

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**



**TESIS DOCTORAL**

**KIR2DL5: contribución a la diversidad del complejo de genes  
"KIR", expresión diferencial de sus alelos y distribución de  
potenciales ligandos**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Elisa Cisneros Leralta**

Director

**Miguel González Muñoz**

**Madrid, 2017**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**Programa de Doctorado en Investigación Biomédica**



**KIR2DL5: Contribución a la diversidad del complejo de  
genes *KIR*, expresión diferencial de sus alelos y distribución  
de potenciales ligandos**

**ELISA CISNEROS LERALTA**

**Madrid, 2016**



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE MEDICINA

Programa de Doctorado en Investigación Biomédica



**KIR2DL5: Contribución a la diversidad del complejo de genes *KIR*,  
expresión diferencial de sus alelos y distribución de potenciales  
ligandos**

**ELISA CISNEROS LERALTA**

**DIRECTOR: BLAS CARLOS VILCHES RUIZ**

**MADRID, 2016**



## **Agradecimientos**

---



## **Abreviaturas**

---



AcMo, Anticuerpo Monoclonal  
ADCC, Citotoxicidad Celular Dependiente de Anticuerpos  
ADN, Ácido Desoxirribonucleico  
ADNc, Ácido Desoxirribonucleico Complementario  
ARN, Ácido Ribonucleico  
ARNm, Ácido Ribonucleico mensajero  
CEACAMs, moléculas de adhesión relacionadas con el antígeno carcinoembrionario humano, *Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules*  
kb, kilobases  
kDa, KiloDalton  
DAP-12, *DNAX-activating protein of 12 kDa*  
Fc, Fragmento cristizable de las inmunoglobulinas  
FcγR, Receptor para el Fragmento cristizable de la IgG  
hCMV, Citomegalovirus humano  
HLA, Antígeno Leucocitario Humano  
IFN, Interferón  
Ig, Inmunoglobulina  
IHW, Taller Internacional de Histocompatibilidad, *Internacional Histocompatibility Workshop*  
IPD, *Immuno Polymorphism Database*  
ITIM, Secuencia Inhibidora de Inmunoreceptores que contienen Tirosinas, *Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motifs*  
ITSM, Secuencia Activadora o Inhibidora de Inmunoreceptores que contienen Tirosinas, *Immunoreceptor Tyrosine-based Switch Motif*  
KIR, Receptores de células citotóxicas de la superfamilia de las inmunoglobulinas, *Killer-cell Ig-like Receptor*  
KLRG1, Receptor inhibitor de células citotóxicas de la familia de las lectinas, *Receptor killer-cell lectin like receptor G1*  
LAIR, Receptor de la superfamilia de las inmunoglobulinas asociado a linfocitos, *Leukocyte Associated Ig-like Receptors*  
LILR, Receptores leucocitarios de la superfamilia de las inmunoglobulinas *Leukocyte Immunoglobulin-Like Receptor family*  
LRC, Complejo de Receptores Leucocitarios, *Leukocyte Receptor Complex*  
MFI, Media de la Intensidad de Fluorescencia, *Mean Fluorescent Intensity*  
MHC, Complejo Principal de Histocompatibilidad  
MIC, Productos relacionados con la cadena del MHC de clase I, *MHC class I chain-related*  
MIP-1, Proteína inflamatoria de macrófagos, *macrophage inflammatory protein 1*  
NCR, Receptor activador de la Citotoxicidad Natural, *Natural Cytotoxicity triggering receptor*  
NK, Célula Citotóxica Natural, *Natural Killer Cell*  
NKC, Complejo NK, *NK Complex*  
pb, pares de bases

PBMCs, Células Mononucleares de sangre periférica, *Peripheral Mononuclear Blood Cells*  
PBS, Tampón fosfato salino  
PCR, Reacción en Cadena de la Polimerasa  
PCR-SSOP, PCR e hibridación con sondas oligonucleotídicas específicas de secuencia  
PCR-SSP, PCR con oligonucleótidos específicos de secuencia  
RT-PCR, Transcripción Inversa-PCR  
RUNX, Proteína relacionada con runt, *Runt-related Protein*  
SHP, Fosfatasa con dominios con homología a Scr, *Scr-homology domain-bearing tyrosine phosphatases*  
SNP, Polimorfismo de un Solo Nucleótido  
TCR, Receptor de Células T  
TLR, *Toll-like Receptor*  
TNF, Factor de Necrosis Tumoral  
TRAIL, Ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral, *TNF-related apoptosis-inducing ligand*  
ULBP, Proteína de unión a UL16, *UL16 binding protein 1*  
WB, Western Blot  
3'nt, región 3' no traducida  
5'nt, región 5' no traducida

## Índice

---



<b>Summary</b> .....	1
<b>Resumen</b> .....	9
<b>Introducción</b> .....	17
1. Las células NK.....	17
2. Los receptores de células NK para moléculas MHC-I.....	20
3. <i>Killer-cell Ig-like Receptors</i> (KIR) .....	21
3.1. Estructura y nomenclatura.....	21
3.2. Ligandos .....	23
3.3. Organización de los genes <i>KIR</i> .....	25
3.3.1. El complejo LRC .....	25
3.3.2. Genes <i>KIR</i> : estructura .....	25
3.3.3. Haplotipos y semihaplotipos <i>KIR</i> .....	27
3.3.4. Polimorfismo alélico .....	29
3.3.5. Generación de la diversidad .....	31
3.4. Expresión de los genes <i>KIR</i> .....	31
4. KIR2DL5.....	32
4.1. Organización genética .....	34
4.2. Polimorfismo alélico .....	36
4.2.1. Polimorfismo en la región codificante .....	36
4.2.2. Polimorfismo en la región del promotor proximal .....	37
4.2.3. Distribución de los alelos de <i>KIR2DL5</i> .....	38
4.3. Expresión .....	38
4.3.1. Transcripción.....	38
4.3.2. Expresión en superficie .....	40
4.4. KIR2DL5, un receptor huérfano.....	41
<b>Objetivos</b> .....	45
<b>Materiales y Métodos</b> .....	49
0. Métodos generales .....	49
1. Diversidad del complejo de genes <i>KIR</i> en la población española .....	50
1.1. Donantes, muestras y aislamiento de ADN .....	50
1.2. Determinación de haplotipos <i>KIR</i> .....	50
1.3. Genotipado <i>KIR</i> y otros análisis genéticos .....	52
1.3.1. Secuenciación de <i>KIR3DL1</i> .....	52
1.3.2. PCR-SSP para la detección de <i>KIR2DL3*033</i> .....	53
1.4. Caracterización genómica de <i>KIR2DL3*033</i> y genes flanqueantes .....	53
1.5. Caracterización genómica de <i>KIR2DL5B*002-EC</i> y genes flanqueantes.....	54
1.6. Secuenciación de ADN y análisis .....	56
1.7. Análisis de datos .....	57
1.8. Citometría de flujo.....	57
2. Análisis de expresión de los alelos del gen <i>KIR2DL5A</i> .....	58
2.1. Construcciones KIR2DL5A-FLAG.....	58
2.2. Generación de transfectantes HEK-293T 2DL5-FLAG y Jurkat 2DL5-FLAG .....	59
2.3. <i>Western blot</i> .....	59
2.4. Citometría de flujo.....	60
2.5. Microscopía confocal .....	61
2.6. Modelado molecular de KIR2DL5A*001 y *005 .....	62
2.7. Análisis de datos.....	63
3. Búsqueda de ligandos potenciales de KIR2DL5 .....	63
3.1. Líneas celulares y cultivo .....	63
3.1.1. Generación de los transfectantes de HLA-F .....	65
3.2. Generación de las construcciones KIR-CD3 $\zeta$ .....	66
3.3. Generación de transfectantes BWZ.36 KIR-CD3 $\zeta$ .....	67
3.4. Ensayo de activación mediante cuantificación de actividad $\beta$ -galactosidasa por quimioluminiscencia .....	68

3.5. Generación de las construcciones KIR-Fc .....	69
3.6. Transfección y producción de las proteínas de fusión KIR-Fc .....	69
3.7. Citometría de flujo.....	70
3.8. Análisis de datos.....	71
<b>Resultados</b> .....	75
1. Diversidad del complejo de genes <i>KIR</i> en la población española .....	75
1.1. Análisis de genotipos y haplotipos comunes .....	75
1.1.1. Diversidad de genotipos <i>KIR</i> : perfiles genéticos y frecuencias.....	75
1.1.2. Análisis de semihaplotipos centroméricos y teloméricos.....	78
1.2. Análisis de ordenamientos genéticos atípicos .....	82
1.3. Caracterización de un nuevo gen quimérico producto de la recombinación entre <i>KIR2DS2</i> y <i>KIR2DL3</i> : <i>KIR2DL3*033</i> .....	88
1.4. Caracterización de un nuevo alelo <i>KIR2DL5B</i> con capacidad de transcribirse: <i>KIR2DL5B*002-EC</i> .....	94
2. Análisis de expresión de los alelos del gen <i>KIR2DL5A</i> .....	96
2.1. El alelo <i>KIR2DL5A*005</i> no es detectado en la superficie de células NK con el AcMo anti-KIR2DL5 UP-R1 .....	96
2.2. Análisis predictivo de modificaciones post-traduccionales y señales de localización subcelular y plegamiento en <i>KIR2DL5A*001</i> y <i>KIR2DL5A*005</i> .....	98
2.3. El producto del alelo <i>KIR2DL5A*005</i> se expresa pobremente en la superficie de células transfectadas .....	100
2.4. El anticuerpo UP-R1 reconoce a <i>KIR2DL5A*005</i> peor que a <i>KIR2DL5A*001</i> .....	102
2.5. Influencia de los polimorfismos G174S y N152D de <i>KIR2DL5A*005</i> sobre su expresión y su reconocimiento por UP-R1.....	103
2.6. Los perfiles de expresión de <i>KIR2DL5A</i> en células Jurkat transfectadas se asemejan a la expresión natural en células NK .....	105
2.7. <i>KIR2DL5A*005</i> es retenido mayoritariamente en el interior celular.....	107
2.8. Predicción de la estructura tridimensional del dominio D2 de <i>KIR2DL5A*001</i> y <i>KIR2DL5A*005</i> .....	108
3. Búsqueda de ligandos potenciales de <i>KIR2DL5</i> .....	110
3.1. Generación de construcciones y transfectantes KIR-CD3ζ.....	110
3.2. Validación del sistema reportero BWZ.36 KIR-CD3ζ .....	112
3.3. Cribado de paneles de líneas celulares.....	113
3.3.1. Células linfoblastoideas con distintos fenotipos HLA .....	115
3.3.2. Líneas celulares defectivas en moléculas HLA-I y transfectantes de moléculas HLA-B y C.....	117
3.3.3. Transfectantes que sobreexpresan moléculas HLA no clásicas .....	118
3.3.4. Transfectantes que sobreexpresan moléculas MHC-like .....	120
3.3.5. Líneas celulares y células primarias humanas de origen hematopoyético y no hematopoyético .....	121
3.3.6. Líneas celulares no humanas .....	123
3.4. Experimentos de bloqueo .....	124
3.5. Validación de los resultados de los ensayos de activación mediante citometría de flujo con proteínas de fusión KIR-Fc .....	127
<b>Discusión</b> .....	133
<b>Conclusiones</b> .....	150
<b>Bibliografía</b> .....	154
<b>Anexo</b> .....	171

## **Summary**

---



## **KIR2DL5: Contribution to *KIR* complex diversity, differential expression of its alleles and potential ligands distribution**

### **Background**

Allelic polymorphism and copy-number variation confer enormous diversity to human *KIR* genotypes. The *KIR* complex includes only three relatively well-conserved blocks: the genes at its centromeric (*KIR3DL3*) and telomeric (*KIR3DL2*) ends and the central cluster (*KIR3DP1-2DL4*). These flank two regions containing variable combinations of all other *KIR* genes. Furthermore, unusual *KIR*-gene combinations that present deletions, insertions and fusion genes (many of them coding for new proteins with new features and functions) contribute to the variability of the *KIR* complex. The distribution of *KIR*-gene combinations (“*KIR* haplotypes”) varies remarkably in different ethnic groups and world regions.

An example of copy number variation and allelic polymorphism is *KIR2DL5*; the most recently described human *KIR*. It is expressed on generally small subsets of NK and T lymphocytes. *KIR2DL4* and *KIR2DL5* are the only members of an ancestral lineage of *KIR* with immunoglobulin-like domains of the D0-D2 type, which distinguishes them from all other *KIR2Ds*, having domains of the D1-D2 type that recognize HLA-C molecules. *KIR2DL5* is represented in the human Leukocyte Receptor Cluster by two genes, the telomeric *KIR2DL5A* and the centromeric *KIR2DL5B*, both of which show copy-number variation. While mRNA of most *KIR2DL5B* alleles is undetectable, *KIR2DL5A* is normally transcribed. However, *KIR2DL5* surface expression, as assessed by flow cytometry with the specific monoclonal antibody UP-R1, is not seen in every human having a transcribed *KIR2DL5A* gene, which relates to allelic polymorphism. In particular, of the most common alleles, *KIR2DL5A*\*001 and *KIR2DL5A*\*005, differing by two amino acid

substitutions in the D2 domain (N152D and G174S), only KIR2DL5A\*001 has been demonstrated to be expressed on the cell surface. Surface expression profiles and UP-R1 recognition of KIR2DL5A\*005 and other transcribed alleles are unknown.

KIR2DL5 role in immunity is not well understood because its ligand has not yet been identified. Demonstration that KIR2DL5 is capable of inhibiting NK cells cytotoxic response suggested that it participated in NK-cell mediated defense according to the missing self model. Furthermore, identification of NK cells which express KIR2DL5 and lack all other detectable inhibitory KIR and NKG2A, suggested the existence of a cellular ligand, possibly expressed in physiological conditions.

## **Objectives**

1. To explore the diversity of *KIR* genotypes in the Spanish population and determine the distribution of common and unusual haplotypes.
3. To determine the influence of KIR2DL5A ectodomain polymorphisms on the variability of NK-cell phenotype.
4. To design a cell-based assay to explore the distribution of KIR2DL5 potential ligands.

## **Methodology and Results**

### *1. KIR Complex diversity in Spanish population*

Homo- and heterozygous combinations of common haplotypes explained the diversity seen in 95% of the individuals. Sixty-five per cent of centromeric haplotypes and 76.3% of telomeric ones were of the A-type, which encode mostly inhibitory KIR. On the centromeric side, two B-type haplotypes (cB01 and cB02), coding for one or two activating KIR, were represented at frequencies of 16.6% and 17.2%, respectively. On the telomeric side, 24% of haplotypes were of the tB01 type, encoding three activating

KIR; of those, approximately two-thirds carried *KIR2DS5*, whilst one-third had its *KIR2DS3* allotype. KIR frequencies were similar to those observed in other Caucasoid populations.

Approximately, 5% of genotypes matched no combination of canonical haplotypes, but were explained in many cases by uncommon or recombinant structures previously described by us and others. One anomalous genotype (apparent presence of *KIR2DS2* in the absence of *KIR2DL2*) led us to discover a new fusion gene, now officially designated *KIR2DL3\*033*. The hybrid gene encodes a receptor combining the inhibitory cytoplasmic tail of *KIR2DL3* and the *KIR2DS2* ectodomain. Finally, unusual location of the *KIR2DL5-2DS3* block in an A haplotype was associated to a new, potentially transcribed, *KIR2DL5B* allele, *KIR2DL5B\*002-EC* (local name).

## 2. Analysis of differential surface expression of *KIR2DL5A* alleles

Flow cytometry experiments showed that *KIR2DL5A\*005* is not detected on the surface of resting and expanded NK cells with UP-R1 mAb. To investigate molecular basis of the *KIR2DL5A\*005* unusual phenotype we analysed surface and intracellular expression of HEK293T and Jurkat cells transfected with tagged constructs representing common *KIR2DL5* polymorphisms. Our results showed significant differences in expression patterns of *KIR2DL5A* alleles. Although *KIR2DL5A\*005* is translated it is less expressed on the cell surface than *KIR2DL5A\*001*. Confocal microscopy experiments verified that *KIR2DL5A\*005*, but not *\*001*, is retained intracellularly. Regarding UP-R1 staining, *KIR2DL5A\*005* is recognised by the antibody worse than *KIR2DL5A\*001*. Finally, our results demonstrated that polymorphisms in the D2 domain, with a major contribution of G174S, are responsible for the intracellular confinement as well as the worse UP-R1 recognition of *KIR2DL5A\*005*, explaining its unusual phenotype.

### 3. Search for *KIR2DL5* potential ligands

To explore the distribution of *KIR2DL5* potential ligands we generated two hybrid constructs comprising the Ig-like domains and the stem region of *KIR2DL5A\*00101* or *KIR2DL1\*002*, and the transmembrane and cytoplasmic regions of the murine CD3 $\zeta$  molecule. Constructs were stably overexpressed on the murine T BWZ.36 cell line which enabled us to detect cell activation through chimeric KIR-CD3 $\zeta$  by  $\beta$ -gal activity quantification. BWZ.36 2DL5-CD3 $\zeta$  and 2DL1-CD3 $\zeta$  were exposed in vitro to cells panels possibly expressing *KIR2DL5* ligands which represented a broad range of polymorphic and non polymorphic MHC molecules and cell lines from different embryonic origins, developmental stages and species. Relevant interactions between 2DL5-CD3 $\zeta$  transfectant and HLA and MHC-like molecules were not found. Surprisingly, activation levels with human and primate epithelial cell lines and fibroblasts were significantly higher than those obtained with haematopoietic cells. Blocking experiments with anti-KIR/anti-HLA mAbs reinforced a *KIR2DL5*-non-MHC molecule interaction and results of flow cytometry experiments with *KIR2DL5*-Fc and *KIR2DL1*-Fc fusion proteins confirmed those obtained in cell-based assays.

### Conclusions

1. We performed the first comprehensive analysis of *KIR* genotypes and haplotypes distribution in Spanish population, to which unusual haplotypes contribute considerable diversity.
2. There are unusual *KIR* haplotypes which contain a normally transcribed hybrid gene, *KIR2DL3\*033*, derived from asymmetric recombination between *KIR2DS2* and *KIR2DL3*.

3. There are unusual *KIR* haplotypes where *KIR2DL5B-2DS3* block is located in an A haplotype and are associated to a new potentially transcribed *KIR2DL5B* allele, *KIR2DL5B\*002-EC*.
4. UP-R1 recognizes *KIR2DL5A\*005* worse than *KIR2DL5A\*001*.
5. *KIR2DL5A\*005* is retained intracellularly due to a serine for glycine substitution in the D2-domain which is also the main responsible for its worse UP-R1 mAb recognition.
6. BWZ.36 KIR-CD3 $\zeta$ - based assay has proven to be an effective system to analyze the distribution of KIR potential ligands.
7. *KIR2DL5* appears to recognize non-MHC molecules mainly expressed on non-haematopoietic cells, and possibly conserved in primates.



**Resumen**

---



## **KIR2DL5: Contribución a la diversidad del complejo *KIR*, expresión diferencial de sus alelos y distribución de potenciales ligandos**

### **Antecedentes**

El polimorfismo alélico y la variación en el número de copias confieren una elevada diversidad a los genotipos *KIR*. El complejo *KIR* incluye sólo tres bloques relativamente bien conservados: los genes en los extremos centromérico (*KIR3DL3*) y telomérico (*KIR3DL2*) y la agrupación central (*KIR3DP1-2DL4*). Dichos bloques flanquean dos regiones que contienen distintas combinaciones del resto de genes *KIR*. Además, combinaciones de genes *KIR* atípicas que presentan deleciones, inserciones y genes de fusión contribuyen a la variabilidad del complejo. La distribución de las combinaciones de genes *KIR* que se heredan juntas en un orden dado (“haplotipos *KIR*”) varía notablemente entre distintas poblaciones.

Un ejemplo de polimorfismo alélico y variación en el número de copias es *KIR2DL5*, el *KIR* más recientemente descrito en humanos, que se expresa en subpoblaciones de linfocitos T y células NK. Junto con *KIR2DL4* son los dos únicos miembros de un linaje ancestral de *KIR* con dominios tipo Ig D0-D2, lo que los distingue del resto de *KIR2Ds*, con dominios D1-D2 que reconocen moléculas HLA-C. *KIR2DL5* está representado en el genoma por dos genes, el telomérico *KIR2DL5A* y el centromérico *KIR2DL5B*, ambos presentan variación en el número de copias. Mientras que el ARNm de la mayoría de alelos *KIR2DL5B* es indetectable, *KIR2DL5A* es transcrito normalmente. Sin embargo, la expresión en superficie de *KIR2DL5*, determinada mediante citometría de flujo con el AcMo UP-R1, no es detectada en todos los individuos que presentan un gen *KIR2DL5A* transcrito, lo que está relacionado con el polimorfismo alélico. En concreto, de los alelos más comunes, *KIR2DL5A\*001* y *KIR2DL5A\*005*, que difieren en dos sustituciones de aminoácido en el dominio D2

(N152D y G174S), sólo se ha demostrado la expresión en superficie de KIR2DL5A\*001. Los perfiles de expresión y el reconocimiento por UP-R1 de KIR2DL5A\*005 y otros alelos transcritos es desconocida.

El papel en la inmunidad de KIR2DL5 no se comprende bien porque todavía no se ha identificado su ligando. La demostración de que KIR2DL5 es capaz de inhibir la respuesta citotóxica de las células NK sugiere que participa en la defensa mediada por célula NK de acuerdo con el modelo del “missing self”. Además, la identificación de células NK que expresan KIR2DL5 y carecen de cualquier otro KIR inhibitor así como de NKG2A, sugiere la existencia de un ligando celular, posiblemente expresado en condiciones fisiológicas.

### **Objetivos**

1. Estudiar la diversidad de genotipos *KIR* en la población española y determinar la distribución de haplotipos canónicos e inusuales.
2. Determinar la influencia de los polimorfismos de la región extracelular de KIR2DL5A sobre la variabilidad fenotípica de las células NK.
3. Diseñar un sistema celular para estudiar la distribución de ligandos potenciales de KIR2DL5.

### **Metodología y Resultados**

#### *1. Diversidad del complejo KIR en población española*

En el 95% de los individuos la diversidad se explica por combinaciones homo- y heterocigotas de haplotipos comunes. El sesenta y cinco por ciento de los haplotipos centroméricos y el 76,3% de los teloméricos fueron de tipo A, el cuál presenta mayoritariamente KIR inhibidores. En el lado centromérico, dos haplotipo de tipo B (cB01 y cB02), que codifican para uno o dos KIR activadores, estaban representados

con frecuencias del 16,6% y 17,2%, respectivamente. En el lado telomérico, el 24% de los haplotipos fueron de tipo tB01, que codifica para tres KIR activadores; de ellos, unos dos tercios portaban *KIR2DS5*, mientras que un tercio presentaba su alotipo *KIR2DS3*. Las frecuencias de los *KIR* fueron similares a las observadas en otras poblaciones caucásicas.

Veinte individuos (5,0%) tenían una dotación de genes *KIR* que no se ajustaba a ninguna combinación de haplotipos canónicos. La mayoría se explicaban mediante estructuras recombinantes o inusuales descritas previamente. Un genotipo inusual (presencia aparente de *KIR2DS2* en ausencia de *KIR2DL2*) nos condujo a la identificación de un nuevo gen de fusión, designado oficialmente como *KIR2DL3\*033*. El gen híbrido codifica un receptor que combina el tallo intracitoplásmico inhibitor de *KIR2DL3* con el dominio extracelular de *KIR2DS2*. Por último, la localización inusual del bloque *KIR2DL5-2DS3* en un haplotipo A se asoció a un nuevo alelo *KIR2DL5B* potencialmente transcribible, *KIR2DL5B\*002-EC* (nombre local).

## 2. Análisis de los patrones de expresión en superficie de los alelos *KIR2DL5A*

Experimentos de citometría de flujo con el AcMo UP-R1 mostraron que *KIR2DL5A\*005* no es detectado sobre la superficie de células NK frescas ni expandidas. Para investigar las bases moleculares del fenotipo inusual de *KIR2DL5A\*005* analizamos la expresión en superficie e intracelular de células HEK293T y Jurkat transfectadas con construcciones marcadas con el epítipo FLAG que representaban el polimorfismo común de *KIR2DL5*. Nuestros resultados mostraron diferencias significativas en los patrones de expresión de los alelos *KIR2DL5A*. Aunque *KIR2DL5A\*005* es traducido normalmente se expresa pobremente en la superficie celular. Experimentos de microscopía confocal demostraron que *KIR2DL5A\*005* y no *KIR2DL5A\*001* es retenido en el interior de la célula. En lo que

respecta a UP-R1, KIR2DL5A\*005 es peor reconocido por el anticuerpo que KIR2DL5A\*001. Finalmente, nuestros resultados demostraron que los polimorfismos N152D y G174S del dominio D2 de KIR2DL5A, con una mayor contribución del segundo, son los responsables tanto de la retención intracelular como del peor reconocimiento de KIR2DL5A\*005 por UP-R1, lo que explica su fenotipo inusual.

### 3. Búsqueda de potenciales ligandos de KIR2DL5

Para investigar la distribución de potenciales ligandos de KIR2DL5 generamos dos construcciones híbridas formadas por los dominios tipo Ig y el tallo de KIR2DL5A\*00101 o KIR2DL1\*002, y las regiones transmembrana e intracitoplásmica de la molécula CD3 $\zeta$  murina. Las construcciones se sobreexpresaron de manera estable en la línea celular T murina BWZ.36, lo que nos permitía detectar la activación de la célula a través de las construcciones quiméricas KIR-CD3 $\zeta$  mediante la cuantificación de la actividad  $\beta$ -gal. Los transfectante BWZ.36 2DL5-CD3 $\zeta$  y 2DL1-CD3 $\zeta$  se enfrentaron in vitro a un panel de células que pudieran expresar ligandos de KIR2DL5 y que representaban un amplio rango de moléculas polimórficas y no polimórficas del MHC y líneas celulares de distintos orígenes embrionarios, estados de desarrollo y especies. No se observaron interacciones relevantes entre el transfectante 2DL5-CD3 $\zeta$  y moléculas HLA o MHC-like. Inesperadamente, los niveles de activación con líneas celulares epiteliales y fibroblastos humanos y de primate fueron significativamente mayores que los obtenidos con células hematopoyéticas. Experimentos de bloqueo con AcMo anti-KIR/anti-HLA reforzaron la interacción de KIR2DL5 con una molécula no MHC y los resultados de experimentos de citometría de flujo con las proteínas de fusión KIR2DL5-Fc y KIR2DL1-Fc confirmaron los obtenidos en los ensayos celulares.

## Conclusiones

1. Hemos realizado el primer análisis detallado en población española sobre la distribución de genotipos y haplotipos KIR, donde los haplotipos atípicos contribuyen de forma considerable a la diversidad
2. Existen haplotipos *KIR* inusuales que presentan un gen híbrido *KIR2DL3\*033*, que parece derivar de un sobrecruzamiento desigual entre *KIR2DS2* y *KIR2DL3* y es transcrito normalmente.
3. Existen haplotipos *KIR* inusuales donde el bloque *KIR2DL5B-2DS3* se localiza en un haplotipo A. Un nuevo alelo *KIR2DL5B* potencialmente transcribible se asocia a dicho haplotipo recombinante.
4. El anticuerpo UP-R1 reconoce a *KIR2DL5A\*005* peor que a *KIR2DL5A\*001*.
5. *KIR2DL5A\*005* es retenido mayoritariamente en el interior celular debido a la sustitución de glicina por serina en la posición 174 de su dominio D2, la cuál es también la principal responsable de su peor reconocimiento por UP-R1.
6. El sistema celular reportero BWZ.36 KIR-CD3 $\zeta$  ha demostrado ser un sistema efectivo para el análisis de la distribución de potenciales ligandos de los KIR.
7. *KIR2DL5* parece reconocer una molécula no MHC expresada mayoritariamente en células de origen no hematopoyético y posiblemente conservado en primates.



## **Introducción**

---



## 1. Las células NK

Mientras estudiaban la citotoxicidad celular frente a tumores, Kiessling et al (1975), descubrieron un grupo de linfocitos con actividad citotóxica selectiva sin necesidad de sensibilización previa. Esta propiedad fue llamada citotoxicidad natural y a las células que mediaban este efecto se les denominó células citotóxicas naturales o NK (*Natural Killer cells*). Las células NK constituyen un 5-15% de los linfocitos de sangre periférica y están presentes también en proporción variable en tejidos linfoides (mayoritariamente en el bazo), así como en hígado, intestino, pulmón y la decidua uterina. Fenotípicamente, se caracterizan por la expresión en superficie de CD56 y la ausencia de CD3 y TCR (Trinchieri, 1989). Sin embargo, las células NK no constituyen una población homogénea. En humanos, dos subpoblaciones de células NK circulantes ( $CD56^+$ ,  $CD3^-$ ), se definen según la expresión relativa de los marcadores CD56 y CD16 (Cooper et al, 2001). Las células NK  $CD56^{dim}$   $CD16^+$ , constituyen ~90% de las células NK de sangre periférica, expresan niveles relativamente bajos de CD56 y elevados del receptor de baja afinidad para el fragmento cristalizante (Fc) de la IgG (CD16A o  $Fc\gamma RIII A$ ) y presentan una gran actividad citotóxica. Por el contrario, la población  $CD56^{bright}$   $CD16^-$ , constituye el ~10% de las células NK de sangre periférica. Presentan una elevada capacidad de proliferación y producción de citoquinas pero una escasa actividad citotóxica (Lanier et al, 1986). Es discutido si la subpoblación  $CD56^{bright}$  es precursora de las células NK  $CD56^{dim}$  mediante un proceso de diferenciación basado en la pérdida progresiva de determinados receptores de membrana y la adquisición de otros (Michel et al, 2016). Células NK con otras características fenotípicas y funcionales se han identificado en tejidos como hígado, intestino, pulmón, útero o amígdalas (Yu et al, 2013; Shi et al, 2011; Moffett-King, 2002).

