

Tesis doctoral

**Polimorfismo de alelos *Mhc-DRB* en
Cercopithecus aethiops: generación y
funcionalidad**

Autor: Manuel Rosal Sánchez



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5314061626

Directores: Prof. Dr. D. Antonio Arnaiz Villena

Dra. D^a Estela Paz Artal

Servicio de Inmunología

Hospital Universitario "12 de Octubre"

Universidad Complutense

MADRID

Año 2.000

Fdo.: El interesado

V^oB^o 1^{er} director

V^oB^o 2^o director



Dedico el presente trabajo a todas aquellas personas que han creído en mí y en mi capacidad para superar obstáculos y alcanzar metas. A todos ellos, muchas gracias de todo corazón.

Dedicado a mi familia, por el apoyo incondicional que siempre me han brindado

Agradezco al Dr. Antonio Carlos Arnaiz Villena el haberme brindado la posibilidad material de llevar a cabo este trabajo de investigación y de plasmarlo en forma de la presente tesis. También le doy las gracias por la continua labor de dirección y de formación como inmunólogo especialista que ha ejercido sobre mí en su calidad de jefe del servicio de Inmunología del hospital "12 de Octubre".

A la Dra. Estela Natividad Paz Artal, por el apoyo e instrucción que me ofreció durante mis primeros momentos como residente.

A todos los miembros pasados y presentes que han integrado esta gran familia que es el Servicio de Inmunología del Hospital "12 de Octubre" y que, durante cuatro plétóricos años han sido como una prolongación de mi entorno familiar, en el cual me he sentido realmente gozoso.

INDICE

EPIGRAFE

Página

I.- INTRODUCCION.....	1
1.- COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD (MHC).....	2
1.1.- Definición de MHC.....	2
1.2.- Complejo Principal de Histocompatibilidad en humanos: sistema HLA.....	3
1.2.1.- Antígenos de clase I del sistema HLA.....	4
1.2.1.1.- Estructura molecular.....	4
1.2.1.2.- Región codificadora.....	8
1.2.1.3.- Antígenos HLA de clase I no clásicos.....	10
1.2.1.4.- Otras secuencias nucleotídicas en la región de clase I del sistema HLA.....	12
1.2.1.5.- Proteínas reguladoras de los loci de clase I.....	13
1.2.2.- Antígenos de clase II del sistema HLA.....	14
1.2.2.1.- Antecedentes históricos.....	14
1.2.2.2.- Estructura molecular.....	14
1.2.2.3.- Región codificadora.....	19
1.2.2.4.- Genes que codifican otras proteínas distintas de los antígenos de clase II.....	22
1.2.2.5.- Elementos reguladores en la región de clase II.....	23
1.2.3.- Antígenos de clase III del sistema HLA.....	25
1.3.- La región de unión al péptido.....	25
1.3.1.- PBR de las moléculas de clase I.....	26
1.3.2.- PBR de las moléculas de clase II.....	28
1.3.3.- Interacciones del PBR de los antígenos de clase II con el TCR.....	32
1.3.4.- Comparación de las uniones peptídicas de los PBR de las clases I y II.....	33
1.4.- El sistema HLA: procesamiento antigénico y presentación.....	34
1.4.1.- Asociación MHC de clase I/péptidos.....	34

1.4.2.- Asociación MHC de clase II/péptidos.....	38
1.5.- Polimorfismo del sistema MHC.....	44
1.5.1.- Serología.....	46
1.5.2.- Análisis de restricción y dosis génica.....	48
1.5.3.- Secuenciación de ADN.....	50
1.5.4.- Alelismo, motivos y linajes.....	50
1.5.5.- Orígenes y fuerzas selectivas del polimorfismo de MHC.....	52
1.5.6.- Mantenimiento del polimorfismo de MHC.....	56
1.5.7.- Restricciones a la diversidad del polimorfismo de MHC.....	58
2.- EVOLUCION DEL MHC.....	59
2.1.- Evolución del MHC de invertebrados a vertebrados.....	59
2.1.1.- Evolución funcional de las moléculas similares a MHC.....	59
2.1.2.- Evolución estructural de las moléculas similares a MHC.....	60
2.2.- MHC de clase II en primates.....	61
2.2.1.- Presencia de genes MHC de clase II en primates no humanos.....	61
2.2.1.1.- <i>Mhc-DQ</i>	62
2.2.1.2.- <i>Mhc-DR</i>	62
2.2.1.3.- <i>Mhc-DP</i>	63
2.2.2.- Evolución de los genes DRB.....	63
2.2.3.- Linajes alélicos en genes DRB.....	66
2.2.4.- Modo transespecífico de evolución de los genes <i>Mhc-DRB</i>	67
2.3.- El orden Primata.....	70
2.3.1.- Clasificación.....	70
2.3.2.- Relaciones evolutivas.....	72
2.3.3.- Relojes moleculares en la evolución de los primates.....	72
2.3.4.- Características particulares de la especie <i>Cercopithecus aethiops</i>	74
II.- OBJETIVOS.....	76
III.- MATERIALES Y METODOS.....	78
1.- ESPECIE, INDIVIDUOS Y LINEAS CELULARES EMPLEADAS.....	79
1.1.- Elección de la especie: motivos.....	79
1.2.- Individuos y cultivos celulares.....	79

2.- EXTRACCION DE ARN Y CONVERSION EN ADNc.....	81
2.1.- Extracción de ARN total.....	81
2.2.- Conversión del ARN en ADNc. Transcripción inversa.....	83
3.- REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	84
3.1.- Cebadores: diseño, síntesis y purificación.....	84
3.2.- Cebadores utilizados en la amplificación.....	85
3.3.- Amplificación génica.....	85
3.4.- Amplificación del ADNc.....	87
3.5.- Control de amplificación.....	88
4.- SECUENCIACION DE ADN (Sambrook et al., 1.989).....	90
4.1.- Purificación de los ADNc amplificados.....	90
4.2.- Ligado en el vector de clonaje.....	91
4.3.- Preparación de bacterias competentes y transformación celular.....	92
4.4.- Selección, amplificación y confirmación de los clones recombinantes.....	94
4.5.- Purificación de plásmidos recombinantes.....	96
4.6.- Reacciones de secuenciación.....	97
4.7.- Purificación de las reacciones de secuenciación.....	98
4.8.- Carga de los productos en el gel, detección y obtención de las secuencias.....	98
5.- ANALISIS DE SECUENCIAS.....	103
5.1.- Programa para traducción de secuencias nucleotídicas a fragmentos peptídicos.....	103
5.2.- Programas para cálculos evolutivos.....	103
5.2.1.- Construcción de dendrogramas según la homología entre secuencias.....	103
5.2.1.1.- Dendrogramas del programa CLUSTAL.....	103
5.2.1.2.- Método de máxima parsimonia (DNAPARS).....	103
5.2.2.- Construcción de dendrogramas según el cálculo de distancias evolutivas entre secuencias.....	104
5.2.3.- Confianza estadística de las ramas obtenidas.....	104
5.2.4.- Cálculo de la proporción de sustituciones sinónimas y no sinónimas (programa NAG).....	105
6.- NOMENCLATURA ALELICA DE LAS SECUENCIAS OBTENIDAS.....	106
IV.- RESULTADOS.....	107
1.- CARACTERIZACION GENICA DE LAS SECUENCIAS OBTENIDAS.....	108

1.1.- Alineamiento e identificación.....	108
1.2.- Descripción de las secuencias.....	113
2.- ASIGNACIÓN DE LAS SECUENCIAS OBTENIDAS A LOCI O A LINAJES	
DE <i>Mhc-DRB</i> Y NOMENCLATURA.....	116
2.1.- Búsqueda de motivos específicos de locus/linaje.....	116
2.2.- Asignación de nomenclatura.....	121
2.3.- Construcción de dendrogramas.....	128
2.3.1.- Dendrograma de máxima parsimonia.....	135
2.3.2.- Arbol filogenético consensuado del método	
de máxima parsimonia.....	137
2.3.3.- Arbol de distancias genéticas.....	139
3.- IDENTIFICACION DE INDIVIDUOS CON DUPLICACIONES GENETICAS.....	141
4.- CARACTERIZACION FUNCIONAL DE LOS PRODUCTOS PEPTIDICOS.....	143
4.1.- Análisis de sustituciones sinónimas y no sinónimas	
en la región de unión al péptido y fuera de ella.....	143
4.2.- Análisis de posiciones relevantes para la	
funcionalidad de la proteína DRB.....	145
4.2.1.- Mantenimiento de las dos cisteínas en las	
posiciones 15 y 79.....	145
4.2.2.- Mantenimiento de los residuos que	
estabilizan el dímero α/β y controlan la	
complejidad del péptido presentado.....	147
4.2.3- Mantenimiento de los residuos para la	
formación de dímeros DR/DR.....	147
4.2.4.- Residuos en las posiciones de interacción	
con CD4.....	149
4.2.5.- Posible afuncionalidad del alelo	
<i>Ceae-DRB1*0701</i>	150
5.- ANALISIS EVOLUTIVO DE LAS SECUENCIAS <i>Ceae-DRB</i>.....	151
5.1.- Señales trans-especie y específicas de especie.....	151
5.1.1.- Motivos específicos de especie.....	151
5.1.2.- Motivos transespecíficos.....	152
V.- DISCUSION.....	154
1.- Variabilidad limitada en los alelos <i>Mhc-DRB</i> de	
<i>Cercopithecus aethiops</i>.....	155
2.- Los productos alélicos <i>Ceae-DRB</i> cumplen criterios de	
funcionalidad para la presentación de antígenos.....	157
3.- Duplicaciones genéticas.....	160
4.- Los alelos <i>Ceae-DRB</i> siguen el modelo de evolución	
transespecífico.....	162

5.- Ausencia de alelos recombinantes.....	165
VI.- CONCLUSIONES.....	166
VII.- BIBLIOGRAFIA.....	169
VIII.- PUBLICACION.....	187

I.- INTRODUCCION

1.- COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD (MHC)

1.1.- Definición de MHC

El Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC; *Major Histocompatibility Complex*) es un conjunto de genes, en su mayoría altamente polimórficos, cuyos productos se expresan en la superficie de una gran variedad de células y que son responsables, entre otros, de la llamada respuesta inmune adaptativa. Se asume que todas las especies de vertebrados poseen un MHC (Klein, 1.986; Humphreys y Reinherz, 1.994).

El MHC fue descubierto en la década de los 50 a raíz del trasplante de un tejido de un individuo a otro. Dicho sistema codifica unas proteínas denominadas "antígenos-MHC", responsables del rechazo o aceptación de un trasplante, aunque no es ésta la función primordial de estas moléculas, sino la presentación de antígenos, para la respuesta inmune específica, mediada por los linfocitos T (Brodsky et al., 1.996).

Las moléculas MHC actúan como antígenos, al igual que las de agentes extraños patógenos (virus o bacterias), estimulando a los linfocitos del receptor. Estos antígenos o moléculas de superficie celular determinan, de esta manera, si un tejido es compatible o no en el ámbito inmunológico, puesto que, en el segundo caso, pueden llegar a producir una rápida destrucción y rechazo del tejido injertado, siendo ésta la causa por la que se les ha dado la denominación de Antígenos Principales de Histocompatibilidad (Klein, 1.990).

Además del MHC existen otros genes cuyos productos pueden actuar como antígenos de histocompatibilidad, si bien mucho más débiles, y que se engloban bajo la denominación común de antígenos menores de histocompatibilidad, de los que los más conocidos son el sistema Hh (histocompatibilidad hematopoyética) y el locus denominado Mls (*Minor lymphocyte stimulant*; locus menor estimulante de los linfocitos).

Los genes MHC son muy polimórficos. Cada gen puede presentarse bajo la forma de diversos alelos, cuyos productos difieren por su capacidad para unirse a y presentar con distinta eficacia diferentes antígenos proteicos (Arnaiz-Villena, 1.993). Cada individuo puede tener dos alelos diferentes para cada gen MHC, los cuales se expresan codominantemente y, al igual que la mayoría de los genes, se heredan según un patrón mendeliano.

La forma en que estos genes influyen en la respuesta inmune queda determinada por la modulación del repertorio de células T maduras realizada por el mismo MHC, por lo que el sistema inmunitario es capaz de distinguir entre lo "propio" (las células y tejidos de su organismo), lo "no propio" (patógenos) y lo "propio alterado" (tumores).

Tres son las características fundamentales del MHC:

- 1.- Es poligénico: está constituido por varios genes.
- 2.- Es polimórfico: cada locus puede presentar multitud de formas alélicas diferentes, lo que implica que la mayoría de la población es heterocigota para cada gen de este sistema.
- 3.- Presenta desequilibrio de ligamiento: diferentes alelos de distintos genes están en un mismo cromosoma con una frecuencia mayor a la teóricamente esperada por una combinación aleatoria.

1.2.- Complejo Principal de Histocompatibilidad en humanos: sistema HLA

En la especie humana el MHC recibe el nombre de sistema HLA (*H*uman *L*eucocyte *A*ntigen, o Antígeno Leucocitario Humano). Se localiza en un segmento cromosómico de aproximadamente 4 millones de pares de bases de longitud (4 cM), que contiene, al menos 200 genes, pseudogenes y genes truncados (Campbell y Trowsdale, 1.993; Newell et al., 1.994; Campbell y Trowsdale, 1.997) y que se ubica en el brazo corto del cromosoma 6, en la parte distal de la banda 6p21.3 (Lamm et al., 1.974; Ferrando et al., 1.981; Senger et al., 1.993). El conjunto de genes del MHC se ha dividido en 3 grandes áreas, atendiendo al origen genético y funcionalidad biológica de sus productos proteicos (Klein, 1.977; Klein, 1.990; Brostoff y Howell, 1.991; Trowsdale et al., 1.991; Trowsdale, 1.995).

El papel principal de los genes HLA en la respuesta inmune frente a antígenos fue postulado en 1.970 cuando se demostró que los linfocitos T específicos de antígeno no reconocían antígenos libres o en forma soluble, sino que reconocían fragmentos de las proteínas antigénicas que se unían de manera no covalente a las moléculas de HLA. Puesto que las moléculas HLA están asociadas a la membrana, los linfocitos T sólo pueden reconocer a los antígenos extraños si éstos están unidos a la superficie de las células portadoras de HLA. Esta limitación en el proceso de reconocimiento, por parte de los linfocitos T, es lo que se conoce como **restricción por el MHC**.

La asociación del antígeno con según qué molécula HLA determina qué subpoblación linfocitaria T va a ser activada. Así, los antígenos unidos a las moléculas HLA de clase I estimulan a los linfocitos T CD8+, mientras que los unidos a las moléculas HLA de clase II estimulan a los linfocitos T CD4+.

Las moléculas de HLA de las clases I y II representan entidades estructurales semejantes; es decir, aunque existen múltiples genes de ambas clases dentro del MHC, todos sus productos tienen globalmente la misma estructura. En cambio, la región de clase III contiene un cúmulo bien diverso de más de 40 genes cuyos productos génicos muestran heterogeneidad estructural, además de que carecen, a diferencia de los productos de las clases I y II, de la función estimuladora de linfocitos T.

La aplicación de técnicas de genética molecular ha permitido determinar la organización física de los loci del complejo HLA. El mapa más completo y reciente se ha publicado en 1.997 (figura 1; Campbell y Trowsdale, 1.997) y en él se han localizado y caracterizado, desde el centrómero hasta el telómero del cromosoma 6, al menos 209 loci que corresponden a genes, pseudogenes y fragmentos génicos de las regiones de clases II, III y I.

1.2.1.- Antígenos de clase I del sistema HLA

1.2.1.1.- Estructura molecular

La estructura básica de las moléculas MHC de clase I ha sido bien establecida desde la publicación de la primera estructura cristalina de una molécula de HLA-A2 (Bjorkman et al., 1.987; Saper et al., 1.991). Dicha estructura comprende una cadena pesada glicosilada (α , de 45 Kd) asociada de manera no covalente con la microglobulina β_2 , un polipéptido de 12 Kd codificado en el cromosoma 15 en el ser humano (Ploegh et al., 1.981; ver figura 2). La cadena α consta de tres dominios extracelulares [denominados α_1 (N-terminal), α_2 y α_3], una región transmembrana y una cola citoplásmica. Cada dominio extracelular comprende unos 90 aminoácidos aproximadamente y toda la región extracelular puede escindirse bajo la acción proteolítica de la enzima papaína. Los dominios consta de tres dominios extracelulares [denominados α_1 (N-terminal), α_2 y α_3], una región transmembrana y una cola citoplásmica. Cada dominio extracelular comprende unos 90 aminoácidos aproximadamente y toda la región extracelular puede escindirse bajo la acción proteolítica de la enzima papaína. Los dominios α_2 y α_3 tienen, ambos, enlaces disulfuro intracadena que engloban asas de 63 y 86

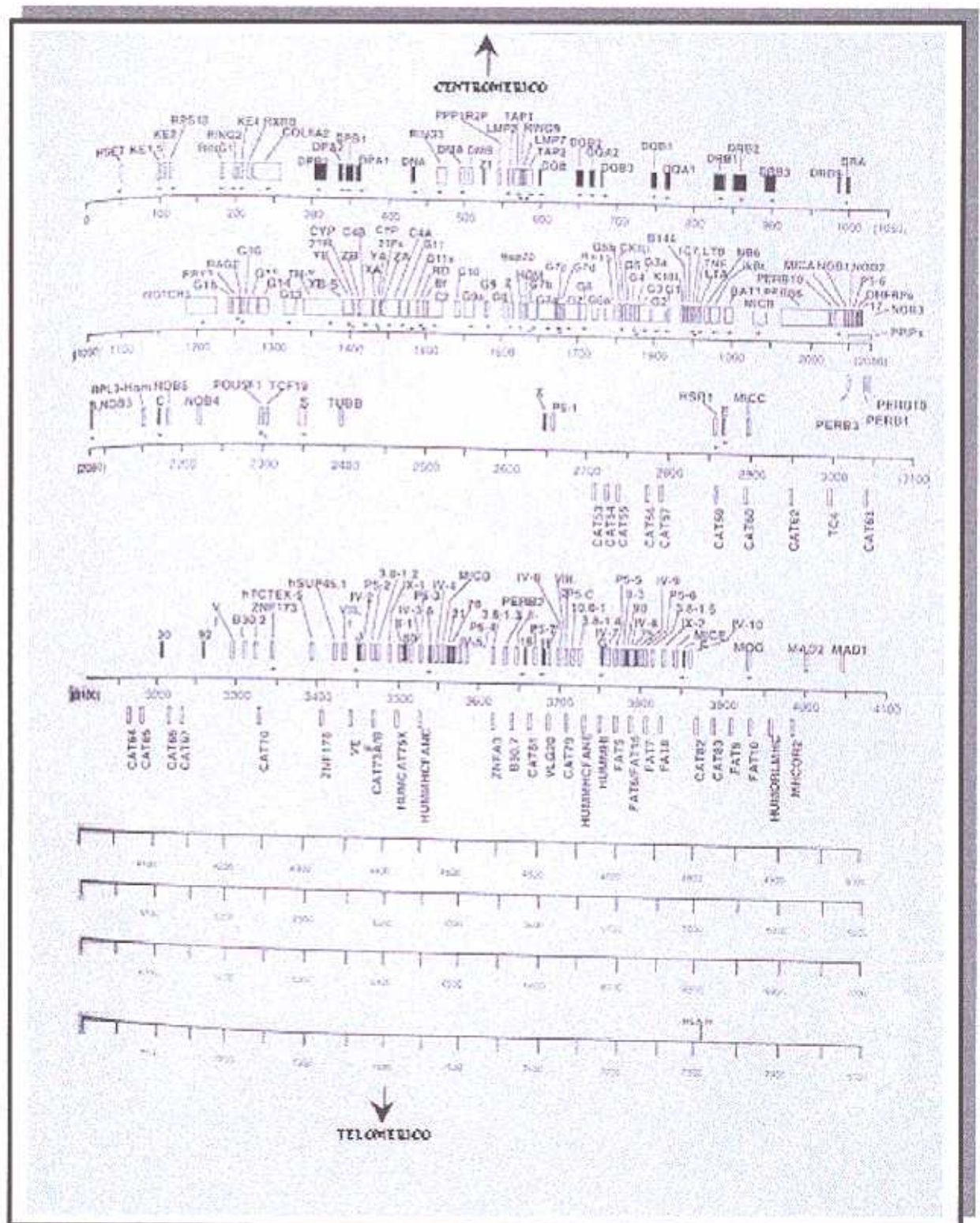


Figura 1.- Mapa genético del Complejo Principal de Histocompatibilidad. Este mapa muestra en detalle, y a escala, los distintos loci encontrados en las diferentes regiones del sistema HLA, tanto de los genes implicados en la codificación de estructuras directamente relacionadas con el reconocimiento antigénico (HLA de clases I y II), como de otras que no lo están, tales como HLA de clase III y proteínas que, estando físicamente situados sus genes en la región de clase II, tampoco intervienen en el reconocimiento antigénico (TAP-1, TAP-2, genes del proteasoma). El C2, el C4A, el C4B y el factor B son proteínas del Complemento; la Hsp-70 es una proteína del choque térmico; la linfotoxina (LT), la linfotoxina β (LT- β) y el factor de necrosis tumoral (TNF) son citoquinas.

aminoácidos, respectivamente. El dominio $\alpha 3$ es homólogo a los dominios constantes de las inmunoglobulinas. La porción extracelular (a nivel del dominio $\alpha 2$) de la cadena pesada de clase I se halla glicosilada; el grado de esta glicosilación depende de la especie y del haplotipo. La región transmembrana, de 25 aminoácidos, predominantemente hidrofóbicos, atraviesa la bicapa lipídica, probablemente bajo la forma de una hélice alfa. El dominio citoplasmático, hidrofílico, de unos 30-40 residuos de longitud, puede fosforilarse *in vivo*. La microglobulina $\beta 2$ ($\beta 2m$) tiene la estructura de un dominio constante inmunoglobulinico y no está anclada a la membrana celular.

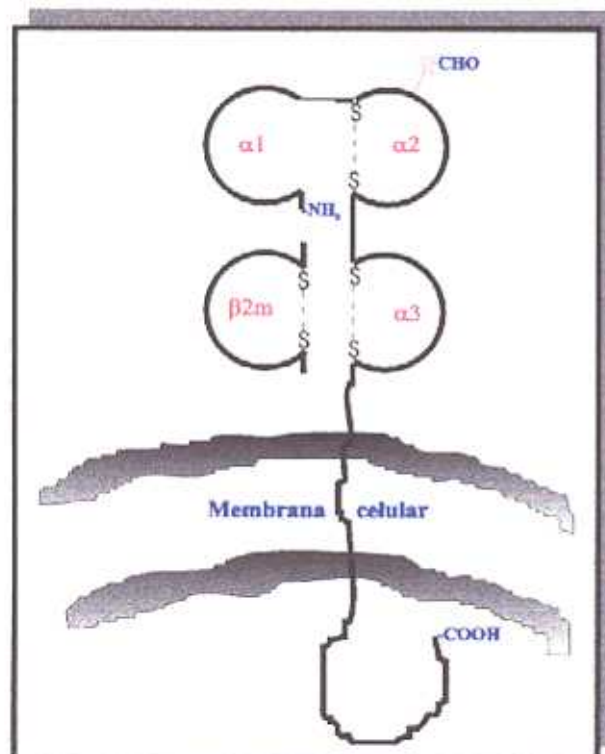


Figura 2.- Representación esquemática de un antígeno de histocompatibilidad de clase I. Son de estructura glicoproteica (CHO: cadena de carbohidratos) y se encuentran acoplados a la membrana externa de todas las células nucleadas del organismo. Constan de una cadena de mayor tamaño (cadena pesada), que por un extremo se introduce en la membrana celular y que posee tres dominios extracitoplasmáticos ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$), dos de los cuales están unidos por puentes disulfuro (S-S). La otra cadena es de menor tamaño y corresponde a la beta-2 microglobulina ($\beta 2m$).

Las estructuras tridimensionales de la porción extracelular (dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ y $\beta 2m$) de varias moléculas humanas de clase I se han dilucidado mediante difracción con rayos X (figura 3). Como se había predicho, los dominios $\alpha 3$ y $\beta 2m$ poseen pliegues de tipo inmunoglobulinico, aunque interactúan de un modo que no se observa entre los pares de dominios constantes de los anticuerpos: la molécula $\beta 2m$ se sitúa en un ángulo bajo los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$.

El dominio $\alpha 3$ y la $\beta 2m$ presentan secuencias relativamente conservadas a lo largo de la filogenia y de gran homología con los dominios constantes de las moléculas de inmunoglobulinas (Srivastava et al., 1985), por lo que se les incluye dentro de la llamada superfamilia Ig. Los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ son los que exhiben la mayor parte del polimorfismo

de secuencia hallado en estos antígenos HLA de clase I (Parham, 1.988; Parham et al., 1.988) y, a diferencia de lo dicho para el dominio α_3 , no presentan secuencias homólogas significativas con las regiones constantes o variables de las inmunoglobulinas.

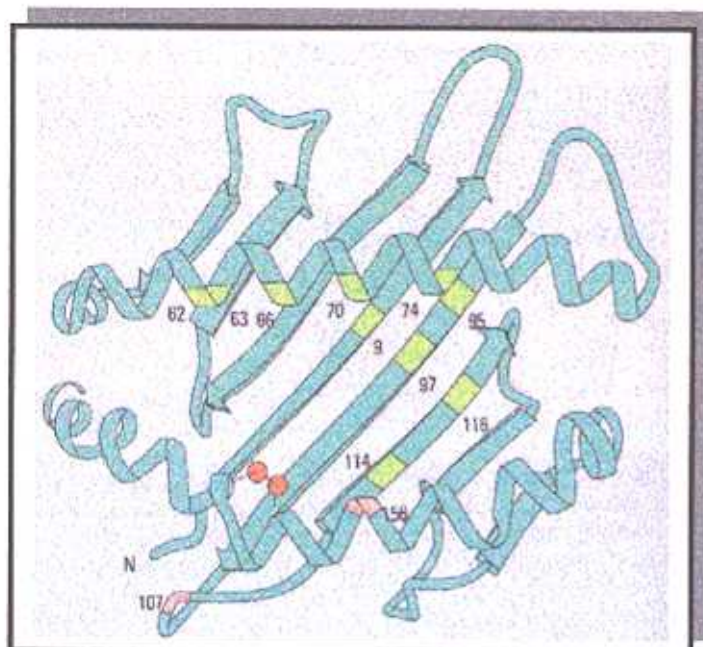


Figura 3.- Patrón de plegamiento de los polipéptidos de una molécula de clase I del MHC. Se muestra una vista superior. Las flechas representan polipéptidos plegados en hoja β , las espirales son polipéptidos plegados en hélice α y los pequeños círculos rojos son enlaces disulfuro.

El dominio α_3 y la cadena de microglobulina están más próximos a la membrana de la célula, mientras que α_1 y α_2 son más externos. A su vez, las estructuras alfa helicoidales de α_1 y α_2 son las zonas más alejadas de la membrana. Los dominios α_3 y β_2 -microglobulina son dos estructuras beta laminares enfrentadas, teniendo la primera de ellas cuatro segmentos beta y la segunda, tres, estabilizadas cada una por un puente disulfuro, tal como también ha sido visto en los dominios constantes de las inmunoglobulinas. Las porciones α_1 y α_2 están formadas por una estructura beta antiparalela y una hélice alfa. En α_2 se encuentra un puente disulfuro que une la cadena terminal β -NH₂ y su hélice alfa más larga. Las dos estructuras en lámina beta de α_1 y α_2 forman un conjunto único de 8 cadenas y, por encima de él, y paralelas entre ellas, están las dos estructuras en hélice alfa. Del aminoácido 86 (asparagina) de la cadena pesada cuelga una ramificación oligosacáridica que marca el límite entre los dominios α_1 y α_2 . Entre las dos hélices alfa largas de α_1 y α_2 aparece una hendidura cuyo fondo está formado por las láminas beta. Sus dimensiones están en consonancia con las de un lugar de unión para un péptido pequeño procedente de un antígeno extraño procesado (Bjorkman, 1.997). Las proteínas HLA de clase I necesitan el ensamblaje intracitoplasmático con el péptido exógeno procesado y la β_2 -microglobulina para madurar y ser expresadas en la superficie celular (Monaco y McDevitt, 1.982).

La variabilidad de las moléculas de clase I se traduce en cambios topológicos en los sitios de unión al péptido. Cada uno de estos sitios, en forma de valva (o Peptide-Binding Groove), tiene una serie de depresiones denominadas "peptide-binding pockets" o bolsillos. Los péptidos unidos a la valva pueden acomodar una o más cadenas laterales aminoacídicas en estos bolsillos.

1.2.1.2.- Región codificadora

La región de genes de histocompatibilidad de clase I ocupa aproximadamente 2.000 Kpb (figura 1) y abarca unos seis subgrupos de genes cuya nomenclatura se relaciona con el orden cronológico de su descripción, estructura, funcionalidad y patrón de expresión celular (Lawlor et al., 1.990). Sus genes son de los más polimórficos que se han encontrado en la Naturaleza (Parham, 1.989).

La región de clase I humana contiene, entre otros, tres loci, denominados HLA-A, HLA-B y HLA-C, que codifican los **principales antígenos de clase I clásicos** (o Ia; figura 4), y dentro del sistema HLA fueron los primeros en conocerse.

En la figura 5 se representa un gen de la cadena pesada de uno de estos antígenos y su organización en exones e intrones, junto con las secuencias reguladoras conocidas. Son un total de ocho exones (Malissen et al., 1.982), de los que el primero codifica para un péptido líder de 24 aminoácidos, los exones 2, 3 y 4 codifican para los tres dominios extracelulares $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ (Malissen et al., 1.982), mientras que el dominio hidrofóbico transmembrana es codificado por el exón 5. El dominio intracitoplasmático se codifica por los exones 6, 7 y 8 en los antígenos HLA-A2, -A3, -A24 y -Cw3, y por los exones 6 y 7 en los alelos pertenecientes al locus HLA-B, en los que el octavo exón codifica sólo para la región 3'UT (*UnTranslated*; No Traducida).

El análisis comparativo de todas las secuencias conocidas de clase I permite la diferenciación de "zonas variables" y de "zonas homólogas". Hasta el 80% de los cambios de bases dentro de las primeras origina cambios aminoacídicos, mientras que sólo lo hacen el 35% en las segundas, aún cuando la frecuencia de mutaciones es similar en ambas zonas (Srivastava et al., 1.985). Se ha constatado que los exones 2º y 3º son los más polimórficos, lo cual es lógico si se considera que son los que codifican los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$, que, por ser los que conforman la hendidura de unión al antígeno, están sujetos a gran variabilidad. En cambio, el 4º exón, codificador del dominio $\alpha 3$ (no implicado en el reconocimiento antigéni-

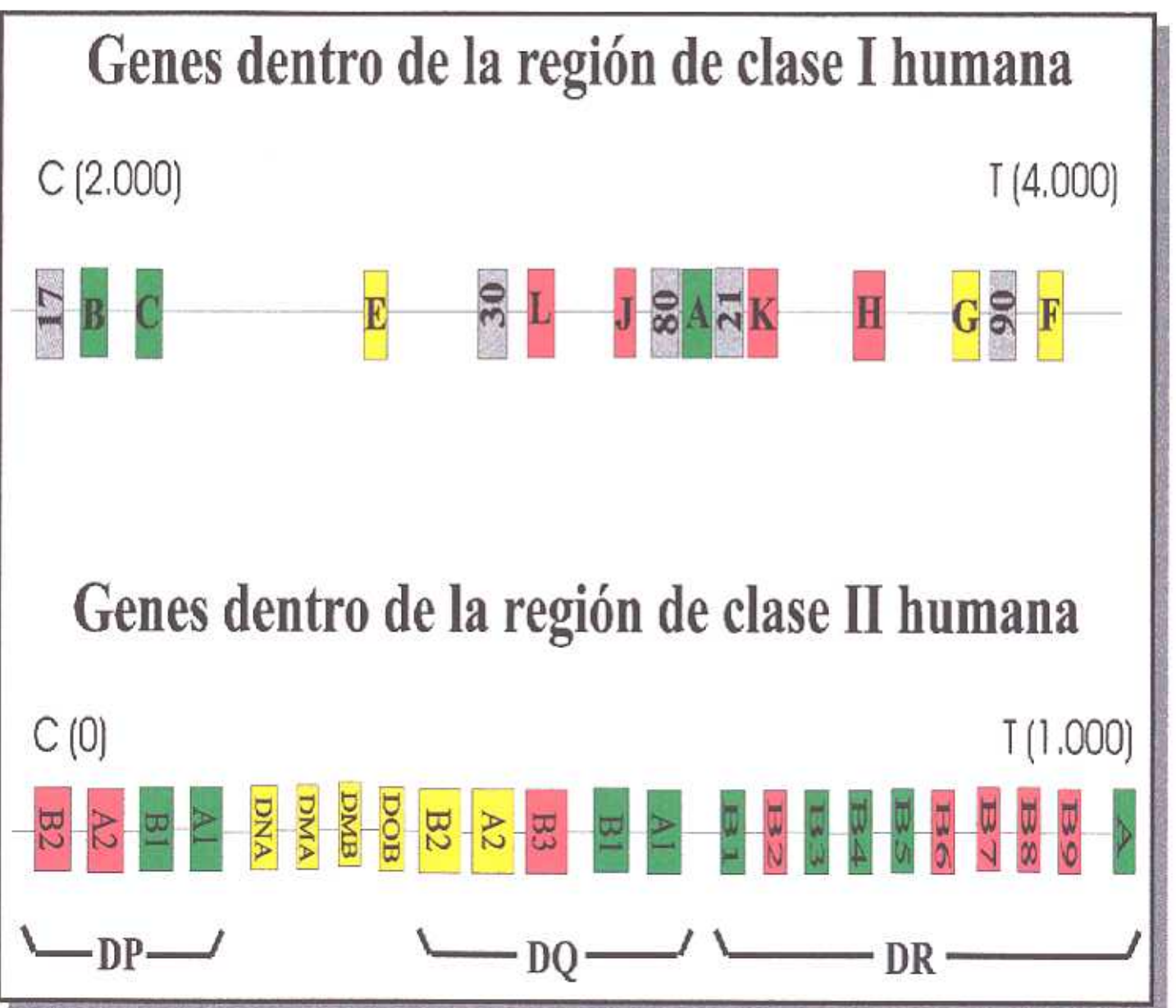


Figura 4. En la mitad izquierda de esta figura se muestra la disposición de los genes dentro del HLA de clase I (desde unas 2.000 hasta 4.000 Kpb del inicio de la región MHC). Además de los genes que codifican los antígenos clásicos o de trasplante (HLA-A, HLA-B y HLA-C*, en verde), se han identificado otros diversos genes semejantes en estructura a los de clase I, y que son los antígenos de clase I no clásicos (HLA-E, HLA-F y HLA-G, en amarillo; véase 1.2.1.3). En esta región también se han identificado pseudogenes (HLA-H, HLA-I, HLA-J, HLA-K y HLA-L, en rojo; véase 1.2.1.4) además de genes truncados, cuya denominación no es literal sino numérica (en gris). La región de clase II humana (mitad derecha de la figura) está situada en el extremo centromérico de la región MHC (entre, aproximadamente, el inicio de ésta y 1.000 Kpb después), indicándose los genes expresados (en verde) y los pseudogenes (en rojo). Las áreas en amarillo indican los genes para los que no se ha encontrado un producto proteínico, pero que, en base a su secuencia génica, no parecen ser pseudogenes. C: extremo centromérico; T: extremo telomérico; los paréntesis indican entre qué posiciones (en miles de pares de bases) de la región MHC se ubican.

co), es el que presenta la secuencia nucleotídica más conservada entre los grandes exones (Srivastava et al., 1.985).

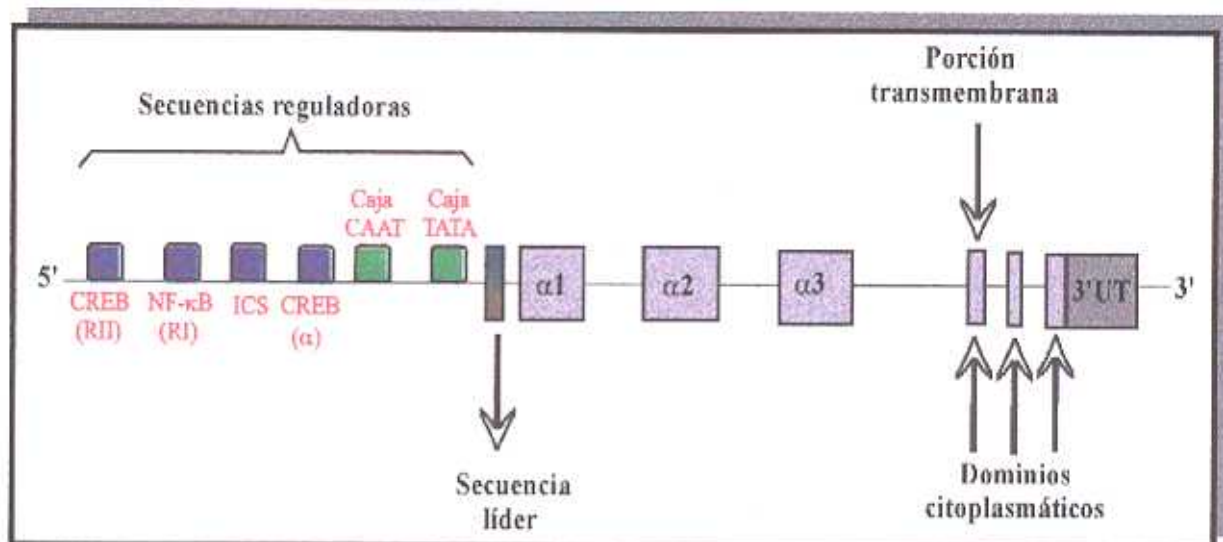


Figura 5.- Estructura exón-intrón y secuencias reguladoras de la transcripción de un gen de cadena pesada del MHC de clase I. Los rectángulos representan las porciones exónicas o las secuencias reguladoras, mientras que los intrones han sido representados por una línea entre los rectángulos. Las secuencias situadas en el extremo 5' son reguladoras (véase 1.2.1.5). La caja 3'UT indica la secuencia no traducida en el extremo 3'.

1.2.1.3.- Antígenos HLA de clase I no clásicos

El primer gen de clase I diferente de HLA-A, -B o -Cw que se reconoció oficialmente fue HLA-E (Köller et al., 1.988). Más tarde fueron aceptados por el Comité de Nomenclatura los denominados HLA-F y HLA-G (Bodmer et al., 1.994; Marsh, 1.997); todos ellos poseen la capacidad potencial de dirigir la síntesis de proteínas de clase I y, colectivamente, reciben el nombre de **antígenos de clase I no clásicos** (o Ib). En su estructura, todos estos genes son muy similares a los clásicos. Básicamente, la diferencia con estos últimos estriba en su limitada expresión tisular, su bajo polimorfismo y su poco conocida función fisiológica.

HLA-E es un gen cuyos ARNm han sido detectados en todo tipo de tejidos, incluyendo los fetales y los placentarios (Wei y Orr, 1.990; Guillaudeux et al., 1.995; Houlihan et al., 1.995), lo que parece sugerir alguna implicación en el embarazo (Houlihan et al., 1.995). Puesto que se ha demostrado que es capaz de unir péptidos a bajas temperaturas (Ulbrecht et al., 1.992) se postula que otra posible función sería la presentación peptídica en sitios del cuerpo donde la temperatura es más baja que en el resto, como piel y testículos.

Recientemente se ha demostrado que HLA-E es capaz de unir péptidos procedentes de fragmentos del péptido líder de otros genes de clase I, tanto clásicos como de HLA-G

(O'Callaghan y Bell, 1.998). HLA-E, con un péptido unido, se expresa en la superficie celular e inhibe la lisis producida por las células NK y mediada por receptores de NK tipo lectina (CD94/NKG2A, B y C; Munz et al., 1.997; Llano et al., 1.998; Sasaki et al., 1.999). Puesto que las células NK lisan las células infectadas por virus, que impiden la expresión normal de las moléculas HLA, resultaría que HLA-E actuaría como un intermediario: cuando la célula está sana se sintetizan proteínas HLA, entre ellas HLA-E, que tiene a su disposición péptidos libres para unirlos y poder expresarse en la superficie celular, interaccionar con las células NK e inhibirlas. Si la célula está infectada, por el contrario, se interrumpe este proceso mediador ya que HLA-E es inestable si no está cargada con un péptido y ocurre la citolisis.

HLA-F presenta dos características que lo distinguen nítidamente de los antígenos de clase I clásicos: la primera de ellas es que pierde el séptimo exón por un proceso de corte y eliminación durante la maduración del ARNm, a causa de una mutación puntual. La segunda característica consiste en la presencia de una región 3'UT inusual, caracterizada por la inserción de una secuencia altamente conservada durante la evolución y semejante a la de una proteína ribosomal (Zemmour y Parham, 1.992).

HLA-G presenta la misma organización exón/intrón que el resto de los genes de clase I y una de sus características más reseñables es su bajo polimorfismo. Hasta la fecha sólo se han descrito seis alelos codificantes (Geraghty et al., 1.987; Morales et al., 1.993; Castro et al., 1.996). Presenta un fuerte desequilibrio de ligamiento con HLA-A (Morales et al., 1.993; Suárez et al., 1.997).

HLA-G tiene un patrón de expresión muy reducido. Sólo se ha descrito un nivel de expresión con significado fisiológico relevante en la placenta. La posible expresión de genes HLA de clase I no clásicos fue sugerida por primera vez en células trofoblásticas (Hunt et al., 1.988; Hunt et al., 1.990). Posteriormente, se ha confirmado la expresión de HLA-G en la placenta (Kovats et al., 1.990; Ellis, 1.990; Wei y Orr, 1.990), aunque otros autores (Shukla et al., 1.990) detectaron HLA-G en el ojo y en el timo.

Mediante la puesta a punto de técnicas de detección más potentes se ha establecido la presencia de HLA-G en prácticamente todas las células y tejidos, incluyendo las células epiteliales tímicas (Crisa et al., 1.997), tanto de adultos como fetales, aunque se ha sugerido que esta situación correspondería a una transcripción basal sin significado fisiológico (Onno et al., 1.994; Kirszenbaum et al., 1.994; Houlihan et al., 1.995).

En este gen se han descrito mecanismos de maduración ("splicing") alternativa de su ARNm, por lo que la proteína HLA-G puede adoptar hasta cuatro formas distintas unidas a

membrana y dos formas distintas no unidas a ella, dando lugar a moléculas de HLA-G solubles (es el llamado "HLA-G soluble").

Puesto que el feto se puede considerar como un "semi-injerto" (expresa antígenos paternos, extraños al sistema inmunitario de la madre), es necesario un mecanismo previsor del rechazo materno, y éste bien podría ser la ausencia de expresión de los antígenos HLA-A, -B y quizás también -C en el tejido placentario. La expresión de HLA-G, al ser poco polimórfico, no presenta alorreactividad *per se*. Puesto que el trofoblasto, en contacto directo con los tejidos maternos, expresa HLA-G en ausencia de otros antígenos HLA, se ha propuesto que HLA-G podría ser el protagonista del fenómeno de tolerancia materna hacia el feto (Schmidt y Orr, 1.993), gracias a su bajo polimorfismo.

Se ha postulado que HLA-G funciona como molécula inhibidora de las células NK de la mucosa uterina al unirse a los receptores KIR de las mismas. Alternativamente, HLA-G podría presentar péptidos a la célula T para proteger al trofoblasto de infecciones virales o transformaciones malignas, igual que los antígenos HLA de clase I clásicos lo hacen en otros tejidos (Diehl et al., 1.996).

Evolutivamente, la relación entre los genes clásicos y los no clásicos no está clara. El estudio de los genes MHC en monos del Nuevo Mundo (MNM) sugiere que estos primates no poseen genes clásicos, puesto que todos los genes de clase I descritos en estas especies se asemejan más, en secuencia, a los genes no clásicos (Watkins et al., 1.990a; Watkins et al., 1.990b; Watkins et al., 1.991). Se ha postulado que los productos de estos genes podrían actuar como los de los clásicos, presentando antígenos a linfocitos T citotóxicos (LTC CD8+), lo que implicaría que tanto los genes de clase I clásicos, como los no clásicos, no constituirían grupos mutuamente excluyentes a lo largo de la evolución.

1.2.1.4.- Otras secuencias nucleotídicas en la región de clase I del sistema HLA

Además de los genes de clase I, clásicos y no clásicos, en la región de clase I se han descubierto toda una serie de secuencias de ADN (figura 4) que se han clasificado en:

- a) Pseudogenes (HLA-H, -J, -K y -L; Geraghty et al., 1.992a). Tienen deleciones que dan lugar a codones de paro prematuros.
- b) Genes truncados (HLA-16, -75, -80 y -90 (Geraghty et al., 1.992b). Presentan homología, en una amplia longitud, con los genes de clase I, pero carecen de la secuencia génica completa.
- c) Segmentos génicos (HLA-17, -21, -30, y -81). Son las secuencias más pequeñas y

con un menor grado de homología con clase I.

d) Genes no HLA que mapean dentro de la región de clase I (gen de la cadena β de la tubulina, gen de la prolactina, gen de la hemocromatosis, entre otros). Pese a su ubicación física, carecen de función relacionada con la presentación antigénica, aunque muchos de ellos podrían tener función reguladora (le Bouteiller, 1.994).

1.2.1.5.- *Proteínas reguladoras de los loci de clase I*

Los elementos reguladores de clase I comprenden dos regiones “inductoras”, los elementos ICS y α y, por último, las cajas CCAAT y TATA (figura 5).

Inductor A: abarca dos regiones, la región I es un palíndromo de 13 pb, homóloga al sitio de unión del factor Nf-kB, descubierto originariamente en el promotor de los genes inmunoglobulínicos y, más recientemente, en otros genes, incluyendo β 2m, IFN- β e IL-2 (Drew et al., 1.995). La región II parece contener un sitio de respuesta a AMPc y otro de respuesta a los retinoles.

Inductor B: (Isráel et al., 1.987) parece ejercer una inducción más débil que el inductor A. Contiene una secuencia de 11 pb conservada, aunque se desconoce su significado fisiológico.

ICS: (*Interferon Consense Sequence*; Secuencia Consenso del Interferón) es homólogo a los denominados elementos de respuesta al interferón (IRE; *Interferon Response Element*) encontrados en otros genes inducibles por interferón.

CRE: (*cAMP Response Element*; Elemento de Respuesta al AMPc) ha sido localizado en la región II y también en la región α . A través de él ejercen su acción algunas hormonas (insulina) y corticoides (hidrocortisona) disminuyendo la expresión de los genes HLA de clase I (Saji et al., 1.992) en los órganos diana. Con estos elementos interaccionan los CREB (*cAMP Response Element Binding factor*) o factores de unión.

A partir de estos elementos existen otros que actúan coordinadamente, definiendo **inductores** y **silenciadores** a través de los cuales se controla la expresión basal e inducible de los genes de clase I, así como el diferente patrón tisular y/o celular de expresión de estos antígenos (Maguire et al., 1.992); de esta forma se podría explicar el patrón de expresión tan restringido y específico de los antígenos de clase Ib.

El gen de la beta-2-microglobulina también posee elementos reguladores del mismo tipo, lo que sugiere una coordinación paralela con la de clase I. Otro aspecto interesante de la

regulación es que las células tumorales pierden frecuentemente la capacidad de expresar antígenos de clase I (Blanchet et al., 1.992), motivada por la carencia de determinados factores proteicos (Nf-kB, KBFI) de unión a otra de estas subregiones (región I), los cuales también están implicados en la regulación.

1.2.2.- Antígenos de clase II del sistema HLA

1.2.2.1.- Antecedentes históricos

El primer dato que apuntó la existencia de estas moléculas fue el descubrimiento de la respuesta linfoproliferativa en cultivos mixtos de linfocitos (Hirschorn et al., 1.963) que no presentaban diferencias en sus antígenos HLA de clase I. Posteriormente se atribuyó esta respuesta linfocitaria a determinantes no detectados serológicamente, viéndose estas reacciones entre hermanos que eran HLA-A y -B idénticos (Bach y Amos, 1.967). Al sistema de antígenos HLA implicado se le denominó HLA-D, viéndose que era polimórfico. En 1.989, Dupont reconoció la existencia de 18 variantes de estos antígenos mediante estudios serológicos.

Más tarde se identificaron antígenos estrechamente relacionados con HLA-D, por lo que se les llamó HLA-DR (*D Related*; Relacionados con D), mediante inhibiciones de la respuesta linfocitaria en cultivos mixtos por sueros procedentes de múltiparas (van Leeuwen, 1.973) o individuos inmunizados con leucocitos. También se identificaron por reacciones inesperadas de antisueros anti-HLA-A o -B con células procedentes de leucemias linfoides crónicas de la estirpe B (Winchester y Kunkel, 1.979). Estos mismos estudios definieron antígenos que parecen representar especificidades públicas de los HLA-DR (Bodmer, 1.978), estableciéndose posteriormente que eran las nuevas series antigénicas DR52/DR53 y DQ (Tanigaki y Tosi, 1.982). A la vez que se discernía la estructura y polimorfismo de los antígenos DR y DQ, se definió (Shaw et al., 1.980a, b) una nueva serie de antígenos HLA de clase II responsables de una respuesta secundaria acelerada en cultivos mixtos linfocitarios (DP).

1.2.2.2.- Estructura molecular

Los productos de los genes de clase II (figura 6) son heterodímeros de cadenas glicoproteicas pesadas (α) y ligeras (β) unidas de manera no covalente. Las cadenas α tienen

pesos moleculares de 30-34 K; los de las β oscilan entre 26 y 29 K, según el locus de que se trate. La diferencia en los pesos moleculares de las cadenas α y β de la clase II se debe principalmente a la glucosilación diferencial: los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\beta 1$ están N-glicosilados, lo que no sucede en el dominio $\beta 2$. La incorporación de cadenas oligosacáridicas en estas estructuras proteicas es debida a modificaciones post-traduccionales que no influyen en el reconocimiento por aloantisueros de las moléculas de clase II (Shackelford y Strominger, 1983).

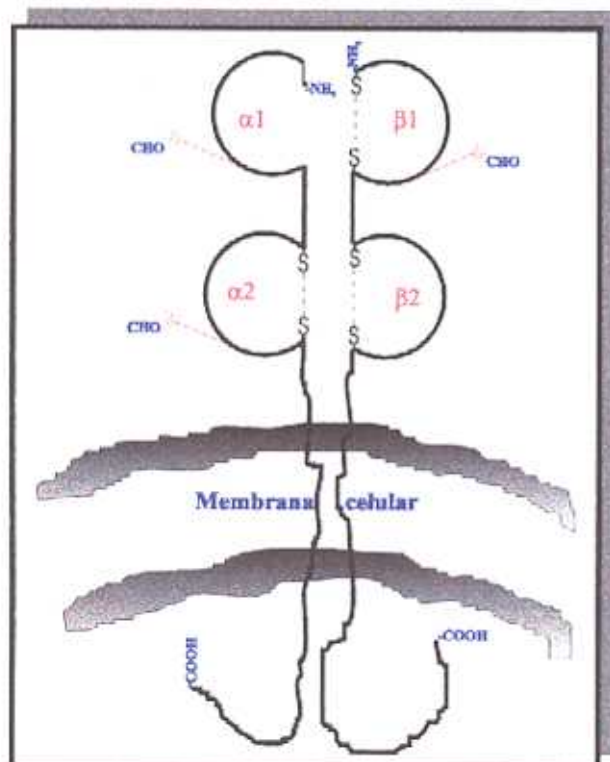


Figura 6.- Representación esquemática de los antígenos de clase II. Se componen de dos péptidos no idénticos (α y β) unidos no covalentemente, que atraviesan la membrana plasmática hacia el extremo C-terminal. Ambas cadenas tienen dos dominios globulares fuera de la célula. El dominio más próximo a la membrana, en cada cadena, está estructuralmente relacionado con los dominios de las inmunoglobulinas. Todos ellos, a excepción del $\alpha 1$, están estabilizados mediante enlaces disulfuro intracadena. Ambas cadenas tienen adheridas unidades de carbohidratos (CHO), más en la cadena α que en la β , lo que explica las diferencias en los pesos moleculares de ambas estructuras. La cadena β , más liviana (pm 28.000), contiene los sitios aloantigénicos, aunque también hay cierto polimorfismo estructural en la cadena α de algunas moléculas de clase II.

Las cadenas α y β tienen la misma estructura global: una porción extracelular, que contiene dos dominios ($\alpha 1$ y $\alpha 2$ ó $\beta 1$ y $\beta 2$, de, aproximadamente, 100 aminoácidos cada uno), está conectada mediante una corta secuencia hidrofóbica (10-12 aminoácidos) a una región transmembrana que posee, aproximadamente, 25 residuos y un dominio intracitoplasmático con unos 10-15 residuos (Kaufman et al., 1984). Los dominios $\alpha 2$ y $\beta 2$ son similares al dominio $\alpha 3$ de clase I y a $\beta 2m$ y poseen las características estructurales de los dominios inmunoglobulínicos constantes.

La secuencia genética comprendida entre los codones 7-54 codifica en los genes DRB para una estructura a modo de plataforma laminar plegada en beta, subyacente a la hendidura de unión al antígeno, y la secuencia comprendida entre los codones 60-80 codifica un largo

rizo alfa helicoidal que forma las paredes laterales de la mencionada hendidura de unión al antígeno (Brown et al., 1.988; Mayer et al., 1.992; Brown et al, 1993).

Los productos proteicos de los genes de clase II están implicados en los fenómenos de restricción del reconocimiento antigénico por parte de los linfocitos T colaboradores (Th) o CD4+. De hecho, la interacción entre CD4 y las proteínas del MHC de clase II es crítica para la activación de las células CD4+ (Janeway, 1.989; 1.991), las cuales están implicadas en reacciones de trasplante y en un cierto número de enfermedades autoinmunes (Mignot et al., 1.995; Vyse y Todd, 1.996). La distribución tisular de estos antígenos histocompatibles está limitada a células del sistema inmune (linfocitos B, macrófagos, linfocitos T activados) presentadoras de antígenos foráneos a las células T colaboradoras, o a células que, sin ser inmunocitos, son consideradas accesorias del sistema inmune, tales como las células epidérmicas de Langerhans y las células dendríticas tímicas (Kaakinen y Hirschberg, 1.977).

La determinación de la primera estructura MHC de clase II empleó un amplio conjunto de técnicas cristalográficas (Brown et al., 1.993). Los estudios que siguieron, acerca de los complejos peptídicos asociados a estas moléculas MHC de clase II establecieron las reglas elementales para la unión de péptidos funcionales (Stern y Wiley, 1.994; Ghosh et al., 1.995; Fremont et al., 1.996). Dichos estudios demostraron que las moléculas de clase II se pliegan formando un surco análogo al de clase I, formado a partir de la hélice α C-terminal de los dominios $\alpha 1$ y $\beta 2$. La base subyacente al surco se forma por las hebras β N-terminales de cada dominio. El polimorfismo se concentra en ese surco y sus inmediaciones, tal como ocurre en clase I.

En 1.996 Johansen y colaboradores vieron, al estudiar los sitios de unión de moléculas HLA-DQ, que los residuos polimórficos, tanto de la cadena alfa como de la beta determinan la especificidad de la unión peptídica, pero que es, en último término, el polimorfismo de la cadena beta el que parece desempeñar el papel más importante, no sólo en HLA-DQ, sino en toda la familia de productos génicos de HLA de clase II.

En la cadena DRB existen ciertas posiciones cuya conservación es fundamental para que la molécula adopte una estructura y funcionalidad correcta. De forma particular, dichas posiciones son importantes para:

- a) Que la molécula sea capaz de adoptar la adecuada estructura plegada para formar la hendidura de presentación antigénica (por medio del enlace disulfuro entre las cisteínas de las posiciones 15 y 79; Kaufman et al., 1.984; Brown et al., 1.993).

- b) Que sea capaz de controlar la complejidad de los péptidos procesados y asegurar la estabilidad del heterodímero α/β . Para ambas funciones es de importancia capital el residuo de la posición 86. Se ha visto (Demotz et al., 1.993) que la variación natural del residuo 86 de la molécula DR β es un mecanismo que regula la cantidad y complejidad de los péptidos presentados por las mismas, al incrementar (por glicina) o disminuir (por valina) la permisividad de estas moléculas para la unión de los péptidos procesados. Simultáneamente (Verreck et al, 1.993), se vio que los haplotipos codificadores de las cadenas DR β con una valina en la posición 86 expresan mayor cantidad de heterodímeros estables que los haplotipos similares que expresan cadenas DR β con una glicina en esa misma posición. Aunque se han encontrado otras sustituciones aminoacídicas en el supuesto sitio de unión al péptido de las cadenas DR β investigadas, sólo el dimorfismo valina/glicina es el único que se correlaciona, respectivamente, con los fenotipos "estables" e "inestables" observados.
- c) Se ha visto, mediante experimentos de difracción de rayos X que las moléculas de clase II cristalizan en forma de dímeros de heterodímeros α/β . Ambos heterodímeros se mantienen unidos por la estabilidad que les confiere la existencia de dos interfases de unión, situándose cada una de ellas, respectivamente, en los dominios $\beta 1$ y $\beta 2$. Dichos dominios poseen ciertos residuos aminoacídicos susceptibles de dar lugar a las dos interfases. Estos residuos son, en la primera interfase, los de las posiciones 49, 50, 51, 52 y 55, y en la segunda, los situados en las posiciones 105, 111, 112, 114, 142, 143 y 162. Tres de estos siete aminoácidos, H111, H112 y E162, interactúan con residuos del dominio proteico $\alpha 2$ para formar tres puentes salinos.
- d) Dado que las moléculas *Mhc-DRB* no actúan aisladamente, sino que su unión a antígenos es una etapa necesaria en la inducción de ciertas respuestas inmunitarias subsiguientes, tales como la activación de linfocitos T cooperadores (Th), caracterizados por expresar en sus membranas citoplasmáticas la molécula correceptora CD4 (Janeway y Bottomly, 1.996; Huang et al., 1.997), se hace necesario que las moléculas de DR β tengan ciertos residuos esenciales para la correcta interacción con el correceptor (figura 7), identificados como las secuencias aminoacídicas 134-148 y, en menor grado, la 138-152, ubicadas todas ellas en el dominio $\beta 2$ (König et al., 1.992; Cammarota et al., 1.992; Fleury et al., 1.995).

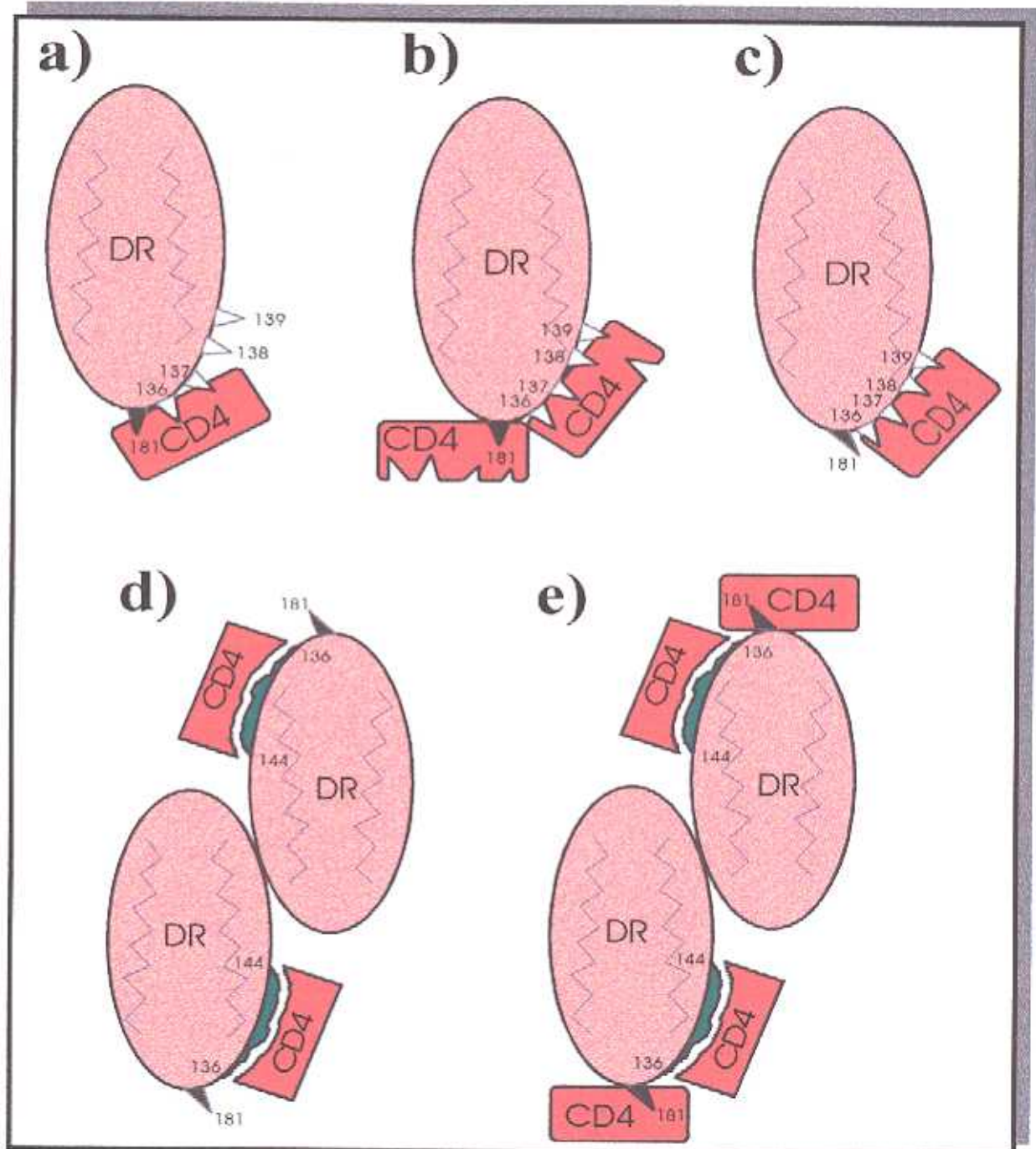


Figura 7.- Posibles interacciones entre CD4 y las moléculas de clase II. a) Una de las caras de la molécula CD4 encaja en dos sitios de unión del dominio $\beta 2$ de una molécula de clase II. Estos sitios de unión pueden implicar a los residuos 181, 136 y 137, puesto que están en el mismo plano. En este modelo, los residuos 138-148 no están en el mismo plano, como ocurre con el residuo 181. b) Una molécula de CD4 contacta por medio de una de sus caras con el residuo 181, mientras que otra molécula de CD4 se une al rizo 136-144 por la cara opuesta. Sólo se ilustran los residuos 136-139. c) CD4 se une al rizo formado por los residuos 136-144 del dominio $\beta 2$ de clase II, pero permanece en estrecha proximidad con el residuo 181, cuya cadena lateral podría modular el anclaje de CD4. d) En el diheterodímero, entre los residuos 136-148 del sitio de unión a CD4, en el dominio $\beta 2$ de clase II, sólo los residuos 136-144 son fácilmente accesibles a CD4. Los residuos 145-148 están sepultados dentro de la estructura diheterodimérica. CD4 se uniría al rizo 136-144 y la cadena lateral del residuo 181 podría afectar a la unión de CD4. e) Dos moléculas de CD4 se unirían a cada lado del diheterodímero. Una de ellas se engrana con el rizo 136-144, mientras que la otra contacta con un segundo sitio de unión en la cadena β , que incluye el residuo 181. Dibujo basado en un esquema de Fleury y colaboradores (1.995).

1.2.2.3.- Región codificadora

La región de clase II abarca hasta unas 1.000 Kpb de ADN y el orden de los distintos loci queda reflejado en las figuras 1 y 4, encontrándose aquí diferentes tipos de genes funcionales: los que codifican para los antígenos de clase II (subregiones de HLA-DP, -DQ y -DR que, a su vez, están integradas por varios genes; Campbell y Trowsdale, 1.993; Campbell y Trowsdale, 1.997; Beck y Trowsdale, 1.999), y los que los hacen para otras proteínas que son importantes en el procesamiento antigénico. Posteriormente se descubrieron y caracterizaron otros antígenos de esta misma clase, que conforman las subregiones HLA-DM, -DN y -DO (Trowsdale y Kelly, 1.985; Tonnellet et al., 1.985; Kelly et al., 1.991). Cada uno de ellas cuenta con, por lo menos, un gen para la síntesis de la cadena pesada (α) y otro para la cadena ligera (β) que, en lo sucesivo, se llamarán, respectivamente, A y B. Son una excepción a esta regla los genes de la subregión DN/DO. Se ha constatado la existencia de proteínas α codificadas por el gen DN, pero no de cadenas β , mientras que, contrariamente, el gen DO es capaz de sintetizar cadenas β pero no proteínas α .

Desde un punto de vista estructural y, al igual que ya ha quedado plasmado para los genes de clase I, en clase II también hay una correspondencia entre los exones génicos y los dominios de las proteínas maduras (Andersson et al., 1.987). En la figura 8 se muestra un esquema típico de los genes α y β de clase II.

Para las cadenas α hay cinco exones (1-5), a partir de los cuales se sintetizan el péptido líder (exón 1); los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ (exones 2 y 3, respectivamente), el péptido de conexión, la región transmembranosa, el dominio citoplasmático y parte de la región 3'UT (exón 4). El exón 5 codifica para el resto de la región 3'UT. Hay algunas variaciones en los genes de las distintas subregiones y así, por ejemplo, el ARNm de DQA1 tiene una longitud diferente de los ARNm que se detectan en el resto de los genes. En el gen DNA el codón de paro se localiza en el exón 5.

De manera parecida, las cadenas β de clase II se codifican por seis exones; un exón para el péptido líder, dos exones para los dominios proteicos $\beta 1$ y $\beta 2$, y un cuarto exón para el péptido de conexión, el dominio transmembranoso y parte del dominio intracitoplasmático. No obstante, el resto del dominio intracitoplasmático se codifica en, por lo menos, dos exones más, con alguna variación en las distintas subregiones.

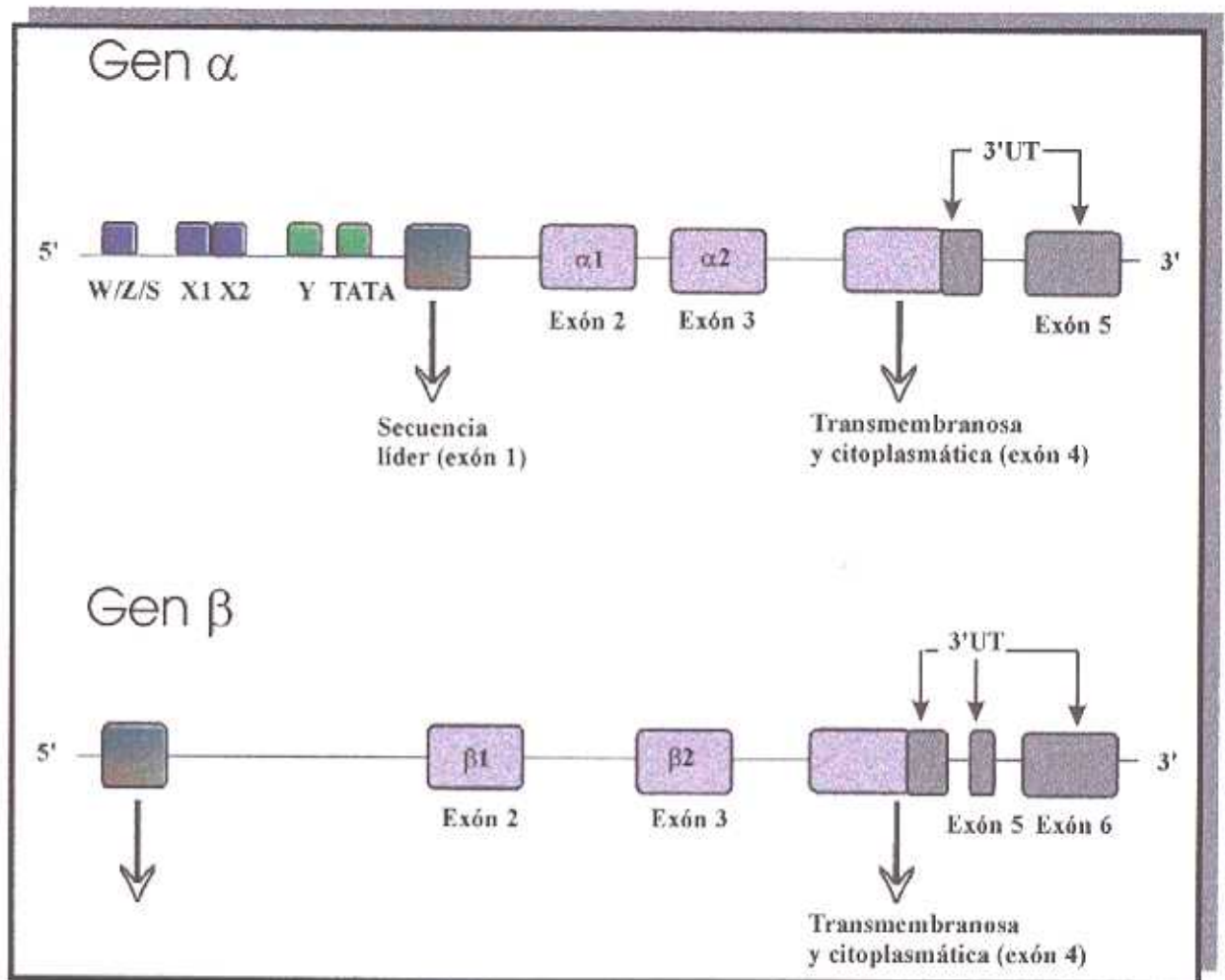


Figura 8.- Estructura en exones de los genes α y β del MHC de clase II. Obsérvense las similitudes evidentes con la estructura exón/intrón de los genes de clase I (figura 5). Al igual que en aquella, la porción 5' está ocupada por secuencias reguladoras (véase 1.2.2.5), a cuyo término se halla una secuencia codificadora de un péptido líder y, más allá, hacia 3', las secuencias codificadoras de los dominios similares a los de Ig, y la secuencia 3'UT. Se ha omitido la representación de las secuencias reguladoras en el diagrama representativo de los genes β .

Los tamaños de los intrones de estos genes de clase II difieren notablemente, siendo de varias Kpb el mayor de todos ellos, que es el intrón primero, que separa el exón codificador del péptido señal del que se encarga de sintetizar el dominio $\alpha 1$. En los genes β , además, hay un intrón de gran tamaño (el número 2), que es el que separa los exones que codifican para los dominios $\beta 1$ y $\beta 2$. El intrón más corto ha sido hallado en el gen DNA, a continuación del exón que codifica para el dominio $\alpha 2$ (intrón 3), con una longitud de tan sólo 180 pares de bases.

La subregión HLA-DP se extiende unas 100 Kpb y contiene dos pares de genes A y B (DPB2, DPA2, DPB1 y DPA1). DPA1 y DPB1 tienen una orientación de cabeza con cabeza, con sus promotores separados tan sólo por una longitud de 2 Kpb. Los productos

DPB1 tienen la estructura típica de las cadenas β de clase II, aunque existen evidencias de algunos haplotipos con distintos patrones de procesamiento que dan lugar a diferentes dominios intracitoplasmáticos. Los otros dos genes de esta región, DPA2 y DPB2, parecen ser pseudogenes (Serenius et al., 1.984), pese a que conservan intacta su secuencia genética, desconociéndose la causa de esta carencia de expresión; en el caso concreto de DPA2 se ha propuesto que la mayor parte del segundo exón estaría reemplazada por la inserción de una secuencia repetitiva en el intrón 1, originando así un péptido líder carente de funcionalidad (Radley et al., 1.994).

En la subregión **HLA-DN/DO** los genes HLA-DNA y HLA-DOB se localizaron por electroforesis de campo pulsante y estos estudios demostraron que el gen DNA se sitúa próximo a la región DP (Trowsdale y Kelly, 1.985), mientras que el gen DOB (Tonelle et al., 1.985) está más próximo a la región DQ. La distancia entre DNA y DOB es superior a 100 Kpb, a pesar de lo cual se cree que forman heterodímeros α/β (Karlsson et al., 1.991). Pese a que la función fisiológica de estos genes se desconoce aún, se cree que, al menos, DOB podría ser un regulador de la carga peptídica de los antígenos de clase II mediada por HLA-DM (Liljedahl et al., 1996), y recientemente se ha demostrado que ejerce una modulación negativa (van Ham et al., 1.997).

Los dos loci **DMA** y **DMB** de la subregión HLA-DM se sitúan entre los loci DNA y DOB (Kelly et al., 1.991), separados por 7,5 Kpb. Su polimorfismo parece ser limitado (Bodmer et al., 1.994) y la comparación de su secuencia con la de los genes de las clases I y II los sitúa en una posición intermedia (Kelly et al., 1.991). Así mismo, la estructura de sus productos proteicos es algo diferente a la del resto de los antígenos de clase II (Gruneberg et al., 1.997): codifican para un producto heterodímero α/β integral de membrana, de 261-263 aminoácidos, no detectado en la superficie celular. La estructura proteica de este dímero es algo diferente a la del resto de los antígenos de clase II, puesto que, aunque los dominios proximales a la membrana pertenecen a la superfamilia Ig, los dos dominios más externos contienen aminoácidos que pueden formar múltiples puentes disulfuro que darían lugar a una conformación sumamente rígida y probablemente cerrada. Estos genes poseen una función relacionada con la presentación antigénica mediada por clase II (véase 1.4.2).

