-A,B,C proteins. *Immunobiology of HLA* vol. II, 33-40. Springer-Verlag, New York, 1989.
- 35.- Sugita, K., Miyazaki, J., Appella E. y Ozato, K. Interferon increase transcription of a major histocompatibility class I gene via a 5' interferon consensus sequence. *Mol. Cell. Biol.* 7, 2625-2630 (1987).
- 36.- Kimura, A., Israel A., Le Bail, O. y Kourilsky, P. Detailed analysis of the mouse H-2K<sup>b</sup> promoter: enhancer-like sequences and their role in the regulation of class I gene expression. *Cell* 44, 261-272 (1986).
- 37.- Miyazaki, J., Appella, E. y Ozato, K. Negative regulation of the major histocompatibility class I gene in undifferentiated embryonal carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 9537-9541 (1986).
- 38.- Zachow, K.R. y Orr, H.T. Regulation of HLA class I transcription in T cells. *J. Immunol.* 143, 3385-3389 (1989).
- 39.- Korber, B., Mermod, N., Hood, L. y Stroynowski, I. Regulation of gene expression by interferons: control of H-2 promoter responses. *Science* 239, 1302-1306 (1988).
- 40.- Shirayoshi, Y., Miyazaki, J., Burke, P.A., Hamada, K., Appella, E. y Ozato, K. Binding of multiple nuclear factors to the 5' upstream regulatory element of the murine major histocompatibility class I gene. *Mol. Cell. Biol.* 7, 4542-4548 (1987).
- 41.- Bjorkman, P.J., Saper, M.A., Samraoui, B. Bennett, W.S., Strominger, J.L. y Wiley D.C. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 329, 506-512 (1987).
- 42.- Bjorkman, P.J., Saper, M.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, 512-518 (1987).
- 43.- Garret, T.P.J., Saper, M.A., Bjorkman, P.J., Strominger, J.L. y Wiley D.C. Specificity pockets for the side chains of peptide antigens in HLA-Aw68. *Nature* 342, 692-696 (1989).
- 44.- Brown J.H., 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, 845-850 (1988).
- 45.- Bodmer, W.F., Albert, E., Bodmer, J.G., Dupont, B., Mach, B., Mayr, W.R., Sasazuki, T., Schreuder, G.M.Th., Svejgaard, A., Terasaki, P.I. Nomenclature for factors of the HLA system. *Immunobiology of HLA. Vol. I: Histocompatibility Testing* ed. B. Dupont, 72-79. Springer-Verlag, New York, 1987.
- 46.- Ezquerra, A., Bragado, R., Vega, M.A., Strominger, J.L., Woody, J. y López de Castro, J.A. Primary structure of papain-solubilized human histocompatibility antigen HLA-B27. *Biochemistry* 24, 1733-1741 (1985).
- 47.- Orr, H.T., López de Castro, J.A., Parham, P., Ploegh, H.L. y Strominger, J.L. Comparison of amino acid sequences of two human histocompatibility antigens, HLA-A2 and HLA-B7: location of putative alloantigenic sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4395-4399 (1979).
- 48.- López de Castro, J.A., Strominger, J.L., Strong, D.M. y Orr, H.T. Structure of crossreactive human histocompatibility antigens HLA-A28 and HLA-A2: possible implications for the generation of HLA polymorphism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 3813-3817 (1982).
- 49.- López de Castro, J.A., Bragado, R., Strong, D.M. y Strominger, J.L. Primary structure of

- papain-solubilized human histocompatibility antigen HLA-B40 (-Bw60). An outline of alloantigenic determinants. *Biochemistry* 22, 3961-3969 (1983).
- 50.- Bjorkman, P.J. y Parham, P. Structure, function, and diversity of class I major histocompatibility complex molecules. *Ann. Rev. Biochem.* 59, 253-288 (1990).
  - 51.- López de Castro, J.A. HLA-B27 and HLA-A2 subtypes: structure, evolution and function. *Immunology Today* 10, 239-246 (1989).
  - 52.- Parham, P., Lawlor, D.A., Sater, R.D., Lomen, C.F., Bjorkman, P.J. y Ennis, P.D. HLA-A,B,C: Patterns of polymorphism in peptide-binding proteins. En: *Immunobiology of HLA*, vol. II, 10-32. Springer Verlag, New York, 1989.
  - 53.- Berzofsky, J.A. Intrinsic and extrinsic factors in protein antigenic structure. *Science* 229, 932-940 (1985).
  - 54.- Chersi, A., Schulz, G. y Houghten, R.A. Immunologic and functional characterization of anti-HLA-DR rabbit antibodies induced by synthetic peptides. *Mol. Immunol.* 21, 847-852 (1984).
  - 55.- Church, W.R., Walker, L.E., Houghten, R.A. y Reisfeld, R.A. Anti-HLA antibodies of predetermined specificity: A chemically synthesized peptide induces antibodies specific for HLA-A, B heavy chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 255-258 (1983).
  - 56.- Walker, L.E., Ketler, T.A., Houghten, R.A., Schulz, G., Chersi, A. y Reisfeld, R.A. Human major histocompatibility complex class I antigens: Residues 61-83 of the HLA-B7 heavy chain specify an allereactive site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 539-542 (1985).
  - 57.- Le Guern, A., Wetterskog, D., Marche, P.N. y Kindt, T.J. A monoclonal antibody directed against a synthetic peptide reacts with a cell surface rabbit class I MHC molecule. *Mol. Immunol.* 24, 455-461 (1987).
  - 58.- Bouillot, M., Choppin, J. y Levy J.P. Definition of epitopes on HLA class I molecules by polyclonal anti-peptide sera. *Immunogenetics* 32, 68-71 (1990).
  - 59.- Choppin, J., Metzger, J.J., Bouillot, M., Briand, J.P., Connan, F., Van Regenmortel, M.H.V. y Levy, J.P. Recognition of HLA class I molecules by antisera directed to synthetic peptides corresponding to different regions of the HLA-B7 heavy chain. *J. Immunol.* 136, 1738-1744 (1986).
  - 60.- Santos-Aguado, J., Barbosa, J.A., Biro, P.A. y Strominger, J.L. Molecular characterization of serologic recognition sites in the human HLA-A2 molecule. *J. Immunol.* 141, 2811-2818 (1988).
  - 61.- Hogan, K.T., Clayberger, C., Bernhard, E.J., Walk, S.F., Ridge, J.P., Parham, P., Krensky, A.M. y Engelhard, V.H. A panel of unique HLA-A2 mutant molecules define epitopes recognized by HLA-A2-specific antibodies and cytotoxic T lymphocytes. *J. Immunol.* 142, 2097-2104 (1989).
  - 62.- Hogan, K.T., Clayberger, C., Bernhard, E.J., Walk, S.F., Ridge, J.P., Parham, P., Krensky, A.M. y Engelhard, V.H. Identification by site-directed mutagenesis of amino acid residues contributing to serologic and CTL-defined epitope differences between HLA-A2.1 y HLA-A2.3. *J. Immunol.* 141, 2519-2525 (1988).
  - 63.- Sire, J., Chimini, G., Boretto, J., Toubert, A., Kahn-Perles, B., Layet, C., Sodoyer, R., Lemonnier, F. y Jordan, B. Hybrid genes between HLA-A2 and HLA-A3 polymorphic antigenic determinants. *J. Immunol.* 140, 2422-2430 (1988).