Las células NK son componentes clave de la respuesta inmune innata frente a virus y tumores mediante su actividad citotóxica natural o dependiente de anticuerpos (vía

liberación de perforina y granzimas o la expresión de Fas-L o TRAIL) y la producción de citoquinas (como IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ ) y quimioquinas (MIP-1a/b, RANTES) que modulan otros mecanismos de las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas (Marras et al, 2014; Yu et al, 2013; Shi et al, 2011; Trinchieri, 1989).

Las células NK presentan un elevado número de receptores inhibidores y activadores que interactúan con sus ligandos en las células diana. Los receptores inhibidores, mayoritariamente, unen moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) presentes en la superficie de las células nucleadas, mientras que los activadores reconocen, en su mayoría, ligandos de estrés celular inducidos tras la transformación tumoral o la invasión viral (Li y Mariuzza, 2014; Lanier, 2005) (Tabla 1).

Familia y receptor	Ligandos	Función
<b>KIR</b>		
KIR2DL1	HLA-C2	Inhib.
KIR2DL2/ L3	HLA-C1, algunos HLA-C2	Inhib.
KIR2DL4	HLA-G, heparán sulfato	Inhib./Activ.
KIR2DL5	?	Inhib.
KIR3DL1	HLA-Bw4	Inhib.
KIR3DL2	HLA-A*03/*11, homodímeros HLA-B*27, CpG	Inhib.
KIR2DS1	HLA-C2	Activ.
KIR2DS2	HLA-A*11, HLA-C1	Activ.
KIR2DS3	?	Activ.
KIR2DS4	HLA-A*11, algunos HLA-C	Activ.
KIR2DS5	?	Activ.
KIR3DS1	?	Activ.
LILRB1	MHC-I, UL18	Inhib.
NKG2D	MICA/B, ULBP1-6	Activ.
<b>CD94-NKG2</b>		
NKG2A	HLA-E	Inhib.
NKG2C	HLA-E	Activ.
NKG2E	HLA-E	Activ.
<b>NCRs</b>		
NKp30	B7-H6, BAT-3, HSPG	Activ.
NKp44	Hemaglutinina viral	Activ.
NKp46	Hemaglutinina viral, HSPG	Activ.
NKp80	AICL	Activ.
CD16/Fc $\gamma$ RIII	Fc IgG	Activ.
2B4/CD244	CD48	Activ.
KLRG1	Cadherinas	Inhib.
NKR-P1A	LLT-1	Activ.
DNAM-1	CD112, CD155	Act.
TIGIT	CD112, CD155	Inhib.

Tabla 1. Receptores de las células NK humanas.

Las moléculas MHC-I (en humanos HLA-I, *Human Leucocyte Antigen class I*) son glicoproteínas de membrana expresadas en las células nucleadas que presentan péptidos derivados de proteínas endógenas a los linfocitos T CD8+. En células tumorales o infectadas por virus, el reconocimiento de péptidos extraños asociados a las moléculas MHC-I por los linfocitos T lleva a su activación y a la eliminación de la célula diana. Sin embargo, frecuentemente dichas células tumorales o infectadas por virus alteran la presentación antigénica al bloquear la expresión en superficie de moléculas MHC-I, impidiendo su reconocimiento por los linfocitos T CD8+ (Tortorella et al, 2000). Las células NK neutralizan este mecanismo de sabotaje al reconocer y eliminar a las células que han perdido la expresión de moléculas MHC-I (Karre et al, 1986).

El modelo inicial sobre el control de la actividad lítica de la célula NK propone que los receptores inhibidores protegen a las células sanas de su ataque, mientras que las células con expresión anormalmente baja de moléculas MHC-I (células tumorales o infectadas por virus) se vuelven susceptibles a la lisis por la célula NK, concepto denominado como la hipótesis del “missing self” (ausencia de lo propio) (Karre et al, 1986). El modelo actual, más complejo, propone que la citotoxicidad espontánea de la célula NK es controlada por el equilibrio entre señales activadoras e inhibidoras (Lanier, 2005). Así, la célula NK no solo mata a las células que carecen de moléculas MHC-I, sino también a las que sobreexpresan ligandos de los receptores activadores. En consecuencia, cuando múltiples receptores activadores se unen a su ligando, la señal puede ser lo suficientemente fuerte como para superar la inhibición. Además, las células NK a través de CD16 reconocen células diana opsonizadas desencadenando una respuesta de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) que no necesita de ninguna otra señal activadora (Perussia et al, 1984).

## 2. Los receptores de células NK para moléculas MHC-I

En humanos, los receptores de células NK que reconocen moléculas MHC-I incluyen miembros tanto activadores como inhibidores pertenecientes a varias familias: los KIR (*Killer-cell Ig-like Receptors*), LILR (*Leukocyte Immunoglobulin-Like Receptors*) y CD94/NKG2.

Los heterodímeros CD94:NKG2, pertenecen a la superfamilia de receptores con homología a lectinas de tipo C, codificada en el complejo NK en el cromosoma 12. Las moléculas NKG2 están codificadas por cinco genes homólogos: *NKG2A*, *-C*, *-D*, *-E* y *-F*. Todos menos NKG2D y F forman heterodímeros con CD94 (codificado por un único gen) y reconocen moléculas HLA-E que presentan los péptidos señal de otras moléculas MHC-I (Braud et al, 1998; Lee et al, 1998). CD94:NKG2A es un receptor inhibidor mientras que CD94:NKG2C y E transmiten señales activadoras (Houchins et al, 1997; López-Botet et al, 1997).

Los LILR (*Leukocyte Immunoglobulin-Like Receptors*) se expresan en un amplio espectro de células de origen mieloide y linfoide. La familia LILR incluye miembros con 2-4 dominios tipo inmunoglobulina y colas citoplasmáticas largas o cortas que les proporcionan capacidad inhibidora o activadora, respectivamente (Colonna et al, 1999; Cosman et al, 1997). En concreto, LILRB1 es un receptor inhibidor que se expresa en la superficie de linfocitos NK, T, B y células mielomonocíticas y reconoce moléculas HLA-I (Borges et al, 1997) y también moléculas *MHC-like*, como la proteína UL18 (codificada por el hCMV) (Chapman et al, 1999).

En el ratón, la función de los receptores KIR es sustituida por los receptores Ly49. Los parecidos funcionales entre estas dos familias de receptores evidencian su evolución convergente e incluyen, como se explica a continuación, su expresión variegada en las células NK, la presencia de receptores tanto inhibidores como activadores, la señalización a través de ITIM y DAP-12 y el reconocimiento de

moléculas MHC-I. Sin embargo, genética y estructuralmente, son muy distintas: los KIR pertenecen a la superfamilia de receptores tipo Inmunoglobulina, mientras que los Ly49 son receptores tipo lectina C (Anderson et al, 2001; Tormo et al, 1999; Smith et al, 1998).

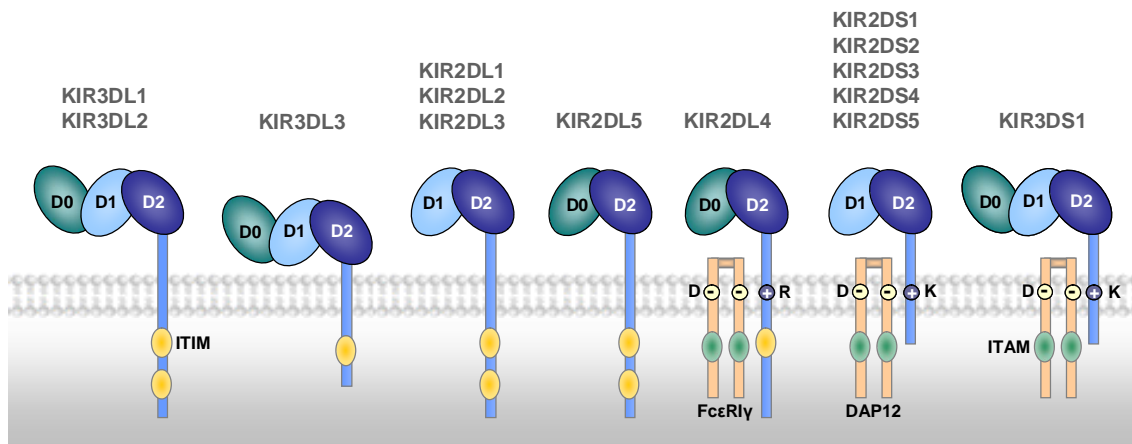
Los receptores para moléculas MHC-I, se piensa que también realizan un papel importante en el proceso de maduración de la célula NK denominado “educación”. En este proceso la célula NK debe expresar al menos un receptor inhibitor específico para una molécula MHC propia para adquirir competencia funcional (Joncker et al, 2010; Anfossi et al, 2006; Kim et al, 2005).

### **3. Killer-cell Ig-like Receptors (KIR)**

#### **3.1. Estructura y nomenclatura**

Los KIR son una familia de glicoproteínas transmembrana que presentan una región extracelular formada por dominios tipo Ig involucrada en la unión al ligando y un tallo transmembrana y una cola intracitoplásmica que definen el tipo de señal transducida por la célula NK. La familia KIR consta de 14 miembros entre los que existen importantes variaciones estructurales e incluye receptores inhibidores, activadores y algunos con función incierta (Lanier, 2005). La nomenclatura de los KIR está basada en su estructura (Marsh et al, 2003). Existen KIR con 2 o 3 dominios extracelulares de tipo Ig (denominados KIR2D y KIR3D, respectivamente) y con una cola intracitoplásmica larga (“*long*”, L) o corta (“*short*”, S). Los KIR3D presentan, del extremo N- al C-terminal, dominios D0, D1 y D2. Los KIR con dos dominios Ig se subdividen dependiendo del dominio Ig más distal que presenten. Los receptores KIR2D de tipo I, presentan un dominio D2 y un dominio distal D1. Los receptores KIR2D de tipo II tienen un dominio D2 y un dominio distal D0 (Figura 1). Los pseudogenes se designan con una P (KIR2DP/KIR3DP). El último dígito indica el número del gen que codifica un receptor con esa estructura. De esta manera, 2DL1,

2DL2 y 2DL3 serían receptores con 2 dominios extracelulares de tipo Ig y una cola citoplásmica larga.



**Figura 1. Estructura de los receptores KIR.**

Los KIR inhibidores presentan una cola citoplásmica larga (de 76 a 95 aminoácidos) con dos motivos ITIM (*Immunoreceptor Tyrosine- based Inhibitory Motifs*) compuestos por secuencias características (I/VxYxxL/V), separadas por 24 aminoácidos. Una vez fosforilados, tras la interacción con el ligando, reclutan las proteínas tirosina fosfatasas SHP-1 y 2 (*Src- homology domain-bearing tyrosine phosphatase*), que son críticas para mediar su función inhibidora (Campbell et al, 1996; Burshtyn et al, 1996). En cambio, los KIR activadores tiene una cola citoplásmica corta (20-30 aminoácidos), que carece de motivos señalizadores, pero contiene un residuo básico de lisina en la región transmembrana que les permite asociarse con la molécula adaptadora DAP-12 y generar señales activadoras (Lanier, 1998; Olcese et al, 1997).

Existen varias excepciones a las estructuras descritas. KIR2DL4 y KIR2DL5 poseen una cola citoplásmica 20-39 aminoácidos más larga que la del resto de KIR inhibidores (Vilches y Parham, 2002; Cantoni et al, 1999). Además, KIR2DL4 tiene un solo ITIM y presenta una arginina en la región transmembrana que le permite asociarse a FcRγ (Kikuchi-Maki et al, 2005) y transmitir señales intracelulares tanto activadores como

inhibidoras (Rajagopalan y Long, 1999). KIR3DL3 carece del tallo que conecta la región transmembrana con los dominios Ig y posee una cola citoplásmica de longitud intermedia y con un solo ITIM (Torkar et al, 1998).

### **3.2. Ligandos**

Los KIR para los que se ha definido su ligando reconocen, en su mayoría, motivos específicos de moléculas HLA-I (Tabla 1). Así, los alelos de HLA-C que portan lisina en la posición 80 (epítipo C2) son reconocidos por el receptor inhibidor KIR2DL1 y con menor afinidad por su homólogo activador KIR2DS1 (Winter y Long, 1997; Wagtmann et al, 1995; Colonna et al, 1993), mientras que KIR2DL2 y 2DL3 reconocen los que portan asparragina en la misma posición (epítipo C1) (David et al, 2013; Moesta et al, 2008). Sin embargo, KIR2DL2 y 2DL3 también interaccionan con varios alelos que contienen el epítipo C2 (Moesta et al, 2008). Las señales inhibitoras disparadas por la interacción 2DL2/L3-C1 son relativamente más débiles que las desencadenadas por la interacción 2DL1-C2 (Moesta et al, 2008). Aunque en varios estudios no se detectó afinidad de KIR2DS2, homólogo inhibidor de KIR2DL2, por HLA-C (Moesta et al, 2010; Winter et al, 1998) estudios más recientes muestran una unión de baja afinidad con el epítipo C1, e incluso, con moléculas HLA-A\*11 (Liu et al, 2014; David et al, 2013; Stewart et al, 2005). Otro receptor que parece reconocer HLA-A\*11, así como distintos alelos HLA-C que portan epítipos C1 o C2, es KIR2DS4 (Graef et al, 2009).

El epítipo Bw4 presente en el 40% de los alelos HLA-B y en HLA-A23, 24 y 32 es ligando del receptor KIR3DL1 (Thananchai et al, 2007; Gumperz et al, 1995). KIR3DL2 se une únicamente a los alelos HLA-A\*03 y A\*11 y la fuerza de la interacción parece ser muy sensible a la secuencia del péptido unido (Hansasuta et al, 2004; Pende et al, 1996). Se ha propuesto que el receptor KIR2DL4 se une a moléculas de HLA-G (Rajagopalan y Long, 1999; Ponte et al, 1999) pero hay datos contradictorios (Le Page et al, 2014). Los ligandos de 2DS3, 2DS5, 3DS1 y 2DL5 aún no se conocen; algunos estudios apuntan a una interacción de KIR3DS1 con alotipos Bw4 con isoleucina en la posición 80 (Alter et al, 2009; Alter et al, 2007; Martin et al, 2002). Sin embargo, una interacción directa entre KIR3DS1 y Bw4 no ha sido demostrada (Carr et al, 2007; O'Connor et al, 2007).

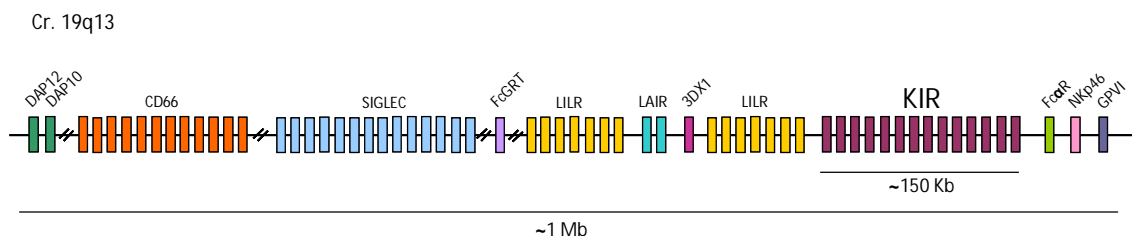
Estudios más recientes han descrito interacciones de varios KIR con moléculas no-HLA. KIR3DL2 (y en menor medida KIR3DL1, 3DS1 y 2DL4) reconoce a través de su dominio D0 oligodesoxinucleótidos de tipo CpG y los internaliza permitiendo que sean reconocidos por TLR9 en los endosomas (Sivori et al, 2010; Carr et al, 2007)). Por otro lado, KIR2DL4 puede interactuar a través del mismo dominio D0 con moléculas de heparán sulfato que podrían actuar como un regulador alostérico modulando la capacidad del receptor de unirse a otros ligandos (Brusilovsky et al, 2014; 2013).

La presencia o ausencia de algunos *KIR* y de sus ligandos en el genoma ha sido relacionada con el control o el desarrollo de varias enfermedades infecciosas, autoinmunes y neoplásicas, así como con complicaciones en la reproducción humana (Khakoo y Carrington, 2006; Parham, 2005; Rajagopalan y Long, 2005; Hiby et al, 2004).

### 3.3. Organización de los genes *KIR*

#### 3.3.1. El complejo LRC

En humanos, los genes *KIR* se localizan en una región de ~150 kb dentro del *Leukocyte Receptor Complex* (LRC), en la región cromosómica 19q13.4 (Wilson et al, 2000), constituyendo el Complejo *KIR*. Además, el LRC contiene otras familias génicas que codifican para otros receptores de la superfamilia de las Ig, como los ya mencionados *LILR* (Figura 2). El complejo *KIR* incluye combinaciones de 15 genes (*KIR2DL1-4*, *KIR2DL5A-B*, *KIR3DL1-3*, *KIR2DS1-5* y *KIR3DS1*) y 2 pseudogenes (*KIR2DP1* y *KIR3DP1*) organizados en tándem, con una orientación cabeza-cola y separados por regiones intergénicas de ~2,5 kb (Wilson et al, 2000), con la excepción de *3DP1* y *2DL4* a los que les separa una región intergénica de ~5 kb (Gómez-Lozano et al, 2005). Además, el pseudogén *KIR3DX1* se encuentra intercalado entre los *LILR*, localizados en una posición más centromérica dentro del LRC (Sambrook et al, 2006).



**Figura 2.** Organización del *Leukocyte Receptor Complex* (LCR) humano.

#### 3.3.2. Genes *KIR*: estructura

La longitud de un gen *KIR* es variable (9-16 kb) y, por regla general, consta de 9 exones. Los exones 1 y 2 codifican para el péptido señal; los exones 3-4-5, para los dominios tipo *Ig* (D0-D1-D2, respectivamente); los exones 6 y 7 codifican para el tallo y la región transmembrana y, por último, los exones 8 y 9 para la cola citoplásmica

(Vilches y Parham, 2002) (Figura 3) Sin embargo, esta estructura es variable, y en función de ella los genes KIR se clasifican en 3 tipos:

- KIR3D: (*3DL1-3*, *3DS1*, *3DP1* y *3DX1*). Presentan la estructura típica con dos excepciones: *KIR3DL3*, que carece del exón 6 que codifica para el tallo (Torkar et al, 1998) y *KIR3DP1*, que posee un exón 6 alternativo, carece de los exones 7-9 y sus alelos más comunes (*KIR3DP1\*003*, *\*005*, *\*006*, *\*010*) tampoco tienen exón 2. *KIR3DL1* y *3DS1*, se consideran formas alélicas de un mismo locus *KIR3DL1/S1*.

-KIR2D con dominios tipo D1-D2: (*KIR2DL1-3*, *KIR2DS1-5* y el pseudogén *KIR2DP1*). Poseen 8 exones porque el exón 3 (que codifica para el D0) se ha convertido en un pseudoexón que no se incorpora al ARNm maduro (Vilches et al, 2000b; Wilson et al, 1997). *KIR2DL2* y *KIR2DL3* por una parte, así como *KIR2DS3* y *KIR2DS5* por otra, se consideran formas alélicas de un mismo locus. El locus *KIR2DS3/S5* se encuentra duplicado y se localiza tanto en la región centromérica como en la telomérica. *KIR2DP1* presenta un codón de parada prematuro en exón 4. La mayoría de alelos de *KIR2DS4*, entre ellos el más frecuente en caucosoides (*KIR2DS4\*003*) presentan una delección de 22 pb en el exón 5 que altera el marco de lectura (Middleton et al, 2007; Maxwell et al, 2004).

- KIR2D con dominios tipo D0-D2: incluyen únicamente *2DL4* y *2DL5*. No poseen exón 4, por lo que no tienen dominio D1, mientras que sí que presentan un exón 3 traducido (Wilson et al, 2000; Vilches et al, 2000c). Existen dos loci *2DL5* localizados en la región centromérica (*2DL5B*) y telomérica (*2DL5A*) (Gómez-Lozano et al, 2002; Vilches et al, 2000a).

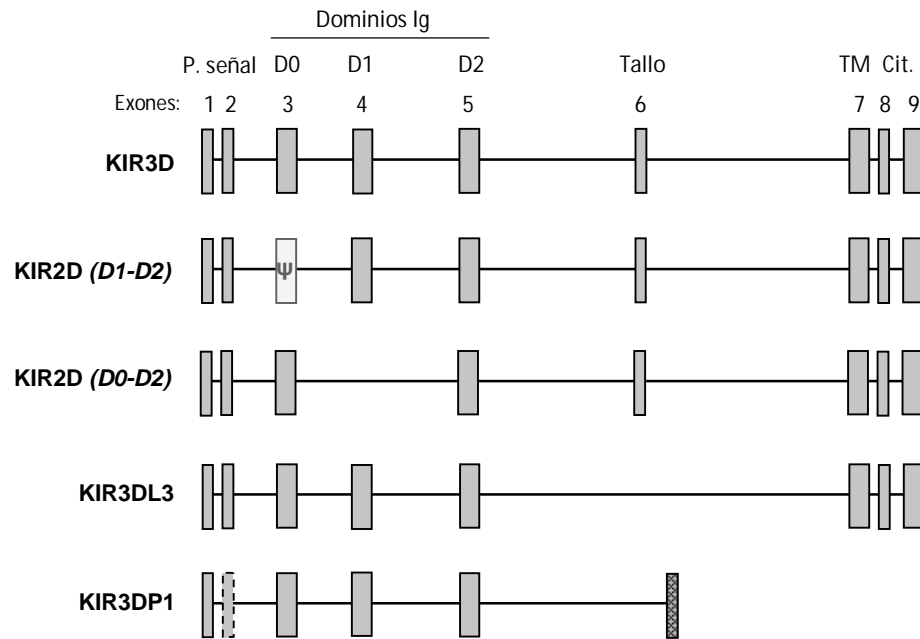
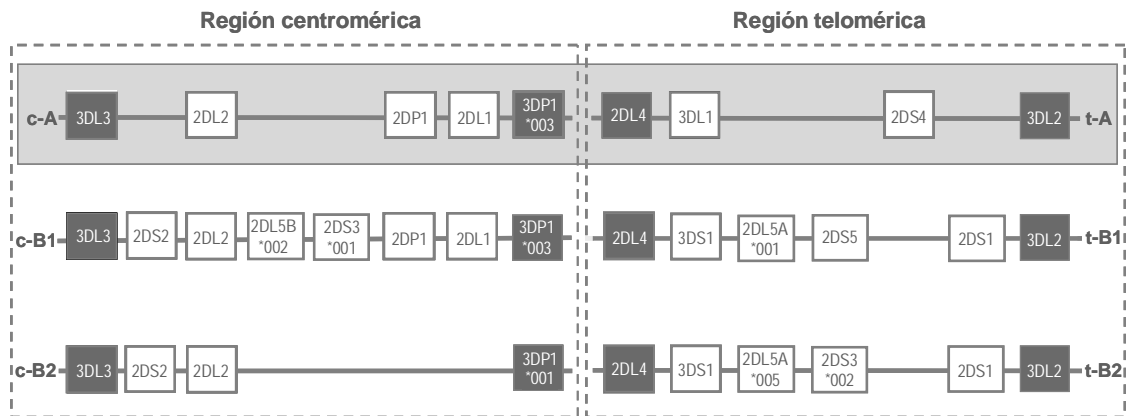


Figura 3. Estructura de los genes *KIR*.

### 3.3.3. Haplotipos y semihaplotipos *KIR*

El genoma humano presenta un número y tipo de genes *KIR* variable. Sólo los llamados *framework genes*, que marcan los extremos (*KIR3DL3* y *KIR3DL2*) y la región central (*KIR3DP1* y *KIR2DL4*) del complejo *KIR*, están presentes en casi la totalidad de los individuos. Estos *framework genes* están separados por distintas combinaciones de genes *KIR* que aparecen con frecuencia variable en cada población (Wilson et al, 2000; Martin et al, 2000).

Las distintas combinaciones de genes *KIR* que se heredan juntas en un orden dado se denominan haplotipos *KIR*. Cada uno de ellos es una combinación de motivos o semihaplotipos centroméricos y teloméricos. Desde el extremo centromérico hasta el telomérico del complejo *KIR*, *3DL3* y *3DP1* delimitan el semihaplotipo centromérico mientras que los extremos del semihaplotipo telomérico los conformarían, *2DL4* y *3DL2* (Figura 4).



**Figura 4. Organizaciones génicas comunes de las regiones centromérica y telomérica del complejo *KIR*.** Los espacios intergénicos se han ampliado artificialmente para alinear genes homólogos. El haplotipo A está formado por los segmentos centro- y teloméricos destacados con fondo gris. Cualquier otra combinación de semihaplotipos centroméricos y teloméricos constituye un haplotipo B.

Según su contenido en genes *KIR* se distinguen dos grupos de haplotipos. El haplotipo A presenta un contenido de genes casi constante, formado por 9 loci (de centrómero a telómero, *KIR3DL3*, *KIR2DL3*, *KIR2DP1*, *KIR2DL1*, *KIR3DP1*, *KIR2DL4*, *KIR3DL1*, *KIR2DS4* y *KIR3DL2*). Este haplotipo es el mayoritario y sólo posee un *KIR* activador, 2DS4, que en la mayoría de los caucasoides corresponde a un alelo aberrante (Maxwell et al, 2004). Por tanto, los individuos homocigotos para este haplotipo A, a menudo carecen de *KIR* activadores.

Los haplotipos B son mucho más variables en el número y la combinación de genes *KIR* que presentan y hay una mayor frecuencia de *KIR* activadores. Los haplotipos B se definen de manera que cualquier variación por exceso respecto a la dotación génica de los haplotipos A es considerado un haplotipo B. La variabilidad en los haplotipos B se origina por la presencia o ausencia de genes y en menor medida, por los alelos (apartado 3.3.4), mientras que en los haplotipos A es principalmente el polimorfismo alélico el que genera la variabilidad (Jiang et al, 2012; Middleton y González, 2010; Pyo et al, 2010).

Estudios en familias e individuos no relacionados indican que existe una gran diversidad de haplotipos en distintas poblaciones (Middleton et al, 2007; Cook et al, 2003; Rajalingam et al, 2002; Yawata et al, 2002a; 2002b; Norman et al, 2001; Toneva et al, 2001). Las frecuencias de los haplotipos A y B son similares en población caucasoide mientras que en japoneses el haplotipo A es mucho más frecuente (75%) en contraste con la baja frecuencia (~13%) en aborígenes australianos.

En individuos caucasoides, la secuenciación de haplotipos KIR completos y estudios familiares (Pyo et al, 2010; Hsu et al, 2002a) ha definido, en función de la presencia o ausencia de genes KIR específicos, tres semihaplotipos centroméricos (c-A1, c-B1, c-B2) y tres teloméricos (t-A1, t-B1, t-B2) cuyas combinaciones explican la diversidad en la gran mayoría de los individuos. Una secuencia entre *3DPI* y *2DL4* parece haber facilitado la recombinación entre las regiones centromérica y telomérica del complejo *KIR*, generando haplotipos completos que presentan distintas combinaciones de semihaplotipos centroméricos y teloméricos. Un haplotipo *KIR* A está siempre formado por el semihaplotipo centromérico c-A1 y el telomérico t-A1. Cualquier otra combinación de semihaplotipos centroméricos y teloméricos daría lugar a un haplotipo B. De esta manera, muchos de los haplotipos B incluyen semihaplotipos centroméricos o teloméricos del haplotipo A.

#### **3.3.4. Polimorfismo alélico**

La diversidad *KIR* en las poblaciones humanas no sólo viene determinada por la variación en el número de genes sino también por el polimorfismo alélico que exhiben. Según la última actualización de la base de datos IPD-KIR (<http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/>) están descritos un total de 753 alelos *KIR*. *KIR3DL1*, *3DL2* y *3DL3*, con un total de 100, 112 y 113 alelos, respectivamente, serían los genes

más polimórficos mientras que sólo se han descrito 15 y 18 alelos de *2DS3* y *2DS5*. La combinación del polimorfismo alélico y el contenido variable de genes *KIR* individualiza los genotipos hasta el punto de que dos individuos no relacionados raramente tienen el mismo genotipo *KIR*. A pesar de ello, existe un fuerte desequilibrio de ligamiento entre ciertos alelos de algunos genes *KIR* que resulta útil para posicionar determinados genes y alelos *KIR* dentro de su haplotipo. Por ejemplo, en individuos caucásicos, el alelo *KIR2DS3\*001* se localiza en el lado centromérico de los haplotipos *KIR*, asociado a *KIR2DL5B\*002*, mientras que *KIR2DS3\*002* se encuentra en el lado telomérico ligado a *KIR2DL5A\*005* (Pyo et al, 2010; Hou et al, 2010; Ordóñez et al, 2008). Igualmente, el desequilibrio de ligamiento entre *2DL1* y *2DP1* y distintos alelos de *3DP1* los convierte, salvo contadas excepciones, en marcadores de haplotipos centroméricos específicos: *KIR3DP1\*003* (sin exón 2) está siempre presente en los haplotipos c-A y c-B1, mientras que los c-B2, portan en la mayoría de casos, sus variantes completas (*KIR3DP1\*001*, *\*002*) (Hsu et al, 2002b).