En la subregión **HLA-DQ** se han visto cinco genes diferentes: DQA1, DQB1, DQA2, DQB2 y DQB3. Los genes funcionales de esta subregión son DQA1 y DQB1 (Okada et al., 1.985; Korman et al., 1.985), que se disponen cabeza con cabeza y, hasta el momento presente, no hay evidencia de que los otros tres genes se expresen, a pesar de que DQA2 y

DQB2 (Jonsson et al., 1.987) poseen secuencias intactas y no hay datos que apunten hacia su posible naturaleza pseudogénica. DQB3 ha sido descubierto posteriormente (Ando et al., 1.989) pero no hay evidencias de que exprese un producto proteico. DQB1 tiene un dominio citoplasmático más corto que DQA1 al haber perdido su quinto exón como consecuencia de un proceso de corte y eliminación durante la maduración del ARNm (Radley et al., 1.994).

Respecto a la subregión HLA-DR (Spies et al., 1.985; Rollini et al., 1.985; Meunier et al., 1.986) hay dos genes DRB expresados en la mayoría de los haplotipos (DRB1 y DRB3 o DRB4 o DRB5) y un número variable de pseudogenes. Una excepción a estos datos son los haplotipos DR1, DR8 y DR10 en los que sólo parece expresarse un gen (DRB1). Los pseudogenes han sido así definidos por presentar deleciones o codones de paro (DRB2, DRB6, DRB7, DRB8 y DRB9) pero se considera que pueden tener un papel importante en mecanismos de conversión génica y no se sabe si son totalmente afuncionales.

1.2.2.4.- Genes que codifican otras proteínas distintas de los antígenos de clase II

En posición centromérica a HLA-DP existe un grupo de genes que incluyen uno para la síntesis de colágeno (del tipo 11A2) y otros cinco genes de función desconocida (Thomas et al., 1.991) cuya posible relación con el MHC está por esclarecer. Un segundo grupo de genes se localiza entre los loci HLA-DNA y -DOB y puede dividirse en tres categorías:

1.- Los que no tienen relación aparente con el sistema inmunitario (RING3, homólogo a un gen de *Drosophila* que controla la esterilidad de las hembras; Beck et al., 1.992).

2.- Un conjunto de genes que codifican proteínas involucradas en el procesamiento de los antígenos por intervenir en el transporte de péptidos hacia el retículo endoplasmático (TAP1 y TAP2; *Transporter associated with Antigen Presentation*; Transportador asociado con la Presentación del Antígeno; Trowsdale et al., 1.990; Spies y de Mars, 1.991; Powis et al., 1.992a, b). Pertenecen a la familia de transportadores ABC, que son proteínas que median la traslocación, dependiente de la hidrólisis de ATP, a través de las membranas celulares pro- y eucarióticas, de una gran variedad de moléculas, tanto orgánicas como inorgánicas. Se han detectado en la membrana del retículo endoplasmático rugoso, donde forman heterodímeros TAP1/TAP2 unidos no covalentemente, de los cuales se ha postulado que estarían formados por 8-10 dominios hidrofóbicos embebidos en la membrana del retículo con los dominios dependientes de ATP orientados hacia el citoplasma (Koopmann et al., 1.997).

3.- Genes implicados en el procesamiento antigénico por su condición de subunidades de los proteasoma (LMP2 y LMP7; *Low Molecular weight Protein*; Proteína de Bajo peso

Molecular; Glynne et al., 1.991; Trowsdale et al., 1.991; Kelly et al., 1.991). TAP1 y LMP2 comparten el mismo promotor de transcripción y, además, presentan elementos reguladores que coordinan su expresión ante diferentes estímulos (Wright et al., 1.995). La existencia de elementos reguladores comunes entre los genes HLA de clase I, genes TAP y genes LMP hace pensar en un mecanismo regulador compartido del aumento de expresión de genes de clase I con los implicados en su transporte. Al igual que TAP y las proteínas de clase I, la expresión de LMP2 y de LMP7 es inducible por el interferón γ (IFN- γ ; Früh et al., 1.994; Groettrup et al., 1.996).

1.2.2.5.- Elementos reguladores en la región de clase II

Al menos se han descrito cuatro regiones que controlan su expresión de manera constitutiva, los llamados "elementos reguladores en *cis*", que son las cajas W/Z/S, X1, X2 e Y (figuras 8 y 9), que son responsables de la mayoría de los aspectos reguladores que conciernen a los genes de clase II (Rohn et al., 1.996).

1.- La caja W/Z/S se localiza en las 30-40 pb anteriores a la caja X. Contiene los subelementos Z y S. Parece que esta caja induce la transcripción, mediada por IFN- γ (Vilen et al., 1.992). Más tarde se describió que el subelemento S se une al factor RFX (Jabrane-Ferrat et al., 1.996).

2.- La caja X1 es un motivo de 14 pb al cual se une el factor proteico RFX (Reith et al., 1.988).

3.- La caja X2 tiene una longitud de 7-8 pb y, como elemento regulador, su secuencia se solapa con X1. Muestra homología con los CRE (*Cyclic-AMP Response Elements*; Elementos de Respuesta al AMP cíclico). A esta caja se une el factor proteico X2BP (*X2 Binding Protein*; Proteína de Unión a X2; Hasegawa y Boss, 1.991). RFX y X2BP cooperan y se une estrechamente a las cajas X y ambos confieren estabilidad al complejo ADN-proteína que se forma (Moreno et al., 1.995).

4.- La caja Y se localiza entre 40-160 pb del lugar de inicio de la transcripción. Contiene una secuencia CCAAT inversa. A esta caja se une el complejo heterotrimérico llamado NF-Y, que actúa como regulador positivo (Sinha et al., 1.995; Ronchi et al., 1.995) y el factor YB-1, que parece modular el efecto inductor del IFN- γ (Ting et al., 1.994).

Estas cuatro cajas que acaban de ser expuestas parecen hallarse presentes en todos los promotores de los genes de clase II y, además de ellas, existen otros elementos reguladores de

distribución más variable, hallados solamente en algunos genes. Estos elementos dispersos son la caja TATA (en el gen DRA; Matsushima et al., 1992), la caja V (elemento silenciador encontrado en el gen DRA) y el elemento J, el cual podría ser un factor de respuesta al IFN- γ en los genes DRB1, DPA1 y DQB1 (Louis et al., 1993).

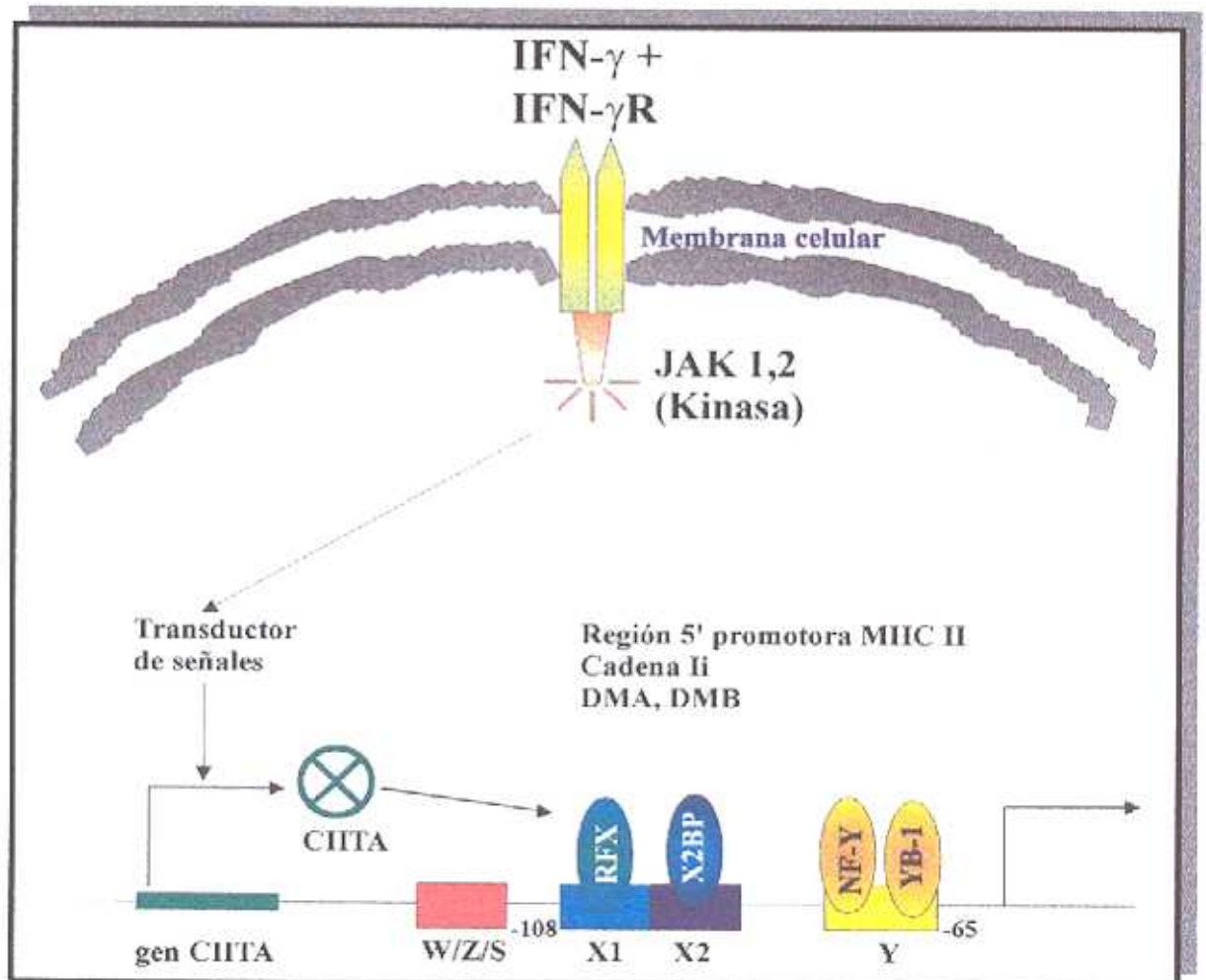


Figura 9.- Regulación de la transcripción de los genes MHC de clase II y secuencias nucleotídicas implicadas.

El nuevo factor regulador de la transcripción, conocido como CIITA (MHC Class II Trans Activator; Activador en Trans del MHC de Clase II; Chang et al., 1994) no se unirá al ADN sino que podría funcionar como un coactivador imprescindible para la regulación general de la expresión de las moléculas de clase II, también regularía la expresión de los genes DM y de la cadena invariable, implicados en el procesamiento antigénico (Chang y Flavell, 1995). A diferencia de los factores RFX, X2BP, NF-Y e YB-1, que se localizan ubicuamente en todos los tejidos, la proteína CIITA sólo ha sido encontrada en células que expresan antígenos de clase II, por lo que se sugiere que esta molécula es el factor limitante

en la regulación de estos genes (Chang et al., 1.994; Steimle et al., 1.994). La regulación de la expresión de las proteínas codificadas por los genes de clase II también se lleva a cabo a nivel post-transcripcional. Se han descrito al menos dos proteínas que interaccionan con las regiones 3'UT del ARNm de HLA-DRA (del Pozzo et al., 1.994) y esta interacción parece condicionar la cantidad de mensajero que se traduce a proteína.

1.2.3.- Antígenos de clase III del sistema HLA

Son genes fuertemente ligados que se sitúan físicamente entre los genes de clase II y los de clase I, a lo largo de unas 800 Kpb de longitud. Dirigen la síntesis de unas 40 proteínas, algunas de ellas relacionadas con funciones inmunitarias, entre las que hay que destacar algunos componentes polimórficos de la cascada del Complemento (Factor B -FB-C2 y C4), los Factores de Necrosis Tumoral (TNF- α y TNF- β ; *Tumor Necrosis Factor*) y el gen para la Hsp-70 (*Heat shock protien* o Proteína de choque térmico). Aunque estos genes comparten la misma localización física que los genes de las clases I y II, su carencia de relaciones evolutivas, funcionales y estructurales con ellos, hace que algunos autores no los clasifiquen como pertenecientes al sistema HLA (Klein, 1.990).

1.3.- La región de unión al péptido

Ya se ha comentado anteriormente (véanse 1.2.1.1 y 1.2.2.2) que las proteínas antigénicas MHC de las clases I y II se pliegan formando, en su parte superior, un surco longitudinal alargado y profundo, en cuyo interior debe quedar emplazado el fragmento antigénico procesado. En una molécula de MHC, sólo esta región de la misma es capaz de interaccionar y unirse a los antígenos, y por eso se la llama región ABS (*Antigen Binding Site*, o Sitio de Unión al Antígeno) o PBR (*Peptide Binding Region*, o Región de Unión al Péptido). El resto de la molécula MHC, que proporciona soporte físico al ABS y lo une a la membrana celular, es la región no-ABS. Una salvedad a lo inmediatamente expuesto lo constituye la región externa al ABS del dominio β 1 en las moléculas de MHC de clase II, la cual es capaz de unirse a los superantígenos (Jardetzky et al., 1.994).

Pese a los caracteres comunes, esta hendidura difiere sustancialmente, tanto en propiedades como en rasgos físicos, en una y en otra clase de antígenos de histocompatibilidad (Brown et al., 1.988).

1.3.1.- PBR de las moléculas de clase I

Los estudios de cristalografía por rayos X en tres alelos de clase I, HLA-A2 (figura 10), HLA-Aw68 y HLA-B27, unidos a mezclas heterólogas de péptidos han establecido los principios generales para la unión peptídica, dentro de la hendidura de unión, a estas moléculas MHC (Bjorkman et al., 1987; Garrett et al., 1989; Saper et al., 1991; Madden et al., 1991; Madden et al., 1993; Guo et al., 1993). Las diferencias entre la unión del péptido a HLA-A2 y HLA-Aw68 (figura 11) son consecuencia de las existentes en 13 posiciones de las cadenas laterales de aminoácidos: seis de ellas en el dominio $\alpha 1$, otras seis en $\alpha 2$ y una en $\alpha 3$ (residuo 245, que contribuye a las interacciones con CD8). Diez de las diferencias en los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ se hallan en posiciones que tapizan el suelo y la parte lateral del surco de unión al péptido antigénico. Estas diferencias estéricas dan lugar a importantes cambios en la morfología del surco y en los péptidos con los que éste se une (Garrett et al., 1989; Madden et al., 1991).

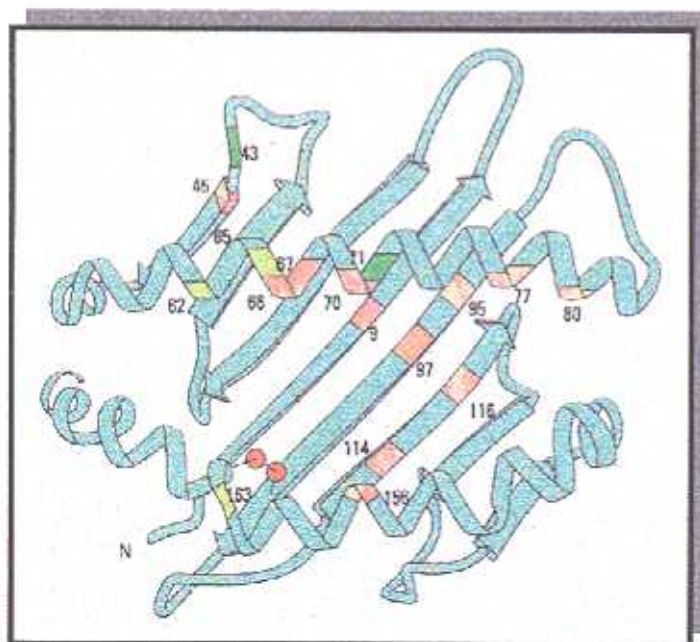


Figura 10.- Superficie superior de una molécula MHC de clase I (HLA-A2). Se muestra el aspecto que presenta en HLA-A2 el surco peptídico para la unión con el antígeno, según lo "ve" el TCR (véase texto). Los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ constan cada uno de cuatro hebras beta antiparalelas que van seguidas por una larga región helicoidal; los dominios forman parejas para constituir una sola lámina beta de ocho hebras culminada por hélices alfa. Se destacan las localizaciones que presentan la mayoría de los residuos polimórficos. Cinco residuos situados sobre las hebras beta centrales de la lámina $\alpha 1$ - $\alpha 2\beta$ hacen prominencia entre las dos regiones helicoidales y pueden ponerse en contacto con los péptidos antigénicos unidos. En el interior del sitio, seis residuos se hallan frente a los lados de las espirales (en rojo). Tres residuos se encuentran sobre la cara superior de las espiras y son candida-

tos para entrar en contacto directo con el TCR (en amarillo). Los residuos representados en color verde no se encuentran en una posición tal que pueda afectar la unión de los péptidos antigénicos.

El surco no es una estructura lisa, sino que posee una serie de subsitios llamados **bolsillos** (Saper et al., 1991), formados por crestas y depresiones, con los que podrían interaccionar las cadenas laterales de aminoácidos. Las variaciones de los aminoácidos dentro del surco pueden hacer que se modifiquen las posiciones y la morfología de los bolsillos, lo

que proporciona una base estructural para las diferencias de afinidad en la unión peptídica; esto, a su vez, gobierna la capacidad o incapacidad de la respuesta inmunitaria.

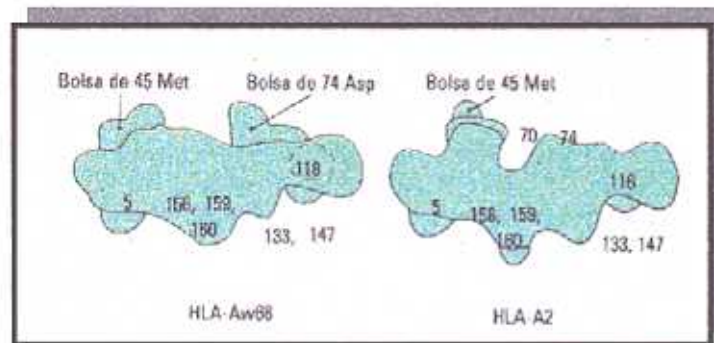


Figura 11.- Comparación de los sitios de unión de HLA-Aw68 y de HLA-A2. Se muestra el trazado esquemático de los surcos de unión al péptido antigénico de HLA-Aw68 y HLA-A2. Están marcadas las bolsas en cuyo interior se cree que encajan los residuos de los péptidos antigénicos unidos.

De manera general, una proteína MHC de clase I puede unirse con alta afinidad a un espectro de péptidos con 8-10 residuos aminoacídicos, empleando residuos conservados en los extremos del PBR capaces de formar puentes de hidrógeno cerca de los extremos N- y C-terminales del péptido ligado. Este espectro no es infinitamente diverso en secuencia, estando limitado por residuos de anclaje preferentes, típicamente en el segundo residuo del extremo amino del péptido (llamado posición P2) y en el residuo carboxi-terminal (llamado PC) para un nonapéptido. Sin embargo, en la mayor parte del surco de unión hay una considerable maleabilidad para poderse acomodar un amplio rango de secuencias peptídicas. Recientes resultados han clarificado los mecanismos que aportan esta propiedad clave funcional. El número creciente de estructuras de alta resolución de complejos MHC clase I/péptido ha subrayado el papel de las moléculas de agua unidas (Fremont et al., 1.995). Estas simples moléculas polares son capaces de actuar como extras opcionales en ciertas posiciones de la hendidura, para acomodar mejor la unión, tanto en forma como en carga electrostática, entre MHC y péptido.

Varios estudios han indicado que la conformación de la porción central de la cadena principal peptídica varía marcadamente para diferentes péptidos unidos a la misma molécula MHC de clase I (Fremont et al., 1.992; Madden et al., 1.993; Fremont et al., 1.995; Fremont et al., 1.996).

Más recientemente, los estudios estructurales de HLA-B53, HLA-B*3501 y HLA-B8 (Reid et al., 1.996) han ampliado enormemente las bases de datos de los complejos específicos MHC-clase I/péptidos (Madden et al., 1.991; Wang et al., 1.994; Madden, 1.995). El análisis de tales datos podría conducir hasta unos algoritmos predictivos específicos para la unión MHC-clase I/péptidos. La comprensión de los elementos clave que gobiernan la

unión peptídica ha comenzado ya a ser ensayada en el diseño de nuevos ligandos MHC, de naturaleza no peptídica, capaces de mimetizar aspectos de la unión peptídica (Weiss et al., 1.995; Bouvier y Wiley, 1.996).

En las moléculas de clase I, son 14 los residuos aminoácidos implicados en la unión al péptido, y son los situados en las posiciones polimórficas 9, 24, 45, 66, 67, 70, 74, 77, 80, 95, 97, 114, 116 y 156 (Parham et al., 1.988); sólo un aminoácido parece responsable de la interacción con el receptor de la célula T (TCR; *T Cell Receptor*), que es el que ocupa la posición 65; además, hay cuatro aminoácidos capaces de interactuar con el conjunto TCR-péptido, y son los ubicados en las posiciones 62, 69, 76 y 163.

1.3.2.- PBR de las moléculas de clase II

En las moléculas de clase II los dominios distales $\alpha 1/\beta 1$ forman la valva de unión del péptido, que consiste en una lámina β formada por ocho hebras antiparalelas y flanqueada por dos regiones en hélice α (figura 12). La región helicoidal del dominio $\alpha 1$ presenta un extremo $-\text{NH}_2$ terminal en cadena extendida y su extremo $-\text{COOH}$ terminal se pliega hacia la base de la valva. Esta peculiaridad hace que el sitio de unión al péptido muestre los extremos abiertos y en él se pueden acomodar péptidos mayores y de longitud más heterogénea (12-28 aminoácidos) que los que se unen a las moléculas MHC de clase I, además de no tener sus extremos anclados a la estructura del heterodímero, sobresaliendo fuera de la molécula (Rudensky et al., 1.991; Chicz et al., 1.992; Rudensky et al., 1.992; Stern et al., 1.994; Rammensee, 1.995).

Estudios cristalográficos de difracción de rayos X del heterodímero humano HLA-DR1 (*DRA, DRB1*0101*; Stern et al., 1.994) unido a un péptido antigénico procedente de la hemaglutinina HA del virus de la influenza [formado por la secuencia de aminoácidos 306-PKYVKQNTLKLAT-318; figura 12; (Jardetzky et al., 1.990; Rothbard y Geftter, 1.991)] han mostrado que el PBR de las moléculas de clase II tiene un bolsillo principal, llamado "1", además de otros cuatro minoritarios que se denotan como "4", "6", "7" y "9". Estos bolsillos están destinados al alojamiento de cadenas laterales de los aminoácidos de la estructura antigénica reconocida. Muchos de los residuos que delinear estos bolsillos son altamente polimórficos, y este polimorfismo es, probablemente, responsable de las diferentes especificidades peptídicas de las distintas proteínas de clase II.

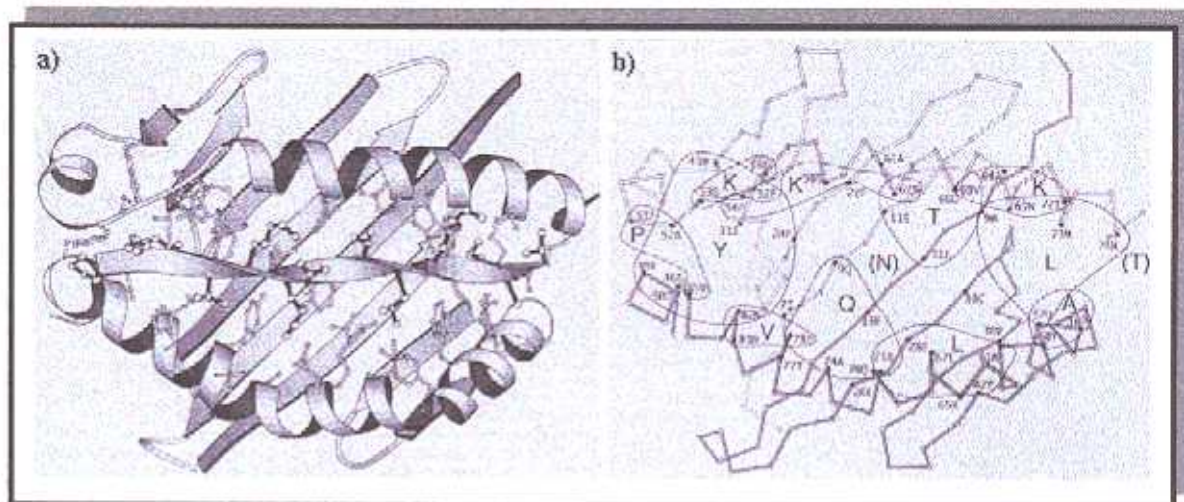


Figura 12.- Contactos peptídicos HLA-DR1/HA. a) Vista apical del sitio de unión al péptido. Las cadenas laterales de HLA que contactan con el péptido o que están ocultas por su interacción con el péptido, se muestran con líneas/enlaces blancos. b) Mapa de los contactos HLA-DR1/péptido HA; HLA-DR1 se indica por la línea que une los carbonos α de los aminoácidos; las líneas blancas son las cadenas α , mientras que las oscuras son las cadenas β . Las líneas curvas cerradas de este diagrama encierran todos los residuos de HLA-DR1 que contactan ($< 4\text{\AA}$) con cada cadena lateral del péptido HA, marcados aquí con el código uniliteral. También se indican otros residuos de HLA-DR1 que no contactan directamente con el péptido pero que son inaccesibles a los solventes y que podrían contactar directamente con el péptido en otros complejos clase II/péptido. Las cadenas laterales en HA de los aminoácidos Asn312 y Thr318 no contactan con HLA-DR1.

El bolsillo "1" (figura 13) es el más grande ($\approx 200 \text{\AA}^2$) y el más hidrofóbico de todo el sitio de unión y alberga la Tyr308 del péptido derivado de HA; en general, muestra una gran preferencia hacia las cadenas laterales hidrofóbicas grandes (Trp, Tyr, Phe, Leu y Ile) y parece ser el principal determinante de la unión peptídica a HLA-DR1 (Jardetzky et al., 1.990). Se ha visto que la mayor parte de la estructura de este bolsillo se mantiene conservada en muchas proteínas HLA-DR diferentes (todos los residuos de la cadena α y Phe89 y Thr90 de la cadena β) y otras muchas proteínas HLA-DR también prefieren una larga cadena lateral hidrofóbica en esta posición. La especificidad en este bolsillo parece estar modulada por el dimorfismo Gly/Val en la posición $\beta 86$ (Verreck et al., 1.993; Demotz et al., 1.993) que cambia la preferencia de unión hacia cadenas laterales más pequeñas. La sustitución de Gly $\beta 86$ por valina situaría la cadena lateral de este aminoácido dentro de la región ocupada por el grupo hidroxílico de la tirosina en 308 del péptido de HA, y restringiría el tamaño de la cadena lateral peptídica que se podría acomodar en esta posición.

El bolsillo "4" (figura 13) alberga la Gln311 del péptido de IIA; éste es un bolsillo grande y poco profundo, orientado a lo largo del lado de unión y con la amida terminal parcialmente expuesta. Puede unirse a una variedad de cadenas laterales alifáticas grandes, las cuales retendrían las interacciones hidrofóbicas a lo largo de las paredes y del suelo del bolsillo. Los aminoácidos con carga positiva no son bien admitidos en este bolsillo,

presumiblemente por las interacciones electrostáticas repulsivas que pueden darse con Arg β 71.

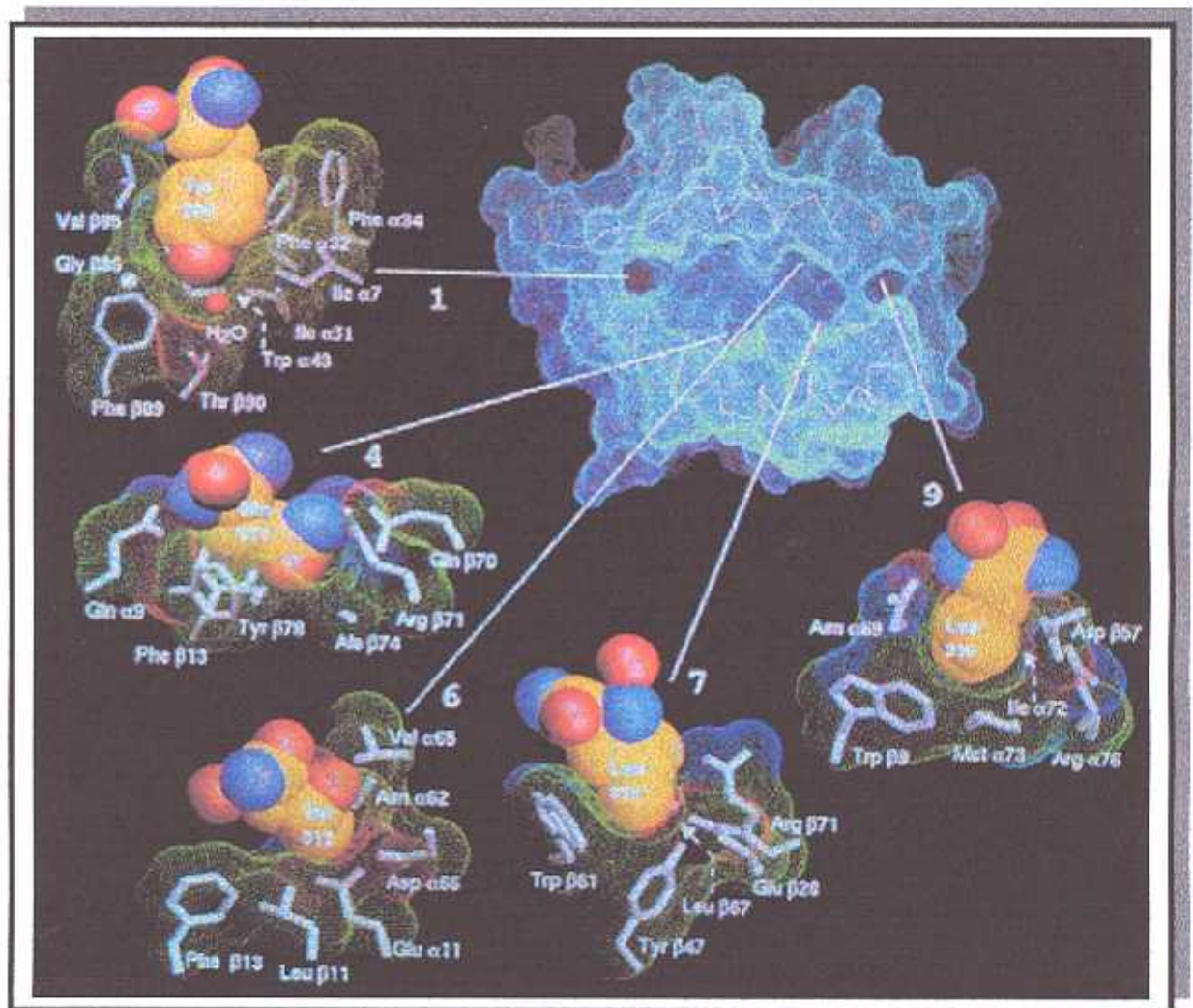


Figura 13.- Bolsillos en el sitio de unión peptídica de HLA-DR1. En la parte superior derecha se ve una vista apical de la superficie molecular del sitio de unión peptídica de HLA-DR1, mostrada en azul, al tiempo que muestra en amarillo la línea que une los C α . Los bolsillos que acomodan las cadenas laterales de HA se muestran con más detalles en las imágenes circundantes y se numeran de acuerdo a su distancia a lo largo del péptido del bolsillo más prominente (1) que acomoda la cadena lateral de Tyr308 (1), Gln311 (4), Thr313 (6), Leu314 (7) y Leu316 (9). Las cadenas laterales del péptido HA y de la cercana cadena peptídica principal se representan como modelos CPK; los átomos de carbono son amarillos, azul los de nitrógeno y rojos los de oxígeno. Las cadenas laterales de los aminoácidos de HLA-DR1 que llegan a contactar con el péptido se indican como barras blancas. La superficie molecular de HLA-DR1 en cada bolsillo está coloreada según el tipo de átomo: carbono y azufre son verdes, el oxígeno es rojo y el nitrógeno es azul. Los bolsillos se ven en el plano del sitio de unión peptídica, hacia el extremo N-terminal del péptido (1 y 6), hacia el extremo C-terminal (4), hacia la región β 1 helicoidal (7) o hacia la α 1 helicoidal (9).

La cadena lateral de la Thr313 del péptido de HA está completamente sepultada en un bolsillo somero, el llamado "6" (figura 13), situado entre la región α 1 helicoidal y la de la lámina β . Se ha visto (Hammer et al., 1.993) que en este bolsillo se acomodan mejor los aminoácidos más pequeños que la treonina, y para el caso concreto del péptido de HA la

sustitución de Thr313 por alanina aumenta la afinidad de unión (Jardetzky et al., 1.990; Hammer et al., 1.992).

La cadena lateral de la leucina 314 de HA se acomoda en un bolsillo no muy hondo (el "7") a lo largo de la hélice de la cadena β , pero este aminoácido sólo está parcialmente incrustado en tal bolsillo. No parece que este bolsillo contribuya de manera protagonista a la especificidad peptídica de HLA-DR1, pero puede ser importante en otros alelos.

La molécula de leucina 316 se acopla bien en un pequeño bolsillo hidrofóbico (el llamado "9"), en el que parece que los residuos hidrofóbicos son mejor aceptados que los de otra naturaleza.

En general, los cuatro bolsillos minoritarios son más pequeños, menos profundos, menos hidrofóbicos y más permisivos en las cadenas laterales que acomodan (Hammer et al., 1.992). Junto con el requerimiento de un gran residuo hidrofóbico en el bolsillo "1", las preferencias de unión en estos cuatro bolsillos menores parecen determinar la mayor parte de la especificidad peptídica de HLA-DR1.

Otras varias cadenas laterales del péptido de HA contactan con HLA-DR1 pero no se unen a bolsillos, aunque pueden contribuir, no obstante, a la unión por medio de interacciones con los residuos superficiales de HLA-DR1.

A la molécula de HLA-DR1 pueden unirse un gran número de diferentes secuencias peptídicas con alta afinidad y las interacciones desfavorables en uno o en más bolsillos pueden compensarse con interacciones favorables en otros lugares del péptido.

En cuanto a los aminoácidos integrantes del PBR, se ha visto que en los loci DQA son un total de 16 y ocupan las posiciones 26, 28, 35, 41, 51, 53, 54, 56, 57, 62, 66, 69, 70, 73, 76 y 77. En los alelos de DQB hay un total de 10 aminoácidos integrantes del PBR, y son los que se sitúan en las posiciones 28, 30, 37, 38, 57, 61, 67, 70, 71 y 74. En los loci de DRB esta función atañe a los 16 aminoácidos encontrados en las posiciones 9, 11, 13, 28, 30, 37, 38, 57, 61, 67, 70, 71, 74, 78, 82 y 86 (Andersson et al., 1.991; Zhu et al., 1.991; Sigurdardóttir et al., 1.992). El plegamiento de la proteína para rendir una determinada conformación tridimensional es lo que permite que estos aminoácidos se encuentren físicamente próximos, pese a que, en términos secuenciales, pueden estar relativamente separados.

Los codones que codifican los aminoácidos del PBR están sujetos a cambios mutacionales que pueden ser de naturaleza sinónima o no sinónima. Diversas fuentes (Hughes y Nei, 1.988; Hughes y Nei, 1.989; Hughes et al., 1.996a) han comprobado que en esta región hay un predominio de las sustituciones no sinónimas, lo que constituye un hecho

de gran trascendencia de cara a afrontar el estudio del polimorfismo y de la evolución de los genes MHC-DRB, como se verá en otros apartados de este trabajo.

1.3.3.- Interacciones del PBR de los antígenos de clase II con el TCR

El receptor de las células T reconoce, de cara a su unión, elementos moleculares tanto de HLA-DR1 como del péptido derivado de HA (Stern et al., 1.994). Algunos residuos del complejo HLA-DR1/péptido que pueden interactuar con el TCR han sido identificados mediante estudios de mutagénesis. Las sustituciones de los residuos del péptido de HA, cuyas cadenas laterales no están incrustadas en los bolsillos definidos con anterioridad (Lys307, Val309, Lys310, Asn312 y Lys315), o las de los residuos HLA-DR que forman el punto más elevado de la estructura (Leu β 67, Gln β 70 y Arg β 71; 1.991; Coppin et al., 1.993), alteran el reconocimiento del complejo por varios clones celulares T. Todos ellos son residuos expuestos y su sustitución alteraría directamente la superficie del complejo HLA-DR1/péptido que interactúa con el receptor de las células T.

Las sustituciones de los residuos ocultos también pueden alterar el reconocimiento de las células T, al haberse visto que la sustitución de los residuos que corresponden a HLA-DR1 β 30 (Boehncke et al., 1.993) y β 86 (Ong et al., 1.991; Newton-Nash y Eckels, 1.993) o de los residuos peptídicos que se asocian con la Tyr308 (Busch et al., 1.991) alteran el reconocimiento de las células T con efectos mínimos en la unión peptídica. La localización de estos residuos en regiones ocultas de la estructura molecular sugiere que su sustitución debe tener un efecto indirecto, por alteración de la superficie que contacta directamente con el TCR. En principio, cualquier alteración en el sitio de unión podría comunicarse al TCR a través del péptido unido.

Paralelamente a estos estudios, Kuchroo y colaboradores (1.994) determinaron la identidad de los aminoácidos que, tanto en el TCR, como en la molécula MHC de clase II murina interaccionaban para formar un complejo unido. Los análisis que llevaron a cabo subrayaron la importancia de los residuos 144 (Trp) y 147 (His) en la molécula de TCR, y de los residuos 145 (Leu) y 148 (Pro) en la estructura de MHC de clase II (IA^S).

1.3.4.- Comparación de las uniones peptídicas de los PBR de las clases I y II

Pese a las semejanzas estructurales que los PBR de las moléculas de clase II guardan con los de clase I, parecen haber evolucionado para unir péptidos de manera muy diferente a como lo hacen estos últimos. Las proteínas de clase II se unen a péptidos de longitud aparentemente arbitraria, usando residuos conservados distribuidos a lo largo del sitio de unión, el cual establece puentes de hidrógeno con la cadena principal del péptido unido, en toda su longitud. La conformación de los péptidos unidos a las moléculas de clase II parece, generalmente, estar restringida.

En el extremo N-terminal del sitio de unión de la molécula de clase II, una corta cadena extendida permite la formación de puentes de hidrógeno entre los residuos de HLA y el péptido, y orienta las cadenas laterales de HLA de tal manera que no interfieren estéricamente con los extremos N-terminales del péptido.

¿Por qué se han adaptado de manera tan distinta las estructuras de clase I y las de clase II? Los antígenos de clase II se unen a péptidos que encuentran en los compartimentos endosómico o lisosómico en los que ocurren procesos proteolíticos, y su capacidad para unirse a péptidos largos que se extienden por fuera de los extremos de la valva de unión permite la posibilidad de que ocurra un desplegamiento parcial y un procesamiento proteolítico del antígeno mientras éste aún se halla unido a la molécula MHC de clase II (Stern et al., 1.994). Por el contrario, las proteínas de clase I se unen a péptidos en las cisternas del retículo endoplásmico y pueden haber evolucionado para unirse a péptidos cortos a través de una coevolución con la maquinaria proteolítica que genera péptidos en el citoplasma, o con transportadores que transportan péptidos al retículo endoplásmico.

A pesar de las diferencias en la unión peptídica entre ambos tipos de moléculas de histocompatibilidad, su afinidad de unión es similar, siendo sus constantes de disociación del orden de nanomolar. El PBR más largo de las moléculas de clase II supone una superficie de contacto mayor, ofreciendo la posibilidad de requerir una especificidad menor en cada contacto.

1.4.- El sistema HLA: procesamiento antigénico y presentación

De manera general, las moléculas de HLA de clase I presentan péptidos originados en la proteólisis de proteínas intracelulares (la llamada ruta endógena; Bjorkman et al., 1.987; Goldberg y Rock, 1.992), mientras que las moléculas HLA de clase II presentan péptidos de antígenos extracelulares (la ruta exógena; Neefjes et al., 1.990; Cresswell, 1.994; Germain, 1.995) o, en menor medida, de las proteínas endógenas que acceden a los endosomas.

La asociación de los péptidos con las moléculas de MHC ocurre en organelas intracelulares específicas, y la interacción de los péptidos con los antígenos de las clases I y II tiene lugar en sitios diferentes dentro de la célula (Babbitt et al., 1.985; Allen y Unanue, 1.987; Cresswell et al., 1.990).

Después de la síntesis en el RER, ambas clases de antígenos, I y II, se transportan al complejo de Golgi: los de clase I lo hacen asociados al péptido antigénico; los de clase II viajan unidos a la llamada cadena invariable (Ii; Roche y Cresswell, 1.990; Liang et al., 1.996). Es en los golgiosomas donde se secretan los antígenos de clase I y II; las moléculas de clase I son transportadas directamente a la membrana celular, y las de clase II llegan al compartimento lisosómico (Germain y Rinker, 1.993; Wolf y Ploegh, 1.995).

El procesado del antígeno incluye su degradación en fragmentos peptídicos. Sólo una minoría de fragmentos peptídicos de un antígeno proteico es capaz de unirse a una determinada molécula MHC. Además, las distintas moléculas de MHC se unen a diferentes series de péptidos (Rudensky et al., 1.991).

Las células son capaces de presentar no sólo los antígenos extraños, sino también fragmentos peptídicos de sus propias moléculas. Sin embargo, en condiciones normales, el individuo no reacciona contra estas moléculas propias a causa de los mecanismos que producen autotolerancia (Deng et al., 1.993).

1.4.1.- Asociación MHC de clase I/péptidos

Las células T CD8⁺ reconocen péptidos que habitualmente derivan de antígenos proteicos procesados dentro de las células y que son posteriormente expresados en la superficie de las mismas, asociados a las moléculas de clase I del MHC (Keegan y Paul, 1.992), aunque también se han descrito casos de procesamiento de proteínas exógenas para

ser reconocidas por este mismo tipo de linfocitos (Kovacsovics-Bankowski y Rock, 1.995; Norbury et al., 1.995). Ejemplos de proteínas extrañas sintetizadas a nivel endógeno son las proteínas virales y los antígenos tumorales. Los LTC son los principales efectores de la defensa inmunitaria contra los virus y pueden ser importantes en la destrucción inmunitaria de los tumores (Yewdell y Bennink, 1.992). Al contrario de la expresión restringida de las moléculas de clase II, casi todas las células expresan moléculas de clase I y tienen la capacidad de mostrar antígenos peptídicos asociados a estas moléculas de MHC sobre la membrana (Bjorkman y Parham, 1.990). Esto asegura que cualquier célula que sintetice proteínas virales o mutantes puede estar marcada para su reconocimiento y muerte por LTC CD8+ (Miceli y Parnes, 1.993). La generación de complejos péptido-clase I del MHC es una función normal continua de las células que no discrimina entre proteínas propias y extrañas.

La estructura cristalina formada por el complejo HLA-péptido ha revelado que un único producto alélico puede unirse a un amplio panel de péptidos con alta afinidad (Madden, 1.995). El prerrequisito para la entrada de una proteína en la vía de procesamiento que lleva a la asociación del péptido con la clase I del MHC es simplemente la localización en el citosol (Monaco, 1.992).

Los péptidos que se unen a las moléculas de clase I del MHC son generados en el citoplasma por proteólisis antes de la entrada en la vía exocítica que conduce al complejo péptido-MHC hacia la superficie celular (figura 14). El tamaño adecuado de estos péptidos oscila entre 8-11 aminoácidos (Falk et al., 1.991; Latron et al., 1.992; Rammensee, 1.995), estando sus extremos $-NH_2$ y $-COOH$ terminales fuertemente anclados al borde de la hendidura (Madden et al., 1.993), diferenciándose en esto de los péptidos que se unirán a las moléculas de clase II, en los que son los residuos centrales los que interaccionan con la valva de unión. En la práctica, el único requerimiento estructural imprescindible para que el péptido se adapte bien a la hendidura es que el aminoácido del extremo carboxi-terminal sea hidrófobo o tenga carga (Rammensee, 1.995).

Si primeramente las proteínas se rompen en péptidos en el citosol y después entran en la vía exocítica, donde se localizan las moléculas de clase I del MHC, debe haber mecanismos para la proteólisis y para el movimiento de péptidos a través de las membranas limitantes de las organelas exocíticas (Goldberg y Rock, 1.992). Ciertas proteínas codificadas por genes en la región de clase II del MHC (aunque ellas mismas no son, ni estructural, ni funcionalmente, moléculas de clase I ni de clase II) intervienen en la proteólisis de los antígenos proteicos y la entrada de los péptidos en la vía exocítica. Son las proteínas del proteasoma y las de los transportadores TAP (Nijenhuis y Hammerling, 1.996; véase 1.2.2.4).

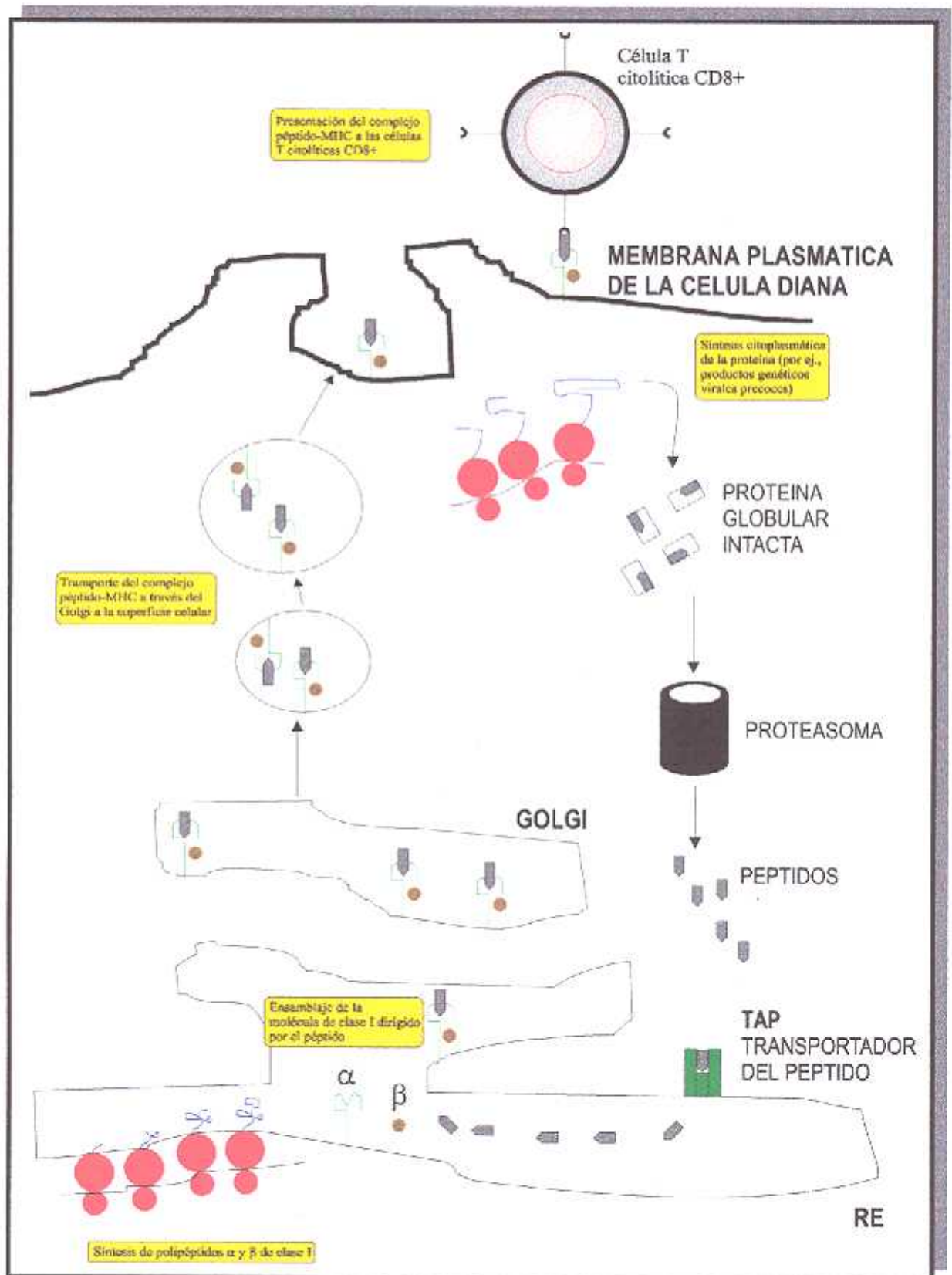


Figura 14.- Vía de presentación de un antígeno (p. ej. viral) sintetizado a nivel endógeno y restringido por la clase I del MHC. Las moléculas de clase I recién sintetizadas se cargan con el péptido y, después del tránsito a través del aparato de Golgi, van directamente a la superficie celular.

Es probable que el proteasoma degrade proteínas citosólicas hasta péptidos (Goldberg y Rock, 1.992; Koopmann et al., 1.997), y que el heterodímero TAP-1/TAP-2 introduzca los péptidos en la vía exocítica donde puedan asociarse a las moléculas de clase I del MHC (Cresswell, 1.994). El único requerimiento específico para que una proteína entre en el proteasoma es que posea una cola de ubiquitina covalentemente unida (Ciechanover, 1.994; Groettrup et al., 1.996).

Los antígenos endógenos (Sant, 1.994) se procesan a péptidos por proteasas citoplásmicas y estos últimos son traslocados, por los productos TAP1 y TAP2, al interior del retículo endoplásmico rugoso (RER). Ya dentro del RER, se cree que los péptidos se asocian eficazmente con las moléculas de clase I recién sintetizadas. Al parecer, el acoplamiento de la cadena pesada del MHC y de $\beta 2m$ está dirigido por los péptidos, ya que los MHC de clase I "vacíos", que carecen de péptidos, son inestables, y la $\beta 2m$ y la cadena pesada se disocian rápidamente a temperaturas fisiológicas. Este ensamblaje también está facilitado por la acción de proteínas chaperonas (moléculas acompañantes de otras y necesarias para que éstas adopten una correcta conformación), destacando entre ellas Hsp60 y Hsp70, que se caracterizan por su falta de especificidad por el sustrato y por no catalizar reacciones de plegamiento específicas; más bien parecen actuar estabilizando la conformación "no nativa" de las proteínas, impidiendo su agregación (Melnick y Argon, 1.995).

El ensamblaje y expresión en la superficie de moléculas de clase I del MHC estables requiere la presencia de péptidos. Las proteínas víricas u otras sintetizadas en el citoplasma son procesadas por complejos de proteasomas. Estos péptidos generados en el citoplasma se transportan, mediante el transportador ABC, al interior del RER donde algunos se asocian con el recién sintetizado complejo clase I- $\beta 2m$ y se estabilizan (Heemels y Ploegh, 1.995). Solamente se unen aquellos péptidos que cumplen los requerimientos espaciales para su acoplamiento en el surco de unión peptídica.

De este modo, la asociación de los antígenos peptídicos con las moléculas de clase I del MHC se debe al tráfico de estos antígenos a través de diferentes compartimentos intracelulares.

No se sabe si los péptidos se transportan al RER en forma de nonapéptidos o como elementos de mayor tamaño que, en este caso, pueden unirse a las moléculas de clase I y recortarse después de la unión. Sea como fuere, el complejo ternario se transporta a la superficie de la célula. Las moléculas de clase I que carecen de péptido unido se disocian (y presumiblemente son degradadas) antes de llegar a la superficie celular, o sobre esta misma.

El tamaño del MHC y la probabilidad de que esta región codifique un cierto número de genes, hasta el momento no descubiertos, suscita la posibilidad de que se encuentren, dentro del MHC, otros genes que intervengan en el procesado y en la presentación del antígeno.

1.4.2.- Asociación MHC de clase II/péptidos

Las células presentadoras de antígenos (APC; *Antigen Presenting Cells*: linfocitos B, células dendríticas, células de Langerhans, macrófagos) convierten antígenos proteicos en péptidos y los presentan en forma de complejos péptido-MHC de una manera que puede ser reconocida por las células T CD4+. La transformación de proteínas nativas en fragmentos peptídicos asociados al MHC por las APC se llama procesamiento del antígeno.

Minutos después de que los antígenos se unan a las APC, entran en las células (Neefjes y Ploegh, 1.992), habitualmente por fagocitosis o por endocitosis mediada por receptores en vesículas cubiertas de clatrina. Los antígenos proteicos solubles pueden ser captados por las APC mediante pinocitosis, sin unirse a la superficie celular. Tales antígenos internados se localizan en vesículas intracelulares rodeadas de membrana llamadas endosomas (Wolf y Ploegh, 1.995). La vía endosomal de tráfico de proteínas en la célula es continua y termina en el lisosoma.

El procesamiento de los antígenos que penetran en una APC desde el medio extracelular suele dar lugar a fragmentos peptídicos de esas proteínas asociados a moléculas de clase II del MHC (figura 15). Muchos de los péptidos generados tienen 10-30 aminoácidos de longitud y son capaces de unirse a las hendiduras de unión al péptido (Stern et al., 1.994; Rammensee, 1.995). Estos antígenos exógenos comprenden las proteínas sintetizadas por bacterias extracelulares, hongos y parásitos, y proteínas tomadas por vía oral.

Las cadenas de clase II α y β residen, en un primer momento, antes de su unión al antígeno, dentro del retículo endoplásmico rugoso en forma de complejos con un elemento proteico no polimórfico de 31 Kd, la cadena invariable (Ii; figuras 15 y 16). Esta proteína se codifica por un gen fuera del MHC, y es un chaperón que no sólo condiciona el plegamiento de los heterodímeros MHC de clase II sino también su migración dentro de las células y, por último, su carga peptídica (Roche y Cresswell, 1.990). Esta proteína es inusual en tanto en cuanto, a diferencia de lo visto en antígenos MHC y en los anticuerpos, es su extremo amino-terminal el que está orientado hacia el citosol, mientras que la porción carboxi-terminal se si-

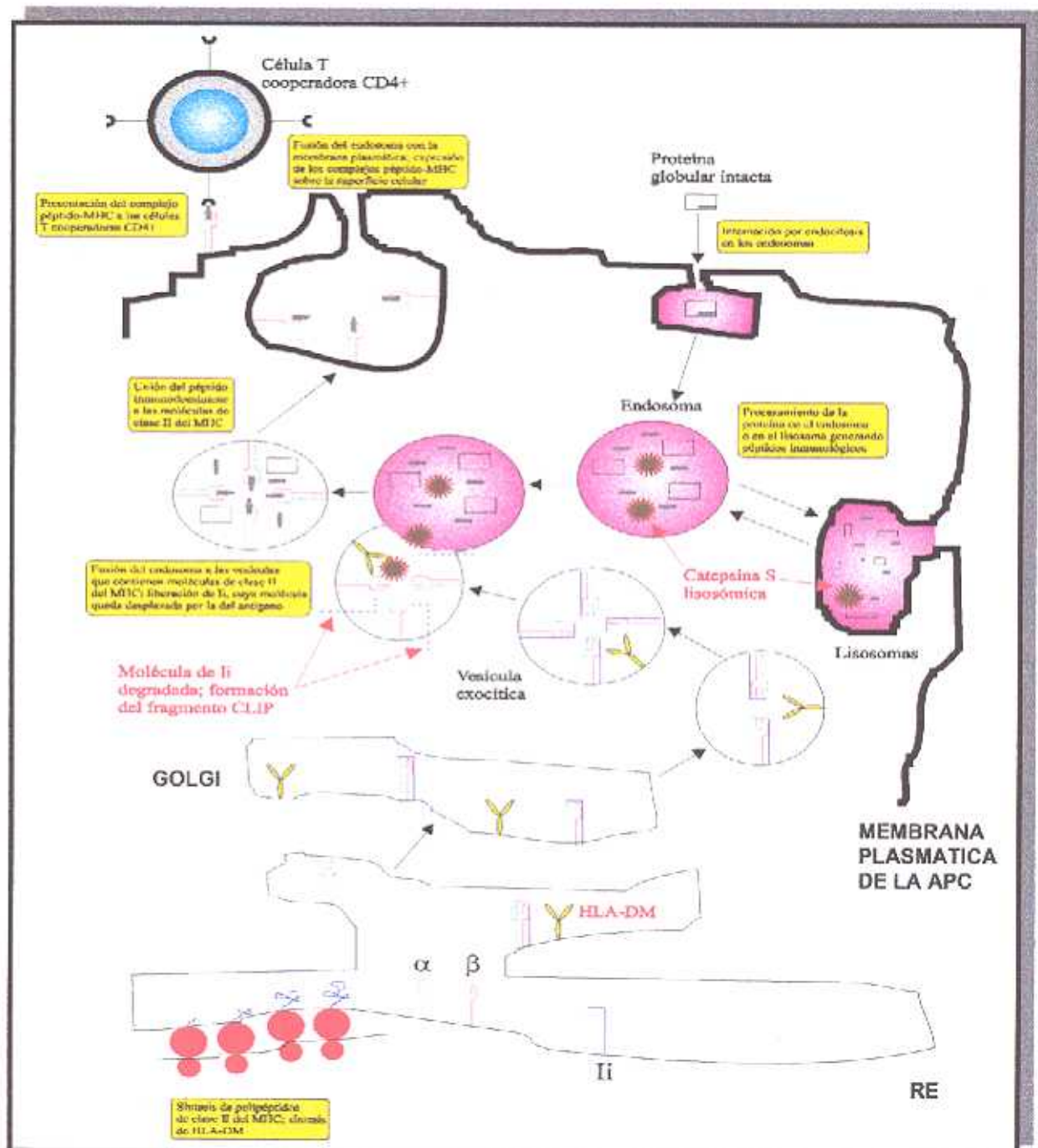


Figura 15.- Vía de presentación restringida por la clase II del MHC de un antígeno proteico exógeno. Las proteínas endocitadas son degradadas tanto por endo- como por exopeptidasas. La desnaturalización por acidificación y la reducción de los puentes disulfuro promueven la degradación, pero el patrón de fragmentación depende frecuentemente (si no siempre) de la captura de fragmentos y/o péptidos por los dimeros MHC de clase II. La actividad catepsina S en células B y en células dendríticas media el rápido procesamiento de II hacia la formación de CLIP (véase texto) u otros derivados, posibilitando así que los dimeros de MHC II se carguen con el péptido, ya sea en los endosomas o en otras vesículas no lisosómicas enriquecidas con MHC de clase II. Los niveles de HLA-DM también están implicados en la rapidez del intercambio II/péptido. HLA-DM parece asociarse con los dimeros MHC de clase II incluso después de la disociación del fragmento CLIP, ayudando a estabilizar los dimeros hasta que se carguen con los péptidos. Los péptidos que no pueden ser cargados en los endosomas o que son generados sólo después de una exposición prolongada a las proteasas pueden ubicarse en los lisosomas (embolsamiento de color morado en la parte derecha de la figura). Dibujo basado en un esquema de Chapman (1.998).

túa en la luz del retículo o de las vesículas intracitoplasmáticas. Estructuralmente, y según el tipo celular en el que sea procesado su ARNm, esta proteína puede presentar, o no, un dominio inhibidor de proteasas (Bevec et al., 1996). Las células dendríticas carecen de ella (Brachet et al., 1997).

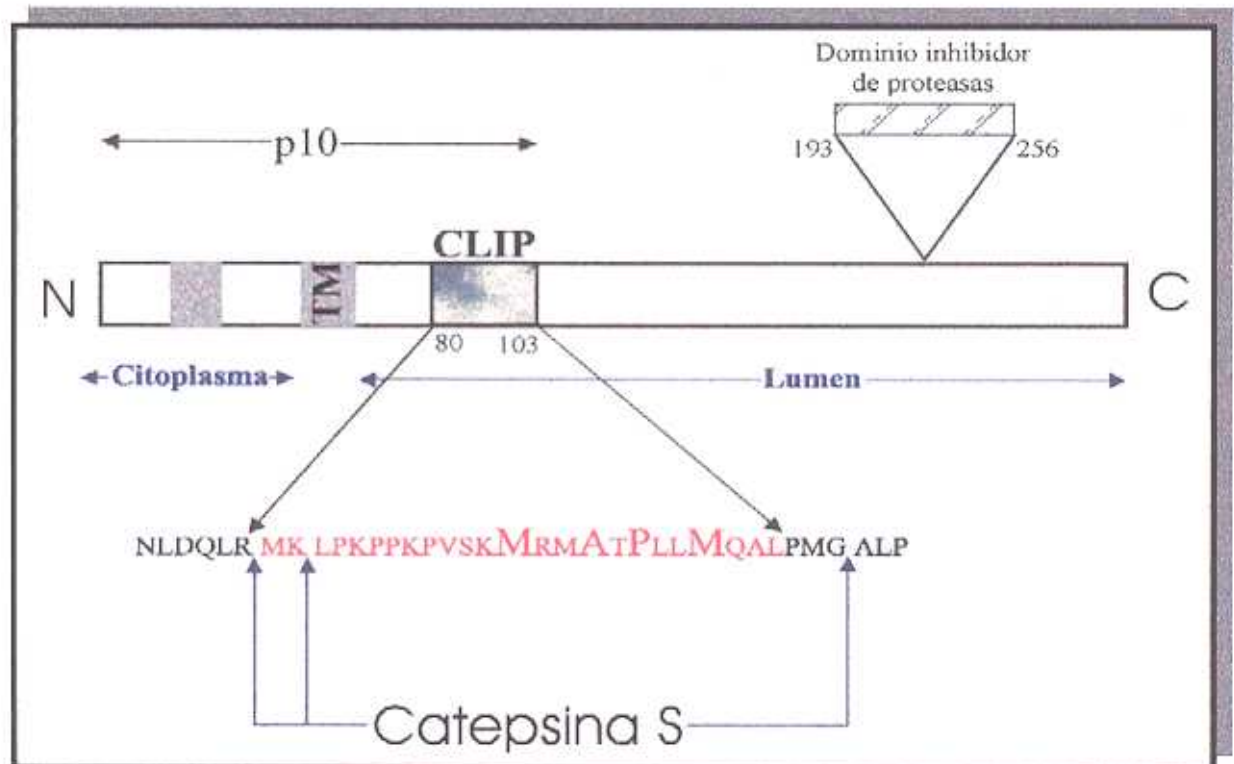


Figura 16.- Rasgos estructurales de la cadena invariable. Se indican los componentes estructurales más importantes de Ii: las secuencias citoplasmáticas que se requieren para el tráfico endosómico (segmento gris de la porción citoplasmática), el dominio transmembrana (TM), el péptido de cadena invariable asociado a clase II (CLIP, cuya secuencia aminoacídica se ha representado en rojo; véase texto), y un dominio inhibidor de proteasas, opcional, codificado por un exón único, y que se elimina en los ARNm de Ii en algunos tipos celulares, como, p. ej., las células dendríticas. El fragmento p10 abarca desde el extremo amino (N) de Ii hasta el extremo carboxilo (C) de CLIP; este fragmento se acumula, asociado a MHC de clase II, en ausencia de catepsina S. Con flechas azules se indican los probables sitios de escisión, en sus dos extremos, del fragmento CLIP, por medio de la catepsina S. Los aminoácidos que, dentro de CLIP, se han representado con letras más grandes, son los encargados de anclar Ii dentro de la hendidura de unión peptídica de varios heterodímeros MHC de clase II. Dibujo basado en un esquema de Chapman (1.998).

La porción luminal de Ii tapa la hendidura de unión peptídica de los heterodímeros, evitando cargas prematuras de péptidos, pero requiriendo ulteriormente su degradación proteolítica para una eficiente captura del fragmento peptídico antigénico (Roche y Cresswell, 1.990; Momburg et al., 1.993). Si no hay tal degradación se produce una acumulación del llamado fragmento p10, unido a las moléculas de MHC de clase II (Fineschi et al., 1.996; Sanderson et al., 1.996; figura 16).

El complejo $\alpha\beta$ -Ii se transporta a un compartimento ácido endosómico o lisosómico, donde se produce el contacto con el antígeno exógeno que, a su vez, ha sido capturado por

endocitosis (Teyton et al., 1.990). Este encuentro da lugar al reemplazo de Ii (Momburg et al., 1.993), el cual se separa de la molécula MHC de clase II por las enzimas proteolíticas y el pH bajo imperantes en este compartimento; al mismo tiempo, la unión del péptido antigénico a la hendidura de unión está mediada por la llamada proteína BiP (Immunoglobulin heavy chain *binding* protein; Proteína de unión a la cadena pesada de la inmunoglobulina) y por la calnexina (Anderson y Cresswell, 1.994), además de por otros chaperones [(α/β)3Ii3; Roche y Cresswell, 1.991; Cresswell, 1.994] que ayudan a la estabilización y el correcto ensamblaje de complejos proteicos nonaméricos. El complejo $\alpha\beta$ -péptido pasa 1-3 horas en este compartimento antes de alcanzar la superficie celular (Germain y Margulies, 1.993; Margulies, 1.997). Los complejos péptido-molécula de clase II del MHC se transportan entonces a la superficie de las APC donde se expresan.

En 1.997, Tan y colaboradores evidenciaron que las últimas etapas del tráfico molecular que controlan la capacidad de la molécula de clase II para acceder a los antígenos están reguladas por el segmento 80-82 de las cadenas β de MHC de clase II.

Un cambio conformacional puede acompañar a la unión peptídica. Los perfiles de estabilidad térmica indican que la unión del péptido incrementa significativamente la estabilidad térmica de los heterodímeros vacíos, tanto en un medio neutral como suavemente ácido (Reich et al., 1.997). La forma vacía de las moléculas de clase II es significativamente más estable que la de las proteínas MHC de clase I. La marcada estabilidad exhibida por sus formas vacías, así como su resistencia a los pH bajos, se correlaciona bien con la capacidad de las moléculas de clase II para atravesar y unir péptidos en las vesículas endosomales ácidas.

En cuanto a lo tocante a las enzimas proteolíticas endosómicas, tienen, por lo menos, dos claros papeles en la función MHC de clase II: generación de péptidos antigénicos y procesamiento de la cadena invariable no polimórfica (Ii).

El fragmento de Ii resultante de la degradación proteolítica es el péptido CLIP (*Class II-associated Invariant Peptide*; Péptido Invariable asociado a Clase II; figura 16), de 24 aminoácidos de longitud (segmento aminoacídico 80-103 de Ii), el cual seguirá ocupando la hendidura de unión gracias a los aminoácidos M92, A95, P97 y M100 (Sinigaglia y Hammer, 1.994; Ghosh et al., 1.995; figura 16), hasta que sea eliminado y físicamente desprendido con la participación de otra molécula codificada por MHC, DM (Weenink y Gautam, 1.997; figura 15). La interacción del heterodímero DMA/DMB con la molécula de clase II, junto a la acidez del compartimento lisosómico, posibilita la subsiguiente rápida carga de péptidos

derivados de antígenos de alta afinidad dentro de la hendidura de MHC de clase II (Denzin y Cresswell, 1.995; Sloan et al., 1.995). Los complejos estables ya cargados con el fragmento peptídico están listos para salir de los compartimentos endocíticos y presentar sus antígenos peptídicos a células T colaboradoras específicas en la superficie celular.

Katz y colaboradores estudiaron en 1.996 las consecuencias de la expresión conjunta de Ii y de HLA-DM sobre la funcionalidad del MHC de clase II. Ii bloquea la unión peptídica en el retículo endoplasmático y posibilita la localización de MHC en los compartimentos endocíticos. Se piensa que HLA-DM actúa primariamente en los endosomas para promover la disociación del péptido derivado de Ii (CLIP) del bolsillo de unión del antígeno de clase II y la subsiguiente carga peptídica (Morris et al., 1.994). En este mismo estudio se evaluó el papel funcional de Ii y de DM al examinar su impacto sobre la expresión superficial de los epítomos reconocidos por un amplio panel de células T alorreactivas. Se vio que la mayoría de los epítomos estudiados estaban influenciados tanto por Ii como por DM. Más sorprendente aún fue encontrar que la expresión superficial de una fracción significativa de complejos clase II-péptido resultaba más entorpecida que favorecida por la expresión de genes DM dentro de las APC. DM podría tener una función más generalizada que la de modificar el conjunto de péptidos que son presentados por antígenos de clase II. Esta modificación puede ser positiva o negativa, sugiriendo que DM juega un papel especificador en la exposición de péptidos presentados a las células T CD4+ (Bertolino y Rabourdin-Combe, 1.996).

Una vez alcanzada la superficie celular, el fragmento antigénico unido a moléculas MHC de clase II será expuesto y presentado a las células T CD4+ (Bjorkman et al., 1.987; Cresswell, 1.994). Han logrado esclarecerse las reglas básicas que determinan cómo las APC muestran determinantes antigénicos a las células T coadyuvantes para regular las respuestas inmunes. El paso inicial en la presentación de un antígeno proteico exógeno es la exhibición del antígeno procesado y unido a la hendidura de la molécula de MHC de clase II, sobre la membrana celular de una APC (figura 17). Esta etapa de reconocimiento implica a la estructura tripartita formada por el TCR, la molécula de MHC y el péptido acoplado dentro de la hendidura de la molécula de MHC.

Recientes análisis estructurales (Feng et al., 1.996; Magee y Sayegh, 1.997) de los complejos péptido-MHC de clase II revelan que un péptido antigénico se une a MHC en una única conformación y que las cadenas laterales que se anclan en los bolsillos de unión parecen no llegar a contactar con el TCR, pues quedan embutidos en los bolsillos de la hendidura de unión.

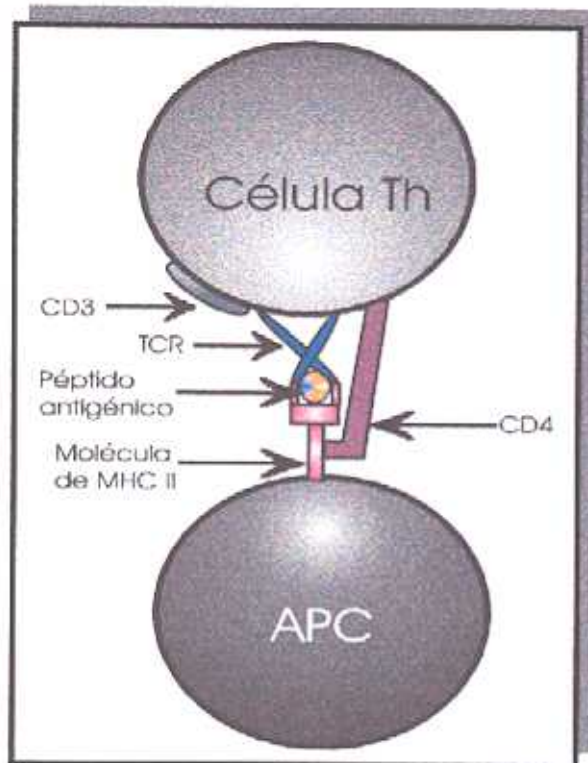


Figura 17.- Esquema que muestra el momento en que una célula T cooperadora reconoce al péptido extraño que le es mostrado por la APC. La presentación del péptido se hace por medio de la molécula MHC de clase II ubicada en la membrana de la APC. La molécula CD4 del linfocito Th interactúa con una región no polimórfica (el dominio $\beta 2$) de los antígenos de histocompatibilidad de clase II. La molécula de CD3 también se encuentra asociada al receptor de las células T y actúa como transmisora de la señal de activación al interior de la célula.

En lo tocante a la molécula correceptora, CD4, Li y colaboradores (1.997) han identificado un bolsillo de su superficie molecular como un epítipo funcional implicado en la interacción CD4-MHC de clase II y en la activación celular T.

Las células T reconocen el antígeno por formación de un complejo trimolecular en el cual el TCR reconoce un antígeno péptido-específico dentro de la hendidura de una molécula MHC. Se ha asumido generalmente que el reconocimiento celular T de distintos complejos MHC-antígeno es debido a similitudes en la estructura tridimensional de estos complejos (Ausubel et al., 1.996). Estos mismos autores demostraron que las sustituciones aminoácidas conservadas del péptido antigénico en los residuos de contacto predominantes del TCR, en las posiciones 91 y 93, suprimen totalmente la reactividad de los clones celulares T específicos. Más aún, cuando una sustitución conservadora se efectúa en la posición 91, concomitantemente a una sustitución no conservadora en la posición 93, los clones de células T recobran una reactividad equivalente a la del péptido estimulador original. Así, la naturaleza exacta de las cadenas laterales aminoácidas que se engranan sobre un bolsillo funcional de TCR puede cambiar la selectividad aparente de los otros bolsillos funcionales predominantes en TCR, sugiriendo así un marcado grado de plasticidad del receptor. Esta capacidad del complejo trimero TCR-péptido-MHC para experimentar cambios conformacionales proporciona un marco de trabajo conceptual para reconciliar la aparente

paradoja de la selectividad extrema del TCR y su acentuada reactividad cruzada con diferentes complejos MHC-péptido (Garboczi et al., 1.996).