- 64.- Toubert, A., Raffoux, C., Boretto, J., Sire, J., Sodoyer, R., Thurau, S.R., Amor, B., Colombani, J., Lemonnier, F.A. y Jordan, B.R. Epitope mapping of HLA-B27 y HLA-B7 antigens by using intradomain recombinants. *J. Immunol.* 141, 2503-2509 (1988).
- 65.- Ajitkumar, P., Geier, S.S., Kesari, K.V., Borriello, F., Nakagawa, M. Bluestone, J.A., Saper, M.A., Wiley, D.C. y Nathenson S.G. Evidence that multiple residues on both the  $\alpha$ -helices of the class I MHC molecule are simultaneously recognized by the T cell receptor. *Cell* 54, 47-56 (1988).
- 66.- Santos-Aguado, J., Crimmins, M.A.V., Mentzer, S.J., Burakoff, S.J. y Strominger, J.L. Alloreactivity studied with mutants of HLA-A2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 8936-8940 (1989).
- 67.- Cowan, E.P., Coligan, J.E. y Biddison, W.E. Human cytotoxic T-lymphocyte recognition of an HLA-A3 gene product expressed on murine L cells: The only human gene product required on the target cells for lysis is the class I heavy chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 4490-4494 (1985).
- 68.- Biddison, W.E., Shearer, G.M. y Shaw, S. Influenza virus-specific cytotoxic T cells are restricted by multiple HLA-A3 related self antigens: Evidence for recognition of distinct self structures in conjunction with different foreign antigens. *J. Immunol.* 127, 2231-2235 (1981).
- 69.- Nathenson, S.G., Geliebter, J., Pfaffenbach, G.M. y Zeff, R.A. Murine major histocompatibility complex class-I mutants: molecular analysis and structure-function implications. *Annu. Rev. Immunol.* 4, 471-502 (1986).
- 70.- Hogan, K.T., Clayberger, C., Le, A.T., Walk, S.F., Ridge, J.P., Parham, P., Krensky, A.M. y Engelhard, V.H. Cytotoxic T lymphocyte-defined epitope differences between HLA-A2.1 y HLA-A2.2 map to two distinct regions of the molecule. *J. Immunol.* 141, 4005-4011 (1988).
- 71.- Cowan, E.P., Jelachich, M.L., Coligan, J.E. y Biddison, W.E. Site-directed mutagenesis of HLA-A3 gene identifies amino acid 152 as crucial for major histocompatibility complex-restricted and alloreactive cytotoxic T-lymphocyte recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 5014-5018 (1987).
- 72.- Jelachich, M.L., Cowan, E.P., Turner, R.V., Coligan, J.E. y Biddison W.E. Analysis of molecular basis of HLA-A3 recognition by cytotoxic T cells using defined mutants of the HLA-A3 molecule. *J. Immunol.* 141, 1108-1113 (1988).
- 73.- Mattson, D.H., Shimojo, N., Cowan, E.P., Baskin, J.J., Turner, R.V., Shvetsky, B.D., Coligan, J.E., Maloy, W.L. y Biddison, W.E. Differential effects of amino acid substitutions in the  $\beta$ -sheet floor and  $\alpha$ -2 helix of HLA-A2 on recognition by alloreactive viral peptide-specific cytotoxic T lymphocytes. *J. Immunol.* 143, 1101-1107 (1989).
- 74.- McMichael, A.J., Gotch, F.M., Santos-Aguado, J. y Strominger, J.L. Effect of mutations and variations of HLA-A2 on recognition of a virus peptide epitope by cytotoxic T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 9194-9198 (1988).
- 75.- Hogan, K.T., Shimojo, N., Walk, S.F., Engelhard, V.H., Maloy, W.L., Coligan, J.E. y Biddison, W.E. Mutations in the  $\alpha$ 2 helix of HLA-A2 affect presentation but do not inhibit binding of influenza virus matrix peptide. *J. Exp. Med.* 168, 725-736 (1988).
- 76.- Robbins, P.A., Lettice, L.A., Rota, P., Santos-Aguado, J., Rothbard, J., McMichael, A.J. y Strominger, J.L. Comparison between two peptide epitopes presented to cytotoxic T lymphocytes by HLA-A2. Evidence for discrete locations within HLA-A2. *J. Immunol.* 143,

- 4098-4103 (1989).
- 77.- Mellins, E., Arp, B., Singh, D., Carreno, B., Smith, L., Johnson, A.H. y Pious, D. Point mutations define positions in HLA-DR3 molecules that affect antigen presentation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 4785-4789 (1990).
  - 78.- Karr, R.W., Yu, W., Watts, R., Evans, K.S. y Celis, E. The role of polymorphic HLA-DR $\beta$  chain residues in presentation of viral antigens to T cells. *J. Exp. Med.* 172, 273-283 (1990).
  - 79.- McLaughlin-Taylor, E., Miyada, C.G., McMillan, M. y Wallace, R.B. Direct demonstration of critical amino acid residues required for cytotoxic T-lymphocyte allorecognition of H-2 class I antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 3085-3089 (1988).
  - 80.- Bill, J., Ronchese, F., Germain, R.N. y Palmer, E. The contribution of mutant amino acids to alloantigenicity. *J. Exp. Med.* 170, 739-750 (1989).
  - 81.- Pierres, M., Marchetto, S., Naquet, P., Landais, D., Peccoud, J., Benoist, C. y Mathis, D. I-A $\alpha$  polymorphic residues that determine alloreactive T cell recognition. *J. Exp. Med.* 169, 1655-1668 (1989).
  - 82.- Lawlor, D.A., Zemmour, J., Ennis, P.D. y Parham, P. Evolution of class-I MHC genes and proteins: from natural selection to thymic selection. *Annu. Rev. Immunol.* 8, 23-63 (1990).
  - 83.- Jaulin, C., Perrin, A., Abastado, J.P., Dumas, B., Papamatheakis, J. y Kourilsky, P. Polymorphism in mouse and human class I H-2 and HLA genes is not the result of random independent point mutations. *Immunogenetics* 22: 453-470 (1985).
  - 84.- Parham, P., Lawlor, D.A., Lomen, C.E. y Ennis, P.D. Diversity and diversification of HLA-A,B,C alleles. *J. Immunol.* 142, 3937-3950 (1989).
  - 85.- Tykocinski, M.L. y Max, E.E. CG dinucleotide clusters in MHC genes and in 5' demethylated genes. *Nucleic Acids Res.* 12, 4385-4396 (1984).
  - 86.- Pease, L.R., Schulze, D.H., Pfaffenbach, G.M. y Nathenson, S.G. Spontaneous H-2 mutants provide evidence that a copy mechanism analogous to gene conversion generates polymorphism in the major histocompatibility complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 242-246 (1983).
  - 87.- Hughes, A.L. y Nei, M. Patterns of nucleotide substitution at major histocompatibility complex class I loci reveals overdominant selection. *Nature* 335, 167-170 (1988).
  - 88.- Klein, J. y Figueroa, F. Evolution of the major histocompatibility complex. *CRC Crit. Rev. Immunol.* 6, 295-386 (1986).
  - 89.- Klein, J. Origin of major histocompatibility complex polymorphism: The trans-species hypothesis. *Human Immunol.* 19, 155-162 (1987).
  - 90.- Mayer, W.E., Jonker, M., Klein, D., Ivanyi, P., van Seventer, G. y Klein, J. Nucleotide sequences of chimpanzee MHC class I alleles: Evidence for trans-species mode of evolution. *EMBO J.* 7, 2765-2774 (1988).
  - 91.- Lawlor, D.A., Ward, F.E., Ennis, P.D., Jackson, A.P. y Parham, P. HLA-A,B polymorphisms predate the divergence of humans and chimpanzees. *Nature* 335, 268-271 (1989).
  - 92.- Watkins, D.I., Chen, Z.W., Hughes, A.L., Evans, M.G., Tedder, T.F. y Letvin, N.L. Evolution of the MHC class I genes of a New World primate from ancestral homologues of human non-classical genes. *Nature* 346, 60-63 (1990).