El polimorfismo alélico de los genes *KIR* puede determinar diferencias importantes a nivel funcional. Aparte de los polimorfismos que generan alelos nulos o alteran el procesamiento del ARNm, como es el caso de los alelos de *KIR2DS4* que presentan una delección, polimorfismos en regiones codificantes pueden afectar a los niveles de expresión en superficie. Por ejemplo, SNPs en los dominios extracelulares provocan el secuestro en el interior de la célula de algunos alelos de *2DL1*, *2DL2*, *2DL4* y *3DL1* (Hilton et al, 2015; Goodridge et al, 2010; VandenBussche et al, 2006; Pando et al, 2003).

Por otra parte, los polimorfismos pueden afectar a la unión del *KIR* con su ligando. En el caso del locus *3DL1/S1* existen alelos que codifican para receptores con una gran afinidad por las moléculas HLA-Bw4 (*KIR3DL1\*00501* - *\*00101*), con afinidad intermedia (*KIR3DL1\*01501* - *\*020*), de baja afinidad (*KIR3DL1\*007*) o que

no reconocen HLA-Bw4, como KIR3DS1 (Thananchai et al, 2007; O'Connor et al, 2007). El efecto de los polimorfismos en el locus 3DL1/S1 llega a su manifestación más extrema al afectar también a la función del receptor cambiando ésta de inhibidora (3DL1) a activadora (3DS1) (O'Connor et al, 2007).

### 3.3.5. Generación de la diversidad

Mutaciones puntuales y eventos de recombinación son responsables de la rápida evolución de los *KIR*, generando múltiples alelos para cada gen y variaciones en el contenido de genes *KIR* entre individuos. Pero es que, además, los procesos de recombinación ocurren también fuera de la región central entre *3DP1* y *2DL4*, dando lugar a haplotipos *KIR* menos comunes que contribuyen a aumentar la diversidad global del complejo *KIR*. Cuando la recombinación tiene lugar entre loci distintos aparecen haplotipos que portan dos o más copias de un mismo gen; deleciones que afectan a uno o varios genes; y genes o alelos *KIR* híbridos (Pyo et al, 2013; Hou et al, 2012; Ordóñez et al, 2011; Pyo et al, 2010; Traherne et al, 2010; Ordóñez et al, 2008; Gómez-Lozano et al, 2005; Martin et al, 2003), muchos de los cuales codifican para proteínas con nuevas características y funciones. En su conjunto, el complejo de genes *KIR* es un modelo de complejidad genética.

### 3.4. Expresión de los genes *KIR*

El contenido génico variable del complejo *KIR* y el polimorfismo alélico condicionan el repertorio *KIR* de cada individuo. Además, la variación en la expresión de los genes *KIR* proporciona otro nivel de diversidad. Distintos clones de células NK de un mismo individuo expresan sólo algunos de sus genes *KIR*. Esta expresión de apariencia estocástica y variegada está bajo control epigenético. Así, la metilación de las islas CpG en los promotores *KIR* proximales durante el desarrollo de las células NK

silencia la expresión del receptor (Santourlidis et al, 2008; Chan et al, 2005; Santourlidis et al, 2002). Además, la metilación también regula su transcripción monoalélica (Chan et al, 2005), así como el silenciamiento de *KIR3DL3* en la población CD56<sup>dim</sup> (Trundley et al, 2006).

De acuerdo con el modelo de SK. Anderson (Davies et al, 2007), los genes *KIR* están controlados por promotores distales y proximales bidireccionales. La transcripción reversa del promotor proximal bloquea la expresión del gen *KIR* en células NK inmaduras, favoreciendo su silenciamiento, mientras que el predominio de los transcritos directos tiene como resultado la expresión del *KIR*.

Las regiones promotoras de la mayoría de genes *KIR* presentan una identidad de secuencia elevada (91,1–99,6%) y comparten sitios de unión de varios factores de transcripción (vanBergen J. et al, 2005; Trowsdale et al, 2001). Sólo *KIR2DL4* y *3DL3* poseen una secuencia promotora significativamente divergente (69% y 89% de homología con *3DL1*, respectivamente), consistente con la transcripción en el 100% de clones de NKs de *KIR2DL4* (Trompeter et al, 2005; Valiante et al, 1997) y la ausencia de expresión de *KIR3DL3* en las células NK CD56<sup>dim</sup> (Trundley et al, 2006; vanBergen J. et al, 2005). Como se detalla en el apartado 4.3.1, los polimorfismos en el promotor proximal de *KIR2DL5* tienen importantes repercusiones funcionales y dotan a *KIR2DL5* de un patrón de expresión único entre los *KIR* (Gómez-Lozano et al, 2007; Vilches et al, 2000a).

#### **4. KIR2DL5**

*KIR2DL5* (CD158f) es el *KIR* más recientemente descrito en el genoma humano (Vilches et al, 2000b). Su papel en la inmunidad no se comprende bien ya que su ligando todavía no ha sido identificado. Junto con *KIR2DL4*, es el único miembro de un linaje

ancestral de KIR con dominios inmunoglobulina del tipo D0-D2 (Rajagopalan y Long, 2012; Cantoni et al, 1998). Sin embargo, pese a la similitud en la organización de los dominios de *KIR2DL4* y *KIR2DL5*, la identidad de su secuencia de aminoácidos es sólo de un 79%. Además, varias características estructurales distintivas (Tabla 2) les confieren funciones diferentes, de manera que *KIR2DL5* estaría funcionalmente más próximo a los KIR que reconocen moléculas HLA-I clásicas. *KIR2DL5* inhibe a la célula NK a través de las fosfatasa SHP-2 y SHP-1 (Estefanía et al, 2007), mientras que *KIR2DL4* tiene capacidad dual (induce la secreción de IFN- $\gamma$  y presenta cierto potencial inhibidor) (Kikuchi-Maki et al, 2005; Faure y Long, 2002).

	KIR2DL5	KIR2DL4	KIR2DL1	KIR3DL1
Dominios tipo Ig	D0-D2	D0-D2	D1-D2	D0-D1-D2
Nº de exones que codifican dominios tipo Ig	2	2	2+ pseudoexón	3
Residuos cargados en región transmembrana	No	Sí	No	No
Motivos de señalización basados en tirosina	1 ITIM, 1 ITSM	1 ITIM	2 ITIM	2 ITIM
Moléculas señalizadoras	SHP-2>1	Fc $\gamma$ R, ADN-PKcs*	SHP-1>2	SHP-1>2
Función	Inhibición	Secreción IFN $\gamma$ , Inhibición?	Inhibición	Inhibición
Transcripción en células NK	Clonal	Ubícuca	Clonal	Clonal
Ligando	?	HLA-G?	HLA-C	HLA-A/B
Variación en el número de copias	++	+/-	+	+/-**
Conservación en primates	++	+++	-	+/-

**Tabla 2. Características estructurales, genéticas y funcionales de KIR2DL5 en comparación con otros KIR.** \*(Kikuchi-Maki et al, 2005; Rajagopalan, 2010). \*\* La mayoría de haplotipos que carecen de *KIR3DL1* tienen su alotipo *KIR3DS1*.

Por otro lado, *KIR2DL4* está conservado en la mayoría de individuos (Uhrberg et al, 1997) y su expresión en superficie está restringida a la población minoritaria CD56<sup>bright</sup> de sangre periférica (Goodridge et al, 2003; Ponte et al, 1999; Uhrberg et al, 1997), aunque es transcrito y detectado intracelularmente de manera ubicua. Por el contrario, *KIR2DL5*, como la mayoría de genes *KIR*, está presente sólo en una fracción de los individuos en cada población. También, la expresión clonal de su ARNm (Vilches et al, 2000c) y su expresión clonal en superficie en células NK de la población mayoritaria de sangre periférica (CD56<sup>dim</sup>) (Estefanía et al, 2007) lo asemeja a la mayor parte de genes *KIR* a la vez que lo diferencia de *KIR2DL4*.

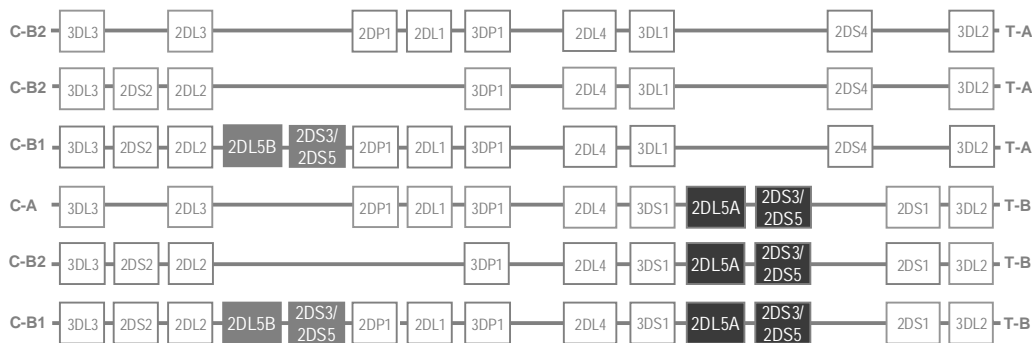
#### 4.1. Organización genética de *KIR2DL5*

*KIR2DL5* es un ejemplo de polimorfismo alélico y más aún de la variación en el número de copias que caracteriza al complejo de genes *KIR*. Los alelos de *KIR2DL5* pertenecen a dos series codificadas por distintos loci (Gómez-Lozano et al, 2002; Vilches et al, 2000a) que se localizan en regiones diferentes del complejo de genes *KIR*: *KIR2DL5A* en la región telomérica y *KIR2DL5B* en la centromérica. Así, en lo que respecta a *KIR2DL5*, podemos distinguir cuatro grupos de haplotipos *KIR*: los que presentan tanto *KIR2DL5A* como *KIR2DL5B*, los que tienen sólo uno de ellos y los que carecen de *KIR2DL5* (todos los haplotipos A y un centromérico B carecen de *KIR2DL5*) (Gómez-Lozano et al, 2002) (Figura 5). Además, algunos haplotipos inusuales resultado de eventos de recombinación pueden contener un tercer locus por duplicación de *2DL5A* (Jiang et al, 2012; Ordóñez et al, 2008).

La duplicación de *KIR2DL5* parece ser específica de los humanos no habiéndose visto en otros primates. Pyo et al (2010), estimaron que la duplicación de un grupo ancestral *KIR2DL5-KIR2DS3S5* tuvo lugar hace 1,7 millones de años y propusieron

varios modelos para la diversificación posterior por medio de mutaciones puntuales y eventos de recombinación.

Los alelos *KIR2DL5* tanto centroméricos como teloméricos están seguidos en el genoma por los parálogos del gen duplicado *KIR2DS3S5*, cada uno de los cuales codifica para diferentes alelos de los activadores *KIR2DS3* y *KIR2DS5*, a los que se considera alotipos (Pyo et al, 2010; Hou et al, 2010; Ordóñez et al, 2008). En su extremo 5', *KIR2DL5B* está flanqueado por *KIR2DL2*, mientras que *KIR2DL5A* es precedido por *KIR3DS1* (Pyo et al, 2010; Hou et al, 2010; Vilches et al, 2000a).



**Figura 5. Haplotipos comunes con 0, 1 ó 2 grupos 2DL5-2DS3S5.**

Existe un fuerte desequilibrio de ligamiento entre *KIR2DL5* y los parálogos del gen duplicado *KIR2DS3S5*. En varios grupos étnicos, distintos alelos de *KIR2DL5* definen determinadas asociaciones con *KIR2DS3* o *KIR2DS5* y viceversa de manera que muchos haplotipos B están marcados por distintos bloques *KIR2DL5-KIR2DS3S5* (Figura 4). En caucasoides, el alelo centromérico más común, *KIR2DL5B\*002*, está asociado muy frecuentemente a *KIR2DS3\*001*, mientras que en población africana es común encontrar asociaciones entre otros alelos *KIR2DL5B* y varios alelos de *KIR2DS5* (Hou et al, 2010). En el lado telomérico, los alelos más frecuentes, *KIR2DL5A\*001* y *\*005*, se asocian a *KIR2DS5\*002* y *KIR2DS3\*002*, respectivamente (Pyo et al, 2010; Hou et al, 2010; Vilches et al, 2000a).

Recombinaciones asimétricas que afectan al grupo *2DL5-2DS3/S5* generan haplotipos contraídos y expandidos que representan excepciones a las anteriores asociaciones, pero la falta de estudios de distribución de haplotipos en población española dificulta o impide su identificación. Por ello, en este trabajo nos hemos propuesto analizar la distribución de los haplotipos *KIR* en la población española e identificar y caracterizar nuevos haplotipos recombinantes.

## **4.2. Polimorfismo alélico de *KIR2DL5***

### **4.2.1. Polimorfismo en la región codificante**

Existen 15 alelos *KIR2DL5A* y 28 *KIR2DL5B* recogidos en la Base de Datos IPD (*Immuno Polymorphism Database*, v2.4.0) (Robinson et al, 2013). En la región codificante (1125 pb) se han encontrado 19 sitios polimórficos, de los cuales 11 son sustituciones no sinónimas. Doce de las sustituciones de nucleótido afectan a los exones 3 y 5 y generan 7 cambios de aminoácido en los dominios tipo Ig (Tabla 3), lo que sugiere que los polimorfismos que podrían modular la afinidad o la especificidad de la interacción de *KIR2DL5* con un supuesto ligando han sido mantenidos por selección natural. Sin embargo, la mayoría de ellos no parecen formar parte de las regiones de los dominios de tipo Ig que se predice interaccionan con el ligando (Du et al, 2008).

Por otro lado, un único polimorfismo en el exón 1 (péptido señal) distingue todos los alelos *KIR2DL5A* de los *KIR2DL5B*, mientras que muchas sustituciones son compartidas por alelos de ambos loci (Tabla 3). El hecho de que existan parejas de alelos (uno para cada locus) que codifican proteínas maduras idénticas y difieren sólo en su péptido señal refleja el extenso intercambio de material genético entre los loci *KIR2DL5* centromérico y telomérico que ha tenido lugar durante la evolución humana.

alelo	P. señal Exs 1-2		Dominio D0 Ex 3					Dominio D2 Ex5				Tallo Ex 7		Cit. Ex 9
	-16	-1	16	19	75	78	95	114	152	167	174	215	247	284
<b>2DL5</b>	Ile	Thr	Ala	Pro	Arg	His	Val	Arg	Asn	Gly	Gly	Arg	Lys	Val
<b>A*001</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>B*008</b>	Val	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>A*012</b>	-	Pro	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>B*006</b>	Val	Pro	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>A*015</b>	-	-	-	-	-	-	-	Cys	-	-	-	-	-	-
<b>B*013</b>	Val	-	-	-	-	-	-	Cys	-	-	-	-	-	-
<b>A*005</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	Asp	-	Ser	-	-	-
<b>B*002</b>	Val	-	-	-	-	-	-	-	Asp	-	Ser	-	-	-
<b>A*014</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Arg	-	-	-	-
<b>B*004</b>	Val	-	Thr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>B*018</b>	Val	-	-	His	Trp	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>B*007</b>	Val	-	-	-	-	-	Met	-	-	-	-	-	-	-
<b>B*003</b>	Val	Pro	-	-	-	-	Met	-	-	-	-	-	-	-
<b>B*011</b>	Val	Pro	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ile
<b>B*009</b>	Val	-	-	-	-	-	-	-	Asp	-	Ser	Leu	-	-
<b>B*010</b>	Val	Pro	-	-	-	-	-	-	Asp	-	Ser	-	-	-
<b>B*016</b>	Val	-	-	-	-	Tyr	-	-	Asp	-	Ser	-	-	-
<b>B*017</b>	Val	-	-	-	-	-	-	-	Asp	-	Ser	-	Asn	-

Tabla 3. Comparación de las estructuras primarias deducidas de los alelos *KIR2DL5*.

#### 4.2.2. Polimorfismo en la región del promotor

El polimorfismo de *KIR2DL5* no está restringido a su región codificante. De hecho, las regiones promotoras de los genes *KIR2DL5* son, incluso, más polimórficas. En la región promotora y 5'nt (~1,2 kb) de los alelos *KIR2DL5A\*001*, *B\*002* y *B\*003* se distinguen 20-32 sitios polimórficos, lo que supone de un 1,6 a un 2,5% de variación en esta región. Estos polimorfismos de *KIR2DL5* definen tres tipos de promotores proximales que determinan perfiles transcripcionales divergentes de los alelos *KIR2DL5* (sección 4.3.1): todos y únicamente los alelos *KIR2DL5A* están controlados por promotores tipo I; el promotor de tipo II se encuentra en múltiples alelos *KIR2DL5B*, de los cuales, *KIR2DL5B\*0020101* es el prototipo; y la transcripción de los alelos *KIR2DL5B\*003* y *\*00602* es dirigida por un promotor de tipo III (Du et al, 2008). El origen de esta divergencia de profunda importancia funcional (los alelos controlados por el promotor de tipo II no se transcriben), no ha sido aún explicado.

### 4.2.3. Distribución de los alelos de *KIR2DL5*

*KIR2DL5* está presente en todas las poblaciones humanas en un rango de frecuencias de un 26 a un 86%, pero las distribuciones de los dos genes *KIR2DL5A* y *KIR2DL5B*, así como de sus alelos, son desiguales. En individuos caucasoides, *KIR2DL5A* y *KIR2DL5B* tienen frecuencias similares pero predominan, respectivamente, en población mongoloide y negroide. Los alelos *KIR2DL5A\*001*, *B\*002* y *A\*005* están ampliamente distribuidos, junto con *B\*006* en negros, población que retiene la mayor diversidad de *KIR2DL5* y constituye el único grupo en el que los alelos de *KIR2DL5* controlados por un promotor de tipo III no son raros (González-Galarza et al, 2011; Hou et al, 2010; Du et al, 2008; Mulrooney et al, 2008; Gómez-Lozano et al, 2007; Vilches et al, 2000a).

## 4.3. Expresión de *KIR2DL5*

### 4.3.1. Transcripción

El patrón de expresión que presentan los alelos de *KIR2DL5* es único dentro de la familia de genes *KIR* y constituye un modelo para el estudio de la regulación de su transcripción. De los alelos *KIR2DL5* cuya transcripción ha sido investigada, los controlados por promotores de tipo I y III son transcritos clonalmente mientras que el ARNm de los alelos controlados por un promotor de tipo II es indetectable (Gómez-Lozano et al, 2007; Vilches et al, 2000a). Hasta el momento no se ha descrito ninguna excepción a esta regla. De hecho, el pseudogén *KIR3DP1*, controlado igualmente por un promotor de tipo II, es también transcripcionalmente silente, con una única excepción: *KIR3DP1\*004*, que presenta un promotor de tipo I adquirido por recombinación con *KIR2DL5A*, es un alelo que sí se transcribe (Gómez-Lozano et al, 2007; Vilches et al, 2000a).

De acuerdo con la regulación epigenética de los genes *KIR* (Chan et al, 2003; Santourlidis et al, 2002), la falta de transcripción del alelo silente *KIR2DL5B\*002* (con

promotor de tipo II) se correlaciona con un estado hipermetilado de las islas CpG de su promotor. Además, la desmetilación farmacológica del ADN de células NK en cultivo basta para restaurar la transcripción de *KIR2DL5B\*002*, demostrando que sólo un mecanismo epigenético impide su expresión (Gómez-Lozano et al, 2007).

Del total de polimorfismos que distinguen los tres tipos de promotores de *KIR2DL5*, únicamente dos SNPs (en las posiciones -97 y -84) se correlacionan completamente con el patrón de expresión de los distintos alelos: GA aparece en los alelos transcritos y AG en los silentes (Tabla 4). La posición -97 forma parte de un motivo de unión de la familia de factores de transcripción RUNX. Gómez -Lozano et al (2007), demostraron que RUNX3 se une exclusivamente a los promotores funcionales de *KIR2DL5*, los cuales poseen el sitio de unión intacto.

alelo <i>KIR2DL5</i>	Región promotora						Tipo de	
	-104 G	-97 G	-84 A	-27 C	-23 C	-10 C	Promotor	Transcripción
<i>A*0010101-00105</i>	-	-	-	-	-	-	I	+
<i>A*0050101/03-04</i>	-	-	-	-	-	-	I	(+)
<i>A*01201/02</i>	A	-	-	-	-	-	I	(+)
<b><i>B*0020101-03/05/07,*00202,*0070101</i></b>	A	A	G	-	T	-	II	-
<b><i>B*004,*0080101/00802,*009,*01301/02</i></b>	A	A	G	-	T	-	II	-
<b><i>B*00601/03</i></b>	A	A	G	-	-	-	II	-
<i>B*0020104,*0080102,*010,*011</i>	A	A	G	-	-	-	II	(-)
<b><i>B*003</i></b>	A	-	-	T	-	T	III	+
<i>B*00602,B*0020106</i>	A	-	-	T	-	T	III	(+)

**Tabla 4. Comparación de las secuencias del promotor proximal y los perfiles de transcripción de los alelos *KIR2DL5*.** La transcripción de los alelos en negrita ha sido determinada experimentalmente. Entre paréntesis se muestran las predicciones para grupos de alelos que no han sido estudiados por RT-PCR.

El motivo de unión de RUNX está conservado en todos los *KIR* que presentan transcripción clonal (vanBergen J. et al, 2005; Trompeter et al, 2005) y *2DL4*, con transcripción ubicua, presenta dos motivos de unión de RUNX altamente conservados en primates (Presnell et al, 2012; Trompeter et al, 2005), por lo que se ha sugerido que RUNX pueda tener un papel esencial en la expresión de los genes *KIR* durante la ontogenia de las células

NK, disminuyendo la actividad del promotor reverso (lo que parece favorecer su no silenciamiento epigenético) y permitiendo, por tanto, la expresión del KIR en la célula madura (Cichocki et al, 2011; Davies et al, 2007).

#### **4.3.2. Expresión en superficie de KIR2DL5**

Como la mayoría de KIR (y en contraste con la expresión no clonal de KIR2DL4) KIR2DL5 presenta un patrón variegado de expresión en la superficie de las células NK CD56<sup>dim</sup> y algunas subpoblaciones de linfocitos T de sangre periférica, lo que concuerda con la distribución clonal vista mediante RT-PCR en células T y NK (Estefanía et al, 2007; Vilches et al, 2000c). La proporción de células NK que expresan KIR2DL5 tiende a ser menor al 10% en la mayoría de individuos sanos. Esta proporción es incluso menor en linfocitos T, en su mayoría de la subpoblación CD8. La densidad del receptor en superficie, medida como la media de la intensidad de fluorescencia (MFI) en citometría de flujo con el anticuerpo monoclonal (AcMo) UP-R1, es también menor que para muchos otros KIR en linfocitos no activados, pero aumenta en células NK expandidas en presencia de IL-2 y líneas celulares linfoblastoides (Estefanía et al, 2007).

El análisis mediante citometría de flujo y RT-PCR de células NK frescas y expandidas revela que KIR2DL5 se distribuye de manera aleatoria, no detectándose una expresión coordinada con cualquier otro KIR (Estefanía et al, 2007; Vilches et al, 2000c). Una minoría de células NK expresan KIR2DL5 y carecen de otros KIR inhibidores así como de NKG2A, pero no ha sido demostrado funcionalmente que KIR2DL5 tenga capacidad de licenciar a las células NK.

El polimorfismo alélico es esencial para entender los distintos patrones de expresión de KIR2DL5 (Tabla 3). Los alelos transcripcionalmente silentes son, por definición, indetectables en la superficie de la célula. Por otro lado, de los dos alelos

*KIR2DL5* transcritos más comunes en individuos caucasoides, *KIR2DL5A\*001* y *KIR2DL5A\*005*, únicamente se ha demostrado la expresión en la superficie celular del primero (Estefanía et al, 2007). El análisis de la expresión en superficie de otros alelos transcritos, especialmente de *KIR2DL5A\*005*, dada su alta frecuencia en la población, resultaría útil para explorar el impacto de los polimorfismos en las regiones extracelulares de los *KIR* sobre su expresión en superficie, así como sobre el reconocimiento de *KIR2DL5* por el único AcMo específico que se ha generado hasta la fecha (UP-R1), aspectos que hemos tratado en el trabajo actual.

#### **4.4. *KIR2DL5*, un receptor huérfano**

La demostración de que *KIR2DL5* es una glicoproteína de membrana capaz de inhibir la respuesta citotóxica de las células NK sugiere su participación en la defensa mediada por estas células de acuerdo con el modelo de “ausencia de lo propio”. Además, la identificación de células NK que expresan *KIR2DL5* y carecen del resto de *KIR* inhibidores así como de *NKG2A* sugiere la existencia de un ligando, posiblemente expresado en condiciones fisiológicas.

Las aproximaciones para investigar la expresión del ligando de *KIR2DL5* llevadas a cabo hasta ahora, han resultado fallidas, sin embargo han servido para descartar determinadas estrategias y reorientar las futuras hacia la cuantificación de señales positivas sobre células modificadas con expresión elevada y homogénea de *KIR2DL5*, aspectos que nos hemos propuesto abordar en este trabajo.



## **Objetivos**

---



1. Estudiar la diversidad de genotipos *KIR* en la población española y determinar la distribución de haplotipos canónicos e inusuales.
2. Determinar la influencia de los polimorfismos de la región extracelular de *KIR2DL5A* sobre la variabilidad fenotípica de las células NK.
3. Diseñar un sistema celular para estudiar la distribución de ligandos potenciales de *KIR2DL5*.



## **Materiales y Métodos**

---



## 0. Métodos generales

- Todas las secuencias de nucleótidos se analizaron en el secuenciador *ABI Prism 3100-Avant* (*Applied Biosystems*) en la Unidad de Secuenciación del Instituto de Investigación Sanitaria Puerta de Hierro- Majadahonda y se alinearon y compararon mediante los programas *Chromas Pro* (*Technelysium Pty*) y *GeneTool Lite v1.0* (*BioTools Incorporated*).

- Todas las construcciones plasmídicas utilizadas para las transfecciones se prepararon usando *EndoFree plasmid Maxi y Midi Kit* (*Qiagen*). Para las electroporaciones, las construcciones se linearizaron con *BsmI* y los plásmidos linearizados se purificaron mediante precipitación con etanol 96% frío en presencia de *NaCl 0,3 M*.

- La mayoría de análisis de citometría de flujo se realizaron en el citómetro *MACSQuant Analyzer* (*Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, DE*) de la Unidad de Citometría de Flujo y Separación Celular del Instituto de Investigación Sanitaria Puerta de Hierro y las representaciones se llevaron a cabo con el programa *MACSQuantify*. Algunos se llevaron a cabo en el citómetro *Epics XL* (*Beckman Coulter, Brea, CA, USA*) utilizando el programa *Expo32* para realizar las representaciones.

- Los análisis de microscopía confocal se realizaron en el microscopio confocal *TCS SP5* (*Leica Microsystems CMS GmbH, Mannheim, Germany*) con los láseres de Argón (488 nm) y Helio-Neón (543 nm) en la Unidad de Microscopía Confocal del Instituto de Investigación Puerta de Hierro. Las imágenes se adquirieron con el programa *LAS AF SP5* (*Leica Microsystems*).

- Se realizaron controles periódicos para detectar la presencia de micoplasmas en los cultivos celulares en la Unidad de Cultivos Celulares del Instituto de Investigación Puerta de Hierro.

## 1. Diversidad del complejo de genes *KIR* en población española

### 1.1. Donantes, muestras y aislamiento de ADN

Se estudiaron 403 individuos: 50 donantes de órgano sólido y 353 voluntarios, sanos y no relacionados; todos ellos recogidos en el H. Puerta de Hierro (Majadahonda, Madrid) y la Universidad Pompeu Fabra (Barcelona). El ADN genómico se obtuvo a partir de sangre periférica o de células mononucleares purificadas de bazo o ganglios linfáticos y se aisló mediante métodos de precipitación salina o mediante el sistema *Maxwell 16 (Promega)*.