1.5.- Polimorfismo del sistema MHC

El polimorfismo se define como la ocurrencia regular y simultánea en la misma población de dos o más alelos en el mismo locus en frecuencias que no pueden ser explicadas sólo por mutación recurrente. En el reino animal es probable que el sistema MHC tenga el más alto grado de polimorfismo. De hecho, un rasgo característico del MHC es el grado extremo de polimorfismo que muestra en sus productos proteicos (Bjorkman y Parham, 1.990), reflejo también de una gran diversidad codificadora: en el conjunto de una población considerada, cada uno de los loci genéticos presenta un alto número de alelos. Es por esto por lo que dos individuos no relacionados tienen una probabilidad muy baja de tener idénticos sus sistemas HLA (o, en general, MHC, en individuos no humanos).

Existen nueve loci diferentes para los genes HLA-DRB, que comprenden cuatro loci expresados (DRB1, 3, 4 y 5) y cinco pseudogenes (DRB2, 6, 7, 8 y 9; Bodmer et al., 1.992).

Dentro de una determinada molécula de clase I o II, el polimorfismo estructural se agrupa en determinadas regiones de la molécula. La variabilidad de la secuencia de aminoácidos en los antígenos de clase I se agrupa en tres regiones principales de los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$; el dominio $\alpha 3$ está mucho más conservado. En las moléculas de clase II, la extensión de la variabilidad depende de la subregión y de la cadena polipeptídica. Así, por ejemplo, dentro de las moléculas humanas de clase II, la mayor parte del polimorfismo tiene lugar en las cadenas β de DR y de DQ, mientras que estas mismas cadenas, en DP, son ligeramente menos polimórficas. $DQ\alpha$ es polimórfica, mientras que las cadenas $DR\alpha$ son invariables (no se ha encontrado variabilidad alélica en el locus codificador de DRA) (Kelly et al., 1.991; Trowsdale et al., 1.991). En las poblaciones exogámicas, donde los individuos poseen dos haplotipos MHC, pueden producirse moléculas híbridas de clase II, con una cadena procedente de cada haplotipo, lo que genera una diversidad estructural sobreañadida en las moléculas expresadas.

Es en el segundo exón de los genes DRB donde se ha localizado la mayor variabilidad de secuencias encontrada en todo el sistema MHC. Concretamente, en este exón se han identificado tres regiones hipervariables (RHV; Wu et al., 1.987). La 1ª región abarca desde el nucleótido -4 hasta el 29 (aminoácidos 4 al 14); la 2ª región comprende los nucleótidos 63

al 79 (residuos aminoacídicos 26 al 37); y la 3ª región es la que se extiende desde el nucleótido 186 hasta el 209 (aminoácidos 67-74; Korman et al., 1.985; Bell et al., 1.987; Bidwell, 1.988).

La mayoría de los aminoácidos polimórficos en los antígenos de clases I y II se agrupan sobre la cima de la molécula, en el gran surco que actúa como sitio de unión al péptido antigénico (Gyllensten et al., 1.991b; Lundberg y McDevitt, 1.992). De este modo, la variación se centra casi exclusivamente en la base de dicho surco, o bien sobresaliendo a ambos lados de la región alfa-helicoidal.

La naturaleza del polimorfismo en los loci MHC difiere de la de otros loci nucleares por presentar (Andersson y Mikko, 1.995):

- a) Un gran número de alelos por locus.
- b) Una gran variabilidad entre los alelos, con alelos individuales que difieren en numerosas posiciones.
- c) Una distribución de frecuencias alélicas en las poblaciones con muchos alelos en frecuencias intermedias, bastante más que la característica distribución de frecuencias de la mayoría de los loci nucleares.

Este polimorfismo incrementa la capacidad para unirse a péptidos de diferentes orígenes, facilitando el reconocimiento de muchos patógenos diferentes y un mejor reconocimiento de ese péptido por medio de las células colaboradoras y una respuesta inmune potenciada (Buus et al., 1.987). Se asume así que la presencia del polimorfismo representa un activo que confiere ventaja selectiva (Hughes y Nei, 1.988; Hughes y Nei, 1.989) y que un heterocigoto para dos alelos diferentes en un locus tendrá, por consiguiente, resistencia a dos tipos diferentes de patógenos y, en consecuencia, tendrá una adaptabilidad más alta que la de un homocigoto para cada uno de esos alelos. Si este posicionamiento es acertado, los heterocigotos para muchos loci tendrían una adaptabilidad superior que aquellos individuos con un número pequeño de loci. Podría esperarse que un sistema genético con muchos loci polimórficos evolucionaría favorablemente. Sin embargo, en la práctica, el número de loci polimórficos es relativamente pequeño, y parece haber dos razones para esto:

- a) Un mismo producto alélico puede reconocer muchos péptidos extraños diferentes, con tal de que compartan un cierto motivo estructural, siendo así que un número relativamente pequeño de antígenos MHC por individuo es suficiente para protegerse efectivamente frente a varios patógenos (Sette et al., 1.988; O'Sullivan et al., 1.991).

b) Si hay demasiados loci polimórficos, la proporción de células T que sería eliminada para evitar autoinmunidad llegaría a ser tan alta que podría llegar a ser incompatible con la vida (Bontrop et al., 1.995).

De hecho, se ha visto que determinadas especies exhiben sólo un polimorfismo limitado de los loci MHC (Darden y Streilein, 1.984; Ellegren et al., 1.996) sin que ello afecte a su supervivencia a corto plazo.

1.5.1.- Serología

Para que un alelo sea reconocido por las técnicas serológicas es necesario tener la disponibilidad de sueros poli- o monoclonales que permitan el reconocimiento de dicha especificidad en diferentes laboratorios. Las nuevas especificidades son revisadas oficialmente cada cuatro años en los llamados Talleres Internacionales de Histocompatibilidad. En el último de éstos (Francia, 1.996) han sido reconocidos oficialmente 27 variantes serológicas de HLA-A, 59 de HLA-B, 10 de HLA-Cw, 26 de HLA-Dw, 6 de HLA-DP, 9 en HLA-DQ y 24 para HLA-DR.

Las técnicas de microlinfocitotoxicidad son usadas para tipificar los tres genes de clase I clásicos, así como HLA-DQ y -DR, mientras que HLA-Dw se tipifica en cultivos mixtos de linfocitos frente a un panel de células homocigotas. Por último, HLA-DP es tipificado en respuesta a cultivos secundarios.

Aunque en el brazo corto del cromosoma 6 humano se han mapeado 9 loci DRB, un cromosoma (haplotipo) individual contiene solamente entre uno y cinco loci (Böhme et al., 1.985) y se clasifica dentro de uno de los cinco grupos haplotípicos principales DR, que han sido identificados tomando como base la especificidad serológica expresada por el locus polimórfico DRB1 y por la presencia de un conjunto característico (Svensson et al., 1.996) de genes DRB (figura 18). Estos cinco grupos haplotípicos principales de DR son:

- a) El grupo DR1, que expresa las especificidades serológicas DR1, 10 y 103.
- b) El grupo DR51, que expresa las especificidades serológicas DR15 y 16.
- c) El grupo DR52, que expresa las especificidades DR3, 11, 12, 13, 14, 1403 y 1404.
- d) El grupo DR53, que expresa las especificidades serológicas DR4, 7 y 9.
- e) El grupo DR8, que expresa la especificidad DR8.

La región DR también contiene un único gen DRA monomórfico.

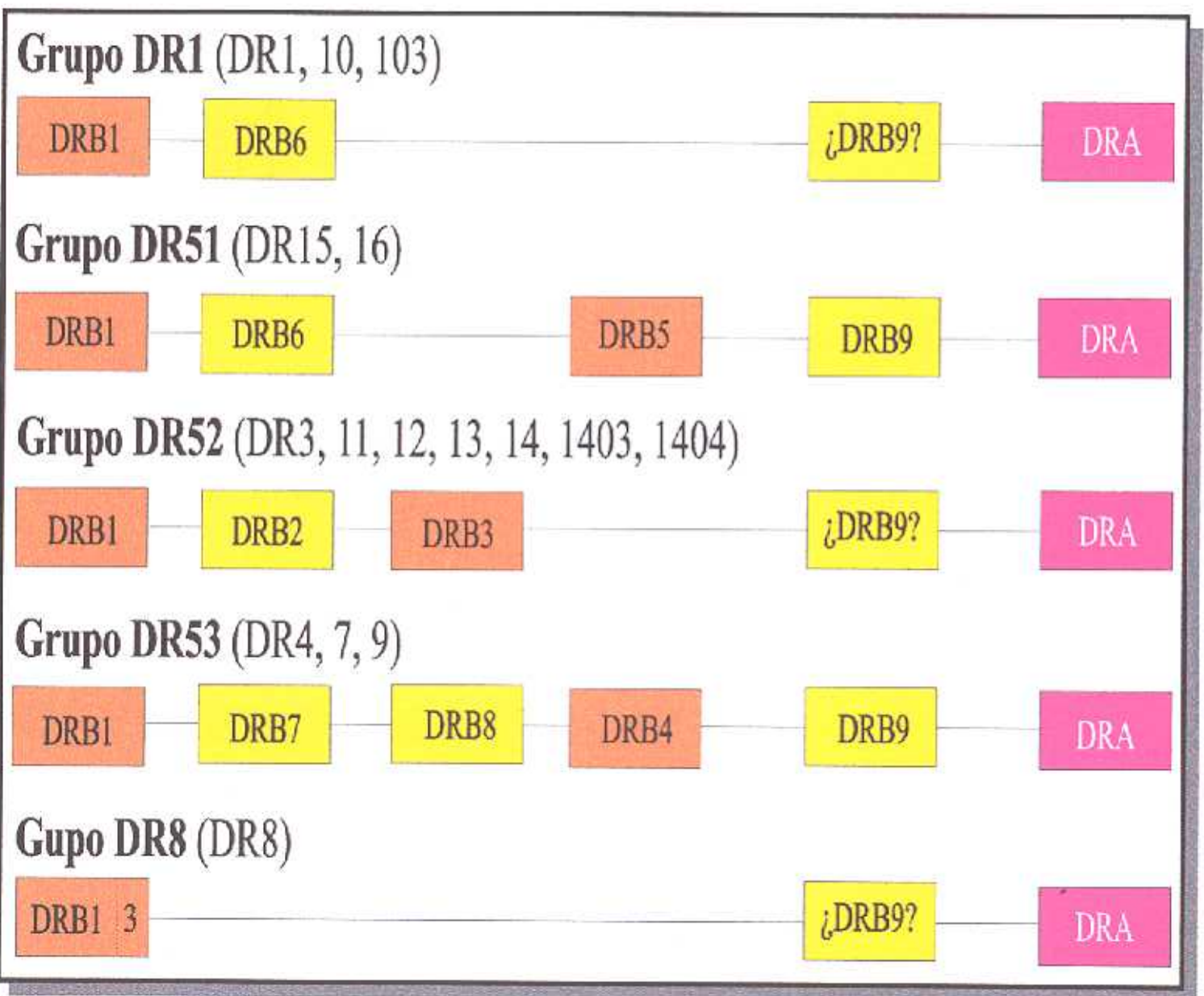


Figura 18.- Organización génica de DRB. Tomando como base la especificidad serológica polimórfica expresada por el locus DRB1, se han identificado cinco grupos principales de haplotipos DR. Aquí se muestran de manera esquemática los distintos genes (en naranja) y pseudo genes (en amarillo) DRB que pueden presentarse combinados en un determinado cromosoma (haplotipo), junto con el gen único DRA. Dentro del grupo DR51, la antiguamente llamada especificidad DR2 ha quedado escindida en DR15 y DR16; análogamente, en DR52, las especificidades DR11 y DR12 son las que, antaño, eran conocidas comúnmente como DR5, y es por ello por lo que DR2 y DR5 no se han representado como tal en este esquema, pudiéndose dar una explicación similar acerca de la antigua especificidad DR6. No es segura la presencia de DRB9 en todos estos grupos haplotípicos (interrogantes en las cajas amarillas de DR1, DR52 y DR8).

En la subregión HLA-DR se han observado al menos 21 variantes del locus mayoritario HLA-DRB1, cuya numeración va desde 1 hasta 18, siendo algunas de ellas una subdivisión que se ha encontrado en fechas más recientes de otras anteriormente definidas (como DR11 y DR12, que son subtipos de DR5, y DR15 junto con DR16, que lo son de DR2; por eso es que DR5 y DR2 no son verdaderos alelos, sino conjuntos de alelos diferentes).

1.5.2.- Análisis de restricción y dosis génica.

Con el advenimiento de la tecnología de Southern Blot (Southern, 1.975), empezaron a ser estudiados los denominados polimorfismos de "presencia/ausencia" de lugares de restricción (fragmentos específicos de secuencias nucleotídicas que son reconocidos por endonucleasas de restricción), sobre todo en los antígenos de clase II (Bidwell y Jarrold, 1.986; Bidwell et al., 1.987), lo que permitió la separación de lo que en serología eran identificados como alelos únicos y, por tanto, la definición de nuevos alelos. Si en un ADN concreto está presente el lugar de reconocimiento para una determinada restrictasa, ésta lo cortará, y al proceder al revelado con una sonda para el gen en estudio se observará un patrón de fragmentos diferente que si no estuviese el lugar específico para el reconocimiento de esa endonucleasa de restricción.

El conocimiento progresivo del sistema HLA ha demostrado que el número de bandas obtenido para un determinado haplotipo coincide siempre con el número de genes DR existente en cada cromosoma (Bontrop et al., 1.989). Así, en las células DR8 sólo se obtiene una banda, dos bandas en las células DR1 y DR10, tres bandas en las células DR2, DR3, DR5 y DR6, y cuatro en las células DR4, DR7 y DR9.

La posibilidad de que en un mismo cromosoma se encuentren más de un gen diferente de DRB ha hecho conveniente la necesidad de manejar el concepto de dosis génica. El sistema HLA (y muy especialmente la región HLA-DR) tiene un polimorfismo de dosis génica basado en la existencia de un diferente número de genes (tanto expresados como no) en un cromosoma, según los individuos considerados.

Así, los cromosomas donde su locus DRB1 codifica para los antígenos DR3, DR5 o DR6 tienen una estructura muy similar, con dos genes DRB activos (DRB1 y DRB3, codificador este último de la proteína DR52; Smith et al., 1.996) y el pseudogén DRB2 (Rollini et al., 1.985; figura 18), el cual carece completamente de exón 2 (Andersson et al., 1.987). A este grupo de cromosomas se le denomina genéricamente, "grupo del DR52" (véase 1.5.1). Aún no está clara la presencia del gen DRB9 en este haplotipo.

Análogamente, los cromosomas cuyo gen DRB1 codifica para las proteínas DR4, DR7 o DR9, poseen una estructura genética muy similar con cinco genes DRB diferentes: dos de ellos activos (DRB1 y DRB4, codificador este último de la proteína DR53; véase 1.5.1) y tres pseudogenes (DRB7 y DRB8 y DRB9; Bodmer et al., 1.992; figura 18). El pseudogén DRB7 no tiene ninguna delección, pero presenta varias mutaciones puntuales inactivadoras por generación de codones prematuros de paro (Larhammar et al., 1.985; Andersson et al., 1.994), mientras que DRB8 carece, aparentemente, tanto del exón 1 como del exón 2 (Rollini et al., 1.987; Vincek et al., 1.992).

Los cromosomas cuyo gen DRB1 codifica para proteínas DR2 tienen una estructura similar a los del grupo del DR52 (figura 18), con dos genes activos (DRB1 y DRB5, que codifica para la proteína denominada DR51; véase 1.5.1) y un pseudogén DRB6 (Kawai et al., 1.989), el cual carece de exón 1 (Corell et al., 1.991; Figueroa et al., 1.991; Klein et al., 1.991; Andersson et al., 1.991).

Por otra parte, los cromosomas cuyo gen DRB1 codifica para proteínas DR1 o DR10 parecen tener sólo un gen activo junto al pseudogén DRB6.

Finalmente, los cromosomas cuyo gen DRB1 codifica para proteínas DR8 tienen la estructura genética más sencilla, con un único gen (DRB1). Este dato se correlaciona una vez más con la obtención de una sola banda de restricción en los estudios de RFLP. No obstante, se sabe por serología que las células de tipaje DR8 presentan reacción cruzada con los sueros del grupo del DR52. Esta aparente contradicción queda explicada porque estos cromosomas proceden del grupo DR52, habiendo sufrido una delección que incluye el extremo 3' del primer locus (DRB1), el segundo locus completo (DRB2) y el extremo 5' del tercer locus (DRB3; Gorski et al., 1.989), de modo que su único locus es un híbrido DRB1-DRB3, lo que explica sus reacciones serológicas cruzadas con el grupo del DR52. La presencia en el MHC de gorila de este supuesto haplotipo ancestral corrobora esta hipótesis (Klein et al., 1.991).

Por último, el pseudogén DRB9 (Bodmer et al., 1.992), del que no se tiene seguridad de que esté presente en todos los haplotipos y que está constituido únicamente por un exón 2 de DRB (Meunier et al., 1.986; Haas et al., 1.987) se localiza centroméricamente a DRA y teloméricamente a los demás genes DRB de cada haplotipo. Es posible que la constancia génica de DRB9, a lo largo de los últimos 4 millones de años, sea debida al monomorfismo y conservación evolutiva del adyacente locus DRA (Góngora et al., 1.996; Góngora et al., 1.997).

El haplotipo DR8 es especial puesto que contiene un único gen DRB. Este gen se generó probablemente por una contracción génica ocurrida en un haplotipo primigenio

semejante a DR52, puesto que el gen DRB de DR8 es similar a DRB1 en el extremo 5' y similar a un gen DRB3 en el extremo 3' (Andersson et al., 1.988; Jonsson et al., 1.989; Gorski et al., 1.989; Smith et al., 1.996). La presencia en el MHC de gorila de este supuesto haplotipo ancestral corrobora esta hipótesis (Klein et al., 1.991).

Los distintos genes DRB expresados (DRB1, 3, 4 y 5) muestran un alto grado de similitud dentro de los grupos haplotípicos. Estos análisis filogenéticos son coherentes con que diferentes grupos haplotípicos DR son evolutivamente antiguos (Klein et al., 1.991).

Todos los pseudogenes vistos hasta ahora tienen unas secuencias nucleotídicas altamente divergentes que no han sido sometidas a ninguna presión selectiva y, por consiguiente, han acumulado una sustancial heterogeneidad después de su inactivación.

1.5.3.- Secuenciación de ADN

Con el desarrollo de la tecnología de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR; *Polymerase Chain Reaction*; Saiki et al., 1.985), el estudio de los genes MHC se ha revolucionado en el sentido de que es procedimentalmente sencillo obtener un elevado número de copias de un gen que se quiera analizar y, con posterioridad, emplear estas copias en técnicas de tipaje con oligosondas o en secuenciación de ADN, lo cual ha posibilitado que en los últimos años se hayan secuenciado muchos alelos MHC. Más concretamente, en la subregión HLA-DR se han obtenido hasta la fecha más de 60 secuencias diferentes para los distintos loci HLA-DRB (Bodmer et al., 1.994) y 13 nuevas secuencias Mhc-E (Alvarez et al., 1.997).

Un refinamiento de esta técnica fue desarrollado por Knapp y colaboradores en 1.997, usando una combinación de PCR, Electroforesis en Gel de Gradiente Desnaturalizante (DGGE, *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) y secuenciación directa, lo cual supuso una manera simple y relativamente rápida de identificar alelos DRB para el tipaje tisular, determinando identificación individual y estudios de asociación y susceptibilidad a enfermedades. Esta nueva técnica también podría contribuir a mejorar los estudios de función y evolución del MHC en muchas especies diferentes.

1.5.4.- Alelismo, motivos y linajes

El polimorfismo del sistema MHC no sólo se caracteriza por la presencia de varios loci génicos en un mismo haplotipo (típico de la organización génica de la subregión DR),

sino también porque muchos de esos genes pueden presentar, a nivel poblacional, un gran número de alelos diferentes (Ayala y Escalante, 1.996). Este polimorfismo alélico se caracteriza por múltiples reemplazamientos nucleotídicos entre los alelos.

Este polimorfismo no está distribuido uniformemente por todo el MHC. Así, en el locus HLA-A se han encontrado 25 diferentes alelos; 32 en HLA-B; 11 en HLA-Cw; sólo 4 alelos han sido hallados en el poco polimórfico locus HLA-DPA1; en cambio, se han hallado 19 en DPB1; el locus DQA1 exhibe hasta 8 alelos diferentes, mientras que el gen HLA-DQB1 tiene 13. Entre los diferentes loci que conforman la subregión DR (Bodmer et al., 1.992) se ha visto que DRB1 puede presentarse hasta en más de 60 formas alélicas diferentes (véase 1.5.3). En esta misma subregión, HLA-DRB3, -DRB4 y -DRB5 tienen, respectivamente, 4, 2 y 4 variantes alélicas.

Dentro de un mismo locus, las distintas secuencias alélicas encontradas en él pueden agruparse, según su homología, en linajes (Klein et al., 1.990; McDevitt, 1.995). El agrupamiento en linajes se hace en función de que los alelos considerados compartan ciertas secuencias características, llamadas motivos.

Un motivo MHC puede definirse como una secuencia nucleotídica o aminoacídica de corta longitud, característica de un linaje alélico o de los productos proteicos de tal linaje, los alomorfos. A su vez, un linaje alélico es un grupo de alelos que son más similares entre si de lo que son respecto a los miembros de otros grupos. Un linaje alélico abarca habitualmente secuencias génicas de especies diferentes pero relacionadas, en las que todos los genes así agrupados derivarían de un gen ancestral común que no sería igual al gen ancestral de otro linaje (Klein et al., 1.993a). Aunque los motivos son evidentes tanto en los alineamientos nucleotídicos como en los aminoacídicos, lo habitual es usar casi exclusivamente los motivos aminoacídicos, y ello por dos razones. La primera de ellas es que en el nivel proteico los motivos son más fáciles de identificar puesto que sus secuencias son más cortas y no están sujetas a las ambigüedades derivadas de la degeneración del código nucleotídico. La segunda razón es que si, como se asume generalmente, los motivos tienen una función, es obvio que la secuencia proteica estará más asociada con tal función que la secuencia génica.

Los motivos MHC varían en longitud desde un único aminoácido hasta más de una docena. En algunos motivos, los residuos aminoacídicos compartidos por diferentes linajes alternan con residuos específicos de linaje, mientras que en otros, los residuos específicos de linaje son contiguos (Klein y O'hUigin, 1.994; Klein y O'hUigin, 1.995).

En los genes de clase II el exón 2 es la región donde se da la mayor parte de los motivos. Los motivos son menos abundantes y menos conspicuos en el resto del gen. Esto es

aparentemente así porque, en el segundo exón, ciertas regiones cortas varían más que otras y su variabilidad está condicionada por la presión de la selección positiva (Hughes y Nei, 1.989). Por consiguiente, estas regiones acumulan sustituciones no sinónimas características en una densidad mayor que la encontrada en el resto del gen (véase 1.5.6).

En el caso concreto de las cadenas β de DR, la mayor parte de los motivos se localiza entre las posiciones 9-14, 27-39, 56-58, 65-78 y 84-88. Los dos primeros tramos se localizan en la lámina beta, mientras que los otros tres son parte de la hélice alfa. El extremo NH_2 -terminal de la molécula, así como los giros que conectan los segmentos de lámina beta son relativamente constantes, así como la totalidad de la cadena α . La variabilidad en la molécula DR depende enteramente del dominio $\beta 1$. La concentración de motivos en las regiones implicadas en el sitio de unión al péptido implica que son importantes para la función de la molécula DR. (Klein et al., 1.993b).

No hay motivos compartidos entre los productos proteicos de DR, DQ y DP, lo que puede significar que estas proteínas sirven a funciones diferentes, quizás debido a una diferente especialización sobre diferentes grupos de parásitos (Klein y O'hUigin, 1.995).

1.5.5.- Orígenes y fuerzas selectivas del polimorfismo de MHC

El elevado polimorfismo encontrado en los loci funcionales del sistema MHC lo sitúa totalmente aparte de otros genes conocidos. Se podría pensar que existen unas fuerzas de selección natural específicas que actúan sobre el MHC. Por supuesto, los loci del MHC sufren también selección negativa (eliminación de alelos mutantes, a- o hipofuncionales) como sucede en los demás genes (Klein, 1.987; Barnden et al., 1.997). ¿Se produce en este sistema algún tipo de selección positiva que dé ventajas a los individuos heterocigotos para los diferentes loci? Hay bastantes controversias sobre este punto, con evidencias en contra de esta supuesta selección positiva (Trowsdale et al., 1.989) y estudios estadísticos que se inclinan a favor (Hughes y Nei, 1.988).

Históricamente se han propuesto cuatro hipótesis para intentar explicar la génesis y el mantenimiento del polimorfismo del MHC:

- a) Una tasa de mutación inusualmente alta (Bailey y Kohn, 1.965; Li et al., 1.996).
- b) Recombinación: microrrecombinación, recombinación no recíproca, conversión génica o intercambio genético interloci o intraloci (Widera y Flavell, 1.984; Mengle-Gaw y McDevitt, 1.985; Yeager y Hughes, 1.999).

c) Selección sobredominante (Doherty y Zinkernagel, 1.975; Klein y Figueroa, 1.986).

d) Selección dependiente de la frecuencia (Snell, 1.968; Bodmer et al., 1.971).

Si la generación del polimorfismo del MHC fuera un proceso relativamente rápido, debido por ejemplo a una considerable tasa de mutación [punto (a)] y porque todas esas mutaciones fuesen seleccionadas positivamente, cabría entonces esperar que la mayor parte de la variación en MHC debería ser posterior al origen de las especies y durante algún tiempo se creyó que esta teoría reflejaba la realidad; pero se ha visto que los genes MHC evolucionan a una velocidad relativamente lenta, con la regularidad de un reloj: se necesitan entre 1 y 6 millones de años para que una nueva mutación se incorpore en un alelo MHC, y la tasa de mutación en estos genes es comparable a la vista en otros genes de primates, además de que no todas las mutaciones son seleccionadas favorablemente. Así mismo, las diferencias mutacionales entre genes MHC humanos y murinos no son particularmente altas comparadas con las de otros genes (Hughes y Nei, 1.988), y no pueden explicar el alto grado de polimorfismo (70-90% de heterocigosis) y la larga persistencia de alelos polimórficos en la población (por lo menos 3-10 millones de años; Figueroa et al., 1.988; Lawlor et al., 1.988). De esta manera, la hipótesis de una tasa de mutación inusualmente alta en los loci MHC puede ser descartada, sin perjuicio de que en este sistema génico, como en cualquier otro, la mutación contribuye a un aumento de la variabilidad.

Algunos investigadores han postulado que la generación de polimorfismo dentro de estos genes es debida principalmente a fenómenos de "conversión génica" [punto (b)], llamados también recombinaciones no homólogas o intercambios genéticos inter- o intraloci (Weiss et al., 1.983; Gorski y Mach, 1.986; Wu et al., 1.990; Andersson y Mikko, 1.995; Erlich et al., 1.996). Hay varias líneas de trabajo que se inclinan por la ocurrencia de recombinación intragénica y sugieren que el segmento que codifica la región alfa-helicoidal de las cadenas polimórficas β de clase II es particularmente proclive a la recombinación. En primer lugar, este segmento génico tienen una composición de bases muy rica en GC, con muchos dinucleótidos CpG que pueden promover los intercambios recombinatorios (Jaulin et al., 1.985; Dieckmann y Gandy, 1.987). En segundo lugar, en la región génica limítrofe entre la secuencia codificadora de la lámina beta y la de la hélice alfa se ha descrito un corto segmento que muestra homología con la secuencia de recombinación χ de *Escherichia coli* (Gyllensten et al., 1.991a). Otros trabajos (Ellegren et al., 1.996) también postulan la existencia de la recombinación intergénica como impulsora de un polimorfismo limitado en el sistema MHC de mamíferos.

Pero estas hipótesis también parece tener algunos problemas (Klein y Figueroa, 1.986); en particular, no pueden explicar las diferencias entre d_s y d_n (véase 1.5.6) en diferentes regiones de los genes MHC; y además, en el caso de los genes de clase II es difícil comprender por qué se concentra el polimorfismo en el PBR si la conversión génica es la principal causa del polimorfismo de MHC. Además, los procesos recombinatorios, si son mecanismos generalizados y si se dan entre loci distintos, producirían un conjunto de secuencias con motivos entremezclados que difícilmente podría explicar cómo, en la gran mayoría de los casos, al construir un árbol filogenético, los distintos alelos quedan perfectamente arracimados en función de sus loci o linajes (Klein y O'hUigin, 1.995).

No obstante, el hecho de que se hayan encontrado ciertos linajes, como *HLA-DRB1*08*, en el que su segundo exón procede del linaje *DRB1*03*, mientras que el exón 6 es del gen *DRB3* (Andersson et al., 1.988), hacen pensar en que no pueden descartarse sucesos recombinatorios entre exones diferentes de distintos loci o linajes (Klein y O'hUigin, 1.995; Brunsberg et al., 1.996) aunque, a la vista de esos mismos trabajos, se trataría de un mecanismo de escasa frecuencia en el proceso generador de diversidad del sistema MHC.

El patrón de sustituciones nucleotídicas en estos genes es bastante diferente del encontrado en la mayoría de otros genes, tanto eucariotas como procariontes, en los que la mayoría de las sustituciones son sinónimas, ocurriendo a menudo en la tercera posición nucleotídica de los codones (Nei y Gojobori, 1.986). En los genes MHC de clase I, la tasa de sustituciones no sinónimas es más alta que la de sustituciones sinónimas en los 19 codones que codifican los aminoácidos integrantes del ARS, pero esta relación se invierte en las otras regiones del gen (Hughes y Nei, 1.988; Hughes et al., 1.996b). Puesto que se sabe que la selección sobredominante [punto (c)] incrementa la tasa de sustituciones aminoacídicas, así como la heterocigosidad y, por consiguiente, la extensión del polimorfismo (Nei et al., 1.983), se ha concluido que el polimorfismo de clase I está principalmente causado por selección sobredominante operativa en el ABS

Hughes y Nei (1.988, 1.989) se aproximaron a la cuestión de la selección en los loci MHC cuando compararon las tasas de sustituciones nucleotídicas sinónimas y no sinónimas. Ellos usaron el método de Nei y Gojobori (1.986) para estimar el número de sustituciones nucleotídicas sinónimas por sitio sinónimo (d_s) y el número de sustituciones nucleotídicas no sinónimas por sitio no sinónimo (d_n ; Li et al., 1.996) en diferentes regiones de los genes MHC. Razonaron que si el polimorfismo de MHC se mantiene por selección sobredominante, la cual a su vez se relaciona con la presentación peptídica y, por ende, con la resistencia frente a patógenos, tal selección actuaría en el sentido de favorecer las diferencias

aminoacídicas en el ARS y, por consiguiente, d_n excedería a d_s en los codones que codifican el ARS. Este patrón es el inverso del que se ha visto en la mayoría de los genes funcionales, en los cuales d_s excede a d_n . Esto ocurre así porque la mayoría de los cambios de aminoácidos alteran la estructura proteica y son perjudiciales para los organismos y así, la mayoría de las sustituciones no sinónimas se eliminan por selección natural conservadora o "purificadora".

Tal como predijeron, Hughes y Nei (1.988) observaron valores de d_n significativamente más altos que los de d_s en los ARS de clase I. En contraste, encontraron que d_s excedía generalmente a d_n en el resto de la estructura de clase I. Así, el gen de clase I está sujeto a selección sobredominante o a alguna otra forma similar de selección favorecedora de la diversidad en el ARS, mientras que la porción restante de la molécula está sometida a selección purificadora. Resultados similares se han encontrado en los genes de clase II (Hughes y Nei, 1.989): d_n excede a d_s en las posiciones codificadoras del sitio de unión, mientras que la situación inversa se presenta en el dominio $\beta 2$. Los resultados hallados en clase II son consistentes con los previamente obtenidos para loci MHC de clase I (Hughes y Nei, 1.988) y sugieren poderosamente que la tasa de sustitución aminoacídica en el ABS se incrementa por selección darwiniana positiva.

Resumiendo, en los loci polimórficos de las cadenas β , tanto en MHC de clase I como de clase II, d_n se ve aumentado en el ARS, mientras que en todas las comparaciones llevadas a cabo en los genes de clase II, d_n es mucho más pequeño que d_s en el dominio $\beta 2$, sugiriendo una fuerte selección depuradora en esta región (Hughes y Nei, 1.988).

Este patrón, en cambio, no se observa en DPA1 ni en DQA1. En DPA1 no hay ninguna diferencia significativa entre d_s y d_n en el ARS. Los valores de d_s para la porción no-ARS de los dominios 1° y 2° son más bajos en las comparaciones entre alelos DPA1 que para la mayoría de comparaciones entre los alelos de otros loci analizados de clase II en humanos. Así, los alelos DPA1 parecen haber divergido entre ellos más recientemente que los alelos de otros loci. Estos resultados sugieren que el polimorfismo DPA1 está probablemente originado por una selección neutral.

El caso de DQA1 es algo diferente. En este locus, d_s y d_n no difieren significativamente en el ARS. Sin embargo, tal como se ha medido por los valores de d_s entre alelos, los alelos DQA1 son bastante divergentes unos de otros, sugiriendo que el polimorfismo en este locus se ha mantenido durante un largo tiempo.

Alternativamente, una explicación extendida para el polimorfismo MHC es la selección dependiente de la frecuencia [punto (d)]. Varios autores (Snell, 1.968; Bodmer et

al., 1.971) propusieron la hipótesis de que un individuo portador de un nuevo alelo mutante tiene ventaja selectiva puesto que los patógenos no habrán tenido tiempo para desarrollar la capacidad de infectar las células hospedadoras portadoras de un nuevo antígeno histocompatible mutante. El número de individuos con tales alelos se verá incrementado en la población debido al fenómeno de selección positiva. Se ha publicado (Satta et al., 1.994) un moderado coeficiente de selección positiva en alelos MHC. La extensión de esta selección positiva puede ser difícil de probar puesto que los patógenos pueden variar de tiempo en tiempo y en distintas localizaciones geográficas. Este modelo genera una tasa de sustituciones no sinónimas más alta que de sustituciones sinónimas, pero no puede explicar ni el alto grado de polimorfismo ni la inusualmente larga persistencia temporal de alelos polimórficos (Hughes y Nei, 1.988).

Sean cuales sean las causas principales de la génesis del polimorfismo en los genes MHC, deberá admitirse que éste representa una galería de vencedores: los distintos alelos MHC aparecen asociados con resistencia o protección frente a enfermedades infecciosas (Hill, 1.991).

1.5.6.- Mantenimiento del polimorfismo de MHC

Se ha sugerido un cierto número de mecanismos responsables del mantenimiento del polimorfismo en MHC, incluyendo selección de la viabilidad, interacciones materno-fetales y emparejamiento no aleatorio (Hedrick, 1.994). Entre los modelos de selección de viabilidad, los más considerados han sido el vigor híbrido (sobredominancia) y la selección dependiente de la frecuencia. Pese a que se ha visto un exceso de heterocigotos de los loci MHC, incluso en poblaciones pequeñas (Markow et al., 1.993), coherente con un mantenimiento selectivo del polimorfismo, los datos disponibles no permiten distinguir los dos tipos de modelos de viabilidad (Hedrick, 1.994).

La evidencia de la selección positiva, de manera particular en los codones de la región de unión al péptido (PBR), se ha obtenido por análisis del patrón de sustituciones nucleotídicas entre alelos. En la mayor parte de los loci nucleares expresados, predominan los cambios nucleotídicos sinónimos entre alelos, debido quizás a una selección conservadora (Li et al., 1.996). Sin embargo, en los codones del PBR de los loci de clase I y clase II, hay un exceso de sustituciones no sinónimas, lo que concuerda con la selección positiva de la variabilidad (Hughes y Nei, 1.988, 1.989).

Los linajes MHC de clase II representan estructuras estables que se han mantenido a lo largo del tiempo. Esto indica que, al menos en algunos linajes MHC, el mantenimiento del polimorfismo ha sido favorecido por selección conservadora. La existencia del polimorfismo de MHC tal cual, ha sido explicada por selección balanceada (ventaja de los heterocigotos), puesto que el análisis de los cocientes d_n/d_s demuestra que los codones para los residuos de contacto en el PBR son más divergentes que los codones que codifican para el resto de la estructura de la molécula de MHC (Hughes y Nei, 1.989; Hughes et al., 1.996b).

Se puede pensar que los linajes que protegen al huésped frente a una enfermedad infecciosa pueden haberse conservado en una configuración más o menos similar a lo largo del tiempo. Las variaciones aminoacídicas vistas en tales linajes pueden ser de naturaleza neutral. Por otra parte, los alelos que no tienen una función protectora claramente definida y están liberados de constricciones selectivas para su mantenimiento, pueden ser capaces de acumular variación. Algunos de estos alelos pueden adquirir mutaciones desfavorables (conferidoras de susceptibilidad) y posiblemente desaparecerán del repertorio genético debido a selección negativa. Por el contrario, los alelos con mutaciones favorables, capaces de hacer frente a una infección particular pueden quedar sujetos a selección dependiente de la frecuencia (Bodmer et al., 1.971).

Se sabe que muchos parásitos cambian su dotación antigénica para eludir el reconocimiento inmune. A este respecto, el MHC y los parásitos están implicados en una batalla continua. De acuerdo con este concepto, el MHC puede emplear dos estrategias principales para combatir los desafíos patogénicos. En primer lugar, los linajes con una función exitosa son bien preservados como se ejemplifica por algunos de los linajes *Mhc-DRB1* que, durante millones de años, se han encargado de desarrollar una respuesta inmune frente a antígenos bacterianos (Geluk et al., 1.993). En segundo lugar, el MHC engloba a loci que codifican productos génicos que parecen evolucionar mucho más rápido, tales como *Mhc-B*, *-DPB1* y algunos linajes *-DRB* y que producen una continua "emisión" de nuevos alelos (Gyllensten et al., 1.996). Los alelos que pueden proteger al huésped de un nuevo tipo de infección parasitaria son subsiguientemente enriquecidos a partir del gran repertorio genético presente en la población. Para apoyar este razonamiento se ha observado que la especificidad HLA-B53 protege a algunas comunidades africanas de la malaria severa (Hill et al., 1.991; Hill et al., 1.992). No obstante, debe tenerse en cuenta que las provocaciones antigénicas varían según el lugar y el momento, y que las migraciones pueden importar nuevos alelos.

Por otra parte, los bajos niveles de polimorfismo MHC descritos en algunas especies de mamíferos, tales como el alce (*Alces alces*; Ellegren et al., 1.996) parecen mantenerse en virtud de una baja presión selectiva, consecuencia de un estilo solitario de vida que puede reducir la transmisión lateral de patógenos en la población.

1.5.7.- Restricciones a la diversidad del polimorfismo de MHC

La expansión y contracción del MHC es probablemente un proceso dinámico y continuo que nunca alcanzará un *status quo*. Este fenómeno influye sobre el repertorio de los TCR (o viceversa). Cada individuo en la población tiene, en conjunto, el mismo potencial para generar un enorme número de diferentes TCR (Bergström y Gyllensten, 1.995). Las células T portadoras de receptores de alta afinidad, específicos para moléculas MHC cargadas con autopéptidos son delecionadas en el timo (selección negativa), pero esta eliminación comporta el grave riesgo de provocar un agujero funcional (Zinkernagel et al., 1.996) debido a la eliminación de un número demasiado elevado de receptores. En teoría, esto supondría que los individuos que poseen demasiadas copias de genes MHC funcionales pueden volverse susceptibles a infecciones parasitarias puesto que sus compartimentos celulares T serían ineficientes.

Visto desde esta perspectiva, es evidente que a lo largo de la evolución los sistemas MHC y TCR deben haber ejercido un gran impacto el uno en el otro. En sus inicios, ambos sistemas deben haber tenido un bajo número de copias. El potencial genético para generar un gran repertorio de regiones variables de TCR, así como para la mayoría de los múltiples linajes de MHC, puede haberse generado en el mismo período evolutivo. Bontrop y colaboradores (1.995) sostienen que la expansión de los genes del MHC y del TCR es anterior a la especiación de los primates contemporáneos.

2.- EVOLUCION DEL MHC

2.1.- Evolución del MHC de invertebrados a vertebrados

Muy poco es lo que se sabe sobre la evolución molecular y funcional de las moléculas MHC y similares a MHC en animales invertebrados, y acerca del tiempo y del orden relativo o de los aspectos estructurales y funcionales de tales sucesos, como la formación de la molécula primordial de MHC a partir de un dominio extracelular, inmunoglobulínico o no, la divergencia de las moléculas de clase I y clase II a partir de su supuesto ancestro común y otros fenómenos relacionados.

En ciertas especies de invertebrados marinos se han encontrado genes del tipo de MHC (Reinisch y Litman, 1.989). El papel de estos posibles precursores puede haberse relacionado con formas primitivas de reconocimiento de lo propio y de lo ajeno, independientemente de la presentación de antígenos extraños y de la interacción con sistemas receptores como Igs y TCR. Por esta función, es de esperar que se tratase también de proteínas de membrana con un número variable de dominios (Andersson et al., 1.987).

La función inmunitaria de la presentación antigénica ha sido adquirida sólo en vertebrados (Humphreys y Reinherz, 1.994). Se ha estimado que el MHC surgió de la familia de las Inmunoglobulinas, a la cual pertenece por su estrecha homología de secuencias, hace unos 3×10^8 años, puesto que el MHC que poseen los elasmobranquios y los anfibios actuales es similar en su estructura y función al encontrado en los mamíferos (du Pasquier et al., 1.989; Flajnik, 1.996).

2.1.1.- Evolución funcional de las moléculas similares a MHC

Ha habido mucha especulación acerca de la evolución funcional de las moléculas similares a MHC, basada principalmente en la concepción original del MHC en vertebrados superiores: la de un locus genético múltiple, altamente polimórfico, implicado en el rechazo de injertos tisulares (Burnet, 1.971; Hildemann et al., 1.979; du Pasquier, 1.989). El rechazo de injertos se ha demostrado en todas las especies vertebradas examinadas hasta la fecha, aunque el alcance y cinética de este rechazo así como otros correlatos *in vivo* e *in vitro* de

alorreconocimientos por parte de los linfocitos T, difieren entre especies de vertebrados (Crone et al., 1985; Klein, 1987). En ciertas especies de invertebrados se han descrito fenómenos de alorreconocimiento con algunas similitudes con los de vertebrados (McCumber y Clem, 1977; Hildemann et al., 1979; Smith y Hildemann, 1984; Du Pasquier, 1989; Klein, 1987). Estos fenómenos están particularmente bien documentados en invertebrados marinos coloniales, desde metazoos tan primitivos como las esponjas (*Porifera*) hasta los tunicados (*Urochordata*), tenidos estos últimos como los representantes más cercanos a los ancestros de los vertebrados. En el tunicado *Botryllus* (cuya genética está relativamente bien establecida), un locus único, altamente polimórfico, determina el rechazo o la aceptación de injertos (Pancer et al., 1996).

También se ha sugerido, sin mayor evidencia, que la función primaria de los sistemas polimórficos de alorreconocimiento en invertebrados, así como los de vertebrados, es la de reconocer patógenos (Ramachandra et al., 1999).

Algunos rasgos asociados a la presencia de las moléculas de MHC, tales como las interacciones célula-célula, la unión peptídica o el transporte intracelular, pueden haber sido más importantes que el polimorfismo para la función de las moléculas ancestrales de MHC (Kaufman et al., 1984; 1990).

2.1.2.- Evolución estructural de las moléculas similares a MHC.

Esencialmente no se sabe nada acerca de la evolución estructural de las moléculas similares a MHC.

El primer modelo propuesto (Doolittle, 1985) es el de una molécula primordial con un dominio N-terminal no inmunoglobulínico y un dominio C-terminal como los de las Ig. La posibilidad más simple es la de que el dominio no inmunoglobulínico surgió como un miembro de una superfamilia génica no relacionado con la superfamilia génica de las Ig, y que los dos dominios llegaron a ser parte de una misma molécula por "barajamiento" exónico, tal como se piensa que ocurrió para la mayoría de estas proteínas.

El segundo modelo concierne al origen de las regiones V de los genes TcR/Ig (Davis y Bjorkman, 1988). Se ha propuesto que originalmente hubo una interacción célula-célula entre el vértice superior de una molécula no polimórfica, semejante a MHC, y las bandas semejantes a CDR de una región invariable, similar a V, de una molécula ancestral a CD8, o TcR, o Ig. El gen para este ancestro CD8/TcR/Ig se duplicó y divergió para dar lugar a un gen conducente a CD8 y otro gen conducente hasta TcR/Ig. El gen TcR/Ig fue invadido por un

transposición para crear la región V, de escisión, del TcR ancestral, que posteriormente daría lugar a los genes para anticuerpos.

El modelo concerniente al origen de las moléculas de clase I y II sostuvo, inicialmente, que la $\beta 2m$ y las moléculas de clase I aparecieron primero (Cunningham y Berggard, 1.974), pero a partir de una base estructural, implicando parsimonia y simetría, parece que la molécula primordial semejante a MHC fue un homodímero semejante a la cadena β de clase II, cuyo gen se duplicó y divergió para dar lugar al conocido heterodímero actual de clase II. Posteriormente, hubo un barajeo exónico, que situó el exón $\alpha 1$ de clase II enfrente del gen β de clase II para crear el gen primordial de la cadena α de clase I, dejando el dominio $\alpha 2$ de clase II y los otros exones 3' dispuestos para convertirse en el gen primordial de $\beta 2m$.

Además de las características estructurales, existen otras razones biológicas para pensar que las moléculas de clase II evolucionaron antes que las de clase I:

- a) El procesamiento antigénico llevado a cabo por las moléculas de clase I es más complejo que el que se ha descrito en las de clase II (Hughes y Nei, 1.993).
- b) Las larvas de anfibios sólo expresan moléculas de clase II antes de entrar en metamorfosis, mientras que durante ésta y durante la vida adulta expresan ambos conjuntos de moléculas (Flajnik et al., 1.991). Puesto que la ontogenia recapitula la filogenia es dable pensar que las moléculas de clase II preceden, evolutivamente, a las de clase I.

Los tres modelos esbozados aquí parecen razonables a la luz de los actuales conocimientos, pero aún no hay manera de saber si son reales y, si es así, cuándo ocurrieron. En invertebrados se han descrito genes semejantes a los de Ig, implicados en la adhesión celular (Seeger et al., 1.988; Harrelson y Goodman, 1.988), pero aún no se sabe si los invertebrados usan un sistema reconecedor similar a MHC/TcR o si éste es un desarrollo de los vertebrados más primitivos.

2.2.- MHC de clase II en primates

2.2.1.- Presencia de genes MHC de clase II en primates no humanos

A finales de los ochenta, se disponía de escasa información acerca del grado de diversidad de los genes de clase II del MHC en primates no humanos. El tipaje serológico

sólo había sido practicado en los productos génicos del mono rhesus y de algunas especies de macacos estrechamente emparentadas (Heise et al., 1.987). Por medio de la técnica de RFLP se vio que los Monos del Viejo Mundo poseían solamente un conjunto de genes *Mhc-DQA/DQB*, mientras que los homínidos (humanos y grandes simios) y los Monos del Nuevo Mundo compartían un conjunto duplicado de genes *Mhc-DQA/DQB* (Bontrop et al., 1.993; Bontrop et al., 1.999). Además, la conservación de los sitios de restricción indicaba que las diferentes especies de primates pueden compartir genes de clase II sumamente similares.

También se probó, en línea con los análisis de segregación, que el número de genes DRB presentes en un haplotipo variaba en los chimpancés (Bontrop et al., 1.993) y en el mono rhesus (Sliereendregt y Bontrop, 1.994; Sliereendregt et al., 1.994), tal como ya se había visto en humanos (Böhme et al., 1.985; Bodmer et al., 1.992; Bergström et al., 1.999). Estas investigaciones también mostraron que algunas regiones DR de primates no humanos son probablemente más grandes que sus equivalentes en humanos, en función de la cantidad de genes que contienen (Erlich et al., 1.996). El número máximo de genes *Mhc-DRB* por haplotipo oscila entre 4-5 en humanos, 5 en chimpancés y hasta 6 en gorilas y macaco rhesus.

2.2.1.1.- *Mhc-DQ*

Hasta ahora se han documentado, en primates no humanos, más de cuarenta secuencias *Mhc-DQA* (Kasahara et al., 1.993) y 90 *-DQB* (Bontrop, 1.994). Los linajes *Mhc-DQA1*01*, *-DQA1*05* y *-DQB1*06*, que son compartidos por humanos, monos antropoides y primates inferiores, son anteriores a la especiación de los primates y, al menos, tienen una antigüedad de 35 millones de años (enter et al., 1.992; Oting et al., 1.992; Gyllensten y Erlich, 1.993). Estos datos apoyan el concepto de la herencia trans-especies (véase 2.2.4) del polimorfismo de MHC (Klein, 1.987). En la mayoría de las especies investigadas de primates, tanto los genes *Mhc-DQA1* como los *-DQB1* exhiben un amplio polimorfismo, con la excepción del tamarino de cabeza algodonosa (*Saguinus oedipus*; Gyllensten et al., 1.994).

2.2.1.2.- *Mhc-DR*

Se ha obtenido un gran número de secuencias *Mhc-DRB* en varias especies de primates no humanos, tales como el chimpancé (Fan et al., 1.989; Kenter et al., 1.992; Mayer et al., 1.992; Bontrop et al., 1.993), gorila (Kupfermann et al., 1.992), orangután (Schönbach et al., 1.993), macaco rhesus (Sliereendregt et al., 1.994; Sliereendregt y Bontrop, 1.994) y

varios primates del Nuevo Mundo (MNM; Trtková et al., 1.993; Gyllensten et al., 1.994). La mayor parte de estas secuencias ha sido compilada (O'hUigin et al. 1.993), deduciéndose que los linajes *Mhc-DRB1*03*, *-DRB1*04* y *-DRB1*10*, así como los loci *Mhc-DRB3* y *-DRB5* ya estaban presentes en la población de una especie ancestral de primates que vivió hace 55 millones de años (Bergström et al., 1.998). De hecho, algunos de estos linajes pueden incluso ser más antiguos puesto que se han encontrado equivalentes de los mismos en prosimios (Figueroa et al., 1.994). Algunos miembros de los linajes de *Mhc-DRB* que son funcionales en *Catarrhini* [homínidos y Monos del Viejo Mundo (MVM)] son, por el contrario, pseudogenes en *Platyrrhini* (Monos del Nuevo Mundo; Trtková et al., 1.993). El que tanto los MVM como los MNM usen diferentes loci codificadores de productos con funciones relacionadas en la activación de una respuesta inmune también ha sido documentado en la región de clase I del MHC (Watkins et al., 1.990a, b).

2.2.1.3.- *Mhc-DP*

La mayor parte de la variación observada en el locus *Mhc-DPBI* de primates puede explicarse por la concatenación de mutaciones puntuales y mecanismos similares a la recombinación (Cullen et al., 1.997). En contraste, la comparación de los alelos *HLA-DPA1* con sus equivalentes de primates no humanos mostró que algunos linajes *Mhc-DPA1* tienen, al menos, 35 millones de años de antigüedad (Otting y Bontrop, 1.995). Otra peculiaridad es que, aunque se ha identificado un considerable número de alelos *Mhc-DPBI* de primates, el grado de libertad para alojar diferentes aminoácidos en los sitios de contacto del PBR es menor que el que se ha visto en moléculas *Mhc-DQBI* y *-DRB* (Sliereendregt et al., 1.993).

2.2.2.- Evolución de los genes DRB

Todos los genes *HLA-DRB* conocidos surgieron por duplicación a partir de un gen ancestral común (Kasahara et al., 1.997), pero probablemente no todos al mismo tiempo. La duplicación inicial debió haber ocurrido antes de la divergencia de los prosimios (incluidos los tarseros) con los primates antropoides, un hecho datado hace 65 millones de años. Esta conclusión se apoya en dos observaciones, además de las similitudes de secuencia y de las distancias genéticas relativas entre los genes. En primer lugar, todos los genes *HLA-DRB* [a excepción de *HLA-DRB9*, puesto que su secuencia consiste en un único exón y poco es lo que se sabe acerca de su origen, aunque se ha sugerido que está relacionado con el gen *DRB3*

(Svensson et al., 1.996)] comparten *Alu50*, que es un miembro de la familia *J* de las secuencias *Alu* (Mnuková-Fajdelová et al., 1.994); esta familia se diseminó en el genoma de los primates hace más de 65 millones de años. En segundo lugar, tanto los prosimios como los primates catarrinos poseen el locus DRB6 (Figuroa et al., 1.994; este gen no ha sido encontrado, hasta ahora, en los Monos del Nuevo Mundo, y es posible que se haya perdido durante la evolución de este grupo de primates). Aunque hasta la fecha sólo se disponen de secuencias del segundo exón del gen DRB6 en prosimios, son tan profundas las similitudes que estas secuencias exhiben frente a las ortólogas de los catarrinos, que es improbable que hayan surgido por simple convergencia.

Los genes DRB2 y DRB4 están estrechamente relacionados con DRB6, lo que se ve no sólo por la gran similitud de secuencias, sino también por compartir elementos retrovirales que están ausentes en todos los demás genes DRB conocidos de primates (Satta et al., 1.996b; Svensson y Andersson, 1.997). Las distancias genéticas estimadas indican que los tres genes surgieron en rápida sucesión; el gen DRB2 fue, posiblemente, el primero en divergir, seguido por la divergencia posterior de los genes DRB6 y DRB4 (Kasahara et al., 1.992b; Satta et al., 1.996a; Kasahara, 1.999). Por tanto, si DRB6 surgió antes de la separación de prosimios y antropoides, lo mismo es aplicable al caso de DRB4. Sin embargo, ni el gen DRB2 ni el DRB4 se han encontrado en prosimios. El gen DRB2 sólo es conocido en antropoides y en humanos y el gen DRB4 en humanos, antropoides y MVM. DRB2 puede haber desaparecido en prosimios y en Monos del Viejo Mundo porque, en antropoides y en humanos, por lo menos, carece de exón 2. Es posible que el pequeño tamaño de la muestra estudiada de prosimios haya imposibilitado el hallazgo del ortólogo a DRB4 en estos animales.

La duplicación que dio lugar a los restantes genes *HLA-DRB* ocurrió después de esta ronda inicial de duplicación y esta conclusión se basa (Klein y O'hUigin, 1.995) en la observación de que todos los genes DRB1, DRB5, DRB7 y DRB8 comparten dos elementos *Alu*, *Alu53* y *Alu54*, los cuales están ausentes en posiciones homólogas de los otros genes DRB de primates (Satta et al., 1.994; Kasahara, 1.997). Estos dos elementos pertenecen a la familia *Sc*, la cual comenzó a diseminarse dentro del genoma de los primates hace 45 millones de años, lapso de tiempo éste que es también, aproximadamente (42 millones de años), el de la divergencia de estos cuatro genes, estimado por medio de las distancias génicas entre intrones (Satta et al., 1.994; Kasahara, 1.998). Esta segunda ronda de duplicaciones, iniciada hace 45 millones de años y posiblemente iniciada después de la separación de los platirinos y de los catarrinos (hace 55 millones de años; Martin, 1.993) produjo los genes DRB5, DRB7 y DRB8 y el gen proto-DRB1, que tendría las características

del linaje alélico *DRB1*04*. La presencia en humanos, en antropoides y en MVM, del gen *DRB5* y del linaje *DRB1*04* concuerda con esta hipótesis (O'hUigin et al., 1993). Los genes *DRB7* y *DRB8* sólo se han encontrado en humanos y en antropoides, aunque esto también podría ser debido a que el trabajo de búsqueda hecho en MVM podría estar sesgado hacia la detección de genes *DRB1*; alternativamente, la posible no funcionalidad de los genes *DRB7* y *DRB8* en los Monos del Viejo Mundo podría haber llevado a su pérdida.

También se estima que hace unos 30 millones de años se produjo una tercera ronda de duplicación que daría lugar al gen *DRB3* a partir de un gen *DRB1* que divergió (Satta et al., 1996b) dentro de los linajes *DRB1*03* y *DRB1*02*. Los linajes *DRB1*02* y *DRB1*03* y el gen *DRB3* tienen en común el compartir un inserto retroviral que está ausente en otros genes *DRB* (Satta et al., 1994; Svensson et al., 1995). La presencia de los genes *DRB1* y *DRB3* en humanos, antropoides y MVM (O'hUigin et al., 1993; O'hUigin, 1995) concuerda con esta interpretación. En cuanto al linaje *DRB1*10*, su procedencia es incierta, pero los datos de las distancias genéticas sugieren que puede estar relacionado con el grupo ya descrito de genes.

El análisis de los genes *DRB* en platirrininos (MNM) arrojó interpretaciones diferentes en función de qué parte del gen era analizada. Los análisis genéticos convencionales de las secuencias del segundo exón han sugerido la presencia de los genes *DRB3* y *DRB5* y del linaje *DRB1*03* en este grupo (Trtková et al., 1993; Gyllensten et al., 1994; Bidwell et al., 1994). Además de esto, los MNM poseen 10 nuevos linajes (*DRB11*, *DRB*w12-w19* y *DRB*w22*) que, en apariencia, no están presentes en otros primates y que pueden representar loci diferentes, o linajes alélicos de un mismo locus o una combinación de ambas posibilidades (Trtkova et al., 1993; Gyllensten et al., 1994). Por otra parte, el análisis de las secuencias del intrón 2, exón 3 y región 3'UT no consiguió revelar una relación ortóloga entre los genes *DRB* de los MNM y los de los primates catarrinos (Trtková et al., 1993, 1995). Por lo tanto, todas las secuencias *DRB* de los MNM parecen haber derivado de un gen ancestral común distinto del gen ancestral para las secuencias *DRB* de catarrinos.

Una situación similar parece darse en prosimios. También aquí las secuencias del segundo exón indican la presencia de ortólogos de *DRB1*03*, *DRB1*04*, *DRB3* y *DRB5* (Figuroa et al., 1994). Además de los linajes *DRB*w1* y *DRB*w3*, semejantes a los previamente encontrados en MVM, y el linaje *DRB*w12* ya descrito en MNM, los prosimios poseen al menos dos linajes, *DRB*w20* y *DRB*w21* que no se han encontrado en otros primates (Figuroa et al., 1994). Sin embargo, a la vista de nuevos datos obtenidos en MNM (Trtková et al., 1993, 1995) se cuestiona la ortología de los genes *DRB* de prosimios con los de otros grupos de primates (con la excepción de *DRB6*, cuya existencia en los prosimios está

fuera de dudas). De cualquier manera, hay evidencias de la expansión de nuevos genes DRB de prosimios que carecen de ortólogos en otros grupos de primates.

2.2.3.- Linajes alélicos en genes DRB

En el locus DRB1 se han identificado cinco linajes alélicos principales (Klein y O'hUigin, 1.995; tabla 1; véase 1.5.4). Los linajes principales están separados por grandes distancias genéticas y su divergencia precede a la divergencia de los antropoides y de los Monos del Viejo Mundo, un suceso fechado actualmente en 35 millones de años (Martin, 1.993). Los linajes menores están separados por distancias más pequeñas y su divergencia es posterior a la divergencia de los antropoides con los Monos del Viejo Mundo. Los cinco linajes alélicos principales son *DRB1*10*, *DRB1*02* (que incluye a *DRB1*15* y *DRB1*16* y también puede incluir a *DRB1*01*), *DRB1*03* (que incluye a *DRB1*11*, *12, *13, *14, *17 y *18, y también al exón 2 de *DRB1*08*), *DRB1*04* (que incluye a parte de *DRB1*09*) y *DRB1*07*.

Tabla 1.- Linajes alélicos reconocidos en los diferentes genes *Mhc-DRB*

GEN	LINAJES
DRB1	10, 02, 03, 04, 07
DRB3	01, 02, 04, 05, 06, 07
DRB4	01, 02
DRB5	01, 02, 03, 04, 05, 06, 07
DRB6	01, 02, 03, 04
DRB7	01
DRB11	01
DRB*w	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21

Cuando una secuencia DRB humana es descubierta y descrita será asignada a aquel de los genes y linajes con el que comparta el mayor grado de homología secuencial (Klein et al., 1.990).

De manera análoga, cuando en primates se descubre y caracteriza una secuencia nucleotídica de DRB, asignar su filiación a un gen concreto de este sistema genético (darle nomenclatura oficial de alelo) se basa en ver cuál de las secuencias HLA-DRB tomadas como referencia tiene mayor homología con esta nueva secuencia de primate. No obstante, en un gran número de ocasiones, las nuevas secuencias de primate no tienen elevada homología con ninguna de las secuencias conocidas de HLA-DRB (no se ha hallado gen ortólogo), por lo que, mientras se elucida si tales secuencias corresponden a loci aún por caracterizar en los cromosomas de primates y no parangonables a los humanos, el Comité de Nomenclatura las incluye, de manera provisoria, en una gran familia alélica llamada *DRB* w* (Klein et al., 1990). A su vez, dentro de esta familia se han establecido linajes (hasta 20; tabla 1) en función de las homologías y desemejanzas que muestran entre sí las secuencias que en ella se han incluido. La razón de que se reconozca al gen DRB11 como tal y no como *DRB* w 11*, se debe a que este gen ya fue identificado y nombrado así en Monos del Nuevo Mundo (Grahovac et al., 1992; Trtková et al., 1993).

El número de linajes no prototípicos aumenta casi a medida que aumenta el estudio en la secuenciación de *Mhc-DRB* de especies de primates cada vez más alejadas, filogenética y evolutivamente, de *Homo sapiens*. Así, en 1993, cuando O'hUigin y colaboradores publicaron su compilación de secuencias de alelos *Mhc-DRB* en primates no humanos, el número total de linajes ascendía a 18, desde *DRB* w 1* hasta *DRB* w 10*, y desde *DRB* w 12* hasta *DRB* w 19*, abarcando alelos de catarrinos, platirrininos y monos antropoides. Al gen DRB11, encontrado en platirrininos, se le da nomenclatura de locus prototípico. En sus estudios sobre alelos DRB de prosimios, Figueroa y colaboradores, en 1994, llegaron a establecer los linajes *DRB* w 20* en la especie *Loris tardigradus* y el *DRB* w 21* en *Petterus fulvus*.

Se ha estimado la antigüedad de estos linajes (Sliendregt y Bontrop, 1994) en virtud de su presencia tanto en antropoides como en monos del Viejo Mundo, y por presentar marcadores específicos de linaje tales como las secuencias *Alu* e insertos retrovirales (Mnuková-Fajdelová et al., 1994; tabla 2).

2.2.4.- Modo transespecífico de evolución de los genes *Mhc-DRB*

Históricamente se han postulado dos hipótesis para dar cuenta del modo cómo evolucionan los genes DRB del sistema MHC: evolución intraespecífica y evolución transespecífica (Kasahara et al., 1990; Kasahara et al., 1992a).

Tabla 2.- Edad mínima estimada de algunos linajes y genes Mhc de clase II y presencia/ausencia de los mismos en diferentes especies o grupos de especies de primates

Linaje/gen	<i>Hosa</i>	<i>Patr</i>	<i>Gogo</i>	<i>Popy</i>	<i>Hyla</i>	MNM	MVM	Edad (m.a.)
DRB1*10	+	+	+	-	-	+	-	35
DRB1*02	+	+	+	-	-	-	-	7
DRB1*03	+	+	+	+	-	+	+	55
DRB1*04	+	-	-	-	-	+	-	35
DRB1*07	+	+	-	-	-	+	-	35
DRB3	+	+	+	-	-	+	+	55
DRB4	+	+	-	-	-	+	-	35
DRB5	+	+	+	+	-	+	+	55
DRB6	+	+	+	+	-	+	-	35

Hosa: *Homo sapiens*; *Patr*: *Pan troglodytes*; *Gogo*: *Gorilla gorilla*; *Popy*: *Pongo pygmaeus*; *Hyla*: *Hylobates lar*; MNM: Monos del Nuevo Mundo; MVM: Monos del Viejo Mundo; m.a.: millones de años. El signo positivo indica que, en esa especie se han encontrado secuencias del linaje considerado; el signo negativo indica ausencia de tales secuencias en una especie.

La primera de ellas, originalmente propuesta para los genes MHC de clase I del ratón (Brégégère, 1.983; Weiss et al., 1.983; Pease, 1.985) asume que determinados mecanismos, tales como una alta tasa de mutación y la conversión génica, que conduce al intercambio de segmentos de longitud variable de ADN, de un gen a otro, juegan un papel destacado en la generación del polimorfismo MHC. Según este punto de vista, el alto grado de diversidad alélica es el resultado, fundamentalmente, de una diversificación acelerada inducida por la alta mutación y por el intercambio de secuencias, y desarrollada dentro de los genomas de especies ya diferenciadas y separadas. Como apoyo de tal teoría se ha descrito un cierto número de sucesos de conversión génica (Gorski y Mach, 1.986).

La segunda hipótesis, propuesta por Klein y sus colaboradores (Klein, 1.977; Klein y Figueroa, 1.986; Klein, 1.987; Brändle et al., 1.992) asume que la evolución de los alelos MHC comienza antes de la aparición de una nueva especie. Para ello, un grupo de alelos principales es transferido a través de la filogenia, desde una especie ancestral hasta otra derivada de ella, acumulando posteriormente mutaciones. Puesto que tal modelo de evolución transespecífico capacita a los alelos MHC individuales para acumular mutaciones más allá del tiempo de existencia de una especie, también deberían estos alelos ser capaces de divergir significativamente entre ellos sin la necesidad de que se den altas tasas mutacionales o mecanismos genéticos especiales (tales como la conversión génica) que podrían acelerar la diversificación de los alelos. O sea, algunos alelos del sistema *Mhc-DRB* en las especies estudiadas serían más antiguos de lo que lo son las propias especies.

Actualmente se acepta la teoría de la evolución transespecífica para los genes *Mhc-DRB*, y ello, entre otros motivos, porque explica mejor las observaciones hechas en el sentido de que los alelos pertenecientes a especies separadas guardan más semejanzas entre sí que con otros alelos diferentes de sus mismas especies.

La prueba formal para la evolución transespecífica del polimorfismo MHC fue primeramente documentada en roedores (Figueroa et al., 1.988) y algo después en el MHC de clase I de primates (Lawlor et al., 1.988; Mayer et al., 1.988). Si los polimorfismos de clase II del MHC son de origen transespecífico cabe esperar que las secuencias particulares obtenidas de diferentes especies deberán estar más relacionadas entre ellas de lo que lo están cuando se las compara con otros alelos de sus mismas especies de procedencia. Es por ello que los alelos transespecíficos se agrupan en racimos estrechamente juntos cuando se hace un árbol filogenético (véanse 2.3.1, 2.3.2 y 2.3.3 de Resultados), y un agrupamiento (racimo) así, de secuencias altamente relacionadas que se enraízan en una estructura ancestral compartida es referido como un linaje (véanse 1.5.4 y 2.2.3).

Por el contrario, si los genes DRB hubiesen evolucionado según un modelo intraespecífico, o específico de especie, no habría ninguna explicación para que se encontrasen secuencias génicas muy similares en alelos de especies evolutivamente distantes, al tiempo que los árboles filogenéticos mostrarían una topología caracterizada por el agrupamiento de secuencias en base a sus especies de procedencia, pero no por sus genes/linajes (Paz-Artal et al., 1.994).

Gaur y Nepom (1.996) y Gaur y colaboradores (1.997) hallaron una conservación muy marcada de motivos secuenciales en la región HVRIII (codones 60-79); algunos de estos motivos fueron hallados en especies de prosimios, que divergieron de la especie humana hace más de 85 millones de años. Sin embargo, estos motivos HVRIII fijados aparecen como un ruido de fondo de diversos linajes, sugiriendo que es el motivo, más que el alelo en si mismo, el que es transespecífico en origen.

2.3.- El orden *Primata*

Desde el punto de vista de la Taxonomía, los primates constituyen un orden, por lo que se les sitúa al mismo nivel en el que se hallan los carnívoros, los roedores, los cetáceos, etc. El orden *Primata* (clase *Mammalia*, phylum *Chordata*, reino *Animalia*) comprende una gama de animales que habitan en Asia, Africa y América, y a todos los humanos, actuales y fósiles.

2.3.1.- Clasificación

El orden *Primata* se divide en prosimios o primates inferiores y en simios o primates superiores. Los prosimios son menos parecidos al hombre y muestran menos tendencias evolutivas avanzadas en comparación con los simios; tienen hocicos más largos, olfato más desarrollado y cerebro más pequeño. Los simios tienen el hocico más pequeño, un agudo sentido de la visión y un cerebro de gran tamaño.

Atendiendo a criterios morfológicos, los primates se clasifican **actualmente** como se plasma en la tabla 3.

Tabla 3.- Clasificación actual del orden *Primata* (criterios morfológicos)

ORDEN	SUBORDEN	FAMILIA	Nombre común	Nº de géneros	Nº de especies
Primata	Prosimii (prosimios o primates inferiores)	<i>Lemuridae</i>	Lémures	4	10
		<i>Cheirogaleidae</i>	Lémures enanos y lémures ratón	4	7
		<i>Indriidae</i>	Indris y sifakas	3	4
		<i>Daubentoniidae</i>	Aye-aye	1	1
		<i>Lorisidae</i>	Gálagos, potos y loris	5	10
		<i>Tarsiidae</i>	Tarseros	1	3
	Anthropoidea (simios o antropoides o primates superiores)	<i>Cebidae</i>	Cébidos	11	30
		<i>Callitrichidae</i>	Titíes y tamarinos	5	21
		<i>Cercopithecidae</i>	Cercopitécidos o MVM	14	82
		<i>Pongidae</i>	Póngidos	3	4
		<i>Hylobatidae</i>	Hilobátidos	1	9
		<i>Hominidae</i>	Homínidos	1	1

2.3.2.- Relaciones evolutivas

La relación evolutiva de las especies más representativas de estos grupos animales se esquematiza en las figuras 19 y 20.

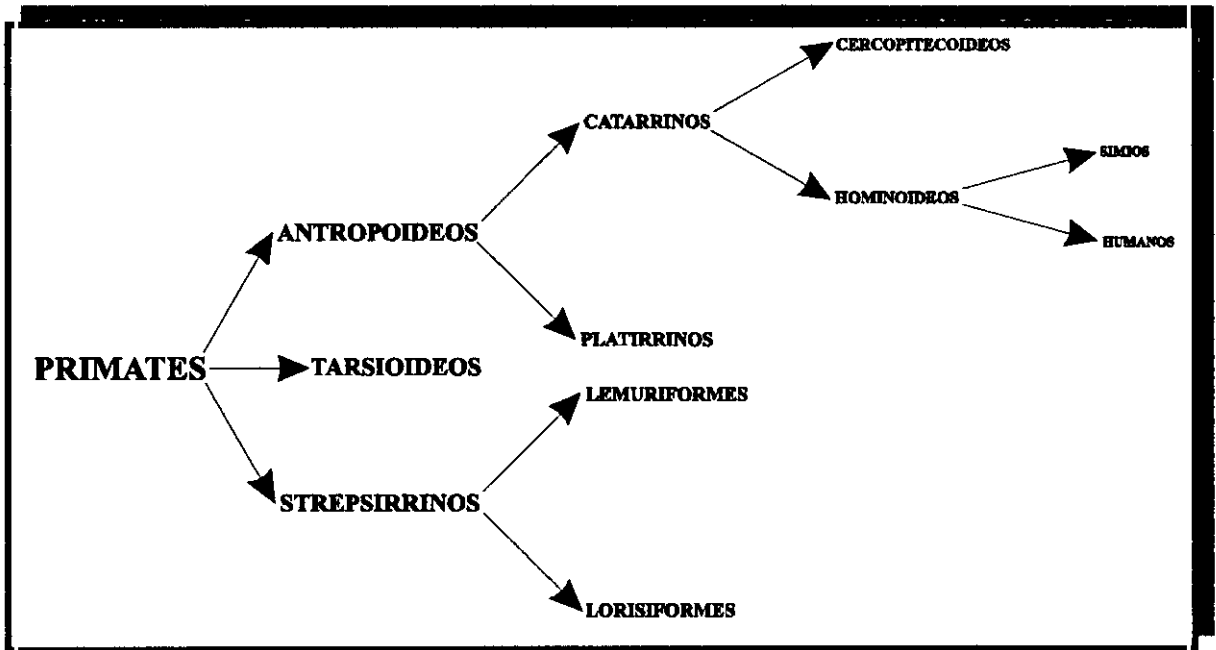


Figura 19.- Relaciones evolutivas actualmente establecidas entre los distintos grupos de especies de primates (basado en los datos aportados por Goodman y colaboradores, 1.994).

2.3.3.- Relojes moleculares en la evolución de los primates

Los experimentos hechos con relojes moleculares han situado el momento de la divergencia entre catarrinos y platirrininos en 38 millones de años. El reloj del pseudogén de la η -globina (Hasegawa et al., 1.987) arrojó fechas de $25,3 \pm 2,4$, $11,9 \pm 1,7$, $5,9 \pm 1,2$ y $4,9 \pm 1,2$ millones de años para la separación, respectivamente, de los monos rhesus, orangutanes, gorilas y chimpancés a partir del linaje que conduce a los humanos, con un intervalo de confianza del 95%. No obstante, estos datos numéricos pueden ser revisados hacia fechas más recientes al haberse sugerido que la tasa evolutiva de este pseudogén decreció en la línea de los antropoides.