- 93.- McConnell, T.J., Talbot, W.S., McIndoe, R.A. y Wakeland, E.K. The origin of MHC class II gene polymorphism within the genus *Mus*. *Nature* 332, 651-654 (1988).
- 94.- Figueroa, F., Günther, E. y Klein, J. MHC polymorphism pre-dating speciation. *Nature* 335, 265-267 (1988).
- 95.- Parham, P., Lomen, C.E., Lawlor, D.A., Ways, J.P., Holmes, N., Coppin, H.L., Salter, R.D., Wan, A.M. y Ennis, P.D. Nature of polymorphism in HLA-A,B,C molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 4005-4009 (1988).
- 96.- Brewerton, D.A., Caffrey, M., Hart, F.D., James, D.C.O., Nicholls, A. y Sturrock, R.D. Ankylosing spondylitis and HL-A27. *Lancet* 1, 904-907 (1973).
- 97.- Brewerton, D.A., Caffrey, M., Nicholls, A., Walters, D., Oates, J.K. y James, C.D.O. Reiter's disease and HL-A27. *Lancet* 2, 996-998 (1973).
- 98.- Grumet, F.C., Fendly, B.M., Fish, L., Foug, S. y Engleman, E.G. Monoclonal antibody (B27M2) subdividing HLA-B27. *Human Immunol.* 5, 61-72 (1982).
- 99.- Grumet, F.C., Calin, A., Engleman, E.G., Fish, L. y Foug, S.K.H. Studies of HLA-B27 using monoclonal antibodies: ethnic -and disease- asociated variants. En: *Advances in Inflammation Research Vol 9: The Spondyloarthropathies*, ed. M. Ziff y S.B. Cohen, pp. 41-53. Raven Press, New York, 1985.
- 100.- 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, 513-525 (1984).
- 101.- Breuning, M.H., Lucas, C.J., Breur, B.S., Engelsma, M.Y., de Lange, G.G., Dekker, A.J., Biddison, W.E. e Iványi, P. Subtypes of HLA-B27 detected by cytotoxic T lymphocytes and their role in self-recognition. *Hum. Immunol.* 5, 259-268 (1982).
- 102.- Breuning, M.H., Breur, B.S., Engelsma, M.Y., Huis, B. e Iványi, P. Specificity of anti-HLA-B27 cytotoxic T lymphocytes. *Tissue Antigens* 22, 267-282 (1983).
- 103.- Breur-Vriesendorp, B.S., Huis, B., Dekker, A.J., Breuning, M.H. e 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. En: *Advances in Inflammation Research 9, The Spondyloarthropathies*, ed. M. Ziff y S.B. Cohen. pp. 55-65. Raven Press, New York, 1985.
- 104.- Breur-Vriesendorp, B.S., Neeffjes, J.C., Huis, B., van Seventer, G.A., Ploegh, H.L. e Iványi, P. Identification of new B27 subtypes (B27C and B27D) prevalent in oriental populations. *Hum. Immunol.* 16, 163-168 (1986).
- 105.- Breuning, M.H., Spits, H., de Vries, J.E. e Iványi, P. A cloned cytotoxic T-lymphocyte (CTL) line recognizing a subtype of HLA-B27. *Hum. Immunol.* 9, 231-242 (1984).
- 106.- Miyachi, Y., Wee, S.L., Chen, L.K., Grumet, F.C., Bowman R.J. y Taurog, J.D. A cytolytic human T lymphocyte clone differentially recognizing HLA-B27 subtypes. *Hum. Immunol.* 10, 237-249 (1984).
- 107.- Mölders, H.H., Breuning, M.H., Iványi, P. y Ploegh, H.L. Biochemical analysis of variant HLA-B27 antigens. *Hum. Immunol.* 6, 111-117 (1983).
- 108.- Neeffjes, J.J., Breur-Vriesendorp, B.S., van Seventer, G.A., Iványi, P. y Ploegh, H.G. An improved biochemical method for the analysis of polymorphism of HLA class I antigens. Definition of new HLA class I subtypes. *Hum. Immunol.* 16, 169-181 (1986).

- 109.- Choo, S.Y., Antonelli, P., Nisperos, B., Nepom, G.T. y Hansen, J.A. Six variants of HLA-B27 identified by isoelectric focusing. *Immunogenetics* 23, 24-29 (1986).
- 110.- Nomenclature for factors of the HLA system, 1987. *Immunogenetics* 28, 391-398 (1988).
- 111.- Baur, M.P., Neugebauer, M., Deppe, H., Sigmund, M., Luton, T., Mayr, W.R. y Albert, E.D. Population analysis on the basis of deduced haplotypes from random families. *Histocompatibility Testing 1984*, pp 333-341. Springer-Verlag, Berlín.
- 112.- Hill, A.V.S., Allsopp, C.E.M., Kwiatkowski, D., Greenwood, B.M., Mc Michael, A.J. HLA typing of class I alleles using PCR and hibridization with oligonucleotides: HLA-B27 and an african B27 subtype. *Hum. Immunol.* 16th Annual ASHI Meeting. Abstracts 1990.
- 113.- Weiss, E.H., Kuon, W., Dörner, C., Lang, M. y Riethmüller, G. Organization, sequence and expression of the HLA-B27 gene: a molecular approach to analyze HLA and disease associations. *Immunobiol.* 170, 367-380 (1985).
- 114.- Coppin, H.L. y McDevitt, H.O. Absence of polymorphism between HLA-B27 genomic exon sequences isolated from normal donors and ankylosing spondylitis patients. *J. Immunol.* 137, 2168-2172 (1986).
- 115.- Vega, M.A, Ezquerro, A., Rojo, S., Aparicio, P., Bragado, R. y López de Castro, J.A. Structural analysis of an HLA-B27 functional variant: Identification of residues that contribute to the specificity of recognition by cytolytic T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 7394-7398 (1985).
- 116.- Vega, M.A., Wallace, L., Rojo, S., Bragado, R., Aparicio, P. y López de Castro, J.A. Delineation of functional sites in HLA-B27 antigens. Molecular analysis of HLA-B27 variant Wewak I defined by cytolytic T lymphocytes. *J. Immunol.* 135, 3323-3332 (1985).
- 117.- Vega, M.A., Bragado, R., Iványi, P., Pelaéz, J.L. y López de Castro, J.A. Molecular analysis of a functional subtype of HLA-B27. A possible evolutionary pathway for HLA-B27 polymorphism. *J. Immunol.* 137, 3557-3565 (1986).
- 118.- de Waal, L.P., Krom, F.E.J.M., Breur-Vriesendorp, B.S., Engelfriet, C.P., López de Castro, J.A. e Iványi, P. Conventional alloantisera can recognize the same HLA-B27 polymorphism as detected by cytotoxic T lymphocytes. *Hum. Immunol.* 20, 265-271 (1987).
- 119.- El-Zaatari, F.A.K., Sams, K.C. y Taurog, J.D. Amino acid substitutions at position 67 disrupt anti-B27 monoclonal antibody binding in direct relation to the size of the substituted side chain. *J. Immunol.* 144, 1512-1517 (1990).
- 120.- Aparicio, P., Vega, M.A. y López de Castro, J.A. One allogeneic cytolytic T lymphocyte clone distinguishes three different HLA-B27 subtypes: Identification of amino acid residues influencing the specificity and avidity of recognition. *J. Immunol.* 135, 3074-3081 (1985).
- 121.- 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, 837-841 (1987).
- 122.- 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, 203-209 (1988).
- 123.- 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,