### 1.2. Determinación de los haplotipos *KIR*

En función de los genotipos definidos en este estudio y del conocimiento existente sobre las organizaciones de los haplotipos *KIR*, inferimos la disposición de los genes *KIR* en cada individuo, asumiendo el menor número posible de combinaciones de genes atípicas o no conocidas. Así, para asignar genes a haplotipos específicos seguimos las siguientes asunciones, basadas en estudios de mapeo físico, desequilibrio de ligamiento y análisis de segregación en familias (Pyo et al, 2013; Hou et al, 2012; Vierra-Green et al, 2012; Gourraud et al, 2010; Hsu et al, 2002b) y los calculados para nuestra población de estudio (sección 1.1.2. de los Resultados):

- El orden y la posición de cada gen *KIR* es invariable, con las excepciones señaladas en los Resultados).
- En el lado centromérico, *2DP1* y *2DL1* forman un bloque con un desequilibrio de ligamiento positivo completo o casi completo, al igual que *3DL1* y *2DS4* en el lado telomérico.
- *3DS1-2DL5A-2DS3S5-2DS1* con desequilibrio de ligamiento muy fuerte, forman un bloque en el lado telomérico.

- El bloque duplicado 2DL5-2DS3S5 se asigna al lado centromérico o al telomérico según la presencia o no de genes adyacentes: 2DPI-2DL1 y 2DS2-2DL2 en el lado centromérico y 3DS1 y 2DS1 en el telomérico. Además, en el lado telomérico, se definen los haplotipos c-B1 y c-B2 en función de la presencia conjunta de 3DS1-2DL5A-2DS1 y 2DS5 o 2DS3, respectivamente.
- 3DL1 y 3DS1 segregan como alelos del mismo locus, al igual que 2DL3 y 2DL2 y 2DS3 y 2DS5. Si un individuo tiene 3DL1 y 3DS1 (o 2DL3 y 2DL2) se considera que pertenecen a haplotipos distintos, con las excepciones descritas.
- La forma delecionada de 3DPI se asigna a los haplotipos centroméricos c-A y c-B1, mientras que los haplotipos centroméricos c-B2 portan las variantes completas de 3DPI.
- En el caso de la presencia simultánea de 2DS3 y 2DS5 junto con los genes que los acompañan en los haplotipos centroméricos y teloméricos B, la asignación de estos últimos resulta ambigua, no pudiéndose distinguir si el individuo porta dos haplotipos t-B1 o un t-B1 y un t-B2. El desequilibrio de ligamiento entre los alelos más comunes de 2DL5A y los haplotipos 2DS3 y 2DS5 (Hou et al, 2010; Ordóñez et al, 2008), permitió resolver dicha ambigüedad en ocho individuos mediante la subtipificación de alelos 2DL5 (Gómez-Lozano et al, 2007). Así, 2DL5A\*001 estaría ligado a 2DS5, definiendo el haplotipo telomérico B1, mientras que el alelo \*005 se asociaría con 2DS3 en un haplotipo telomérico B2.
- Cuando un individuo presentaba un semihaplotipo A y un semihaplotipo B tanto en la región centromérica como en la telomérica (por ejemplo, c-A, c-B1/ t-A, t-B1), la asignación deducida de haplotipos completos resultó ambigua al no poder distinguir si el individuo tenía dos haplotipos B (haplotipo 1: c-A/t-B1; haplotipo 2: c-B1/t-A) o un A (c-A/t-A) y un B(c-B1/t-B1).

### 1.3. Genotipado *KIR* y otros análisis genéticos

El genotipado *KIR* se llevó a cabo mediante un método de PCR-SSP de diseño local descrito previamente (Ordóñez et al, 2012; Vilches et al, 2007) que permite discriminar entre algunos alelos *KIR* que son marcadores de haplotipos específicos (por ejemplo, *KIR3DP1\*001* y *\*003*) y entre las dos variantes del gen *2DS4* (la forma larga y la variante que presenta una delección).

La tipificación específica de los alelos *2DS2\*005*, *3DP1\*004*, así como de alelos de *2DL5A*, *2DL5B* y *2DS3*, se llevó a cabo mediante métodos locales de PCR-SSP descritos previamente (Ordóñez et al, 2011; 2008; Gómez-Lozano et al, 2007; 2005).

Todos los individuos que portaban estructuras atípicas fueron adicionalmente genotipados utilizando la tecnología *Luminex xMap* basada en el método de PCR-SSOP reversa (*LabType SSO Test, One Lambda*). Este método permitía discriminar las variantes alélicas de *3DP1* y *2DS4*, así como los genes híbridos *2DS2\*005* y *3DP1\*004*.

#### 1.3.1. Secuenciación de *KIR3DL1*

Para genotipar *3DL1* el individuo T269 se realizó la amplificación de los exones 3-5 mediante dos PCR solapantes en el exón 4: la primera generaba un amplicón de ~1,5 kb que incluía el exón 3, el intrón 3 y la mitad 5' del exón 4 de *3DL1*; la segunda generaba un amplicón de ~2 kb que abarcaba la mitad 3' del exón 4, el intrón 4 y el exón 5. Se utilizó la polimerasa *Advantage 2 (BD-Clontech)* y los cebadores que se indican en la tabla 5, 3a y 3b para la primera PCR y 3c y 3d para la segunda. Las condiciones de la PCR se indican en la tabla 6 (programa 3DL1 part).

En el individuo C333, se amplificaron los exones 3-5 y 7-9 del gen quimérico *3DL2\*060* mediante dos PCR independientes que combinaban cebadores específicos de locus (*3DL1* o *3DL2*) y genéricos. Posiciones específicas en los exones 5 y 9 permitirían distinguir el gen híbrido tanto de *3DL1* como de *3DL2* y, en su caso, identificarlo como *3DL1\*059*, *\*060* o *\*061* (Norman et al, 2009). La PCR 1, que cubría los exones 3-5 (cebadores 1a y 1b, Tabla 5) generaba un amplicón de ~4 kb. La PCR 2 amplificaba un fragmento de ~1,1 kb que incluía los exones 7-9 (cebadores 1c y 1d, Tabla 5). Para ambas PCRs se utilizó la polimerasa *Advantage-2* (*BD-Clontech*). Las condiciones se indican en la tabla 6 (programas *3DL1\*060* 1 y 2).

### 1.3.2. PCR-SSP para la detección de *KIR2DL3\*033*

El cribado para la detección del gen híbrido *2DL3\*033* se llevó a cabo mediante un nuevo método de PCR-SSP: 100 ng de ADN genómico se amplificaron usando 0,2 U de la polimerasa *Biotaq* (*Bioline*) y los cebadores 4a y 4b de la Tabla 5, que reconocen una combinación de polimorfismos única para *2DL3\*033* generando un amplicón de 1385 pb. La reacción incluía otra pareja de cebadores que sirve como control interno de la PCR y que reconoce una secuencia no polimórfica del gen *COCH* (directo, *COCH* Fi8-86, 5'-gaaagaaactgtgtgtgtctgt-3'; reverso, *COCH* Ri11+95, 5'-attgggtaaagccacaggtgtttg-3'). Las condiciones de la PCR se indican en la tabla 6 (programa *2DL3\*033* scr).

### 1.4. Caracterización genómica de *KIR2DL3\*033* y genes flanqueantes

Amplificación del alelo *KIR2DL3\*033* completo. Para la descripción completa de la secuencia de *2DL3\*033* se realizó una amplificación del gen completo mediante PCR de largo alcance usando la polimerasa *Advantage-2* (*BD-Clontech*). Para ello, se

combinó un cebador directo que reconocía una secuencia consenso de *KIR* en la región 5'nt y que excluía *2DL3* (cebador 5a, Tabla 5) con un cebador reverso específico del codón de parada de *2DL3* (cebador 5b, Tabla 5). Las condiciones de la PCR se indican en la tabla 6 (programa *2DL3\*033 full*). Así, amplificamos un fragmento de ~14 kb que se analizó para determinar la secuencia de nucleótidos de parte de la región 5'nt, todos los exones (del 1 al 9), el pseudoexón 3, el intrón 6 completo así como fragmentos de secuencia no codificante que flanqueaba los exones.

Para obtener la secuencia completa del exón 9, la cual incluye el codón de parada, y confirmar los nuevos polimorfismos encontrados en los intrones 6 y 7, realizamos otra PCR usando la polimerasa Takara LA Taq (*Clontech*) un cebador directo específico del intrón 6 de *2DS2* (cebador 6a, tabla 5) y uno reverso localizado en la región 3'nt de *2DL3* (cebador 6b, Tabla 5), amplificando un producto de ~3,7 kb que se secuenció con cebadores internos. Las condiciones de la PCR se indican en la tabla 6 (programa *2DL3\*033 ex9*).

Mapeo del gen *2DL3\*033*. Para localizar el gen *2DL3\*033* dentro del haplotipo inusual realizamos un “paseo génico”. Para ello combinamos un cebador directo genérico de *KIR* y uno reverso específico de *2DS2* (cebadores 7a y 7b de la Tabla 5, respectivamente) y usamos la polimerasa *Advantage-2 (BD-Clontech)*, generando un amplicón de ~7 kb que cubría los exones 7-9 de *3DL3*, la región intergénica y los exones 1-4 de *2DS2*. Las condiciones de la PCR se indican en la tabla 6 (programa *2DL3\*033 walk*).

### **1.5. Caracterización genómica de *KIR2DL5B\*002-EC* y genes flanqueantes**

Mapeo del gen *KIR2DL5B\*002-EC*. En el donante D139, se determinó la posición del gen *2DL5* dentro de su haplotipo mediante paseo génico como se describe en (Vilches et

al, 2000c), generando un amplicón de ~4 kb. El gen *KIR* que precedía a *2DL5* se definió mediante el análisis de la secuencia de su exón 9 y de la región 3'nt y la secuencia de *2DL5* (región 5'nt y exones 1-3) se determinó en base a polimorfismos característicos de la región promotora y los exones 1-3.

Amplificación completa de *KIR2DL5B\*002-EC*. Para la descripción del gen completo *2DL5B\*002-EC* se realizó una PCR de largo alcance basándonos en polimorfismos característicos de los alelos *2DL5* con promotor tipo III (Gómez-Lozano et al, 2007; Vilches et al, 2000b) y de su región 3'nt. Se utilizó la polimerasa *Advantage-2 (BD-Clontech)* y los cebadores 2a o 2b y 2c de la Tabla 5. Las condiciones de la PCR se indican en la tabla 6 (programa *2DL5 full*). El amplicón resultante tenía ~9,4 kb. Mediante cebadores intrónicos se secuenció parte de la región promotora, todos los exones (del 1 al 9), fragmentos de secuencia no codificante que flanqueaba los exones y parte de la región 3' nt.

ID	Nombre†	Especificidad	Localización	Secuencia 5'-3'
1a	Fi2c-201	3DL1/S1	Intrón 2	tctagtaagagttgcttctc
1b	Ri5+305	3DL1, otros*	Intrón 5	atgggcttctgggaaatgga
1c	Fi6-235	3DL2, otros	Intrón 6	gagaaagcaggagaaagctg
1d	Ra1461	3DL2	3'nt	gttcattggatctggcaacct
2a	Fg-97b	2DL5	5'nt	tcaccctccrrtgatgtg
2b	Fcon-104	multi	5'nt	ctgcgtacgtcaccctccca
2c	Rg1769b	2DL5	3'nt	ggaaggtggaacagcacgtgtctc
3a	F153	multi	Exón 3	tggtcaggacaarcctt
3b	Rt624	3DL1	Exón 4	aggtccctgcaaggcaaa
3c	Fg539	3DL1, otros*	Exón 4	actctttctgcacaaagagg
3d	Rc959	3DL1/S1	Exón 5	cmactcgtaggagagtg
4a	Fi6t+1516	2DS2	Intrón 6	catcctaaagtactgggataact
4b	Ri6t+2713	2DL3	Intrón 6	tctgtgctggaggattctga
5a	LFc-444	Multi**	5'nt	gctattctgatgcctctggttagtac
5b	LRt1375	2DL3	Codon parada	caggagacaacttggatca
6a	Fi6t+1516	2DS2	Intrón 6	catcctaaagtactgggataact
6b	Rt1460	2DL3	3'nt	acattggagctggcaacca
7a	Fi6-81	Multi	Intrón 6	ctaaagagacgttgatgtggttacc
7b	LRa546	2DS2	Exón 4	ctccaatgaggtgcaaagtgctctat

**Tabla 5. Cebadores *KIR*- específicos utilizados.** \*Excluye *3DS1*; \*\*Excluye *2DL3*; † Se indica en el nombre del cebador si éste es directo (F) o reverso (R).

Programa	Nº ciclos	Tiempo	T (°C)	Programa	Nº ciclos	Tiempo	T (°C)
3DL1*060 1		120s	95	2DL3*033 scr		60s	95
	5	30s	94		10	20s	94
		30s	60			30s	65
		4min 30s	72			90s	72
	25	30s	94		20	20s	94
		30s	56			30s	61
		4min 30s	72			90s	72
		7min	72			7min	72
	3DL1*060 2		120s		95	2DL3*033 full	
5		30s	94	5	20s		94
		30s	66		30s		68
		90s	72		15min		72
25		30s	94	30	20s		94
		30s	62		30s		64
		90s	72		15min		72
3DL1 part			60s	95	2DL3*033 ex9		
	10	30s	94	10		20s	94
		30s	64			30s	65
		120s	72			4min	72
	20	30s	94	20		20s	94
		30s	60			30s	61
		120s	72			4min	72
		10min	72				
	2DL5 full		120s	95		2DL3*033 walk	
30		20s	94	30	20s		94
		15min	72		15min		72
		20min	72		20min		72

Tabla 6. Condiciones de las PCRs.

### 1.6. Secuenciación de ADN y análisis

Todos los productos de PCR se secuenciaron de forma directa sin clonaje. Previamente, los amplicones se trataron con *ExoSAP-IT* (*GE Healthcare*) para eliminar los cebadores y nucleótidos no incorporados y se secuenciaron con el kit de secuenciación *BigDye Terminator v3.1* o *v1.1* (*Applied Biosystems*). Los productos así obtenidos se purificaron con *BDXterminator* (*Applied Biosystems*). Todas las secuenciaciones tanto de exones como de intrones u otras regiones no codificantes, se realizaron con cebadores intrónicos genéricos de diseño local, secuenciando las dos hebras de ADN cuando se identificó un polimorfismo o alelo nuevo.

La nueva secuencia *KIR2DL3\*033* descrita se depositó en la base de datos *EMBL/GenBank/DDBJ* (*accesión number: IWS40001947*) y se envió al *WHO Nomenclature Committee for factors of the HLA System Subcommittee for Killer-cell*

*Immunoglobulin-like Receptors*, quien, siguiendo las normas establecidas en el último informe de Nomenclatura (Marsh et al, 2003), le asignó nombre oficial. La secuencia *KIR2DL5B\*002-EC* ha sido depositada en el *EMBL* y está pendiente de obtener un número de acceso y un nombre oficial.

### 1.7. Análisis de datos

El desequilibrio de ligamiento entre dos loci (A y B), D, se determinó según la fórmula original (Lewontin, 1964; Lewontin y Dunn, 1960):  $D_{AB} = p_{AB} - p_A \cdot p_B$ , donde  $p_{AB}$  es la frecuencia de los haplotipos que portan ambos loci y  $p_A$  y  $p_B$  son las frecuencias de cada locus. Para normalizar D se dividió entre la máxima frecuencia alélica teórica ( $D' = D/D_{max}$ ). Las frecuencias de cada haplotipo fueron calculadas usando el programa PHASE v2.1 (Stephens y Donnelly, 2003; Stephens et al, 2001). Las frecuencias se compararon usando el test  $\chi^2$ , considerándose significativas diferencias con p-valor > 0,05.

### 1.8. Citometría de flujo

PBMCs aisladas mediante centrifugación en *Lymphoprep (AXIS-Shield)* del donante LR1675 se incubaron a 4°C con los siguientes anticuerpos: anti-CD56-APC (*eBioscience*), anti-CD3-VioBlue (*Miltenyi Biotec*), anti-2DL3-FITC (180701, *R&D Systems*) y anti-2DL3/L2/S2- PE/Cy7 (DX27, *Miltenyi Biotec*). Los controles negativos de isotipo utilizados fueron los siguientes: IgG2a-FITC (*Invitrogen*) e IgG2a-PE (S43.10, *Miltenyi Biotec*). El análisis se hizo sobre la población correspondiente a las células NK (CD3<sup>-</sup>, CD56<sup>+</sup>).

## 2. Análisis de expresión de los alelos del gen *KIR2DL5A*

### 2.1. Construcciones KIR2DL5A-FLAG

Las construcciones utilizadas fueron secuencias de ADNc que contenían el epítipo artificial FLAG entre el péptido señal y el dominio extracelular D0 clonados en el vector pCDNA3 (Estefanía et al, 2007). Los ADNc codificaban para los alelos KIR2DL5A\*001 y KIR2DL5A\*005, así como para dos construcciones mutantes que portaban cada una de ellas una de las dos sustituciones que distinguen dichos alelos N152D y G174S (Figura 6).

Plásmido	Dominio D2	
	152	174
<b>2DL5FLAG</b>		
<b>A*001</b>	Asn (N)	Gly (G)
<b>A*005</b>	Asp (D)	Ser (S)
<b>N152D</b>	Asp (D)	Gly (G)
<b>G174S</b>	Asn (N)	Ser (S)

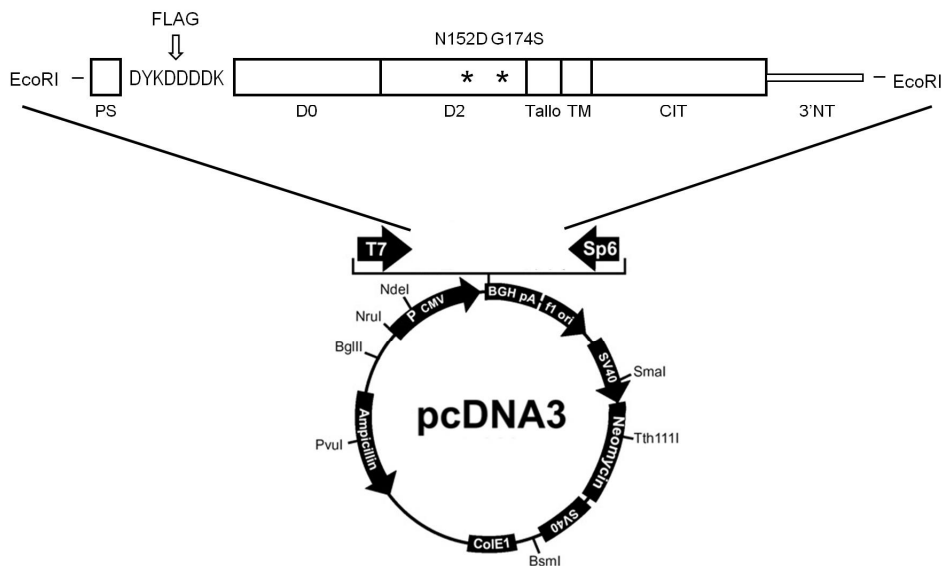


Figura 6. Construcciones marcadas con el epítipo FLAG que representan los polimorfismos comunes de *KIR2DL5A*.

Todos los experimentos fueron replicados usando al menos cinco lotes distintos de cada plásmido para controlar posibles variaciones aleatorias atribuibles a la calidad del ADN. La ausencia de mutaciones se examinó mediante secuenciación con el cebador universal SP6 y el cebador interno de diseño local R5e61 (5'-gttttgagcttggttcag-3').

## **2.2. Generación de transfectantes HEK-293T 2DL5-FLAG y Jurkat 2DL5-FLAG**

Las células HEK-293T se crecieron según se describe en el apartado 3.1. de Materiales y métodos y se transfectaron mediante el método de fosfato cálcico (Jordan et al, 1996). Cinco microgramos de cada construcción pCDNA3-2DL5F y 0,1 µg de pEGFP-N1 (para controlar la eficacia de la transfección), se cotransfectaron a las 16-24 h de sembrar  $2 \cdot 10^6$  células (tras alcanzar ~50% de confluencia). Posteriormente, las células fueron cultivadas durante 48 h antes de realizar el marcaje para la citometría de flujo.

En cuanto a las células Jurkat, un millón de las mismas se cotransfectaron con 2 µg de cada construcción pCDNA3-2DL5F y 0,1 µg de pEGFP-N1 usando el *Nucleofector I*, la solución de Nucleofección V y el programa X-01 (*Amaxa Biosystems*). Tras la transfección, se eliminaron las células muertas mediante centrifugación en *Lymphoprep (AXIS-Shield)* y se cultivaron durante 24 h (según se describe en el apartado 3.1. de Materiales y métodos) antes de realizar el marcaje para la citometría de flujo.

## **2.3. Western blot**

Células HEK-293T ( $10\text{-}20 \cdot 10^4$ ) transfectadas con las construcciones pCDNA3-2DL5A se solubilizaron en tampón de lisis con Nonidet P-40 1% conteniendo inhibidores de proteasas (*Protease Inhibitor Cocktail, Roche*) 48 h después de la

transfección. Las proteínas se redujeron y desnaturalizaron en tampón Laemmli 5x, se separaron en gel de poliacrilamida 10%-SDS (160V) y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (*iBlot Gene Transfer Stacks Nitrocellulose, Mini, Novex Life Technologies*). La membrana se bloqueó durante 1 h con el tampón de bloqueo Li-Cor para *Odyssey* (*Li-Cor Bioscience*). Para detectar las bandas proteicas correspondientes a KIR2DL5A se incubó la membrana durante 12-16 h con el AcMo anti-FLAG M2 (*Sigma Aldrich*) (dilución 1:1000). Todas las diluciones de los anticuerpos se realizaron en el tampón de bloqueo. Como anticuerpo secundario se utilizó una dilución 1:5000 de un anticuerpo de burro anti- IgG de ratón marcado con IRDye800 (*Li-Cor Bioscience*), cuya señal se detectó mediante el sistema de imagen *Odyssey Infrared Imaging System* (*Licor Biosciences, Lincoln, NE*). Como proteína control se usó la  $\beta$ -actina, que se detectó con una dilución 1:2000 de un anticuerpo de conejo específico de la  $\beta$ -actina humana (*Abcam*) y un anticuerpo secundario de burro anti-IgG de conejo marcado con IRDye700 (*Li-Cor Bioscience*).

#### **2.4. Citometría de flujo**

Los AcMo primarios purificados usados para los experimentos de citometría de flujo con los transfectantes KIR2DL5A-FLAG fueron los siguientes: anti FLAG M2 (*Sigma-Aldrich*), anti-KIR2DL5 UP-R1 (purificado de ascitis) y un control de isotipo IgG1 (MOPC-21, *Sigma Aldrich*). Como anticuerpo secundario se usaron fragmentos F(ab')<sub>2</sub> de cabra anti IgG+IgM de ratón conjugados con ficoeritrina (*Jackson ImmunoResearch*).

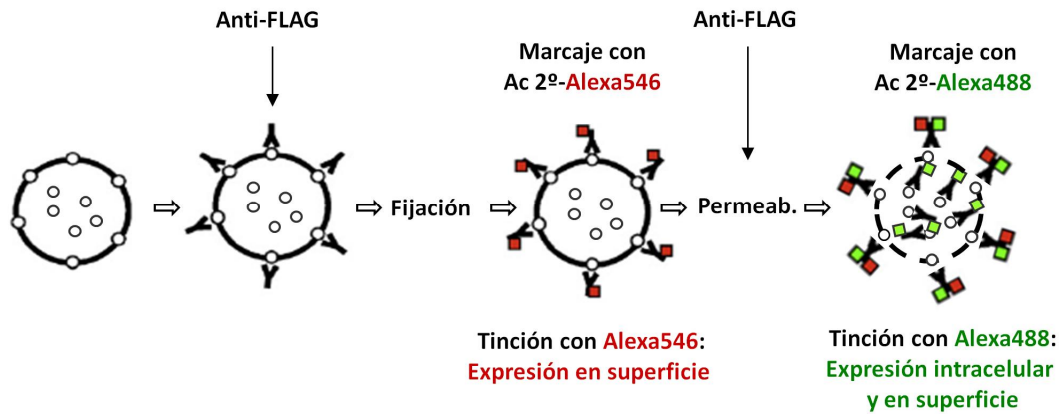
Aproximadamente, 24 y 48 h tras la transfección de las células Jurkat y HEK-293T, respectivamente, se determinó la expresión transitoria en superficie de KIR2DL5 mediante marcaje a 4°C. Se determinó la Mediana de Intensidad de Fluorescencia (MFI)

para PE sobre el total de células. Para determinar el éxito de la transfección se comprobó que de un 10 a un 40% de las células eran positivas para la Proteína Fluorescente Verde.

Células mononucleares de sangre periférica aisladas mediante centrifugación en *Lymphoprep (AXIS-Shield)* o células NK expandidas in vitro de donantes sanos con genotipo KIR conocido se incubaron a 4°C con los siguientes anticuerpos: anti-CD56-APC (*eBioscience*), anti-CD3-PE/Cy7 (*Biolegend*), anti-KIR2DL5-PE (UP-R1, *Biolegend* y *Miltenyi Biotec*) y anti-KIR2DL2/L3/S2 (DX27, *Miltenyi Biotec*). Como anticuerpo secundario se usaron fragmentos  $F(ab')_2$  de cabra anti IgG+IgM de ratón conjugados con PE (*Jackson ImmunoResearch*). Los controles negativos de isotipo utilizados fueron los siguientes: IgG1-PE (MOCP-21, *Invitrogen*) e IgG2a-PE (S43.10, *Miltenyi Biotec*). Se determinó tanto el porcentaje como el MFI de las células KIR2DL5 positivas tras seleccionar la población correspondiente a las células NK (CD3<sup>-</sup>, CD56<sup>+</sup>).

## **2.5. Microscopía confocal**

Las células HEK-293T se transfectaron con cada una de las cuatro construcciones *pCDNA3-2DL5F* y, tras 48 h, se llevó a cabo una estrategia de marcaje en suspensión con el anticuerpo anti-FLAG M2, fijación, permeabilización y análisis mediante microscopía confocal basada en (Sierra-Filardi et al, 2010) que se detalla en la Figura 7:



**Figura 7. Estrategia de microscopía confocal.** Tras incubar las células con el anticuerpo anti-FLAG, fueron fijadas e incubadas con un anticuerpo secundario marcado con Alexa-546 (*Invitrogen*) para detectar la expresión de KIR2DL5-FLAG en la superficie celular. Después, las células fueron permeabilizadas e incubadas de nuevo con anti-FLAG y un anticuerpo secundario conjugado con Alexa-448 (*Invitrogen*) para detectar las moléculas KIR2DL5-FLAG presentes tanto sobre la membrana como en el interior celular. Los núcleos se tiñeron con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI).

Paralelamente, se controló la expresión en superficie de KIR2DL5A de cada uno de los transfectantes mediante citometría de flujo tal y como se describe en el apartado correspondiente. Las fijaciones se realizaron con paraformaldehído 4% en PBS durante 15 min a temperatura ambiente y lavadas en PBS-BSA 0,01%. Para la permeabilización las células se incubaron con Tritón X-100 al 0,3% (5 min a temperatura ambiente). Una vez teñidas, se montaron en portaobjetos cubiertos con poli-L-Lisina para favorecer la adhesión rápida y la forma esférica de las células. Las imágenes presentadas corresponden a cortes únicos hechos, aproximadamente, a la altura del diámetro mayor de cada célula.

## 2.6. Modelado molecular de KIR2DL5A\*001 y \*005

Tomando como referencia la estructura cristalina de KIR2DL1 (PBD: 1NKR, Fan et al, 1997) realizamos una predicción estructural del dominio D2 de KIR2DL5A\*001 y \*005 por homología de secuencia usando el programa *Swiss model*, accesible a través de

la web del servidor ExpASY (<http://www.expasy.org/swissmod/SWISS-MODEL.html>).

Las estructuras generadas se visualizaron y editaron con el programa Pymol (*The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.7.4 Schrödinger, LLC*).

## 2.7. Análisis de datos

Para comparar los datos obtenidos mediante citometría de flujo usamos la media de intensidad de fluorescencia (MFI). Para realizar el análisis estadístico los valores de MFI de cada experimento de citometría de flujo con los transfectantes 2DL5FLAG fueron normalizados con el valor Z mediante la fórmula  $(V - V_{\text{media}})/\sigma$ , donde “V” es la variable y “ $\sigma$ ” es la desviación estándar y comparados mediante la prueba *t* de Student para muestras pareadas. Se consideraron significativas diferencias con p-valor <0.05.

## 3. Distribución de ligandos potenciales de KIR2DL5

### 3.1. Líneas celulares y cultivo

Las líneas celulares utilizadas se describen en las tablas 9, 10 y 11 de la sección de Resultados. Todas las líneas celulares linfoblastoides B, las derivadas de HMy2.C1R, las líneas B Daudi, Raji (Linfoma de Burkitt) y B95-8, las líneas de estirpe T, MLA144, MOLT-4, Jurkat, BW5147 y BWZ.36, las células NK3.3, así como la de origen monocítico U-937 y eritroide K562 se cultivaron en RPMI-Glutamax con 10% de suero bovino fetal y 1% de penicilina/estreptomicina. Las células 721.221 y C1R transfectadas con HLA-E (721.221AEH), HLA-G (721.221 G1), HLA- C\*1505, C\*03:04, B\*73:01 y moléculas MHC-like además de los transfectantes BWZ.36 KIR-CD3 $\zeta$  se mantuvieron con G-418 a 1 $\mu$ g/ml y las células transfectadas con HLA-F con G418 1 $\mu$ g/ml e Higromicina a 0,75  $\mu$ g/ml. La línea celular murina Ba/F3 se cultivó en presencia de 10ng/ml de IL3.