Amason y colaboradores (1.996) sugirieron que la divergencia entre los homínidos fue establecida mucho antes de lo que, anteriormente, se había concluido basándose en los datos del registro fósil. Según estos autores, la divergencia primaria de los homínidos, con-

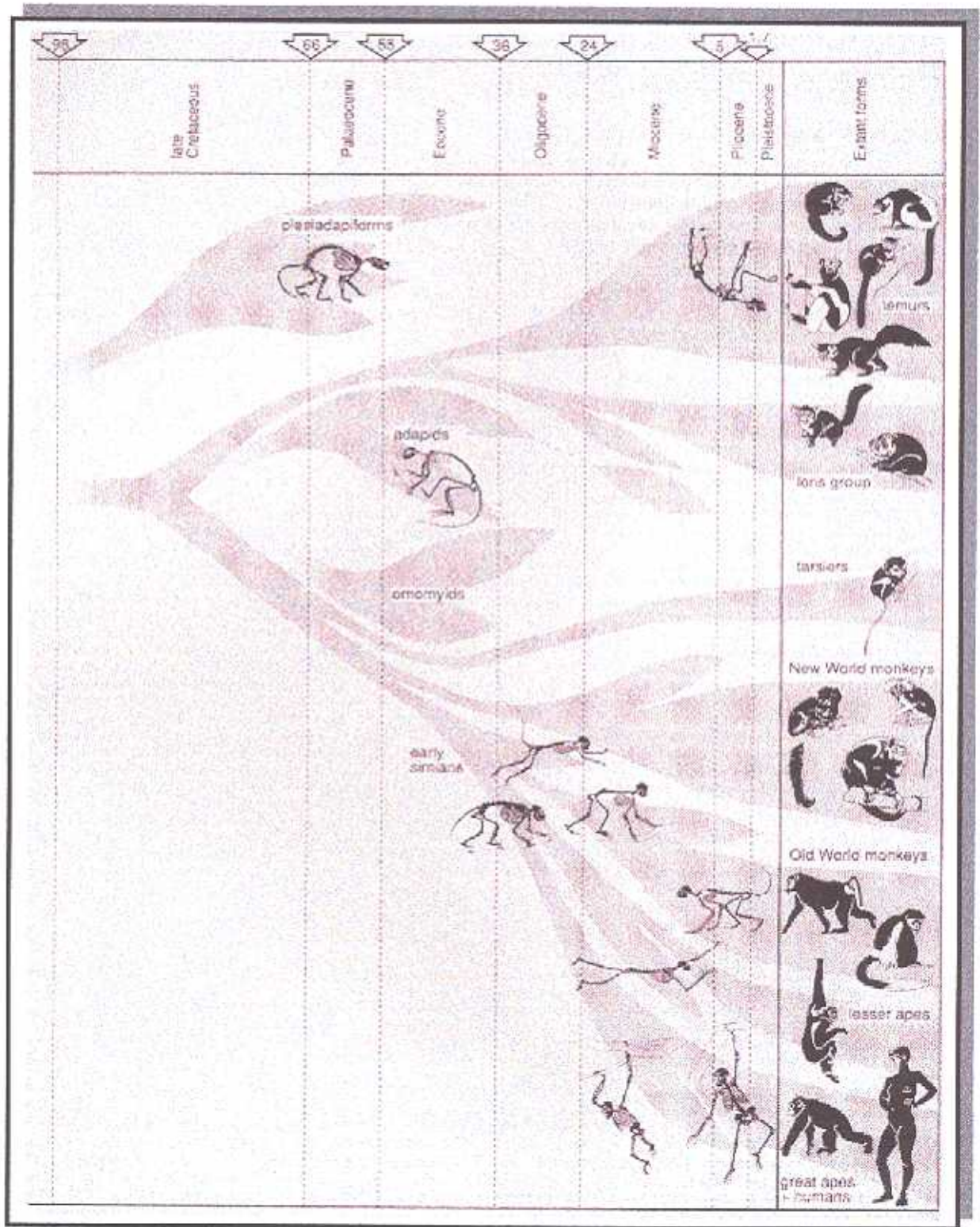


Figura 20.- Árbol que muestra los principales grupos de primates vivos y una posible interpretación de sus relaciones. El árbol incluye formas fósiles conocidas a partir de esqueletos relativamente completos y enfatiza las lagunas que aún persisten (p. e.), ningún fósil de lemur y ningún fósil de tarsiero aparte, en este último, de un único molar inferior del Mioceno). El tiempo de origen de los ancestros de los primates, según este esquema, ha sido establecido alrededor de 96 millones de años atrás, durante el Cretácico tardío. Los ancestros de MNM, MVM y homínidos surgirían hace, aproximadamente, 66 millones de años, durante el período Paleoceno. Los primitivos simios habrían aparecido durante el Eoceno, hace 36 millones de años.

cretamente entre las familias *Hylobatidae* y *Hominidae* fue datada en, aproximadamente, 36 millones de años. El tiempo correspondiente de la divergencia entre *Pongo* y la tríada *Gorilla-Pan-Homo* es de, aproximadamente, 24,5 millones de años; la de *Gorilla versus Homo-Pan* se cifra en aproximadamente 18 millones de años y, finalmente, la de *Homo* frente a *Pan* en 13,5 millones de años. El análisis de un gen singular (citocromo b) sugiere que la divergencia dentro de los catarrinos, concretamente entre homínidos y MVM comenzó hace más de 40 millones de años; la existente dentro de los antropoides (catarrinos frente a plitirinos) fue hace más de 60 millones de años; y la escisión entre antropoides y prosimios (lémures) en, aproximadamente, 80 millones de años. Estos tiempos de separación son, en líneas generales, el doble de mayores que los que se habían considerado previamente en otras publicaciones, por lo que los datos de Arnason y sus colaboradores implican una evolución mucho más lenta en el ADN de los homínidos que la comúnmente reconocida.

2.3.4.- Características particulares de la especie *Cercopithecus aethiops*

Esta especie recibe los nombres comunes de mono verde africano (o simplemente, mono verde), cercopiteco de cara negra y también, la denominación indígena de tota. Taxonómicamente se la encuadra dentro de la subfamilia *Cercopithecinae*, englobada ésta en la familia *Cercopithecidae* o Monos del Viejo Mundo, de la que es la especie más difundida.

Morfológicamente, se caracteriza por presentar una pelambrera con una coloración que va desde el amarillo pajizo hasta el gris oliváceo, con el abdomen blanquecino, la cara oscura con penachos blancos en las mejillas (figura 21).



Figura 21.- Imagen de un individuo representante de la especie *Cercopithecus aethiops* en el que pueden verse las características morfológicas superficiales descritas en el texto.

El mono verde africano se distribuye en una amplia franja geográfica que abarca desde Senegal hasta Somalia y en el África meridional. Su hábitat es la sabana, el límite de los pastos y las orillas de los cursos acuáticos. Es semiterrestre y omnívoro, consistiendo su dieta en frutas, hojas, flores, insectos, huevos, pájaros, pequeños roedores y cultivos. Vive en grupos, con varios machos adultos, en las copas de los árboles (figura 22).

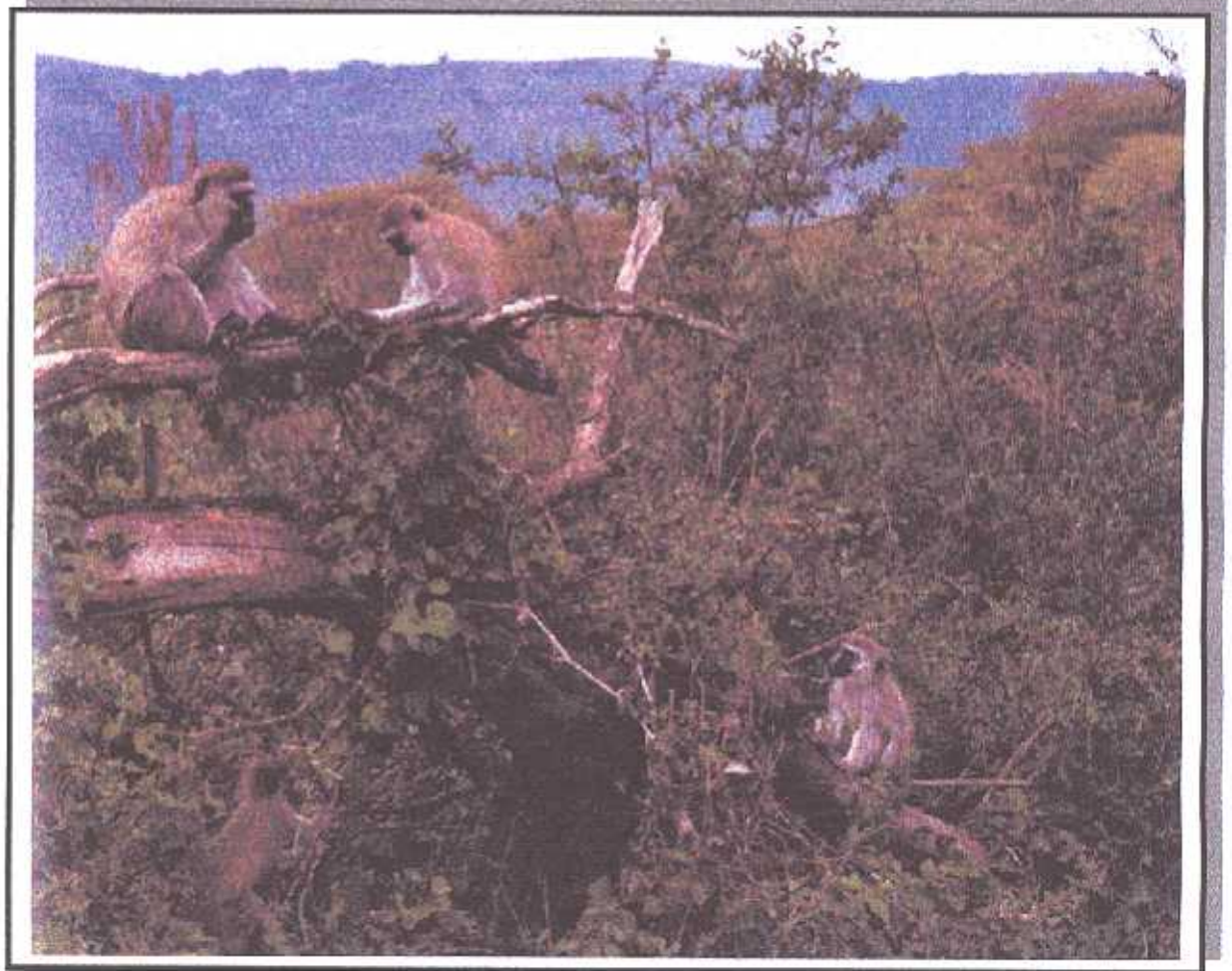


Figura 22.- El mono verde africano es semiterrestre y una gran parte de su vida transcurre en las copas de los árboles altos típicos del ecosistema sabana; en estos ambientes forma grupos relativamente numerosos de individuos en los que hay varios machos adultos.

II.- OBJETIVOS

- 1.- Obtener secuencias nucleotídicas de *Mhc-DRB* en la especie *Cercopithecus aethiops* (mono verde africano).**
- 2.- Asignar las secuencias obtenidas a loci o linajes *Mhc-DRB* mediante la construcción de dendrogramas.**
- 3.- Analizar las relaciones evolutivas entre las secuencias de mono verde y las de otros primates (prosimios, monos del Viejo y del Nuevo Mundo y póngidos).**
- 4.- Comprobar si los datos obtenidos apoyan el modelo de evolución transespecífica del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC).**
- 5.- Estudiar si los productos proteicos de los alelos obtenidos cumplen los requisitos para funcionar como moléculas presentadoras de antígenos, mediante el análisis de residuos aminoacídicos específicos deducidos y el cálculo de sustituciones sinónimas y no sinónimas en el sitio de unión al antígeno y fuera de él.**
- 6.- Estudiar los posibles mecanismos de generación de alelos DRB en el mono verde.**

III.- MATERIALES Y METODOS

1.- ESPECIE, INDIVIDUOS Y LINEAS CELULARES EMPLEADAS

1.1.- ELECCION DE LA ESPECIE: MOTIVOS

Tres son los motivos que nos han impulsado a elegir al mono verde africano como objeto de estudio del presente trabajo de investigación.

En primer lugar, este trabajo tiene el interés de que, con carácter novedoso, se ha hecho una caracterización, a nivel funcional y evolutivo, de los genes *Mhc-DRB* en una especie cuyos genes de clase II no habían sido estudiados hasta la fecha. *Cercopithecus aethiops* es una especie de la familia de los cercopitécidos, de la que su representante más prototípico es el macaco rhesus (*Macaca mulatta*), animal en el que sí se ha hecho un profuso estudio de sus alelos *Mhc-DRB*. En tal sentido, el presente trabajo sobre *Cercopithecus aethiops* contribuye a incrementar el conocimiento del acervo genético de esta familia de Monos del Viejo Mundo (*Cercopithecidae*) y, por ende, de los primates en general.

En segundo lugar, la pertenencia a la familia de los macacos también fue un motivo de consideración, debido al gran protagonismo que ha adquirido esta familia como modelo clínico en diversos estudios patológicos y terapéuticos. En particular, en la especie *Macaca mulatta* (macaco rhesus) se han hecho estudios de trasplantes y aceptación/rechazo de órganos, secuenciación de genes MHC de las clases I y II, asociaciones haplotípicas de los mismos, estudios del polimorfismo asociado a esas secuencias génicas y análisis evolutivos y filogenéticos. El mono verde africano es hospedador natural del virus SIV (*Simian Immunodeficiency Virus*; Virus de la Inmunodeficiencia de los Simios) que, en estos animales lleva a cabo un curso patológico similar al del VIH en humanos (Fomsgaard et al., 1.995; Norley, 1.996). Estos estudios suponen una incursión en el estudio de las relaciones entre el correceptor CD4 de los linfocitos Th del mono verde africano y el SIV y su posible extrapolación a la relación existente entre ese mismo correceptor, en linfocitos humanos, y el VIH (Fomsgaard et al., 1.997), así como un intento por elucidar posibles mecanismos de resistencia natural a través de la actividad citotóxica CD8+ (Murayama et al., 1.997).

En tercer lugar, la secuenciación del genoma del mono verde puede arrojar nueva luz sobre el devenir evolutivo del polimorfismo del sistema MHC.

Los individuos cuyo material genético ha sido analizado en el presente trabajo no guardan entre ellos vínculos familiares, por lo que se puede considerar a la muestra estudiada como representante de su población o especie de origen.

1.2.- INDIVIDUOS Y CULTIVOS CELULARES

Ha sido estudiado un total de 15 individuos, identificados con la notación genérica "Ve-n", siendo n un número desde el 1 hasta el 16. La amplificación de los genes *Mhc-DRB* en el individuo Ve-9 fue negativa, por lo que, en lo sucesivo, no será tenido en cuenta en los resultados y discusión presentados en este trabajo.

El material genético de los 15 individuos fue extraído a partir de líneas celulares de los mismos por medio de cultivos de células renales embrionarias (BIOWHITTAKER; Walkersville, MD, USA). Las células renales embrionarias poseen la capacidad de crecer en cultivo primario durante un número limitado de generaciones. Su forma de crecimiento es en monocapa, extendida ésta a lo largo de la superficie inferior del recipiente que las contiene.

Estos cultivos se recibieron en el laboratorio en recipientes de plástico con un medio de cultivo constituido por MEM (*Minimum Essential Medium*; Medio Mínimo Esencial; LABORTECHNIK; Alemania) suplementado con suero de ternera fetal (FCS; *Fetal Calf Serum*; LABORTECHNIK) inactivado por calor (56°C durante 45 minutos), a una concentración final de 2% V/V.

Estos recipientes se incuban en una estufa a la temperatura constante de 37°C, concentración atmosférica de 5% de CO₂ y humedad saturante.

El subsiguiente crecimiento celular se controla diariamente mediante microscopía de contraste de fase hasta que, una vez que se ha formado íntegramente la monocapa, hay que proceder a duplicar los cultivos con la finalidad de obtener más masa celular, superando así las inhibiciones de crecimiento y multiplicación celular que llegan a producirse por el contacto entre las células de la monocapa, una vez que ésta ha alcanzado su máxima extensión.

El proceso de duplicación requiere que el medio de cultivo sea retirado (por decantación), procediendo seguidamente a la adición de 20 ml de solución de Tripsina+EDTA (BIOWHITTAKER) e inmediata agitación a la temperatura de 37°C.

Al quedar despegadas, las células en suspensión se reparten en tres recipientes de cultivo, aportando a éstos el medio de cultivo necesario [RPMI-1640 (GIBCO; Painsley, Reino Unido) + FCS inactivado por calor al 20% V/V + glutamina 2 mM (BIOWHITTAKER) + cóctel antibiótico al 1% V/V].

Una vez duplicados o triplicados los medios de cultivo, se reincuban bajo las mismas condiciones de temperatura, [CO₂] y humedad que posibilitaron, inicialmente, la expansión de la monocapa celular.

Cuando los cultivos crecen suficientemente (al menos 2×10^7 células por cada recipiente) se puede proceder al tratamiento necesario para la lisis de las células y extracción de su ARN.

2.- EXTRACCION DE ARN Y CONVERSION EN ADNc

2.1.- EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL

Se siguió el protocolo de Sambrook y colaboradores (1.989), que abarca las siguientes etapas:

1.- Obtención del botón celular (un mínimo de 2×10^7 células) mediante centrifugación del microtubo que contiene la suspensión.

2.- Resuspensión en 250 μ l de tampón de lisis frío [ClNa 0,14 M (MERCK; Darmstadt, Alemania); Cl_2Mg 1,5 M (id.); Tris 10 mM, pH 8,6 (SIGMA; St. Louis, MO, USA); Nonidet P-40, 0,5% (id.)] y 5 μ l de inhibidor de ribonucleasas (RNasín, 50 U/ μ l; PROMEGA; Madison, WI, USA).

3.- Incubación en hielo (1 min).

4.- Centrifugación (2 min, 14.000 rpm, 4°C). A su término se obtiene un botón de núcleos celulares que puede ser aprovechado para la extracción de ADN genómico. El ARN permanece en el sobrenadante y se seguirá procesando.

5.- Adición al sobrenadante de 250 μ l de tampón PK 2X [Tris 0,2 M, pH 7,5 (SIGMA); EDTA 25 mM (CARLO ERBA REAGENTI; Milán, Italia); ClNa 0,3 M (MERCK); SDS 2% (SIGMA)], complementado con 20 μ l de proteinasa K (10 mg/ml en Tris 20 mM, pH 7,5; BOEHRINGER MANNHEIM; Mannheim, Alemania) e incubación a 37°C (30 min).

6.- Adición de un volumen (500 μ l) de fenol/cloroformo (APPLIED BIOSYSTEMS; Foster City, CA, USA) o de fenol/agua/cloroformo (id.) y agitación vigorosa Incubación a 4°C durante 5'.

7.- Centrifugación a 14.000 rpm durante 5 minutos. Las dos fases del apartado anterior quedarán estratificadas.

8.- Descartar la fase inferior (apolar) y pipetear la fase superior a un nuevo tubo, donde se continuará procesando mediante repetición, dos veces más, de las etapas 6-8.

9.- Añadir un volumen de 50 μ l de acetato sódico 3M, pH 5,5 (APPLIED BIOSYSTEMS) y 1 ml de etanol absoluto (PANREAC). Se agita bien y se incuba 30 minutos a -80°C o una hora a -20°C.

10.- Centrifugar a 14.000 rpm durante 20' y a 4°C. El ARN aparecerá en forma de un pequeño botón en el fondo del tubo de centrifugación.

11.- Aspirar el sobrenadante y lavar el botón con etanol (PANREAC) frío (-20°C) al 70% V/V y volver a centrifugar. Se eliminarán las posibles sales residuales del proceso de purificación.

12.- Reaspirar el sobrenadante y continuar procesando el botón de ARN mediante repetición, una vez más, del paso 11.

13.- Secar el botón mediante centrifugación al vacío y resuspenderlo en 50 μ l de agua bidestilada o en tampón Tris-EDTA (10/0,1).

14.- Para comprobar que el ARN no ha estado sujeto a degradación se llevará a cabo un control electroforético de la muestra obtenida en el punto anterior. Para ello, se mezclará un volumen de 20 μ l de disolución

de ARN con 5 μ l de tampón de carga [Tris 50 mM, pH 7,6 (SIGMA) + EDTA 50 mM (CARLO ERBA REAGENTI) + SDS 0,5% (SIGMA) + Azul de Bromofenol (BPB; *BromoPhenol Blue*; BOEHRINGER MANNHEIM) 0,1% + sacarosa 40% (MERCK)]

15.- La mezcla conseguida se somete a electroforesis en gel de agarosa.

El gel de agarosa se prepara suspendiendo 0,5 gramos de agarosa tipo II (SIGMA) en un volumen de 50 ml de una dilución acuosa 1:10 de tampón T.E.B. 10X [Tris-EDTA-Acido Bórico; por cada 1.000 ml de disolución tamponada se pesan Tris 108 g (SIGMA); EDTA 8,3 g (CARLO ERBA REAGENTI); Acido Bórico 55 g (id.); ajustar el pH hasta 8,2-8,4; filtrar la disolución a través de un filtro de 0,22 micras de tamaño de poro (NUNC; Roskilde, Dinamarca)] y calentando la suspensión hasta ebullición total durante unos 5 minutos, a fin de que los cristaloides de agarosa queden completamente disueltos. Tras ello se deja enfriar la suspensión y, poco antes de alcanzar la temperatura de fusión ($\approx 65^{\circ}\text{C}$), se le añaden 2,5 μ l de una disolución acuosa del colorante bromuro de etidio (BrEt, MERCK; 10 mg/ml) para, seguidamente, verter la suspensión en una minibandeja de electroforesis en la que se ha acoplado un peine de 8 dientes. Cuando el gel se polimeriza y solidifica se sumerge en una minicubeta con 250 ml de tampón T.E.B. 1X, se retira el peine y se cargan las muestras mezcladas con tampón de carga en el interior de los pocillos dejados por el peine, y se somete el conjunto a un potencial de 100 voltios durante ≈ 2 horas. Acabado este periodo se observa el resultado de la migración electroforética (figura 23) con un irradiador UV que emite una longitud de onda de 254 nm.

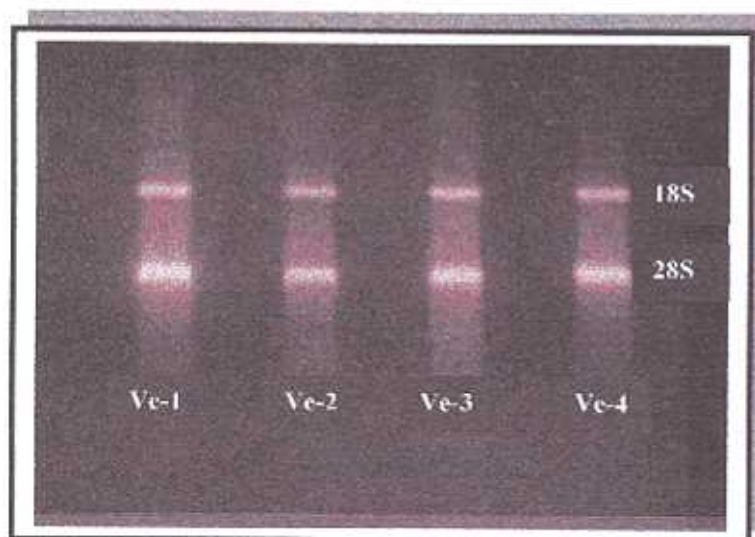


Figura 23.- Electroforesis de ARNs extraídos de células de los individuos Ve-(1-4). Pueden verse dos bandas nítidas correspondientes a los ARNr 28S y 18S, mientras que la imagen difuminada que se ve a lo largo de cada calle corresponde a una mezcla de moléculas de ARNm de diversos tamaños.

Una vez realizado este control electroforético y confirmada la presencia de ARN en la suspensión acuosa, se procede a determinar la concentración del mismo mediante ensayo espectrofotométrico, para lo cual se hace una dilución 1/100 del material resuspendido y se mide a las longitudes de onda de 260 y de 280 nm.

La concentración se cuantificará mediante la fórmula: $[\text{ARN}] = (A_{260} \times 40 \times F_{\text{DII}})$ y el resultado numérico obtenido tendrá las unidades $\mu\text{g/ml}$ o, lo que es equivalente, $\text{ng}/\mu\text{l}$; a su vez, el cociente A_{260}/A_{280} nos dará una indicación del grado de pureza de la preparación, siendo lo ideal que dé un valor de 2.

De cara a posteriores ensayos (conversión en ADNc, véase 2.2) es recomendable que las suspensiones de los ARN obtenidos se guarden a -80°C , ajustadas a la concentración de 200 $\text{ng}/\mu\text{l}$.

2.2.- CONVERSION DEL ARN EN ADNc. TRANSCRIPCION INVERSA

El ARN total y monocatenario obtenido en la etapa anterior no sirve como sustrato para la *Taq* polimerasa (véase 3.3), por lo que es preciso sintetizar una hebra de ADN complementario (ADNc). Este fue sintetizado a partir del ARN total, empleando el conjunto de reactivos aportados en el paquete "Reverse Transcription System" (PROMEGA). Por cada reacción de transcripción inversa se preparó la siguiente mezcla de reacción:

Reactivo	Volumen
Tampón RT 10X	2 μ l
Cl ₂ Mg 25 mM	4 "
dNTPmix 10 mM	2 "
Oligo-dT ₁₈ (500 ng/ μ l)	1 "
RNasin (40 U/ μ l)	0,5 "
AMV-RT (25 U/ μ l)	0,6 "
H ₂ O libre de nucleasas	4,9 "
TOTAL	15 "

El tampón RT 10X es una disolución de Tris-HCl 200 mM y ClK 500 mM.

A cada mezcla se le añaden 5 μ l de cada disolución de ARN (200 ng/ μ l) que se desee convertir en ADNc. El volumen final de cada mezcla de reacción será de 20 μ l.

Las mezclas de reacción se incuban durante 60 minutos a la temperatura de 42°C (figura 24). A continuación se procede a la inactivación de la enzima y separación de los híbridos ARN/ADN por calentamiento (5 minutos a 99°C). Acabada esta etapa es necesario enfriar muy rápidamente la preparación (inmersión en un baño de hielo durante un mínimo de 2 minutos).

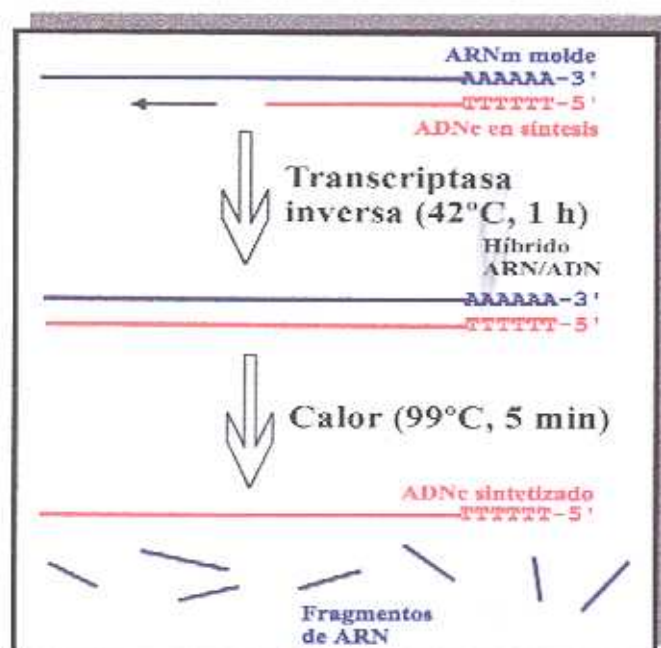


Figura 24. Modo de acción de la transcriptasa inversa. Utilización de un oligo-dT como iniciador y síntesis de la primera hebra. Degradación del ARN molde por calor y liberación de la cadena monocatenaria de ADNc.

3.- REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

3.1.- CEBADORES: DISEÑO, SINTESIS Y PURIFICACION

La síntesis de los oligonucleótidos empleados como cebadores en las reacciones de amplificación se llevó a cabo en el sintetizador automático "DNA-SM" (BECKMAN; Palo Alto, CA, USA). La técnica de síntesis está basada en la denominada "química del cianoetil-fosforamidita", que consiste en la incorporación sucesiva de los diferentes nucleótidos a un soporte sólido a lo largo de tres etapas:

1.- Protección de nucleósidos y funcionalización del soporte: los nucleósidos se protegen por acilación de sus grupos amino y el bloqueo de la posición 5'-OH con p-dimetoxotritilo. Con el primer nucleósido de la secuencia (avanzando en el sentido 3'→5') se funcionaliza el soporte sólido, acción que consiste en la reacción del primer nucleósido con grupos carboxilo terminales presentes en el soporte, cuya naturaleza suele ser gel de sílice o vidrio poroso.

2.- Síntesis cíclica: a través del soporte funcionalizado se hace discurrir una disolución de ácido tricloroacético, liberándose el radical 5'-OH del nucleósido unido al soporte del grupo p-dimetoxotritilo. Seguidamente se añade el fosforamidito del segundo nucleótido que habrá de incorporarse en la secuencia. Los radicales 5'-OH que no hayan llegado a reaccionar son bloqueados haciendo pasar por la columna una disolución de anhídrido acético. Los grupos fosfito se oxidarán hasta fosfato por medio de una disolución de yodo, obteniéndose un dímero unido al soporte por medio del 3'-OH. Se pasará nuevamente ácido tricloroacético a través de la columna, liberándose la posición 5'-OH y haciendo que el dinucleótido se vuelva susceptible a la unión de un tercer nucleótido. El ciclo expuesto se repetirá tantas veces sean necesarias para lograr la secuencia oligonucleotídica deseada.

3.- Liberación del soporte y desprotección final: eluyendo con una disolución concentrada de amoníaco se consigue la separación del oligonucleótido de su soporte físico. La disolución amoniacal de oligonucleótido se incuba a 54°C durante un tiempo de 5-12 horas, permitiendo la desprotección de todas las bases de la secuencia y la obtención del fragmento de ADN monocatenario en una disolución acuosa de amoníaco.

Una vez obtenida esta disolución "cruda" de oligonucleótido, se debe proceder a su purificación, para lo cual existen varios métodos, habiéndose empleado para este trabajo el que a continuación se describe:

1.- Evaporación del amoníaco mediante una prolongada (≈3 horas) centrifugación al vacío. Al final se recoge un residuo sólido consistente en las moléculas de cebador mezcladas con diferentes sustancias químicas empleadas en el proceso de síntesis.

2.- Suspensión de ese residuo sólido en 100 µl de acetato sódico 3M, pH 5,5 (ó 2M, pH 4,5).

3.- Adición de 900 µl de etanol absoluto.

4.- Incubación de la mezcla obtenida a -80°C durante una hora o a -20°C a lo largo de toda una noche.

5.- Centrifugación a máxima velocidad (14.000 rpm) durante 30 minutos. Obtención de un botón de oligonucleótidos.

6.- Eliminación, por aspiración, de la fase líquida.

- 7.- Lavado con etanol frío (-20°C) al 70% V/V.
- 8.- Centrifugación durante cinco minutos a 14.000 rpm.
- 9.- Repetición de las etapas 6-8 durante una vez. Las sales remanentes a lo largo de los procesos de síntesis y de purificación deberán quedar eliminadas en su mayor parte.
- 10.- Nueva eliminación, por aspiración, de la fase líquida.
- 11.- Secado de la fase líquida residual mediante centrifugación al vacío.
- 12.- Resuspensión del botón molecular en 150 µl de agua bidestilada.

De los oligonucleótidos purificados y resuspendidos se pipetea una alícuota de 3 µl y se diluye en agua bidestilada en la relación 1/100. Estas diluciones se miden en un espectrofotómetro a la longitud de onda de 260 nm y su concentración se calcula mediante la expresión:

$$[\text{Oligonucleótido}] = (A_{260} \times 50 \times F_{DN}) / (n^{\circ}A \times 1,16 + n^{\circ}C \times 0,96 + n^{\circ}G \times 1,08 + n^{\circ}T \times 0,92)$$

El resultado de este cálculo vendrá dado como µmol/l (µM), y los oligonucleótidos se ajustan finalmente a una concentración de trabajo de 10 µM. Los cebadores se mantienen, alícuotados, a la temperatura de -20°C hasta el momento de su utilización.

3.2.- CEBADORES UTILIZADOS EN LA AMPLIFICACION

Se emplearon dos cebadores que flanqueaban cada uno de ellos las zonas extremas del segmento génico que debía ser amplificado: las primeras bases del extremo 5' del exón 2 y las últimas bases del extremo 3' del exón 3 de genes *Mhc-DRB*.

El primero de ellos era el oligonucleótido llamado *DRB-Amp A* (Todd et al., 1.987), cuya secuencia nucleotídica es 5'- **CCCCACAGCACGTTTCTTG**-3'; es un oligonucleótido diseñado desde la última base del segundo triplete del exón 2 de los genes DRB, hasta la última base del octavo codón, ambas inclusive.

El diseño del cebador para la amplificación de las cadenas *minus* se realizó seleccionando una secuencia oligonucleotídica común en las tres especies publicadas (humana, chimpancé y gorila; Figueroa et al., 1.991), cuyo extremo 3' está situado a 44 bases de distancia (hacia 5') del extremo 3' del exón 3. Se le ha dado el nombre de *DRB-E3*, y su secuencia de nucleótidos es 5'-**TGGCAGGTGTAAACCTCTC**-3'.

3.3.- AMPLIFICACION GENICA

La PCR es un método de obtención, *in vitro*, de un elevado (amplificación) número de copias de un fragmento nucleotídico, a partir de sólo un reducido número inicial de moléculas de ADN que contienen dicho fragmento en su secuencia. Consiste en la repetición cíclica de tres etapas en el orden que se esquematiza en la figura 25, y que son:

1.- Desnaturalización: consiste en la separación de las dos cadenas del ADN objeto de amplificación, lo cual se consigue mediante una gran elevación de la temperatura del medio de reacción (93-97°C), suficiente para

romper los puentes de hidrógeno que mantienen íntegra la estructura del ADN. A esta alta temperatura las hebras sencillas resultantes permanecerán desapareadas en su conformación azarosa de más baja energía libre.

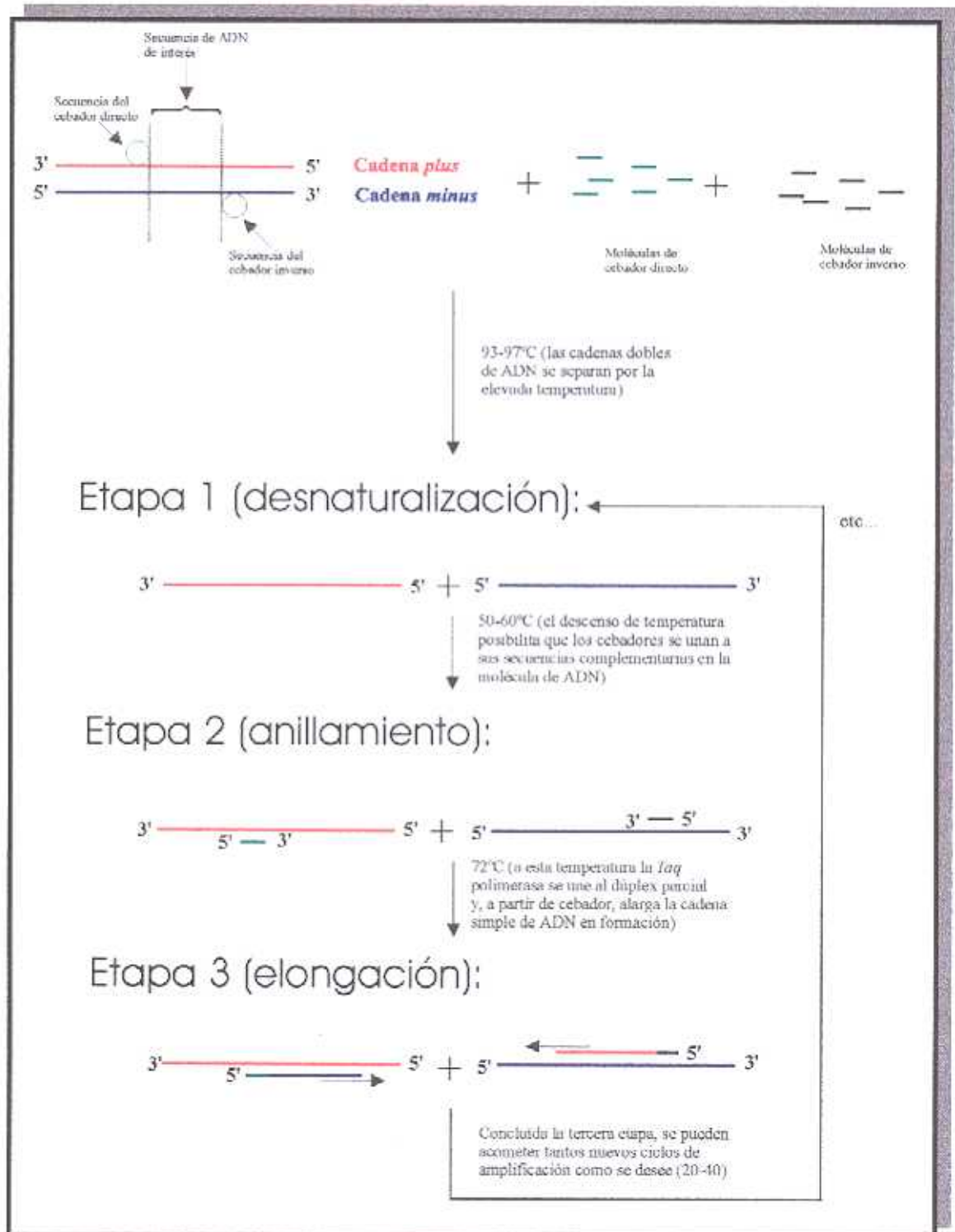


Figura 25.- Esquema del proceso cíclico de amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Véase el apartado 3.3.

2.- Anillamiento: un inmediato descenso de la temperatura (hasta 50-60°C) del medio de reacción, en presencia de una alta concentración de cebadores, cuya secuencia sea complementaria de la de ciertos segmentos de

las dos hebras sencillas, hará que aquéllos se unan a éstas. Para la amplificación de una región "diana" del ADN es necesaria la presencia de dos oligonucleótidos, siendo uno de ellos complementario del inicio de transcripción de la cadena *plus*, y el otro del de la cadena *minus*. La secuencia de estos cebadores estará en función de cuál sea la secuencia de esos inicios de transcripción en las dos hebras complementarias y, en la mayoría de los casos, se tratará de cortas secuencias de ADN sencillo, compuestas por 15-25 nucleótidos, siendo fundamental que sus secuencias no guarden complementariedad entre ellas, pues ello acarrearía que estos oligos se hibridaran entre si y no con las secuencias "diana" de la hebra de ADN.

3.- Elongación: esta etapa consiste en la adición, en el sentido 5'→3', por parte de la *Taq* polimerasa, de los nucleótidos necesarios para replicar cada hebra sencilla desnaturalizada, originando, de esta manera, al final de esta etapa, el doble de moléculas de ADN de las que había antes del inicio del proceso. La incorporación de estos nucleótidos del medio se hace respetando las reglas de complementariedad de bases.

Una peculiar característica de la *Taq* polimerasa es que siempre añade una adenina en el extremo 3' de la cadena que sintetiza; esta base queda desapareada y es por eso que se la llama "base colgante" (véase 4.2).

3.4.- AMPLIFICACION DEL ADNc

Cada ADNc, procedente de los ARNs extraídos de las líneas celulares renales de monos verdes, fue amplificado mediante el procedimiento de la reacción en cadena de la polimerasa.

Cada mezcla de reacción constaba de los siguientes reactivos en las cantidades que se dan:

<u>Reactivo</u>	<u>Volumen</u>
Tampón PCR 10X	10 µl
Cl ₂ Mg 25 mM	10 "
dNTPmix 1,25 mM	16 "
Cebador <i>DRB</i> -Amp A 10 µM	10 "
Cebador <i>DRB</i> -E3 10 µM	10 "
<i>Taq</i> polimerasa (5 U/µl)	0,5 "
H ₂ O destilada	38,5 "
TOTAL	95 "

El tampón PCR 10X es una disolución de Tris 100 mM, pH 8,3 y ClK 500 mM.

La mezcla total se prepara añadiendo todos los reactivos excepto el ADN, y se irradia durante 5' con luz ultravioleta a dos longitudes de onda: 254 y 302 nm. Esta exposición elimina la posible presencia de ADN contaminante en la mezcla, que pudiera alterar el resultado de la PCR.

A cada mezcla se le añade un volumen de 5 µl de disolución de ADNc, alcanzando cada una de éstas un volumen final de 100 µl.

Las condiciones en que se llevó a cabo la amplificación de las muestras consistieron en una desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos (para asegurar la completa separación de las hebras), seguida por los ciclos propios de la PCR:

- a) Desnaturalización a 94°C durante de 20 segundos.
- b) Anillamiento a 55°C durante un minuto.
- c) Elongación a 72°C durante 2'15''.

El número total de ciclos fue 40 y, acabados éstos y, a fin de asegurar la conclusión de cualquier elongación inacabada, se procedió a mantener las muestras a 72°C durante 10 minutos, tras lo cual, las muestras se pueden guardar a 4°C. El termociclador empleado fue el DNA Thermal Cycler 9600 de PERKIN ELMER CETUS (Norwalk, CT, USA).

3.5.- CONTROL DE AMPLIFICACION

La alta sensibilidad amplificadora de la técnica de la PCR hace necesario emplear un cuidado extremo en la manipulación de las muestras para evitar contaminaciones cuyo origen puede ser manipulación defectuosa o presencia de ADN foráneos ajenos al estudio propuesto. Es por ello por lo que, además de las muestras objeto de estudio, se prepara siempre otra muestra adicional que actúa como control negativo en la que a la mezcla de reacción descrita con anterioridad se le añade agua bidestilada en vez de disolución de ADNc. En esta mezcla no debe producirse ningún tipo de amplificación.

La verificación de la amplificación en los ADNc de monos verdes, y su ausencia en el control negativo, se realizó por electroforesis en gel de agarosa a una concentración final del 2%, preparado de la siguiente manera:

1.- Se pesan 6 gramos de agarosa "NuSieve 3:1" (IBERLABO; Barcelona, España).

2.- Se suspenden en 300 ml. de una dilución acuosa 1:50 de tampón T.E.A 50X. [Tris-EDTA-Ácido Acético; este tampón es una disolución de Tris-base (SIGMA) 2 M, EDTA (CARLO ERBA REAGENTI) 0,1 M y ácido acético glacial (PANREAC) 1 M; el pH de la misma se ajusta a 8 con ácido acético glacial y, finalmente, se filtra a través de una membrana de acetato, o nitrato de celulosa de 0,22 µm de tamaño de poro (NUNC)].

El resto de pasos son iguales a los que se siguieron para el control electroforético de la extracción de ARN (véase 2.1). La salvedad es que las bandejas y las cubetas de electroforesis son ahora más grandes (bandejas para geles de 300 ml de capacidad y cubetas de 2 litros de volumen de tampón).

En esta electroforesis, junto a las muestras amplificadas y el control negativo, también se someten al control electroforético los marcadores de peso molecular V (8-587 pb) y VI (154-2.176 pb; ambos de BOEHRINGER MANNHEIM).

En la figura 26 se muestra una imagen típica de una electroforesis de ADNc de monos verdes. El tamaño de las bandas es de 516 pb, que es la suma de las 478 pb que mide el segmento formado por el exón 2 (259 pb) más el exón 3 (219 pb), además de las 38 bases correspondientes a los cebadores (19 en cada uno).

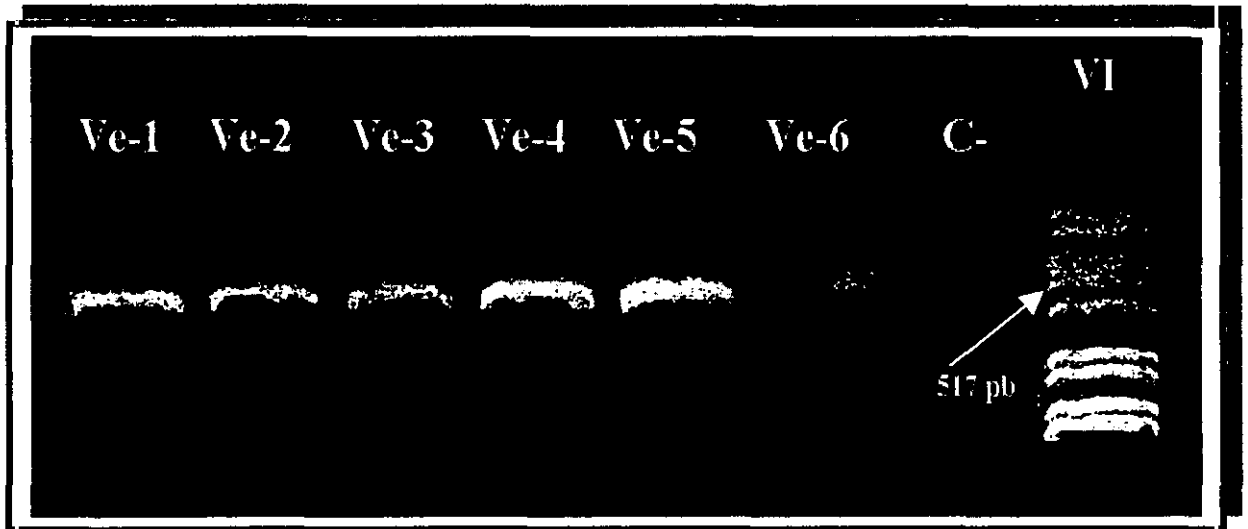


Figura 26.- Visualización, tras la migración electroforética, de unas bandas de ADNc de monos verdes [Ve-(1-6)] amplificadas con los cebadores y las condiciones descritas en el texto. En el extremo derecho de la imagen aparecen las bandas del marcador de peso molecular VI. En esta imagen se muestran seis calles, conteniendo cada una de ellas una banda de ADNc amplificado que se sitúa en una posición tal, respecto a las bandas del marcador, que su tamaño es ligeramente superior a 500 pb. Nótese la ausencia de banda en la calle correspondiente al control negativo (C-): en ella la mezcla carece de ADNc y en su lugar se ha cargado agua bidestilada.

4.- SECUENCIACION DE ADN (Sambrook et al., 1.989)

4.1 PURIFICACION DE LOS ADNc AMPLIFICADOS

El ADNc amplificado se encuentra en un medio donde se hallan, además de él mismo, moléculas de oligonucleótidos que no han llegado a actuar como cebadores (éstos siempre se añaden en exceso al medio de reacción), desoxinucleósido trifosfatos que no han sido incorporados en las duplicaciones, sales del tampón, etc., siendo por ello necesaria una etapa de purificación de este ADN.

Sobre un transiluminador UV y visualizando en todo momento las bandas de amplificación (el bromuro de etidio que acompaña a las bandas es visible bajo esta fuente de luz), se procede a recortar las bandas de tamaño adecuado utilizando un bisturí estéril y procurando minimizar en lo posible la cantidad de agarosa adherida a la banda.

En el proceso de purificación se ha empleado el equipo "Wizard PCR-Preps" (PROMEGA), que consta de los siguientes pasos:

1.- Cada porción de agarosa recortada, con la banda de ADN embebida en ella, se introduce en un tubo limpio de microcentrífuga de 1,5 ml.

2.- En cada tubo se añade 1 ml de resina de purificación de ADN (tiocianato de guanidina 6 M) y se incuban durante un minuto a 72°C a fin de fundir la agarosa (las moléculas duplexas de ADN no se desnaturalizan a esta temperatura).

3.- Cada mezcla fundida (con la banda de ADN suspendida en ella) se vierte en un cilindro de jeringa de plástico de 2 ml. que, a su vez, está acoplado verticalmente a la boquilla superior (aférente) de una minicolumna de purificación suministrada por el kit (una por cada producto de amplificación que sea necesario purificar). La boquilla eférente de cada minicolumna (parte inferior de las mismas) está provista de un filtro membranoso por medio del cual quedan retenidas las moléculas largas y filamentosas de ADN, al tiempo que deja pasar los demás componentes del medio. El paso de la suspensión fundida a través de la minicolumna y del filtro que contiene se consigue por medio de la presión manual que se ejerce sobre el émbolo de la jeringa.

4.- Cuando la suspensión ha quedado completamente filtrada y el ADN retenido en la membrana, se recurre al mismo procedimiento del punto anterior para forzar el paso, a través de los filtros de las minicolumnas, de 2 ml de una disolución acuosa de isopropanol (PANREAC) al 80%, equilibrado a temperatura ambiente, a fin de eliminar las posibles sales remanentes que quedaron en el filtro.

5.- Se desechan las jeringas utilizadas y cada minicolumna se acopla a la boca de un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml.

6.- En el interior de cada minicolumna se pipetea 50 µl de agua bidestilada. Si tras el control electroforético posterior a la PCR se sospecha que hay poca cantidad de ADNc amplificado (en función del brillo del bromuro de etidio adherido a la banda) es recomendable reducir ese volumen (hasta 40, 30 ó 20 µl)

7.- Tras esperar un minuto como mínimo (tiempo necesario para que la membrana del filtro se empape con el microvolumen de agua del punto anterior), los conjuntos acoplados minicolumna/tubo de microcentrifuga se centrifugan durante 20 segundos a 14.000 rpm.

8.- El ADN, que había permanecido unido a la membrana de la minicolumna, se eluye a consecuencia de la centrifugación y es recogido en los microtubos acoplados a aquéllas.

Este proceso de purificación supone una cierta pérdida de la cantidad de ADNc inicialmente amplificada, por lo que es necesario montar una electroforesis del material purificado para comprobar que todavía se dispone de suficiente cantidad del mismo, hecho que se evidencia de forma cualitativa por el brillo que ofrecen las bandas al acabar esta nueva electroforesis.

4.2.- LIGADO EN EL VECTOR DE CLONAJE

Para las reacciones de ligado se ha usado el equipo "pGEM-T Vector System" (PROMEGA), y se llevaron a cabo de esta manera (para cada reacción de ligado, una por cada ADNc amplificado y purificado):

<u>Reactivos</u>	<u>Volumen</u>
Tampón ligasa 10X	1 μ l
Vector pGEM-T (50 ng/ μ l)	1 "
ADN-ligasa de T7 (3 U/ μ l)	1 "
H ₂ O bidestilada	2 "
TOTAL	5 "

En esta mezcla se añaden 5 μ l de la disolución de ADNc purificado, y la suspensión resultante se incuba a 15-25°C en un intervalo de tiempo entre 3 y 12 horas. El producto de actuación de la ligasa es una molécula completamente circular (plásmido más el ADNc ligado).

Si al acabar la electroforesis de los ADNc purificados (véase 4.1), la banda de una determinada muestra es débil, con lo que cabe suponer poca concentración del mismo, se pueden reemplazar los 2 μ l de agua bidestilada del protocolo anterior por suspensión de ADNc purificado, con lo que este último componente tendrá un volumen final de 7 microlitros.

El ligado se consigue porque el plásmido (inicialmente una cadena abierta) porta en sus dos extremos 3' dos timinas desapareadas, llamadas "bases colgantes", susceptibles de complementarizarse con las adeninas colgantes en posición 3' del ADN amplificado (véase 3.3).

Para comprobar la estabilidad del vector es recomendable evaluar su capacidad de autoligado (o religado) añadiendo una muestra más a las anteriores, a modo de control, consistente en una reacción como las descritas en la que se añade agua bidestilada en lugar de ADN purificado.

Las estructuras del vector pGEM-T y de los puntos de inserción del fragmento amplificado se muestran en las figuras 27 y 28.

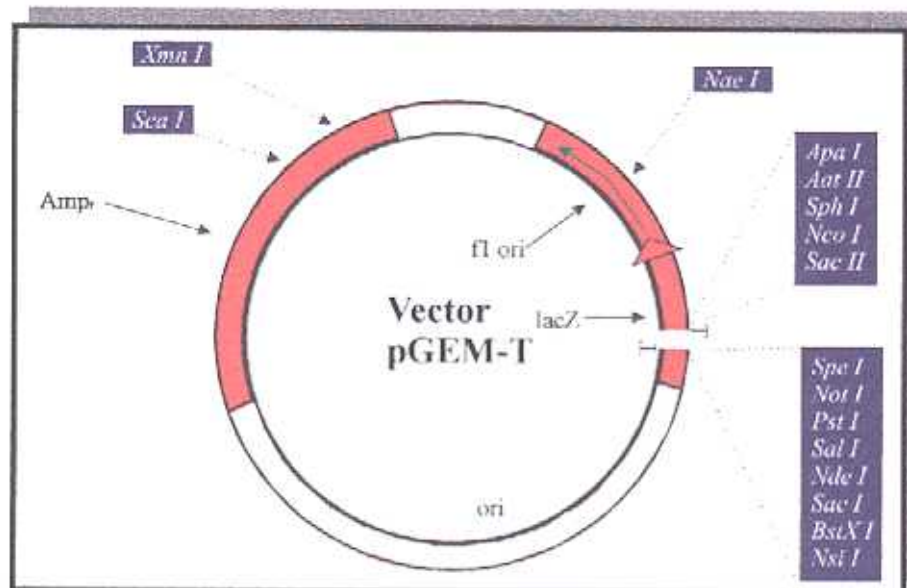


Figura 27.- Mapa del vector plasmídico pGEM-T. El mapa no es completamente circular, ya que su continuidad se interrumpe a nivel de las dos timidinas colgantes de ambos extremos 3', a ambos lados de las cuales se ha diseñado la región de las "secuencias de clonación múltiple", con un gran número de segmentos reconocibles por diferentes restrictasas.

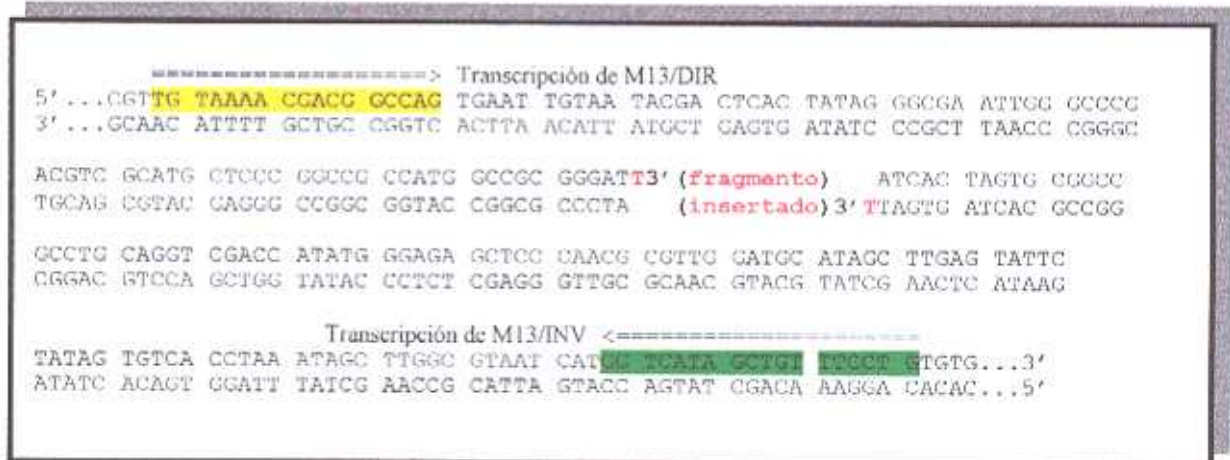


Figura 28.- Lugar de unión de los fragmentos foráneos de ADN purificados al plásmido pGEM-T. Es el hueco situado entre ambas timinas colgantes (representadas en color rojo y corchete de apareamiento). Con más detalle se aprendían en este esquema las secuencias nucleotídicas de los promotores del virus bacteriófago M13 (M13/DIR, sombreado de amarillo, para la cadena plus, y M13/INV, sombreado de verde, para la cadena minus), los cuales servirán para la posterior amplificación del fragmento de ADN que se inserta entre ambos (véase 4.4).

4.3.- PREPARACION DE BACTERIAS COMPETENTES Y TRANSFORMACION CELULAR

Como bacterias receptoras a la interiorización de material genético de mono verde se usó la cepa TG1 de la especie *Escherichia coli*, las cuales son transformadas en competentes por medio de la siguiente sucesión de etapas:

1.- Una alícuota de 5 µl de suspensión de bacterias de la cepa TG1 se inocula en un volumen de 5 ml de medio TY 2X (dilución 1:1 000) y el tubo empleado se deja en agitación constante (200-250 rpm) durante toda la noche a la temperatura de 37°C. El medio líquido TY 2X para el enriquecimiento de cultivos bacterianos se prepara

(por cada 1.000 ml) disolviendo 16 g de bacto-triptona (DIFCO; Detroit, MI, USA), 5 g de extracto de bacto-levadura (id.) y 5 g de cloruro sódico (MERCK); el pH se ajusta a 7 con NaOH 5N (id.).

2.- Alcanzada la fase de crecimiento exponencial (12-14 horas de agitación) se recogen 400 µl del medio enriquecido y se inoculan en 40 ml de medio TY 2X (dilución 1:100), volviendo a agitar la suspensión bacteriana durante 2 horas a 37°C (200-250 rpm).

3.- Esta nueva suspensión se centrifuga a 3.000 rpm durante 10 minutos.

4.- Se obtiene un botón bacteriano del que se elimina el sobrenadante por decantación.

5.- El botón es resuspendido en 20 ml de una disolución fría (4°C) de Cl₂Ca 50 mM [MERCK; la disolución será filtrada a través de una membrana de 0,2 µm (MILLIPORE; Molsheim, Francia)], manteniendo el tubo inmerso en un baño de hielo. Esta resuspensión debe hacerse con suavidad, puesto que el contacto con los iones Ca²⁺ tiene el efecto de fragilizar la pared bacteriana, con lo que una resuspensión por agitación vigorosa podría destruir las bacterias. A partir del contacto con el cloruro cálcico resulta crítico que las bacterias estén siempre en un entorno frío.

6.- La suspensión, inmersa en baño de hielo, se deja en reposo durante 30 minutos, tiempo mínimo para que los iones de calcio terminen de fragilizar las paredes bacterianas, volviéndolas porosas y permeables a la introducción de material genético no propio.

7.- La suspensión es centrifugada durante 10 minutos, a la velocidad de 3.000 rpm y a la temperatura de 4°C.

8.- Dentro de un baño de hielo, al botón bacteriano obtenido se le elimina el sobrenadante por aspiración y se vuelve a resuspender cuidadosamente en 4 ml de disolución fría de Cl₂Ca.

La transformación se logró poniendo en contacto durante media hora (dentro de un baño de hielo) cada disolución de los ADN_s ligados (5 µl de cada una) con una alícuota de 50 µl de la suspensión de bacterias competentes. También se transformó una alícuota de bacterias competentes con el plásmido religado (véase 4.2). Con esta incubación se consigue que los plásmidos queden adheridos a la superficie externa de la bacteria.

Acabada la incubación se somete a un breve choque térmico (42°C durante 40-45 segundos) a cada tubo de reacción, con lo que se logra la dilatación de los poros membranosos y la penetración del plásmido; a continuación, una inmersión en hielo durante un mínimo de 2 minutos contrae nuevamente los poros.

Se añaden 450 µl de medio TY2X y se mantiene el cultivo en agitación (200-250 rpm) a 37°C durante 1-1,5 horas, tras lo cual ya se puede sembrar en placas de agar LB.

El agar LB se prepara pesando y disolviendo, por cada 1.000 ml, 10 gramos de bacto-triptona (DIFCO), 5 de extracto de bacto-levadura (id.) y 10 de ClNa (MERCK). Estos componentes se disuelven en 950 ml de agua destilada y se ajusta su pH hasta 7 con NaOH, enrasando hasta un volumen final de un litro, tras lo cual se añaden 7,5 gramos de bacto-agar (DIFCO). Se esteriliza en autoclave durante 20 minutos. Tras el autoclavado, y sin llegar a dejar que la temperatura baje lo suficiente como para que el bacto-agar polimerice (fenómeno que ocurre aproximadamente a 56°C), se fracciona la suspensión en placas de Petri, conteniendo cada una de ellas un volumen de 20 ml.

Las placas se enfrían y polimerizan su agar a temperatura ambiente y, después, se dejan en reposo durante una noche a fin de eliminar el exceso de humedad que aún contienen. Acabado este periodo, las placas se sellan con papel PARAFILM (AMERICAN NATIONAL CAN; Neenah, WI, USA) y, en posición invertida (para evitar deshidrataciones excesivas), se guardan a la temperatura de 4°C hasta el momento de su uso.

Antes de la siembra bacteriana, las placas se pretratan impregnándolas en toda su superficie con 100 μ l de una disolución etanólica de ampicilina (20 mg/ml) y, media hora después, se les extiende una mezcla de dos disoluciones: 40 μ l de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido) al 2% en dimetilformamida como disolvente, y 40 μ l de disolución acuosa de IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosido) 100 mM. Media hora después de esta segunda impregnación, ya puede procederse a la siembra, utilizando para ello un volumen de 200 μ l de suspensión de células transformadas. Las placas sembradas se incuban, invertidas, en una estufa a la temperatura de 37°C durante 14-18 horas.

Para evaluar la eficiencia de las bacterias competentes se realiza un control de transformación de bacterias, usando 10 pg de un plásmido superenrollado, carente de inserto e, igualmente, portador del gen que confiere resistencia a la ampicilina, para transformar 200 μ l de bacterias competentes.

4.4.- SELECCION, AMPLIFICACION Y CONFIRMACION DE LOS CLONES RECOMBINANTES

Las colonias de bacterias transformadas (todas las que han conseguido crecer sobre el agar pretratado con antibiótico) se dividen en dos clases según su color: blancas y azules. Las blancas son las que llevan plásmidos recombinantes y el color se debe a que la inserción del ADN foráneo se produce en un punto del plásmido en el que se rompe la integridad del gen *lacZ*, cuyo producto proteico ayuda a la bacteria a metabolizar el X-gal (figura 27).

Por contra, en las bacterias portadoras de plásmidos no recombinantes, queda preservada la estructura y capacidad codificante del gen anterior, permitiendo a la bacteria degradar el X-gal y formar en esta reacción un derivado metabólico cuyo pH tiñe de azul a la colonia.

El resultado de las placas en las que se han sembrado bacterias transformadas con plásmido religado y de las que lo han sido con control de transformación nos informará sobre la calidad del experimento.

La placa de control de religado tan sólo debe contener una mínima proporción de colonias blancas (1-8%).

La placa en la que se ha sembrado el control de transformación debe mostrar una eficiencia de \approx 100 células transformantes/pg de plásmido superenrollado.

Pero no todas las colonias blancas acaban resultando positivas para el ADN insertado, puesto que puede ocurrir que, dentro de una bacteria, el plásmido no recombinante se rompa imposibilitando el metabolismo del X-gal y confiriendo a la colonia color blanco. Sería un caso de falsa positividad.

Para confirmar la condición de auténticas recombinantes de las colonias blancas (descartando los posibles falsos positivos), se procedió a recoger (con el extremo de una punta de micropipeta de 20-100 μ l) al azar algunas de estas colonias blancas, separándolas así de la superficie del agar y sumergiéndolas en 15 μ l de disolución de PBS. Un microvolumen de 10 μ l de esta suspensión bacteriana se inocula en 90 μ l de disolución acuosa al 0,1% de detergente TWEEN-20 (PANREAC). Tras esto, las bacterias son sometidas a una incubación de 100°C durante 15 minutos, proceso por el que las bacterias quedan lisadas, liberándose su material genético.

A continuación se realiza una PCR de "control de insertos". Algunas bases antes del punto de inserción, y a cada lado del mismo, el plásmido pGEM-T presenta unas cortas secuencias del bacteriófago M13 (figura 28), las cuales serán usadas como cebadores para amplificar toda la región que se extiende entre ellas.

Los dos cebadores de M13 tienen la siguiente composición de bases:

M13/DIR: 5'-TGTA AACGACGGCCAG-3'

M13/INV: 5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3'

Este control de insertos se prepara, para cada reacción, de la siguiente manera:

<u>Reactivo</u>	<u>Volumen</u>
Tampón PCR 10X	2,5 µl
Cl ₂ Mg 25 mM	1,5 "
dNTPmix 1,25 mM	0,5 "
Cebador M13/DIR 3,2 µM	0,39 "
Cebador M13/INV 3,2 µM	0,39 "
Taq-polimerasa (5 U/µl)	0,1 "
Glicerol (25%)	5 "
Rojo de cresol 5X	5 "
H ₂ O bidestilada	4,62 "
TOTAL	20 "

A cada una de estas mezclas se les añaden 5 µl de cada suspensión de TWEEN-20 que contiene plásmidos de las bacterias destruidas por calor (volumen total = 25 µl).

Las condiciones de esta PCR son 30 ciclos de:

- Desnaturalización a 95°C durante 20 segundos.
- Anillamiento a 50°C durante 20 segundos.
- Elongación durante un minuto a 72°C.

Si el plásmido porta inserto, el amplificado final se revelará en la electroforesis subsiguiente (figura 29) como una banda cuyo tamaño es de 696 pb, correspondiente a la longitud del ADN amplificado de DRB (478 bases; véase 3.5) más la longitud de separación que hay entre cada cebador de M13 y el extremo más cercano al ADN insertado (183 pb; 75 desde M13/DIR y 108 desde M13/INV; figura 28), más la longitud propia de los cebadores (35 bases; 17 del oligo directo y 18 del inverso).

Si no ha habido inserto, los dos cebadores flanquearán un segmento muy corto (218 pb, incluyendo las secuencias de ambos), dando una banda de ADN que en la electroforesis migrará muy rápido debido a su pequeño tamaño.

De aquellos clones cuya positividad haya sido confirmada se inoculan los 5 µl restantes de suspensión bacteriana en PBS dentro de 5 ml de TY2X, en agitación a 37°C durante 12-16 horas, a 200-250 rpm.



Figura 29.- Control electroforético posterior a una PCR de control de insertos. Las bandas amplificadas se sitúan en una zona que corresponde a un tamaño equivalente al del fragmento génico amplificado más las regiones flanqueantes del plásmido (algo menos de 700 pb; marcador VI). En la parte derecha de la fotografía, y a la izquierda del marcador de peso molecular se ve una banda más liviana (algo más de 200 pb) correspondiente a la amplificación de una secuencia plasmídica (PI) carente de inserto. Los números corresponden a la identificación de cada mono verde: Ve-n.

4.5.- PURIFICACION DE PLASMIDOS RECOMBINANTES

Una vez que se ha conseguido un medio enriquecido en bacterias portadoras de plásmidos recombinantes, se procede al aislamiento y purificación de tales plásmidos, para lo cual se ha empleado el equipo "QIA-Well 8 Plasmid Kit" (QIAGEN; Hilden, Alemania), cuyo proceso se atiene a las siguientes etapas:

1.- Transferencia del medio enriquecido a tubos limpios de microcentrífuga. Normalmente sólo se transfieren 3 de los 5 ml (dos tubos); centrifugación a 3.000 rpm durante 2 minutos y eliminación de los sobrenadantes por aspiración.

2.- Resuspensión de los dos botones bacterianos en un volumen de 300 μ l de tampón de resuspensión o P1 (Tris 25 mM, pH 8; EDTA 10 mM; glucosa 50 mM.) y agitación vigorosa en vórtex para conseguir que el botón quede completamente resuspendido. Este tampón está complementado con RNasa H a fin de eliminar trazas contaminantes de ARN bacteriano.

3.- Adición de 300 μ l de tampón de lisis o P2 (NaOH 0,2 N; SDS 1%) y actuación del mismo durante 5 minutos, cuya extrema alcalinidad provoca la lisis de las células resuspendidas y que el plásmido adopte una conformación superenrollada que le protegerá de futuras acciones químicas.

4.- Adición de 300 μ l de tampón de neutralización o P3 (360 ml de una disolución de acetato potásico 5 M a la que se le añaden 70 ml de ácido acético glacial; ajustar el pH a 4,8; enrasar con agua destilada hasta 500 ml, con lo que se obtiene una disolución 5 M para el ion acetato y 3 M para el catión K^+). El ácido acético neutraliza la alcalinidad de P2 durante un espacio de 10 minutos en baño de hielo.

5.- Centrifugación a velocidad de 14.000 rpm durante 15 minutos. Los sobrenadantes, que contienen los plásmidos recombinantes, se cargan en minicolumnas provistas por el kit. Estas minicolumnas son pequeños cilindros con una membrana porosa acoplada a una boquilla inferior para salida de líquidos. El conjunto se filtra por absorción al vacío, haciendo que los plásmidos queden adheridos a las membranas.

6.- Seguidamente se hacen pasar, por absorción al vacío, 2 ml de tampón de lavado, el cual elimina los residuos salinos atrapados en las membranas porosas.

7.- Finalmente, cada plásmido será despegado de la membrana que lo retiene haciendo pasar por las columnas 0,5 ml de tampón de elución. El eluato es recogido en tubos colectores suministrados por el propio kit.

8.- Al volumen eluido se le añaden 350 μl (70% del volumen total eluido) de isopropanol puro equilibrado a temperatura ambiente, el cual actuará como fase extractora. Tras homogenizar bien las mezclas anteriores se centrifugan los tubos colectores durante 30 minutos a 14.000 rpm.

9.- Por aspiración se eliminan cuidadosamente los sobrenadantes de la centrifugación anterior, y el botón plasmídico es lavado con etanol frío (-20°C) al 70%. Tras una nueva centrifugación (14.000 rpm, 5 minutos) y aspiración de sobrenadantes, el botón plasmídico es secado por centrifugación al vacío y resuspendido en 20 μl de agua bidestilada.

10.- Por espectrofotometría se determina la concentración de los plásmidos:

$[\text{ADN}_{\text{PLASM}}] = A_{260} \times 50 \times F_{\text{DIL}}$, así como su pureza, expresada por el cociente (A_{260}/A_{280}). El primero de estos parámetros vendrá expresado en ng/ μl y las muestras se ajustarán finalmente hasta el valor de 200 ng/ μl , tras lo cual se guardan a -20°C. En cuanto a la pureza, lo ideal es obtener un cociente de absorbancias igual a 1,8, pero en la práctica se obtienen buenos resultados con valores comprendidos entre 1,4-1,9.

4.6.- REACCIONES DE SECUENCIACION

Una vez purificado el ADN bicatenario de plásmido que contiene el inserto de interés, se realizan las reacciones de secuenciación (copia) siguiendo básicamente el modelo descrito por Sanger y colaboradores (1.977). Se pueden utilizar distintas enzimas como polimerasas y procedimientos manuales de secuenciación (que incluyen el manejo de isótopos radiactivos) o automatizados, con el uso de fluoróforos como señal. En este trabajo se utilizó la enzima *Taq* polimerasa y un procedimiento automatizado de secuenciación, con el uso de un termociclador para las reacciones de secuenciación y de un secuenciador automático de ADN.

La mezcla de reacción se realiza con los siguientes componentes:

<u>Reactivos</u>	<u>Volumen</u>
PREMIX de terminadores	9,5 μl
M13/(DIR o INV) 3,2 μM	1 "
H ₂ O bidestilada	4,5 "
TOTAL	15 "

El PREMIX de terminadores ya viene preparado comercialmente (APPLIED BIOSYSTEMS) y es una mezcla de dye-terminadores de A, C, G y T, dATP, dCTP, dITP, dTTP, Tris-HCl pH 9, Cl₂Mg, pirofosfatasa termoestable y Ampli-*Taq* polimerasa FS.

Se añade el ADN plasmídico que se quiere secuenciar, en un volumen final de 5 μl y concentración inicial de 200 ng/ μl . El volumen final de cada reacción de secuenciación es de 20 μl .

Las reacciones de secuenciación se llevan a cabo en el mismo termociclador en el que se realizaron las amplificaciones originales y las PCRs de control de insertos, con las siguientes condiciones:

- a) Desnaturalización inicial a 95°C durante 2 minutos.
- b) 25 ciclos de:
 - 1.- Desnaturalización a 96°C durante 15 segundos.
 - 2.- Anillamiento (un solo cebador por reacción) a 50°C durante 1 segundo.
 - 3.- Elongación a 60°C durante 4 minutos.
- c) Enfriamiento final a 4°C durante tiempo indefinido.

El fragmento de ADN, abarcando los exones 2 y 3 de DRB, fue secuenciado tanto en sentido directo (con el empleo del oligonucleótido M13/DIR) como en el inverso (con el M13/INV), puesto que la longitud total del amplificado (478 pb) es algo superior a la sensibilidad óptima del secuenciador de ADN (≈ 300 pb).

En las reacciones de secuenciación se incorporan en una hebra desnaturalizada de ADN, a partir de un cebador, además de los deoxinucleótidos habituales en una PCR, dideoxinucleótidos marcados con cuatro fluorocromos distintos [fluoresceína, NBD(4-cloro-7-nitrobenceno-2-oxal-diazol), tetrametilrodamina y rojo de Texas, uno para cada base], pero cuando uno de estos dideoxinucleótidos es el incorporado la cadena ya no será elongada subsiguientemente (figura 30) y el fragmento de ADN terminará en el punto en el que se incorpora ese nucleótido modificado.