- 1945-1950 (1988).
- 124.- Gomard, E., Sitbon, M., Toubert, A., Bègue, B. y Lévy, J.P. HLA-B27, a dominant restricting element in antiviral responses? *Immunogenetics* 20, 197-204 (1984).
  - 125.- Kievits, F., Iványi, P., Krimpenfort, P., Berns, A. y Ploegh, H.L. HLA-restricted recognition of viral antigens in HLA transgenic mice. *Nature* 329, 447-449 (1987).
  - 126.- Nixon, D.F., Townsend, A.R.M., Elvin, J.G., Rizza, C.R., Gallwey, J. y McMichael, A.J. HIV-1 gag-specific cytotoxic T lymphocytes defined with recombinant vaccinia virus and synthetic peptides. *Nature* 336, 484-487 (1988).
  - 127.- Kvist, S. y Hamann, U. A nucleoprotein peptide of influenza A virus stimulates assembly of HLA-B27 class I heavy chains and  $\beta_2$ -microglobulin translated in vitro. *Nature* 348, 446-448 (1990).
  - 128.- Keat, A. Is spondylitis caused by Klebsiella?. *Immunol. Today* 7, 144-149 (1986).
  - 129.- Karr, R.W., Hahn, Y. y Schwartz, B.D. Structural identity of human histocompatibility leukocyte antigen-B27 molecules from patients with ankylosing spondylitis and normal individuals. *J. Clin. Invest.* 69, 443-450 (1982).
  - 130.- Lochead, J.A., Chalmers, I.M., Marshall, W.H., Larsen, B., Skanes, V.M., Payne, R.H. y Barnard, J.M. HLA-B27 haplotypes in family studies of ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* 26, 1011-1016 (1983).
  - 131.- Reveille, J.D., Koopman, W.J., Barger, B.O., Acton, R.T. y McDaniell, D.O. Restriction fragment length polymorphism analysis in ankylosing spondylitis. *Am. J. Med.* 85 (Suppl. 6A), 48-50 (1988).
  - 132.- Hammer, R.E., Maika, S.D., Richardson, J.A., Tang, J.P. y Taurog, J. Spontaneous inflammatory disease in transgenic rats expressing HLA-B27 and human  $\beta_2m$ : An animal model of HLA-B27-associated human disorders. *Cell* 63, 1099-1112 (1990).
  - 133.- Geczy, A.F., Alexander, K., Bashir, H.V. y Edmonds, J. A factor(s) in Klebsiella culture filtrates specifically modifies an HLA-B27-associated surface component. *Nature* 283, 782-784 1980.
  - 134.- Geczy, A.F., McGuigan, L.E., Sullivan, J.S. y Edmonds, J.P. Cytotoxic T lymphocytes against disease-associated determinant(s) in ankylosing spondylitis. *J. Exp. Med.* 164, 932-937 (1986).
  - 135.- Oldstone, M.B. Molecular mimicry and autoimmune disease. *Cell* 50, 819-820 (1987).
  - 136.- Welsh, J., Avakian, H., Cowling, P., Ebringer, A., Wooley, P., Panayi, G. y Ebringer, R. Ankylosing spondylitis, HLA-B27 and Klebsiella. I. Cross-reactivity studies with rabbit antisera. *Br. J. Exp. Pathol.* 61, 85-91 (1980).
  - 137.- Chen J.H., Kono, D.H., Yong, Z., Park, M.S., Oldstone, M.M. y Yu, D.T. A Yersinia pseudotuberculosis protein which cross-reacts with HLA-B27. *J. Immunol.* 139, 3003-3011 (1987).
  - 138.- Schwimbeck, P.L., Yu, D.T.Y. y Oldstone, M.B.A. Autoantibodies to HLA-B27 in the sera of HLA-B27 patients with ankylosing spondylitis and Reiter's syndrome. Molecular mimicry with Klebsiella pneumoniae as potential mechanism of autoimmune disease. *J. Exp. Med.* 166, 173-181 (1987).
  - 139.- Toubert, A., Hamachi, M., Raffoux, C., Park, M.S. y Yu, D.T.Y. Epitope mapping of an

- HLA-B27 monoclonal antibody that also reacts with a 35-Kd bacterial outer-membrane protein. *Clin. exp. Immunol* 82, 16-20 (1990).
- 140.- Ewing, C., Ebringer, R., Tribbick, G. y Geysen, H.M. Antibody activity in ankylosing spondylitis sera to two sites on HLA B27.1 at the MHC groove region (within sequence 65-85), and to a *Klebsiella pneumoniae* nitrogenase reductase peptide (within sequence 181-199). *J. Exp. Med.* 171, 1635-1647 (1990).
  - 141.- Breur-Vriesendorp, B.S., Dekker-Saeyns, A.J. e Iványi, P. Distribution of HLA-B27 subtypes in patients with ankylosing spondylitis: the disease is associated with a common determinant of the various B27 molecules. *Ann. Rheum. Dis.* 46, 353-356 (1987).
  - 142.- Benjamin, R. y Parham, P. Guilt by association: HLA-B27 and ankylosing spondylitis. *Immunol. Today* 11, 137-142 (1990).
  - 143.- Clevers, H., Alarcón, B., Wileman, T. y Terhorst, C. The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble. *Ann. Rev. Immunol.* 6, 629-662 (1988).
  - 144.- Davis, M.M. T cell receptor gene diversity and selection. *Annu. Rev. Biochem.* 59, 475-496 (1990).
  - 145.- Fraser, J.D., Goldsmith, M.A. y Weiss, A. Ligand-induced association between the T-cell antigen receptor and two glycoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 7133-7137 (1989).
  - 146.- Davis, D.R. y Metzger, H. Structural basis of antibody function. *Ann. Rev. Immunol.* 1, 87-117 (1983).
  - 147.- Davis, M.M. y Bjorkman, P.J. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* 334, 395-402 (1988).
  - 148.- Amit, A.G., Mariuzza, R.A., Phillips, S.E. y Poljak, R.J. Three-dimensional structure of an antigen-antibody complex at 2.8 Å resolution. *Science* 233, 747-753 (1986).
  - 149.- Chothia, C., Boswell, D.R. y Lesk, A.M. The outline structure of the T-cell  $\alpha\beta$  receptor. *EMBO J.* 7, 3745-3755 (1988).
  - 150.- Claverie, J.M., Prochnicka-Chalufuor y Bougueleret L. Implications of a Fab-like structure for the T-cell receptor. *Immunol. Today* 10, 10-14 (1989).
  - 151.- Kappler, J.W., Wade, T., White, J., Kushnir, E., Blackman, M., Bill, J., Roehm, N. y Marrack, P. A T cell receptor VB segment that imparts reactivity to a Class II Major Histocompatibility Complex product. *Cell* 49, 263-271 (1987).
  - 152.- Zinkernagel, R.M., 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. *Adv. Immunol* 27, 51-177 (1979).
  - 153.- Unanue, E.R., Allen, P.M. The basis for the immunoregulatory role of macrophages and other accessory cells. *Science* 236, 551-557 (1987).
  - 154.- Townsend, A. y Bodmer, H. Antigen recognition by class I-restricted T lymphocytes. *Ann. Rev. Immunol.* 7, 601-624 (1989).
  - 155.- Babbitt, B.P., Allen, P.M., Matsueda, G., Haber, E. y Unanue, E.R. Binding of immunogenic peptides to Ia histocompatibility molecules. *Nature* 317, 359-361 (1985).
  - 156.- Buus, S., Sette, A., Colon, S.M., Miles, C. y Grey, H.M. The relation between major histocompatibility (MHC) restriction and the capacity of Ia to bind immunogenic peptides.