Las LCLs PITOUT, NDS-JD, NDS-WW, PAR, GB92, C211 y LE023 pertenecen a distintos *International Histocompatibility Workshop (IHW) Cell Panels* (<http://www.ihwg.org/reference/index.html>). Las moléculas HLA-I que expresan se recogen en la tabla 10 de la sección de Resultados.

Todas las células adherentes (CHO, HeLa, HEK-293T, MRC5, HCA2-hTERT, JEG-3, WM1361C, DU-145, COS-7, NIH-3T3 y fibroblastos humanos de Vircel, FHV) se cultivaron en DMEM con 10% de suero bovino fetal, 1% de penicilina/estreptomicina y glutamina a 2 mM.

Las células mononucleares de sangre periférica, así como los linfocitos de ganglio y bazo de distintos donantes se aislaron mediante centrifugación en *Lymphoprep (AXIS-Shield)*.

Las LCLs establecidas de pacientes con defectos en el transportador de péptidos TAP nos fueron proporcionadas por J. Zimmer, *Centre de Recherche Public de la Santé, Luxembourg*.

Los transfectantes 721.221 que sobreexpresan MR1 y el transfectante 721.221-mock, así como los transfectantes HMy2-C1R de CD1a, CD1b, CD1c y CD1d fueron cedidos amablemente por Eduardo Martínez-Naves, UCM y Dolores Jaraquemada, UAB, y los transfectantes 721.221 AEH, G1 y C\*03:04 por Miguel López-Botet (IMIM). Los transfectantes de HLA-C\*15:05 y B\*73:01 fueron generados en el laboratorio previamente a este trabajo. Los transfectantes CHO MICA, CHO MICB, CHO ULBP1, CHO ULBP2 y CHO ULBP3 fueron generados en el laboratorio de HT. Reyburn (CNB).

### 3.1.1. Generación de los transfectantes de HLA-F

Previamente a este trabajo, se habían clonado en el laboratorio (E. Estefanía, C. Vilches) los transcritos maduros de HLA-F en el vector pCDNA3: uno que contiene 8 exones (*accession number* NM\_018950) y otro carente de exón 7, el cual, codifica para parte del dominio citoplásmico (*accession number* AY253270). Además, disponíamos también de una construcción que incluía el ADNc de la  $\beta_2m$  en el vector hygROSV5 (C. Vilches), RSV5-  $\beta_2m$ .

Para la generación del transfectante de  $\beta_2m$  se resuspendieron  $10 \cdot 10^6$  células BW5147 en 400  $\mu$ l de PBS y se electroporaron con 50  $\mu$ g de la construcción RSV5- $\beta_2m$  linearizada, en el electroporador *Gene Pulser II* (BioRad) mediante un pulso de 300 V a 975  $\mu$ F ( $\tau \sim 18,5$ ) usando cubetas de 4 mm. Las células electroporadas se transfirieron inmediatamente a 50 ml de RPMI suplementado con 20% de suero bovino fetal precalentado y se repartieron en dos placas de 24 pocillos. Tras 48 horas, los transfectantes se seleccionaron en RPMI con 10% FCS, 1% penicilina/estreptomicina y 1mg/ml de higromicina (*Sigma-Aldrich*). Las colonias aisladas que crecieron se expandieron y se chequeó la expresión de  $\beta_2m$  mediante tinción por citometría de flujo con sobrenadante del AcMo BBM.1.

Para la generación de los transfectantes de HLA-F, se electroporaron en las mismas condiciones, las células BW5147-  $\beta_2m$  con 60 $\mu$ g de cada construcción linearizada, pCDNA3 HLA-F ex7- o pCDNA3 HLA-F ex7+, obteniéndose unos valores de  $\tau$  de 24 y 23s, respectivamente. En este caso la selección se realizó con G418 (1mg/ml). La expresión de HLA-F y  $\beta_2m$  de los clones seleccionados se chequeó mediante tinción por citometría de flujo con los AcMo W6/32 y BMM.1, respectivamente.

Para determinar la dinámica de expresión de HLA-F, las células BW5147-HLA-F ex7- y BW5147-HLA-F ex7+ se incubaron durante 24 horas a 25°C con 5% de CO<sub>2</sub>, tras lo cual se mantuvieron a 37°C comprobando a las 2, 6 y 16h la expresión de HLA-F mediante tinción con los AcMo W6/32 y BBM.1 (no mostrado).

### **3.2. Generación de las construcciones KIR-CD3 $\zeta$**

Las construcciones que codificaban para las proteínas de fusión KIR2DL1-CD3 $\zeta$  y KIR2DL5-CD3 $\zeta$  se generaron mediante PCR solapante a partir de dos productos de PCR que incluían los exones que codifican para los dominios tipo Ig y el tallo de KIR2DL1\*002 o KIR2DL5A\*001 y la región transmembrana y el dominio citoplasmático de la cadena CD3 $\zeta$  del TCR (Figura 1, sección 3 de Resultados). Los exones de la región extracelular de KIR2DL1 se generaron a partir de un ADNc previamente clonado en el vector RSV5gpt (RSV5gpt2DL1) con el cebador directo RSV5F-77 (5' ctgaattccgcattgcagag -3') y el reverso Rcon560 (5'- ggtgttctccaatgaggcg -3'). El molde para amplificar la secuencia del dominio citoplasmático de la cadena CD3 $\zeta$  fue un vector proporcionado por HT. Reyburn y se usaron los cebadores Fa517 (5'- gttggtcagatgtcatgtttgaa- 3') y BGH (5'- tagaaggcacagtcgagg -3') y la polimerasa EcoTaq (Ecogen) bajo las siguientes condiciones: 2 min a 96 °C seguidos de 5 ciclos de 10 s a 94 °C, 10 s a 45 °C y 1 min a 72 °C; 15 ciclos de 10 s a 94 °C, 10 s a 56 °C y 1 min a 72 °C.

Los exones de la región extracelular de KIR2DL5 se obtuvieron a partir del vector NV23d14 con la pareja de cebadores M13F y R2DL5CD3 $\zeta$  (5'- agcaagtagcagaggtgcaggtgtctgcggataaccagtt -3'). Para amplificar la secuencia del CD3 $\zeta$  se usaron el cebador directo F2DL5CD3Z (5' atccgcagacacctgcacctctgctacttgctagatggaa -3') y el reverso BGH. Ambas PCRs se llevaron a cabo usando la polimerasa EcoTaq

(Ecogen) bajo las siguientes condiciones: 2 min a 94 °C seguidos de 15 ciclos de 10 s a 94 °C, 30 s a 56 °C y 90 s a 72 °C.

Los productos de esta primera ronda de PCR constituirían el ADN molde para llevar a cabo la segunda PCR y generar así las construcciones quiméricas KIR2DL1-CD3 $\zeta$  y KIR2DL5-CD3 $\zeta$ .

Para generar la construcción KIR2DL1-CD3 $\zeta$  los fragmentos KIR2DL1 y CD3 $\zeta$  se fusionaron en una PCR anidada usando los cebadores Fc55HindIII (5'-cggcggaagcttggctgctgtctgtcc – 3' y SP6 y la polimerasa EcoTaq (Ecogen) bajo las siguientes condiciones: 2 min a 96 °C seguidos de 5 ciclos de 10 s a 94 °C, 10 s a 60 °C y 1 min a 72 °C; 15 ciclos de 10 s a 94 °C, 10 s a 65 °C y 10 min a 72 °C. El producto se clonó en el vector pCR2.1TOPO 2.1 (*Invitrogen*) y después entre los sitios de EcoRI y HindIII de pCDNA3.

Para fusionar los fragmentos KIR2DL5 y CD3 $\zeta$ , se realizó otra PCR anidada con Fcon69bHindIII (5'- agagtacgcggaagcttcaccggcagcaccatgtc- 3') y SP6 usando la polimerasa AmpliTaq Gold. Las condiciones de la PCR fueron: 8 min a 95 °C seguidos de 15 ciclos de 20 s a 95 °C, 30 s a 60 °C y 90 s a 72 °C; y una elongación final de 2 min a 72 °C. El producto se digirió con *EcoRI* y *HindIII*, se purificó en gel y se insertó en el vector pCDNA3.

### 3.3. Generación de transfectantes BWZ.36 KIR-CD3 $\zeta$

Diez millones de células BWZ.36 (proporcionadas por F. Sánchez-Madrid, CNIC, con permiso de N. Shastri, U. Berkeley) se resuspendieron en PBS y se electroporaron con 50  $\mu$ g de cada construcción linearizada, pCDNA3-2DL5-CD3 $\zeta$  o pCDNA3-2DL1-CD3 $\zeta$ , en el electroporador *Gene Pulser II* (*BioRad*) mediante un pulso de 300 V a 975  $\mu$ F ( $\tau$  ~15-25s) usando cubetas de 4mm. Las células electroporadas se transfirieron inmediatamente a 50ml de RPMI suplementado con 20% de suero bovino

fetal precalentado y se repartieron en dos placas de 24 pocillos. Tras 48 horas, los transfectantes se seleccionaron en RPMI con 10% FCS, 1% penicilina/estreptomicina y 2mg/ml de G418 (Sigma-Aldrich). Las colonias aisladas que crecieron se expandieron y se chequeó la expresión de cada proteína de fusión 2DL5-CD3 $\zeta$  y 2DL1-CD3 $\zeta$  mediante tinción por citometría de flujo con los AcMo UP-R1 (anti-KIR2DL5) y HP-MA4 (anti-KIR2DL1/S1/S3/S5), respectivamente.

### **3.4. Ensayo de activación mediante cuantificación de actividad $\beta$ -galactosidasa por quimioluminiscencia**

Los transfectantes BWZ.36-2DL1-CD3 $\zeta$  y 2DL5-CD3 $\zeta$ , se sembraron en placas de 96 pocillos ( $10^5$  células/pocillo) y se cocultivaron con la misma cantidad de cada una de las células del panel en medio RPMI GlutaMax con 10% de suero bovino fetal, 1% penicilina/streptomicina y 10 ng/ml de PMA durante 14-16 h. En cada experimento se incluyeron varios controles que se detallan en el apartado 3.2. de los Resultados.

La actividad  $\beta$ -gal se determinó mediante medición de la producción de luz (475 nm) en unidades relativas durante 10 s (url/10s) en un luminómetro (*Sirius L Single Tube luminometer, Berthold Detection System*) tras lisar las células e incubarlas con un sustrato quimioluminiscente, Galacton Plus, según las instrucciones del fabricante ( *$\beta$ -gal reporter gene assay, chemiluminescent, Roche*).

La actividad  $\beta$ -gal para cada cocultivo se relativizó tomando como referencia la obtenida con la célula control BW5147 y se realizó la media entre los dos duplicados.

Para los experimentos de bloqueo de la interacción de KIR2DL1 y 2DL5 con moléculas HLA, las células diana se incubaron con 20  $\mu$ l de sobrenadante del AcMo A6.136 (anti-HLA-I) durante 1 h antes de añadir al cocultivo los transfectantes BWZ.36 KIR-CD3 $\zeta$ . Para el bloqueo de las moléculas KIR2DL5 y KIR2DL1 sobre sus

respectivos transfectantes BWZ.36 KIR-CD3 $\zeta$ , se incubaron con 10  $\mu$ g de los AcMo purificados anti-KIR2L5, 513 y 611 (anticuerpos amablemente proporcionados por Jeffrey Houchins, *R&D Systems*, no comercializados) y HP-MA4 (anti-KIR2DL1) durante 1h antes de añadir al cocultivo las células diana.

### 3.5. Generación de las construcciones KIR-Fc

Los exones que codifican para los dominios tipo Ig de KIR2DL5A\*001 y KIR2DL1\*002 se amplificaron mediante PCR a partir de dos ADNc clonados en el vector CD5neg1 (Estefanía et al, 2007; Winter y Long, 2000). Los cebadores usados fueron: F148*Hind*III (5'-CCCAATAagcttcatgagggtggtcaggacaag -3') y R1065a*Bam*HI (5' - TGCTTAggatccatgtgcaggtgtctgcggatac - 3') para KIR2DL5A\*001 y F434*Hind*III (5'-CCCAATAagcttcatgagggtccacagaaaac-3') y R1065b*Bam*HI (5'-TGCTTAggatccatgtgcaggtgtcgggggttac - 3') en el caso de KIR2DL1\*002. Se usó la polimerasa Pfx50 (*Life Technologies*) bajo las siguientes condiciones: 2 min a 95 °C seguidos de 10 ciclos de 20 s a 94 °C, 30 s a 68 °C y 1 min a 72 °C; 20 ciclos de 20 s a 94 °C, 30 s a 65 °C y 1 min a 72 °C. Los productos se digirieron con *Hind*III y *Bam*HI, se purificaron en gel y se insertaron en el vector Signal pIgPlus (*R&D Systems*) que contiene la región bisagra y dominios CH2 y CH3 de la IgG1 humana mutados para evitar su unión a receptores para el fragmento cristalizable (Fc).

### 3.6. Transfección y producción de las proteínas de fusión KIR-Fc

Para cada proteína de fusión se sembraron  $18 \cdot 10^6$  células HEK-293T repartidas en 6 placas de 10cm que fueron transfectadas, tras 16-24 h (tras alcanzar ~50% de confluencia) con 10  $\mu$ g del plásmido, mediante el método de fosfato cálcico (Jordan et al, 1996). Tras la transfección el medio se sustituyó por medio AIM V (*Gibco*) libre de

suero y ~120 ml de sobrenadante se recogieron 3 y 7 días después y se almacenaron a 4°C hasta su purificación en columna de proteína G-Sepharosa (*Hi-Trap Protein G HP, GE Healthcare*) con bomba peristáltica. Las proteínas se eluyeron con tampón Glicina-HCl a pH 2,7 sobre Tris-HCl 1M, pH 8. Las fracciones purificadas se dializaron contra 1L de PBS en *cassettes* de diálisis de 0,5-3 ml (*Pierce*). La concentración de las proteínas KIR-Fc se determinó mediante absorbancia a 280 nm.

### **3.7. Citometría de flujo**

La expresión de moléculas HLA-I en las líneas celulares y los transfectantes se comprobó previamente a los experimentos de activación mediante tinción con el AcMo, W6/32, que reconoce específicamente moléculas HLA completas (cadenas  $\alpha + \beta_2m$ ) (Kievits y Ivanyi, 1987). Igualmente, la expresión de moléculas MHC-like en los transfectantes para cada una de ellas se determinó con los AcMo siguientes: anti-ULBP1-3 y anti MICA/B (proporcionados por HT. Reyburn), anti-CD1a, b y d (clones HI149, eBioSN13 y 51.1, *eBioscience*) y anti-CD1c (clon L161, *Biolegend*). La expresión de KIR2DL5 y KIR2DL1 en los transfectantes BWZ.36 2DL5-CD3 $\zeta$  y BWZ.36 2DL1-CD3 $\zeta$ , se comprobó mediante tinción con los AcMo UP-R1 y HP-MA4 (purificados de ascitis). Como control negativo se usó un anticuerpo anti-myc (9510, IgG1, proporcionado por M. López-Botet). Como anticuerpo secundario se usaron fragmentos F(ab')<sub>2</sub> de cabra anti IgG+IgM de ratón conjugados con ficoeritrina (*Jackson ImmunoResearch*).

En las tinciones con las proteínas de fusión KIR-Fc, se bloquearon los FcRs mediante incubación a 4°C, durante 20 min con suero de conejo (10  $\mu$ l/  $2 \cdot 10^5$  células) y, posteriormente, se incubaron con 10  $\mu$ g de cada proteína de fusión, KIR2DL5-Fc o KIR2DL1-Fc, durante 1 h a 4°C, se lavaron con PBS y fueron teñidas con fragmentos

F(ab')<sub>2</sub> de cabra anti-Fc $\gamma$  humano conjugado con ficoeritrina (*Jackson ImmunoResearch*).

### **3.8. Análisis de datos**

Los niveles de activación relativos de los transfectantes BWZ.36 KIR-CD3 $\zeta$  frente a líneas celulares con y sin bloquear con los AcMo anti-KIR/anti-HLA, fueron normalizados según se describe en el apartado 2.8. de Materiales y métodos y se compararon mediante la prueba *t* de *Student* para muestras no pareadas. Se consideraron significativas diferencias con p-valor <0.05.

---

Esta tesis ha podido ser elaborada gracias a la financiación por parte de proyectos concedidos por el Programa Nacional de Biología Fundamental del Plan Nacional de I+D+i 2004-2007 del Ministerio de Educación y Ciencia (BFU2005-04622); por el Programa Nacional de Proyectos de Investigación Fundamental del Plan Nacional I+D+i 2008-2011 del Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2010-22153-C03) y por la Asociación Española Contra el Cáncer (AECC) (GCB15152947MELE).



## **Resultados**

---



## 1. Diversidad del complejo de genes *KIR* en la población española

### 1.1. Análisis de genotipos y haplotipos comunes

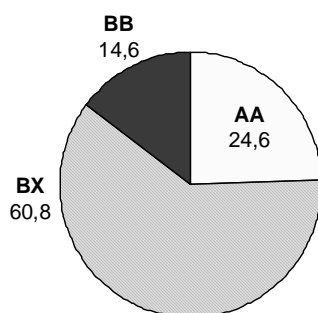
#### 1.1.1. Diversidad de genotipos *KIR*: perfiles genéticos y frecuencias

Para explorar la diversidad y la distribución de genotipos y haplotipos *KIR* en la población española estudiamos una muestra de 403 donantes no relacionados. Su contenido en genes *KIR* se determinó mediante métodos de PCR-SSP diseñados en nuestro laboratorio (Ordóñez et al, 2011; 2008; Gómez-Lozano et al, 2007; 2002). Los genotipos inusuales fueron confirmados mediante PCR-SSOP comercial. La frecuencia de cada gen, estudiada previamente en 289 de estos individuos (Ordóñez et al, 2009), resultó similar a las frecuencias de otras poblaciones Caucasoides (Bontadini et al, 2006; Hsu et al, 2002b; Norman et al, 2001). Los genes que constituyen los segmentos relativamente bien conservados del complejo *KIR* (*KIR3DP1*, *KIR2DL4*, en el centro y *KIR3DL3* y *KIR3DL2* en los extremos centromérico y telomérico, respectivamente) estaban presentes en todos los individuos. Las frecuencias de los genes *KIR2DL/3DL* no conservados fueron cercanas al 90%, con las excepciones de *KIR2DL2* y *KIR2DL5* (58,6% y 57,1%, respectivamente). La frecuencia de los *KIR* activadores, resultó más variable, oscilando entre un 29,5% para *KIR2DS5* y un 96,3% para *KIR2DS4*, siendo *KIR2DS2* el *KIR* activador funcional más frecuente (58,8%) (Tabla 7).

<b>KIR de cola larga</b>	<b>%</b>	<b>KIR de cola corta</b>	<b>%</b>	<b>Pseudogenes</b>	<b>%</b>
<i>2DL1</i>	96,3	<i>2DS1</i>	42,4	<i>2DP1</i>	96,3
<i>2DL2</i>	58,6	<i>2DS2</i>	58,8	<i>3DP1</i>	100,0
<i>2DL3</i>	88,3	<i>2DS3</i>	34,5	full	31,5
<i>2DL4</i>	100,0	cen	30,5	del	96,0
<i>2DL5</i>	57,1	tel	14,6		
<i>2DL5A</i>	40,7	<i>2DS4</i>	96,3		
<i>2DL5B</i>	32,3	full	36,7		
<i>3DL1</i>	96,6	del	82,1		
<i>3DL2</i>	100,0	<i>2DS5</i>	29,5		
<i>3DL3</i>	100,0	<i>3DS1</i>	41,7		

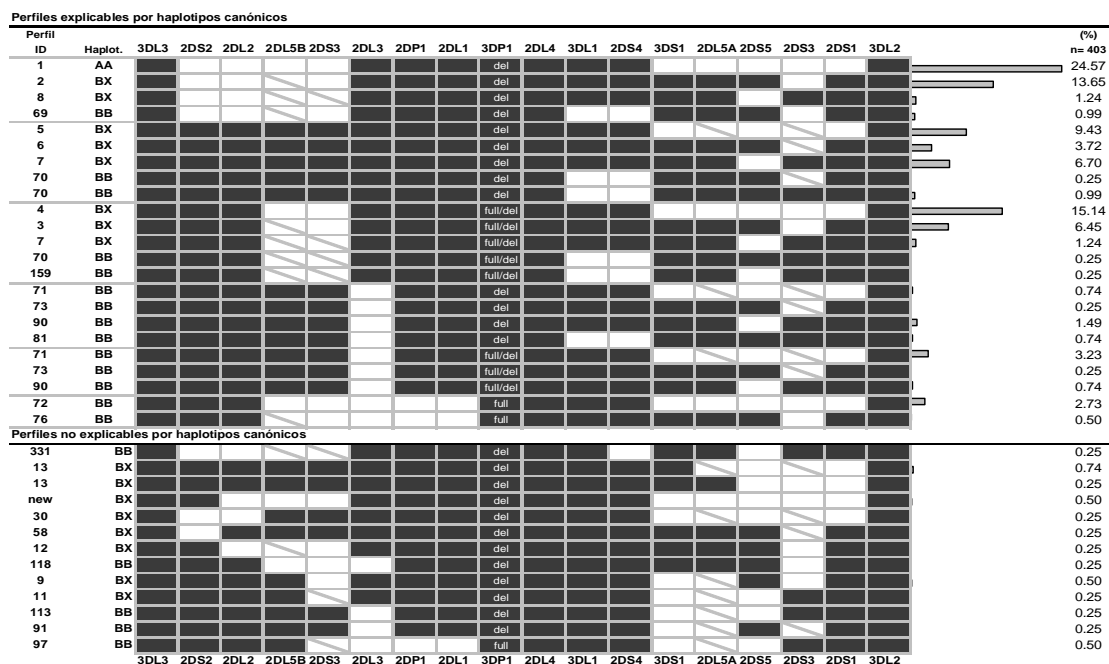
**Tabla 7. Frecuencia de los genes *KIR*.** %: porcentaje de individuos positivos; full: variante completa; del: variante que presenta una delección; cen: localización centromérica; tel: localización telomérica.

En función de sus genes *KIR*, cada individuo fue asignado a uno de los tres grupos de genotipos: AA (individuos que presentan todos los genes del haplotipo A y ningún otro), BB (individuos carentes de cualquiera de los genes del haplotipo A y con uno o más del B), y BX (los que poseen todos los genes del haplotipo A y uno o más del haplotipo B) (McQueen et al, 2007). Sus frecuencias se muestran en la figura 8.



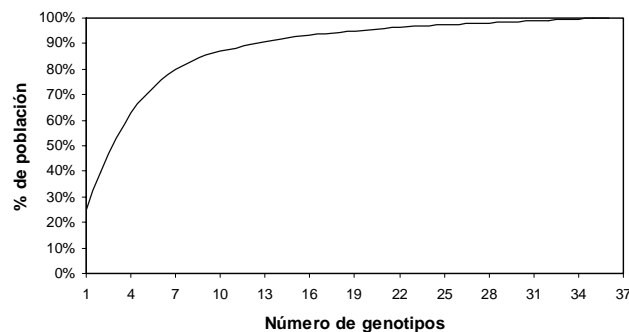
**Figura 8. Distribución de los grupos de genotipos AA, BB y BX.**

Encontramos 36 genotipos que portaban distinto número y combinación de genes (Figura 9). El genotipo AA, representado por una combinación única de nueve genes (*3DL3*, *2DL3*, *2DP1*, *2DL1*, *3DP1\*003*, *2DL4*, *3DL1*, *2DS4*, *3DL2*) de los que sólo uno es activador, fue el más frecuente (ID: 1, 24,57%). Los siguientes en frecuencia fueron del grupo BX (ID: 4, 2, 5, 7, 3 y 6), con una mayor heterogeneidad génica. Estos 6 genotipos dan cuenta de más del 50% de los individuos. En cuanto a los pertenecientes al grupo BB, dos genotipos predominantes (ID: 71 y 72) de un total de catorce, cuya frecuencia fue de 3,23 y 2,73%, respectivamente, están presentes casi en el 50% de los individuos con genotipo BB (Figura 9). Como se analiza en las secciones siguientes, todos los perfiles, excepto trece, correspondientes a 20 individuos (5,0%), se explicaban mediante combinaciones de haplotipos canónicos.



**Figura 9. Perfiles y distribución de genotipos KIR.** Para cada genotipo se señala la presencia (rectángulos azules) o ausencia (rectángulos blancos) de 17 genes KIR. *KIR2DL5* se subdivide en centromérico (*KIR2DL5B*) y telomérico (*KIR2DL5A*); al igual que *KIR2DS3*. Para estos dos genes, los rectángulos con línea diagonal indican presencia del gen en el individuo pero ausencia probable en esa localización. Se señala la presencia de las formas completa (full) o delecionada (del) de *KIR3DP1*. Las barras horizontales representan la frecuencia de cada genotipo expresada en porcentaje (%). El perfil ID corresponde a la numeración asignada por la *Allele Frequency Net Database* (González-Galarza et al, 2011).

La figura 10 muestra la distribución de las frecuencias del total de genotipos KIR. Más del 50% de la población estudiada puede ser representada por sólo tres genotipos; Seis dan cuenta del 75% del total y trece, del 90%. Por otro lado, catorce genotipos se observaron sólo una vez; cuatro de ellos corresponden a organizaciones canónicas mientras que diez no son explicables por éstas.



**Figura 10. Distribución de frecuencias de los genotipos KIR en la población española.**

La gráfica muestra la proporción de la población ( $n=403$ ) que puede ser representada por un número dado de genotipos ( $n=36$ ). Cada genotipo se añade a los acumulados en orden decreciente de frecuencia.

### 1.1.2. Análisis de semihaplotipos *KIR* centroméricos y teloméricos

Para asignar los genes a haplotipos específicos se siguieron determinadas asunciones que se detallan en la sección 1.2. de Materiales y métodos, basadas en los estudios de mapeo físico y desequilibrio de ligamiento entre parejas de genes *KIR* (Pyo et al, 2013; Vierra-Green et al, 2012; Gourraud et al, 2010) incluyendo los calculados para nuestra población de estudio (Tabla 8). Con la excepción de los genes presentes en todos los individuos (*3DL3 3DP1*, *2DL4* y *3DL2*), estimamos el desequilibrio de ligamiento entre parejas de loci. Para el análisis, *2DL2/L3*, *3DL1/L1* y *2DS4/S1* se consideraron formas alélicas de un mismo locus. Se observa un fuerte desequilibrio de ligamiento entre genes dentro de las regiones centromérica y telomérica, que es mucho menor entre genes en regiones opuestas del complejo. Existen genes con un desequilibrio de ligamiento positivo fuerte ( $D' = 0,71-0,97$ ) tanto en el lado centromérico (*2DS2-2DL2/2DP1-2DL1/2DL5B-2DS3*) como en el telomérico (*3DL1-2DS4/3DS1-2DL5-2DS35-2DS1*). Igualmente, parejas y bloques de genes en cada lado presentan un desequilibrio de ligamiento negativo completo o casi completo ( $D' = -0,95--0,99$ ), como *2DS2-2DL3* y *3DS1-2DS4* o del bloque *2DL5A-2DS5T* con *3DL1-2DS4* (tabla 8).

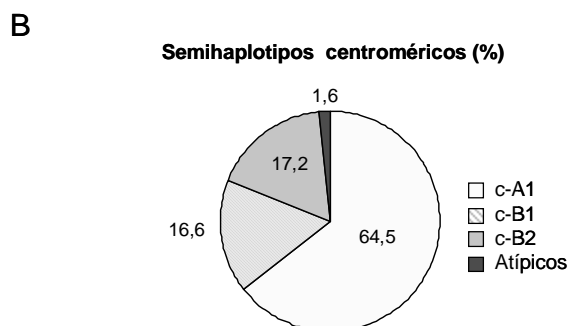


Genotipos y semihaplotipos centroméricos. La mayoría de los genotipos centroméricos fueron de tipo c-AA (42,4%), que no contiene KIR activadores. Los siguientes en frecuencia fueron combinaciones de un haplotipo A y un B: el 22,1% de los individuos fueron c-AB1 y 24,5%, c-AB2. Mucho menos frecuentes resultaron los genotipos sin ningún haplotipo centromérico A: c-B1B1 (3,0%), c-B1B2 (4,2%) y c-B2B2 (3,2%). Un 3,4% de los genotipos no encajaban con ninguna de las combinaciones de haplotipos consenso (Figura 11A).

De acuerdo con lo anterior, la frecuencia deducida del semihaplotipo c-A1, que codifica sólo KIR inhibidores, fue del 64,5%. Los dos haplotipos centroméricos B que codifican para uno u dos KIR activadores (sólo *KIR2DS2* o *KIR2DS2* y *KIR2DS3*, respectivamente) presentaron frecuencias similares, alrededor del 17% cada uno. Un 1,6% de los haplotipos centroméricos fueron estructuras atípicas (Figura 11B).