4.7.- PURIFICACION DE LAS REACCIONES DE SECUENCIACION

Este procedimiento de purificación es necesario con el fin de eliminar el exceso de "terminadores" marcados y no incorporados a las secuencias. Para ello se utilizaron columnas de sephadex (Sephadex G-50 Fine; BOEHRINGER MANNHEIM), cuyo límite de exclusión es inferior a 72 pb. Sus etapas son:

- 1.- Homogenizar el contenido de la columna y dejarlo reposar para que el sephadex se sitúe en la parte inferior de la misma.
- 2.- Abrir y dejar eluir el tampón.
- 3.- Lavar la columna con 1 ml de agua destilada.
- 4.- Centrifugar a 1.200 Xg durante 2 minutos.
5. Pipetear el producto de la reacción de secuenciación en el interior de la columna.
- 6.- Centrifugar a 1.200 Xg durante 2 minutos sobre un tubo donde se recoja la reacción.
- 7.- Secar la muestra por completo en una centrífuga conectada a una bomba de vacío. Las muestras ya están preparadas para cargarse en el gel de secuenciación o pueden guardarse a -20°C y en oscuridad.

4.8.- CARGA DE LOS PRODUCTOS EN EL GEL, DETECCION Y OBTENCION DE LAS SECUENCIAS

Para preparar los geles de secuenciación, se mezclan:

- a) 50 gramos de urea (MERCK).
- b) 15 ml de acrilamida (BIO-RAD; Hercules, CA, USA) al 40% (38 g de acrilamida + 2 g de bis-acrilamida

en 100 ml de disolvente).

c) 2 gramos de resina de intercambio iónico.

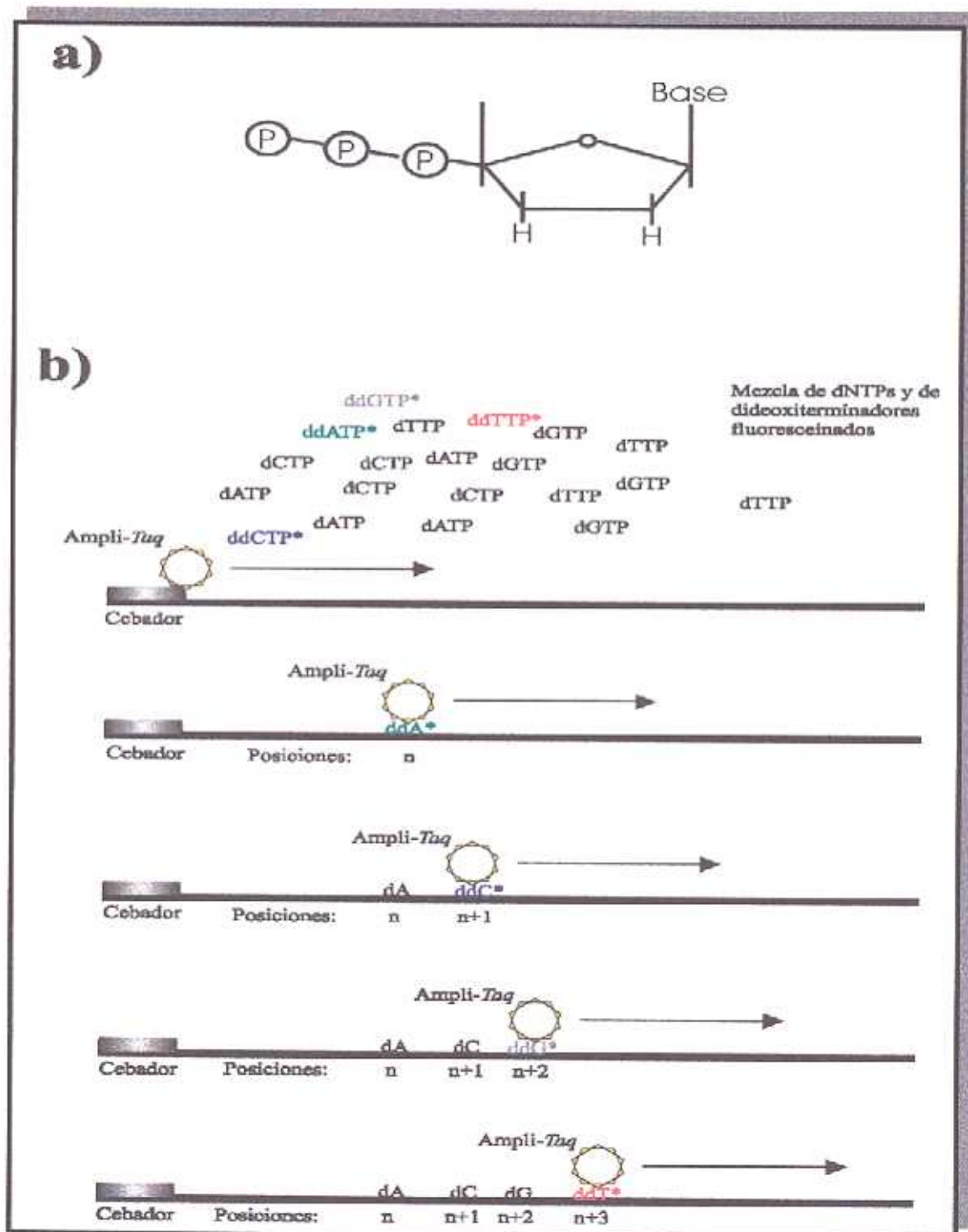


Figura 30.- Esquema de una reacción de secuenciación. a) Estructura de un dideoxineucleótido trifosfato (ddNTP), que bloquea la elongación de la cadena. b) Modo de actuación de la enzima Ampli-Taq: si esta enzima introduce un dideoxineucleótido fluoresceinado en la cadena de ADN (posición n) ésta ya no continuará elongándose. Posteriormente, un equipo informatizado identificará la base presente en esa posición en función de la fluorescencia emitida. En otras cadenas de ADN de ese mismo medio de reacción también se incorporará este nucleótido modificado, pero en otras no, sino otro normal, pero, a su vez, la siguiente posición (n+1) será ocupada por otro dideoxineucleótido marcado con fluorescencia, el cual sí podrá ser reconocido por el secuenciador, repitiéndose este ciclo hasta que se complete la secuenciación del fragmento genético que se quiere conocer o, en su defecto, hasta alcanzar una longitud de secuenciación igual a la sensibilidad del sistema empleado. En este ejemplo, la secuencia reconocida sería ACGT. Las moléculas representadas en color son los ddNTPs, y el asterisco indica que son moléculas excitables y emisoras de fluorescencia.

Al final se consigue un gel al 6% de acrilamida y 8,3 M de urea. Se agita la mezcla magnéticamente y con calor (50°C) hasta que se disuelva totalmente. A continuación se hace pasar por un filtro de 0,22 µm (NUNC), se le añaden 10 ml de tampón T.E.B. 10X y se enrasa hasta 100 ml con agua bidestilada.

Los cristales de secuenciación se lavan con detergentes que no produzcan residuos y agua caliente, secándolos con papel blanco del tipo "tissue". Se aclaran con abundante agua corriente y, cuando ya no quedan residuos de detergente, con agua bidestilada. Finalmente se lavan con etanol al 95% y se dejan secar en posición vertical.

Cuando se han secado se prepara una estructura trilaminar cristal-espaciadores-cristal. Se sellan los laterales y el fondo con cinta adhesiva plástica. A la solución de acrilamida filtrada se le añaden 500 µl de persulfato amónico al 10% y 45 µl de TEMED (IBI). Se agita suavemente y se carga entre los dos cristales, en posición vertical y procurando evitar la formación de burbujas. Cuando el interior de los cristales está lleno hasta dos centímetros del borde superior, se coloca el peine de secuenciación y se fija con tres pinzas metálicas. El conjunto se deja en reposo durante 1-2 horas para que pueda polimerizar.

Polimerizada la acrilamida, se retiran las pinzas, el peine y la cinta adhesiva. Se lava abundantemente con agua corriente y seguidamente con etanol al 95%. Se coloca el conjunto en el interior de la cubeta del secuenciador automático Applied Biosystems 373A. Una vez situado el cristal y comprobada la buena lectura del láser, se rellenan con tampón T.E.B. 1X las cubetas de electroforesis superior e inferior. Se conectan los cables de tensión, se limpian los pocillos de restos de acrilamida y se realiza una carrera previa de electroforesis durante 30 minutos, a 1500 V, 20 mA y 30W

Las muestras de secuenciación, una vez descongeladas (véase 4.7) se resuspenden en una mezcla de 1 µl de EDTA 50 mM, pH 8, y 5 µl de formamida desionizada, preparándose esta última de la siguiente forma: el mismo día de su uso, pesar 5 gramos de resina AG 501-X8 (BIO-RAD) por cada 100 ml de formamida. Agitar magnéticamente durante 30 minutos. Eliminar la resina filtrando con papel de filtro normal.

La preparación anterior y las reacciones purificadas de secuenciación se mezclan con cuidado y de forma repetida para conseguir la resuspensión del botón de ADN. A continuación se centrifugan los tubos durante unos pocos segundos para recoger todo el líquido en el fondo. Se calientan durante dos minutos a 90°C para desnaturalizar el ADN y se sumergen inmediatamente en hielo para evitar la renaturalización que vendría a causa de una bajada paulatina de la temperatura. Así quedan preparadas las muestras para ser cargadas en los pocillos del gel. Después de la carga se someten a electroforesis en las mismas condiciones que la pre-carrera, durante 14 horas.

Dentro del secuenciador, un rayo láser incide sobre y excita los fluoróforos que pasan a su través (figura 31), y la longitud de onda emitida al cesar la excitación estará en función de cuál sea el fluoróforo excitado, que será diferente para cada dideoxinucleótido. La emisión se filtra por los cuatro colores posibles, se fotomultiplica y se envía al ordenador, el cual identifica las bases marcadas y sus posiciones dentro del fragmento secuenciado. Es necesaria esta computerización de la última etapa de la técnica para discriminar los espectros de cada fluorocromo, ya que se solapan ligeramente (Smith et al., 1.986).

En las figuras 32 y 33 se ven ejemplos de secuencias nucleotídicas recogidas del secuenciador y empleadas en los análisis efectuados en el presente trabajo.

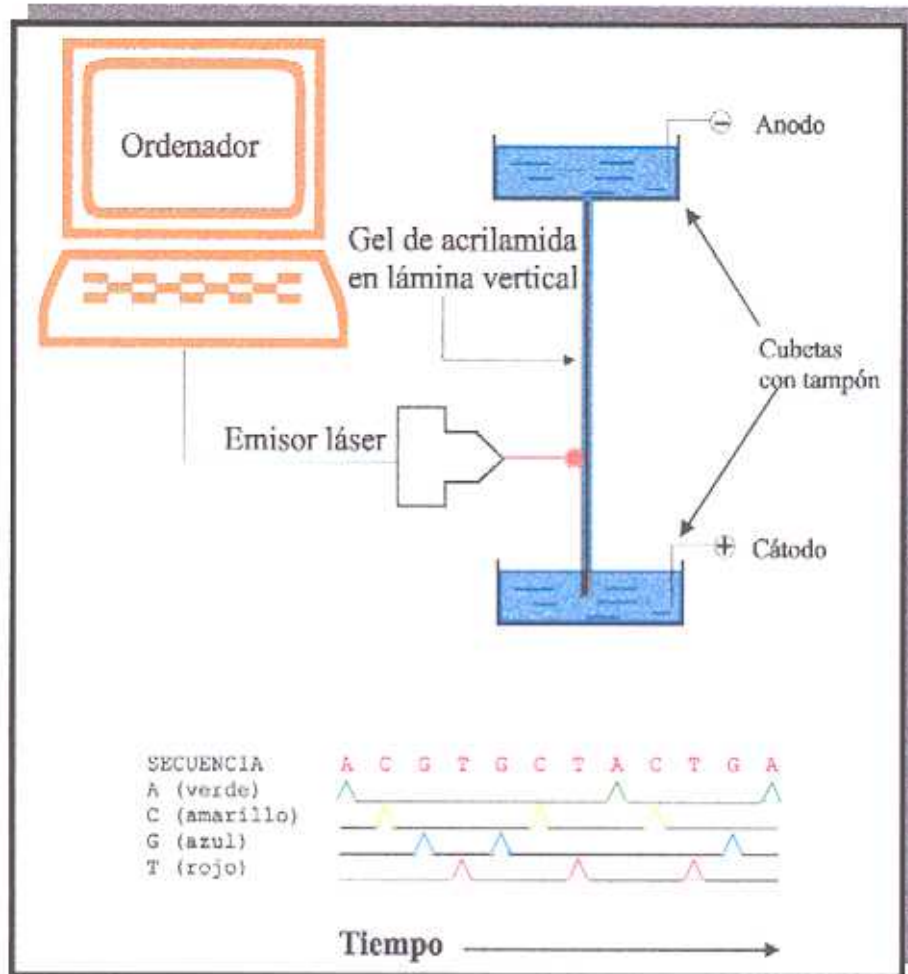


Figura 31.- Diagrama simplificado de un proceso automatizado de secuenciación de ADN. Cuando el haz láser incide sobre una molécula de fluoróforo se emite una radiación cuya longitud de onda es captada y reconocida por el ordenador (un pico de fluorescencia, como se representa en la parte inferior de la figura) como perteneciente a una determinada base. A lo largo del tiempo, el ordenador integra las diferentes señales que han llegado hasta él, en un determinado orden cronológico, y elabora la secuencia consecutiva de bases (en la figura sería una secuencia de las bases ACGTGCTACTGA)

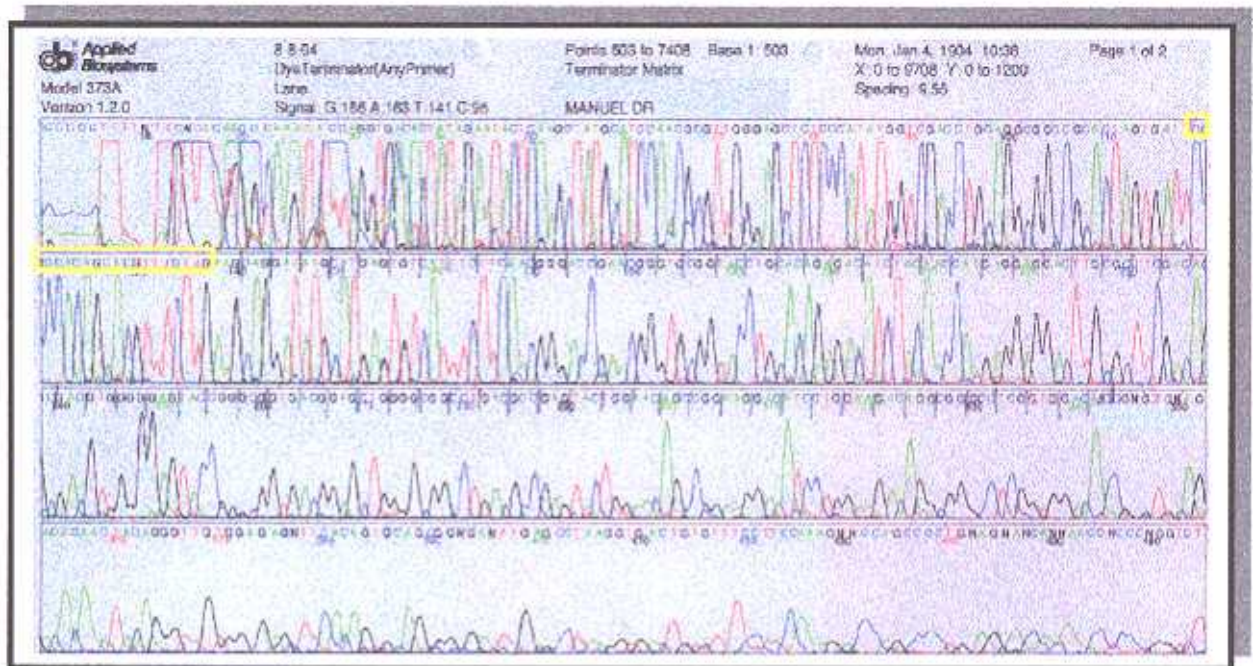


Figura 32.- Secuencia nucleotídica obtenida de, aproximadamente, las 277 primeras bases del fragmento conjunto formado por los exones 2 y 3 de un alelo *Mhc-DRB* del mono verde. El oligonucleótido empleado para la secuenciación fue el M13/DIR. A partir de la base n° 118 (en color amarillo) se distingue la secuencia de *DRB-Amp A*, utilizada como cebador directo en la PCR inicial de los ADNc.

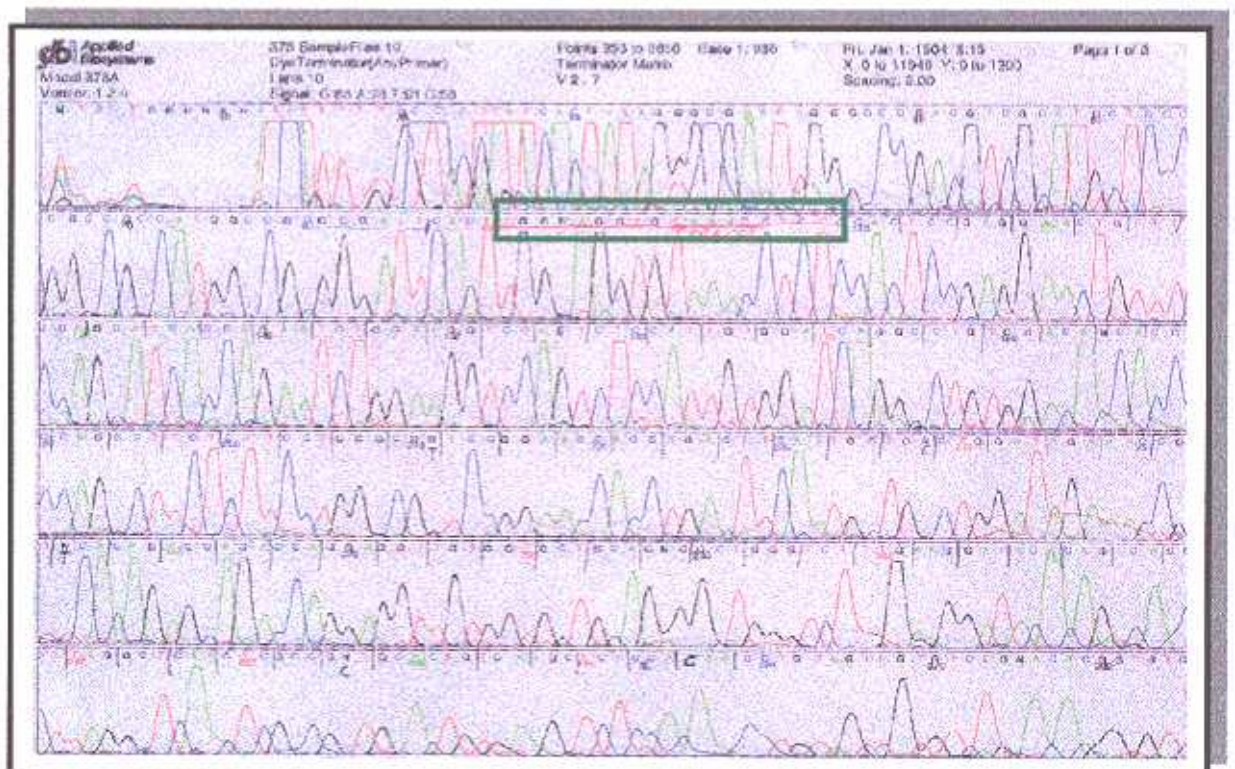


Figura 33.- Secuencia nucleotídica correspondiente a las últimas 295 bases del segmento exón 2 más exón 3 de un alelo *Ceae-DRB*. El oligonucleótido usado como cebador para la reacción de secuenciación fue el M13/INV y, a partir de la base n° 90 se localiza el oligonucleótido usado como cebador inverso en la etapa previa de amplificación, el *DRBE-3* (en verde).

5.- ANALISIS DE SECUENCIAS

5.1.- PROGRAMA PARA TRADUCCION DE SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS A FRAGMENTOS PEPTIDICOS

La traducción a proteína, a partir de todas las secuencias nucleotídicas obtenidas, se realizó con el programa TRANSL, contenido en el paquete informático PC/GENE (INTELLIGENETICS; Palo Alto, CA, USA). Este programa hace una traducción en los tres posibles marcos de lectura, por lo que es necesario conocer cuál es la correcta pauta de lectura de la secuencia nucleotídica investigada a fin de escoger la adecuada al trabajo que se lleva a cabo.

5.2.- PROGRAMAS PARA CALCULOS EVOLUTIVOS

5.2.1.- Construcción de dendrogramas según la homología entre secuencias

5.2.1.1.- Dendrogramas del programa CLUSTAL

Los árboles o dendrogramas filogenéticos se construyeron a partir de las secuencias de ADN utilizando el programa CLUSTAL del paquete informático PC/GENE, programa que se basa en el método de Wilbur y Lipman (Wilbur y Lipman, 1.983; Higgins y Sharp, 1.988; Higgins y Sharp, 1.989).

CLUSTAL recoge las secuencias que se han introducido en un adecuado formato informático y las dispone en un alineamiento buscando homología y diferencias. Seguidamente, calcula un valor de similitud para cada pareja de secuencias que se someten a comparación. En un tercer paso se construye el dendrograma utilizando los valores de similitud obtenidos para cada pareja en el alineamiento inicial. El método utilizado para construir los dendrogramas se llama UPGMA (*Unweighted Pair Group Maximum Average*; Máximo Promedio de Grupos Pareados y No ponderados). El método UPGMA comienza agrupando en una rama las dos secuencias más similares. Posteriormente, calcula los valores de similitud de esta rama con cada una de las secuencias restantes. En pasos posteriores se van agrupando las dos secuencias más similares en nuevas ramas y se calculan nuevos valores de similitud para cada una de las ramas que se van estableciendo.

5.2.1.2.- Método de máxima parsimonia (DNAPARS)

DNAPARS es un programa incluido en el paquete PHYLIP (*Phylogenic Inference Package 3.5c*; Paquete de Inferencia Filogenética; Felsenstein, J., 1.993). Estima filogenias por el método de parsimonia usando secuencias nucleotídicas y se basa en las siguientes asunciones:

- a) Cada sitio evoluciona independientemente.

b) Los linajes diferentes evolucionan independientemente.

c) La probabilidad de sustitución de una base en un sitio dado es pequeña en el conjunto de los periodos de tiempo implicados en una rama de la filogenia.

Los residuos delecionados son tratados como si fueran un quinto nucleótido; de hecho, las deleciones son consideradas como un cambio y las reversiones de las mismas también.

Finalmente, todos los extremos de las ramas quedan alineados en la misma vertical, por lo que, pese a ser el DNAPARS un buen método para establecer filogenias, no es adecuado para la evaluación de distancias genéticas.

Con DNAPARS, cada rama y arracimamiento de secuencias tiene una probabilidad asociada de ocurrencia. No obstante, cada vez que el programa es ejecutado, aún con el mismo grupo de secuencias nucleotídicas, estas probabilidades están sujetas a pequeñas fluctuaciones, como resultado de que, cada vez que el programa funciona, las comparaciones entre las secuencias introducidas son efectuadas de manera aleatoria. Es por ello que, para tener una idea de la bondad de tales probabilidades, PHYLIP incorpora otro programa, llamado SEQBOOT, que permite realizar un proceso de "bootstrap" (véase 5.2.3) para el análisis de la topología del árbol (Felsenstein, 1.988).

Además de ello, PHYLIP dispone de otra herramienta, llamada CONSENSE, gracias a la cual se puede obtener un árbol consenso a partir del n número de veces que SEQBOOT haya efectuado las comparaciones entre las secuencias objeto de estudio.

5.2.2.- Construcción de dendrogramas según el cálculo de distancias evolutivas entre secuencias

El programa NJBOOT II está basado en el método de Saitou y Nei (1.987). Además, al igual que PHYLIP, incluye la capacidad de llevar a cabo un proceso de "bootstrap" con la finalidad de evaluar la significación estadística de cada rama interior del árbol.

NJBOOT II permite elegir uno entre varios métodos para el cálculo de las distancias genéticas de las secuencias introducidas en el fichero de entrada; en este trabajo se ha optado por el método biparamétrico de Kimura (Kimura, 1.980).

Este método se aplica sólo a los ácidos nucleicos y considera el hecho de que las transiciones (purina-purina o pirimidina-pirimidina) ocurren, a menudo, con más frecuencia que las transversiones.

Cuando NJBOOT II ha calculado los valores de distancias genéticas entre las secuencias introducidas en el fichero de entrada, interviene el programa TREEVIEW (asociado a aquél), el cual permite la visualización gráfica del árbol filogenético.

Puesto que el árbol obtenido por este procedimiento está en función de las distancias genéticas entre las secuencias nucleotídicas, los extremos de las ramas del mismo no se encuentran en la misma vertical, a diferencia de lo que ocurre con los dendrogramas de los programas CLUSTAL y DNAPARS.

5.2.3.- Confianza estadística de las ramas obtenidas

La bondad estadística de las ramas internas de los árboles obtenidos se calculó con el método denominado "bootstrap" (Felsenstein, 1.988). En este método se introducen cambios al azar en las secuencias y se analizan. Esto

se repite durante varios ciclos (normalmente 100-1.000 ciclos). El resultado final introduce un valor a cada nodo que da idea de la frecuencia con que aparece dicho nodo en la totalidad de los ciclos del análisis.

5.2.4.- Cálculo de la proporción de sustituciones sinónimas y no sinónimas (programa NAG)

NAG (*Nei and Gojobori*) es un programa FORTRAN para la estimación del número de sustituciones sinónimas y no sinónimas por sitio nucleotídico, que se basa en el método de Nei y Gojobori (1.986).

En el fichero de salida de datos se dispone de la siguiente información:

- a) Nombre del fichero de entrada en la primera línea.
- b) El resultado del análisis a partir de la segunda línea. El fichero de salida proporciona secuencias comparadas, número de sitios, número de búsquedas en las que se han encontrado sustituciones, proporción de diferencias y número de sustituciones por sitio para la región total y las de sitios sinónimos y no sinónimos. El número de sustituciones por sitio se estima según el método de Jukes y Cantor (1.969).

6.- NOMENCLATURA ALELICA DE LAS SECUENCIAS OBTENIDAS

De forma individualizada, cada secuencia fue finalmente denominada siguiendo las instrucciones propuestas por Klein et al. (1.990). El nombre de cada secuencia (o alelo) comienza con cuatro caracteres alfabéticos, *Ceae*, basados en el nombre de la especie de procedencia. Las dos primeras de estas cuatro letras son, a su vez, las dos primeras letras del nombre del género (*Cercopithecus*), mientras que las otras dos son las dos primeras letras del epíteto específico del género (*aethiops*). Este nombre de cuatro caracteres va seguido por un guión, después del cual se escribe, en letra cursiva, el gen considerado (*DRB1*, *DRB3*, *DRB4*...), si se está tratando con genes que tienen ortólogos en HLA; además, un asterisco, inmediatamente después del cual se escribe un dígito de cuatro cifras de las que las dos primeras hacen referencia al linaje alélico (*01*, *02*, *03*...). Los otros dos numerales hacen referencia al orden de descubrimiento de tales alelos. Un ejemplo de lo dicho lo constituye el alelo *Gogo-DRB1*1001*, en el que el nombre nos indica que es un alelo de la especie *Gorilla gorilla* (*Gogo*), perteneciente al gen prototípico *DRB1* y que, dentro de éste está incluido en el linaje **10*, habiendo sido el primer alelo que se describió en tal linaje (*01*).

Pero si el alelo estudiado exhibe escasa homología con los de HLA, de manera que en este sistema genético no se encuentran secuencias ortólogas, no siendo posible su asignación a un gen concreto, se omitirá el numeral de designación génica, colocándose el grupo "**w*" inmediatamente después del término "*DRB*". A continuación de **w* se escribirá un número de tres o de cuatro cifras, en las que las dos últimas harán referencia siempre al orden de descubrimiento del alelo, mientras que la primera o dos primeras designarán al linaje de la serie "*w*". Un ejemplo sería el alelo *Saoe-DRB*w1403*, cuyo nombre nos informa de que es el tercer (*03*) alelo estudiado en el decimocuarto linaje no prototípico (**w14*) de la especie *Saguimus oedipus* (*Saoe*).

IV.- RESULTADOS

1.- CARACTERIZACION GENICA DE LAS SECUENCIAS OBTENIDAS

1.1.- ALINEAMIENTO E IDENTIFICACION

Como resultado de la secuenciación se obtuvo un total de 27 secuencias nucleotídicas de los monos verdes africanos analizados. De ellas, 16 fueron descartadas por no cumplir los requisitos necesarios para su confirmación (obtención de, al menos, tres clones idénticos obtenidos a partir de un mínimo, en cada una, de dos amplificaciones independientes), o por tratarse de secuencias fragmentadas, no solapables. Las 11 restantes se consideraron alelos reales. La tabla 4 reúne todos los datos sobre el número de individuos, clones analizados de los mismos y secuencias finales.

Tabla 4.- Individuos, clones de los mismos y secuencias obtenidas

Nº de individuos estudiados	15
Nº de clones analizados	239
Nº de clones confirmatorios	137
Nº de secuencias obtenidas	27
Nº de secuencias confirmadas	11

Las secuencias comprendían los exones 2+3 de genes *Mhc-DRB*. El amplificado final tenía una extensión de 516 nucleótidos, siendo 259 del exón 2, 219 del exón 3, 19 del cebador directo y 19 del inverso (véase 3.5 de Materiales y Métodos).

A las 11 secuencias confirmadas se les dio inicialmente el nombre de "Ceae-n", notación que denota la especie biológica a partir de la cual fueron obtenidas (*Cercopithecus aethiops*), seguido de un número (n) que indica el orden cronológico de su aparición: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 13 y 17 (tabla 5).

Tabla 5.- Secuencias obtenidas, número de clones e individuos en los que se han hallado

<u>Secuencia</u>	<u>Nº de clones</u>	<u>Individuos</u>
<i>Ceae-1</i>	7	Ve-1, Ve-3, Ve-8 y Ve-15
<i>Ceae-2</i>	30	Ve-2, Ve-3, Ve-4, Ve-5 y Ve-6
<i>Ceae-3</i>	12	Ve-7, Ve-8, Ve-10 y Ve-15
<i>Ceae-4</i>	18	Ve-7, Ve-8, Ve-10, Ve-14 y Ve-16
<i>Ceae-5</i>	4	Ve-1
<i>Ceae-6</i>	6	Ve-1 y Ve-8
<i>Ceae-7</i>	11	Ve-10 y Ve-14
<i>Ceae-9</i>	6	Ve-1 y Ve-8
<i>Ceae-10</i>	24	Ve-1, Ve-10, Ve-11, Ve-12 y Ve-13
<i>Ceae-13</i>	14	Ve-15
<i>Ceae-17</i>	5	Ve-12 y Ve-15

A fin de facilitar su comparación, la identificación de residuos nucleotídicos comunes y diferentes y la búsqueda de señales características, las porciones correspondientes al 2º exón de dichas secuencias fueron alineadas (figura 34) con la secuencia consenso del exón 2 de genes *Mhc-DRB* (O'hUigin et al., 1.993); en cambio, al no aparecer en la bibliografía una secuencia similar que sea aceptada como consenso del exón 3 en los genes DRB, se recurrió, de manera arbitraria, a utilizar como referente la secuencia del tercer exón de *Ceae-1*.

La numeración asignada a estas bases (tanto en el exón 2 como en el 3) está basada en la que aparece en Zhu y colaboradores (1.991), y en la parte del exón 2 coincide con la que aparece en O'hUigin y colaboradores (1.993).

El que estas secuencias correspondían a alelos de los genes DRB y no a otros genes MHC de clase II (DQB, DPB, DOB o DMB) se suponía inicialmente por la pareja de cebadores empleada en las amplificaciones (diseñados para amplificar sólo genes DRB) y, posteriormente, por las regiones de amplia homología que tenían con la secuencia consenso de DRB. Su asignación a DRB se confirmó posteriormente por la construcción de un dendrograma mediante el programa CLUSTAL (figura 35; véase 5.2.1.1 de Materiales y Métodos). El origen de la rama de la secuencia consenso de DRB está aproximadamente en la misma vertical en la que se encuentran los orígenes de las ramas de *Ceae-n*; por el contrario, los orígenes de las ramas de las secuencias consenso de DQB y de DPB quedan sensiblemente más alejados. Se puede concluir que las once secuencias analizadas son alelos de la familia DRB y no de otras familias de MHC de clase II. Las secuencias empleadas para la construcción de este árbol han sido exclusivamente las del segundo exón, tanto para las secuencias investigadas como para las consenso, ya que no se dispone en la bibliografía de secuencias consenso del tercer exón de los genes DRB, DQB y DPB.

El simple análisis visual de las secuencias revela que las posiciones con cambios nucleotídicos son más numerosas en la porción correspondiente al exón 2 que a la del exón 3, situación lógica al ser el primero de ellos el encargado de codificar el dominio $\beta 1$ que es el que contacta con las estructuras antigénicas variables. También se observa que la longitud de todas las secuencias estudiadas es la misma, lo que descarta cambios mutacionales del tipo de las deleciones y de las inserciones.

1.2.- Descripción de las secuencias

A continuación se enumeran las posiciones y cambios que presentan las secuencias DRB obtenidas de los monos verdes:

Ceae-1: Tiene un total de 22 cambios respecto a la secuencia consenso del exón 2 (O'hUigin et al., 1.993). En este exón los cambios y posiciones nucleotídicas son los siguientes: **G→A** (25, 42, 127 y 169), **T→G** (37 y 258), **T→C** (48 y 88), **C→G** (84 y 167), **A→G** (98, 170, 191, 197 y 211), **A→T** (140 y 199), **G→T** (182), **G→C** (183), **T→A** (200) y **A→C** (212 y 221). El exón 3 de esta secuencia es el que se ha usado como consenso de la tercera región exónica.

Ceae-2: Tiene 29 cambios con relación al consenso de exón 2 y 13 en el exón 3. Estos son los cambios respecto a la secuencia consenso del exón 2: **G→A** (25, 66, 102, 207 y 250),

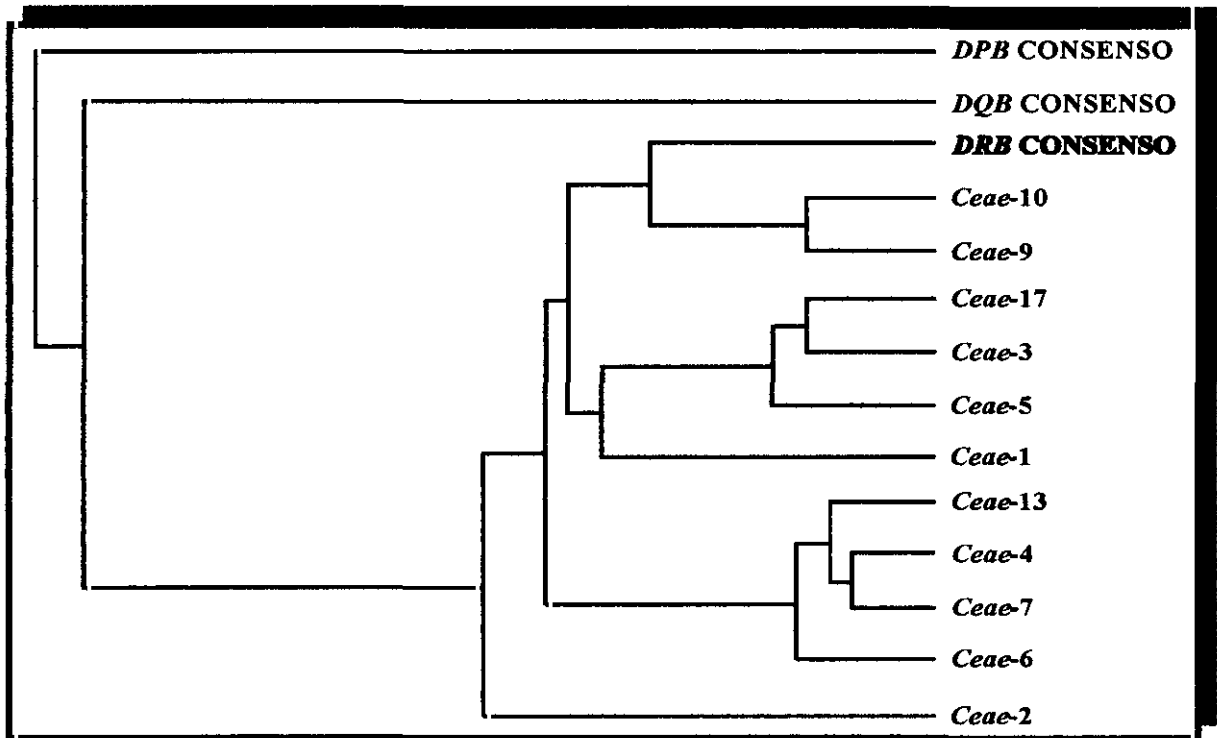


Figura 35.- Arbol de homología genética diseñado mediante el programa CLUSTAL (paquete PC/GENE): Nótese que, de las tres secuencias consenso empleadas para la asignación, es la de DRB la que ha quedado situada en la proximidad inmediata de las 11 secuencias de monos verdes: Las secuencias empleadas para la construcción de este árbol han sido exclusivamente las del segundo exón.

C→A (32, 38 y 230), A→T (35 y 233), T→C (37, 57 y 96), G→C (63, 82 y 210), T→A (77 y 91), T→G (88, 109, 232 y 258), G→T (112 y 220), A→G (191 y 212), C→G (208 y 234) y A→C (221). A nivel del exón 3 los cambios hallados son: C→T (285, 369, 470 y 471), C→G (286), A→G (288 y 497), G→T (310), C→A (338), G→C (404, 444 y 447) y G→A (435).

Cae-3: Veintidós cambios en la segunda región exónica y ocho en el tercer exón: G→T (25), A→G (26, 211 y 245), T→G (37 y 258), G→A (40), T→C (48, 57 y 88), T→A (77 y 200), C→G (84), A→T (110, 151, 191 y 199), C→A (111 y 230), A→C (212 y 221) y C→T (231). En el exón 3 se pueden ver: C→A (338), C→T (369), G→C (399, 444 y 447), G→A (403 y 435) y A→G (497).

Cae-4: Hay 19 cambios cuando se compara con la secuencia consenso del segundo exón, cuyas posiciones y bases implicadas son: C→T (32, 231, 241), T→C (57), A→T (140, 151), C→A (167, 230), G→A (169, 207), A→G (170, 191, 211), A→C (199, 221), C→G (208), G→C (210), G→T (220), T→G (258). En el tercer exón los cambios son cuatro: C→T (343 y 369), G→A (435) y G→C (444).

Ceae-5: Son veinticinco los cambios que esta secuencia exhibe en el exón 2 si es confrontada con el consenso, y sólo 8 en el exón 3. Se diferencia de *Ceae-3* en que, comparada con la consenso, presenta, además, las modificaciones **A→G** (56), **G→A** (60, 74) y **T→C** (71) y, por contra, carece del cambio **A→G** (245). Su tercer exón es idéntico al de *Ceae-3*.

Ceae-6: Son 22 los cambios que tiene esta secuencia, comparada con la consenso del segundo exón, y 7 si la comparación se centra en el tercer exón. Tiene los mismos cambios en el segundo exón que ya se han visto en *Ceae-4* más los tres siguientes: **C→T** (123), **G→C** (217) y **T→C** (255). Comparada con *Ceae-1* (tomada como consenso del tercer exón), son siete los cambios observados: **C→A** (343), **C→T** (369), **A→G** (401), **G→C** (404 y 444), **T→C** (430) y **G→A**. (435).

Ceae-7: El análisis nucleotídico revela un único cambio de esta secuencia con relación a *Ceae-4*, y es la transición **A→G** (359).

Ceae-9: En esta secuencia se han visto 21 cambios de base al compararla con la secuencia consenso del exón 2, que son: **G→C** (25 y 31), **C→A** (32), **T→A** (33 y 119), **T→G** (37, 131, 232 y 257), **T→C** (48, 57 y 200), **G→A** (69, 114 y 217), **C→G** (78, 84 y 234), **A→G** (199 y 212) y **A→T** (233); y otros 10 con la del exón 3: **C→T** (324 y 369), **A→G** (335, 359 y 497), **C→A** (338), **G→A** (404 y 435), **G→T** (437) y **G→C** (444).

Ceae-10: Hay un total de 28 cambios con respecto a las secuencias consenso, 20 de ellos con relación al exón 2 y 8 con el exón 3. Si el exón 2 se confronta con el de *Ceae-9* (con la que guarda una estrecha relación), carece de los cambios **T→C** (48), **G→A** (114) y **T→G** (131) y, en cambio, presenta dos nuevos: **A→T** (140) y **A→C** (179). A nivel del tercer exón, y tomando como referente la secuencia anteriormente descrita, presenta un cambio nuevo, que es **G→A** (377) y carece de otros tres de aquella: **A→G** (335, 359) y **G→T** (437).

Ceae-13: La porción exónica segunda tiene un total de 17 cambios respecto a la consenso, los cuales son los que también muestra *Ceae-4*, con la salvedad de **A→G** (191) y **A→C** (199). Los 5 cambios vistos en el tercer exón, respecto a *Ceae-1*, son: **C→T** (360 y 369), **G→A** (435), **G→C** (444) y **A→G** (497).

Ceae-17: En su exón nº 2 se han encontrado 19 diferencias nucleotídicas en relación a la consenso del mismo segmento génico. Esa secuencia es muy parecida a *Ceae-3* y, frente a ella, carece de los cambios reseñados en ésta como **A→G** (211 y 245), **A→C** (212) y **T→G** (258), pero presenta una nueva sustitución, la transversión **T→G** (257). El tercer exón de esta secuencia es idéntico al de *Ceae-3*.

2.- ASIGNACIÓN DE LAS SECUENCIAS OBTENIDAS A LOCI O A LINAJES DE *Mhc-DRB* Y NOMENCLATURA

Una vez establecido que las secuencias confirmadas de mono verde correspondían a genes DRB (figura 35), la siguiente etapa del trabajo consistía en averiguar (asignar) qué genes DRB eran y, dentro de los mismos, a qué linajes pertenecían.

Dicha asignación se llevó a cabo mediante dos metodologías:

a) Búsqueda, dentro de las secuencias en estudio, de motivos específicos de un locus o linaje (residuos aminoacídicos) o combinaciones de tales motivos, que son compartidos por alelos de los que ya se sabe que pertenecen a dicho locus o linaje y están ausentes en el resto de los alelos.

b) Construcción de árboles filogenéticos (dendrogramas), en los que las secuencias son agrupadas en ramas tanto más próximas entre si cuanto mayor es la homología existente entre ellas. Para la construcción de los dendrogramas se utilizó, al menos, una secuencia representativa de todos los loci y linajes descritos en póngidos, monos del Nuevo Mundo y monos del Viejo Mundo.

2.1.- Búsqueda de motivos específicos de locus/linaje

Para la asignación alélica efectuada en este trabajo no se emplearon las secuencias nucleotídicas como tales, sino sus equivalentes aminoacídicas (véase 1.5.4 de Introducción). Para ello fue preciso traducir las secuencias nucleotídicas de la figura 34 a sus correspondientes secuencias aminoacídicas (figura 36). Para la comparación de motivos se utilizaron las compilaciones publicadas por O'hUigin y colaboradores (1.993), Slierendregt y colaboradores (1.994) y Figueroa y colaboradores (1.994).

El hecho de que las secuencias consenso de la bibliografía carezcan de la porción exónica 3 obligó a que la búsqueda de motivos aminoacídicos se limitase al exón 2. No obstante, en las familias génicas de MHC de clase II, la mayor parte de los residuos polimórficos reside en el

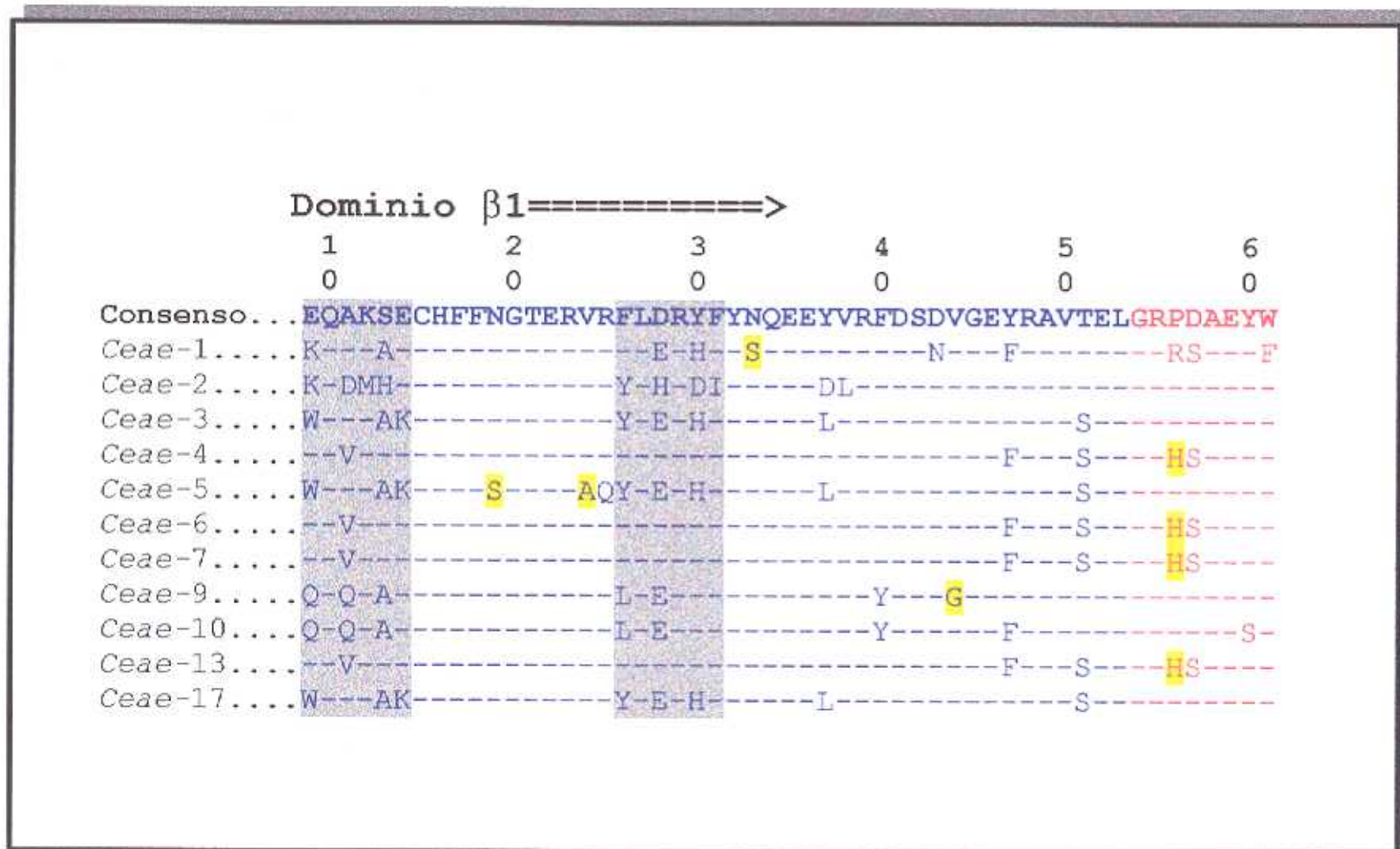


Figura 36.- Véase texto en página 119.

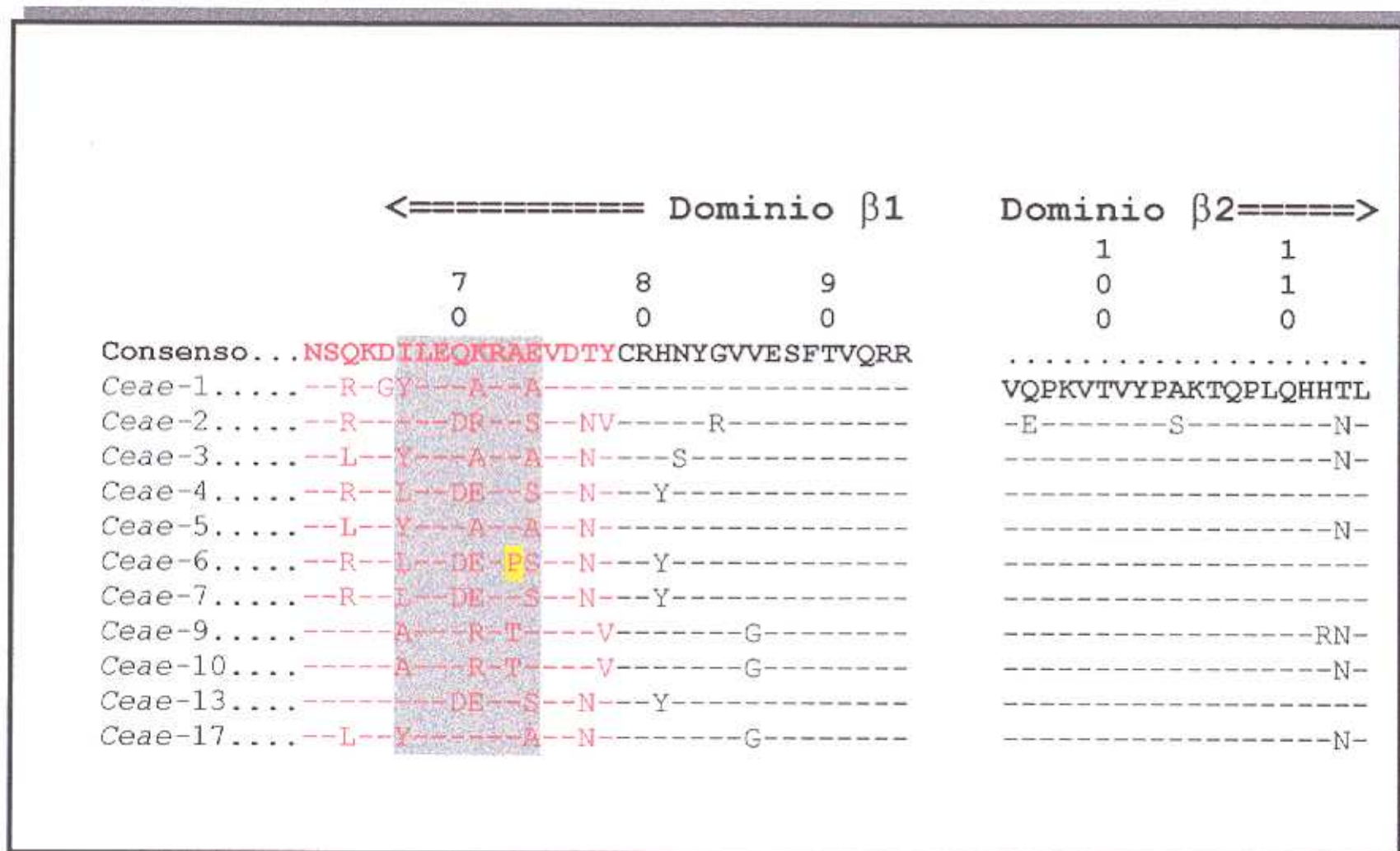


Figura 36 (continuación).- Véase texto en página 119.

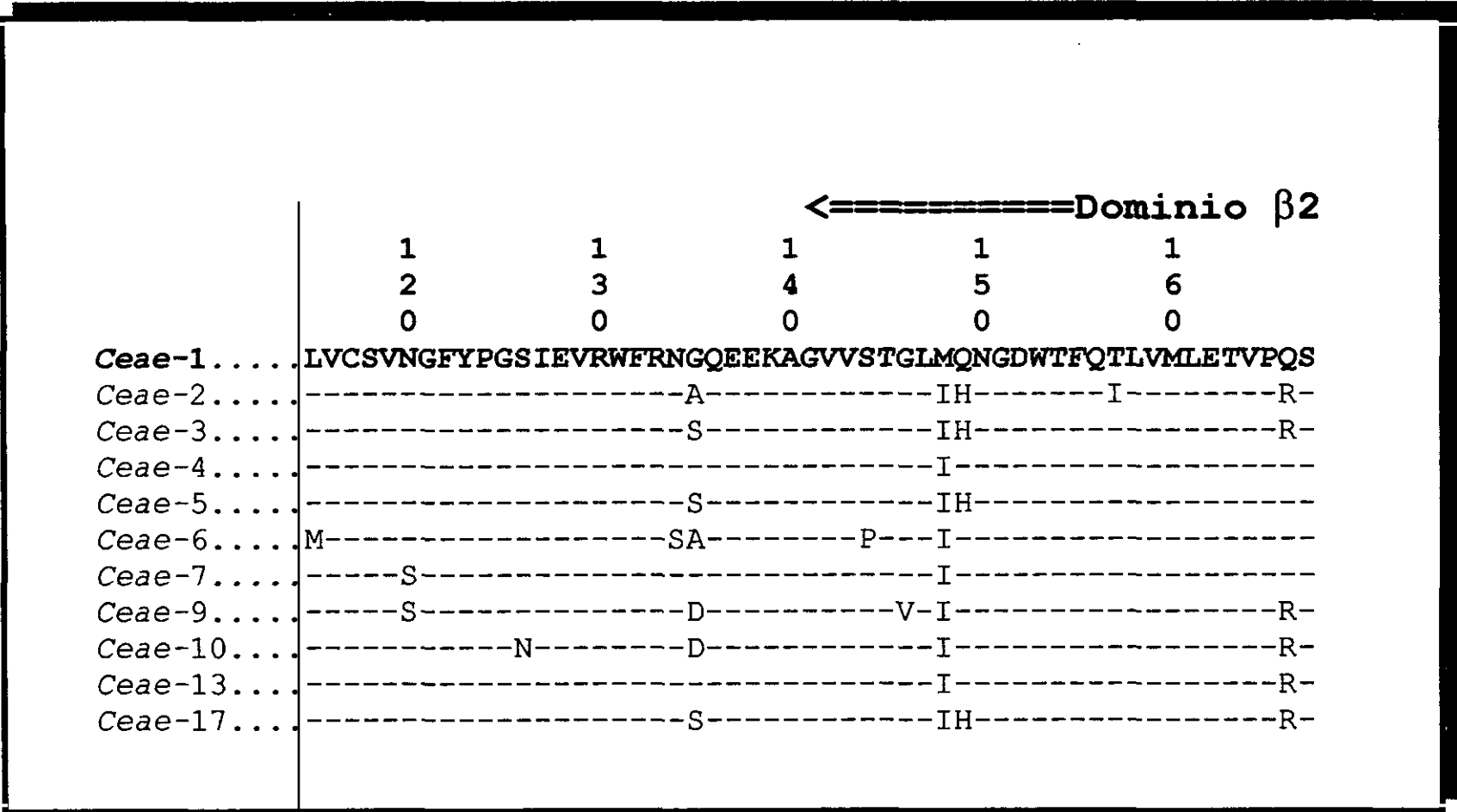


Figura 36 (continuación).- Alineamiento aminoacídico inferido a partir de las once secuencias nucleotídicas de mono verde, representadas en la figura 34. El exón 2 codifica para el dominio peptídico β1 y el exón 3 codifica para β2. La secuencia consenso para el dominio β1 ha sido transcrita de O'hUigin y colaboradores (1.993). No se han traducido los fragmentos correspondientes a los oligonucleótidos cebadores. Los aminoácidos idénticos a los de las secuencias consenso se han representado por un guión; las diferencias se simbolizan por una letra correspondiente a los códigos aminoacídicos. En color azul se han escrito los aminoácidos que, en el segundo exón, forman la hélice α, mientras que los que constituyen la lámina β se han escrito en rojo. Los segmentos sombreados de gris son las tres regiones hipervariables (Gaur y Nepom, 1.996; Gaur et al., 1.997). Sombreados de amarillo aparecen los aminoácidos del segundo exón que se vieron que eran específicos de la especie.

exón 2, siendo por tanto esta porción la que, por sus diferencias composicionales, determina la clasificación de los diferentes linajes génicos de clase II en el sistema MHC.

Tras la identificación, en las secuencias "*Ceae-n*", de los motivos necesarios para las asignaciones, se vio que (tabla 6):

1.- La secuencia *Ceae-1* tiene una combinación de 10 aminoácidos presentes como tales en alelos del linaje *DRB*w6*. Estos aminoácidos son: **K9, A13, E28, H30, R56, S57, F61, G66, Y67 y A74**. En menor medida, también han contribuido a esta asignación dos aminoácidos que sólo están presentes en una minoría de alelos pertenecientes a este linaje, y que son **F47 y A71**.

2.- La secuencia *Ceae-2* presenta una gran similitud secuencial con los alelos encuadrados en todos los linajes del locus *Mhc-DRB5*. A la hora de discernir con cuál de ellos podía filiarse, se vio que el linaje *DRB5*01* era el más apropiado, pues la secuencia en análisis presenta hasta 10 aminoácidos en una combinación posicional que es propia de aquél. Son los residuos **K9, D11** (exclusivo del locus *DRB5*; tabla 6), **Y26, H28, D30, I31, D37, L38, D70 y R71**. En menor medida, también se ha considerado la presencia de **S74**. Con otros linajes de este locus la compartición de motivos, aunque numéricamente importante, es menor que la vista en *DRB5*01* (8 aminoácidos compartidos con *DRB5*02*, 9 con *DRB5*03*, 5 con *DRB5*04*, 8 con *DRB5*05*, 7 con *DRB5*06* y 6 con *DRB5*07*).

3.- Las secuencias *Ceae-3*, *Ceae-5* y *Ceae-17* son sumamente parecidas entre si, por lo que, *a priori*, puede pensarse que forman parte de un mismo linaje. De hecho, se ha visto que las tres exhiben una gran semejanza con secuencias del linaje *DRB1*07*. Los aminoácidos comunes a estas tres secuencias y al linaje mencionado son: **W9, A13, K14** (exclusivo del linaje; tabla 6), **Y26, E28, H30 y N77**; además, *Ceae-5* tiene **Q25**, que es un aminoácido también hallado en este linaje.

4.- Hay otras cuatro secuencias con una gran homología entre ellas y, por tanto, susceptibles de poder encuadrarse en un mismo linaje. Son *Ceae-4*, *Ceae-6*, *Ceae-7* y *Ceae-13*. No obstante, la búsqueda de motivos de linaje arrojó, inicialmente, unos resultados no inequívocos para la asignación alélica de estas secuencias, pues, a diferencia de lo ocurrido en otras secuencias de este trabajo, en éstas no se encontró una única combinación del suficiente número de aminoácidos para lograr tal objetivo. Así, se vio que estas cuatro secuencias podían ser del linaje *DRB1*03* por la presencia de **D70 y S74**; pero también podían ser del linaje *DRB1*04* por la aparición de **V11, L67** (no en *Ceae-13*) y **D70**; incluso cabía la posibilidad de encuadrarlas en el linaje no ortólogo *DRB*w21* al presentar los residuos **V11, N77 y Y81**. Es por

ello por lo que para confirmar la asignación de estas secuencias ha sido necesario, mucho más que en los otros grupos, recurrir a la búsqueda de motivos no tan ubicuos como los que han sido reflejados en la tabla 6. De esta manera se vio que las cuatro secuencias presentaban aminoácidos descritos en algunos alelos del linaje *DRB1*03*, entre los que hay que citar **V11**, **F47**, **S51**, **S57**, **R64** (no en *Ceae-13*), **L67** (id.), **E71**, **N77** y **Y81**. También se encontraron aminoácidos poco frecuentes asignados a secuencias alélicas de *DRB1*04*, como **F47** y **S57**. Del linaje *DRB*w21* se encontraron **S51** y **R64** (no en *Ceae-13*). De esta manera, y puesto que la búsqueda de los aminoácidos más frecuentes de un linaje no ha sido suficiente para realizar una primera asignación de estas secuencias, parece ser que, siguiendo un criterio cuantitativo (basado en el número de residuos que se han llegado a encontrar), la búsqueda de los aminoácidos menos frecuentes de tales linajes favorece la asignación hacia el linaje *DRB1*03*.

5.- Por último, se ha visto que las secuencias *Ceae-9* y *Ceae-10* también podrían ser candidatas, por su gran semejanza, a ser asignadas a un mismo linaje, el cual puede ser *DRB*w7*, con el que se ha visto que tienen seis aminoácidos en común: **Q9**, **Q11**, **A13**, **E28**, **R71** y **G86**. Otros aminoácidos importantes para esta asignación, pero presentes en sólo pocos alelos de este linaje son: **L26**, **Y40**, **A67** y **T73**.

Así pues, ocho de estas secuencias tienen contrapartidas identificadas en alelos ortólogos de HLA (siete *DRB1* y un *DRB5*; todas ellas tienen en común la posesión de asparagina en la posición 77). Por el contrario, tres de estas secuencias no tienen suficiente homología con alelos MHC de clase II encontrados en *Homo sapiens*, y es por ello que han sido encuadradas en la serie de linajes *DRB*w* (carecen del mencionado aminoácido).

2.2.- Asignación de nomenclatura

Según lo expuesto en Materiales y Métodos (apdo. 6), las once secuencias confirmadas se nombraron como se ve en la tabla 7, en la que también constan los números de acceso dados en las bases de datos en las que han sido registradas, GenBank o Genome Sequence Data Base.

Tabla 6.- Aminoácidos más frecuentes en los linajes de los genes *Mhc-DRB* de primates no humanos

Linajes		Posiciones aminoácidas																				
		9	10	11	12	13	14	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	28	30	31	32
DRB1*	10			V		F											Y	E	R		H	
	02	L		P		G												E				
	03		Y	S	T												Y					
	04			V		H													E			
	07	W				Y/A	K										Q	Y	E/Q	L/H		
DRB3*	01		L											L			Y				H	
	02		L	V															E			
	04																Y	Q				
	05	D	L	L				R	S			R	S		Q				E	H	I	
	06			V														Y			I	H
	07		L	L																E		H
DRB4*	01					H/C				L							W	N	I		I	
	02			L		F								Q				L	E			
DRB5*	01	K		D		Y											Y	H	D	I		
	02	K		D		Y											Y	H	D	I		
	03	K		D		Y													H	D	I	
	04	K		D		G													H		I	
	05	K		D		G													H		I	
	06	K		D		Y													H	G	I	
	07	K		D		Y													H	G	I	
DRB6*	01		K			C			I					K		Q	Y	N		I	H	
	02					C			I	L						Q	Y	N		I	H	
	03					C			I							Q	Y	N		I	H	
	04					C			I					K			Y	N		I	H	
DRB7*	01														*	*	Y					

Tabla 6.- (continuación)

		Posiciones aminoacídicas																				
		9	10	11	12	13	14	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	28	30	31	32
Linajes																						
DRB*	w1		Y	C		F									L	M	L	Y	I			H
	w2	G	H																Q		I	
	w3					R																H
	w4	H		F		P													E	H		
	w5																					I
	w6	K		T		A												L	E	H		
	w7	Q		Q		A		R											E		I	
	w8	W		T															Y			
	w9					A														E		
	w10		Y	S	T																	
DRB11*	01					A			H									L	E			
DRB*	w12					G			H	L								L			I	
	w13									L												
	w14	K		V		H			H		K								F	H	I	
	w15	R		F		P				L									E	H	I	
	w16			V		F			H									Y	E			
	w17			V		H															I	H
	w18							Y										Q		E		
	w19		H	N		F			H	L				Q					Y	H	F	I
	w20			F			D													E		L
	w21			V																E		

Tabla 6.- (continuación)

Linajes		Posiciones aminoacídicas																				
		33	34	35	37	38	39	40	41	44	45	47	48	49	51	52	55	56	57	58	59	60
DRB1*	10		R			A					F											
	02				F	M													V			
	03																					
	04																					
	07				F							F							V/A			S
DRB3*	01				F														V		S	
	02																		V		S	
	04				F						F								V			
	05			D	F	L	L		H					C	I	A			E	E	S	
	06																					
	07				Q									P								S
DRB4*	01					A		Y	N	L		Q									K	
	02					A		Y	N	L											V	
DRB5*	01				D	L																
	02				D	L					F	Q							V		N	
	03				D	L																
	04				D	A																
	05				D	A														A		
	06			K	D															I		
	07			K	D															I		
DRB6*	01	K	R		N	L		H		E	F	Q						V	T		N/L	
	02	K	R		N	L					F	Q						V			K	
	03	K	R		N	L				E	F	Q				Q		V			N	
	04	K	R		N	L		H	L		F	Q						V			N	
DRB7*	01							N	M		F											

Tabla 6.- (continuación)

		Posiciones aminoácidas																					
		33	34	35	37	38	39	40	41	44	45	47	48	49	51	52	55	56	57	58	59	60	
Linajes																							
DRB*	w1							Y											V			N	
	w2				L/F							F										S	
	w3					A						F										S	
	w4				N	L									S				E		Q	S	
	w5											H											
	w6							Y										R	S				
	w7																						
	w8				T																		
	w9											F											
	w10										E	F	Q					Q		V			N
DRB11*	01				L															E			
DRB*	w12				F						F												
	w13										F								S				
	w14										F												S
	w15										F												
	w16										F												
	w17				L														E				S
	w18																					K	
	w19				I	A																	
	w20					L									S				T				S
	w21									M													

Tabla 6.- (continuación)

		Posiciones aminoacídicas																				
		61	63	64	65	66	67	68	70	71	72	73	74	77	78	81	82	84	85	86	87	
<i>Líneas</i>																						
DRB1*	10						L		R	R					V							
	02	C											A	N							G	
	03								D				Q/S								G	
	04						L		D	R			G									
	07		G				L/F		D	R			G	Q/S	N	V			R	G		
DRB3*	01						L					G	Q	N							G	
	02						L					G	Q	N					A			
	04						F					G	N			Y						
	05		H	R			E	L		L		P	G	Q						T	\	
	06																					
	07					E	E	L		R					N							G
DRB4*	01						L		R	T/R						Y					G	
	02						L			R												
DRB5*	01								D	R												
	02					G			E	N		D	A									
	03		G						R	R					V						L	
	04						L						A				I	D				
	05			R			V		R	R					V							
	06						L		R	R			A	N								
	07						L		R	R	\		D			F					L	
DRB6*	01					G			E			D	K	\		Y					F	
	02					E			E			D	K			Y	S				F	
	03					G			E			D	K			Y		R			F	
	04					G			E			D	K									
DRB7*	01													N								

Tabla 6.- (continuación)

		Posiciones aminoacídicas																			
		61	63	64	65	66	67	68	70	71	72	73	74	77	78	81	82	84	85	86	87
Linajes																					
DRB*	w1						L			R											G
	w2		T	R	E				R	E		Q		*F							G
	w3						F			R		T	A								F
	w4						F			R			A					R			C
	w5						F		D	Q			A		F	Y					G
	w6	F				G	Y			R			A					R	I		G
	w7									R											G
	w8						F					G	Q	N							G
	w9						L					G	Q	N							
	w10						L			R			D		F				R		G
DRB11*	01			R					T			A		F				E	I	L	
DRB*	w12	L					V			M				V				E	I	F	
	w13							D				A	N								G
	w14				E					M			K	*				E			
	w15						Y	M		R			A					E	I	S	
	w16												A	R	*			E	G	F	
	w17			R	E				D	E			A					E	I	L	
	w18		G		Q				L			G	Q	N							F
	w19			R			Y			R			A					Q	I	F	
	w20						Y							N							
	w21		G			G	Y					G	Q	N		Y		R			G

Las posiciones que se reseñan en el encabezado de la tabla son las reconocidas para los codones/aminoácidos del exón 2/dominio $\beta 1$. Los aminoácidos destacados en rojo son los que de forma más frecuente se han encontrado en los linajes consignados, pero sólo en la especie *Macaca mulatta*, que es la más estudiada de la familia *Cercopithecidae*. Un asterisco indica aminoácido deletado en esa posición; la barra inclinada señala una mutación con aparición de cambio en la pauta de lectura; los codones prematuros de paro han sido señalados mediante un signo de admiración

Tabla 7.- Denominación alélica de las secuencias investigadas y número de registro asignado

<u>Secuencia Cee-</u>	<u>Alelo Cee-</u>	<u>Nº de acceso</u>
1	<i>DRB*w601</i>	L41537
2	<i>DRB5*0101</i>	U19283
3	<i>DRB1*0701</i>	U19284
4	<i>DRB1*0301</i>	U19285
5	<i>DRB1*0702</i>	L47989
6	<i>DRB1*0302</i>	L47988
7	<i>DRB1*0303</i>	U19286
9	<i>DRB*w701</i>	L47987
10	<i>DRB*w702</i>	L41538
13	<i>DRB1*0304</i>	L41539
17	<i>DRB1*0703</i>	L41540

2.3.- Construcción de dendrogramas

Las asignaciones de las secuencias obtenidas se corroboraron, tras la comparación de motivos, por un segundo método, consistente en la construcción de dendrogramas que agrupan en una misma rama a las secuencias que guardan mayor homología o menor distancia genética entre si.

Los árboles filogenéticos que aparecen en esta sección han sido construídos utilizando un total de 56 secuencias nucleotídicas (figura 37), siendo once de ellas las investigadas en este trabajo; las otras 45 secuencias son alelos previamente publicados y pertenecientes, todos ellos, a una amplia selección de especies de póngidos, monos del Nuevo Mundo y monos del Viejo Mundo. Se ha escogido, al menos, una secuencia representativa de cada linaje alélico que haya sido visto en la familia *Cercopithecidae*.

	1					1					2					2					3										
	0					5					0					5					0										
Consenso	CA	GGT	TTC	TIG	GAG	CAG	GCT	AGG	TCT	GAG	TGT	CAT	TTC	TTC	ATT	GGG	ACG	GAG	GGG	GAG	GGG	GGG	TTC	CAG	GAC	AGA	TAC	TTC	TAT	ATC	CAG
Gogo-DRB1*1001	.	—	—	—	T	—	—	—	G	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	A	G	CG	A	C	—	—	A	
Patr-DRB1*0201	.	—	—	C	TT	—	C	—	GGG	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	G	G	A	—	—	A		
Ceae-DRB1*0301	.	—	—	—	—	—	T	—	—	—	—	—	—	—	C	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		
Ceae-DRB1*0302	.	—	—	—	—	—	T	—	—	—	—	—	—	—	C	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		
Ceae-DRB1*0303	.	—	—	—	—	—	T	—	—	—	—	—	—	—	C	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		
Ceae-DRB1*0304	.	—	—	—	—	—	T	—	—	—	—	—	—	—	C	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		
Gogo-DRB1*0307	.	—	—	—	—	T-C	T	-C	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	C	—	—	A	
Manu-DRB1*0301	.	—	—	—	—	T-C	T	-CA	—	—	—	C	—	—	C	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		
Sace-DRB1*0301	.	—	—	—	—	T-T	AGC	-C	—	CA	—	—	—	—	—	—	T	—	—	—	—	—	—	—	—	—	C	—	—		
Manu-DRB1*0402	—	—	—	T	-A	CA	—	G	—	—	C	—	—	—	—	—	—	—	—	A	G	C	—	—	—	—		
Manu-DRB1*0403	—	—	—	T	-A	CA	—	C	—	—	C	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		
Manu-DRB1*0404	—	—	—	T	-A	CA	—	C	—	—	C	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		
Ceae-DRB1*0701	.	—	—	—	—	TG	—	—	G	A	—	C	—	C	—	—	—	—	—	—	—	—	A	G	C	—	—	—	—		
Ceae-DRB1*0702	.	—	—	—	—	TG	—	—	G	A	—	C	—	—	CC	A	—	—	—	C	A	A	—	G	C	—	—	—	—		
Ceae-DRB1*0703	.	—	—	—	—	TG	—	—	G	A	—	C	—	—	C	—	—	—	—	—	—	A	G	C	—	—	—	—	—		
Manu-DRB1*0701	—	—	—	TG	—	G	A	C	C	—	C	—	—	—	—	—	—	—	A	C	G	C	—	—	—	—		
Patr-DRB1*0701	C	TG	—	AG	—	A	A	—	—	—	C	—	—	—	—	—	—	A	—	A	—	—	CT	—	—	—		
Patr-DRB1*0702	C	TG	—	G	—	A	A	—	—	—	C	—	—	—	—	—	—	A	—	A	—	—	CT	—	—	—		
Gogo-DRB3*0101	.	—	—	—	—	—	T	CG	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	T	—	—	A	—	—	—	—	C	—	—	A	
Patr-DRB3*0201	.	—	—	—	—	—	T	T	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	G	—	—	—	—	—	—	
Manu-DRB3*0401	—	—	—	—	—	T	—	—	C	—	C	—	—	—	—	—	—	—	A	C	G	—	—	—	—	—	—	
Cano-DRB3*0501	.	—	—	—	—	—	T	CT	—	—	—	G	—	C	—	—	—	A	—	N	—	—	A	—	C	A	C	—	—		
Aotr-DRB3*0601	.	—	—	—	—	—	T	T	CA	—	—	—	—	C	—	—	—	—	—	—	—	A	—	—	—	A	C	—	—	—	
Cano-DRB3*0701	.	—	—	—	—	—	T	CT	—	—	—	—	—	C	—	—	—	—	—	—	—	—	A	—	—	C	C	—	—	—	
Manu-DRB4*0101	—	—	—	—	—	G	—	—	—	—	—	—	—	—	—	A	T	AA	—	AT	—	A	—	—	—	—	A	
Ceae-DRB5*0101	.	—	—	—	A	—	A	T	CA	—	—	—	—	C	—	C	A	—	—	—	A	—	C	—	G	A	C	—	—	A	
Gogo-DRB5*0101	.	—	—	—	A	—	A	A	—	—	—	—	—	C	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	G	A	—	—	A	
Patr-DRB5*0101	—	A	—	A	A	—	—	—	—	—	C	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	GG	A	—	—	A	
Manu-DRB5*0301	—	A	—	A	T	—	—	—	—	—	C	—	C	—	—	—	—	—	—	C	—	G	A	C	—	—	A	
Popy-DRB5*0601	.	—	—	—	A	—	A	A	—	—	—	—	—	C	—	C	—	—	—	—	—	—	C	—	GG	A	—	—	—	A	
Sace-DRB5*0701	.	—	—	—	A	—	A	A	—	—	—	—	—	C	—	—	—	—	—	—	—	—	C	—	GG	A	—	—	—	A	
Manu-DRB6*0101	—	—	—	—	—	—	—	A	—	—	—	—	—	T	—	—	—	—	—	A	A	A	A	C	—	A	TG	

Figura 37.- Véase texto en página 134.