- Science 235, 1353-1358 (1987).
- 157.- Guillet, J.G., Lai, M.Z., Briner, T.J., Smith, J.A. y Geftter, M.L. Interaction of peptide antigens and class II major histocompatibility complex antigens. *Nature* 324, 260-262 (1986).
- 158.- Chen, B.P. y Parham, P. Direct binding of influenza peptides to class I HLA molecules. *Nature* 337, 743-745 (1989).
- 159.- Bouillot, M., Choppin, J., Cornille, F., Martinon, F., Papo, T., Gomard, E., Fournie-Zaluski, M.C. y Lévy, J.P. Physical association between MHC class I molecules and immunogenic peptides. *Nature* 339, 473-475 (1989).
- 160.- Frelinger, J.A., Gotch, F.M., Zweerink, H., Wain, E. y McMichael, A.J. Evidence of widespread binding of HLA class I molecules to peptides. *J. Exp. Med.* 172, 827-834 (1990).
- 161.- Choppin, J., Martinon, F., Gomard, E., Bahraoui, E., Connan, F., Bouillot, M. y Lévy, J.P. Analysis of physical interactions between peptides and HLA molecules and application to the detection of human immunodeficiency virus 1 antigenic peptides. *J. Exp. Med.* 172, 889-899 (1990).
- 162.- Chen, B.P., Rothbard, J. y Parham, P. Apparent lack of MHC restriction in binding of class I HLA molecules to solid-phase peptides. *J. Exp. Med.* 172, 931-936 (1990).
- 163.- Harding, C.V. y Unanue, E.R. Quantitation of antigen-presenting cell MHC class II/peptide complexes necessary for T-cell stimulation. *Nature* 346, 574-576 (1990).
- 164.- Rothbard, J.B., Lechler, R.I., Howland, K., Bal, V., Eckels, D.D., Sekaly, R., Long, E.O., Taylor, W.R. y Lamb, J.R. Structural model of HLA-DR1 restricted T cell antigen recognition. *Cell* 52, 515-523 (1988).
- 165.- Reddehase, M.J., Rothbard, J.B., Koszinowski, U.H. A pentapeptide as minimal antigenic determinant for MHC class I-restricted T lymphocytes. *Nature*, 337, 651-653 (1989).
- 166.- Bodmer, H.C., Gotch, F.M. y McMichael, A.J. Class I cross-restricted T cells reveal low responder allele due to processing of viral antigen. *Nature* 337, 653-655 (1989).
- 167.- Van Bleek, G.M. y Nathenson, S.G. Isolation of an endogenously processed immunodominant viral peptide from the class I H-2K<sup>b</sup> molecule. *Nature*, 348, 213-216 (1990).
- 168.- Rötzschke, O., Falk, K., Deres, K., Schild, H., Norda, M., Metzger, J., Jung, G. y Rammensee, H.G. Isolation and analysis of naturally processed viral peptides as recognized by cytotoxic T cells. *Nature* 348, 252-254 (1990).
- 169.- Rothbard, J.B. y Taylor, W.R. A sequence common to T cell epitopes. *EMBO J.* 7, 93-100 (1988).
- 170.- DeLisi, C. y Berzofsky, J.A. T-cell antigenic sites tend to be amphipathic structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 7048-7052 (1985).
- 171.- Claverie, J.M., Kourilsky, P., Langlade-Demoyden, P., Chalufour-Prochnicka, A., Dadaglio, G., Tekaiia, F., Plata, F. y Bougueleret, L. T-immunogenic peptides are constituted of rare sequence patterns. Use in the identification of T epitopes in the human immunodeficiency virus gag protein. *Eur. J. Immunol.* 18, 1547-1553 (1988).
- 172.- Perkins, D.L., Lai, M.Z., Smith, J.A. y Geftter, M.L. Identical peptides recognized by

- MHC class I -and II- resstricted T cells. *J. Exp. Med.* 170, 279-289 (1989).
- 173.- Townsend, A.R.M., Bastin, J., Gould, K. y Brownlee, G.G. Cytotoxic T lymphocytes recognize influenza haemagglutinin that lacks a signal sequence. *Nature* 324, 575-577 (1986).
- 174.- Townsend, A., Bastin, J., Gould, K., Brownlee, G., Andrew, M., Coupar, B., Boyle, D., Chan, S. y Smith, G. Defective presentation to class I-restricted cytotoxic T lymphocytes in vaccinia-infected cells is overcome by enhanced degradation of antigen. *J. Exp. Med.* 168, 1211-1224 (1988).
- 175.- 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, 171-183 (1990).
- 176.- Guagliardi, L.E., Koppelman, B., Blum, J.S., Marks, M.S., Cresswell, P. y Brodsky F.M. Co-localization of molecules involved in antigen processing and presentation in an early endocytic compartment. *Nature* 343, 133-139 (1990).
- 177.- Stockinger, B., Pessara, U., Lin, R.H., Habicht, J., Grez, M. y Koch, N. A role of Ia-associated invariant chains in antigen processing and presentation. *Cell* 56, 683-689 (1989).
- 178.- Roche, P.A. y Cresswell, P. Invariant chain association with HLA-DR molecules inhibits immunogenic peptide binding. *Nature* 345, 615-618 (1990).
- 179.- Teyton, L., O'Sullivan, D., Dickson, P.W., Lotteau, V., Sette, A., Fink, P. y Peterson, P.A. Invariant chain distinguishes between the exogenous and endogenous antigen presentation pathways. *Nature* 348, 39-44 (1990).
- 180.- Nuchtern, J.G., Biddison, W.E. y Klausner, R.D. Class II MHC molecules can use the endogenous pathway of antigen presentation. *Nature* 343, 74-76 (1990).
- 181.- Elliot, T., Townsend, A. y Cerundulo, V. Naturally processed peptides. *Nature* 348, 195-196 (1990).
- 182.- Monaco, J.J., Cho, S. y Attaya, M. Transport protein genes in the murine MHC.- Possible implications for antigen processing. *Science* 250, 1723-1726 (1990).
- 183.- 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, 741-744 (1990).
- 184.- 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, 738-741 (1990).
- 185.- 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, 744-747 (1990).
- 186.- Alexander, J., Payne, J.A., Shigekawa, B., Frelinger, J.A. y Cresswell, P. The transport of class I major histocompatibility complex antigens is determined by sequences in the  $\alpha_1$  and  $\alpha_2$  protein domains. *Immunogenetics* 31, 169-178 (1990).
- 187.- 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, 443-448 (1989).

- 188.- Townsend, A., Elliot, T., Cerundolo, V., Foster, L., Barber, B. y Tse, A. Assembly of MHC class I molecules analyzed in vitro. *Cell* 62, 285-295 (1990).
- 189.- Kvist, S. y Hamann, U. A nucleoprotein peptide of influenza A virus stimulates assembly of HLA-B27 class I heavy chains and  $\beta_2$ -microglobulin translated in vitro. *Nature* 348, 446-448 (1990).
- 190.- Ljunggren, H.G., Stam, N.J., Öhlén, C., Neefjes, J.J., Höglund, P., Heemels, M.T., Bastin, J., Schumacher T.N.M., Townsend, A., Kärre, K. y Ploegh, H.L. Empty MHC class I molecules come out in the cold. *Nature* 346, 476-480 (1990).
- 191.- Elliott, T.J. y Eisen, H.N. Cytotoxic T lymphocytes recognize a reconstituted class I histocompatibility antigen (HLA-A2) as an allogeneic target molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 5213-5217 (1990).
- 192.- Matzinger, P. y Bevan, M.J. Why do so many lymphocytes respond to major histocompatibility antigens?. *Cell. Immunol.* 29, 1-5 (1977).
- 193.- Kourilsky, P. y Claverie, J.M. MHC restriction, alloreactivity, and thymic education: a common link?. *Cell* 56, 327-329 (1989).
- 194.- 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, 508-519 (1977).
- 195.- Bevan, M.J. High determinant density may explain the phenomenon of alloreactivity. *Immunol. Today* 5, 128-130 (1984).
- 196.- Lorenz, R.G. y Allen, P.M. Direct evidence for functional self protein/Ia-molecule complexes in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 5220-5223 (1988).
- 197.- Parham, P., Clayberger, C., Zorn, S.L., Ludwig, D.S., Schoolnik, G.K. y Krensky, A.M. Inhibition of alloreactive cytotoxic T lymphocytes by peptides from the  $\alpha_2$  domain of HLA-A2. *Nature* 325, 625-628 (1987).
- 198.- Clayberger, C., Parham, P., Rothbard, J., Ludwig, D.S., Schoolnik, G.K. y Krensky, A.M. HLA-A2 peptides can regulate cytolysis by human allogeneic T lymphocytes. *Nature* 330, 763-765 (1987).
- 199.- Song, E.S., Linsk, R., Olson, C.A., McMillan, M. y Goodenow, R.S. Allospecific cytotoxic T lymphocytes recognize an H-2 peptide in the context of a murine major histocompatibility complex class I molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 1927-1931 (1988).
- 200.- Olson, C.A., Williams, L.C., McLaughlin-Taylor, E. y McMillan, M. Creation of H-2 class I epitopes using synthetic peptides: Recognition by alloreactive cytotoxic T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 1031-1035 (1989).
- 201.- Maryanski, J.L., Accolla, R.S. y Jordan, B. H2-restricted recognition of cloned HLA class I gene products expressed in mouse cells. *J. Immunol.* 136, 4340-4347 (1986).
- 202.- Maryanski, J.L., Pala, P., Corradin, G., Jordan, B.R. y Cerottini, J.C. H-2-restricted cytolytic T cells specific for HLA can recognize a synthetic HLA peptide. *Nature* 324, 578-579 (1986).
- 203.- Maryanski, J.L., Pala, P., Cerottini, J.C. y Corradin, G. Synthetic peptides as antigens and competitors in recognition by H-2-restricted cytolytic T cells specific for HLA. *J. Exp. Med.* 167, 1391-1405 (1988).