**A**

Genotipos comunes	3DL3	2DS2	2DL2	2DL5B	2DS3	2DL3	2DP1	2DL1	3DP1	(%)
c-AA	del	del	del	del	del	del	del	del	del	40,7
c-AB1	del	del	del	del	del	del	del	del	del	22,1
c-AB2	del	del	del	del	del	del	del	del	full/del	23,2
c-B1B1	del	del	del	del	del	del	del	del	del	3,0
c-B1B2	del	del	del	del	del	del	del	del	full/del	4,2
c-B2B2	del	del	del	del	del	del	del	del	full	3,2
<b>Genotipos atípicos</b>										
c-ARec	del	del	del	del	del	del	del	del	del	2,0
	del	del	del	del	del	del	del	del	del	
	del	del	del	del	del	del	del	del	del	
	del	del	del	del	del	del	del	del	del	
c-B1Rec	del	del	del	del	del	del	del	del	del	0,7
c-B2Rec	del	del	del	del	del	del	del	del	full	0,7
	del	del	del	del	del	del	del	del	del	



**Figura 11. Frecuencias de genotipos (A) y semihaplotipos centroméricos (B).**

Genotipos y semihaplotipos teloméricos. La combinación de dos semihaplotipos A fue la pareja más frecuente (t-AA, 58.6%). El 37% de los individuos presentaron combinaciones de haplotipos teloméricos t-A y t-B: el 25,6% fueron t-AB1 y el 11,4%, t-AB2. Combinaciones homo- y heterocigotas de haplotipos t-B representaron en conjunto el 3,5% de los genotipos. Un 3,0% de los genotipos no eran explicables por ninguna combinación de haplotipos teloméricos consenso (Figura 12A).

De acuerdo con estos genotipos, la frecuencia del semihaplotipo t-A, que codifica sólo uno o ningún *KIR* activador, fue del 76%. El 22% fueron t-B, que codifican para tres *KIR* activadores; de ellos, aproximadamente dos tercios portaban *KIR2DL5A* asociado a *KIR2DS5* (t-B1) y un tercio, asociado a su alotipo *KIR2DS3* (t-B2) (Figura 12B).

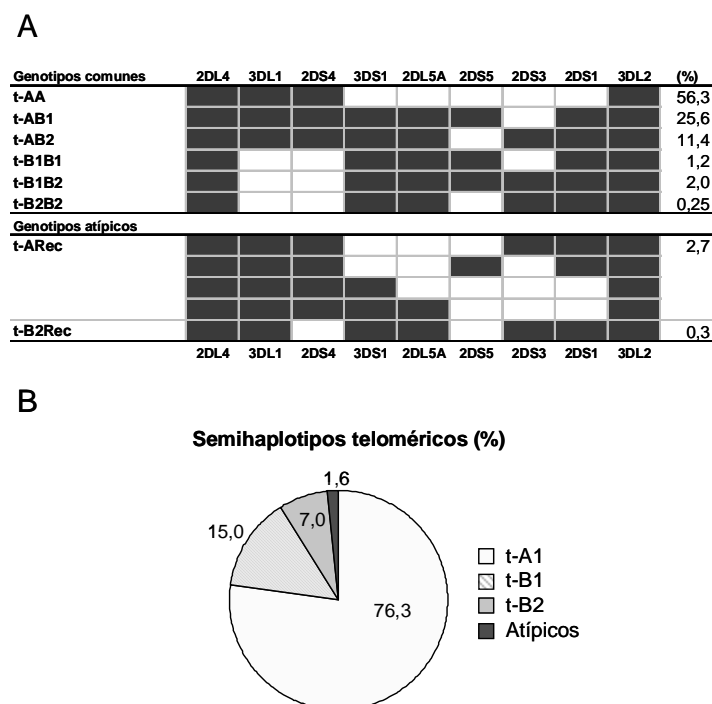
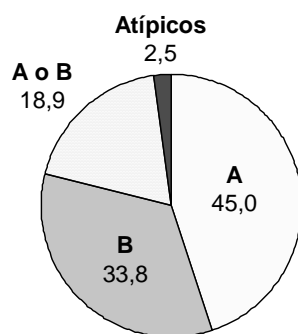


Figura 12. Frecuencias de genotipos (A) y semihaplotipos teloméricos (B).

Haplotipos completos deducidos. En función de los haplotipos parciales centroméricos y teloméricos pudimos deducir los haplotipos completos en el 81% de los individuos; en general, aquellos en los que, siendo homocigóticos para un semihaplotipo, no existe ambigüedad respecto a su combinación en cis o en trans. El 45% de los haplotipos completos fueron A (c-A/t-A), conteniendo sólo uno o ningún KIR activador (formas completa o delecionada de *KIR2DS4*, respectivamente). Un 33,8% fueron haplotipos B, que poseían de uno a cinco KIR activadores. El 18,9% no pudieron asignarse al grupo A o B al presentar los individuos un semihaplotipo A y otro B tanto en la región centromérica como en la telomérica y carecer de estudios familiares. Finalmente, un 2,5% correspondían a haplotipos atípicos (Figura 13) que se analizarán en la sección siguiente.



**Figura 13. Frecuencias de los haplotipos completos deducidos.** La frecuencia de cada haplotipo se expresa en porcentaje.

## 1.2. Análisis de ordenamientos genéticos atípicos

Veinte individuos (5,0%) tenían una dotación de genes *KIR* que no se ajustaba a ninguna combinación de haplotipos canónicos. Del total, un 68,4% pertenecían al grupo genotípico BX y un 31,6% al BB. Dieciséis podían explicarse mediante estructuras recombinantes descritas previamente mientras que los tres restantes portaban nuevos haplotipos o genes híbridos que se describen más adelante.

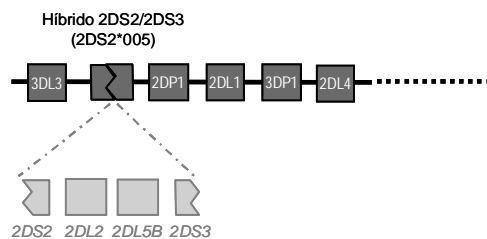
**- Región centromérica:**

Presencia de 2DS2 en ausencia de otros genes característicos del semihaplotipo centromérico B1. Este perfil génico atípico presente en cuatro individuos nos condujo a la identificación, en dos de ellos, de un haplotipo reducido, descrito por nuestro grupo, que presenta una delección del grupo de genes *KIR2DL2-2DL5B-2DS3* asociada a la formación del gen híbrido *2DS2\*005* (Figura 14), producto de la recombinación de *KIR2DS2\*0010101* y *KIR2DS3\*0010* (Ordóñez et al, 2011). La detección de *KIR2DS2\*005* mediante PCR-SSP (Ordóñez et al, 2011) nos permitió confirmar el haplotipo recombinante en 2 de los cuatro individuos sospechosos por su contenido en genes *KIR*, así como descubrirlo en un individuo, C342, con un contenido en genes *KIR* aparentemente normal (Figura 14 y Figura 9 (perfil ID: 81)).

**A**

	3DL3	2DS2	2DL2	2DL5B	2DS3	2DL3	2DP1	2DL1	3DP1	2DL4	3DL1	2DS4	3DS1	2DL5A	2DS5	2DS3	2DS1	3DL2
C052									del									
C180									del									
C342									del									

**B**

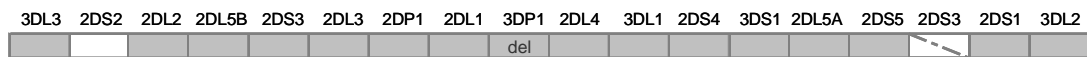


**Figura 14. Perfil de genes *KIR* de los individuos portadores del haplotipo atípico (A) y estructura del semihaplotipo centromérico recombinante que contiene el gen híbrido *KIR2DS2\*005*.** A., El gen *KIR2DL2* en el individuo C180 está presente en su otro haplotipo centromérico (c-B2), B, Los cuadros con fondo claro indican genes deletados.

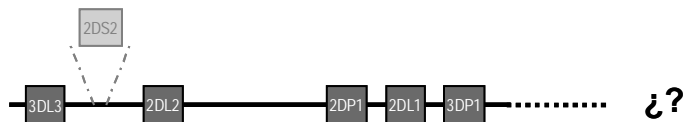
Los otros dos individuos que presentaban el perfil génico atípico pero fueron negativos para *KIR2DS2\*005*, resultaron portadores de un nuevo haplotipo recombinante cuya caracterización se detalla en el apartado 1.3.

Presencia de 2DL2 en ausencia de 2DS2. Este perfil génico atípico donde 2DS2 no acompaña a 2DL2 en un haplotipo c-B1 podría explicarse por una delección de ese locus descrita previamente en población negroide (Pyo et al, 2010; Norman et al, 2002), siendo ésta la primera vez que se describe en un individuo caucásico. Otro posible origen es el haplotipo ancestral con 2DL2 de cuya duplicación pudieron surgir los actuales KIR2DS2 y 2DL2.

A



B



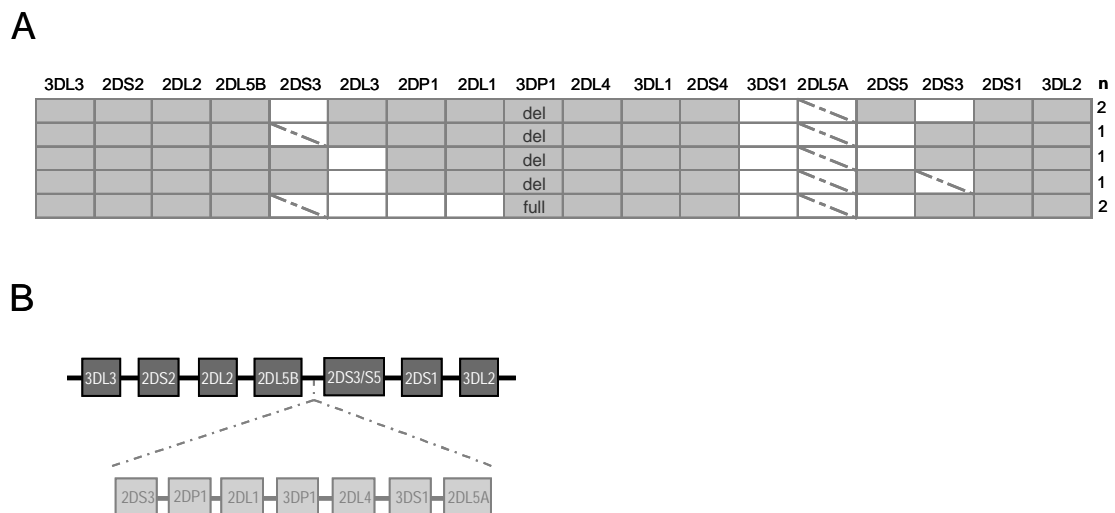
**Figura 15.** Perfil de genes KIR del individuo portador del haplotipo atípico (A) y estructura del semihaplotype centromérico recombinante que presenta 2DL2 en ausencia de 2DS2.

Presencia de KIR2DL5 y KIR2DS3 en ausencia de otros genes característicos del haplotipo B. Identificamos un individuo, D139, que presenta el bloque KIR2DL5-KIR2DS3 fuera de su localización habitual (no están 2DL2 ni 3DS1, que normalmente preceden a 2DL5B y 2DL5A, respectivamente). El haplotipo recombinante porta un nuevo alelo KIR2DL5B que, al contrario de la mayoría, podría transcribirse. Su caracterización se describe en el apartado 1.4.

#### **- Región central:**

Presencia de 2DS3/S5 y 2DS1 en ausencia de otros genes del semihaplotype telomérico B. Este perfil atípico donde 2DS1 (el gen más telomérico) y 2DS3 o 2DS5 no iban acompañados del resto de genes del semihaplotype B (3DS1 y 2DL5A), se observó en

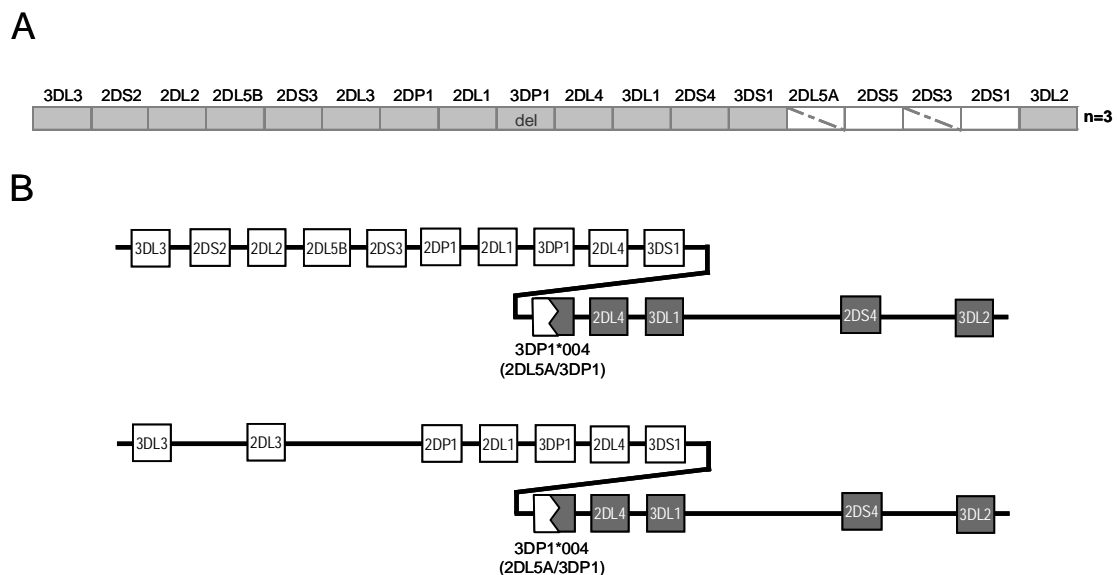
siete individuos y se explica por una deleción extensa que afecta a genes de la región central del complejo *KIR* y parte de los segmentos centro- y teloméricos (*KIR2DS3-2DP1-2DL1-3DP1-2DL4-3DS1-2DL5A*) descrita por nuestro grupo (Ordóñez et al, 2008). El haplotipo resultante contiene sólo 7 genes *KIR* y en él, *KIR2DL5B* (típicamente centromérico) queda unido a *2DS1* (telomérico) mediante *2DS3* o *2DS5*, cuya asignación a la zona centromérica o telomérica es ambigua (Figura 16) (Ordóñez et al, 2008).



**Figura 16. Perfiles de genes *KIR* de los individuos portadores del haplotipo atípico (A) y estructura del haplotipo recombinante que presenta una deleción extensa en la región central del complejo *KIR*.** A, la presencia de los genes *2DS3*, *2DP1*, *2DL1*, *3DP1* y *2DL4* en los perfiles génicos de los individuos con el haplotipo atípico se explica por su presencia en el haplotipo acompañante.

Presencia de *3DS1* en ausencia de *2DS1* asociada a duplicaciones de los genes centrales. Cuatro individuos tenían un perfil génico poco común donde *3DS1* no iba acompañado de los genes normalmente situados corriente abajo (*2DL5A*, *2DS5* y *2DS1*). Este perfil es característico de un haplotipo recombinante previamente caracterizado (Gómez-Lozano et al, 2005) que porta una duplicación de los genes *3DP1-*

2DL4-2DL1/S1 así como el gen híbrido *KIR3DP1\*004*. Mediante PCR-SSP (Gómez-Lozano et al, 2005) se confirmó su presencia en tres de los cuatro individuos con este perfil génico así como en un individuo con un genotipo aparentemente normal (T1005) (Figura 17). En dicho haplotipo, detectado en varias poblaciones europeas (Gómez-Lozano et al, 2005; Martin et al, 2003), *KIR3DS1* está seguido del gen híbrido, *KIR3DP1\*004*, formado por la región 5' de *KIR2DL5A* fusionada con el resto de *KIR3DP1* (Gómez-Lozano et al, 2005) (Figura 17).

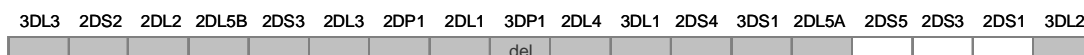


**Figura 17.** Perfil de genes *KIR* de los individuos portadores del haplotipo atípico (A) y estructura de los haplotipos extendidos que contienen el gen híbrido *KIR3DP1\*004* (B). B, los genes originalmente provenientes de distintos cromosomas se representan de distinta manera (fondo blanco o fondo morado).

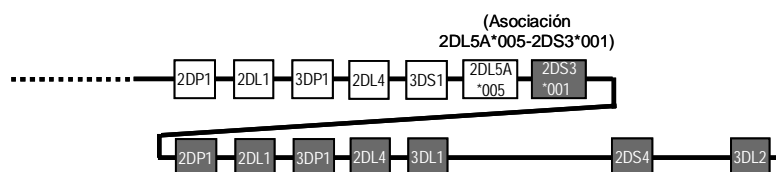
*3DS1-2DL5A asociado a una duplicación extensa de los genes centrales.* El individuo T269, pese a presentar un perfil génico similar al anterior (*KIR3DS1* en ausencia de *KIR2DS1*), presentó una PCR-SSP específica negativa para *KIR3DP1\*004*. El perfil también encajaba con un haplotipo extendido, previamente descrito por nuestro grupo, que presenta una duplicación aún mayor. En dicho haplotipo el alelo telomérico

*KIR2DL5A*\*005 va acompañado de *KIR2DS3*\*001 (alelo que generalmente se encuentra en el lado centromérico, consecutivo al gen *KIR2DL5B*), en vez de *KIR2DS3*\*002 (alelo típicamente telomérico) (Ordóñez et al, 2008).

A



B



**Figura 18.** Perfil de genes *KIR* del individuo portador del haplotipo atípico (A) y estructura del haplotipo extendido que contiene la asociación inusual de alelos *2DL5A-2DS3*.

El tipaje específico de alelos *KIR2DS3* confirmó que el individuo portaba el alelo *KIR2DS3*\*001 mientras que carecía de *KIR2DS3*\*002. Presumiblemente, el haplotipo presentaba además dos copias del grupo de genes *KIR2DP1-2DL1-3DP1-2DL4-3DS1/L1*, una precediendo y otra consecutiva al bloque atípico *KIR2DL5A*\*005-*KIR2DS3*\*001 (Figura 18). Dada la identidad de secuencia en la mayoría de exones e intrones de *KIR2DL5A*\*005 y *KIR2DL5B*\*002 (ambos presentes en este individuo), no existía la posibilidad de realizar un paseo génico para determinar qué gen se encontraba corriente abajo de *KIR2DL5A*\*005. Sin embargo, la supuesta duplicidad de algunos genes debida a la presencia del haplotipo recombinante, nos permitiría detectar de manera indirecta su presencia. Secuenciamos los exones 3 al 5 del más polimórfico de los genes hipotéticamente duplicados, *KIR3DL1*, evidenciando la presencia de dos alelos distintos, con SNPs típicos de *KIR3DL1*\*005 y \*007, además de su alotipo *3DS1*.

Ésto confirmaba de manera indirecta la presencia del haplotipo con la extensa duplicación (un alelo y 3DS1 formarían parte del haplotipo inusual y otro del otro haplotipo, t-A) (Figura 18).

### - **Región telomérica:**

Presencia de 3DL1 en ausencia de 2DS4. Un individuo (C333) presentaba este perfil génico característico de un haplotipo carente de 2DS4 previamente descrito, que portaba una recombinación asimétrica que fusionaba los exones 1-5 de *KIR3DL1* con los exones 6-9 de *KIR3DL2* (Norman et al, 2007; Shilling et al, 2002) (Figura 19). La secuenciación de los exones 3-5 y 7-9 nos permitió distinguir el gen híbrido *KIR3DL1\*060* de *KIR3DL1* y de *KIR3DL2* (Norman et al, 2009).

A



B

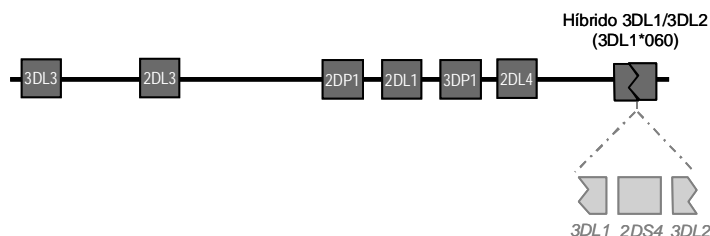


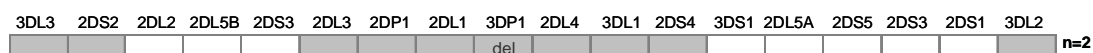
Figura 19. Perfil de genes *KIR* (A) y estructura del haplotipo A recombinante que presenta una delección de *KIR2DS4* asociada al gen híbrido *KIR3DL1\*060* (B).

### 1.3. Caracterización de un nuevo gen quimérico producto de la recombinación entre *KIR2DS2* y *KIR2DL3*: *KIR2DL3\*033*

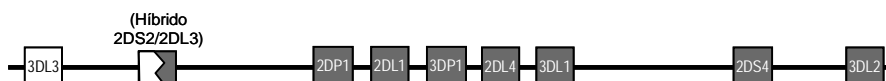
Un individuo (T1316) presentaba un genotipo *KIR* incongruente con casi todos los haplotipos comunes y recombinantes hasta ahora definidos: aparentemente portaba todos los genes característicos de un genotipo AA, más *KIR2DS2*, pero ningún otro gen

de los asociados a él en los haplotipos B. Ya que el perfil génico hacía sospechar de la presencia del alelo híbrido *KIR2DS2\*005*, se realizó la PCR-SSP específica que resultó negativa. Posteriormente, amplificamos un fragmento de ~7,6 kb que incluía los exones 5-7 del supuesto gen *2DS2*. Su secuencia reveló que no era un gen *KIR2DS2* propiamente dicho, sino un gen híbrido (Figura 20) donde los exones 5-6 eran idénticos a *KIR2DS2*, pero el exón 7 correspondía a *KIR2DL3* y el intrón 6 tenía una secuencia híbrida.

A

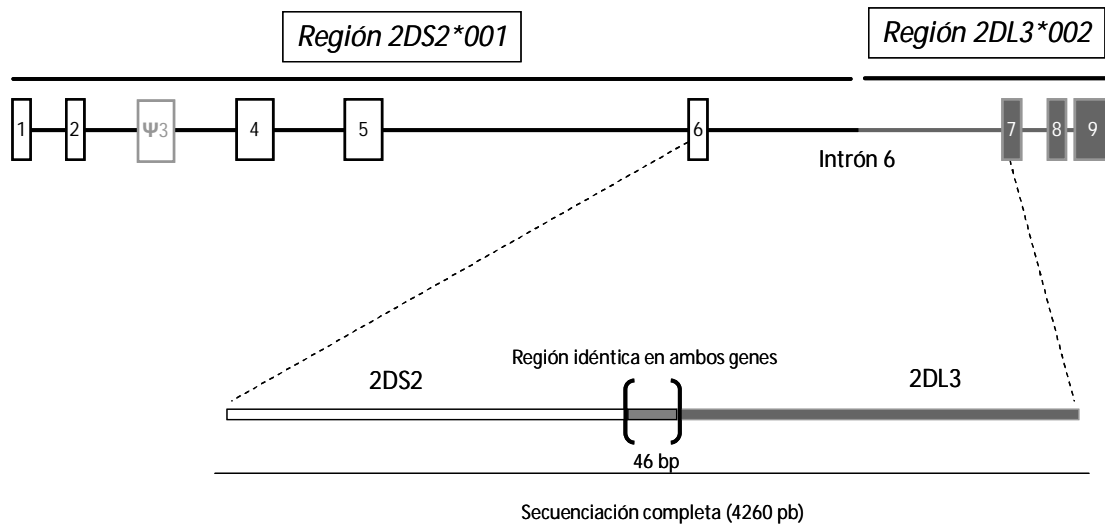


B



**Figura 20. Perfil de genes KIR de los individuos portadores del haplotipo atípico (A) y estructura del haplotipo A recombinante que contiene el gen híbrido *KIR2DL3\*033* (B).**

Amplificación génica completa y caracterización. Para caracterizar totalmente el nuevo gen híbrido amplificamos todos sus exones en un solo fragmento genómico de ~14 kb. El análisis de la secuencia codificante completa y del intrón 6 confirmó la presencia de un gen híbrido. La región 5' del gen (incluyendo 2140 pb del intrón 6) era idéntica los alelos *KIR2DS2\*0010102/12*; la región 3' (desde las últimas 2075 pb de intrón 6) coincidía casi totalmente con *KIR2DL3\*002*; y una región intermedia de 46 pb en intrón 6 era idéntica a ambos genes (Figura 21). Estas características apoyaban que *KIR2DS2* y *KIR2DL3* (provenientes de haplotipos B y A, respectivamente) recombinaron dentro de la región de 46 pb idéntica en intrón 6 generando el nuevo gen, designado oficialmente por el *KIR Nomenclature Committee* como *KIR2DL3\*033*, pese a que la mayor parte de su secuencia proviene de *KIR2DS2*.

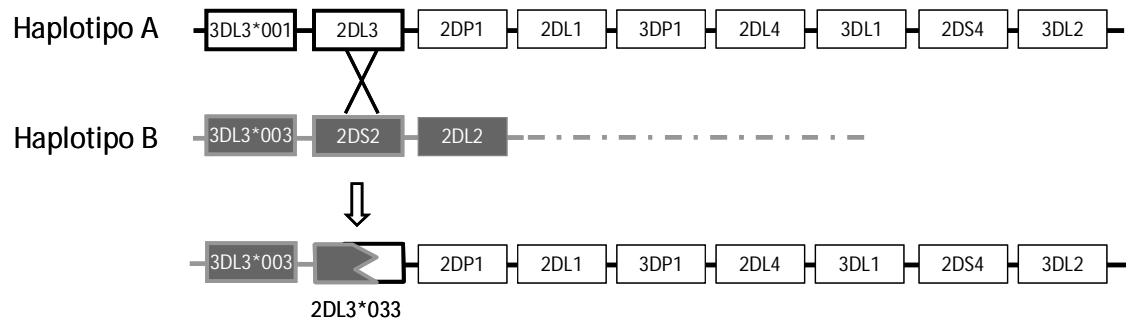


**Figura 21.** Estructura quimérica del gen *KIR2DL3\*033*.

En los intrones correspondientes a *KIR2DL3* encontramos tres SNPs. Dos de ellos, en intrón 6, no habían sido descritos en ningún otro alelo de *KIR2DL3* (A>G y C>T en las posiciones 11586 y 11849). El otro, que afectaba al intrón 7 (G>A en posición 13627), era compartido con *KIR2DL3\*010*.

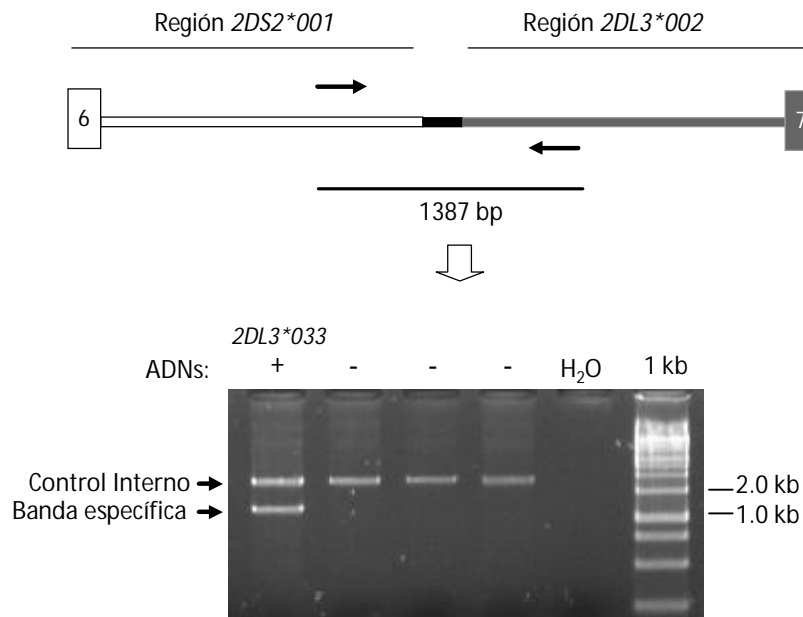
Mapeo de *KIR2DL3\*033* y origen del haplotipo inusual. Los genes *KIR2DS2* y *KIR2DL3* son característicos de los haplotipos centroméricos B y A, respectivamente y ambos se encuentran normalmente precedidos por *KIR3DL3*. Distintos alelos de *KIR3DL3* están en desequilibrio de ligamiento con *KIR2DS2* (semihaplotipo B) y *KIR2DL3* (semihaplotipo A) (Hou et al, 2012; Pyo et al, 2010). Para confirmar la ubicación del nuevo gen *KIR2DS/L3* dentro del haplotipo inusual e indagar su origen, realizamos un paseo génico amplificando una región de ~7 Kb que abarcaba desde el exón 7 de *KIR3DL3*, hasta el exón 4 de *KIR2DL3\*033*. Tras analizar la secuencias exónicas demostramos que *KIR2DL3\*033* se encuentra también corriente abajo del alelo *KIR3DL3\*003*, generalmente asociado a *KIR2DS2*. El otro alelo era *KIR3DL3\*001*, asociado al *2DL3* normal del otro cromosoma. Estos datos sustentan que *KIR2DL3\*033* sea el producto de una recombinación asimétrica que dio lugar a un haplotipo A inusual

que incorporó el alelo *KIR3DL3\*003* y la región 5' de *KIR2DS2* (exones 1 a 6) de un haplotipo B (Figura 22).