	1					2					3																				
	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0																	
Consenso	.CA	OGT	TTC	TIG	GAG	CMG	GCT	AMG	TCT	GAG	TGT	CAT	ETC	TTC	AMT	GGG	ACG	GGG	CGG	GTC	CGG	TTC	CIG	GAC	AGA	TAC	TTC	TAT	ATC	CAG	
Mame-DRB*w101	..	---	---	-A	-	T-C	TG-	---	-T-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-A-	-A-	---	AT-	---	---	---	---	---	---	-A	
Mame-DRB*w201	..	---	---	C	-	G	-	T	---	-	A	---	---	---	---	C	---	---	---	---	---	---	---	C-G	---	---	A	---	---	---	
Mamu-DRB*w301	---	---	---	---	-A	OG-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	C	---	---	
Mamu-DRB*w306	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	C	---	---	---	---	---	---	---	---	T	---	---	C	---	---	
Ceae-DRB*w601	..	---	---	A	---	---	G	-	A	---	-	C	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	G	C	---	---	G	---	---	
Mamu-DRB*w601	A	---	A	G	---	---	---	---	---	---	---	C	---	---	---	---	---	---	---	G	---	---	C	---	---	---	---	
Ceae-DRB*w701	..	---	---	C	---	CAA	G	---	-	C	---	-	C	---	---	---	---	---	---	-A	---	-	G	---	G	---	---	---	---	---	---
Ceae-DRB*w702	..	---	---	C	---	CAA	G	---	-	C	---	-	C	---	---	---	---	---	---	-A	---	-	G	---	G	---	---	---	---	---	---
Mamu-DRB*w701	C	---	CAA	G	---	G	---	-	C	---	-	A	---	---	---	---	---	---	-	G	---	G	---	A	---	---	---	
Mamu-DRB*w702	C	---	CAA	G	---	G	---	-	C	---	-	A	---	---	---	---	-A	---	-	G	---	G	---	A	---	---	---	
Patr-DRB*w801	TG	---	A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-	A	---	---	---	---	---	---	
Patr-DRB*w901	---	---	---	G	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	G	---	---	---	---	---	
Camo-DRB11*0101	..	---	---	C	CA	---	G	---	---	CA	---	C	---	---	---	---	---	---	---	---	---	C	---	A	---	A	C	C	---	---	
Caja-DRB*w1201	..	---	-A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	A	C	---	---	
Aotr-DRB*w1301	..	---	---	---	---	TT	C	-	A	---	---	---	---	---	C	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	T	---	---	
Sasc-DRB*w1403	..	T	---	A	-	C	-	T	CA	---	---	CA	---	A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	TT	G	A	---	---	---	---	
Ceap-DRB*w1501	..	---	---	AG	---	TT	C	---	---	C	-	C	-	C	---	---	---	---	---	---	---	---	CT	TC	A	C	A	---	---	---	
Caja-DRB*w1601	..	---	-A	---	---	-T	-	T	---	---	CA	---	C	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-	A	---	A	---	---	---	---	
Camo-DRB*w1701	..	---	---	---	---	-T	---	CP	C	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	A	C	C	---	
Aotr-DRB*w1801	..	---	---	---	---	---	T	---	---	-	C	---	---	---	---	---	---	---	---	-A	---	---	-	A	---	A	---	T	---	---	
Sasc-DRB*w1902	..	---	---	---	-	C	CT	---	-	T	---	---	---	---	-	C	---	---	---	---	---	---	-	A	---	-	T	G	A	A	---
Mamu-DRB*w2001	---	---	TT	---	-	T	---	-	C	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-	G	---	C	---	---	---	
Mamu-DRB*w2101	---	---	---	-	T	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-	G	---	---	---	---	---
Mamu-DRB*w2102	---	---	-	T	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-	G	---	---	---	---	---

Figura 37 (continuación).- Véase texto en página 134.

Consenso	3		4				4				5				5				6											
	GAG	GAG	TAC	GTG	GGC	TTC	GAC	AGC	GAC	GTG	GGG	GAG	TAC	GGG	GGC	GTG	ACG	GAG	CTG	GGG	GGG	CGT	GAC	GCC	GAG	TAC	TGG	ACC	AGC	CAG
Gogo-DRB1*1001	---	---	-C-	---	-A-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-T-	---	---	---	---	---	---	---
Patr-DRB1*0201	---	---	-T-	A-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-T-	---	---	---	-C-	---	---	---
Ceae-DRB1*0301	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-T-	---	---	---	T-	---	---	---	---	---	---	-A-	AG-	---	---	---	---	---	-G-
Ceae-DRB1*0302	---	---	---	---	---	---	-T-	---	---	---	---	-T-	---	---	T-	---	---	---	---	---	---	---	-A-	AG-	---	---	---	---	---	-G-
Ceae-DRB1*0303	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-T-	---	---	---	T-	---	---	---	---	---	---	---	-A-	AG-	---	---	---	---	---	-G-
Ceae-DRB1*0304	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-T-	---	---	---	T-	---	---	---	---	---	---	---	-A-	AG-	---	---	---	---	---	---
Gogo-DRB1*0307	---	---	CT-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-T-	---	---	---	---	---	---	---
Mane-DRB1*0301	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	T-	---	---	---	---	---	---	---	-G-	AG-	---	---	---	---	---	G-
Sace-DRB1*0301	---	---	-T-	C-	---	---	---	---	---	T-	---	---	---	---	---	---	-G-	---	---	---	---	---	-GG	AG-	-A-	C-	-TC-	---	-G-	
Mamu-DRB1*0402	---	---	-T-	C-	-A-	---	---	-T-	C-	---	---	-T-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-T-	---	-T-	---	
Mamu-DRB1*0403	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-G-	AG-	---	---	---	---	---	---
Mamu-DRB1*0404	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-T-	---	---	---	---	---	---
Ceae-DRB1*0701	---	---	-TA	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	T-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-T-	
Ceae-DRB1*0702	---	---	-TA	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	T-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-T-	
Ceae-DRB1*0703	---	---	-TA	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	T-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-T-	
Mamu-DRB1*0701	---	---	-T-	---	---	---	---	---	---	---	---	-T-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-CA	---	---	---	---	G-	---	
Patr-DRB1*0701	---	---	-T-	---	---	---	---	---	---	-T-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-T-	---	C-	---	---	---	---	
Patr-DRB1*0702	---	---	-T-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-T-	---	C-	---	---	---	---	
Gogo-DRB3*0101	---	---	-T-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-T-	---	---	---	---	---	---	---
Patr-DRB3*0201	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	C-	---	---	---	-T-	---	C-	---	---	---	---	---
Mamu-DRB3*0401	---	---	-T-	---	---	---	---	---	---	---	---	-T-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-T-	---	---	---	---	---	---	---
Camo-DRB3*0501	---	---	-T-	C-C	-T-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-TC	C-	---	---	---	---	-G	-A	-GA	-C-	---	C-	G-	
Actr-DRB3*0601	---	---	GT-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Camo-DRB3*0701	---	---	C-G	---	---	-T-	---	---	---	---	---	---	C-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-G	-C-	---	G-T	---	---	
Mamu-DRB4*0101	---	---	-C-	---	-A-	A-	-T-	C-	---	---	---	-A-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-T-	---	---	---	---	---	---	
Ceae-DRB5*0101	---	G-	T-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-G-	
Gogo-DRB5*0101	---	G-	T-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Patr-DRB5*0101	---	A-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Mamu-DRB5*0301	---	G-	T-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	G-	---	---
Popy-DRB5*0601	A-	G-	---	---	---	---	-T-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	AT-	---	---	---	---	---	---	---
Sace-DRB5*0701	A-	G-	---	---	---	---	-T-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	AT-	---	---	---	---	---	---	---
Mamu-DRB6*0101	---	A-	C-	---	---	C-	---	---	C-A	---	-T-	-A-	---	---	---	-A-	-A-	---	---	---	---	-T-	-G	A-	---	---	---	---	---	

Figura 37 (continuación).- Véase texto en página 134.

	3		4			4			5			5			6																	
	5		0		5	0		5	0		5	0		5	0		5	0														
Consenso	GAG	GAG	TAC	GIG	CGC	TTC	GAC	AGC	GAC	GIG	GGG	GAG	TAC	CGG	GCG	GIG	ACG	GAG	CIG	GGG	CGG	OCT	GAC	GCC	GAG	TAC	TGG	ANC	AGC	CAG		
Mane-DRB*w101	---	---	---	---	-A-	---	---	---	-C	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	G-	
Mane-DRB*w201	---	---	-TG	---	---	---	---	---	---	-T-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-T-	---	-C-	---	---	-T	-G	---		
Mamu-DRB*w301	---	---	---	-C-	---	---	---	---	---	-T-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	AG-	-G	-C-	---	---	---	---	---		
Mamu-DRB*w306	---	---	-TG	---	---	---	---	---	---	-T-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-A	C-	-C-	---	---	---	-G		
Cbae-DRB*w601	---	---	---	---	---	---	A-	---	---	-T-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-G	AG-	---	---	-TC	---	-G	---		
Mamu-DRB*w601	---	---	---	---	-AT	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-G	AG-	---	---	-TC	---	---	---		
Cbae-DRB*w701	---	---	-A	-A-	---	---	---	---	-G-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
Cbae-DRB*w702	---	---	---	---	-A	---	---	---	---	-T-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-C-	---	---	---	---	---	
Mamu-DRB*w701	---	---	-C-	-A-	---	---	---	---	---	---	---	T-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
Mamu-DRB*w702	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-G	AG-	---	---	---	---	---	---	---	
Patr-DRB*w801	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-T	---	---	---	---	---	---	---	---	
Patr-DRB*w901	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-T-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	AG-	---	---	---	---	---	---	---	---
Camo-DRB11*0101	---	---	-TT	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-G	CGG	---	---	---	---	---	-G	---	
Caja-DRB*w1201	---	---	-T-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	AG-	A	A-G	CTC	---	---	---	---	---	
Aotr-DRB*w1301	---	---	-T	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-A	A	---	-TT	---	-T-	---	---	
Sasc-DRB*w1403	---	---	-T-	---	---	---	---	---	---	-T-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	AA-	-C-	---	C-	---	---	---	---	
Cbae-DRB*w1501	---	---	A-	---	---	---	---	---	---	-T-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	G	---	---	---	---	---	---	---	---
Caja-DRB*w1601	---	---	-T	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	G	---	---	---	---	---	---	---	---
Camo-DRB*w1701	---	---	CIT	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-G	G	-C-	---	---	---	-G	---	
Aotr-DRB*w1801	---	---	-T	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-T	A	A-	---	---	G-T	---	---	
Sasc-DRB*w1902	---	---	AT-	---	---	---	---	---	---	-T-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	AC-	G	---	-TC	---	---	---	---	---
Mamu-DRB*w2001	---	---	C	---	-T	---	---	---	-C	---	---	---	---	---	T-	---	---	---	---	---	---	---	---	AC-	---	-C-	---	---	---	---	---	
Mamu-DRB*w2101	---	---	---	---	---	---	---	A-	---	---	---	---	---	T-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	G	-G	---	
Mamu-DRB*w2102	---	---	---	---	---	---	---	A-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	G	---	---	---

Figura 37 (continuación).- Véase texto en página 134.

	6			7			7			8			8			9															
	5			0			5			0			5			0															
Consenso	AAG	GAC	ATC	CTG	GAG	CAG	ANG	CGG	GCC	GAG	GNG	GAC	ACC	TAC	TGC	ACA	CAC	ACC	TAC	GGG	GTT	GTT	GAG	AGC	TTC	ACA	GTC	CAG	CGG	CGA	G
Gogo-DRB1*1001	---	---	C	---	---	---	-G	---	-C	---	-T	---	---	-T	---	---	---	A	---	-G	---	-G	---	---	---	---	---	---	-A	---	
Patr-DRB1*0201	---	---	---	---	---	---	GC	---	---	---	-AT	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-G	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
Ceae-DRB1*0301	---	---	C	---	---	A	G-C	G	---	---	TC	---	---	-AT	---	---	T	---	---	---	-G	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
Ceae-DRB1*0302	---	---	C	---	---	A	G-C	G	---	C	TC	---	---	-AT	---	---	T	---	---	---	C	-G	---	---	---	---	---	---	---	---	
Ceae-DRB1*0303	---	---	C	---	---	A	G-C	G	---	---	TC	---	---	-AT	---	---	T	---	---	---	-G	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
Ceae-DRB1*0304	---	---	---	---	---	A	G-C	G	---	---	TC	---	---	-AT	---	---	T	---	---	---	-G	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
Gogo-DRB1*0307	---	---	---	---	---	A	G-C	C	---	---	TC	---	---	-T	---	---	---	---	---	---	-G	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
Mane-DRB1*0301	---	---	---	---	---	A	G-C	GC	---	---	C	---	---	---	---	---	---	---	C	A	-G	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
Sace-DRB1*0301	---	A	TA	A	---	G	T	GC	---	---	-C	---	---	-GT	***	---	---	---	A	A	TCA	---	-G	CT	---	-T	---	A	---		
Mamu-DRB1*0402	---	---	C	---	---	A	G-C	G	---	---	G	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-CG	---	---	
Mamu-DRB1*0403	---	---	---	---	---	A	G-C	G	---	---	AT	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-G	---	---	
Mamu-DRB1*0404	---	---	T	---	---	A	G-C	G	---	---	C	---	---	GTG	---	---	---	---	---	---	-G	---	---	
Ceae-DRB1*0701	---	---	TA	---	---	---	GC	---	---	---	-C	---	---	-AT	---	---	---	G	---	---	-G	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
Ceae-DRB1*0702	---	---	TA	---	---	---	GC	---	---	---	-C	---	---	-AT	---	---	---	---	---	---	-G	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
Ceae-DRB1*0703	---	---	TA	---	---	---	---	---	---	---	-C	---	---	-AT	---	---	---	---	---	---	-G	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Mamu-DRB1*0701	---	---	T	---	---	---	-G	---	---	---	TC	---	---	-AT	---	---	---	---	A	-G	-G	---	---	
Patr-DRB1*0701	---	---	C	---	---	---	G-C	G	---	---	G	---	---	GTG	---	---	---	---	---	---	T-G	---	---	
Patr-DRB1*0702	---	---	C	---	---	---	G-C	G	---	---	G	---	---	GTG	---	---	---	---	---	---	-G	---	---	
Gogo-DRB3*0101	---	---	C	---	---	---	---	---	---	---	-G	CG	---	-AT	---	---	---	---	---	---	-G	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
Patr-DRB3*0201	---	---	C	---	---	---	---	---	---	---	-G	C	---	-AT	---	---	---	---	---	---	-C	-G	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Mamu-DRB3*0401	---	---	T	---	---	---	---	---	---	---	-C	---	---	-A	---	T	---	---	---	---	-G	---	---	
Camo-DRB3*0501	---	A	C	---	---	---	-G	---	---	---	-G	C	---	-AG	---	---	---	A	---	-G	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
Aotr-DRB3*0601	---	---	TA	G	---	---	---	---	---	---	-G	CG	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	A	---
Camo-DRB3*0701	G	-A	C	---	---	---	-G	---	---	---	---	---	---	-A	---	---	---	---	---	---	-G	---	---	---	---	---	---	---	A	---	
Mamu-DRB4*0101	---	---	C	---	---	---	-G	-G	---	---	---	---	---	---	---	T	---	---	---	---	-G	---	---	
Ceae-DRB5*0101	---	---	---	---	---	A	G-C	-G	---	---	TC	---	---	A	GTG	---	---	---	A	---	-G	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
Gogo-DRB5*0101	---	---	G	---	---	A	G-C	G	---	---	TC	---	---	-T	---	---	---	---	---	---	-G	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
Patr-DRB5*0101	---	---	---	---	---	---	-G	-G	---	---	-C	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-C	---	---	
Mamu-DRB5*0301	---	---	---	---	---	---	-G	-G	---	---	---	---	---	A	GTG	---	---	---	---	---	T	---	---	
Popy-DRB5*0601	---	---	C	---	---	---	-G	-G	---	---	-C	---	---	-AT	---	---	---	---	---	---	-G	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
Sace-DRB5*0701	---	---	C	---	---	---	-G	-G	**	---	-C	---	---	-T	---	---	---	---	---	---	T-A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
Mamu-DRB6*0101	---	-G	---	---	---	---	G	---	-C	-A	T	---	---	-T	---	---	T	-T	-G	---	-C	---	---	

Figura 37 (continuación).- Véase texto en página 134.

	6		7			7			8			8			9																	
	5			0		5			0		5			0																		
Consenso	ANG	GAC	AAC	CTG	GAG	CAG	ANG	CGG	GCC	GAG	GTC	ACC	TAC	TGC	AGA	CAC	AAC	TAC	GCG	GTT	GTT	GAG	AGC	TTC	ACA	GTC	CAG	CGG	CGA	G		
Mane-DRB*w101	---	C	---	---	-G	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
Mane-DRB*w201	---	T	---	---	-G	G	---	---	C	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-G	G	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
Mamu-DRB*w301	---	T	T	---	---	GG	---	A	C	A	---	A	---	---	---	---	---	---	---	---	C	---	---	---		
Mamu-DRB*w306	---	C	---	---	---	-G	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	T	---	---		
Ceae-DRB*w601	---	-G	TA	---	---	GC	---	---	C	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-G	---	---	---	---	---	---	---	---	
Mamu-DRB*w601	---	-G	TA	---	---	GC	---	---	C	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	A	A	---	---	---	---	
Ceae-DRB*w701	---	GC	---	---	---	GG	---	A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-G	---	---	---	---	---	---	---	---	
Ceae-DRB*w702	---	GC	---	---	---	GG	---	A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-G	---	---	---	---	---	---	---	---	
Mamu-DRB*w701	---	C	---	---	---	-G	---	A	C	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-G	---	---	---	
Mamu-DRB*w702	---	GC	---	---	G	-G	---	---	OG	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-G	---	---	---	
Patr-DRB*w801	---	T	---	---	---	---	---	-G	C	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-G	---	-G	---	---	---	---	---	---	
Patr-DRB*w901	---	C	---	---	---	---	---	-G	C	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-G	---	---	---	
Camo-DRB11*0101	G	---	T	---	---	T	---	---	C	---	---	-G	GTG	---	---	---	---	---	---	A	A	TCA	---	-G	CT	---	C	---	A	---		
Caja-DRB*w1201	---	C	---	---	---	-G	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	CG	CT	---	C	---	A	---	
Aotr-DRB*w1301	---	T	A	---	G	C	---	---	C	---	---	---	---	T	A	---	---	---	---	---	---	T	---	---	---	---	---	---	---	---	A	---
Sasc-DRB*w1403	---	C	---	---	---	T	---	---	---	---	---	---	GG	T	---	---	---	---	---	A	A	TCA	---	-G	CTG	---	C	---	A	---	---	
Ceap-DRB*w1501	---	TA	A	---	---	-G	---	---	C	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	A	A	TCA	---	-G	CT	---	C	---	A	---	---	
Caja-DRB*w1601	---	---	---	---	---	---	---	---	C	---	---	---	GA	---	---	---	---	---	---	A	G	T-C	---	CG	CT	---	C	---	A	---	---	
Camo-DRB*w1701	G	---	---	---	G	C	G	---	C	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	A	A	T-A	---	-G	CT	---	C	---	A	---	---	
Aotr-DRB*w1801	C	---	---	---	T	---	---	-G	C	A	---	A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	T	---	---	---	---	---	---	---	---	A	---
Sasc-DRB*w1902	G	---	T	---	---	---	---	---	C	---	---	---	---	---	G	---	---	---	---	CA	A	TCG	---	-G	CTG	---	CC	---	A	---	---	
Mamu-DRB*w2001	---	TA	---	---	---	---	---	---	---	---	---	A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
Mamu-DRB*w2101	---	-G	TA	---	---	---	---	-G	C	T	---	A	---	---	---	T	---	---	---	C	---	-G	---	---	---	---	
Mamu-DRB*w2102	---	-G	TA	---	---	---	---	-G	C	T	---	A	---	---	---	T	---	---	---	C	---	-G	---	---	---	---	

Figura 37 (continuación).- Alineamiento nucleotídico de 56 secuencias de exón 2 en varias especies de primates. Las once nuevas secuencias aportadas por este trabajo, correspondientes a *Cercopithecus aethiops*, se han representado en rojo. La secuencia consenso ha sido tomada del trabajo de O'hUigin y colaboradores (1.993). Las posiciones idénticas a las de la consenso se han representado con un guión. Los asteriscos representan deleciones. Las abreviaturas de cuatro letras, indicativas de especie, son: Aotr (*Aotus trivirgatus*, mono aullador nocturno), Caja (*Callithrix jacchus*, marmoseta común), Camo (*Callicebus moloch*, titi pardo), Ceap (*Cebus apella*, capuchino castaño), Gogo (*Gorilla gorilla*, gorila), Mane (*Mandrillus leucophaeus*, mandril), Mamu (*Macaca mulatta*, macaco rhesus), Paha (*Papio hamadryas*, babuino), Papa (*Pan paniscus*, chimpancé pigmeo), Patr (*Pan troglodytes*, chimpancé), Popy (*Pongo pygmaeus*, orangután), Sasc (*Saimiri sciureus*, mono ardilla común) y Saoc (*Saguinus oedipus*, tamarino de cabeza algodonosa).

En los programas informáticos que se citan sólo se han introducido secuencias correspondientes a los segundos exones, puesto que son éstas las que se hallan disponibles en la bibliografía. Los terceros exones de las secuencias de *Cercopithecus aethiops* han sido descartados, pero, tal como se argumentó en 2.1, esta limitación de datos no afecta a la fiabilidad de los resultados finales de asignación alélica que se obtengan.

2.3.1.- Dendrograma de máxima parsimonia

Tras la introducción de las 56 secuencias comentadas, el programa DNAPARS rindió un fichero de salida en el que se había construido un árbol como el representado en la figura 38. La ubicación de las secuencias "Ceae-n" en determinados lugares del árbol confirman la asignación alélica que se había hecho por medio de la búsqueda de motivos aminoacídicos específicos:

1.- La rama correspondiente a la secuencia *Ceae-DRB5*0101* (inicialmente llamada *Ceae-2*) está estrechamente asociada con otra rama representativa de un alelo de este mismo linaje, tal como es *Gogo-DRB5*0101*. A su vez, estas dos ramas están asociadas, en un racimo mayor, con otras cuatro secuencias del gen DRB5. Se confirma así la estrecha homología de *Ceae-2* con secuencias pertenecientes al locus DRB5 y, dentro de éste, más concretamente, con el linaje *DRB5*01*.

2.- Los alelos *Ceae-DRB1*0301*, *Ceae-DRB1*0302*, *Ceae-DRB1*0303* y *Ceae-DRB1*0304* están juntos en una misma rama, confirmado así la evidente relación que ya había sido comentada para los mismos en 2.1. Las cuatro ramas de estos alelos han sido situadas por el programa en la vecindad de dos alelos del linaje *DRB1*03*, que son *Mane-DRB1*0301* y *Gogo-DRB1*0307*. En esa misma vecindad, pero algo menos próximas, hay dos secuencias del linaje *DRB1*04*, que son *Mamu-DRB1*0402* y *Mamu-DRB1*0403*. Cuando se buscaba la filiación de estas secuencias por motivos de linaje se dijo que guardaban una similitud algo mayor con el linaje *DRB1*03* que con otros dos linajes probables, que eran *DRB1*04* y *DRB*w21*. En este árbol, las secuencias del linaje *DRB*w21* han quedado muy alejadas, y a tenor de la topología que exhiben las secuencias de *DRB1*03* y de *DRB1*04*, puede sugerirse que la filiación postulada en 2.1 es correcta.

3.- Se confirma que las secuencias inicialmente llamadas *Ceae-3* (*Ceae-DRB1*0701*), *Ceae-5* (*Ceae-DRB1*0702*) y *Ceae-17* (*Ceae-DRB1*0703*) son alelos del linaje *DRB1*07*, tal como se ve por su gran proximidad, en una misma rama, al alelo *Mamu-DRB1*0701*.

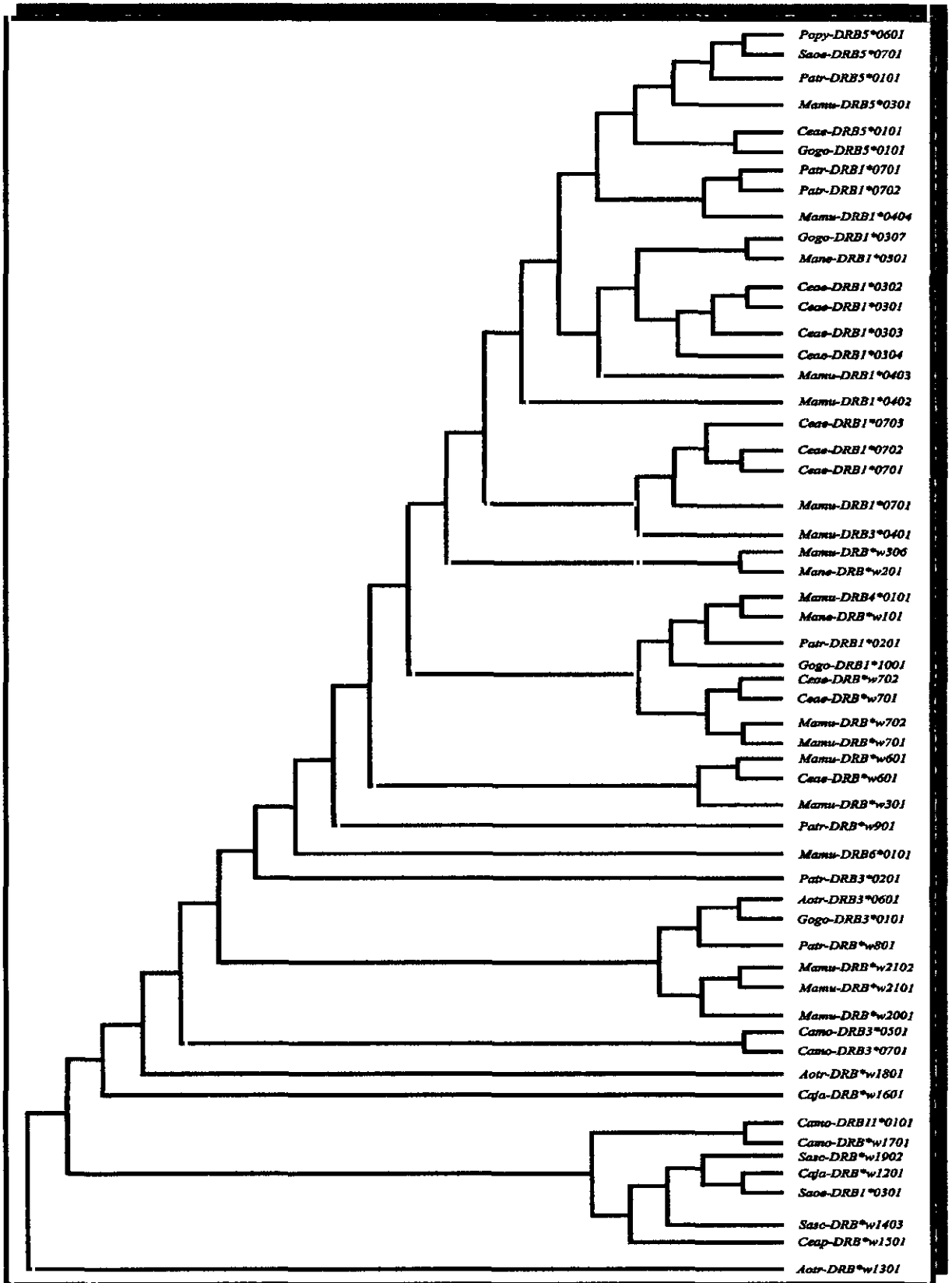


Figura 38.- Arbol filogenético, obtenido mediante el método de máxima parsimonia (programa DNAPARS del paquete PHYLIP), de un total de 56 secuencias del exón 2 de genes DRB de primates. Las secuencias de mono verde estudiadas en este trabajo, con sus denominaciones alélicas oficiales, se han representado en rojo.

4.- Los alelos *Ceae-DRB*w701* y *Ceae-DRB*w702* han sido asociados, sin ninguna ambigüedad, con otros dos alelos de ese mismo linaje: *Mamu-DRB1*w701* y *Mamu-DRB1*w702*. Se ratifica así la pertenencia a este linaje de esas dos secuencias de *Cercopithecus aethiops*.

5.- La rama del alelo *Ceae-DRB*w601* se halla en estrecha asociación con la rama del alelo *Mamu-DRB*w601*. Este patrón concuerda con la asignación que se había hecho de esta secuencia de mono verde (*Ceae-1*) mediante el método de búsqueda de motivos de locus/linaje.

2.3.2.- Arbol filogenético consensuado del método de máxima parsimonia

En la figura 39 se representa un árbol consenso obtenido tras la ejecución del programa CONSENSE (véase 5.2.1.3 de Materiales y Métodos). Pese a que su diseño difiere de forma evidente del descrito en la figura 38, puede verse que la ubicación de las ramas representantes de las secuencias de mono verde permite una asignación alélica **idéntica** a la que se consiguió mediante el árbol único.

Aún así, pueden comentarse dos mínimas diferencias de este árbol en relación con el no consenso:

1.- Las cuatro secuencias que ya habían sido asignadas al linaje *DRB1*03* están en la misma asociación con un alelo de este linaje (*Mane-DRB1*0301*) que con otro de *DRB1*04* (*Mamu-DRB1*0403*). Esta ambigüedad se resuelve hacia *DRB1*03* puesto que a este linaje pertenece el siguiente alelo situado en la vecindad de las cuatro secuencias problema (*Gogo-DRB1*0307*), mientras que el segundo alelo, usado en la filiación, del linaje *DRB1*04* (*Mamu-DRB1*0404*) queda algo más alejado de aquel racimo de secuencias y además, él mismo forma un racimo aparte con los alelos *Patr-DRB1*0701*, *Patr-DRB1*0702* y *Mamu-DRB1*0402*. Al igual que ocurría en el dendrograma previo, las ramas representativas del linaje *DRB*w21* quedan alejadas del lugar que ocupan las cuatro secuencias de *Ceae-DRB1*03*.

2.- Hay un alelo del linaje *DRB1*02* (*Patr-DRB1*0201*) cuya rama ha sido situada por el programa en el mismo racimo en el que se encuentran todas las secuencias del locus DRB5 que se han usado para filiar *Ceae-2*. Esta asociación no se veía en el árbol único de parsimonia pero, aún así, el que aparezca en el árbol consenso no invalida en absoluto la asignación que, a favor del linaje *DRB5*01*, se ha hecho en la segunda secuencia hallada de mono verde africano, puesto que la rama representativa de ese alelo de *DRB1*02* tiene su origen en el nodo más distal

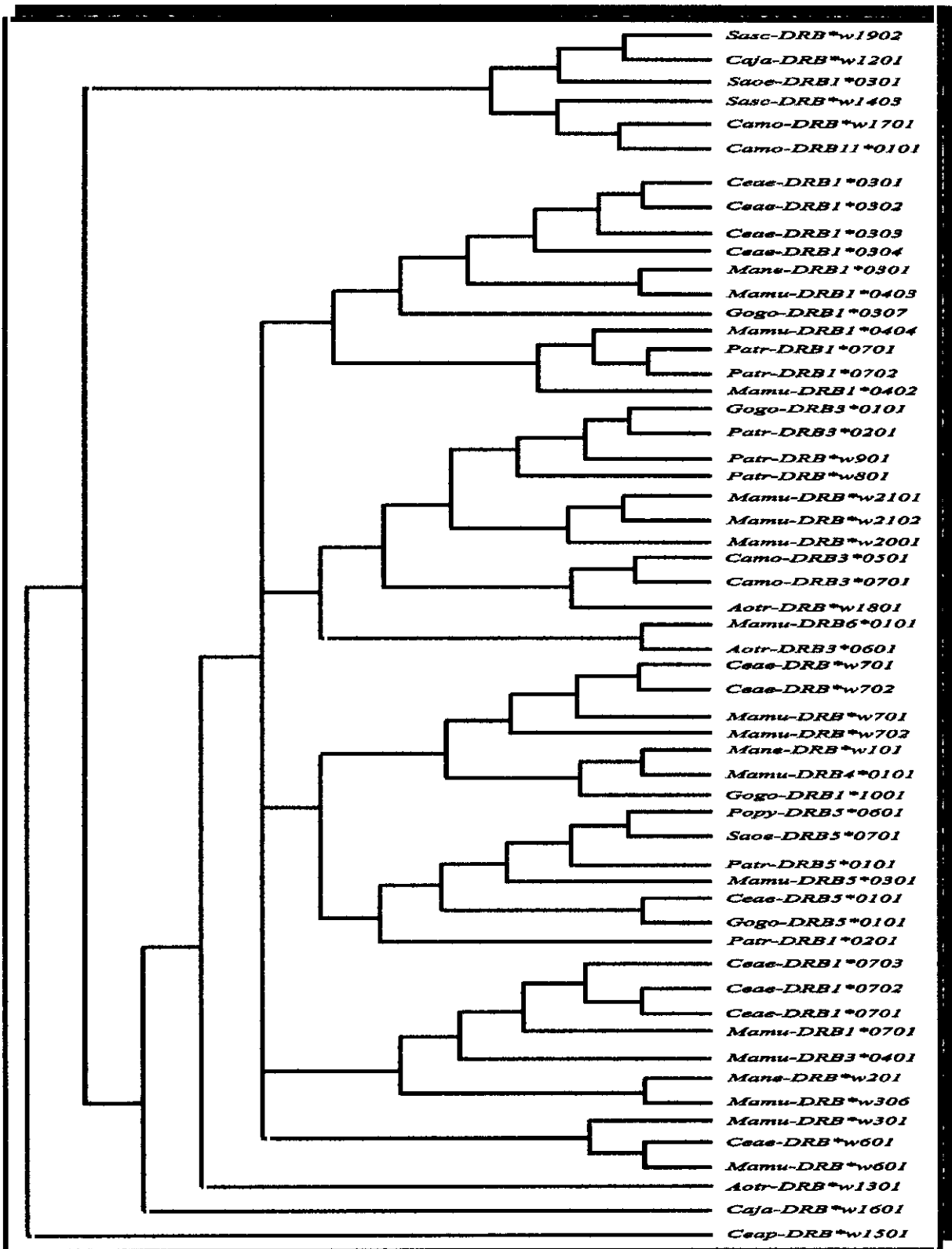


Figura 39.- Dendrograma obtenido, mediante la actuación secuencial de los programas SEQBOOT y CONSENSE, de 56 secuencias del segundo exón de genes DRB de primates. Este árbol se ha obtenido mediante la programación de un total de 100 "bootstraps". Otro árbol obtenido con 1.000 "bootstraps" (no mostrado en este trabajo) mostró una topología de ramas y una localización de los alelos prácticamente idéntica a la del que se muestra en esta figura.

de ese racimo de secuencias. Esta topología parece sugerir la existencia de una cierta homología entre algunas secuencias de DRB1 y de DRB5, y en tal sentido merece la pena comentar que Kenter y sus colaboradores (1.992) y Slierendregt y Bontrop (1.994) ya apuntaron la existencia de una asociación débil, a nivel evolutivo, entre esos dos loci.

2.3.3.- Arbol de distancias genéticas

Este árbol se generó mediante el programa NJBOOT (5.2.2 de Materiales y Métodos).

La figura 40 representa un dendrograma tal como es generado por el programa TREEVIEW. En él puede verse que las asignaciones alélicas coinciden plenamente con las que se han obtenido mediante los anteriores métodos usados en este trabajo: búsqueda de motivos aminoacídicos específicos de locus/linaje, construcción de un árbol de parsimonia y dendrograma consenso.

Al igual que ocurrió en los dos árboles previos, las cuatro secuencias de alelos *Ceae-DRB1*03* se asocian muy estrechamente con secuencias de los linajes *DRB1*03* y *DRB1*04*, pero a la vista del patrón de arracimamiento, la homología es algo mayor con *DRB1*03*. Por otra parte, vuelve a confirmarse el hecho de que, del conjunto de linajes del locus DRB5, es el *DRB5*01* el que filia más estrechamente con la secuencia *Ceae-2*.

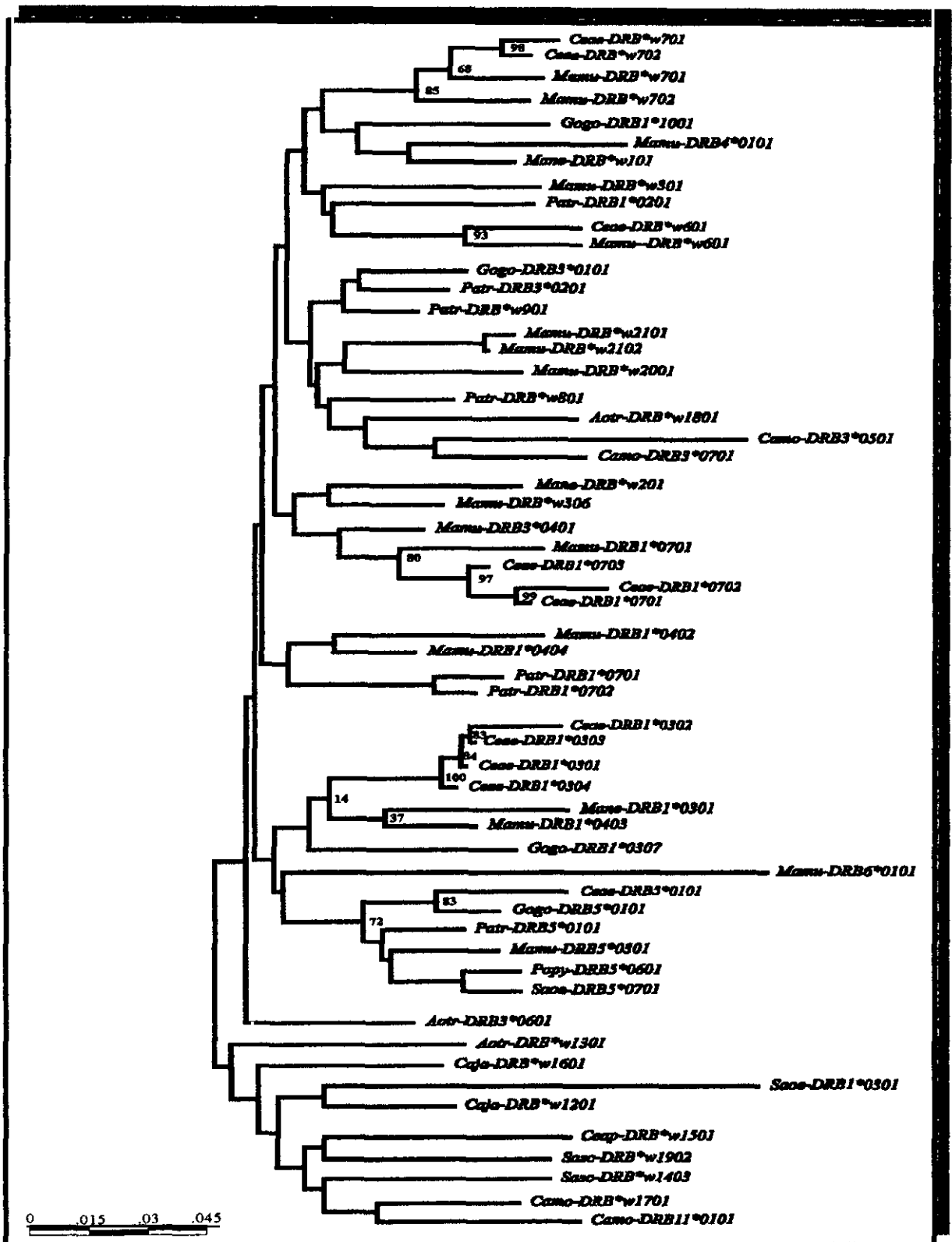


Figura 40.- Dendrograma de secuencias del exón 2 de genes *Mhc-DRB* en el que se reflejan las relaciones filogenéticas de los once alelos *Ceae-DRB* estudiados en este trabajo. El árbol fue construido por el método NJBOOT. Se programaron un total de 100 "bootstraps" para diseñarlo. Los valores de "bootstrap" se muestran en las bifurcaciones de las ramas correspondientes a los alelos de mono verde. En la esquina inferior izquierda se aprecia una escala representativa de las distancias evolutivas.

3.- IDENTIFICACION DE INDIVIDUOS CON DUPLICACIONES GENETICAS

Tras la asignación de cada alelo a cada uno de los 15 individuos a partir de los cuales habían sido obtenidos (tabla 8), se observó que tres de estos individuos, los llamados Ve-8, Ve-10 y Ve-15 presentan tres alelos del gen DRB1.

Tabla 8.- Alelos *Ceae-DRB* encontrados en cada mono verde individual

<u>Individuo</u>	<u>Alelos <i>Ceae-DRB</i></u>
Ve-1	1*0302, 1*0702, *w601, *w701, *w702
Ve-2	5*0101
Ve-3	5*0101, *w601
Ve-4	5*0101
Ve-5	5*0101
Ve-6	5*0101
Ve-7	1*0301, 1*0701
<u>Ve-8</u>	1*0301, 1*0302, 1*0701, *w601, *w701
<u>Ve-10</u>	1*0301, 1*0303, 1*0701, *w702
Ve-11	*w702
Ve-12	1*0703, *w702
Ve-13	*w702
Ve-14	1*0301, 1*0303
<u>Ve-15</u>	1*0304, 1*0701, 1*0703, *w601
Ve-16	1*0301

Se han subrayado los individuos en los que se han encontrado genes DRB duplicados.

El individuo Ve-8 tiene los alelos *DRB1*0301*, *DRB1*0302* y *DRB1*0701*; en el individuo Ve-10 se encuentran *DRB1*0301*, *DRB1*0303* y *DRB1*0701* y, por último, en Ve-15 se han hallado los alelos *DRB1*0304*, *DRB1*0701* y *DRB1*0703*. Esto significa que algunos haplotipos *Mhc* de esta especie podrían llevar dos copias del gen *DRB1*.

Puede observarse que los tres individuos portadores de la duplicación comparten un mismo alelo, el *DRB1*0701*. Como se verá posteriormente, este alelo es el único de los 11 descritos en este trabajo, que podría carecer de funcionalidad (véase 4.5.2).

No obstante, el alelo *DRB1*0701* no aparece exclusivamente en los individuos con duplicaciones genéticas, puesto que puede apreciarse que también se halla en el individuo Ve-7 que, a la vista de los resultados, no parece tenerlas.

4.- CARACTERIZACION FUNCIONAL DE LOS PRODUCTOS PEPTIDICOS

A priori, se supone funcionalidad a los once productos peptídicos derivados de los alelos caracterizados por haber sido obtenidos a partir de ADNc y no presentar deleciones ni codones de paro. Pero, además de esto, se han llevado a cabo análisis específicos para ratificar tal suposición (el de sustituciones sinónimas frente a no sinónimas y el de residuos relevantes para estructura y funcionalidad).

4.1.- Análisis de sustituciones sinónimas y no sinónimas en la región de unión al péptido y fuera de ella

El cálculo de sustituciones sinónimas y no sinónimas en los distintos alelos, genes y clases del MHC ha puesto de manifiesto que la diversidad polimórfica en moléculas proteicas de MHC es, sobre todo, el resultado de una presión selectiva que tiende a provocar cambios mutacionales no conservativos (que modifican el aminoácido) en la región de unión al péptido, mientras que en el resto de la proteína, que no corresponde a dicha región, las mutaciones que ocurren suelen producir cambios sinónimos (que no modifican el aminoácido).

Esto caracteriza precisamente a los alelos cuyo producto tiene función presentadora de antígeno, por lo que si en monos verdes el resultado es similar se podrá deducir que los productos alélicos estudiados en esta especie también serán presentadores.

En un total de dos series independientes de procesamiento de datos, una para la secuencia codificante de ABS (48 nucleótidos), y la otra para los nucleótidos de la región no-ABS (195; los 16 nucleótidos del extremo 3' del segundo exón no han sido tenidos en cuenta para este análisis por su naturaleza monomórfica), el programa enfrentó cada una de las once secuencias con las diez restantes y, haciendo en cada emparejamiento una distinción entre sitios sinónimos y sitios no sinónimos, calculó unos parámetros correspondientes a "número de sustituciones por sitio \pm error estándar".

El siguiente paso ha sido calcular las proporciones de sustituciones sinónimas por sitio sinónimo (d_s) y las de las no sinónimas por sitio no sinónimo (d_n) para cada par de secuencias

de la totalidad de los alelos *Ceae-DRB* con cada subgrupo de secuencias representantes de un locus/linaje concreto: *Ceae-DRB1*, *Ceae-DRB5*, *Ceae-DRB*w6* y *Ceae-DRB*w7* (tabla 9).

Tabla 9.- Valores de d_n , d_s y d_n/d_s en regiones ABS y no-ABS de alelos *Ceae-DRB*

	ABS (nb = 48) [§]			No-ABS (nb = 195) [#]		
	d_n	d_s	d_n/d_s	d_n	d_s	d_n/d_s
<i>Ceae-DRB*w6</i> vs <i>Ceae-DRB</i>	52,6±16,5	8,20±6,57	6,41	5,93±2,03	11,2±5,21	0,529
<i>Ceae-DRB5</i> vs <i>Ceae-DRB</i>	76,2±22,9	11,9±11,7	6,40	6,11±2,09	16,0±6,43	0,382
<i>Ceae-DRB1</i> vs <i>Ceae-DRB</i>	54,8±16,7	13,0±10,2	4,22	5,29±1,84	8,12±4,15	0,651
<i>Ceae-DRB*w7</i> vs <i>Ceae-DRB</i>	68,8±20,4	27,7±19,0	2,48	6,71±2,17	8,68±4,49	0,773

Las medias aritméticas, junto a sus valores de error estándar han sido expresadas como porcentaje de las sustituciones sinónimas por sitio sinónimo (d_s) y porcentaje de sustituciones no sinónimas por sitio no sinónimo (d_n)

nb = número de bases

§→ABS = Sitio de Unión Antigénica. Codones 9, 11, 13, 28, 30, 37, 38, 57, 61, 67, 70, 71, 74, 78, 82 y 86.

#→No-ABS = Codones 9-89, excluyendo los que pertenecen a la región ABS

Véase que si en cada columna (ABS y no-ABS) se procede a efectuar el cociente de cada pareja de valores (d_n/d_s), éste siempre resulta superior a la unidad en las regiones ABS en todas las confrontaciones de grupos génicos que se hacen, lo que da a entender que en estas zonas, los cambios nucleotídicos producidos serán en la mayor parte de las veces del tipo no sinónimo, productores de nuevas moléculas de péptido MHC de clase II. Por contra, en la segunda columna (no-ABS) los cocientes d_n/d_s de las cuatro parejas de valores siempre son inferiores a la unidad, lo que nos dice que en la región no-ABS la mayor parte de los cambios nucleotídicos que se producen son del tipo sinónimo.

En suma, los resultados obtenidos concuerdan con los que, en la bibliografía, se han publicado referentes a los mismos cálculos efectuados sobre alelos funcionales y, por el contrario, se oponen a los vistos en estudios similares del gen DRB6, el cual es probablemente un gen no presentador. Estos datos apoyan que los alelos estudiados en *Cercopithecus aethiops* muy posiblemente codifican para moléculas cuya función es la presentación del antígeno.

4.2.- Análisis de posiciones relevantes para la funcionalidad de la proteína DRB

Existen ciertos residuos en determinadas posiciones de la cadena DR β cuya conservación es fundamental para que la proteína adopte una estructura correcta y sea plenamente funcional (véase 1.2.2.2. de Introducción).

En los once alelos secuenciados de DRB de mono verde se analizó específicamente la presencia o ausencia de dichos residuos con el fin de comprobar si dichos alelos podían codificar para variantes proteicas que cumplieran requisitos de funcionalidad.

4.2.1.- Mantenimiento de las dos cisteínas en las posiciones 15 y 79

Las cadenas DR β de las moléculas presentadoras de antígenos poseen dos cisteínas críticas para su correcto plegamiento, que son las de las posiciones 15 y 79 del dominio β 1 (Kaufman et al., 1.984; figura 41a). La importancia de estos dos residuos radica en que entre ellos se forma un puente disulfuro fundamental para que la proteína adopte la adecuada conformación tridimensional.

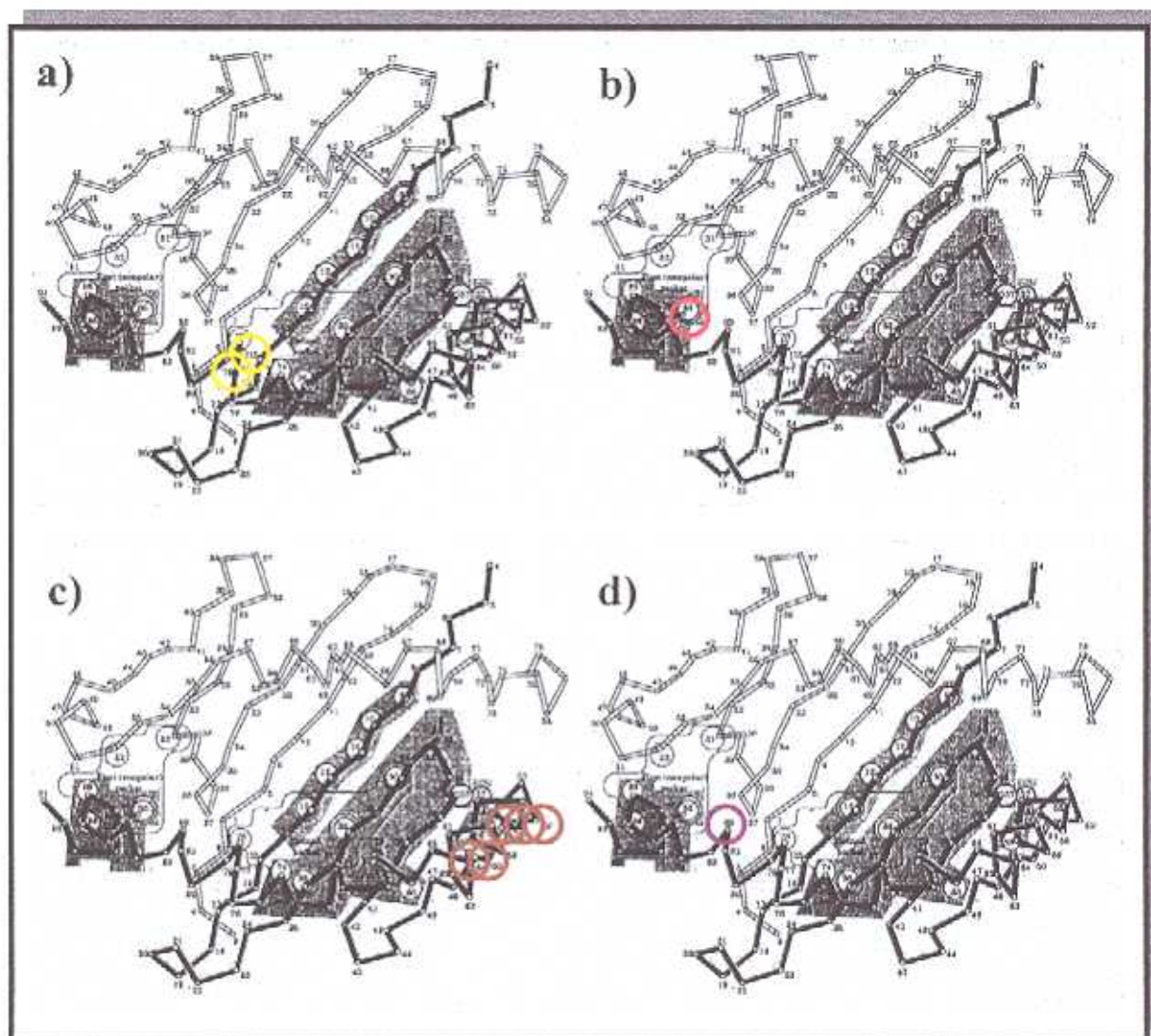


Figura 41.- Representación tridimensional de la estructura plegada del primer dominio globular del heterodímero α/β de una proteína DR. Con una línea blanca se ha representado la cadena α , mientras que la línea negra es la cadena β . Se han sombreado las áreas ricas en motivos, mientras que las posiciones altamente variables se han representado con círculos grandes, al tiempo que con una línea curva se han encerrado los aminoácidos constituyentes de los bolsillos de unión al péptido. a) Se han marcado las dos cisteínas de las posiciones 15 y 79 (círculos amarillos), necesarias para formar el enlace disulfuro que permite el plegamiento molecular. b) Se ha localizado la posición 86 (círculo rojo), donde se presenta la dicotomía Glu/Val, y su proximidad a la cadena DR α , necesaria para mantener la estabilidad del heterodímero α/β . c) Muestra los aminoácidos de las posiciones 49, 50, 51, 52 y 55 (círculos marrones), que conforman la interfase de unión, a nivel del dominio β 1, de los dímeros DR/DR cristalizados. d) Se muestra el aminoácido de la posición 82 (círculo violeta), que si está ocupado por serina puede suponer una afuncionalidad de la molécula presentadora.

Las once secuencias *Ceae-DRB* presentan, de manera invariable, estas dos cisteínas en las posiciones antedichas y, además de ello, no hay ningún otro residuo cisteínico a lo largo de la secuencia del exón 2. La presencia de estas dos cisteínas en las moléculas DRB de mono verde posibilitarían la formación del puente disulfuro intracadena con el que se consiga dar la correcta conformación espacial, de cara a la funcionalidad como moléculas presentadoras de antígenos.

La secuenciación del tercer exón en los once alelos *Ceae-DRB* analizados ha permitido constatar en todos ellos la existencia de una cisteína en la posición 117, al igual que en el resto de las proteínas DRB. Debido a que la amplificación de las secuencias de monos verdes concluye en el codón que codifica el aminoácido de la posición 167, no se puede constatar en este trabajo la presencia de una 4ª cisteína, que debería aparecer en la posición 173 del dominio $\beta 2$.

4.2.2.- Mantenimiento de los residuos que estabilizan el dímero α/β y controlan la complejidad del péptido presentado

De gran importancia para la estabilidad del heterodímero α/β es la posición 86 (véase 1.2.2.2 de Introducción), como demostraron Verreck y colaboradores (1.993). Todos los alelos *HLA-DRB* funcionales presentan los aminoácidos glicina o valina en la posición 86 del exón 2. Además de su función estabilizadora, dichos aminoácidos también condicionan la naturaleza y la longitud de los fragmentos peptídicos antigénicos que será capaz de presentar la molécula *MHC-DRB* (Demotz et al., 1.993), porque según sea esta posición ocupada por un aminoácido provisto de cadena lateral voluminosa (valina) o no (glicina), así estará condicionada estéricamente la hendidura de unión para poder albergar en su interior péptidos procesados de tamaño pequeño o más grande, respectivamente.

En los once alelos *Ceae-DRB* esta posición está ocupada por glicina o por valina, sin que se hayan visto otros residuos en esta posición. No obstante, este dimorfismo de la posición 86 no está balanceado, ya que hay ocho alelos con valina y sólo tres con glicina.

En la figura 41b se representa esquemáticamente la posición de este residuo 86 y su cercanía a la cadena DR α , con la cual interacciona, estabilizando el heterodímero α/β .

4.2.3.- Mantenimiento de los residuos para la formación de dímeros DR/DR

En los once alelos *Ceae-DRB* se analizaron los aminoácidos presentes en las interfases de los dominios $\beta 1$ y $\beta 2$ que estabilizan los dímeros de α/β . La interfase del dominio $\beta 1$ la forman los aminoácidos de las posiciones 49, 50, 51, 52 y 55 (véase 1.2.2.2 de Introducción), las cuales están extremadamente conservadas en humanos, presentando, respectivamente, los aminoácidos alanina, valina, treonina, ácido glutámico y arginina. Estos mismos aminoácidos

ocupan esas mismas posiciones en los alelos analizados de *Cercopithecus aethiops* con la salvedad de la posición 51, en la que algunos alelos (los cuatro del linaje *DRB1*03* y los tres de *DRB1*07*) presentan serina.

Si se comparan las estructuras moleculares de los aminoácidos treonina y serina se verá que ambos, además de ser neutros y polares, disponen de una cadena alifática terminada en un grupo hidroxilo. Esto hace pensar que la modificación, en la posición 51, del aminoácido treonina por otro que es serina no va a repercutir de forma negativa en la capacidad de esta región del exón 2 para constituirse en la primera de las interfases de unión estabilizadoras del dímero DR/DR.

De hecho, el aminoácido serina se encuentra en esa misma posición, en otros alelos de primates del linaje *DRB1*03*, tales como *Gogo-DRB1*0305*, *Male-DRB1*0301*, *Mamu-DRB1*0301*, *Mamu-DRB1*0302*, *Mamu-DRB1*0303*, *Mamu-DRB1*0311*, *Mamu-DRB1*0314*, y *Mane-DRB1*0301*.

Se ha encontrado S51 en otros loci y linajes de DRB, pero no en los que ya hay descritos correspondientes al linaje *DRB1*07*, siendo los primeros que se describen con esta característica estructural los tres alelos *Cee-DRB1*07* que se exponen en el presente trabajo, aunque esto quizás no sea debido a una carencia de ese aminoácido en esa posición en alelos de este linaje génico, sino al escaso número de alelos de tal linaje que hay disponibles en la literatura científica: tan sólo tres alelos, dos de chimpancé y uno de mono rhesus.

En el esquema tridimensional de la figura 41c puede apreciarse que estos cinco residuos, invariables en los once alelos caracterizados (salvo la posición 51), ocupan una posición periférica en la cadena β , lo cual los capacita para llevar a cabo esas interacciones de corto alcance con los mismos residuos de la otra cadena β del dímero DR/DR.

Mientras que los residuos A49, V50 y T/S51 de ambas cadenas beta del heterodímero establecen interacciones de tipo hidrofóbico por sus cadenas laterales, el ácido glutámico de la posición 52 y la arginina de la posición 55 forman puentes salinos cruzados. El residuo Glu52 (cargado negativamente) de un dominio $\beta 1$ es capaz de interactuar electrostáticamente con Arg55 (con carga positiva) del otro dominio $\beta 1$ del heterodímero. Análogamente, la arginina del primer dominio $\beta 1$ también puede establecer esta interrelación con el ácido glutámico de la otra región $\beta 1$.

La segunda interfase de unión del dímero DR/DR se localiza en el dominio proteico $\beta 2$, codificada por el exón 3. La componen siete aminoácidos cuya identidad y posiciones en alelos

DR1 humanos es: Lys105, His111, His112, Leu114, Val142, Val143 y Glu162. His111, His112 y Glu162 interactúan con residuos del dominio $\alpha 2$ de la otra molécula de DR, formando tres puentes salinos.

Los siete aminoácidos están muy conservados en alelos DR humanos, habiéndose encontrado una muy ligera variabilidad en las posiciones 105, 111 y 112, que siempre van a estar ocupadas por un aminoácido catiónico. Este mismo patrón secuencial se ha visto en los alelos estudiados de *Cercopithecus aethiops*: siempre aparece lisina en la posición 105, histidina en la 111 y nuevamente histidina en la posición 112, con la única excepción en este último caso, del alelo *Ceae-DRB*w701*, donde la histidina ha sido reemplazada por el aminoácido arginina, igualmente catiónico.

En el estudio de esta segunda interfase de unión no se ha podido hacer un análisis estructural comparativo con los alelos de primates de otras compilaciones, ya que en éstas el estudio nucleotídico y aminoacídico afecta solamente al segundo exón o dominio proteico $\beta 1$, pero puesto que ya se ha constatado el menor polimorfismo de esta región con relación a la precedente del exón 2 (o dominio proteico $\beta 1$), no hay razón para pensar que el patrón secuencial de la segunda interfase de unión de los productos proteicos DRB de mono verde sea muy diferente al que realmente se presente, cuando sea secuenciado, en otros productos alélicos de esta misma región, en primates.

4.2.4.- Residuos en las posiciones de interacción con CD4

Las moléculas funcionales de DRB deben poseer los residuos necesarios para interactuar con las moléculas del correceptor antigénico CD4 (figura 41d), el cual se halla asociado con ellas, formando un complejo, sobre la membrana de las APC (figura 7).

Estudios de unión a péptidos demuestran que dicha interacción ocurre mediante los residuos aminoacídicos existentes entre las posiciones 134-148 del dominio $\beta 2$ (codificados por el exón 3; Cammarota et al., 1.992). A su vez, estas observaciones concuerdan con experimentos de mutagénesis dirigida en muridos (König et al., 1.992), en los que se ha visto que los aminoácidos de las posiciones 110, 137, 140, 141 y 142 (todos ellos del dominio estructural $\beta 2$) intervienen en la unión DRB/CD4. En los once alelos *Ceae-DRB*, estas cinco posiciones se encuentran ocupadas, de manera invariable, por los aminoácidos glutamina, ácido glutámico,

alanina, glicina y valina. Dichos aminoácidos se encuentran en muchos alelos *HLA-DRB* funcionales.

4.2.5.- Posible afuncionalidad del alelo *Ceae-DRB1*0701*

Los residuos estructurales investigados hasta ahora en las secuencias alélicas *Ceae-DRB* parecen estar muy bien conservados, posibilitando así el correcto plegamiento tridimensional de la molécula, la disponibilidad de sitios de anclaje para los antígenos, la dimerización DR/DR y la interacción con el correceptor CD4.

No obstante, el alelo *Ceae-DRB1*0701* podría representar una excepción, puesto que contiene serina en la posición 82 en lugar de asparagina, y se ha publicado que la presencia de S82 en las moléculas DRB murinas dificulta o incluso imposibilita tanto el transporte intracelular de la proteína DRB recién sintetizada como su expresión superficial (Griffith et al., 1.988).

Curiosamente, en los tres monos verdes en los que se han descrito genes DRB1 duplicados, uno de estos alelos es siempre *Ceae-DRB1*0701* (véase el epígrafe 3 de esta sección).

5.- ANALISIS EVOLUTIVO DE LAS SECUENCIAS

Ceae-DRB

5.1.- SEÑALES TRANS-ESPECIE Y ESPECIFICAS DE ESPECIE

La observación del alineamiento de todas las secuencias nucleotídicas disponibles hasta la actualidad reveló la existencia de motivos comunes a varias de dichas secuencias: Estos motivos pueden ser de dos tipos:

- a) Compartidos por **todas** las secuencias correspondientes a una especie y **exclusivamente** presentes en dicha especie. Como es lógico pensar, este tipo de motivos se encontró sólo en aquellas especies de las que se había obtenido más de un alelo o cuando se estudiaron varios individuos de una especie. A este tipo de motivos se les denomina "específicos de especie" o "intraespecíficos".
- b) **Compartidos** por secuencias *Mhc-DRB* de **distintas** especies. A estos motivos se les denomina "transespecíficos".

5.1.1.- Motivos específicos de especie

En la figura 36 se han representado aquellos aminoácidos que sólo se han encontrado en la especie *Cercopithecus aethiops* y no en ningún otro alelo de los recopilados, hasta el momento presente, en la bibliografía. Se trata de los residuos **S19** (*DRB1*0702*), **A24** (id.), **S33** (*DRB*w601*), **G44** (*DRB*w701*), **H56** (linaje *DRB1*03*) y **P73** (*DRB1*0302*). De estos seis aminoácidos es de destacar la histidina en la posición 56, que es el único de ellos que ha sido encontrado en más de una secuencia alélica, dándose además la circunstancia de que aparece, de manera característica, en los cuatro alelos del linaje *DRB1*03*.

La localización de estos residuos queda plasmada en el modelo tridimensional de la molécula DRB que aparece en la figura 42, donde se observa que ninguna de dichas posiciones forma parte de la región de unión al péptido. Esto significa que ninguno de estos aminoácidos específicos de especie interviene en la selección de los péptidos presentados por las moléculas *Ceae-DRB*. Tampoco ocupan estos aminoácidos las posiciones de las que ya se ha comentado

(véase 4.2) que son imprescindibles para que la molécula *Mhc-DRB* de clase II pueda actuar como presentadora de péptidos antigénicos.

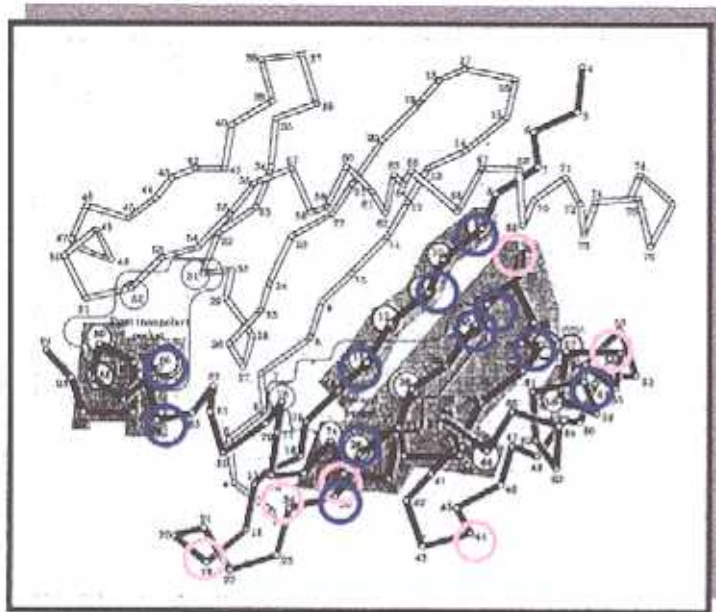


Figura 42.- Localización, en un esquema tridimensional del primer dominio del heterodímero DRB/DRA, de los aminoácidos específicos de especie (círculos de color rosa) encontrados en *Cercopithecus aethiops*. Ninguno de ellos ocupa posiciones de la región de unión al péptido. Igualmente, ninguno de los seis ocupa las posiciones que ya se han descrito como necesarias para el correcto modelado tridimensional de la molécula de clase II. También se han representado aquellas posiciones (círculos de color azul oscuro) en las que se han encontrado aminoácidos presentes en todos los alelos estudiados, desde los prosimios hasta los homínidos. Hasta cuatro de ellos caen dentro de los bolsillos de unión a los péptidos antigénicos.

Desde un punto de vista evolutivo es lógico pensar que los cambios en la secuencia de ADN que han originado la aparición de estos aminoácidos son posteriores a la aparición de la especie *Cercopithecus aethiops* (< 40 m.a.) y que pueden haber sobrevenido por mutaciones puntuales.

5.1.2.- Motivos transespecíficos

Hay trece aminoácidos en un total de once posiciones que son invariables desde los prosimios hasta los homínidos, pasando por las etapas intermedias de Monos del Nuevo Mundo y Monos del Viejo Mundo. Estos residuos y sus posiciones son: **K9**, **V11**, **(A/H)13**, **Q25**, **Y26**, **H30**, **I31**, **L37**, **S60**, **R84** y **(V/G)86** (se han subrayado los que forman parte de la región de unión al péptido; figura 42).

Hay también un segundo grupo de residuos transespecíficos, que son **L26**, **Y40**, **G66** y **S82**, encontrados todos ellos en prosimios, MVM y homínidos, pero no en MNM. También hay que fijar la atención en los restos aminoácidos que no están presentes en prosimios pero sí en MNM, MVM y homínidos, y que son **D37** y **D38**.

Un tercer grupo de motivos aminoácidos transespecíficos serían aquellos que, encontrándose en alelos de prosimios y teniendo por tanto, la antigüedad mínima de estos, no

se han visto en las secuencias caracterizadas de monos antropoides. Entre estos residuos se encuentran: **R56**, **F61** y **L64**, presentando este último la particularidad de que, dentro de los MVM, sólo se ha encontrado en secuencias de las aquí estudiadas de *Cercopithecus aethiops*.

Un cuarto grupo de aminoácidos transespecíficos lo forman aquéllos que, teniendo su origen en alelos pertenecientes a especies de prosimios, sólo vuelven a presentarse en el estadio de MVM, pero no en MNM. Se citan entre ellos **Q9** y **T73**, los cuales, para ser precisos, no se encuentran en todos los alelos consultados de DRB de monos del Viejo Mundo, sino sólo en algunos alelos de macacos rhesus y del mono verde aquí estudiado (cercopitécidos ambos).

Hay otros aminoácidos cuya evolución parece ser relativamente reciente y que son, por un lado **S74**, vista en alelos *Ceae-DRB*, *Mamu-DRB*, *Gogo-DRB* y una sola secuencia de *Paha-DRB*, o sea, MVM y un mono antropoide, y por otro lado **K14** y **N43**, que aparecen en alelos de *Ceae-DRB* en conjunción con secuencias, respectivamente, de *Patr-DRB* y de *Papa-DRB*, es decir, un solo mono cercopitécido y dos especies representantes de homínidos.

De posible interés identificativo son los aminoácidos transespecíficos encontrados solamente en alelos *Mhc-DRB* de macacos y de monos verdes, como una marca propia de esta familia, y que son **Q11** y **A67**.

Por último, el residuo **M12** se encuentra, además de en *Cercopithecus aethiops* (MVM), en *Saguinus oedipus* (MNM) y nada más que en estas dos especies.

En el punto 4 de la sección Discusión se comenta el significado de estos residuos transespecíficos desde el punto de vista evolutivo.

V.- DISCUSSION

1.- Variabilidad limitada en los alelos *Mhc-DRB* de *Cercopithecus aethiops*

En la actualidad se conoce la secuencia de ADN de más de 200 alelos DRB de primates, que se agrupan en un total de 30 loci y/o linajes alélicos (loci DRB1-DRB9 y linajes no ortólogos DRB*w1-DRB*w21, incluyendo a DRB11). En cambio, el espectro de alelos DRB obtenidos en los monos verdes ha sido relativamente limitado. Por ejemplo, las secuencias correspondientes al gen DRB1 pertenecen únicamente a los linajes *03 ó *07, a pesar de que la última compilación de secuencias DRB de primates contiene cinco linajes de DRB1 (*10, *02, *03, *04 y *07).

Mediante comparación de motivos específicos y la construcción de árboles filogenéticos se ha demostrado que los once alelos *Ceae-DRB* corresponden a los genes y linajes DRB1*03, DRB1*07, DRB5*01, DRB*w6 y DRB*w7.

El que cuatro de los once alelos *Ceae-DRB* sean asignables al linaje DRB1*03 apoya la evidencia de que éste es uno de los linajes más extendidos entre los primates, puesto que un gran número de secuencias adscritas a él se han hallado en todos los grupos estudiados de primates, tales como homínidos (*Pan troglodytes*, *Pan paniscus*, *Gorilla gorilla* y *Pongo pygmaeus*), monos del Viejo Mundo (*Mandrillus leucophaeus*, *Papio hamadryas*, *Macaca nemestrina* y *Macaca mulatta*), monos del Nuevo Mundo (*Aotus trivirgatus*, *Callithrix jaccus*, *Callicebus moloch* y *Saguinus oedipus*) y prosimios (*Galago moholi* y *Galago senegalensis*).

Por el contrario, hasta el momento de la realización del presente trabajo, el linaje DRB1*07 comprendía únicamente dos alelos de chimpancé en la bibliografía existente, los llamados *Patr-DRB1*0701* y *Patr-DRB1*0702* (Kenter et al., 1.992) y un solo alelo del mono rhesus, *Mamu-DRB1*0701* (Slierendregt et al., 1.994). Así pues, pese a ser un linaje muy escasamente representado, se da el caso de que en el trabajo que aquí se expone han sido encontrados tres alelos asignables a este gen.

De los restantes genes de histocompatibilidad de clase II de los que se conoce la existencia de un producto proteico transcrito y expresado (DRB3, DRB4 y DRB5), sólo se ha obtenido un alelo: *Ceae-DRB5*0101*, cuyo linaje ya había sido hallado en *Gorilla gorilla*, *Macaca mulatta* y *Pan troglodytes*.