- 204.- Rosloniec, E.F., Vitez, L.J., Buus, S. y Freed, J.H. MHC class II-derived peptides can bind to class II molecules, including self molecules, and prevent antigen presentation. *J. Exp. Med.* 171, 1419-1430 (1990).
- 205.- Essaket, S., Fabron, J., de Preval, C. y Thomsen, M. Corecognition of HLA-A1 and HLA-DPw3 by a human CD4<sup>+</sup> alloreactive T lymphocyte clone. *J. Exp. Med.* 172, 387-390 (1990).
- 206.- Arnold, B., Messerle, M., Jatsch, L., Küblbeck G. y Koszinowski, U. Transgenic mice expressing a soluble foreign H-2 class I antigen are tolerant to allogeneic fragments presented by self class I but not to the whole membrane-bound alloantigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 1762-1766 (1990).
- 207.- Marrack, P. y Kappler, J. T cells can distinguish between allogeneic major histocompatibility complex products on different cell types. *Nature* 332, 840-843 (1988).
- 208.- Lombardi, G., Sidhu, S., Lamb, J.R., Batchelor, J.R. y Lechler, R.I. Co-recognition of endogenous antigens with HLA-DR1 by alloreactive human T cell clones. *J. Immunol.* 142, 753-759 (1989).
- 209.- Molina, I.J. y Huber, B.T. The expression of a tissue-specific self-peptide is required for allorecognition. *J. Immunol.* 144, 2082-2088 (1990).
- 210.- Heath, W.R., Hurd, M.E., Carbone, F.R. y Sherman, L.A. Peptide-dependent recognition of H-2K<sup>b</sup> by alloreactive cytotoxic T lymphocytes. *Nature* 341, 749-752 (1989).
- 211.- Buus, S., Sette, A., Colon, S.M. y Grey, H.M. Autologous peptides constitutively occupy the antigen binding site on Ia. *Science* 242, 1045-1047 (1988).
- 212.- Spits, H., van Schooten, W., Keizer, H., van Seventer, G., van de Rijn, M., Terhorst, C. y de Vries, J.E. Alloantigen recognition is preceded by nonspecific adhesion of cytotoxic T cells and target cells. *Science* 232, 403-405 (1986).
- 213.- Krensky, A.M., Robbins, E., Springer, T.A. y Burakoff, S.J. LFA-1, LFA-2, and LFA-3 antigens are involved in CTL-target conjugation. *J. Immunol.* 132, 2180-2182 (1984).
- 214.- Shaw, S., Luce, G.E.G., Quinones, R., Gress, R.E., Springer, T.A., Sanders, M.E. Two antigen-independent adhesion pathways used by human cytotoxic T cell clones. *Nature* 323, 262-264 (1986).
- 215.- Blanchard, D., van Els, C., Aubry, J.P., de Vries, J.E. y Spits, H. CD4 is involved in a post-binding event in the cytolytic reaction mediated by human CD4<sup>-</sup>, cytotoxic T lymphocyte clones. *J. Immunol.* 140, 1745-1752 (1988).
- 216.- Blanchard, D., van Els, C., Borst, J., Carrel, S., Boylston, A., de Vries, J.E. y Spits, H. The role of the T cell receptor, CD8 y LFA-1 in different stages of the cytolytic reaction mediated by alloreactive T lymphocyte clones. *J. Immunol.* 138, 2417-2421 (1986).
- 217.- Makgoba, M.W., Sanders, M.E. y Shaw, S. The CD2-LFA-3 and LFA-1-ICAM pathways: relevance to T-cell recognition. *Immunol. Today* 10, 417-422 (1989).
- 218.- Marlin, S.D. y Springer, T.A. Purified intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function associated antigen 1(LFA-1) *Cell* 51, 813-819 (1987).
- 219.- Staunton, D.E., Dustin, M.L. y Springer, T.A. Functional cloning of ICAM-2, a cell adhesion ligand for LFA-1 homologous to ICAM-1. *Nature* 339, 61-64 (1989).

- 220.- Selvaraj, P.M., 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, 400-403 (1987).
- 221.- Bierer, B.E., Sleckman, B.P., Ratnofsky, S.E. y Burakoff, S.J. The biologic roles of CD2, CD4, and CD8 in T-cell activation. *Ann. Rev. Immunol.* 7, 579-599 (1989).
- 222.- de Vries, J.E., Yssel, H. y Spits, H. Interplay between the TCR/CD3 complex and CD4 or CD8 in the activation of cytotoxic T lymphocytes. *Immunol. Rev.* 109, 120-141 (1989).
- 223.- Springer, T.S. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 246, 425-434 (1990).
- 224.- Springer, T.S., Dustin, M.L., Kishimoto, T.K. y Marlin, S.D.. The lymphocyte function-associated LFA-1, CD2 and LFA-3 molecules: cell adhesion receptors of the immune system. *Ann. Rev. Immunol.* 5, 223-252 (1987).
- 225.- Dustin, M.L., Rothlein, R., Bhan, A.K., Dinarello, C.A. y Springer, T.A. Induction by IL-1 and interferon, tissue distribution, biochemistry and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J. Immunol.* 137, 245-254 (1986).
- 226.- Altmann, D.M., Hogg, N., Trowsdale, J. y Wilkinson, D. Cotransfection of ICAM-1 and HLA-DR reconstitutes human antigen-presenting cell function in mouse L cells. *Nature* 338, 512-514 (1989).
- 227.- Dustin, M.L. y Springer, T.A. T-cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1. *Nature* 341, 619-624 (1989).
- 228.- van Kooyk, Y., van de Wiel-van Kemenade, P., Weder, P., Kuijpers, T.W. y Figdor C.G. Enhancement of LFA-1-mediated cell adhesion by triggering through CD2 or CD3 on T lymphocytes. *Nature* 342, 811-813 (1989).
- 229.- Imboden J.B. y Stobo, J.D. Transmembrane signalling by the T cell antigen receptor. Perturbation of the T3-antigen receptor complex generates inositol phosphates and releases calcium ions from intracellular stores. *J. Exp. Med.* 161, 446-456 (1985).
- 230.- Pantaleo, G., Olive, D., Poggi, A., Kozumbo, W.J., Moretta, L. y Moretta, A. Transmembrane signalling via the T11-dependent pathway of human T cell activation. Evidence for the involvement of 1,2-diacylglycerol and inositol phosphates. *Eur. J. Immunol.* 17, 55-60 (1987).
- 231.- Chatila, T.A. y Geha, R.S. Phosphorylation of T cell membrane proteins by activators of protein kinase C. *J. Immunol.* 140, 4308-4314 (1988).
- 232.- Burn, P., Kupfer, A. y Singer, S.J. Dynamic membrane-cytoskeletal interactions: specific association of integrin and talin arises in vivo after phorbol ester treatment of peripheral blood lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 497-501 (1988).
- 233.- Shiue, L., Gorman, S.D. y Parnes, J.R. A second chain of human CD8 is expressed on peripheral blood lymphocytes. *J. Exp. Med.* 168, 1993-2005 (1988).
- 234.- Ratnofsky, S.E., Peterson, A., Greenstein, J.L. y Burakoff, S.J. Expression and function of CD8 in a murine T cell hybridoma. *J. Exp. Med.* 166, 1747-1757 (1987).
- 235.- Parnes, J.R. Molecular biology and function of CD4 and CD8. *Advances in Immunology* 44, 265-311 (1989).
- 236.- Potter, T.A., Rajan, T.V., Dick, R.F.II y Bluestone, J.A. Substitution at residue 227 of H-2 class I molecules abrogates recognition by CD8-dependent, but not CD8-independent