**Figura 22. Origen hipotético del gen quimérico *KIR2DL3\*033*.**

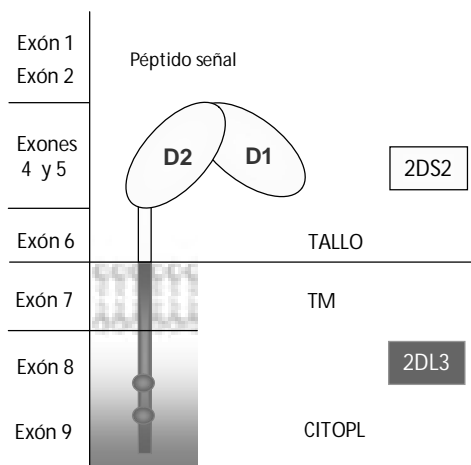
Cribado de *KIR2DL3\*033* mediante un nuevo método de PCR-SSP. Para detectar el nuevo gen quimérico de forma simple y precisa, y estudiar su distribución, diseñamos un método de genotipado mediante PCR-SSP. La estructura híbrida de su intrón 6 nos permite detectarlo de forma inequívoca combinando cebadores para las regiones idénticas a *KIR2DS2* y *KIR2DL3* en las zonas cercanas a la recombinación. Dichos cebadores amplifican específicamente un fragmento de 1387 pb únicamente en los ADN positivos para *KIR2DL3\*033*. Dos de las 1101 muestras anónimas a las que se les realizó la PCR específica resultaron positivas por lo que se estima que la frecuencia de *KIR2DL3\*033* en la población es del 0,2 % (0-0,46%,  $p < 0,05$ ) (Figura 23).



**Figura 23. Detección de *KIR2DL3\*033* mediante PCR-SSP.**

Transcripción de *KIR2DL3\*033*. Para determinar si el nuevo gen quimérico podría ser transcrito y procesado como los genes de *2DS2* y *2DL3* normales, sintetizamos ADNc a partir de ARN extraído de PBMCs de un individuo positivo para *KIR2DL3\*003* (LR1675). Realizamos una RT-PCR específica de la región codificante completa de *KIR2DL3\*033* obteniendo un amplicón de ~1,1 kb, cuya secuencia de nucleótidos encajaba con la de las regiones codificantes predichas mediante secuenciación de ADN genómico.

El receptor *KIR2DL3\*033*: predicción estructural. La secuencia completa del nuevo gen quimérico nos permite predecir la estructura de su producto: los dominios D1 y D2 y el tallo serían como las del receptor *KIR2DS2* mientras que tendría la región transmembrana y una cola citoplasmática larga con ITIM como *KIR2DL3* (Figura 24).



**Figura 24. Predicción de la estructura del receptor KIR2DL3\*033.**

Expresión de KIR2DL3\*033. El individuo LR1675 era positivo para 2DL1, 2DL2, 2DL3, 3DL1, 3DL2, 2DS2, 2DS4, 3DL3, 2DP1, 2DL4, 3DP1 y negativo para 2DS1, 2DS3, 2DS5, 3DS1 y 2DL5. Así, su genotipo KIR era del tipo ArecB2/AA, es decir, en la parte centromérica tendría un haplotipo B2 junto con el haplotipo A recombinante que portaría el gen híbrido KIR2DL3\*033. La reacción positiva para KIR2DL3 en el genotipado KIR es consecuencia de la amplificación de la parte 3' del gen quimérico 2DL3\*033 y no de un gen KIR2DL3 completo. Por tanto, el fenotipo predicho de este individuo sería: 2DS2+, 2DL3\*033+. Como 2DS2 y 2DL3\*033 tienen la misma región extracelular, no podemos revelar específicamente la expresión del recombinante KIR2DL3\*033, pero sí descartar la presencia de la región extracelular de un KIR2DL3 no quimérico. Por tanto, en experimentos de citometría de flujo, su fenotipo sería idéntico al de un individuo 2DS2+, 2DL3-. Para comprobarlo usamos un anticuerpo monoespecífico de 2DL3 y un multiespecífico 2DL3/L2/S2 que nos permitirían discriminar entre las subpoblaciones que expresan KIR2DL3 y/o KIR2DL2/S2. Como se observa en la Figura 25, el individuo LR1765 es positivo para 2DS2 y negativo para la porción extracelular de 2DL3, confirmándose su fenotipo predicho.

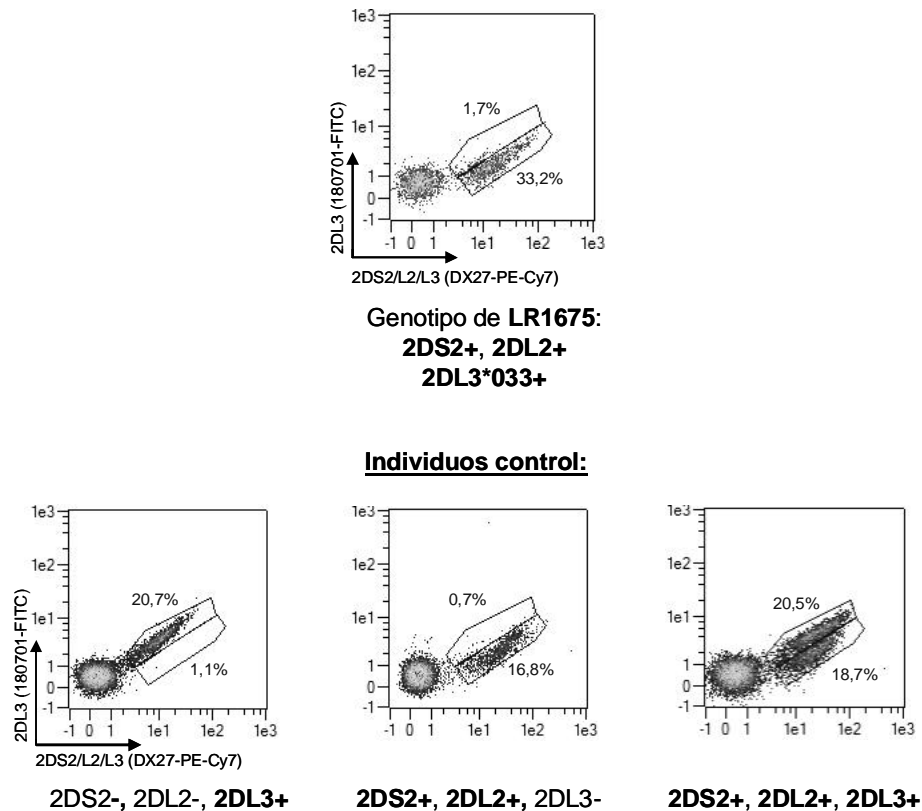


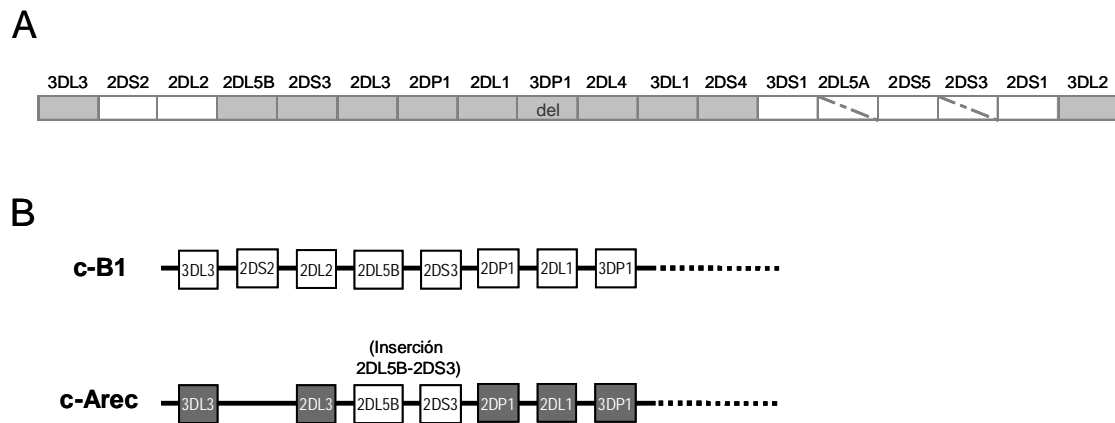
Figura 25. Análisis, mediante citometría de flujo, de la expresión en superficie de KIR2DS2, KIR2DL2 y KIR2DL3\*033 en células NK del individuo LR1675.

#### 1.4. Caracterización de un nuevo alelo KIR2DL5B con capacidad de transcribirse

Identificamos un individuo, D139, que parecía portar *KIR2DL5-KIR2DS3* en ausencia de cualquier otro gen de un haplotipo B centromérico o telomérico, del que dicha agrupación es característica: era negativo para *KIR2DS2*, *2DL2*, *3DS1* y *2DS1*, generalmente asociados a *KIR2DL5-KIR2DS3/S5* y tenía todos los genes del haplotipo A (Figura 26A).

Mapeo de KIR2DL5. Para ubicar *KIR2DL5* hicimos un mapeo génico (Vilches et al, 2000c) amplificando ~4 kb que abarcaban el exón 9 de cualquier *KIR*, la región intergénica y los exones de 1 a 3 de *KIR2DL5*. Su secuencia mostró que el exón 9 pertenecía a *KIR2DL3\*010*, el cual presentaba corriente abajo el gen *KIR2DL5B*, lo que colocaba al

bloque *KIR2DL5-KIR2DS3* dentro de un haplotipo centromérico A (Figura 26B). Pyo et al (2013 y 2010) y Hou et al (2010), describieron, en individuos africanos, haplotipos con la misma organización.



**Figura 26.** Perfil de genes **KIR** del individuo portador del haplotipo atípico (A) y estructura del haplotipo A recombinante que contiene el bloque *KIR2DL5-KIR2DS3* (B).

Amplificación génica completa y caracterización de *KIR2DL5B*. Para caracterizar mejor este haplotipo amplificamos completamente el gen *KIR2DL5B*. El amplicón, de ~9 kb, comprendía ~100 pb del promotor, todos los exones e intrones y ~280 pb de la región 3' nt. Su secuenciación reveló la presencia de un nuevo alelo *KIR2DL5B* (nombre local: *KIR2DL5B\*002-EC*) que poseía un promotor de tipo III (igual a *KIR2DL5B\*0020106* y similar a *2DL5B\*003*), mientras que la secuencia codificante era idéntica a *KIR2DL5B\*00202* (Figura 27). Al igual que *KIR2DL5B\*003* (alelo con un promotor de tipo III cuya transcripción ha sido demostrada empíricamente (Du et al, 2008; Vilches et al, 2000a) y a diferencia de la mayoría de alelos de *KIR2DL5B*, el nuevo alelo presenta intacto el sitio de unión del factor de transcripción *RUNX3* por lo que teóricamente podría transcribirse (Gómez-Lozano et al, 2005; Vilches et al, 2000a).

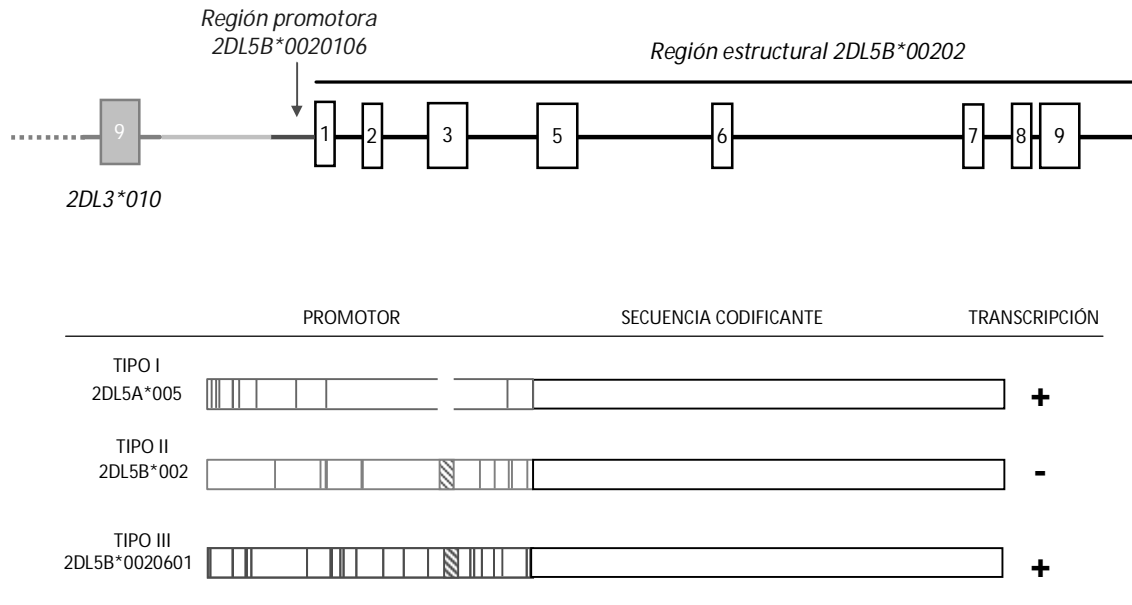


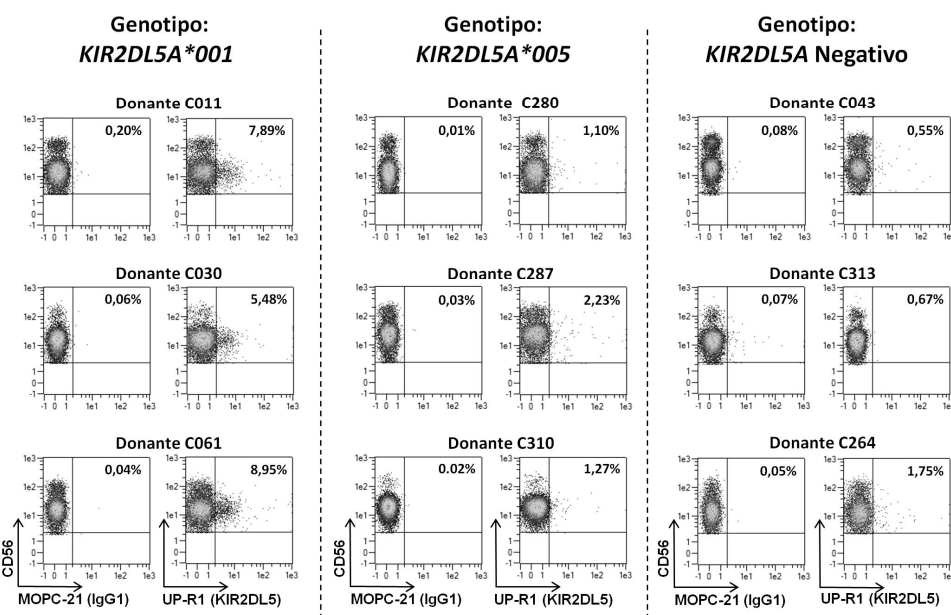
Figura 27. Estructura del nuevo alelo *KIR2DL5B\*002-EC*.

## 2. Análisis de expresión de los alelos del gen *KIR2DL5A*

### 2.1. El alelo *KIR2DL5A\*005* no es detectado en la superficie de células NK con el AcMo anti-*KIR2DL5* UP-R1

La generación de un AcMo que reconoce específicamente el producto del gen *KIR2DL5* (clon UP-R1) permitió caracterizar la expresión en superficie de dicho receptor. Sin embargo, de los dos alelos *KIR2DL5* transcritos comunes en caucosoides, *KIR2DL5A\*001* y *KIR2DL5A\*005*, únicamente se demostró la expresión en la superficie celular de *KIR2DL5A\*001* (Estefanía et al, 2007). Experimentos de citometría de flujo con células NK de sangre periférica positivas para *KIR2DL5A\*001* teñidas con UP-R1 confirman los perfiles descritos inicialmente (Figura 28). Así, la expresión de *KIR2DL5A\*001* en células NK circulantes está restringida a la subpoblación CD56<sup>dim</sup>.

## Células NK frescas

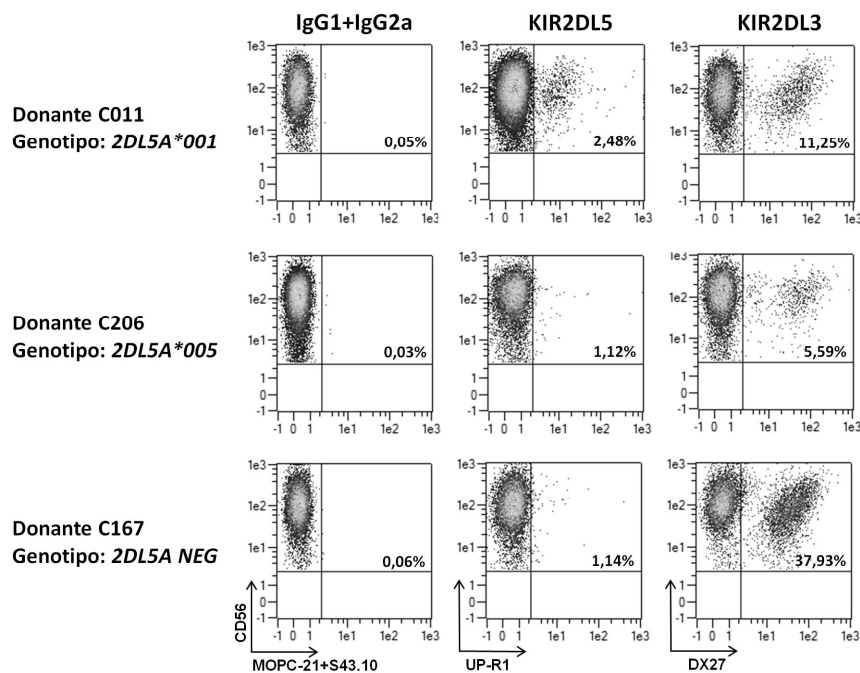


**Figura 28.** El alelo *KIR2DL5A\*005* no es detectado en la superficie de células NK con el AcMo anti-*KIR2DL5* UP-R1. Análisis mediante citometría de flujo de tres colores de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de nueve donantes positivos para *KIR2DL5A\*001* o *\*005* o que carecen del gen *KIR2DL5A*. Las células de cada donante se tiñeron con anticuerpos anti-CD3-PE/Cy7, anti-CD56-APC y UP-R1-PE (anti-*KIR2DL5*) o un control negativo de isotipo IgG1-PE. Se representan los diagramas de puntos correspondientes a la fracción  $CD3^- CD56^+$ .

En los individuos que expresan *KIR2DL5A\*001* el porcentaje de células NK positivas es menor del 10%, generalmente con baja densidad del receptor (MFI). En cambio, cuando se tiñen con UP-R1 células NK de distintos donantes con el alelo *KIR2DL5A\*005*, éste resulta indetectable, siendo las tinciones comparables a las de individuos que carecen del gen *KIR2DL5A* (Figura 28).

En las células NK expandidas in vitro en presencia de IL-2 y líneas celulares linfoblastoides, la densidad de *KIR2DL5A\*001* en superficie aumenta, como sucede con otros KIR (Figura 29 y Estefanía et al, 2007). Sin embargo, células NK expandidas de individuos que portan *KIR2DL5A\*005* continúan sin reaccionar con UP-R1, en ningún caso (Figura 29).

## Células NK expandidas



**Figura 29.** Células NK expandidas de individuos que portan el alelo *KIR2DL5A\*005* no se tiñen con UP-R1. Células NK (47-69% CD3<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup>) expandidas in vitro desde PBMCs de tres donantes que expresan *KIR2DL5A\*001* o *\*005* o que carecen del gen *KIR2DL5A*, se analizaron, mediante citometría de flujo de tres colores, con los anticuerpos anti-CD3-PE/Cy7, anti-CD56-APC y UP-R1-PE (anti-KIR2DL5), DX27-PE (anti-KIR2DL2/L3/S2) o una mezcla de sus controles de isotipo IgG1-PE y IgG2a-PE. Se representan los diagramas de puntos correspondientes a la fracción CD3<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup>.

La falta de tinción con UP-R1 de células NK de individuos *KIR2DL5A\*005* positivos podría atribuirse a varias causas: ausencia de síntesis o expresión en superficie de dicha proteína; alteración/pérdida del epítipo de UP-R1 debido a diferencias en su secuencia de aminoácidos con respecto a *KIR2DL5A\*001*; o una combinación de varios factores.

## 2.2. Análisis predictivo de modificaciones post-traduccionales y señales de localización subcelular y plegamiento en *KIR2DL5A\*001* y *KIR2DL5A\*005*

Debido al papel clave de las modificaciones post-traduccionales de las proteínas en muchos procesos celulares, incluidas su maduración y localización, analizamos si



correcto plegamiento de la proteína y forzar su retención en el retículo endoplásmico (RE), limitando su expresión en la superficie celular. Sin embargo, ninguno de los dos polimorfismos que distinguen KIR2DL5A\*001 de \*005 forma parte de los motivos WSXPS localizados en los dominios D0 y D2 (Figura 30).

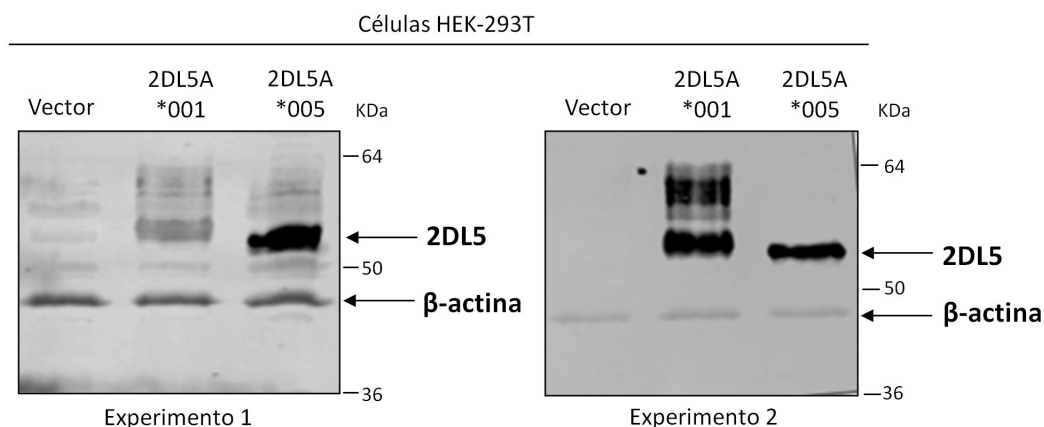
Tampoco observamos secuencias de retención en el RE en el extremo carboxi-terminal de KIR2DL5A\*001 y \*005, tales como motivos dibásicos (di-lisina o di-arginina) o el tetrapéptido H/KDEL y sus variantes (Teasdale y Jackson, 1996), descartando que pudieran formar parte de las proteínas residentes en el RE.

Excepto la pérdida del sitio de N-glicosilación en la posición 152 de KIR2DL5A\*005, las predicciones realizadas sobre modificaciones post-traduccionales y señales de localización subcelular y plegamiento no ponen de manifiesto diferencias relevantes entre KIR2DL5A\*001 y \*005 que nos permitan deducir de qué manera los polimorfismos que las diferencian, N152D y G174S, contribuyen al fenotipo de KIR2DL5A\*005.

### **2.3. El producto del alelo KIR2DL5A\*005 se expresa pobremente en la superficie de células transfectadas**

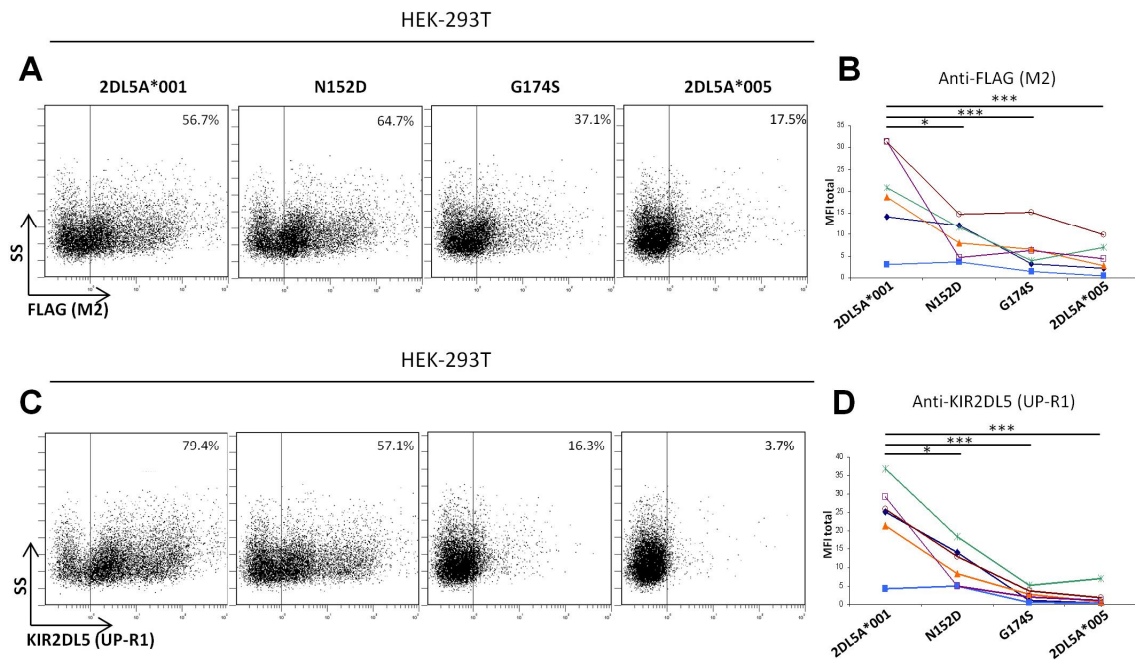
Teniendo en cuenta el análisis predictivo previo, nos propusimos investigar experimentalmente las bases moleculares del fenotipo inusual de KIR2DL5A\*005. Para ello, se generaron construcciones que contenían su secuencia codificante (ADNc) con el epítipo artificial FLAG insertado entre el péptido señal y el dominio D0 (Figura 6, Materiales y Métodos), lo que nos permitiría detectar las proteínas independientemente del reconocimiento por el AcMo UP-R1. Con estas construcciones se transfectaron células HEK-293T, junto con el plásmido pEGFP-N1 como control de transfección y se evaluó su expresión.

Para verificar la síntesis de KIR2DL5A en HEK-293T, realizamos un Western blot (WB) con lisados de los transfectantes 2DL5A\*001 y \*005. Como se muestran en la figura 31 (imágenes correspondientes a dos experimentos), ambas proteínas, 2DL5A\*001 y \*005, son sintetizadas, con bandas específicas entre 50 y 60 KDa, aproximadamente, no detectadas en el transfectante control negativo. Por otro lado, se aprecian ligeras diferencias en su movilidad relativa, de manera que 2DL5A\*005 migra con menor peso molecular aparente que 2DL5A\*001, lo que podría explicarse por la falta de un sitio de N-glicosilación (debido a la sustitución de asparragina por aspártico 152) (Figura 30).



**Figura 31. Análisis de expresión de las proteínas KIR2DL5A\*001 y KIR2DL5A\*005 en células HEK-293T transfectadas.** Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS y WB con los anticuerpos anti-FLAG y anti- $\beta$ -actina a partir de lisados de células HEK-293T transfectadas con las construcciones *KIR2DL5AFLAG\*001* y *\*005*. Células transfectadas con el vector que contiene la secuencia antisentido de *KIR2DL5AFLAG\*001* (pCDNA3-F5LD2) se usaron como control negativo. Se muestran dos experimentos independientes. La beta-actina monitoriza la cantidad de lisado celular cargado en el gel.

Pese a los resultados del WB, la citometría de flujo reveló que la densidad del receptor en la superficie de las células transfectadas cuando son teñidas con anti-FLAG es notablemente menor para 2DL5A\*005 (MFI:  $19,9 \pm 10,8$ ) que para 2DL5A\*001 (MFI:  $4,5 \pm 3,5$ ), diferencia que se mantiene significativa en distintos experimentos ( $p=0,0001$ ) (Figura 32A y 32B).



**Figura 32.** Análisis mediante citometría de flujo de células HEK-293T transfectadas con las construcciones KIR2DL5A\*001 y KIR2DL5A\*005 y con los mutantes individuales N152D y G174S. Células HEK-293T se transfectaron con cada construcción y se tiñeron con los anticuerpos anti-FLAG (A) y UP-R1 (C). Se muestran imágenes representativas de un experimento de un total de seis. Comparación del MFI del total de células en las tinciones con anti-FLAG (B) y UP-R1 (D) en los seis experimentos. Valores de  $p$  calculados tras la tipificación de las variables como se indica en el apartado 2.7 de Materiales y métodos. \* $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

#### 2.4. El anticuerpo UP-R1 reconoce a KIR2DL5A\*005 peor que a KIR2DL5A\*001

De manera similar a anti-FLAG, ambas proteínas son detectables en la superficie de las células transfectadas con el anticuerpo UP-R1. Sin embargo, mientras que las células transfectadas con 2DL5A\*001 se tiñen intensamente con UP-R1 (MFI:  $23,8 \pm 10,9$ ), los niveles de expresión en superficie de 2DL5A\*005 detectados con el mismo anticuerpo son notablemente menores (MFI  $2,6 \pm 2$ ;  $p = 0,0001$ ) (Figuras 32C y 32D). Estos resultados confirman la diferencia entre ambos alelos, pero contrastan en parte con los obtenidos ex vivo donde células NK que portan el alelo KIR2DL5A\*005 son indetectables con UP-R1, diferencia atribuible a la sobreexpresión de la proteína en las células HEK-293T transfectadas.