El resto de las secuencias obtenidas en mono verde corresponden a los linajes no ortólogos *DRB*w6* y *DRB*w7*, sólo dos de los 20 conocidos en la actualidad (tabla 1). Hasta el momento, estos dos linajes sólo habían sido descritos en *Macaca mulatta*, circunstancia que puede poner de relieve el parentesco existente entre esta especie y *Cercopithecus aethiops*.

Es posible que el pequeño número de alelos obtenido en este trabajo se deba a un efecto selector de la pareja de oligonucleótidos empleada en la amplificación. Por ejemplo, la razón por la que probablemente no se han obtenido alelos del linaje *DRB1*02* podría estribar en que en el octavo codón (que son las tres últimas bases del cebador *DRB-Amp*) de las secuencias de dicho linaje, el triplete TTG es reemplazado por CTG. Un cambio en una posición tan próxima al extremo 3' puede provocar una ausencia de complementariedad del cebador directo con la secuencia diana, acarreando la falta de amplificación.

No obstante, McAdam y colaboradores (1.995) encontraron también que los alelos *Mhc-A* de las especies chimpancé común y pigmeo se agrupan en un restringido número de linajes: estas dos especies expresan alelos *Mhc-A* relacionados con una sola (*HLA-A1*, *-A3*, *-A11*) de las seis familias de alelos humanos *HLA-A*. Estos limitados repertorios alélicos podrían reflejar un cuello de botella genético en la evolución de especies correspondientes, o que la selección puede haber favorecido a una familia particular de alelos a lo largo de la evolución.

Estos limitados repertorios alélicos de las especies concernidas podrían explicarse por alguno de los siguientes mecanismos:

- a) que la especie ha sufrido un "cuello de botella" en su evolución (por ejemplo, por enfermedades infecciosas que han diezmando la población);
- b) que el nivel de endogamia es elevado;
- c) que la selección puede haber favorecido a una familia particular de alelos a lo largo de la evolución.

2.- Los productos alélicos *Ceae-DRB* cumplen criterios de funcionalidad para la presentación de antígenos

Dichos criterios son los siguientes:

1.- Los once alelos confirmados en este trabajo han sido amplificados, clonados y secuenciados a partir de moléculas de ADNc, y se ha visto que no hay en ellos elementos tales como deleciones o inserciones, que pudieran trastocar la correcta pauta de lectura, o codones de paro que pudieran impedir la traducción del segmento génico hasta un péptido normal.

2.- En los once alelos se ha encontrado, sin excepción, que el cociente entre las proporciones, halladas por el método de Nei y Gojoori, de las sustituciones no sinónimas y de las sustituciones sinónimas (d_n/d_s) es superior a la unidad para las secuencias constituidas por los codones de la región de unión al péptido. Por contra, en los codones cuyo conjunto conforma las regiones de no unión al péptido, el citado cociente de proporciones es inferior a 1.

Los cocientes $d_n/d_s > 1$ en los codones de la región de unión al péptido sugieren que la selección natural está actuando en el sentido de propiciar la aparición de variabilidad en esta región, la cual contará con un polimorfismo cada vez mayor a causa de que la mayoría de las sustituciones que experimenta son de tipo no sinónimo (Hughes and Nei, 1989), situación que es compatible con lo ya visto en loci normalmente expresados (no pseudogenes) y proteínas derivadas de ellos, con función presentadora de antígenos. Así, los alelos de DRB1, DRB3 y DRB5 exhiben en los codones de la región de unión al péptido cocientes d_n/d_s más altos que el que se ha hallado para una molécula derivada del gen DRB6 que, probablemente, no es presentadora (Bergström and Gyllensten, 1995).

3.- El análisis molecular del dominio $\beta 1$ de los productos alélicos de mono verde muestra la existencia de los restos aminoacídicos que son esenciales para la correcta función presentadora de antígenos de los productos proteicos de estos alelos. Así, el plegamiento del dominio estructural $\beta 1$ se presupone por la presencia de los dos aminoácidos cisteína en las posiciones 15 y 79 (véanse 1.2.2.2 de Introducción y 4.2.1 de Resultados).

La estabilidad del heterodímero α/β y la capacidad para interactuar con determinados fragmentos peptídicos se da por la presencia dicotómica, en la posición 86, de los aminoácidos glicina o valina (véanse 1.2.2.2 de Introducción y 4.2.2 de Resultados). Esta dualidad de residuos

podría proporcionar sitios de reconocimiento antigénico "grandes" y "pequeños" para el mono verde, al igual que ocurre en alelos *HLA-DRB*, en los que también se ha observado esta dicotomía de aminoácidos. Concretamente, tres de los once alelos secuenciados (*Ceae-DRB1*0703*, *Ceae-DRB*w701* y *Ceae-DRB*w702*, los tres con glicina en la posición 86) pertenecerían a la categoría de los alelos capaces de albergar más cantidad de péptidos y más complejos que los que exhiben valina en tal ubicación, al tiempo que establecerían unas interacciones DR β /DR α menos estables que las conseguidas por estos últimos.

Bontrop y colaboradores (1.995) postularon que esta dualidad aminoacídica es exclusiva de la especie humana. El presente trabajo cuestiona, por el momento, tal exclusividad, aunque sería necesario secuenciar más alelos para poder asegurar de forma tajante esta premisa. No obstante, puede reseñarse que si bien esta dicotomía glicina/valina se ha encontrado en sólo once alelos de mono verde, en otras especies de primates, presentes en las recopilaciones bibliográficas, se da el caso de que aún habiéndoseles estudiado un número menor de alelos se ha encontrado un polimorfismo de la posición 86 que va más allá del dicotómico glicina/valina. Este es el caso, por ejemplo, de *Aotus trivirgatus* (MNM), donde de seis alelos secuenciados, tres presentan fenilalanina en la posición 86, además de la glicina y la valina en los otros tres alelos, o de los ocho alelos publicados de la especie *Pongo pygmaeus* (MVM), en los que dos de ellos también tienen fenilalanina en la posición 86.

Los once alelos de mono verde conservan intactos o muy poco reemplazados (en tal caso por aminoácidos estructuralmente relacionados) los aminoácidos susceptibles de formar las dos interfases de unión entre heterodímeros α/β (véanse 1.2.2.2 de Introducción y 4.2.3 de Resultados), por lo que se puede pensar que estos alelos de mono verde son capaces de interaccionar mutuamente para formar dímeros de DR, siendo ésta otra prueba a favor de su funcionalidad.

También se ha visto que en el exón 3 se codifican los aminoácidos necesarios para que los alelos *Ceae-DRB* sean capaces de interactuar con la molécula CD4 (véanse 1.2.2.2 de Introducción y 4.2.4 de Resultados), que se encuentra también en la membrana de la célula presentadora de antígenos formando un complejo con la molécula del MHC.

No obstante, en uno de los alelos de mono verde (*Ceae-DRB1*0701*) se ha encontrado serina en la posición 82 (véase 4.2.5 de Resultados) en vez de la habitual glutamina. Estudios realizados en ratones (Griffith et al., 1.988) han evidenciado que la presencia de este aminoácido

en una proteína DRB no impide su traducción pero imposibilita o dificulta su transporte intracelular desde las cisternas del aparato de Golgi hasta la membrana citoplasmática.

Se ha visto que los únicos alelos de primates no humanos con **S82** se encuentran en el locus DRB6 y son, probablemente, moléculas no presentadoras (Figuroa et al., 1.991) debido a las modificaciones que presentan respecto a las secuencias correctamente traducidas [*Gogo-DRB6*0202* (un codón prematuro de paro), *Gogo-DRB6*0203* (id), *Popy-DRB6*0201* (un aminoácido delecionado) y *Popy-DRB6*0202* (un aminoácido delecionado más un codón prematuro de paro)].

3.- Duplicaciones genéticas

En este trabajo se demuestra la existencia de tres alelos de DRB1 en tres individuos, lo que sugiere que el gen DRB1 puede encontrarse duplicado en algunos haplotipos de mono verde (tabla 8). En el mono rhesus (Sliendregt et al., 1.994; Knapp et al., 1.997), el titi pardo (Trtková et al., 1.993) y en el prosimio *Galago senegalensis* (Figuroa et al., 1994) también se han observado duplicaciones de este gen.

De hecho, en los genes de los primates (no sólo en el mencionado DRB1) las duplicaciones son fenómenos observados con relativa frecuencia (Kasahara et al., 1.997), tanto en prosimios (hasta seis diferentes copias de DRB3 y de *DRB*w12* en varios individuos de *Otolemur garnetti*; Figuroa et al., 1.994), como en homínidos, tales como *Pongo pygmaeus* (duplicación de DRB5; Schönbach et al., 1.993) y *Pan troglodytes* (duplicación del pseudogén DRB6, Kenter et al., 1.992) y en *Macaca mulatta* (duplicación de DRB6 y de *DRB*w6*, Sliendregt et al., 1.994; Knapp et al., 1.997). Estos fenómenos también se han observado en genes de clase I (*Mhc-B*; Bontrop et al., 1.995).

El que haya tres individuos con tres copias del gen DRB1 y no dos como sería de esperar, una por cada gen DRB1 de cada cromosoma, puede indicar que en algún momento de la evolución, en los haplotipos "ancestrales" a los que representan dichos individuos, se ha producido una duplicación genética, lo que haría que uno de sus cromosomas fuese portador de dos genes DRB1.

Por lo tanto, el gen *Mhc-DRB1* parece haber experimentado un proceso genético por el cual se promueve su expansión en toda la escala filogenética que se extiende desde los prosimios hasta los monos del Nuevo Mundo y monos del Viejo Mundo, mientras que se ha estabilizado en el linaje conducente a homínidos, puesto que esta duplicación de DRB1 ya no se ha observado en los linajes conducentes a póngidos (orangután, gorila y chimpancé) ni en el propio ser humano.

Por otro lado, los tres individuos con duplicaciones de DRB1 llevan un alelo probablemente no funcional (*Ceae-DRB1*0701*) por tener la presencia de serina en la posición 82 (véase 4.2.5 de Resultados). Este alelo no funcional podría formar parte del haplotipo que lleva la duplicación (para comprobarlo sería necesario realizar estudios familiares de los individuos correspondientes) y podrían haber sucedido, aunque no se sabe en qué orden cronológico, dos mecanismos:

- a) la duplicación del gen DRB1;
- b) la supuesta inactivación de *Ceae-DRB1*0701* por la mutación S82.

Parece probable que la selección natural esté actuando en esta especie con el objetivo de emplazar genes DRB1 duplicados sobre un mismo cromosoma, uno funcional y otro defectuoso.

Este mecanismo podría servir para mantener, a nivel de cada individuo, un subconjunto de moléculas presentadoras bastante grande, con el objetivo de interactuar con diferentes péptidos antigénicos, pero no tan grande como para llegar a eliminar, durante el proceso de selección negativa, un alto número de clones celulares T en el timo, lo que podría dar lugar a una posterior pérdida de funcionalidad en el repertorio de los individuos adultos y, quizás al desarrollo de inmunodeficiencias (Bontrop et al., 1.995).

4.- Los alelos *Ceae-DRB* siguen el modelo de evolución transespecífico

La asignación alélica de las secuencias de mono verde, obtenida tanto a través de la comparación de motivos como por la construcción de dendrogramas (véanse 2.1 y 2.3 de Resultados), demuestra que estos alelos *Mhc-DRB*, caracterizados por primera vez en esta especie animal, siguen el modelo de la evolución transespecífica.

Ciertos residuos aminoácidos encontrados en *Cercopithecus aethiops* también se han hallado en otras especies, no sólo de la familia *Cercopithecidae*, sino también en monos platirrinos y hasta en prosimios, pese a que la edad de divergencia estimada con estos últimos se estima es 48 millones de años.

Es muy improbable que un mismo motivo aminoácido aparezca en secuencias de especies tan separadas por medio de un mecanismo de convergencia. Posiblemente, estos aminoácidos ya existían en los alelos ancestrales de los organismos antepasados inmediatos de prosimios y de los otros primates, y que su importancia, tanto estructural como funcional es lo suficientemente grande como para no haber experimentado cambios en los últimos 85 millones de años, de manera que han sido heredados, sin más cambios, por todas aquellas especies que han evolucionado a partir de los antepasados comunes ya mencionados.

En segundo lugar, la inspección ocular del árbol de distancias genéticas (figura 40) muestra que hay alelos de diferentes especies de procedencia que, no obstante, se agrupan juntos en un mismo racimo. Esto quiere decir que lo realmente importante no es la especie de origen de ese alelo sino su homología con los que quedan agrupados en su proximidad, y puesto que en un mismo racimo puede haber alelos de especies divergentes, se puede pensar que la homología subyacente que las ha hecho agruparse juntas se debe a que comparten un antecesor común, el cual experimentó procesos de duplicación, modificación nucleotídica y variaciones traduccionales conducentes a una cierta diversidad, pero conservando siempre ciertos rasgos secuenciales que posibilitan a las diferentes variantes el agruparse en un mismo linaje, definible por esa misma homología.

Por las argumentaciones expuestas se propone el siguiente orden cronológico de aparición de los residuos aminoácidos en el segundo exón de los alelos DRB: hace al menos 85 millones

de años ya estaban presentes todos aquellos residuos encontrados en secuencias de prosimios, a saber **(K/Q)9, V11, (A/H)13, Q25, (Y/L)26, H30, I31, L37, Y40, R56, S60, F61, L64, G66, T73, S82, R84** y **(V/G)86** (figura 43).

Posteriormente, entre 37 y 85 millones de años, aparecerían ciertos aminoácidos no presentes en prosimios pero sí, de manera común en catarrinos, platirrinos y homínidos: **D37** y **D38**.

Tiempo después de producirse la escisión entre monos del Nuevo y del Viejo Mundo (hace unos 55 millones de años), un antepasado común al mono verde y al mono rhesus adquiriría los aminoácidos **Q11** y **A67**, los cuales no serían transmitidos, con posterioridad, a los homínidos, los cuales sí presentan, por el contrario, **S74** (visto en gorila además de en los cercopitécidos mono verde, mono rhesus y babuino), por lo que es dable pensar que este aminoácido es, evolutivamente, algo más moderno que los dos reseñados anteriormente y, a su vez, esta serina puede ser algo más antigua que **K14** y **N43**, los cuales sí han sido vistos en dos homínidos tales como *Pan paniscus* y *Pan troglodytes*, además de en mono verde pero, sorprendentemente, no están presentes en ninguna de las extensas recopilaciones alélicas del exón 2 de genes *Mhc-DRB* de *Macaca mulatta*.

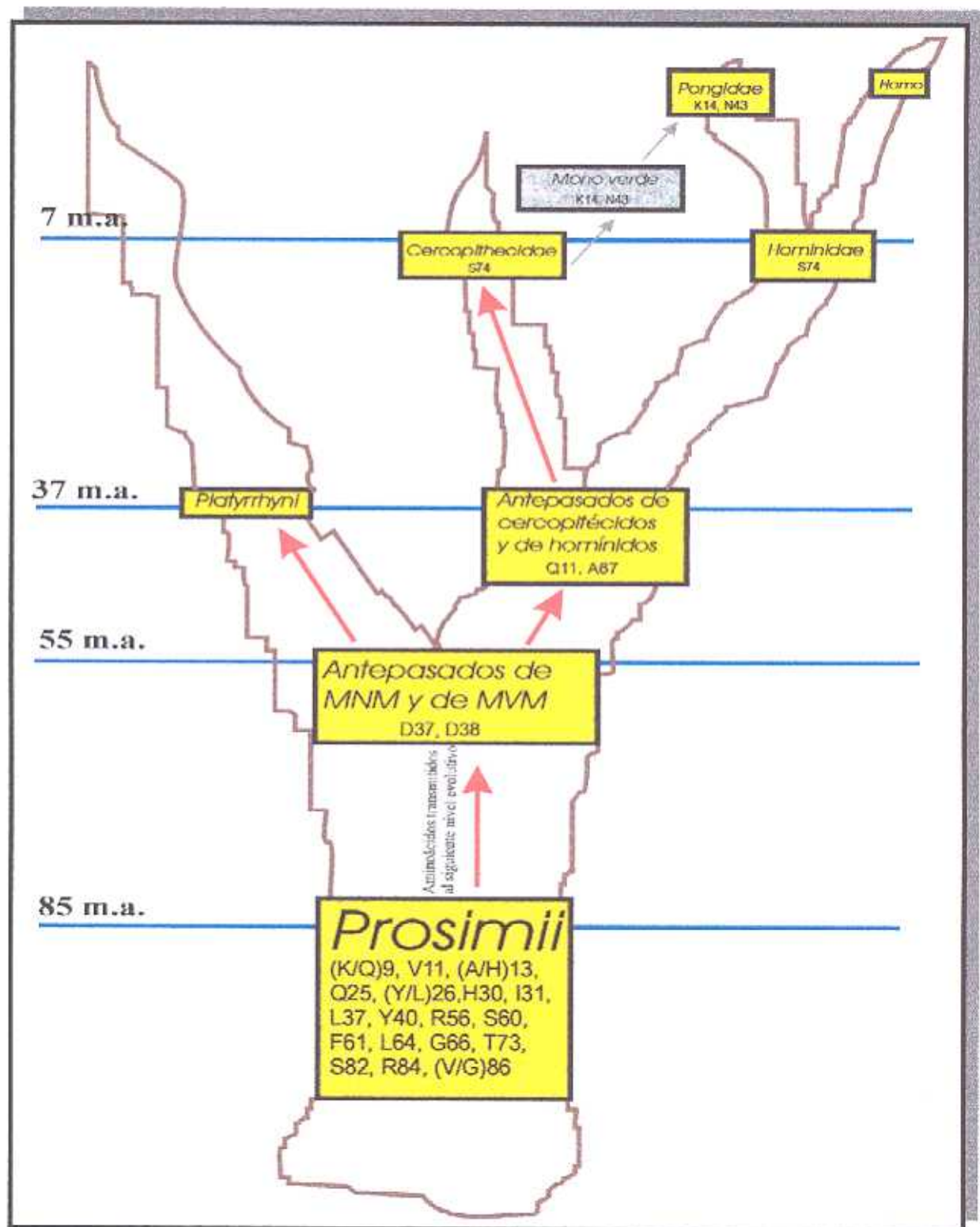


Figura 43.- Diagrama esquemático en el que se muestra la presunta relación cronológica y evolutiva existente entre los residuos aminoacídicos de las secuencias descritas en este trabajo. Las flechas rojas representan la transmisión de los aminoácidos considerados hacia el siguiente nivel evolutivo. El que a un determinado grupo taxonómico se le hayan asignado ciertos aminoácidos no significa necesariamente que éstos hayan sido vistos en todas las especies de ese taxa. Nótese la situación particular de los aminoácidos K14 y N43 (flechas grises), que han sido encontrados por igual en póngidos y en *Cercopithecus aethiops*, pero no en una especie tan emparentada con ésta como es *Macaca mulatta* ni en ninguna otra de la familia *Cercopithecidae*.

5.- Ausencia de alelos recombinantes

Para la generación de la diversidad en los loci del MHC se han postulado varios mecanismos moleculares, entre los que se encuentran:

- a) las mutaciones puntuales;
- b) Mutaciones complejas;
- c) el intercambio de secuencias cortas o motivos (denominado por algunos autores conversiones o microconversiones génicas); y
- d) mecanismos recombinatorios que combinan la porción codificante de la lámina β de un alelo con la hélice α de otro alelo (Gyllensten et al., 1.991a, b; Bergström y Gyllensten, 1.995).

Los alelos de mono verde de este trabajo apuntan a la existencia de las mutaciones puntuales y al intercambio de secuencias cortas, por ejemplo: la única diferencia observada entre los alelos *Ceae-DRB1*0301* y *Ceae-DRB1*0303* (N cambia por S en el residuo 120, AAC→AGC) podría deberse a una mutación puntual; y otro subgrupo de secuencias muestra un patrón característico de motivos compartidos, como ERH en las posiciones 28, 29 y 30 de *Ceae-DRB*w601*, *-I*0701*, *-I*0702* y *-I*0703*; o YLEQARAA en las posiciones 67 á 74 de *Ceae-DRB*w601*, *-I*0701* y *-I-0702*, consistente con un aparente intercambio de pequeños segmentos intra- o interlocus.

El cuarto mecanismo de los mencionados anteriormente (recombinaciones extensas) no se ha comprobado en las secuencias obtenidas en los monos verdes. Esto concuerda con las observaciones de otros autores en chimpancés (Kenter et al., 1.992), platirrinos (Trtková et al., 1.993) y macacos rhesus (Slierendregt et al., 1.994) y sugieren que las recombinaciones extensas contribuyen de una forma muy limitada o nula a la generación de la variabilidad de DRB. No obstante, un número superior de alelos *Ceae-DRB* podría ayudar a identificar y distinguir los mecanismos genéticos particulares implicados en la generación de la diversidad de DRB en los monos verdes.

VI.- CONCLUSIONES

1.- Se han obtenido, por primera vez, once secuencias de genes DRB de la especie *Cercopithecus aethiops* (mono verde africano), con una longitud de 516 nucleótidos, que comprenden los exones de mayor polimorfismo (2 y 3).

2.- La comparación de motivos específicos y la construcción de dendrogramas permiten la asignación inequívoca de las once secuencias a los linajes *DRB*06* (una secuencia) y *DRB*07* (dos secuencias) y a los loci DRB5 (una secuencia) y DRB1 (tres al linaje *07 y cuatro al linaje *03).

3.- El número de alelos DRB encontrado en la especie es pequeño, limitándose a pocos genes o linajes DRB de todos los conocidos en primates hasta el momento actual. Esto podría reflejar que, descartando errores de muestreo, la especie ha sufrido en su evolución un "cuello de botella" genético, o que tiene un alto grado de endogamia, o que la selección ha favorecido a determinadas familias de alelos.

4.- Se han obtenido árboles filogenéticos con 56 secuencias de DRB de primates de distintas especies (prosimios, monos del Nuevo Mundo, monos del Viejo Mundo y póngidos), que incluyen las once secuencias obtenidas en el presente trabajo. La topología de dichos dendrogramas no reproduce las relaciones filogenéticas de primates aceptadas en la actualidad, sino que apoya el modelo de evolución transespecífica del MHC. No obstante, no se puede descartar que la mayor similitud entre alelos de distintas especies pueda deberse a fenómenos de convergencia.

5.- Las secuencias obtenidas sugieren que la diversidad de los genes DRB en la especie *C. aethiops* puede generarse por, al menos, dos mecanismos: mutaciones puntuales e intercambio de motivos o secuencias cortas o conversión génica; y no ponen de manifiesto mecanismos de recombinación de fragmentos extensos entre alelos.

6.- Las proteínas deducidas de las secuencias obtenidas cumplen criterios de funcionalidad como moléculas presentadoras de antígenos puesto que:

- a) Las secuencias se han obtenido a partir de ADNc y no presentan deleciones, inserciones o codones de paro que supongan la inactivación de la proteína.

- b) El número de sustituciones sinónimas es inferior al de sustituciones no sinónimas en los lugares de unión al péptido, mientras que fuera de dichos sitios ocurre lo contrario.
- c) Las posiciones 15 y 79 del dominio $\beta 1$ llevan el aminoácido cisteína, permitiendo que las proteínas adopten la adecuada conformación espacial.
- d) Las proteínas presentan los aminoácidos glicina o valina en la posición 86 del dominio $\beta 1$, que son fundamentales para la estabilidad del heterodímero α/β .
- e) Presentan los aminoácidos alanina, valina, treonina/serina, ácido glutámico y arginina en las posiciones 49, 50, 51, 52 y 55 del dominio $\beta 1$ respectivamente, y lisina, histidina, histidina/arginina, leucina, valina, valina y ácido glutámico en las posiciones 105, 111, 112, 114, 142, 143 y 162 del dominio $\beta 2$ respectivamente, que posibilitan la formación de dímeros DR/DR.
- f) Presentan los aminoácidos glutamina, ácido glutámico, alanina, glicina y valina en las posiciones 110, 137, 140, 141 y 142 del dominio $\beta 2$ respectivamente, que forman la interfase de contacto de DR con la molécula CD4.

7.- El alelo *Ceae-DRB1*0701* podría codificar para una molécula sin capacidad funcional para la presentación antigénica, ya que lleva el aminoácido serina en la posición 82 (S82) que impide el transporte intracelular y la expresión en superficie de las moléculas DRB murinas, y que los únicos alelos humanos con S82 son las moléculas DRB6, cuya función, probablemente, no sea la de presentar péptidos.

8.- En tres de los individuos analizados se han encontrado tres secuencias (en cada uno) del gen DRB1, lo que significa que dicho gen está duplicado en algunos haplotipos MHC de la especie estudiada. Los tres individuos con genes DRB1 duplicados llevan el alelo *Ceae-DRB1*0701*, probablemente no funcional. Se discute el significado del hallazgo como modelo de generación de polimorfismo a partir de pseudogenes.

VII.- BIBLIOGRAFIA

A

- Allen PM, Unanue ER.** "Antigen processing and presentation at a molecular level". *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 1987. **225**: 147-154.
- Alvarez M, Martínez-Laso J, Varela P, Díaz-Campos N, Gómez-Casado E, Vargas-Alarcón G, García de la Torre C, Arnaiz-Villena A.** "High polymorphism of *Mhc-E* locus in non-human primates: alleles with identical exon 2 and exon 3 are found in two different species". *Tissue Antigens*. 1997. **49**: 160-167.
- Anderson KS, Cresswell P.** "A role for calnexin (IP90) in the assembly of class II MHC molecules". *EMBO Journal*. 1994. **13**: 675-682.
- Andersson G, Andersson L, Larhammar D, Rask L, Sigurdardóttir S.** "Simplifying genetic locus assignment of *HLA-DRB* genes". *Immunology Today*. 1994. **15**: 58-62.
- Andersson G, Larhammar D, Widmark E, Servenius B, Peterson PA, Rask L.** "Class II genes of the human major histocompatibility complex: organization and evolutionary relationship of the *DRβ* genes". *Journal of Biological Chemistry*. 1987. **262**: 8748-8758.
- Andersson G, Lindblom B, Andersson L, Gorski J, Mach B, Rask L.** "The single *DRβ* gene of the *DRw8* haplotype is closely related to the *DRβ3III* gene encoding *DRw52*". *Immunogenetics*. 1988. **28**: 1-5.
- Andersson L, Gustafsson K, Jonsson AK, Rask L.** "Concerted evolution in a segment of the first domain exon of polymorphic MHC class II β loci". *Immunogenetics*. 1991. **33**: 235-242.
- Andersson L, Mikko S.** "Generation of MHC class II diversity by intra- and intergenic recombination". *Immunological Reviews*. 1995. **143**: 5-12.
- Ando A, Kawai J, Maeda M, Tsuji K, Trowsdale J, Inoko H.** "Mapping and nucleotide sequence of a new HLA class II light chain gene, *DQB3*". *Immunogenetics*. 1989. **30**: 243-249.
- Arnaiz-Villena A.** "MHC research: fast forward". *Immunology Today*. 1993. **14**: 3-5.
- Arnason U, Gullberg A, Janke A, Xu X.** "Pattern and timing of evolutionary divergences among hominoids based on analyses of complete mtDNAs". *Journal of Molecular Evolution*. 1996. **43**: 650-661.
- Ausubel LJ, Kwan CK, Sette A, Kuchroo V, Hafler DA.** "Complementary mutations in an antigenic peptide allow for crossreactivity of autoreactive T-cell clones". *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1996. **93**: 15317-15322.
- Ayala FJ, Escalante AA.** "The evolution of human populations: a molecular perspective". *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 1996. **5**: 188-201.

B

- Babbitt BP, Allen PM, Matsueda G, Haber E, Unanue ER.** "Binding of immunogenic peptides to Ia histocompatibility molecules". *Nature*. 1985. **317**: 359-361.
- Bach FH, Amos DB.** "Hu-1: Major histocompatibility locus in man". *Science*. 1967. **156**: 1506-1508.
- Bailey DW, Kohn HL.** "Inherited histocompatibility changes in progeny of irradiated and unirradiated inbred mice". *Genetical Research*. 1965. **6**: 330-340.
- Barnden MJ, Heath WR, Carbone FR.** "Down-modulation of CD8 β -chain in response to an altered peptide ligand enables developing thymocytes to escape negative selection". *Cellular Immunology*. 1997. **175**: 111-119.
- Beck S, Hanson I, Kelly A, Pappin DJ, Trowsdale J.** "A homologue of the *Drosophila* female sterile homeotic (*fsH*) gene in the class II region of the human MHC". *DNA Sequence*. 1992. **2**: 203-210.
- Beck S, Trowsdale J.** "Sequence organisation of the class II region of human MHC". 1999. *Immunological Reviews*. 1999. **167**: 201-210.
- Bell JI, Denney D Jr, Foster L, Belt T, Todd JA, McDevitt HO.** "Allelic variation in the DR subregion of the human major histocompatibility complex". *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1987. **84**: 6234-6238.
- Bergström T, Gyllensten U.** "Evolution of Mhc class II polymorphism: the rise and fall of class II gene function in primates". *Immunological Reviews*. 1995. **143**: 13-31.
- Bergström TF, Erlandsson R, Engkvist H, Josefsson A, Erlich HA, Gyllensten U.** "Phylogenetic history of hominoid DRB loci and alleles inferred from non-coding sequences". *Immunological Reviews*. 1999. **167**: 351-365.
- Bergström TF, Josefsson A, Erlich HA, Gyllensten U.** "Recent origin of *HLA-DRB1* alleles and implication for human evolution". *Nature Genetics*. 1998. **18**: 237-242.
- Bertolino P, Roubardin-Combe C.** "The MHC class II-associated invariant chain: a molecule with multiple roles in MHC class II biosynthesis and antigen presentation to CD4+ T cells". *Critical Reviews in Immunology*. 1996. **16**: 359-379.

- Bevec T, Stoka V, Pungercic G, Dolenc I, Turk V. "Major histocompatibility complex class II-associated p41 invariant chain fragment is a strong inhibitor of lysosomal cathepsin L". *Journal of Experimental Medicine*. 1996. **183**: 1331-1338.
- Bidwell J. "DNA-RFLP analysis and genotyping of HLA-DR and DQ antigens". *Immunology Today*. 1988. **9**: 18-23.
- Bidwell JL, Bidwell EA, Laundry GJ, Klouda PT, Bradley BA. "Allogentypes defined by short DQ α and DQ β cDNA probes correlate with and define splits of HLA-DQ serological specificities". *Molecular Immunology*. 1987. **24**: 513-522.
- Bidwell JL, Jarrold EA. "HLA-DR allogentyping using exon-specific cDNA probes and application of rapid minigel methods". *Molecular Immunology*. 1986. **23**: 1111-1116.
- Bidwell JL, Lu P, Wang Y, Zhou K, Clay TM, Bontrop RE. "DRB, DQA, DQB and DPB nucleotide sequences of *Saguinus oedipus* B95-8". *European Journal of Immunogenetics*. 1994. **21**: 67-77.
- Bjorkman PJ. "MHC restriction in three dimensions: a view of T cell receptor/ligand interactions". *Cell*. 1997. **89**: 167-170.
- Bjorkman PJ, Parham P. "Structure, function, and diversity of class I major histocompatibility complex molecules". *Annual Review of Biochemistry*. 1990. **59**: 253-288.
- Bjorkman PJ, Saper MA, Samraovi B, Bennet WS, Strominger JL, Wiley AC. "Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2". *Nature*. 1987. **329**: 506-512.
- Blanchet O, Bourge JF, Zinszner H, Israël A, Kourilsky P, Dausset J, Degos L, Paul P. "Altered binding of regulatory factors to HLA class I enhancer sequence in human tumor cell lines lacking class I antigen expression". *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1992. **89**: 3488-3492.
- Bodmer JG. "Ia antigens: definition of the HLA-DRw specificities". *British Medical Bulletin*. 1978. **34**: 233-240.
- Bodmer JG, Marsh SG, Albert ED, Bodmer WF, Dupont B, Erlich HA, Mach B, Mayr WR, Parham P, Sasazuki T, et al. "Nomenclature for factors of the HLA system, 1991. WHO Nomenclature Committee for factors of the HLA system". *Tissue Antigens*. 1992. **39**: 161-173.
- Bodmer JG, Marsh SG, Albert ED, Bodmer WF, Dupont B, Erlich HA, Mach B, Mayr WR, Parham P, Sasazuki T, et al. "Nomenclature for factors of the HLA system, 1994". *Human Immunology*. 1994. **41**: 1-20.
- Bodmer WF, Bodmer JG, Coukell A, Cann H, van West B. "Some further data on the joint segregation of HL-A and haptoglobin". *Annals of Human Genetics*. 1971. **35**: 167-169.
- Boehncke WH, Takeshita T, Pendleton CD, Houghten RA, Sadegh-Nasseri S, Racioppi L, Berzofsky JA, Germain RN. "The importance of dominant negative effects of amino acid side chain substitution in peptide-MHC molecule interactions and T cell recognition". *Journal of Immunology*. 1993. **150**: 331-341.
- Böhme J, Andersson M, Andersson G, Moller E, Peterson PA, Rask L. "HLA-DR β genes vary in number between different DR specificities, whereas the number of DQ β genes is constant". *Journal of Immunology*. 1985. **135**: 2149-2155.
- Bontrop RE. "Nonhuman primate Mhc-DQA and -DQB second exon nucleotide sequences: a compilation". *Immunogenetics*. 1994. **39**: 81-92.
- Bontrop RE, Kenter M, Otting N, Jonker M. "Major Histocompatibility Complex polymorphism in humans and chimpanzees". *Journal of Medical Primatology*. 1993. **22**: 50-59.
- Bontrop RE, Otting N, Broos LA, Noort MC, Kenter M, Jonker M. "RFLP analysis of the HLA-, ChLA-, and RhLA-DQ α chain gene regions: conservation of restriction sites during evolution". *Immunogenetics*. 1989. **30**: 432-439.
- Bontrop RE, Otting N, de Groot NG, Doxiadis GGM. "Major histocompatibility complex class II polymorphisms in primates". *Immunological Reviews*. 1999. **167**: 339-350.
- Bontrop RE, Otting N, Slierendregt BL, Lanchbury JS. "Evolution of major histocompatibility complex polymorphisms and T-cell receptor diversity in primates". *Immunological Reviews*. 1995. **143**: 33-62.
- Bouvier M, Wiley DC. "Antigenic peptides containing large PEG loops designed to extend out of the HLA-A2 binding site form stable complexes with class I major histocompatibility complex molecules". *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1996. **93**: 4583-4588.
- Brachet V, Raposo G, Amigorena S, Mellman I. "Ii chain controls the transport of major histocompatibility complex class II molecules to and from lysosomes". *Journal of Cell Biology*. 1997. **137**: 51-65.
- Brändle U, Ono H, Vincek V, Klein D, Golubic M, Grahovac B, Klein J. "Trans-species evolution of Mhc-DRB haplotype polymorphism in primates: organization of DRB genes in the chimpanzee". *Immunogenetics*. 1992. **36**: 39-48.
- Brégégère F. "A directional process of gene conversion is expected to yield dynamic polymorphism associated with stability of alternative alleles in class I histocompatibility antigens gene family". *Biochimie*. 1983. **65**: 229-237.

- Brodsky FM**, Lem L, Bresnahan PA. "Antigen processing and presentation". *Tissue Antigens*. 1996. **47**: 464-471.
- Brostoff SW, Howell MD**. "Immunoregulation of autoimmune disease by vaccination with T cell receptor peptides". *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1991. **636**: 71-78.
- Brown JH**, Jardetzky T, Saper MA, Samraoui B, Bjorkman PJ, Wiley DC. "A hypothetical model of the foreign antigen binding site of class II histocompatibility molecules". *Nature*. 1988. **332**: 845-850.
- Brown JH**, Jardetzky TS, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Strominger JL, Wiley DC. "Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen *HLA-DR1*". *Nature*. 1993. **364**: 33-39.
- Brunsborg U**, Edfors I, Andersson L, Gustafsson K. "Structure and organization of pig MHC class II DRB genes: evidence for genetic exchange between loci". *Immunogenetics*. 1996. **44**: 1-8.
- Burnet FM**. "Self-recognition" in colonial marine forms and flowering plants in relation to the evolution of immunity. *Nature*. 1971. **232**: 230-235.
- Busch R**, Hill CM, Hayball JD, Lamb JR, Rothbard JB. "Effect of natural polymorphism at residue 86 of the *HLA-DRβ* chain on peptide binding". *Journal of Immunology*. 1991. **147**: 1292-1298.
- Buus S**, Sette A, Colon SM, Miles C, Grey HM. "The relation between major histocompatibility complex (MHC) restriction and the capacity of Ia to bind immunogenic peptides". *Science*. 1987. **235**: 1353-1358.

C

- Cammarota G**, Scheirle A, Takacs B, Doran DM, Knorr R, Bannwarth W, Guardiola J, Sinigaglia F. "Identification of a CD4 binding site on the $\beta 2$ domain of *HLA-DR* molecules". *Nature*. 1992. **356**: 799-801.
- Campbell RD**, Trowsdale J. "Map of the human Major Histocompatibility Complex". *Immunology Today*. 1993.
- Campbell RD**, Trowsdale J. "A map of the human major histocompatibility complex". *Immunology Today*. 1997. **18**: 43.
- Castro MJ**, Morales P, Fernández-Soria V, Suárez B, Recio MJ, Alvarez M, Martín-Villa M, Arnaiz-Villena A. "Allelic diversity at the primate *Mhc-G* locus: exon 3 bears stop codons in all *Cercopithecinae* sequences". *Immunogenetics*. 1996. **43**: 327-336.
- Chang CH**, Flavell RA. "Class II transactivator regulates the expression of multiple genes involved in antigen presentation". *Journal of Experimental Medicine*. **181**: 765-767, 1995.
- Chang CH**, Fontes JD, Peterlin M, Flavell RA. "Class II transactivator (CIITA) is sufficient for the inducible expression of major histocompatibility complex class II genes". *Journal of Experimental Medicine*. 1994. **180**: 1367-1374.
- Chapman HA**. "Endosomal proteolysis and MHC class II function". *Current Opinion in Immunology*. 1998. **10**: 93-102.
- Chicz RM**, Urban RG, Lane WS, Gorga JC, Stern LJ, Vignali DA, Strominger JL. "Predominant naturally processed peptides bound to *HLA-DR1* are derived from MHC-related molecules and are heterogeneous in size". *Nature*. 1992. **358**: 764-768.
- Ciechanover A**. "The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway". *Cell*. 1994. **79**: 13-21.
- Coppin HL**, Carmichael P, Lombardi G, L'Faqihi FE, Salter R, Parham P, Lechler RI, de Preval C. "Position 71 in the alpha helix of the DR beta domain is predicted to influence peptide binding and plays a central role in allorecognition". *European Journal of Immunology*. 1993. **23**: 343-349.
- Corell A**, Martín-Villa JM, Morales P, de Juan MD, Varela P, Vicario JL, Martínez-Laso J, Arnaiz-Villena A. "Exon-2 nucleotide sequences, polymorphism and haplotype distribution of a new *HLA-DRB* gene: *HLA-DRBσ*". *Molecular Immunology*. 1991. **45**: 533-543.
- Cresswell P**. "Antigen presentation. Getting peptides into MHC class II molecules". *Current Biology*. 1994. **4**: 541-543.
- Cresswell P**, Avva RR, Davis JE, Lamb CA, Riberdy JM, Roche PA. "Intracellular transport and peptide binding properties of HLA class II glycoproteins". *Seminars in Immunology*. 1990. **2**: 273-280.
- Crisa L**, McMaster MT, Ishii JK, Fisher SJ, Salomon DR. "Identification of a thymic epithelial cell subset sharing expression of the class Ib *HLA-G* molecule with fetal trophoblasts". *Journal of Experimental Medicine*. 1997. **186**: 289-298.
- Crone M**, Simonsen M, Skjodt K, Linnet K, Olsson L. "Mouse monoclonal antibodies to class I and class II antigens of the chicken MHC. Evidence for at least two class I products of the B complex". *Immunogenetics*. 1985. **21**: 181-187.
- Cullen M**, Noble J, Erlich H, Thorpe K, Beck S, Klitz W, Trowsdale J, Carrington M. "Characterization of recombination in the HLA class II region". *American Journal of Human Genetics*. 1997. **60**: 397-407.

Cunningham BA, Berggard I. "Structure, evolution and significance of beta2-microglobulin"...
Transplantation Reviews. 1974. **21**: 3-14.

D

Darden AG, Streilein JW. "Syrian hamsters express two monomorphic class I major histocompatibility complex molecules". *Immunogenetics.* 1984. **20**: 603-622.

Davis MM, Bjorkman PJ. "T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition". *Nature.* 1988. **334**: 395-402.

Del Pozzo G, Ciullo M, Autiero M, Guardiola J. "Control of nucleo-cytoplasmic HLA-DRA mRNA partitioning by interaction of a retention signal with compartmentalized proteins". *Journal of Molecular Biology.* 1994. **240**: 193-204.

Demetz S, Barbey C, Corradin G, Amoroso A, Lanzavecchia A. "The set of naturally processed peptides displayed by DR molecules is tuned by polymorphism of residue 86". *European Journal of Immunology.* 1993. **23**: 425-432.

Deng H, Fosdick L, Sercarz E. "The involvement of antigen processing in determinant selection by class II MHC and its relationship to immunodominance". *APMIS.* 1993. **101**: 655-662.

Denzin LK, Cresswell P. "HLA-DM induces CLIP dissociation from MHC class II α/β dimers and facilitates peptide loading". *Cell.* 1995. **82**: 155-165.

Dieckmann CL, Gandy B. "Preferential recombination between GC clusters in yeast mitochondrial DNA". *EMBO Journal.* 1987. **6**: 4197-4203.

Diehl M, Munz C, Keilholz W, Stevanovic S, Holmes N, Loke YW, Rammensee HG. "Nonclassical HLA-G molecules are classical peptide presenters". *Current Biology.* 1996. **6**: 305-314.

Doherty PC, Zinkernagel RM. "A biological role for the major histocompatibility antigens". *Lancet.* 1975. **1**: 1406-1409.

Doolittle RF. "More homologies among the vertebrate plasma proteins". *Bioscience Reports.* 1985. **5**: 877-884.

Drew PD, Franzoso G, Carlson LM, Biddison WE, Siebenlist U, Ozato K. "Interferon regulatory factor-2 physically interacts with NF-kappa B in vitro and inhibits NF-kappa B induction of major histocompatibility class I and β 2-microglobulin gene expression in transfected human neuroblastoma cells". *Journal of Neuroimmunology.* 1995. **63**: 157-162.

Du Pasquier L, Schwager J, Flajnik MF. "The immune system of Xenopus". *Annual Review of Immunology.* 1989. **7**: 251-275.

Dupont B. "Nomenclature for factors of the HLA system, 1987. Decisions of the Nomenclature Committee on Leukocyte Antigens, which met in New York on November 21-23, 1987". *Human Immunology.* 1989. **26**: 3-14.

E

Ellegren H, Mikko S, Wallin K, Andersson L. "Limited polymorphism at Major Histocompatibility Complex (MHC) loci in the swedish moose *A. alces*". *Molecular Ecology.* 1996. **5**: 3-9.

Ellis S. "HLA G: at the interface". *American Journal of Reproductive Immunology (Copenhagen).* 1990. **23**: 84-86.

Erlich HA, Bergström TF, Stoneking M, Gyllensten U. "HLA sequence polymorphism and the origin of humans" *Science.* 1996. **274**: 1552-1554.

F

Falk K, Rotzschke O, Stevanovic S, Jung G, Rammensee HG. "Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules". *Nature.* 1991. **351**: 290-296.

Fan WM, Kasahara M, Gutknecht J, Klein D, Mayer WE, Jonker M, Klein J. "Shared class II MHC polymorphisms between humans and chimpanzees". *Human Immunology.* 1989. **26**: 107-121.

Felsenstein J. "PHYLIP (Phylogenetic Inference Package 3.5c)". University of Washington. 1993.

Felsenstein J. "Phylogenies from molecular sequences: inference and reliability". *Annual Review of Genetics.* 1988. **22**: 521-565.

Feng MH, Shen YC, Chou DL, Lai MZ, Liaw YC. "Selective contact during TCR recognition". *International Immunology.* 1996. **8**: 45-55.

- Ferrando P**, San Román C, Rodríguez de Córdoba S, Arnaiz-Villena A. "Partial trisomy 6P: 46 XX, - 10, der (10), T (6; 10) (p22; q26) pat and HLA localization". *Journal of Medical Genetics*. 1981. **18**: 231-234.
- Figueroa F**, Gunther E, Klein J. "MHC polymorphism pre-dating speciation". *Nature*. 1988. **335**: 265-267.
- Figueroa F**, O'hUigin C, Inoki H, Klein J. "Primate *DRB6* pseudogenes: clue to the evolutionary origin of the *HLA-DR2* haplotype". *Immunogenetics*. 1991. **34**: 324-337.
- Figueroa F**, O'hUigin C, Tichy H, Klein J. "The origin of the primate *Mhc-DRB* genes and allelic lineages as deduced from the study of prosimians". *Journal of Immunology*. 1994. **152**: 4455-4465.
- Fineschi B**, Sakaguchi K, Appella E, Miller J. "The proteolytic environment involved in MHC class II-restricted antigen presentation can be modulated by the p41 form of invariant chain". *Journal of Immunology*. 1996. **157**: 3211-3215.
- Flajnik MF**. "The immune system of ectothermic vertebrates". *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 1996. **54**: 145-150.
- Flajnik MF**, Canel C, Kramer J, Kasahara M. "Which came first, MHC class I or class II?". *Immunogenetics*. 1991. **33**: 295-300.
- Fleury S**, Thibodeau J, Croteau G, Labrecque N, Aronson HE, Cantin C, Long EO, Sékaly RP. "*HLA-DR* polymorphism affects the interaction with *CD4*". *Journal of Experimental Medicine*. 1995. **182**: 733-741.
- Fomsgaard A**, Johnson PR, Nielsen C, Novembre FJ, Hansen J, Goldstein S, Hirsch VM. "Receptor function of *CD4* structures from african green monkey and pig-tail macaque for simian immunodeficiency virus, SIVsm, and human immunodeficiency virus type-1". *Viral Immunology*. 1995. **8**: 121-133.
- Fomsgaard A**, Muller-Trutwin MC, Diop O, Hansen J, Mathiot C, Corbet S, Barre-Sinoussi F, Allan JS. "Relation between phylogeny of African green monkey *CD4* genes and their respective simian immunodeficiency virus genes". *Journal of Medical Primatology*. 1997. **26**: 120-128.
- Fremont DH**, Hendrickson WA, Marrack P, Kappler J. "Structures of an MHC class II molecule with covalently bound single peptides". *Science*. 1996. **272**: 1001-1004.
- Fremont DH**, Matsumura M, Stura EA, Peterson PA, Wilson IA. "Crystal structures of two viral peptides in complex with murine MHC class I H-2Kb". *Science*. 1992. **257**: 919-927.
- Fremont DH**, Stura EA, Matsumura M, Peterson PA, Wilson IA. "Crystal structure of an H-2Kb-ovalbumin peptide complex reveals the interplay of primary and secondary anchor positions in the major histocompatibility complex binding groove". *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1995. **92**: 2479-2483.
- Früh K**, Gossen M, Wang K, Bujard H, Peterson PA, Yang Y. "Displacement of housekeeping proteasome subunits by MHC-encoded LMPs: a newly discovered mechanism for modulating the multicatalytic proteinase complex". *EMBO Journal*. 1994. **13**: 3236-3244.

G

- Garboczi DN**, Ghosh P, Utz U, Fan QR, Biddison WE, Wiley DC. "Structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide and *HLA-A2*". *Nature*. 1996. **384**: 109-110.
- Garrett TP**, Saper MA, Bjorkman PJ, Strominger JL, Wiley DC. "Specificity pockets for the side chains of peptide antigens in *HLA-Aw68*". *Nature*. 1989. **342**: 692-696.
- Gaur LK**, Nepom GT. "Ancestral major histocompatibility complex *DRB* genes beget conserved patterns of localized polymorphisms". *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1996. **93**: 5380-5383.
- Gaur LK**, Nepom GT, Snyder KE, Anderson J, Pandarpurkar M, Yadock W, Heise ER. "*MHC-DRB* allelic sequences incorporate distinct intragenic trans-specific segments" *Tissue Antigens*. 1997. **49**: 342-355.
- Geluk A**, Elferink DG, Slierendregt BL, van Meijgaarden KE, de Vries RR, Ottenhoff TH, Bontrop RE. "Evolutionary conservation of major histocompatibility complex-DR/peptide/T cell interactions in primates". *Journal of Experimental Medicine*. 1993. **177**: 979-987.
- Geraghty DE**, Koller BH, Hansen JA, Orr HT. "The *HLA* class I gene family includes at least six genes and twelve pseudogenes and gene fragments". *Journal of Immunology*. 1992. **149**: 1934-1946.
- Geraghty DE**, Koller BH, Orr HT. "A human major histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment". *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1987. **84**: 9145-9149.
- Geraghty DE**, Koller BH, Pei J, Hansen JA. "Examination of four *HLA* class I pseudogenes. Common events in the evolution of *HLA* genes and pseudogenes". *Journal of Immunology*. 1992. **149**: 1947-1956.
- Germain RN**. "Binding domain regulation of MHC class II molecule assembly, trafficking, fate, and function". *Seminars in Immunology*. 1995. **7**: 361-372.
- Germain RN**, Margulies DH. "The biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation". *Annual Review of Immunology*. 1993. **11**: 403-450.

- Germain RN, Rinker AG Jr.** "Peptide binding inhibits protein aggregation of invariant-chain free class II dimers and promotes surface expression of occupied molecules". *Nature*. 1993. **363**: 725-728.
- Ghosh P, Amaya M, Mellins E, Wiley DC.** "The structure of an intermediate in class II MHC maturation: CLIP bound to *HLA-DR3*". *Nature*. 1995. **378**: 457-462.
- Glynnne R, Powis SH, Beck S, Kelly A, Kerr LA, Trowsdale J.** "A proteasome-related gene between the two ABC transporter loci in the class II region of the human MHC". *Nature*. 1991. **353**: 357-360.
- Goldberg AL, Rock KL.** "Proteolysis, proteasomes and antigen presentation". *Nature*. 1992. **357**: 375-379.
- Góngora R, Figueroa F, Klein J.** "The *HLA-DRB9* gene and the origin of *HLA-DR* haplotypes". *Human Immunology*. 1996. **51**: 23-31.
- Góngora R, Figueroa F, O'hUigin C, Klein J.** "*HLA-DRB9*: possible remnant of an ancient functional DRB subregion". *Scandinavian Journal of Immunology*. 1997. **45**: 504-510.
- Goodman M, Bailey WJ, Hayasaka K, Stanhope MJ, Slightom J, Czelusniak J.** "Molecular evidence on primate phylogeny from DNA sequences". *American Journal of Physical Anthropology*. 1994. **94**: 3-24.
- Gorski J, Irle C, Mickelson EM, Sheehy MJ, Termijtelen A, Ucla C, Mach B.** "Correlation of structure with T cell responses of the three members of the *HLA-DRw52* allelic series". *Journal of Experimental Medicine*. 1989. **170**: 1027-1032.
- Gorski J, Mach B.** "Polymorphism of human Ia antigens: gene conversion between two DR beta loci results in a new *HLA-D/DR* specificity". *Nature*. 1986. **322**: 67-70.
- Grahovac B, Mayer WE, Vincek V, Figueroa F, O'hUigin C, Tichy H, Klein J.** "Major histocompatibility complex *DRB* genes of a New-World monkey, the cottontop tamarin (*Saguinus oedipus*)". *Molecular Biology and Evolution*. 1992. **9**: 403-416.
- Griffith IJ, Nabavi N, Ghogawala Z, Chase CG, Rodriguez M, McKean DJ, Glimcher LH.** "Structural mutation affecting intracellular transport and cell surface expression of murine class II molecules" *Journal of Experimental Medicine*. 1988. **167**: 541-555.
- Groettrup M, Kraft R, Kostka S, Ständer S, Stohwasser R, Kloetzl PM.** "A third interferon-gamma-induced subunit exchange in the 20S proteasome". *European Journal of Immunology*. 1996. **26**: 863-869.
- Gruneberg U, van Ham SM, Malcherek G, Broker I, Melms A, Trowsdale J.** "The structure and function of the novel MHC class II molecule, *HLA-DM*". *Biochemical Society Transactions*. 1997. **25**: 208S.
- Guillaudeux T, Rodriguez AM, Girr M, Mallet V, Ellis SA, Sargent IL, Fauchet R, Alsat E, le Bouteiller P.** "Methylation status and transcriptional expression of the MHC class I loci in human trophoblast cells from term placenta". *Journal of Immunology*. 1995. **154**: 3283-3299.
- Guo HC, Madden DR, Silver ML, Jardetzky TS, Gorga JC, Strominger JL, Wiley DC.** "Comparison of the P2 specificity pocket in three human histocompatibility antigens: *HLA-A*6801*, *HLA-A*0201*, and *HLA-B*2705*". *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1993. **90**: 8053-8057.
- Gyllensten U, Bergström T, Josefsson A, Sundvall M, Ehrlich HA.** "Rapid allelic diversification and intensified selection at antigen recognition sites of the Mhc class II DPB1 locus during hominoid evolution". *Tissue Antigens*. 1996. **47**: 212-221.
- Gyllensten U, Bergström T, Josefsson A, Sundvall M, Savage A, Bluner ES, Giraldo LH, Soto LH, Watkins DI.** "The cotton-top tamarin revisited: Mhc class I polymorphism of wild tamarins, and polymorphism and allelic diversity of the class II DQA1, DQB1 and DRB loci". *Immunogenetics*. 1994. **40**: 167-176.
- Gyllensten U, Sundvall M, Erlich HA.** "Allelic diversity is generated by intraexon sequence exchange at the DRB1 locus of primates". *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1991. **88**: 3686-3690.
- Gyllensten U, Sundvall M, Ezcurra I, Erlich HA.** "Genetic diversity at class II DRB loci of the primate MHC". *Journal of Immunology*. 1991. **146**: 4368-4376.
- Gyllensten UB, Erlich HA.** "MHC class II haplotypes and linkage disequilibrium in primates". *Human Immunology*. 1993. **36**: 1-10.

H

- Haas DA, Boss JM, Strominger JL, Spies T.** "A highly diverged beta 1 exon in the DR region of the human MHC: sequence and evolutionary implications". *Immunogenetics*. 1987. **25**: 15-20.
- Hammer J, Takacs B, Sinigaglia F.** "Identification of a motif for *HLA-DR1* binding peptides using M13 display libraries". *Journal of Experimental Medicine*. 1992. **176**: 1007-1013.
- Hammer J, Valsasini P, Tolba K, Bolin D, Higelin J, Takacs B.** "Sinigaglia F. Promiscuous and allele-specific anchors in *HLA-DR*-binding peptides". *Cell*. 1993. **74**: 197-203.
- Harrelson AL, Goodman CS.** "Growth cone guidance in insects: fasciclin II is a member of the immunoglobulin superfamily". *Science*. 1988. **242**: 700-708.

- Hasegawa M, Kishino H, Yano T.** "Man's place in *Hominoidea* as inferred from molecular clocks of DNA". *Journal of Molecular Evolution*. 1987. **26**: 132-147.
- Hasegawa SL, Boss JM.** "Two B cell factors bind the *HLA-DRA* X box region and recognize different subsets of HLA class II promoters". *Nucleic Acids Research*. 1991. **19**: 6269-6276.
- Hedrick PW.** "Purging inbreeding depression and the probability of extinction: full-sib mating". *Heredity*. 1994. **73**: 363-372.
- Heemels MT, Ploegh H.** "Generation, translocation, and presentation of MHC class I-restricted peptides". *Annual Review of Biochemistry*. 1995. **64**: 463-491.
- Heise ER, Cook DJ, Schepart BS, Manning CH, McMahan MR, Chedid M, Keever CA.** "The major histocompatibility complex of primates". *Genetica*. 1987. **73**: 53-68.
- Higgins DG, Sharp PM.** "CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer". *Gene*. 1988. **73**: 237-244.
- Higgins DG, Sharp, PM.** "Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer". *Computer Applications in the Biosciences*. 1989. **5**: 151-153.
- Hildemann WH, Johnson IS, Jokiel PL.** "Immunocompetence in the lowest metazoan phylum: transplantation immunity in sponges". *Science*. 1979. **204**: 420-422.
- Hill AV, Allsopp CE, Kwiatkowski D, Anstey NM, Twumasi P, Rowe PA, Bennett S, Brewster D, McMichael AJ, Greenwood BM.** "Common west African HLA antigens are associated with protection from severe malaria". *Nature*. 1991. **352**: 595-600.
- Hill AVS.** "HLA associations with malaria in Africa: some implications for MHC evolution". *Molecular Evolution of the Major Histocompatibility Complex*. Klein ed. Springer Berlin. Heidelberg. NATO ASI Series; Vol H 59. 1991.
- Houlihan JM, Biro PA, Harper HM, Jenkinson HJ, Holmes CH.** "The human amnion is a site of MHC class Ib expression: evidence for the expression of *HLA-E* and *HLA-G*". *Journal of Immunology*. 1995. **154**: 5665-5674.
- Huang B, Yachou A, Fleury S, Hendrickson WA, Sekaly RP.** "Analysis of the contact sites on the CD4 molecule with class II MHC molecule:co-ligand versus co-receptor function". *Journal of Immunology*. 1997. **158**: 216-225
- Hughes AL, Nei M.** "Evolutionary relationships of the classes of Major Histocompatibility Complex genes". *Immunogenetics*. 1993. **37**: 337-346.
- Hughes AL, Nei M.** "Nucleotide substitutions at major histocompatibility complex class II loci: Evidence for overdominant selection". *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1989. **86**: 958-962.
- Hughes AL, Nei M.** "Pattern of nucleotide substitution at major histocompatibility complex class I loci reveals overdominant selection". *Nature*. 1988. **335**: 167-170.
- Hughes AL, Yeager M, Carrington M.** "Peptide binding function and the paradox of HLA disease associations". *Immunology and Cell Biology*. 1996. **74**: 444-448.
- Hughes DA, Pinder AC, Piper Z, Johnson IT, Lund EK.** "Fish oil supplementation inhibits the expression of major histocompatibility complex class II molecules and adhesion molecules on human monocytes". *American Journal of Clinical Nutrition*. 1996. **63**: 267-272.
- Humphreys T, Reinherz EL.** "Invertebrate immune recognition, natural immunity and the evolution of positive selection" *Immunology Today*. 1994. **15**: 316-320.
- Hunt JS, Fishback JL, Andrews GK, Wood GW.** "Expression of class I HLA genes by trophoblast cells. Analysis by in situ hybridization". *Journal of Immunology*. 1988. **140**: 1293-1299.
- Hunt JS, Fishback JL, Chumbley G, Loke YW.** "Identification of class I MHC mRNA in human first trimester trophoblast cells by in situ hybridization". *Journal of Immunology*. 1990. **144**: 4420-4425.

I

- Israël A, Kimura A, Kieran M, Yano O, Kanellopoulos J, le Bail O, Kourilsky P.** "A common positive trans-acting factor binds to enhancer sequences in the promoters of mouse H-2 and β 2-microglobulin genes". *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1987. **84**: 2653-2657.

J

- Jabrane-Ferrat N, Fontes JD, Boss JM, Peterlin BM.** "Complex architecture of major histocompatibility complex class II promoters: reiterated motifs and conserved protein-protein interactions". *Molecular and Cellular Biology*. 1996. **16**: 4683-4890.
- Janeway CA Jr.** "The co-receptor function of CD4". *Seminars in Immunology*. 1991. **3**: 153-160.

- Janeway CA Jr.** "The role of CD4 in T-cell activation: accessory molecule or co-receptor?". *Immunology Today*. 1989. **10**: 234-238.
- Janeway CA Jr, Bottomly K.** "Responses of T cells to ligands for the T-cell receptors". *Seminars in Immunol.* 1996. **8**: 108-115.
- Jardetzky TS, Brown JH, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Chi Y, Stauffer C, Strominger JL, Wiley DC.** "Three-dimensional structure of a human class II histocompatibility molecule complexed with superantigen". *Nature*. 1994. **368**: 711-718.
- Jardetzky TS, Gorga JC, Busch R, Rothbard J, Strominger JL, Wiley DC.** "Peptide binding to HLA-DR1: a peptide with most residues substituted to alanine retains MHC binding". *EMBO Journal*. 1990. **9**: 1797-1803.
- Jaulin C, Perrin A, Abastado JP, Dumas B, Papamatheakis J, Kourilsky P.** "Polymorphism in mouse and human class I H-2 and HLA genes is not the result of random independent point mutations". *Immunogenetics*. 1985. **22**: 453-470.
- Johansen BH, Jensen T, Thorpe CJ, Vartdal F, Thorsby E, Sollid LM.** "Both α and β chain polymorphisms determine the specificity of the disease-associated *HLA-DQ2* molecules, with β chain residues being most influential". *Immunogenetics*. 1996. **45**: 142-150.
- Jonsson AK, Andersson L, Rask L.** "Selection for polymorphism in the Antigen Recognition Site of Major Histocompatibility Complex class II molecules". *Scandinavian Journal of Immunology*. 1989. **30**: 409-417.
- Jonsson AK, Hyldig-Nielsen JJ, Serenius B, Larhammar D, Andersson G, Jorgensen F, Peterson PA, Rask L.** "Class II genes of the human major histocompatibility complex. Comparisons of the DQ and DX α and β genes". *Journal of Biological Chemistry*. 1987. **262**: 8767-8777.
- Jukes TH, Cantor CR.** "Evolution of protein molecules". *Mammalian protein metabolism*. Munro HN ed. Academic Press. San Diego. 1969. 21-132.

K

- Kaakinen A, Hirschberg H.** "Stimulation of human lymphocytes by allogenic macrophages *in vitro*". *Tissue Antigens*. 1977. **10**: 306-314.
- Karlsson L, Surh CD, Sprent J, Peterson PA.** "A novel class II MHC molecule with unusual tissue distribution". *Nature*. 1991. **351**: 485-488.
- Kasahara M.** "New insights into the genomic organization and origin of the major histocompatibility complex: role of chromosomal (genome) duplication in the emergence of the adaptative immune system". *Hereditas*. 1997. **127**: 59-65.
- Kasahara M.** "The chromosomal duplication model of the major histocompatibility complex". *Immunological Reviews*. 1999. **167**: 17-32.
- Kasahara M.** "What do the paralogous regions in the genome tell us about the origin of the adaptative immune system?" *Immunological Reviews*. 1998. **166**: 159-175.
- Kasahara M, Klein D, Fan W, Gutknecht J.** "Evolution of the class II Major Histocompatibility Complex alleles in higher primates". *Immunological Reviews*. 1990. **113**: 65-82.
- Kasahara M, Klein D, Vincek V, Sarapata DE, Klein J.** "Comparative anatomy of the primate Major Histocompatibility Complex *DR* subregion: evidence for combinations of DRB genes conserved across species". *Genomics*. 1992. **14**: 340-349.
- Kasahara M, McKinney EC, Flajnik MF, Ishibashi T.** "The evolutionary origin of the major histocompatibility complex: polymorphism of class II α chain genes in the cartilaginous fish". *European Journal of Immunology*. 1993. **23**: 2160-2165.
- Kasahara M, Nakaya J, Satta Y, Takahata N.** "Chromosomal duplication and the emergence of the adaptative immune system". *Trends in Genetics*. 1997. **13**: 90-92.
- Kasahara M, Vázquez M, Sato K, McKinney EC, Flajnik MF.** "Evolution of the major histocompatibility complex: isolation of class II A cDNA clones from the cartilaginous fish". *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1992. **89**: 6688-6692.
- Katz JF, Stebbins C, Appella E, Sant AJ.** "Invariant chain and DM edit self-Peptide presentation by major histocompatibility complex (MHC) class II molecules". *Journal of Experimental Medicine*. 1996. **184**: 1747-1753.
- Kaufman J, Skjoedt K, Salomonsen J.** "The MHC molecules of nonmammalian vertebrates". *Immunological Reviews*. 1990. **113**: 83-117.
- Kaufman JF, Auffray C, Korman AJ, Shackelford DA, Strominger J.** "The class II molecules of the human and murine major histocompatibility complex". *Cell*. 1984. **36**: 1-13.

- Kawai J, Ando A, Sato T, Nakatsuji T, Tsuji K, Inoko H. "Analysis of gene structure and antigen determinants of the DR2 antigens using DR gene transfer into mouse L cells". *Journal of Immunology*. 1989. **142**: 312-317.
- Keegan AD, Paul WE. "Multichain immune recognition receptors: similarities in structure and signaling pathways". *Immunology Today*. 1992. **13**: 63-68.
- Kelly AP, Monaco JJ, Cho SG, Trowsdale J. "A new human HLA class II-related locus, DM". *Nature*. 1991. **353**: 571-573.
- Kenter M, Otting N, Anholts J, Jonker M, Schipper R, Bontrop RE. "Mhc-DRB diversity of the chimpanzee (*Pan troglodytes*)". *Immunogenetics*. 1992. **37**: 1-11.
- Kimura M. "A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences". *Journal of Molecular Evolution*. 1980. **16**: 111-120.
- Kirszenbaum M, Moreau P, Gluckman E, Dausset J, Carosella E. "An alternatively spliced form of HLA-G mRNA in human trophoblasts and evidence for the presence of HLA-G transcript in adult lymphocytes". *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1994. **91**: 4209-4213.
- Klein D, Vincek V, Kasahara M, Schonbach C, O'Uigin C, Klein J. "Gorilla major histocompatibility complex-DRB pseudogene orthologous to HLA-DRBVIII". *Human Immunology*. 1991. **32**: 211-220.
- Klein J. "Evolution and function of the major histocompatibility system: facts and speculations. The major histocompatibility system in man and animals". Götze D ed. Springer-Verlag. New York. 1977. 339-378.
- Klein J. "Natural History of the Major Histocompatibility complex". Wiley & Sons. New York. 1986.
- Klein J. "Origin of major histocompatibility complex polymorphism: the trans-species hypothesis". *Human Immunology*. 1987. **19**: 155-162.
- Klein J. "The major histocompatibility complex". Klein J ed. Blackwell Scientific Publications. Massachusetts. 1990. 161-187.
- Klein J, Bontrop RE, Dawkins RL, Erlich HA, Gyllensten UB, Heise ER, Jones PP, Parham P, Wakeland EK, Watkins DI. "Nomenclature for the major histocompatibility complexes of different species: a proposal". *Immunogenetics*. 1990. **31**: 217-219.
- Klein J, Figueroa F. "Evolution of the major histocompatibility complex" *Critical Reviews in Immunology*. 1986. **6**: 295-386.
- Klein J, Nagy ZA. "Trouble in the J-land". *Nature*. 1982. **300**: 12-13.
- Klein J, O'Uigin C. "Class II Mhc motifs in an evolutionary perspective". *Immunological Reviews*. 1995. **143**: 89-111.
- Klein J, O'Uigin C. "The conundrum of nonclassical major histocompatibility complex genes". *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*. 1994. **91**: 6251-6252.
- Klein J, O'Uigin C, Figueroa F, Mayer W, Klein D. "Different modes of Mhc evolution in primates". *Molecular Biology and Evolution*. 1993. **10**: 48-59.
- Klein J, Satta Y, O'Uigin C. "The molecular descent of the Major Histocompatibility Complex". *Annual Review of Immunology*. 1993. **11**: 269-295.
- Knapp LA, Cadavid LF, Eberle ME, Knechtle SJ, Bontrop RE, Watkins DI. "Identification of new Mamu-DRB alleles using DGGE and direct sequencing". *Immunogenetics*. 1997. **45**: 171-179.
- Kötter BH, Geraghty DE, Shimizu Y, de Mars R, Orr HT. "HLA-E. A novel HLA class I gene expressed in resting T lymphocytes". *Journal of Immunology*. 1988. **141**: 897-904.
- König R, Huang LY, Germain RN. "MHC class II interaction with CD4 mediated by a region analogous to the MHC class I binding site for CD8". *Nature*. 1992. **356**: 796-798.
- Koopmann JO, Hammerling GJ, Momburg F. "Generation, intracellular transport and loading of peptides associated with MHC class I molecules". *Current Opinion in Immunology*. 1997. **9**: 80-88.
- Korman AJ, Boss JM, Spies T, Sorrentino R, Okada K, Strominger JL. "Genetic complexity and expression of human class II histocompatibility antigens". *Immunological Reviews*. 1985. **85**: 45-86.
- Kovacsovic-Bankowski M, Rock KL. "A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules". *Science*. 1995. **267**: 243-246.
- Kovats S, Main EK, Librach C, Stubblebine M, Fisher SJ, de Mars R. "A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts". *Science*. 1990. **248**: 220-223.
- Kuchroo VK, Greer JM, Kaul D, Ishioka G, Franco A, Sette A, Sobel RA, Lees MB. "A single TCR antagonist peptide inhibits experimental allergic encephalomyelitis mediated by a diverse T cell repertoire". *Journal of Immunology*. 1994. **153**: 3326-3336.
- Kupfermann H, Mayer WE, O'Uigin C, Klein D, Klein J. "Shared polymorphism between gorilla and human Major Histocompatibility Complex DRB loci". *Human Immunology*. 1992. **34**: 267-278.

L

Lamm LU, Friedrich U, Petersen CB, Jorgensen J, Nielsen J, Therkelsen AJ, Kissmeyer-Nielsen F. "Assignment of the major histocompatibility complex to chromosome No. 6 in a family with a pericentric inversion". *Human Heredity*. 1974. **24**: 2732-84.

Larhammar D, Serenius B, Rask L, Peterson PA. "Characterization of an *HLA DRβ* pseudogene". *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1985. **82**: 1475-1479

Latron F, Pazmany L, Morrison J, Moots R, Saper MA, McMichael A, Strominger JL. "A critical role for conserved residues in the cleft of HLA-A2 in presentation of a nonapeptide to T cells". *Science*. 1992. **257**: 964-967.

Lawlor DA, Ward FE, Ennis PD, Jackson AP, Parham P. "HLA-A and B polymorphisms predate the divergence of humans and chimpanzees". *Nature*. 1988. **335**: 268-271.

Lawlor DA, Zemmour J, Ennis PD, Parham P. "Evolution of class-I MHC genes and proteins: from natural selection to thymic selection". *Annual Review of Immunology*. 1990. **8**: 23-63.

Le Bouteiller P. "HLA class I chromosomal region, genes, and products: facts and questions". *Critical Reviews in Immunology*. 1994. **14**: 89-129.

Li S, Gao J, Satoh T, Friedman TM, Edling AE, Koch U, Choksi S, Han X, Korngold R, Huang Z. "A computer screening approach to immunoglobulin superfamily structures and interactions: discovery of small non-peptide CD4 inhibitors as novel immunotherapeutics". *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1997. **94**: 73-78.

Li WH, Ellsworth DL, Krushkall J, Chang, BHJ, Emmett DH. "Rates of nucleotide substitution in primates and rodents and the generation-time effect hypothesis". *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 1996. **5**: 182-187.

Liang MN, Lee C, Xia Y, McConnell HM. "Molecular modeling and design of invariant chain peptides with altered dissociation kinetics from class II MHC". *Biochemistry*. 1996. **35**: 14734-14742.

Liljedahl M, Kuwana T, Fung-Leung WP, Jackson MR, Peterson PA, Karlsson L. "*HLA-DO* is a lysosomal resident which requires association with *HLA-DM* for efficient intracellular transport". *EMBO Journal*. 1996. **15**: 4817-4824.

Llano M, Lee N, Navarro F, Garcia P, Albar JP, Geraghty DE, Lopez-Botet M. "HLA-E-bound peptides influence recognition by inhibitory and triggering CD94/NKG2 receptors: preferential response to an HLA-G-derived nonamer". *European Journal of Immunology*. 1998. **28**: 2854-2863.

Louis P, Eliaou JF, Kerlan-Candon S, Pinet C, Vincent R, Clot J. "Polymorphism in the regulatory region of *HLA-DRB* genes correlating with haplotype evolution". *Immunogenetics*. 1993. **38**: 21-26.

Lundberg AS, McDevitt HO. "Evolution of major histocompatibility complex class II allelic diversity: direct descent in mice and humans". *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1992. **89**: 6545-6549.

M

Madden DR. "The three-dimensional structure of peptide-MHC complexes". *Annual Review of Immunology*. 1995. **13**: 587-622.

Madden DR, Garboczi DN, Wiley DC. "The antigenic identity of peptide-MHC complexes: a comparison of the conformations of five viral peptides presented by *HLA-A2*". *Cell*. 1993. **75**: 693-708.

Madden DR, Gorga JC, Strominger JL, Wiley DC. "The structure of *HLA-B27* reveals nonamer self-peptides bound in an extended conformation". *Nature*. 1991. **353**: 321-325.

Magee CC, Sayegh MH. "Peptide-mediated immunosuppression". *Current Opinion in Immunology*. 1997. **9**: 669-675.

Maguire JE, Frels WI, Richardson JC, Weissman JD, Singer DS. "*In vivo* function of regulatory DNA sequence elements of a major histocompatibility complex class I gene". *Molecular and Cellular Biology*. 1992. **12**: 3078-3086.

Malissen M, Malissen B, Jordan BR. "Exon/intron organization and complete nucleotide sequence of an HLA gene". *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1982. **79**: 893-897.