- cytotoxic T lymphocytes. *Nature* 337, 73-75 (1989).
- 237.- Salter, R.D., Norment, A.M., Chen, B.P., Clayberger, C., Krensky, A.M., Littman, D.R. y Parham, P. Polymorphism in the  $\alpha_3$  domain of HLA-A molecules affects binding to CD8. *Nature* 338, 345-247 (1989).
- 238.- 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, 41-46 (1990).
- 239.- McDonald, H.R., Glasebrook, A.L. y Cerottini, J.C. Clonal heterogeneity in the functional requirement for Lyt-2/3 molecules on cytolytic T lymphocytes: analysis by antibody blocking and selective trypsinization. *J. Exp. Med.* 156, 1711-1722 (1982).
- 240.- Maryanski, J.L., Pala, P., Cerottini, J.C. y MacDonald, H.R. Antigen recognition by H-2-restricted cytolytic T lymphocytes: inhibition on cytolysis by anti-CD8 monoclonal antibodies depends upon both concentration and primary sequence of peptide antigen. *Eur. J. Immunol.* 18, 1863-1866 (1988).
- 241.- O'Rourke, A.M., Rogers, J. y Mescher, M.F. Activated CD8 binding to class I protein mediated by the T-cell receptor results in signalling. *Nature* 346, 187-189 (1990).
- 242.- Blue, M.L., Hafler, D.A., Craig, K.A., Levine, H. y Schlossman, S.F. Phosphorylation of CD4 and CD8 molecules following T cell triggering. *J. Immunol.* 139, 3949-3954 (1987).
- 243.- 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<sup>lck</sup>. *Cell* 55, 301-308 (1988).
- 244.- Emmrich, F. Cross-linking of CD4 and CD8 with the T-cell receptor complex: quaternary complex formation and T-cell repertoire selection. *Immunol. Today* 9, 296-299 (1988).
- 245.- Janeway, C.A. The role of CD4 in T-cell activation: accessory molecule or co-receptor. *Immunol. Today* 10, 234-238 (1989).
- 246.- Van de Rijn, M., Bernabeu, C., Royer-Pokora, B., Weiss, J., Seidman, J.G., de Vries, J., Spits, H. y Terhorst, C. Recognition of HLA-A2 by cytotoxic T lymphocytes after DNA transfer into human and murine cells. *Science* 226, 1083-1085 (1984).
- 247.- Barbosa, J.A., Mentzer, S.J., Minowada, G., Strominger, J.L., Burakoff, S.J. y Biro, P.A. Recognition of HLA-A2 and -B7 antigens by cloned cytotoxic T lymphocytes after gene transfer into human and monkey, but not mouse, cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 7549-7553 (1984).
- 248.- Bernabeu, C., Maziarz, R., Spits, H., de Vries, J., Burakoff, S.J. y Terhorst, C. Coexpression of the human HLA-A2 or HLA-B7 heavy chain gene and human  $\beta_2$ -microglobulin gene in L cells. *J. Immunol.* 133, 3188-3194 (1984).
- 249.- Achour, A., Begue, B., Gomard, E., Paul, P., Sayagh, B., van Pel, A y Levy, J.P. Specific lysis of murine cells expressing HLA molecules by allospecific human and murine H-2-restricted anti-HLA T killer lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 16, 597-604 (1986).
- 250.- Van Pel, A., De Plaen, E. y Boon, T. Selection of highly transfectable variant from mouse mastocytoma P815. *Somatic Cell Mol. Genet.* 11, 467-475 (1985).
- 251.- Maryanski, J.L., Moretta, A., Jordan, B., De Plaen, E., Van Pel, A., Boon, T. y Cerottini, J.C. Human T cell recognition of cloned HLA class I gene products expressed on DNA transfectants of mouse mastocytoma P815. *Eur. J. Immunol.* 15, 1111-1117 (1985).

- 252.- Gomard, E., Begue, B., Sodoyer, S., Maryanski, J.L., Jordan, B.R. y Levy, J.P. Murine cells expressing an HLA molecule are specifically lysed by HLA-restricted antiviral human T cells. *Nature* 319, 153-154 (1986).
- 253.- Koller, T.D., Clayberger, C., Maryanski, J.L. y Krensky, A.M. Human allospecific cytolytic T lymphocyte lysis of a murine cell transfected with HLA-A2. *J. Immunol.* 138, 2044-2049 (1987).
- 254.- 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, 408-413 (1986)
- 255.- Prieto, J., Takei, F., Gendelman, R., Christenson, B., Biberfeld, P. y Patarroyo M. MALA-2, mouse homologue of human adhesion molecule ICAM-1 (CD54). *Eur. J. Immunol.* 19, 1551-1557 (1989).
- 256.- Johnston, S.C., Dustin M.L, Hibbs, M.L. y Springer, T.A. On the species specificity of the interaction of LFA-1 with intercellular adhesion molecules. *J. Immunol.* 145, 1181-1187 (1990).
- 257.- Bernhard, E.J., Le, A.L., Yannelli, J.R., Holterman, M.J., Hogan, K.T., Parham, P. y Engelhard, V.H. The ability of cytotoxic T cells to recognize HLA-A2.1 or HLA-B7 antigens expressed on murine cells correlates with their epitope specificity. *J. Immunol.* 130, 3614-3621 (1987).
- 258.- Storkus, W.J, Howell, D.H., Salter, R.D., Dawson, J.R. y Cresswell, P. NK susceptibility varies inversely with target cell class I HLA antigen expression. *J. Immunol.* 138, 1657-1659 (1987).
- 259.- 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, 9-20 (1978).
- 260.- Ellis, S.A., Taylor, C. y McMichael, A. Recognition of HLA-B27 and related antigens by a monoclonal antibody. *Hum. Immunol.* 5, 49-59 (1982).
- 261.- Parham, P., Bodmer, W.F. Monoclonal antibody to a human histocompatibility alloantigen. *Nature* 276, 397-399 (1978).
- 262.- Liabeuf, A., Le Borgne de Kaouel, C., Kourilsky, F.M., Malissen, B., Manuel, Y. y Sanderson, A.R. An antigenic determinant of human  $\beta_2$ -microglobulin masked by the association with HLA heavy chains at the cell surface: analysis using monoclonal antibodies. *J. Immunol.* 127, 1542-1548 (1981).
- 263.- Brodsky, F.M., Bodmer, W.F. y Parham, P. Characterization of a monoclonal anti- $\beta_2$ -microglobulin antibody and its use in the genetic and biochemical analysis of major histocompatibility antigens. *Eur. J. Immunol.* 9, 536-545 (1979).
- 264.- 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, 510-519 (1984).
- 265.- Keizer, G.D., Borst, J., Figdor, C.G., Spits, H., Miedema, F., Terhorst, C. y de Vries, J.E. Biochemical and functional characteristics of the human leukocyte membrane antigen family LFA-1, Mo-1 and p150,95. *Eur. J. Immunol.* 15, 1142-1148 (1985).
- 266.- Malissen, B., Rebai, N., Liabeuf, A. y Mawas, C. Human cytotoxic T cells structures

- associated with expression of cytolysis. I. Analysis at the clonal cell level of the cytolysis-inhibiting effect of 7 monoclonal antibodies. *Eur. J. Immunol.* 12, 739-748 (1982).
- 267.- Neefjes, J.J. y Ploegh, H.L. Allele and locus-specific differences in cell surface expression and the association of HLA class I heavy chain with  $\beta_2$ -microglobulin: differential effects of inhibition of glycosylation on class I subunit association. *Eur. J. Immunol.* 18, 801-810 (1988).
- 268.- Merrifield, R.B. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* 85, 2149-2154 (1963).
- 269.- Coligan, J.E., Gates III, F.T., Kimball, E.S. y Maloy, W.L. Radiochemical sequence analysis of biosynthetically labeled proteins. *Methods Enzymol.* 91, 413-434 (1983).
- 270.- Bordier, C. Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *J. Biol. Chem.* 252, 1604-1607 (1981).
- 271.- Kessler, S.W. Cell membrane antigen isolation with the staphylococcal protein-A antibody adsorbent. *J. Immunol.* 117, 1482-1478 (1976).
- 272.- Drapeau, G.R. Cleavage at glutamic acid with staphylococcal protease. *Methods Enzymol.* 47, 189-191 (1977).
- 273.- Rodriguez de Córdoba, S., Rubistein, P. y Ferreira, A. High resolution isoelectric focusing of immunoprecipitated proteins under denaturing conditions. A simple analytical method applied to the study of complement polymorphisms. *J. Immunol. Meth.* 69, 165-172 (1984).
- 274.- Barbosa, J.A., Santos-Aguado, J., Mentzer, S.J., Strominger, J.L., Burakoff, S.J. y Biro, P.A. Site-directed mutagenesis of class I HLA genes. Role of glycosylation in surface expression and functional recognition. *J. Exp. Med.* 166, 1329-1350 (1987).
- 275.- Hanahan, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557- 580 (1983).
- 276.- Grunstein, M. y Hogness, D.S. Colony hybridization: a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 3961-3965 (1975).
- 277.- Southern, E.M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98, 503-517 (1975).
- 278.- Sambrook, Fritsch y Maniatis. *Molecular cloning. A laboratory manual*, 2<sup>o</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.
- 279.- Maxam, A.M. y Gilbert, W. Sequencing and labelled DNA with base-specific chemical cleavages. *Meth. Enzymol.* 65, 499-560 (1982).
- 280.- Tabor, S. y Richardson, C.C. DNA sequence analysis with a modified bacteriophage T7 DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 4767-4771 (1987).
- 281.- Southern, P.J. y Berg, P. Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter. *J. Mol. and Appl. Genet.* 1, 327-341 (1982).
- 282.- Chu, G., Hayakawa, H. y Berg, P. Electroporation for the efficient transfection of mammalian cells with DNA. *Nucl. Acids. Res.* 15, 1311-1326 (1987).
- 283.- Wigler, M.A., Pellicer, M.A., Silverstein, S., y Axel, R. Biochemical transfer of single-copy eucaryotic genes using total celular DNA as donor. *Cell* 14, 725-731 (1978).

- 284.- Hopp, T.P. y Woods, K.R. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 3824-3828 (1978).
- 285.- Parham, P. Changes in conformation with loss of alloantigenic determinants of a histocompatibility antigen (HLA-B7) induced by a monoclonal antibody. *J. Immunol.* 132, 2975-2983 (1984).
- 286.- Alexander, H., Johnson, D.A., Rosen, J., Jerabed, L., Green, N., Weissman, I.L. y Lerner, R.A. Mimicking the alloantigenicity of proteins with chemically synthesized peptides differing in single amino acids. *Nature* 306, 697-699 (1983).
- 287.- Lerner, R.A. Tapping the immunological repertoire to produce antibodies of predetermined specificity. *Nature* 299, 592-596 (1982).
- 288.- Parham, P., Humphreys, R.E., Turner, M.J. y Strominger, J.L. Microheterogeneity of HLA-A antigen preparations is due to variable sialic acid content. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 3998-4002 (1974).
- 289.- Cowan, E.P., Jordan, B.R. y Coligan, J.E. Molecular cloning and DNA sequence analysis of genes encoding cytotoxic T lymphocyte defined HLA-A3 subtypes: the E1 subtype. *J. Immunol.* 135, 2835-2841 (1985).
- 290.- van Schravendijk, M.R., Biddison, W.E., Berger, A.E. y Coligan, J.E. Comparative structural analysis of HLA-A3 antigens distinguishable by cytotoxic T lymphocytes: variant E1. *J. Immunol.* 134, 410-416 (1985).
- 291.- Choo, S.Y., St.John, T., Orr, H.T. y Hansen, J.A. Molecular analysis of the variant alloantigen HLA-B27d (HLA-B\*2703) identifies a unique single amino acid substitution. *Hum. Immunol.* 21, 209-219 (1988).
- 292.- Rein, R.S., Seemann, G.H.A., Neefjes, J.J., Hochstenbach, F.M.H., Stam, N.J. y Ploegh, H.L. Association with  $\beta_2$ -microglobulin controls the expression of transfected human class I genes. *J. Immunol.* 138, 1178-1183 (1987).
- 293.- Bragado, R., Lauzurica, P., López, D. y López de Castro, J.A. T cell receptor V $\beta$  gene usage in a human alloreactive response. Shared structural features among HLA-B27-specific T cell clones. *J. Exp. Med.* 171, 1189-1204 (1990).
- 294.- Hedrick, S.M., Engel, I., McElligot, D.L., Fink, P.J., Hsu, M., Hansburg, D. y Matis, L.A. Selection based on specificity for amino acid sequences in the putative third hypervariable region of the beta chain of the T cell antigen receptor. *Science* 239, 1541-1544 (1988).
- 295.- Acha-Orbea, H., Mitchell, D., Timmermann, L., Wraith, D.C., Tausch, G.S. y Waldor, M.K. Limited heterogeneity of T cell receptors from lymphocytes mediating autoimmune encephalomyelitis allows specific immune intervention. *Cell* 54, 263-273 (1988).
- 296.- Aparicio, P., Jaraquemada, D. y López 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, 428-443 (1987).
- 297.- Kane, K.P., Sherman, L.A. y Mescher, M.F. Molecular interactions required for triggering alloantigen-specific cytolytic T lymphocytes. *J. Immunol.* 142, 4153-4160 (1989).
- 298.- Öhlén, C., Bastin, J., Ljunggren, H.G., Foster, L., Wolpert, E., Klein, G., Townsend, A.R.M. y Kärre, K. Resistance to H-2-restricted but not to allo-H2-specific graft and cytotoxic T lymphocyte responses in lymphoma mutant. *J. Immunol.* 145, 52-58 (1990).
- 299.- Howard, J.C. How old is a polymorphism?. *Nature* 332, 588-590 (1988).