Margulies DH. "Interactions of TCRs with MHC-peptide complexes: a quantitative basis for mechanistic models". *Current Opinion in Immunology*. 1997. **9**: 390-395.

Markow T, Hedrick PW, Zuerlein K, Danilovs J, Martin J, Vyvial T, Armstrong C. "HLA polymorphism in the Havasupai: evidence for balancing selection". *American Journal of Human Genetics*. 1993. **53**: 943-952.

Marsh SG. "Nomenclature for factors of the HLA system". *Tissue Antigens*. 1997. **50**: 207.

Martin RD. "Primate origins: plugging the gaps". *Nature*. 1993. **363**: 223-234.

- Matsushima GK, Itoh-Lindstrom Y, Ting JP.** "Activation of the *HLA-DRA* gene in primary human T lymphocytes: novel usage of TATA and the X and Y promoter elements". *Molecular and Cellular Biology*. 1992. **12**: 5610-5619.
- Mayer WE, Jonker M, Klein D, Ivanyi P, van Seventer G, Klein J.** "Nucleotide sequences of chimpanzee MHC class I alleles: evidence for trans-species mode of evolution". *EMBO Journal*. 1988. **7**: 2765-2774.
- Mayer WE, O'Uigin C, Zaleska-Rutczynska Z, Klein J.** "Trans-species origin of *Mhc-DRB* polymorphism in the chimpanzee". *Immunogenetics*. 1992. **37**: 12-23.
- McAdam SN, Boyson JE, Liu X, Gauber TL, Hughes AL, Bontrop RE, Watkins DI.** "Chimpanzee MHC class I A locus alleles are related to only one of the six families of human A locus alleles". *Journal of Immunology*. 1995. **154**: 6421-6429.
- McCumber LJ, Clem LW.** "Recognition of viruses and xenogeneic proteins by the blue crab, *Callinectes sapidus* L. Clearance and organ concentration". *Developmental and Comparative Immunology*. 1977. **1**: 5-14.
- McDevitt H.** "Evolution of MHC class II allelic diversity". *Immunological Reviews*. 1995. **143**: 113-122.
- Melnick J, Argon Y.** "Molecular chaperones and the biosynthesis of antigen receptors". *Immunology Today*. 1995. **16**: 243-250.
- Mengle-Gaw L, McDevitt HO.** "Genetics and expression of mouse Ia antigens". *Annual Review of Immunology*. 1985. **3**: 367-396.
- Meunier HF, Carson S, Bodmer WF, Trowsdale J.** "An isolated $\beta 1$ exon next to the *DR α* gene in the *HLA-D* region". *Immunogenetics*. 1986. **23**: 172-180.
- Miceli MC, Parnes JR.** "Role of CD4 and CD8 in T cell activation and differentiation". *Advances in Immunology*. 1993. **53**: 59-122.
- Mignot E, Tafti M, Dement WC, Gruner FC.** "Narcolepsy and immunity". *Advances in Neuroimmunology*. 1995. **5**: 23-27.
- Mnuková-Fajdelová M, Satta Y, O'Uigin C, Mayer WE, Figueroa F, Klein J.** "Alu elements of the primate major histocompatibility complex". *Mammalian Genome*. 1994. **5**: 405-415.
- Momburg F, Fuchs S, Drexler J, Busch R, Post M, Hammerling GJ, Adorini L.** "Epitope-specific enhancement of antigen presentation by invariant chain". *Journal of Experimental Medicine*. 1993. **178**: 1453-1458.
- Monaco JJ.** "A molecular model of MHC class-I-restricted antigen processing". *Immunology Today*. 1992. **13**: 173-179.
- Monaco JJ, McDevitt HO.** "Identification of a fourth class of proteins linked to the murine major histocompatibility complex". *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1982. **79**: 3001-3005.
- Morales P, Corell A, Martinez-Laso J, Martin-Villa JM, Varela P, Paz-Artal E, Allende LM, Arnaiz-Villena A.** "Three new *HLA-G* alleles and their linkage disequilibria with *HLA-A*". *Immunogenetics*. 1993. **38**: 323-331.
- Moreno CS, Emery P, West JE, Durand B, Reith W, Mach B, Boss JM.** "Purified X2 binding protein (X2BP) cooperatively binds the class II MHC X box region in the presence of purified RFX, the X box factor deficient in the bare lymphocyte syndrome". *Journal of Immunology*. 1995. **155**: 4313-4321.
- Morris P, Shaman J, Attaya M, Amaya M, Goodman S, Bergman C, Monaco JJ, Mellins E.** "An essential role for *HLA-DM* in antigen presentation by class II major histocompatibility molecules". *Nature*. 1994. **368**: 551-554.
- Munz C, Holmes N, King A, Loke YW, Colonna M, Schild H, Rammensee HG.** "Human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G molecules inhibit NKAT3 expressing natural killer cells". *Journal of Experimental Medicine*. 1997. **185**: 385-391.
- Murayama Y, Amano A, Mukai R, Shibata H, Matsunaga S, Takahashi H, Yoshikawa Y, Hayami M, Noguchi A.** "CD4 and CD8 expressions in African green monkey helper T lymphocytes: implication for resistance to SIV infection". *International Immunology*. 1997. **9**: 843-851.

N

- Neeffes JJ, Stollorz V, Peters PJ, Geuze HJ, Ploegh HL.** "The biosynthetic pathway of MHC class II but not class I molecules intersects the endocytic route". *Cell*. 1990. **61**: 171-183.
- Neeffes JJ, Ploegh HL.** "Intracellular transport of MHC class II molecules". *Immunology Today*. 1992. **13**: 179-184.
- Nei M, Gojobori T.** "Simple methods for estimating the numbers of synonymous and non-synonymous nucleotide substitutions". *Molecular Biology and Evolution*. 1986. **3**: 418-426.
- Nei M, Maruyama T, Wu CI.** "Models of evolution of reproductive isolation". *Genetics*. 1983. **103**: 557-579.
- Newell WR, Trowsdale J, Beck S.** "MHCDB-database of the human MHC". *Immunogenetics*. 1994. **40**: 109-115.

- Newton-Nash DK, Eckels DD. "Differential effect of polymorphism at HLA-DR1 beta-chain positions 85 and 86 on binding and recognition of DR1-restricted antigenic peptides". *Journal of Immunology*. 1993. **150**: 1813-1821.
- Nijenhuis M, Hammerling GJ. "Multiple regions of the transporter associated with antigen processing (TAP) contribute to its peptide binding site". *Journal of Immunology*. 1996. **157**: 5467-5477.
- Norbury CC, Hewlett LJ, Prescott AR, Shastri N, Watts C. "Class I MHC presentation of exogenous soluble antigen via macropinocytosis in bone marrow macrophages". *Immunity*. 1995. **3**: 783-791.
- Norley SG. "SIVagm infection of its natural African green monkey host". *Immunology Letters*. 1996. **51**: 53-58.

O

- Okada K, Prentice HL, Boss JM, Levy DJ, Kappes D, Spies T, Raghupathy R, Mengler RA, Auffray C, Strominger JL. "SB subregion of the human major histocompatibility complex: gene organization, allelic polymorphism and expression in transformed cells". *EMBO Journal*. 1985. **4**: 739-748.
- Ong B, Willcox N, Wordsworth P, Beeson D, Vincent A, Altmann D, Lanchbury JS, Harcourt GC, Bell JI, Newsom-Davis J. "Critical role for the Val/Gly86 HLA-DR β dimorphism in autoantigen presentation to human T cells". *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1991. **88**: 7343-7347.
- Onno M, Guillaudeux T, Amiot L, Renard I, Drenou B, Hirel B, Girr M, Semana G, le Bouteiller P, Fauchet R. "The HLA-G gene is expressed at a low mRNA level in different human cells and tissues". *Human Immunology*. 1994. **41**: 79-86.
- Otting N, Bontrop RE. "Evolution of the major histocompatibility complex DPA1 locus in primates". *Human Immunology*. 1995. **42**: 184-187.
- O'Callaghan CA, Bell JL. "Structure and function of the human MHC class Ib molecules HLA-E, HLA-F and HLA-G". *Immunological Reviews*. 1998. **163**: 129-138.
- O'hUigin C. "Quantifying the degree of convergence in primate Mhc-DRB genes". *Immunological Reviews*. 1995. **143**: 123-140.
- O'hUigin C, Bontrop R, Klein J. "Nonhuman primate Mhc-DRB sequences: a compilation". *Immunogenetics*. 1993. **38**: 165-183.

P

- Pancer Z, Scheffer U, Muller I, Muller WE. "Cloning of sponge (*Geodia cydonium*) and tunicate (*Botryllus schlosseri*) proteasome subunit epsilon (PRCE): implications about the vertebrate MHC-encoded homologue LMP7 (PRCC)". *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1996. **228**: 406-410.
- Parham P. "Function and polymorphism of human leukocyte antigen-A,B,C molecules". *American Journal of Medicine*. 1988. **85**: 2-5
- Parham P. "MHC protein structure. Getting into the groove". *Nature*. 1989. **342**: 617-618.
- Parham P, Lomen CE, Lawlor DA, Ways JP, Holmes N, Coppin HL, Salter RD, Wan AM, Ennis PD. "Nature of polymorphism in HLA-A, -B, and -C molecules". *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1988. **85**: 4005-4009.
- Paz Artal E, Corell A, Alvarez M, Varela P, Allende L, Madroño A, Rosal M, Arnaiz-Villena A. "C4 gene polymorphism in primates: evolution, generation, and Chido and Rodgers antigenicity". *Immunogenetics*. 1994. **40**: 381-396.
- Pease LR. "Diversity in H-2 genes encoding antigen-presenting molecules is generated by interactions between members of the major histocompatibility complex gene family". *Transplantation*. 1985. **39**: 227-231.
- Ploegh HL, Orr HT, Strominger JL. "Major histocompatibility antigens: the human (HLA-A, -B, -C) and murine (H-2K, H-2A) class I molecules". *Cell*. 1981. **24**: 287.
- Powis SH, Mockridge I, Kelly A, Kerr LA, Glynn R, Gileadi U, Beck S, Trowsdale J. "Polymorphism in a second ABC transporter gene located within the class II region of the human major histocompatibility complex". *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1992. **89**: 1463-1467.
- Powis SJ, Deverson EV, Coadwell WJ, Ciruela A, Huskisson NS, Smith H, Butcher GW, Howard JC. "Effect of polymorphism of an MHC-linked transporter on the peptides assembled in a class I molecule". *Nature*. 1992. **357**: 211-215.

R

Radley E, Alderton RP, Kelly A, Trowsdale J, Beck S. "Genomic organization of *HLA-DMA* and *HLA-DMB*. Comparison of the gene organization of all six class II families in the human major histocompatibility complex". *Journal of Biological Chemistry*. 1994. **269**: 18834-18838.

Ramachandra L, Chu RS, Askew D, Noss EH, Canaday DH, Potter NS, Johnsen A, Krieg AM, Nedrud JG, Boom WH, Harding CV. "Phagocytic antigen processing and effects of microbial products on antigen processing and T-cell responses". *Immunological Reviews*. 1999. **168**: 217-239.

Rammensee HG. "Chemistry of peptides associated with MHC class I and class II molecules". *Current Opinion in Immunology*. 1995. **7**: 85-96.

Reich Z, Altman JD, Boniface JJ, Lyons DS, Kozono H, Ogg G, Morgan C, Davis MM. "Stability of empty and peptide-loaded class II major histocompatibility complex molecules at neutral and endosomal pH: comparison to class I proteins". *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1997. **94**: 2495-2500.

Reid SW, McAdam S, Smith KJ, Klenerman P, O'Callaghan CA, Harlos K, Jakobsen BK, McMichael AJ, Bell JI, Stuart DI, Jones EY. "Antagonist HIV-1 Gag peptides induce structural changes in HLA B8". *Journal of Experimental Medicine*. 1996. **184**: 2279-2286.

Reinisch CL, Litman GW. "Evolutionary immunobiology". *Immunology Today*. 1989. **10**: 278-281.

Reith W, Satola S, Sanchez CH, Amaldi I, Lisowska-Grospierre B, Griscelli C, Hadam MR, Mach B. "Congenital immunodeficiency with a regulatory defect in MHC class II gene expression lacks a specific *HLA-DR* promoter binding protein, RF-X". *Cell*. 1988. **53**: 897-906.

Roche PA, Cresswell P. "Invariant chain association with HLA-DR molecules inhibits immunogenic peptide binding". *Nature*. 1990. **345**: 615-618.

Roche PA, Cresswell P. "Proteolysis of the class II-associated invariant chain generates a peptide binding site in intracellular HLA-DR molecules". *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1991. **88**: 3150-3154.

Rohn WM, Lee YJ, Benveniste EN. "Regulation of class II MHC expression". *Critical Reviews in Immunology*. 1996. **16**: 311-330.

Rollini P, Mach B, Gorski J. "Characterization of an *HLA-DRβ* pseudogene in the DRw52 supertypic group". *Immunogenetics*. 1987. **25**: 336-342.

Rollini P, Mach B, Gorski J. "Linkage map of three of *HLA-DRβ*-chain genes: evidence for a recent duplication event". *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1985. **82**: 7197-7201.

Ronchi A, Bellorini M, Mongelli N, Mantovani R. "CCAAT-box binding protein NF-Y (CBF, CPI) recognizes the minor groove and distorts DNA". *Nucleic Acids Research*. 1995. **23**: 4565-4572.

Rothbard JB, Gefter ML. "Interactions between immunogenic peptides and MHC proteins". *Annual Review of Immunology*. 1991. **9**: 527-565.

Rudensky AY, Preston-Hurlburt P, al-Ramadi BK, Rothbard J, Janeway CA Jr. "Truncation variants of peptides isolated from MHC class II molecules suggest sequence motifs". *Nature*. 1992. **359**: 429-431.

Rudensky AY, Preston-Hurlburt P, Hong SC, Barlow A, Janeway CA Jr. "Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules". *Nature*. 1991. **353**: 622-627.

S

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. "Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia". *Science*. 1985. **230**: 1350-1354.

Saitou N, Nei M. "The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees". *Molecular Biology and Evolution*. 1987. **4**: 406-425.

Saji M, Moriarty J, Ban T, Kohn LD, Singer DS. "Hormonal regulation of major histocompatibility complex class I genes in rat thyroid FRTL-5 cells: thyroid-stimulating hormone induces a cAMP-mediated decrease in class I expression". *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1992. **89**: 1944-1948.

Sambrook J, Fritsch RF, Maniatis R. "Molecular Cloning". Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY. 1989.

Sanderson F, Thomas C, Neefjes J, Trowsdale J. "Association between HLA-DM and HLA-DR in vivo". *Immunity*. 1996. **4**: 87-96.

- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors". *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1977. **74**: 5463-5467.
- Sant AJ. "Endogenous antigen presentation by MHC class II molecules". *Immunologic Research*. 1994. **13**: 253-267.
- Saper MA, Bjorkman PJ, Wiley DC. "Refined structure of the human histocompatibility antigen *HLA-A2* at 2.6 Å resolution". *Journal of Molecular Biology*. 1991. **219**: 277-319.
- Sasaki H, Xu XC, Mohanakumar T. "HLA-E and HLA-G expression on porcine endothelial cells inhibit xenoreactive human NK cells through CD94/NKG2-dependent and -independent pathways". *Journal of Immunology*. 1999. **163**: 6301-6305.
- Satta Y, Mayer WE, Klein J. "Evolutionary relationship of *HLA-DRB* genes inferred from intron sequences". *Journal of Molecular Evolution*. 1996. **42**: 648-657.
- Satta Y, Mayer WE, Klein J. "*HLA-DRB* intron 1 sequences: implications for the evolution of *HLA-DRB* genes and haplotypes". *Human Immunology*. 1996. **51**: 1-12.
- Satta Y, O'hUigin C, Takahata N, Klein J. "Intensity of natural selection at the major histocompatibility complex loci". *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1994. **91**: 7184-7188.
- Schmidt CM, Orr HT. "Maternal/fetal interactions: the role of the MHC class I molecule *HLA-G*". *Critical Reviews in Immunology*. 1993. **13**: 207-224.
- Schönbach C, Vincek V, Mayer WE, Golubic M, O'hUigin C, Klein J. "Multiplication of *Mhc-DRB5* loci in the orangutan: implications for the evolution of *DRB* haplotypes". *Mammalian Genome*. 1993. **4**: 159-170.
- Seeger MA, Haffley L, Kaufman TC. "Characterization of amalgam: a member of the immunoglobulin superfamily from *Drosophila*". *Cell*. 1988. **55**: 589-600.
- Senger G, Ragoussis J, Trowsdale J, Sheer D. "Fine mapping of the human MHC class II region within chromosome band 6p21 and evaluation of probe ordering using interphase fluorescence in situ hybridization". *Cytogenetics and Cell Genetics*. 1993. **64**: 49-53.
- Servenius B, Gustafsson K, Widmark E, Emmoth E, Andersson G, Larhammar D, Rask L, Peterson PA. "Molecular map of the human *HLA-SB* (*HLA-DP*) region and sequence of an *SBα* (*DPα*) pseudogene". *EMBO Journal*. 1984. **3**: 3209-3214.
- Sette A, Buus S, Colon S, Miles C, Grey HM. "I-Ad-binding peptides derived from unrelated protein antigens share a common structural motif". *Journal of Immunology*. 1988. **141**: 45-48.
- Shackelford DA, Strominger JL. "Analysis of the oligosaccharides on the *HLA-DR* and DC1 B cell antigens". *Journal of Immunology*. 1983. **130**: 274-282.
- Shaw S, Johnson AH, Shearer GM. "Evidence for a new segregant series of B cell antigens that are encoded in the *HLA-D* region and that stimulate secondary allogenic proliferative and cytotoxic responses". *Journal of Experimental Medicine*. 1980. **152**: 565-580.
- Shaw S, Pollack MS, Payne SM, Johnson AH. "HLA-linked B cell alloantigens of a new segregant series: population and family studies of the *SB* antigens". *Human Immunology*. 1980. **1**: 177-185.
- Shukla H, Swaroop A, Srivastava R, Weissman SM. "The mRNA of a human class I gene *HLA G/HLA 6.0* exhibits a restricted pattern of expression". *Nucleic Acids Research*. 1990. **18**: 2189.
- Sigurdardóttir S, Borsch C, Gustafsson K, Andersson L. "Exon encoding the antigen-binding site of MHC class II beta-chains is divided into two subregions with different evolutionary histories". *Journal of Immunology*. 1992. **148**: 968-973.
- Sinha S, Maity SN, Lu J, de Crombrughe B. "Recombinant rat CBF-C, the third subunit of CBF/NFY, allows formation of a protein-DNA complex with CBF-A and CBF-B and with yeast HAP2 and HAP3". *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1995. **92**: 1624-1628.
- Sinigaglia F, Hammer J. "Rules for peptide binding to MHC class II molecules". *APMIS*. 1994. **102**: 241-248.
- Sliendregt BL, Bontrop RE. "Current knowledge on the major histocompatibility complex class II region in non-human primates". *European Journal of Immunogenetics*. 1994. **21**: 391-402.
- Sliendregt BL, Kenter M, Otting N, Anholts J, Jonker M, Bontrop RE. "Major histocompatibility complex class II haplotypes in a breeding colony of chimpanzees (*Pan troglodytes*)". *Tissue Antigens*. 1993. **42**: 55-61.
- Sliendregt BL, Otting N, van Besouw N, Jonker M, Bontrop RE. "Expansion and contraction of rhesus macaque *DRB* regions by duplication and deletion". *Journal of Immunology*. 1994. **152**: 228-2306.
- Sloan VS, Cameron P, Porter G, Gammon M, Amaya M, Mellins E, Zaller DM. "Mediation by *HLA-DM* of dissociation of peptides from *HLA-DR*". *Nature*. 1995. **375**: 802-806.
- Smith AG, Nelson JL, Regen L, Guthrie LA, Donadi E, Mickelson EM, Hansen JA. "Six new *DR52*-associated *DRB1* alleles, three of *DR8*, two of *DR11*, and one of *DR6*, reflect a variety of mechanisms which generate polymorphism in the MHC". *Tissue Antigens*. 1996. **48**: 118-126.

- Smith LC, Hildemann WH.** "Alloimmune memory is absent in *Hymeniacidon sinapium*, a marine sponge". *Journal of Immunology*. 1984. **133**: 2351-2355.
- Smith LM, Sanders JZ, Kaiser RJ, Hughes P, Dodd C, Connell CR, Heimer C, Kent SB, Hood LE.** "Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis". *Nature*. 1986. **321**: 674-679.
- Snell GD.** "The H-2 locus of the mouse: observations and speculations concerning its comparative genetics and its polymorphism". *Folia Biologica*. 1968. **14**: 335-358.
- Southern EM.** "Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis". *Journal of Molecular Biology*. 1975. **98**: 503-517.
- Spies T, de Mars R.** "Restored expression of major histocompatibility class I molecules by gene transfer of a putative peptide transporter". *Nature*. 1991. **351**: 323-324.
- Spies T, Sorrentino R, Boss JM, Okada K, Strominger JL.** "Structural organization of the DR subregion of the human major histocompatibility complex". *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1985. **82**: 5165-5169.
- Srivastava R, Duceman B, Biro PA, Sood AS, Weissman SM.** "Molecular organization of the class I gene of human Major Histocompatibility Complex". *Immunological Reviews*. 1985. **84**: 93-121.
- Steimle V, Siegrist CA, Mottet A, Lisowska-Grospierre B, Mach B.** "Regulation of MHC class II expression by interferon-gamma mediated by the transactivator gene CIITA". *Science*. 1994. **265**: 106-109.
- Stern LJ, Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, Urban RG, Strominger JL, Wiley DC.** "Crystal structure of the human class II MHC protein *HLA-DR1* complexed with an influenza virus peptide". *Nature*. 1994. **368**: 215-221.
- Stern LJ, Wiley DC.** "Antigenic peptide binding by class I and class II histocompatibility proteins". *Structure*. 1994. **2**: 245-251.
- Suárez B, Morales P, Castro MJ, Fernández-Soria V, Recio MJ, Pérez-Blas M, Alvarez M, Díaz-Campos N, Arnaiz-Villena A.** "Mhc-E polymorphism in *Pongidae* primates: the same allele is found in two different species". *Tissue Antigens*. 1997. **50**: 695-698.
- Svensson AC, Andersson G.** "Presence of retroelements reveal the evolutionary history of the human DR haplotypes". *Hereditas*. 1997. **127**: 136-142.
- Svensson AC, Setterblad N, Pihlgren U, Rask L, Andersson G.** "Evolutionary relationship between human Major Histocompatibility Complex *HLA-DR* haplotypes". *Immunogenetics*. 1996. **43**: 304-314.
- Svensson AC, Setterblad N, Sigurdardóttir S, Rask L, Andersson G.** "Primate *DRB* genes from the *DR3* and *DR8* haplotypes contain *ERV9 LTR* elements at identical position". *Immunogenetics*. 1995. **41**: 74-82.

T

- Tan LJ, Ceman S, Chervonsky A, Rodríguez-París J, Steck TL, Sant AJ.** "Late events in the intracellular sorting of major histocompatibility complex class II molecules are regulated by the 80-82 segment of the class II β chain". *European Journal of Immunology*. 1997. **27**: 1479-1488.
- Tanigaki N, Tosi R.** "The genetic control of human Ia alloantigens: a three-loci model derived from the immunochemical analysis of «supertypic» specificities". *Immunological Reviews*. 1982. **66**: 5-37.
- Teyton L, O'Sullivan D, Dickson PW, Lotteau V, Sette A, Fink P, Peterson PA.** "Invariant chain distinguishes between the exogenous and endogenous antigen presentation pathways". *Nature*. 1990. **348**: 39-44.
- Thomas JT, Cresswell CJ, Rash B, Hoyland J, Freemont AJ, Grant ME, Boot-Handford RP.** "The human collagen X gene: complete primary sequence and re-expression in osteoarthritis". *Biochemical Society Transactions*. 1991. **19**: 804-808.
- Ting JP, Painter A, Zeleznik-Le NJ, MacDonald G, Moore TM, Brown A, Schwartz BD.** "YB-1 DNA-binding protein represses interferon gamma activation of class II major histocompatibility complex genes". *Journal of Experimental Medicine*. 1994. **179**: 1605-1611.
- Todd JA, Bell JI, McDevitt HO.** "*HLA-DQB* gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus". *Nature*. 1987. **329**: 599-604.
- Tonnelle C, de Mars R, Long EO.** "DOB: a new β chain gene in *HLA-D* with a distinct regulation of expression". *EMBO Journal*. 1985. **4**: 2839-2847.
- Trowsdale J.** "Molecular genetics of the human HLA complex, including evolutionary aspects". *Animal Genetics*. 1989. **20**: 335-336.
- Trowsdale J.** "«Both man & bird & beast»: comparative organization of MHC genes". *Immunogenetics*. 1995. **41**: 1-17.
- Trowsdale J, Hanson I, Mockridge I, Beck S, Townsend A, Kelly A.** "Sequences encoded in the class II region of the MHC related to the «ABC» superfamily of transporters". *Nature*. 1990. **348**: 741-744.

- Trowsdale J, Kelly A.** "The human HLA class II α chain gene *DZ α* is distinct from genes in the DP, DQ and DR subregions". *EMBO Journal*. 1985. **4**: 2231-2237.
- Trowsdale J, Ragoussis J, Campbell RD.** "Map of the human MHC". *Immunology Today*. 1991. **12**: 443-446.
- Trtková K, Kupfermann H, Grabovac B, Mayer WE, O'hUigin C, Tichy H, Bontrop R, Klein J.** "Mhc-DRB genes of platyrrhine primates". *Immunogenetics*. 1993. **38**: 210-222.
- Trtková K, Mayer WE, O'hUigin C, Klein J.** "Mhc-DRB genes and the origin of New World monkeys". *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 1995. **4**: 408-419.

U

- Ulbrecht M, Kellermann J, Johnson J, Weiss EH.** "Impaired intracellular transport and cell surface expression of nonpolymorphic *HLA-E*: evidence for inefficient peptide binding". *Journal of Experimental Medicine*. 1992. **176**: 1083-1090.

V

- Van Ham SM, Tjin EPM, Lillemeier BF, Gruneberg U, van Meijgaarden KE, Pastoors L, Verwoerd D, Tulp A, Canas B, Rahman D, Ottenhoff TH, Pappin DJ, Trowsdale J, Neefjes J.** "*HLA-DO* is a negative modulator of *HLA-DM*-mediated MHC class II peptide loading". *Current Biology*. 1997. **7**: 950-957.
- Van Leeuwen G.** "Single umbilical artery". *Pediatrics*. 1973. **52**: 890-891.
- Verreck FAW, Termijtelen A, Koning F.** "*HLA-DR β* chain residue 86 controls *DR $\alpha\beta$* dimer stability". *European Journal of Immunology*. 1993. **23**: 1346-1350.
- Vilen BJ, Penta JF, Ting JP.** "Structural constraints within a trimeric transcriptional regulatory region. Constitutive and interferon-gamma-inducible expression of the *HLA-DRA* gene". *Journal of Biological Chemistry*. 1992. **267**: 23728-23734.
- Vincek V, Klein D, Figueroa F, Hauptfeld V, Kasahara M, O'hUigin C, Mach B, Klein J.** "The evolutionary origin of the *HLA-DR3* haplotype". *Immunogenetics*. 1992. **35**: 263-271.
- Vyse TJ, Todd JA.** "Genetic analysis of autoimmune disease". *Cell*. 1996. **85**: 311-318.

W

- Wang K, Fröh K, Peterson PA, Yang Y.** "Nucleotide binding of the C-terminal domains of the major histocompatibility complex-encoded transporter expressed in *Drosophila melanogaster* cells". *FEBS Letters*. 1994. **350**: 337-341.
- Watkins DI, Chen ZW, Hughes AL, Evans MG, Tedder TF, Letvin NL.** "Evolution of the MHC class I genes of a New World primate from ancestral homologues of human non-classical genes" *Nature*. 1990. **346**: 60-63.
- Watkins DI, Garber TL, Chen ZW, Toukatly G, Hughes AL, Letvin NL.** "Unusually limited nucleotide sequence variation of the expressed major histocompatibility complex class I genes of a New World primate species (*Saguinus oedipus*)". *Immunogenetics*. 1991. **33**: 79-89.
- Watkins DI, Letvin NL, Hughes AL, Tedder TF.** "Molecular cloning of cDNA that encode MHC class I molecules from a New World primate (*Saguinus oedipus*). Natural selection acts at positions that may affect peptide presentation to T cells". *Journal of Immunology*. 1990. **144**: 1136-1143.
- Weenink SM, Gautam AM.** "Antigen presentation by MHC class II molecules". *Immunology and Cell Biology*. 1997. **75**: 69-81.
- Wei XH, Orr HT.** "Differential expression of *HLA-E*, *HLA-F*, and *HLA-G* transcripts in human tissue". *Human Immunology*. 1990. **29**: 131-142.
- Weiss EH, Mellor A, Golden L, Fahrner K, Simpson E, Hurst J, Flavell RA.** "The structure of a mutant H-2 gene suggests that the generation of polymorphism in H-2 genes may occur by gene conversion-like events". *Nature*. 1983. **301**: 671-674.
- Weiss GA, Collins EJ, Garboczi DN, Wiley DC, Schreiber SL.** "A tricyclic ring system replaces the variable regions of peptides presented by three alleles of human MHC class I molecules". *Chemistry and Biology*. 1995. **2**: 401-407.
- Widera G, Flavell RA.** "The nucleotide sequence of the murine I-E β immune response gene: evidence for gene conversion events in class II genes of the major histocompatibility complex". *EMBO Journal*. 1984. **3**: 1221-1225.

Wilbur WJ, Lipman DJ. "Rapid similarity searches of nucleic acid and protein data banks". *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1983. **80**: 726-730.

Winchester RJ, Kunkel HG. "The human Ia system". *Advances in Immunology*. 1979. **28**: 221-292.

Wolf PR, Ploegh HL. "How MHC class II molecules acquire peptide cargo: biosynthesis and trafficking through the endocytic pathway". *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 1995. **11**: 267-306.

Wright KL, White LC, Kelly A, Beck S, Trowsdale J, Ting JP. "Coordinate regulation of the human TAP1 and LMP2 genes from a shared bidirectional promoter". *Journal of Experimental Medicine*. 1995. **181**: 1459-1471.

Wu SK, Lu D, Madden M, Liu CP, Miyokawa N, Bach FH, Saunders TL. "Full-length DQ β cDNA sequences of HLA-DR2/DQw1 subtypes: genetic interactions between two DQ β loci generate human class II HLA diversity". *Human Immunology*. 1990. **27**: 305-322.

Wu SK, Yabe T, Madden M, Saunders TL, Bach FH. "cDNA cloning and sequencing reveals that the electrophoretically constant DR β 2 molecules, as well as the variable DR β 1 molecules, from HLA-DR2 subtypes have different amino acid sequences including a hypervariable region for a functionally important epitope". *Journal of Immunology*. 1987. **138**: 2953-2959.

Y

Yeager M, Hughes AL. "Evolution of the mammalian MHC: natural selection, recombination, and convergent evolution". *Immunological Reviews*. 1999. **167**: 45-58.

Yewdell JW, Bennink JR. "Cell biology of antigen processing and presentation to major histocompatibility complex class I molecule-restricted T lymphocytes". *Advances in Immunology*. 1992. **52**: 1-123.

Z

Zemmour J, Parham P. "A ribosomal protein-like sequence in the 3' untranslated region of the *HLA-F* gene". *Tissue Antigens*. 1992. **40**: 250-253.

Zhu Z, Vincek V, Figueroa F, Schönbach C, Klein J. "Mhc-DRB genes of the pigtail macaque (*Macaca nemestrina*): implications for the evolution of human DRB genes". *Molecular Biology and Evolution*. 1991. **8**: 563-578.

Zinkernagel RM, Bachmann MF, Kundig TM, Oehen S, Pirchet H, Hengartner H. "On immunological memory". *Annual Review of Immunology*. 1996. **14**: 333-367.

VIII.- PUBLICACION

M. Rosal-Sánchez
E. Paz-Artal
M.A. Moreno-Pelayo
N. Martínez-Quiles
J. Martínez-Laso
J.M. Martín-Villa
A. Arnaiz-Villena

Polymorphism of *Mhc-DRB* alleles in *Cercopithecus aethiops* (green monkey): generation and functionality

Key words:

Apes; *Cercopithecus*; DRB; Mhc

Acknowledgments:

This work was supported in part by Ministerio de Educación (PM-95-0057 and PM-96-0021) and Ramon Areces grants (Spain). We are grateful to Jose Luis Peña Garcia-Margallo and Miguel Garcia Berciano for help and technical assistance.

Abstract: *DRB* genes have been studied for the first time in green monkeys (*Cercopithecus aethiops*). Eleven new *DRB* alleles (exon 2, exon 3) have been obtained and sequenced from cDNA. A limited number of lineages have been identified: *DRB1*03* (4 alleles), *DRB1*07* (3 alleles), *DRB5* (1 allele), *DRB*w6* (1 allele), and *DRB*w7* (2 alleles). The existence of *Ceae-DRB1* duplications is supported by the finding of 3 *DRB1* alleles in 3 different individuals. *Ceae-DRB1*0701* may be non-functional because it bears serine at position 82, which hinders molecule surface expression in mice; the allele is only found in *Ceae-DRB* duplicated haplotypes. Base changes in cDNA *Ceae-DRB* alleles are consistent with the generation of polymorphism by point mutations or short segment exchanges between alleles. The eleven green monkey *DRB* alleles meet the requirements for functionality as anti-gen-presenting molecules (perhaps, excluding *DRB1*0701*), since: 1) they have been isolated from cDNA and do not present deletions, insertions or stop codons; 2) structural motifs necessary for a correct folding of the molecule, for the formation of DR/DR dimers and for CD4 interactions are conserved, and 3) the number of non-synonymous substitutions is higher than the number of synonymous substitutions in the peptide binding region (PBR), while the contrary holds true for the non-PBR region.

Authors' affiliation:

M. Rosal-Sánchez.
E. Paz-Artal¹.
M.A. Moreno-Pelayo.
N. Martínez-Quiles.
J. Martínez-Laso.
J.M. Martín-Villa.
A. Arnaiz-Villena

Department of Immunology.
Hospital 12 de Octubre.
Universidad Complutense.
Madrid, Spain

Correspondence to:

Antonio Arnaiz-Villena
Departamento de
Inmunología
Hospital 12 de Octubre
Universidad Complutense
Ca. Andalucía 28041 Madrid
Spain
Tel: 34-1-3908315
Fax: 34-1-3908399
E-mail:
antonio.arnaiz@inm.h12o.es

The major histocompatibility complex *DRB* genes code for the β chains of proteins that present antigenic peptides to CD4 T lymphocytes. *DRB* gene polymorphism has been extensively studied in humans and in several nonhuman primate species; the last published compilation contains 244 exon 2 sequences corresponding to

The nucleotide sequence data reported in this paper have been submitted to GenBank or to the Genome Sequence Data Base and the following accession numbers have been assigned: L41537 (*Ceae-DRB*w601*), U19283 (*Ceae-DRB5*0101*), U19284 (*Ceae-DRB1*0701*), U19285 (*Ceae-DRB1*0301*), L47989 (*Ceae-DRB1*0702*), L47988 (*Ceae-DRB1*0302*), U19286 (*Ceae-DRB1*0303*), L47987 (*Ceae-DRB*w701*), L41538 (*Ceae-DRB*w702*), L41539 (*Ceae-DRB1*0304*), L41540 (*Ceae-DRB1*0703*).

¹ The contribution by Manuel Rosal-Sánchez and Estela Paz-Artal is equal and the order of authorship is arbitrary.

Received 27 October 1997, revised,
accepted for publication 13 March 1998

Copyright © Munksgaard 1998
Tissue Antigens. ISSN 0001-2815

Tissue Antigens 1998; 51: 541–548
Printed in Denmark. All rights reserved

14 *Pongidae*, catarrhini and platyrrhini species (1). Subsequently, new *DRB* alleles have been reported from DNA sequencing studies in macaques (2–6), baboons (3, 4), New World monkeys (7, 8) and prosimians (4, 9). The genetic haplotype structure has also been studied in many apes; the number of *DRB* genes per haplotype is not constant and shows duplications and deletions during evolution (10).

Assignment of a new primate *DRB* sequence to a well-defined orthologous *DRB* gene from other species is not always a straightforward task; however, the frequent sharing of motifs among alleles corresponding to different primate species has led to their classification in lineages: sequences from the same lineage cluster together within an evolutive tree clade. An allelic lineage is composed of sequences coming from different primate species that share a degree of homology higher than that found for *DRB* alleles belonging to the same species. This is a characteristic of class I and class II *Mhc* polymorphism and supports the trans-species model of evolution (11). This has been further demonstrated by the finding of the same *Mhc-E* alleles in two pairs of different monkey species (12, 13). Some *DRB* lineages were established more than 85 million years ago (9).

Several mechanisms have been postulated in order to explain *Mhc* polymorphism generation (point or complex mutations, recombinations, gene conversions or segmental exchanges) (14) and for maintaining this polymorphism (xenobiotic-driven selection, disassortative mating, maternal-fetal incompatibility, high mutation rate, ancient neutral polymorphism) (15, 16), but their degree of contribution to the observed variability is controversial.

The description of the *DR* molecule crystallographic structure (17) allowed the identification of the putative amino acid residues which interact with the CD4 molecule and with the antigenic peptide. Hughes and Nei demonstrated that the rates of non-synonymous substitution exceed that of synonymous substitution in the antigen-recognition site, whereas out of that region, the former was significantly lower than the latter (18). These results suggest that the high degree of polymorphism at class II *Mhc* loci is mainly caused by microorganism-driven overdominant selection (heterozygote advantage) working at the antigen-recognition site.

The contribution of the present paper to the knowledge of the *Mhc* polymorphism in primates consists of the description of 11 *DRB* exon 2 plus exon 3 sequences in *Cercopithecus aethiops*. Exon 2 sequencing allows the identification of most *DRB* polymorphic variants. Exon 3 codes for several essential amino acid residues, and plays an important role in DR/DR dimer formation and in interactions with the T-cell coreceptor molecule CD4. DR/DR dimer formation might provide the initial signaling for T lymphocytes and antigen-presenting cells to trigger cellular activation (17); CD4-class II MHC interactions modulate T-cell signal transduction (19–21) and have a major role in intrathymic T-cell selection (22). The putative

structure of the obtained sequences is analyzed and functional conclusions are drawn. Duplications, point mutations and short segmental exchanges are probably present in the evolution of the green monkey *DRB* genes.

Material and methods

Ape cell lines

Fifteen kidney cell lines from the species *Cercopithecus aethiops* (green monkey) were analyzed (Whitaker, Walkersville, MD). They correspond to fifteen individuals without family links.

RNA isolation, cDNA synthesis and PCR

Total RNA was extracted as published elsewhere (23). cDNA was synthesized with the Reverse Transcription System (Promega, Madison, WI) following the manufacturer's recommendations. *DRB* exons 2 and 3 were PCR-amplified with the primer *DRB*-Amp A from exon 2 (24) and the primer DRBE-3 from exon 3: 5'-TGGCAGGTGTAAACCTCTC-3'. Primer DRBE-3 was designed taking into account the consensus human *DRB* sequence (25); it does not amplify a particular allele or group of alleles, but all tested DR alleles (unpublished observations).

Cloning and sequencing

PCR products were purified (Wizard PCR-Preps DNA Purification System, Promega, Madison, WI) and inserted in the pGEM-T plasmid vector (pGEM-T Vector Systems, Promega, Madison, WI). After cloning, recombinant plasmids were isolated from positive colonies and purified by vacuum-propelled minicolumns (QIAwell-8 Plasmid Purification Kit, Hilden, Germany). Double-stranded DNA templates were sequenced in both directions with the primers corresponding to the M13 sequences contained in the pGEM-T vector. Electrophoresis and analysis of the sequenced samples were done in a Perkin Elmer automated DNA sequencer (Foster City, CA) as previously described (23).

Dendrograms and synonymous/non-synonymous substitution calculations

The eleven sequences reported in this work were used for the construction of two dendrograms. The first one contained also primate *DRB*, *DQB*, and *DPB* consensus sequences and was obtained by the UPGMA-CLUSTAL method (PC Gene; Intelligenetics, Mountain

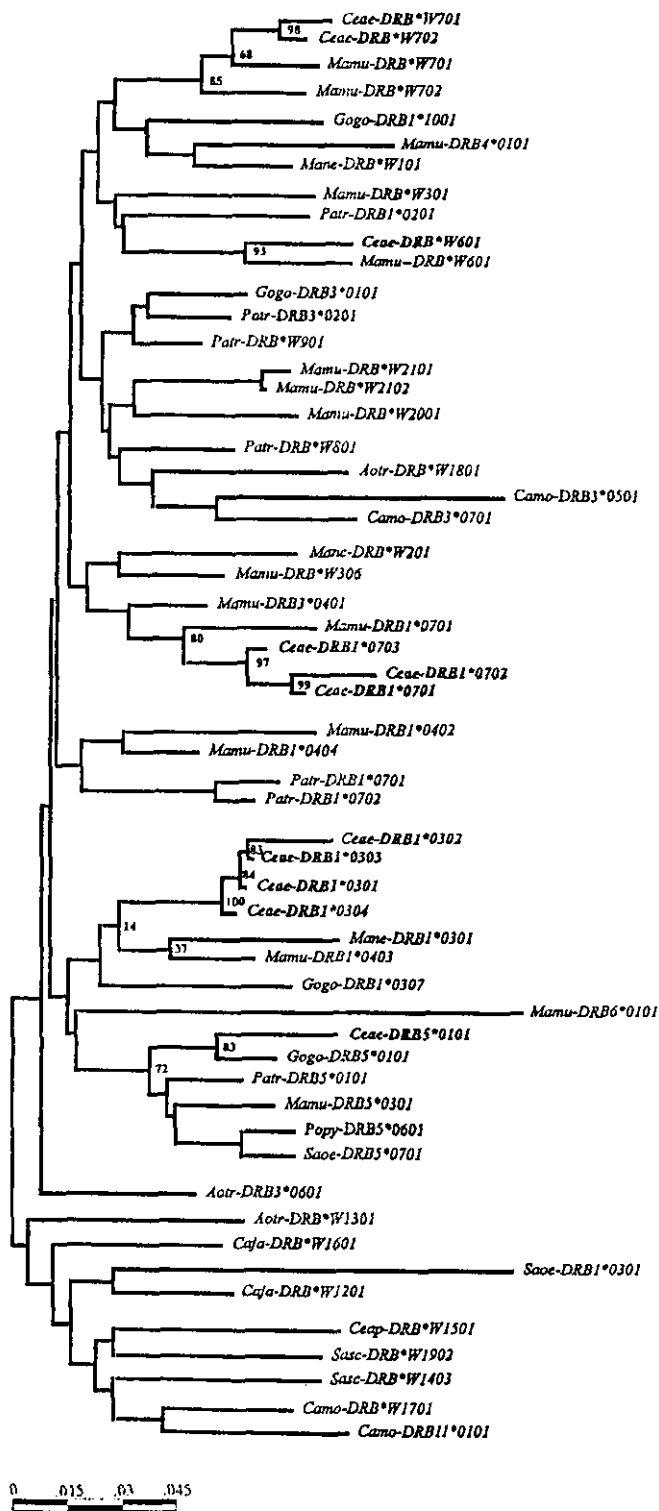


Fig. 1. Exon 2 dendrogram depicting phylogenetic relationships of the eleven *Ceae-DRB* alleles reported in this work. The tree was constructed by the NJBOOT method (see Material and methods) with sequences from the compilation of O'hUigin and coworkers (1) together with *Mamu-DRB*w2101*, *Mamu-DRB*2102*, *Mamu-DRB*w2001*, and *Mamu-DRB1*0701* (2). Bold type characters correspond to the new *Ceae-DRB* sequences. Bootstrap values are shown on the branches corresponding to *Ceae-DRB* alleles. *Papa*=*Pan paniscus*, *Patr*= *Pan troglodytes*, *Gogo*= *Gorilla gorilla*, *Popy*=*Pongo pygmaeus*, *Mamu*=*Macaca mulatta*, *Mane*= *Macaca nemestrina*, *Ceae*=*Cercopithecus aethiops*, *Camo*=*Callicebus moloch*, *Aotr*=*Aotus trivirgatus*, *Caja*=*Callithrix jacchus*, *Ceap*=*Cebus apella*, *Sasc*=*Saimiri sciureus*, *Saoe*=*Saguinus oedipus*.

published by Slierendregt and coworkers (2). The genetic distances were calculated by the Kimura two-parameter method (27).

Synonymous and non-synonymous substitutions were calculated by the NAG program (28) based on the Jukes and Cantor method (29).

Results and discussion

Assignment of DRB loci or lineages

Confirmation that the eleven different sequences (Table 1) correspond to *DRB* genes was obtained because they clustered together with a *DRB* consensus sequence in a dendrogram constructed with *DRB*, *DQB*, and *DPB* exon 2 consensus sequences (data not shown). The assignment of alleles to particular *DRB* loci or lineages was done by two different methodologies. The first one consists of the sequence comparison with sequences already published and the detection of locus- or lineage-specific motifs. These assignments were corroborated by a second method, which consisted of the construction of a genetic distance dendrogram; in this tree, the obtained 'Ceae-' exon 2 sequences clustered together with alleles of the corresponding locus or lineage (Fig. 1). Another tree was constructed by using the parsimony program DNAPARS (PHYLIP, 30) and it showed essentially the same branch topology as the 'neighbor' dendrogram (data not shown). The new eleven alleles were named according to the nomenclature proposal of Klein and coworkers (31). Seven alleles corresponded to *DRB1* (four to the *03 lineage and three to the *07 lineage); one to *DRB5*; one to the *DRB*166* lineage, and two to the *DRB*w7* lineage (Table 1).

Limited variability and genetic duplications

Table 2 shows two significant findings. First, the spectrum of *DRB* alleles obtained in *Cercopithecus aethiops* is relatively limited. All

View, CA). The second dendrogram was constructed by the neighbor-joining method (26) (Fig. 1), and it also contains 45 exon 2 *DRB* sequences from the compilation of O'hUigin and coworkers (1) or

Alleles obtained and number of clones sequenced

Sequence	Allelic assignation	Number of clones (from two or more PCR)
Ceae-1	Ceae-DRB*w601	7
Ceae-2	Ceae-DRB5*0101	30
Ceae-3	Ceae-DRB1*0701	12
Ceae-4	Ceae-DRB1*0301	18
Ceae-5	Ceae-DRB1*0702	4
Ceae-6	Ceae-DRB1*0302	6
Ceae-7	Ceae-DRB1*0303	11
Ceae-9	Ceae-DRBw*701	6
Ceae-10	Ceae-DRBw*702	24
Ceae-13	Ceae-DRB1*0304	14
Ceae-17	Ceae-DRB1*0703	5

Table 1

the obtained sequences from the *DRB1* gene correspond only to the *03 or the *07 lineages, although the last compilation of primate *DRB* sequences contains five *DRB1* lineages (1). The finding of four *DRB1**03 alleles in green monkeys supports the fact that *DRB1**03 is a very extended lineage among apes, since several representatives have been found in all the studied primate groups (*Pongidae*, Old and New World monkeys) and prosimians. In contrast, the *DRB1**07 lineage was only reported in two chimpanzee alleles (*Patr-DRB1**0701 and *Patr-DRB1**0702 (14)) and one rhesus macaque allele (*Mamu-DRB1**0701 (2)); in green monkey we have obtained three additional alleles: *Ceae-DRB1**0701, *0702, and *0703. Only one allele has been obtained (*Ceae-DRB5**0101) from the remaining *DRB* genes which are postulated to be expressed. No *DRB3* or *DRB4* alleles have been found in the green monkeys analyzed for the present work. The primate *DRB* compilation also contains more than fifteen *DRB**w lineages and new 'w' lineages have subsequently been described (2-6); the *Cercopithecus aethiops* individuals studied by us show alleles from only *DRB**w6 (*w601) and *w7 (*w701 and *w702) lineages. McAdam and coworkers (32) also reported a restricted number of lineages both in chimpanzee and bonobo: these species express *Mhc-A* alleles related to only one (*HLA-A1*, *-A3*, *-A11*) of the six human *HLA-A* allele families. This limited allelic repertoire could reflect a genetic bottleneck in the evolution of the concerned species, inbreeding, or that selection may have favored a particular family of alleles along the evolution.

The second remarkable finding is the identification of three individuals bearing three *DRB1* alleles each (Table 2); this means that two copies of the *DRB1* gene may be present in some green monkey *Mhc* haplotypes. Duplications of *Mhc-B* and *-DRB5* in orangutans, *-DRB6* in chimpanzees, *-DRB6* and *-DRBw6* in rhesus macaques,

DRB alleles found in each green monkey individual

Individual	Alleles (Ceae-DRB)
Ve-1	1*0302, 1*0702, *w601, *w701, *w702
Ve-2	5*0101
Ve-3	5*0101, *w601
Ve-4	5*0101
Ve-5	5*0101
Ve-6	5*0101
Ve-7	1*0301, 1*0701
<u>Ve-8</u>	1*0301, 1*0302, 1*0701, *w601, *w701
<u>Ve-10</u>	1*0301, 1*0303, 1*0701, *w702
Ve-11	*w702
Ve-12	1*0703, *w702
Ve-13	*w702
Ve-14	1*0301, 1*0303
<u>Ve-15</u>	1*0304, 1*0701, 1*0703, *w601
Ve-16	1*0301

Individuals with *DRB* gene duplications are underlined.

Table 2

and *-DRB3* in a prosimian have also been reported (summarized in reference 10). *DRB1* gene duplications have been reported in rhesus macaque (2, 6), dusky titi (33) and the prosimian *Galago senegalensis* (9) and in three green monkeys studied in this work. In conclusion, the *Mhc-DRB1* locus seems to be expanding in haplotypes from Old and New World monkeys and prosimians; this is probably due to a frequent occurrence of unequal crossing-overs. In contrast, *DRB1* may have reached genetic stability in the lineage leading to *Pongidae* (orangutan, gorilla, and chimpanzee) and humans, since no more than one *DRB1* gene per haplotype has been described in these species.

Evolutionary mechanisms

Several molecular mechanisms have been postulated for the generation of genetic diversity at the *Mhc* loci including: 1) point mutations, 2) complex mutations, 3) exchange of short sequence motifs across the gene, and 4) extensive recombination events, combining variants of the β -sheet of one allele with that of variants of the α helix of another allele (34, 35). The *Ceae-DRB* alleles found in this work provide evidence for the occurrence of the first and the third mechanisms, but a microgene conversion may not be discarded; a point mutation could be responsible for the unique difference observed among *Ceae-DRB1**0301 and *Ceae-DRB1**0303 alleles: asparagine and serine respectively appear at residue 120 (A_{AC}→A_{GC})

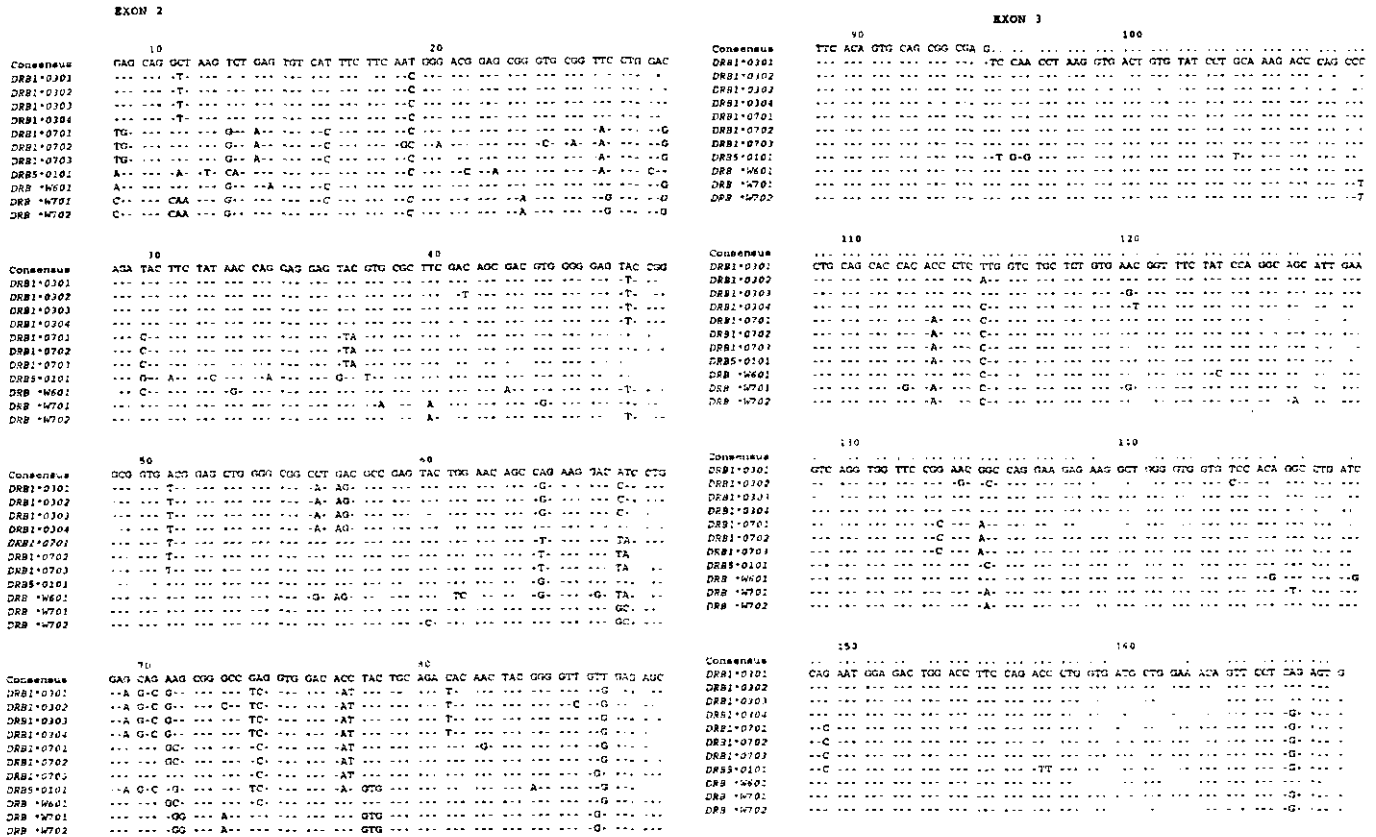


Fig. 2. Exon 2 and 3 *Ceae-DRB* nucleotide sequences obtained in the present work. Exon 2 sequences are aligned to the *DRB* consensus sequence from the nonhuman primate *DRB* compilation (1). Exon 3 se-

quences are aligned to *Ceae-DRB1*0301*. Identity of nucleotides is represented by a hyphen.

(Figs. 2 and 3). Other subgroups of sequences show a characteristic pattern of shared motifs: for example ERH at positions 28, 29, and 30 of *Ceae-DRB*w601*, *1*0701*, *1*0702*, and *1*0703*; or YLEQA-RAA in positions 67–74 of *Ceae-DRB*w601*, *1*0701*, and *1*0702* (Fig. 3); this is consistent with apparent intra- or interlocus exchanges of short segments. The fourth mechanism (extensive recombination events) has not been observed in the sequences obtained from the green monkeys studied for this work; the lack of this kind of recombination events agrees with others' observations on chimpanzees (14), platyrrhine primates (33) and rhesus macaques (2), suggesting that extensive recombination has a limited or null contribution to the generation of *DRB* variability. Nevertheless, a higher number of *Ceae-DRB* sequences might be necessary to identify and distinguish the particular genetic mechanisms implied in the generation of *DRB* diversity in green monkeys.

Trans-species and species-specific signals

The dendrogram in Fig. 1 supports the notion that *Cercopithecus aethiops* *DRB* alleles follow the trans-species model of evolution, since

several *Ceae-DRB* sequences are more similar to different species' orthologous sequences than to other *Ceae-DRB* alleles; also, alleles from different primate species group together in near branches. In addition, *DRB* alleles from green monkeys share several amino acid residues with those from other primates. This could be due to the generation of the *DR* diversity in common ancestors but also to convergent evolution. However, certain amino acids (underlined, Fig. 3) are exclusively found in green monkeys and none of these (bold face, Fig. 3) are placed at the peptide binding region (PBR) positions; thus they do not seem to exert any influence in the selection of peptides presented by the *Cercopithecus aethiops* *DRB* molecules. Also, the species-specific residues appear in green monkey *DRB* molecule positions which do not correspond to the T-cell receptor contact region or to regions stabilizing *DR/DR* contacts (17).

***Ceae-DRB* alleles show a functional-presenting molecule structure**

The *Ceae-DRB* alleles sequenced for this work have been characterized from cDNA and they do not present deletions, insertions or

β1 DOMAIN		10	20	30	40	50
Consensus		EQA	KSE	CHFFN	GTERV	RFLDRYFYNO
<i>Ceae-DRB1*0301</i>		-V	-	-	-	-
<i>Ceae-DRB1*0302</i>		-V	-	-	-	-
<i>Ceae-DRB1*0303</i>		-V	-	-	-	-
<i>Ceae-DRB1*0304</i>		-V	-	-	-	-
<i>Ceae-DRB1*0701</i>		W	-AK	-	-	-
<i>Ceae-DRB1*0702</i>		W	-AK	-	-	-
<i>Ceae-DRB1*0703</i>		W	-AK	-	-	-
<i>Ceae-DRB5*0101</i>		K	DMH	-	-	-
<i>Ceae-DRB*w601</i>		K	-A	-	-	-
<i>Ceae-DRB*w701</i>		Q	-Q	-	-	-
<i>Ceae-DRB*w702</i>		Q	-Q	-	-	-

β2 DOMAIN		100	110	120	130
Consensus		VQPKVT	VPYPAK	TQPLQ	HTLLVCS
<i>Ceae-DRB1*0301</i>		-	-	-	-
<i>Ceae-DRB1*0302</i>		-	-	-	-
<i>Ceae-DRB1*0303</i>		-	-	-	-
<i>Ceae-DRB1*0304</i>		-	-	-	-
<i>Ceae-DRB1*0701</i>		-	-	-	-
<i>Ceae-DRB1*0702</i>		-	-	-	-
<i>Ceae-DRB1*0703</i>		-	-	-	-
<i>Ceae-DRB5*0101</i>		-	-	-	-
<i>Ceae-DRB*w601</i>		-	-	-	-
<i>Ceae-DRB*w701</i>		-	-	-	-
<i>Ceae-DRB*w702</i>		-	-	-	-

		140	150	160
Consensus		EKAGV	VSTGL	IQNGD
<i>Ceae-DRB1*0301</i>		-	-	-
<i>Ceae-DRB1*0302</i>		-	-	-
<i>Ceae-DRB1*0303</i>		-	-	-
<i>Ceae-DRB1*0304</i>		-	-	-
<i>Ceae-DRB1*0701</i>		-	-	-
<i>Ceae-DRB1*0702</i>		-	-	-
<i>Ceae-DRB1*0703</i>		-	-	-
<i>Ceae-DRB5*0101</i>		-	-	-
<i>Ceae-DRB*w601</i>		-	-	-
<i>Ceae-DRB*w701</i>		-	-	-
<i>Ceae-DRB*w702</i>		-	-	-

Fig. 3. Predicted amino acid sequences of the 11 *Ceae-DRB* alleles identified in this work. Identity to the consensus is represented by a hyphen, differences are represented by single-letter substitutions. Species-specific residues are underlined. PBR residues are in bold face.

stop codons that could prevent the translation into normal proteins. Also, the *Ceae-DRB* allele non-synonymous/synonymous substitution ratio (d_N/d_S) is bigger than 1 for the PBR codons, while the contrary holds true for the non-PBR residues (Table 3). High d_N/d_S ratios at PBR sites suggest that positive selection is working at these sites to promote variability (18), and are consistent with normally expressed genes and proteins with antigen-presenting function (36).

Certain *DR-β* chain residues are important for the correct structure and function of the *DR* molecule (17); some of these have been revised in order to further strengthen the fact that the new *Ceae-DRB* alleles reported in this work code for proteins capable of pre-

senting antigenic peptides. It has been observed that all the *Ceae-DRB* sequences present cysteines at both residue 15 and 79, which are needed for the correct folding of the molecule (37). Residue 86 influences the nature and length of the presented peptides and controls the stability of the α/β dimer (38, 39). *HLA-DRB* bears invariably either glycine or valine at residue 86 and, according to some authors, this strict duality is exclusive for *Homo sapiens* and is not found in other primates studied (10). Surprisingly, this dichotomy has been observed also in the *Ceae-DRB* alleles presented in this work. Nevertheless, many other primate species show different amino acids or more extensive variability at that position in spite of the small sample of alleles characterized: at position 86, 9 *Camo-DRB* alleles present glycine, valine, serine or leucine; 8 *Popy-DRB* alleles and 6 *Aotv-DRB* alleles present valine, glycine or phenylalanine; 6 *Ceap-DRB* alleles present glycine or serine; 11 *Sasc-DRB* alleles present phenylalanine, leucine, arginine and serine. In conclusion, the duality glycine/valine seems to provide 'short' and 'long' peptide binding sites to green monkeys also (1); the human specificity of that mechanism (10) may be questioned according to the data obtained from *Cercopithecus aethiops*, although more alleles need to be sequenced to confirm this observation.

DR1 crystallizes as a dimer of the α/β heterodimer (17) and certain β -chain residues are involved in the *DR/DR* interactions. The first interface comprises amino acids at positions 49, 50, 51, 52, and 55, which are extremely conserved in humans (alanine, valine, threonine, glutamic acid, and arginine respectively); the same amino acids have been found at the corresponding positions of *Ceae-DRB* alleles, except for position 51, which is occupied by serine (instead of threonine) in several alleles (*Ceae-DRB-1*0701*, **0702*, **0703*, **0301*, **0302*, **0303*, and **0304*). Both amino acids, threonine and serine, are polar neutral and serine is present in several gorilla, drill, rhesus macaque, and pigtail macaque *DRB* alleles (1). Also, two salt bonds from glutamic acid $\beta 52$ in one *DR* molecule to arginine $\beta 55$ in the other molecule are conserved in all the human *DR* alleles; the eleven *Ceae-DRB* alleles invariably present the same amino acids at the respective positions. The second *DR/DR* interface of β -chain residues is formed by amino acids at positions 105, 111, 112, 114, 142, 143, and 162. Three of them (histidine-111, histidine-112, and glutamic acid-162) interact with residues of the other *DR* molecule $\alpha 2$ domain in order to originate three salt bonds. These seven amino acids are very conserved in humans and the only positions with slight variability are 105, 111, and 112, which are occupied always by polar positive amino acids: arginine, lysine or histidine. This amino acid pattern observed in the human *DR/DR* second interface is also found in the green monkey *DRB* alleles.

Another functional role of the *DRB* molecules is the interaction with the T-cell coreceptor molecule *CD4*. Peptide binding studies

Nucleotide substitution pattern in DRB

Table 3

	PBR (n=48) ^a		Non-PBR (n=195) ^b	
	d _S	d _N	d _S	d _N
<i>Ceae-DRB*w6</i> vs <i>Ceae-DRB</i>	8.20±6.57	52.6±16.5	11.2±5.21	5.93±2.03
<i>Ceae-DRB5</i> vs <i>Ceae-DRB</i>	11.9±11.7	76.2±22.9	16.0±6.43	6.11±2.09
<i>Ceae-DRB1</i> vs <i>Ceae-DRB</i>	13.0±10.2	54.8±16.7	8.12±4.15	5.29±1.84
<i>Ceae-DRB*w7</i> vs <i>Ceae-DRB</i>	27.7±19.0	68.8±20.4	8.68±4.49	6.71±2.17

Mean numbers and standard errors are expressed as percentages of synonymous substitutions per synonymous site (d_S) and non-synonymous substitutions per non-synonymous site (d_N).

^a: PBR=peptide binding regions, codons 9, 11, 13, 28, 30, 37, 38, 57, 61, 67, 70, 71, 74, 78, 82, 86

^b: non-PBR=Codons 9 to 89, excluding the PBR codons

have identified a region at the β2 domain (residues 134–148) that is responsible for that interaction (40). This agrees with mutation experiments in mouse, which have shown that the β2-domain residues involved in the DR/CD4 recognition are 110, 137, 140, 141, and 142 (41). The amino acids found at these five positions are also conserved in the *Ceae-DRB* alleles; the same amino acids can be found in many functional human *DRB* alleles (40).

In conclusion, the structural residues investigated in *Ceae-DRB* alleles seem to be conserved enough to allow putative DR/DR dimerization and binding to CD4 molecules. These and other characteristics mentioned above (no deletions, insertions or stop codons and d_N/d_S>1 in PBR sites) suggest that the *DRB* alleles obtained from the green monkey in this work are functional. *Ceae-DRB1*0701* might be an exception, since it contains serine (S) at position 82 instead of asparagine, and it has been described that the presence of S82 in murine DRB molecules impairs both the in-

tracellular transport of the protein and its expression (42). The only nonhuman primate alleles with serine at position 82 correspond to the probably non-presenting *DRB6* molecules (*Gogo-DRB6*0202*, *Gogo-DRB6*0203*, *Popy-DRB6*0201*, and *Popy-DRB6*0202*) (1). Interestingly, the three green monkeys showing duplicated *DRB1* genes bear the S82-positive allele (*Ceae-DRB1*0701*). Although it is difficult to establish which of the two following events arose in the first place: 1) a *DRB1* gene duplication, or 2) a putative inactivation of the *Ceae-DRB1*0701* allele by means of the S82 mutation, selective forces might be working to put duplicated and defective *DRB1* genes together in the same haplotype. This would maintain, at the individual level, a subset of presenting molecules large enough to deal with different antigenic peptides, but not as excessive as to delete a number of T-cell clones in the thymus which would originate a functional hole in the repertoire (10).

References

- O'Uigin C, Bontrop R, Klein J. Nonhuman primate *Mhc-DRB* sequences: a compilation. *Immunogenetics* 1993; **38**: 165–83.
- Slierendregt BL, Otting N, van Besouw N, Jonker M, Bontrop RE. Expansion and contraction of Rhesus macaque *DRB* regions by duplication and deletion. *J Immunol* 1994; **152**: 2298–307.
- Lakshmi KG, Nepom GT. Ancestral major histocompatibility complex *DRB* genes beget conserved patterns of localized polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; **93**: 5380–3.
- Gaur LK, Nepom GT, Snyder KE et al. MHC-DRB allelic sequences incorporate distinct intragenic trans-specific segments. *Tissue Antigens* 1997; **49**: 342–55.
- Paz-Artal E, Corell A, Varela P et al. Primate DRB6 gene expression and evolution: a study in *Macaca mulatta* and *Cercopithecus aethiops*. *Tissue Antigens* 1996; **47**: 222–7.
- Knapp LA, Cadavid LF, Eberle ME, Knechtle SJ, Bontrop RE, Watkins DI. Identification of new *Mamu-DRB* alleles using DGGE and direct sequencing. *Immunogenetics* 1997; **45**: 171–9.
- Trtkova K, Mayer WE, O'Uigin C, Klein J. *Mhc-DRB* genes and the origin of New World monkeys. *Mol Phylogenet Evol* 1995; **4**: 408–19.
- Gyllensten U, Bergström T, Josefsson A et al. The cotton-top tamarin revisited: *Mhc* class I polymorphism of wild tamarins, and polymorphism and allelic diversity of the class II *DQA1*, *DQB1* and *DRB* loci. *Immunogenetics* 1994; **40**: 167–76.
- Figuerola F, O'Uigin C, Tichy H, Klein J. The origin of the primate *Mhc-DRB* genes and allelic lineages as deduced from the study of prosimians. *J Immunol* 1994; **152**: 4455–65.

10. Bontrop RE, Otting N, Sliereendregt BL, Lanchbury JS. Evolution of major histocompatibility complex polymorphisms and T-cell receptor diversity in primates. *Immunol Rev* 1995; **143**: 33–62.
11. Klein J. Origin of major histocompatibility complex polymorphism: the trans-species hypothesis. *Hum Immunol* 1987; **19**: 155–62.
12. Alvarez M, Martinez-Laso J, Varela P et al. High polymorphism of *Mhc-E* locus in non-human primates: alleles with identical exon 2 and 3 are found in two different species. *Tissue Antigens* 1997; **49**: 160–7.
13. Suarez B, Morales P, Castro MJ et al. *Mhc-E* polymorphism in *Pongidae* primates: the same allele is found in two different species. *Tissue Antigens* 1997; **50**: 695–8.
14. Kenter M, Otting N, Anholts J, Jonker M, Schipper R, Bontrop RE. *Mhc-DRB* diversity of the chimpanzee (*Pan troglodytes*). *Immunogenetics* 1992; **37**: 1–11.
15. Hill AVS. HLA associations with malaria in Africa: some implications for MHC evolution. NATO ASI Series, Vol. H 59. In: Klein J, ed. *Molecular evolution of the Major Histocompatibility Complex*. Berlin: Springer-Verlag, 1991: 403–20.
16. Arnaiz-Villena A, Martinez-Laso J, Corell A et al. Frequencies of HLA-A24 and HLA-DR4-DQ8 are increased and that of HLA-B*BLANK is decreased in chronic toxic oil syndrome. *Eur J Immunogenet* 1996; **23**: 211–9.
17. Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC et al. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* 1993; **364**: 33–9.
18. Hughes AL, Nei M. Nucleotide substitution at major histocompatibility complex class II loci: evidence for overdominant selection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; **86**: 958–62.
19. Emmrich F, Strittmatter U, Eichmann K. Synergism in the activation of human CD8 T cells by cross-linking the T-cell receptor complex with the CD8 differentiation antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; **83**: 8298–302.
20. Rosoff PM, Burakoff SJ, Greenstein JL. The role of the L3T4 molecule in mitogen and antigen-activated signal transduction. *Cell* 1987; **49**: 845–53.
21. Veillette A, Bookman MA, Horak EM, Bolen JB. The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56lck. *Cell* 1988; **55**: 301–8.
22. Von Boehmer H. The developmental biology of T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 1988; **6**: 309–26.
23. Corell A, Martin-Villa JM, Morales P et al. Exon-2 nucleotide sequences, polymorphism and haplotype distribution of a new HLA-DRB gene: HLA-DRB σ . *Mol Immunol* 1991; **28**: 533–43.
24. Todd JA, Bell JI, McDevitt HO. HLA-DQ beta gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature* 1987; **329**: 599–604.
25. Marsh SG, Bodmer J. HLA class II region nucleotide sequences, 1995. *Tissue Antigens* 1995; **45**: 258–80.
26. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987; **4**: 406–25.
27. Kimura MA. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 1980; **16**: 111–20.
28. Nei M, Gotohori T. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol Biol Evol* 1986; **3**: 418–26.
29. Jukes TH, Cantor CR. Evolution of protein molecules. In: Munro HN, ed. *Mammalian protein metabolism*. San Diego: Academic Press, 1969: 21–132.
30. Felsenstein J. *PHYLIP (Phylogenetic Inference Package 3.5c)*. University of Washington, 1993.
31. Klein J, Bontrop RE, Dawkins RL et al. Nomenclature for the major histocompatibility complexes of different species: a proposal. *Immunogenetics* 1990; **31**: 217–9.
32. McAdam SN, Boyson JE, Liu X et al. Chimpanzee MHC class I A locus alleles are related to only one of the six families of human A locus alleles. *J Immunol* 1995; **154**: 6421–9.
33. Trtková K, Kupfermann H, Grahovac B et al. *Mhc-DRB* genes of platyrrhine primates. *Immunogenetics* 1993; **38**: 210–22.
34. Gyllensten UB, Sundvall M, Erlich HA. Allelic diversity is generated by intra-exon sequence exchange at the *DRB1* locus of primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; **88**: 3686–90.
35. Gyllensten U, Sundvall M, Ezcurra I, Erlich HA. Genetic diversity at class II DRB loci of the primate MHC. *J Immunol* 1991; **146**: 4368–76.
36. Bergström T, Gyllensten U. Evolution of Mhc class II polymorphism: the rise and fall of class II gene function in primates. *Immunol Rev* 1995; **143**: 13–31.
37. Kaufman JF, Auffray C, Korman AJ, Shackelford DA, Strominger J. The class II molecules of the human and murine major histocompatibility complex. *Cell* 1984; **36**: 1–13.
38. Demotz S, Barbey C, Corradin G, Amoroso A, Lanzavecchia A. The set of naturally processed peptides displayed by DR molecules is tuned by polymorphism of residue 86. *Eur J Immunol* 1993; **23**: 425–32.
39. Verreck FAW, Termijtelen A, Koning F. HLA-DR β chain residue 86 controls DR $\alpha\beta$ dimer stability. *Eur J Immunol* 1993; **23**: 1346–50.
40. Cammarota G, Scheirle A, Takacs B et al. Identification of a CD4 binding site on the β 2 domain of HLA-DR molecules. *Nature* 1992; **356**: 799–801.
41. König R, Huang LY, Germain RN. MHC class II interaction with CD4 mediated by a region analogous to the MHC class I binding site for CD8. *Nature* 1992; **356**: 796–8.
42. Griffith IJ, Nabavi N, Ghogawala Z et al. Structural mutation affecting intracellular transport and cell surface expression of murine class II molecules. *J Exp Med* 1988; **167**: 541–55.