Por otro lado, si comparamos el perfil de tinción de UP-R1 sobre cada transfectante con el obtenido con anti-FLAG, vemos que aunque siguen la misma tendencia, las diferencias de expresión resultan más acusadas con UP-R1 (ratio 2DL5A\*001/\*005, UP-R1: 11,9; anti-FLAG: 4,42) (Figura 32). Estos hallazgos sugieren que la detección de KIR2DL5A\*005 con UP-R1 en células NK podría estar dificultada, no sólo por su baja expresión en superficie, sino también por un peor reconocimiento por el anticuerpo.

### **2.5. Influencia de los polimorfismos G174S y N152D de KIR2DL5A\*005 sobre su expresión y su reconocimiento por UP-R1**

Los dos cambios de aminoácido que distinguen KIR2DL5A\*001 de \*005 se encuentran en el dominio extracelular D2: asparragina/aspártico en la posición 152 y glicina/serina en la 174. Para evaluar su contribución relativa al fenotipo de KIR2DL5A\*005, utilizamos dos construcciones que portaban por separado cada sustitución: 2DL5-N152D y 2DL5-G174S (a partir de ahora referidos como mutantes N152D y G174S, respectivamente). Las construcciones fueron transfectadas en HEK-293T y se determinó su expresión mediante WB y citometría de flujo con anti-FLAG y UP-R1.

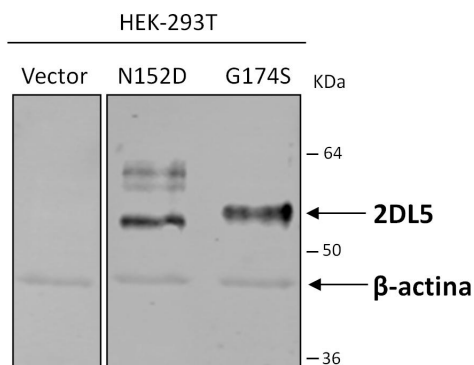
Primero, para determinar la influencia de cada polimorfismo, comparamos las tinciones con anti-FLAG en cada construcción. Como muestran las Figuras 32A y 32B, cuando la asparragina 152 es sustituida por aspártico, los niveles de la proteína en la superficie son ligeramente menores que en 2DL5A\*001 (2DL5A\*001, MFI: 19,9±10,8; N152D, MFI: 9,2±4,4, resp; p=0,036). Sin embargo, el efecto más acusado se aprecia en la sustitución de glicina por serina 174, que conduce a una marcada disminución de la

expresión en superficie (MFI:  $6,1 \pm 4,8$ ;  $p=0,0001$ ), acercándose a los bajos niveles de expresión del “doble mutante” 2DL5A\*005 (MFI:  $4,5 \pm 3,5$ ).

Por otro lado, el perfil de expresión de cada transfectante analizado paralelamente con UP-R1 reproduce el obtenido con anti-FLAG (Figuras 32C y 32D). Así, comparado con los niveles de expresión observados en el transfectante 2DL5A\*001 (MFI:  $23,8 \pm 10,9$ ), la expresión en superficie de N152D y G174S es significativamente menor (MFI:  $10,7 \pm 5,4$ ;  $p=0,024$  y  $2,6 \pm 1,7$ ;  $p=0,0001$ , respectivamente), aunque la disminución es menos drástica en el mutante N152D. Además, al igual que ocurría con 2DL5A\*005, la disminución de expresión en el transfectante G174S es también más acusada con UP-R1 que con anti-FLAG (ratio 2DL5A\*001/G174S, UP-R1: 9,2; anti-FLAG: 3,3).

La comparación de los perfiles de expresión de cada construcción con UP-R1 y anti-FLAG revela que la serina 174 de KIR2DL5A\*005 es el principal factor que dificulta su expresión en superficie y afecta además, a su reconocimiento por UP-R1, mientras que el aspártico 152 parece tener una influencia menor sobre ambos aspectos.

Adicionalmente, comprobamos los niveles de síntesis de las proteínas mutantes N152D y G174S mediante WB de lisados de sus transfectantes. Como se observa en la figura 33, los niveles de la proteína G174S (cuya expresión en superficie es baja) son comparables a los de la proteína N152D, con expresión en superficie más elevada. Por otro lado, el cambio de aspártico 152, que rompe un sitio putativo de N-glicosilación, provoca un aumento de la movilidad relativa, al igual que ocurría con KIR2DL5A\*005 (Figura 33).

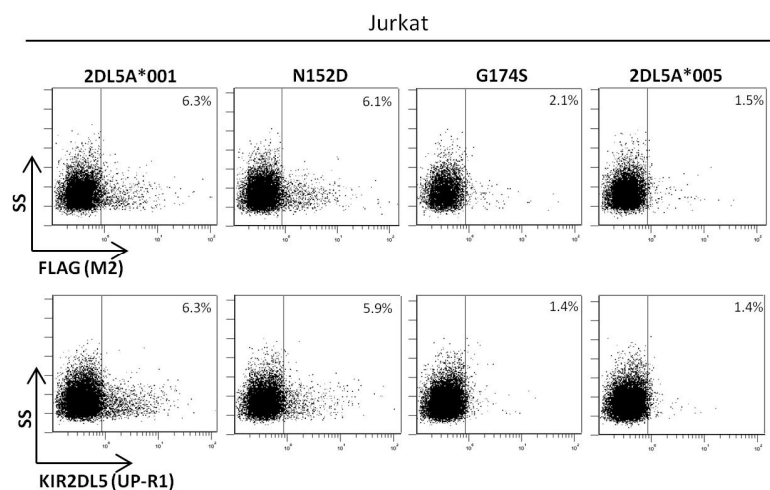


**Figura 33.** Las células HEK-293T transfectadas con las construcciones mutantes N152D y G174S se lisaron y se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS y WB con los anticuerpos anti-FLAG y anti-β-actina (Control negativo compartido con el experimento 2 de la figura 3).

## 2.6. Los perfiles de expresión de KIR2DL5A en células Jurkat transfectadas se asemejan a la expresión natural en células NK

La alta expresión de proteínas que ofrece la transfección en células HEK-293T lleva a su sobreexpresión en superficie, de manera que no se reproducen fielmente las condiciones naturales. Así, los niveles de expresión de KIR2DL5A\*001 pasan de ser bajos en células NK a altos en los transfectantes HEK-293T, y la expresión en superficie de KIR2DL5A\*005 pasa de ser indetectable en células NK a baja en HEK-293T. Por esta razón, y para descartar, además, que los perfiles de expresión observados en HEK-293T no se reprodujeran en células hematopoyéticas, repetimos los experimentos utilizando la línea celular T Jurkat, previamente usada para expresión de otros KIR (VandenBussche et al, 2009; Sharma et al, 2009; VandenBussche et al, 2006; Pando et al, 2003) y cuya transfección es menos eficaz. De esta manera, los perfiles de expresión se acercarían más a lo que ocurre en la célula NK.

En la figura 34 se muestra un experimento de los dos que realizamos con Jurkat, donde se observa que tanto los niveles de expresión como el número de células positivas para todas las construcciones es menor que en HEK-293T (el MFI disminuye de 2 a 10 veces según el transfectante y el anticuerpo utilizados), siendo más parecidos a la expresión natural de KIR2DL5A\*001 y \*005 en las células NK (Figura 28). Además, se mantienen los perfiles relativos de expresión de las distintas construcciones previamente obtenidos: tanto el número de células positivas como la densidad del receptor en superficie determinada tanto con anti-FLAG como con UP-R1 son menores para el alelo *2DL5A\*005*. Al igual que con HEK-293T, los niveles de expresión de G174S son también menores que los de KIR2DL5A\*001 con ambos anticuerpos. Por último, el mutante N152D es detectado en superficie a niveles mayores que *2DL5A\*005* y que el G174S, siendo comparables a *2DL5A\*001*.

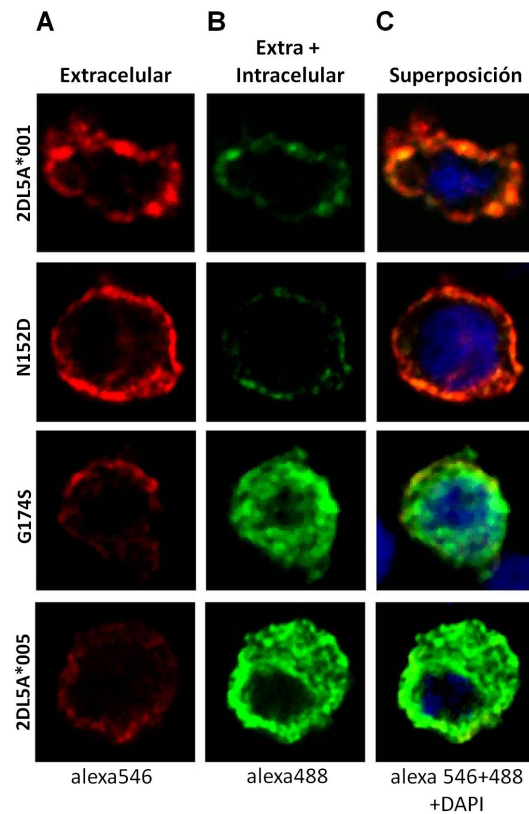


**Figura 34.** Análisis mediante citometría de flujo de células Jurkat nucleofectadas con las construcciones KIR2DL5A\*001, N152D, G174S y \*005. Las células transfectadas se tiñeron con los anticuerpos anti-FLAG (paneles superiores) y UP-R1 (paneles inferiores).

## **2.7. KIR2DL5A\*005 es retenido mayoritariamente en el interior celular**

Nuestros resultados demuestran que KIR2DL5A\*005 es incapaz de alcanzar la superficie celular en cantidades similares a KIR2DL5A\*001, lo que podría deberse a que la molécula queda retenida dentro de la célula. Para comprobarlo, transfectamos células HEK-293T con las construcciones KIR2DL5A-FLAG y realizamos microscopía confocal siguiendo una estrategia de marcaje con el anticuerpo anti-FLAG que nos permitió discriminar entre expresión en superficie e intracelular (Figura 7, Materiales y métodos).

Como vemos en la figura 35, existen marcadas diferencias en la distribución celular de las distintas construcciones. En las células que expresan KIR2DL5A\*001 o el mutante N152D la señal de fluorescencia se localiza en la membrana plasmática no observándose tinción intracelular. Por el contrario, tanto 2DL5A\*005 como el mutante G174S, aunque también colocalizan parcialmente con la membrana plasmática, son detectados mayoritariamente en el interior de las células transfectadas. Estos datos son consistentes con los obtenidos mediante citometría de flujo y respaldan la interpretación de que KIR2DL5A\*005 es retenido mayoritariamente en el interior de la célula, siendo la serina 174 de su dominio extracelular D2 el principal factor que dificulta su expresión en superficie.

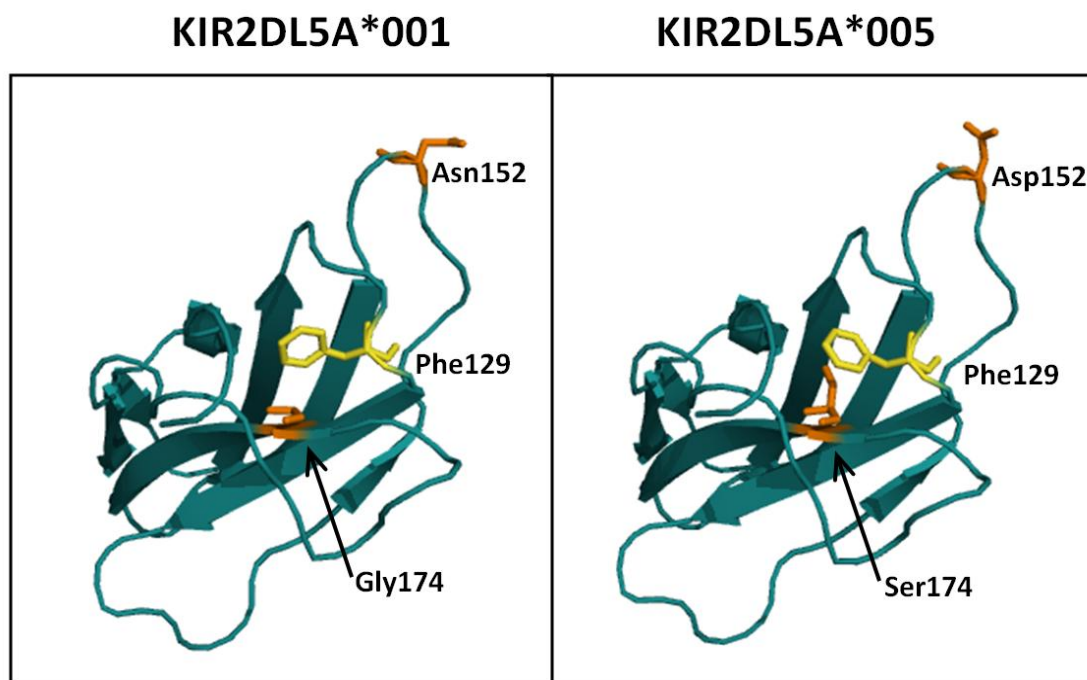


**Figura 35. Experimentos de microscopía confocal muestran diferencias en la distribución celular de las proteínas KIR2DL5A-FLAG.** Células HEK-293T se transfectaron con las construcciones KIR2DL5A\*001, N152D, G174S y \*005 y, tras 48h, se tiñeron con anti-FLAG y un anticuerpo secundario marcado con alexa-546 (**A**, tinción extracelular); y de nuevo, con anti-FLAG, tras la permeabilización y un anticuerpo secundario marcado con alexa-488 (**B**, tinción extra- e intracelular). La columna **C** muestra la imagen combinada de las columnas **A** y **B**. Los núcleos se muestran teñidos con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) en la imagen de la superposición.

## 2.8. Predicción de la estructura tridimensional del dominio D2 de KIR2DL5A\*001 y KIR2DL5A\*005

Aunque la estructura cristalográfica por difracción de rayos X para KIR2DL5 todavía no ha sido resuelta, sí han sido descritas las de otros receptores KIR2D, incluyendo KIR2DL1 y KIR2DL4 (Moradi et al, 2015; Fan et al, 1997). Entre ellos, KIR2DL5 presenta el mayor porcentaje de identidad y de similitud de secuencia en el dominio D2 con KIR2DL1 (86,73% y 88,77%, respectivamente) (Figura 36). Por ello, nos basamos en dicho receptor para realizar una predicción estructural por homología de





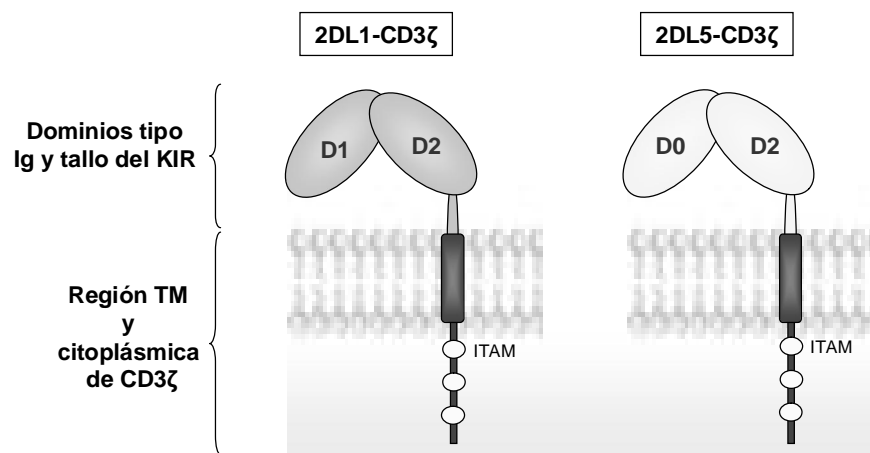
**Figura 37. Modelos de las estructuras tridimensionales de los dominios D2 de KIR2DL5A\*001 y \*005.** Los dos residuos que distinguen KIR2DL5A\*001 de \*005 (N152D y G174S) aparecen destacados en color naranja. Como se muestra en el panel de la derecha, la sustitución de glicina por serina en la posición 174 de KIR2DL5A\*005 provoca, en el modelo, un desplazamiento de la fenilalanina 129 (amarillo) que podría repercutir en el plegamiento de la molécula.

### 3. Búsqueda de ligandos potenciales de KIR2DL5

#### 3.1. Generación de construcciones y transfectantes KIR-CD3 $\zeta$

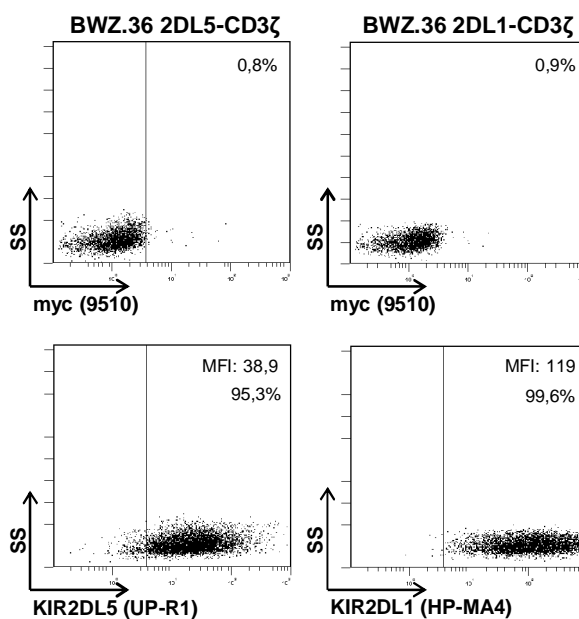
Aproximaciones previas de nuestro grupo para el cribado del ligando de KIR2DL5 basadas en el análisis de la degranulación diferencial de células NK frescas positivas y negativas para KIR2DL5 frente a distintas dianas celulares resultaron poco prácticas debido a la baja expresión de 2DL5 en células NK, así como a los bajos niveles de degranulación que hacen difícil evaluar reducciones de la misma atribuibles a la inhibición por KIR2DL5. Sin embargo, orientaron las futuras estrategias hacia el uso de células que expresen KIR2DL5 de manera homogénea así como de aproximaciones

basadas en lecturas positivas (más que en la inhibición de una señal). De acuerdo con esto, para explorar la distribución de los ligandos potenciales de KIR2DL5, generamos dos construcciones híbridas formadas por los dominios tipo inmunoglobulina y el tallo de KIR2DL5 (alelo *KIR2DL5A\*00101*) o KIR2DL1 (alelo *KIR2DL1\*002*) y las regiones transmembrana y citoplásmica de la molécula de señalización murina CD3 $\zeta$  (Figura 38).



**Figura 38. Estructura de las construcciones KIR-CD3 $\zeta$ .**

La construcción 2DL1-CD3 $\zeta$  nos serviría como control ya que su ligando, el epítipo C2 de HLA-C, está bien definido. Ambas proteínas de fusión, 2DL1-CD3 $\zeta$  y 2DL5-CD3 $\zeta$  se sobreexpresaron de manera estable en una línea celular reportera BWZ.36 (Figura 39), derivada de BW5147 (línea T murina sin TCR) donde la expresión de  $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ -gal) está controlada por el factor nuclear de activación de células T (NFAT) (Sanderson y Shastri, 1994). Esta línea, nos permitiría medir de manera simple y sencilla su activación a través de las proteínas quiméricas KIR-CD3 $\zeta$  mediante la cuantificación de su actividad  $\beta$ -gal.



**Figura 39. Expresión en superficie de las construcciones KIR-CD3 $\zeta$  en las células BWZ.36 transfectadas.** Los transfectantes estables BWZ.36 2DL5-CD3 $\zeta$  y BWZ.36 2DL1-CD3 $\zeta$  se tiñeron con los AcMo anti-KIR2DL5 (UP-R1) y anti-KIR2DL1 (HP-MA4). Como control negativo se usó el anticuerpo anti-myc (9510).

### 3.2. Validación del sistema reportero BWZ.36 KIR-CD3 $\zeta$

Para comprobar la validez del sistema reportero y posteriormente controlar cada experimento, siempre se incluyeron los siguientes controles:

- Como control de una posible actividad  $\beta$ -gal endógena de la célula reportera se cocultivó ésta con la célula de la que deriva, BW5147, utilizando los valores de estimulación de este cocultivo como niveles de activación basal para relativizar los obtenidos con cada célula candidata a las que se enfrentó la célula reportera.
- Para controlar la capacidad de activación independiente de su estimulación a través de los receptores KIR-CD3 $\zeta$  los transfectantes se cultivaron con Acetato de forbol miristato (PMA)/Ionomicina para inducir la actividad  $\beta$ -gal máxima (no mostrada).
- Como control de activación específica a través de la proteína de fusión, el transfectante BWZ.36-2DL1-CD3 $\zeta$  se cocultivó con el hibridoma HP-MA4 (anti-

KIR2DL1), siendo siempre activado en niveles que oscilaban entre 11 y 50 veces los niveles basales. Igualmente, el transfectante BWZ.36-2DL5-CD3 $\zeta$  se cocultivó con el hibridoma UP-R1 (anti-KIR2DL5), siendo siempre estimulado en niveles que oscilaban entre 1,8 y 40 veces los basales. La expresión de los anticuerpos en la superficie de los hibridomas se comprobó previamente a cada experimento.

- El propio transfectante BWZ.36-2DL1-CD3 $\zeta$ , de ligando conocido (el epítipo C2 de HLA-C) funcionaba como control de activación específica cuando se enfrentaba a otra que expresaba su ligando. Siempre se activó de manera específica, siendo estimulada por casi la totalidad de las células que tenían un residuo de lisina en la posición 80 de la molécula HLA-C (epítipo C2) y no por las que no lo expresaban.

- Por último, para controlar variaciones aleatorias cada cocultivo se realizó por duplicado y para cada célula diana se realizaron al menos 2 ensayos en días distintos.

### 3.3. Cribado de paneles de líneas celulares

Los transfectantes BWZ.36 2DL5-CD3 $\zeta$  y BWZ.36 2DL1-CD3 $\zeta$  se enfrentaron a un panel de líneas celulares que representaban un amplio rango de moléculas polimórficas y no polimórficas del MHC y líneas celulares de distintos orígenes embrionarios, estados de desarrollo y especies que se detallan en las tablas 9, 10 y 11. Debido a que la mayoría de los ligandos de los receptores KIR y de otras familias de receptores de células NK son moléculas MHC (clásicas y no clásicas) (Moesta et al, 2008; Rajagopalan y Long, 1999; Ponte et al, 1999; Navarro et al, 1999; Braud et al, 1998; Winter y Long, 1997; Pende et al, 1996; Gumperz et al, 1995) o moléculas *MHC-like* (Steinle et al, 2001; Cosman et al, 2001; Chapman et al, 1999; Bauer et al, 1999) incluimos líneas celulares B linfoblastoideas transformadas con EBV (LCLs) homocigóticas y heterocigóticas para varias combinaciones de alelos HLA, transfectantes que sobreexpresaban moléculas HLA-clásicas, no clásicas (HLA-E, G y F) y moléculas *MHC-like* (MICA-B, ULBP1-3, MR1,

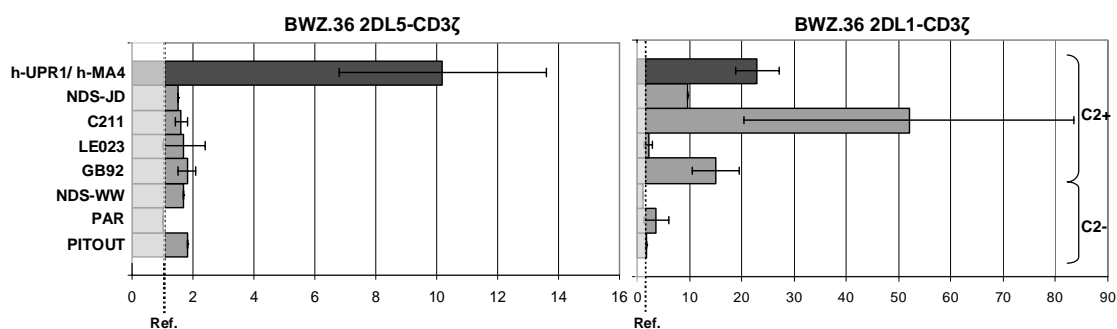
CD1a-d), así como líneas celulares humanas defectivas en moléculas HLA-I (Tabla 9). Además, el panel incluía tanto células primarias sin purificar como linfocitos aislados de ganglio y bazo, además de linfocitos de sangre periférica. Por último, ante la posibilidad de que el ligando de KIR2DL5 fuera una molécula no-MHC o que se expresara predominantemente en células no hematopoyéticas se incluyeron líneas celulares de otros orígenes embrionarios humanos así como de otras especies.

Nombre célula	Especie	Estirpe	Información Adicional
NDS-JD	Humano	Linfoide B	Linfoblastoide EBV+
NDS-WW	"	"	"
PAR	"	"	"
PITOUT	"	"	"
C211	"	"	"
LE023	"	"	"
GB92	"	"	"
721.221 C*03:04	"	"	Transfectante C*03
721.221 C*15:05	"	"	Transfectante C*1505
721.221 B*35:03	"	"	Transfectante B*3503
HMy-C1R B*73:01	"	"	Transfectante B*73
721.221 AEH	"	"	Transfectante HLA-E
721.221 G1	"	"	Transfectante HLA-G
BW5147 $\beta_2m$ HLA-F ex7-	Ratón	Linfoide T	Transfectante HLA-F (sin ex7)
BW5147 $\beta_2m$ HLA-F ex7+	"	"	Transfectante HLA-F (con ex7)
721.221	Humano	Linfoide B	HLA-I -/low
HMy-C1R	"	"	HLA-A/B-, C*04 +
Daudi	"	"	$\beta_2m$ -
K562	"	Eritroide	HLA-I -, CD1+
MOLT-4	"	Linfoide T	HLA-I -, CD1+
ST-FSH	"	Linfoide B	EBV+, TAP-
ST-ANK1	"	"	EBV+, TAP-
ST-LURI	"	"	EBV+, TAP-
CHO MICA	Hamster	Epitelial	Transfectante MICA
CHO MICB	"	"	Transfectante MICB
CHO ULBP1	"	"	Transfectante ULBP1
CHO ULBP2	"	"	Transfectante ULBP2
CHO ULBP3	"	"	Transfectante ULBP3
721.221 mock	Humano	Linfoide B	Transfectante mock
721.221 MR1	"	"	Transfectante MR1
HMy-C1R CD1a	"	"	Transfectante CD1a
HMy-C1R CD1b	"	"	Transfectante CD1b
HMy-C1R CD1c	"	"	Transfectante CD1c
HMy-C1R CD1d	"	"	Transfectante CD1d
Raji	Humano	Linfoide B	Linfoma de Burkitt
Jurkat	"	Linfoide T	Leucemia aguda T
NK3.3	"	NK	
U937	"	Monocito	Linfoma histiocítico
MLA-144	Gibón manos blancas	Linfoide T	Linfosarcoma
B95-8	Tití común	Linfoide B	
Ba/F3	Ratón	Linfoide B	Pro-B
BW5147	"	Linfoide T	Linfoma

**Tabla 9.** Líneas celulares de origen hematopoyético y transfectantes de moléculas HLA clásicas, no clásicas y moléculas MHC-like.

### 3.3.1. Células linfoblastoideas con distintos fenotipos HLA

Las LCLs (NDS-JD, NDS-WW, PAR, PITOUT, C211, LE023 y GB92) homocigotas o heterocigotas para distintas combinaciones de alelos HLA-I y HLA-II que presentan todos los ligandos hasta ahora definidos para distintos KIR (epítotos C1, C2, Bw4, A\*03 y \*11) no estimularon al transfectante BWZ.36 2DL5-CD3 $\zeta$  o lo hicieron en niveles muy bajos (entre 1,5 y 1,8 veces los basales) comparados con los obtenidos con el control del hibridoma de UP-R1 y con la estimulación específica del transfectante BWZ.36 2DL1-CD3 $\zeta$  con sus ligandos específicos (Figura 40). Éste fue estimulado en niveles elevados por todas las LCLs y transfectantes que expresaban su ligando (el epítoto C2 de HLA-C), con la excepción de la LCL LE023, mientras que aquellas líneas celulares negativas para el epítoto C2 no lo activaron.



**Figura 40. Niveles de activación relativos de los transfectantes BWZ.36 2DL5-CD3 $\zeta$  y 2DL1-CD3 $\zeta$  frente a líneas celulares con distintos fenotipos HLA.** Se muestran los niveles de activación medios relativos alcanzados por cada transfectante BWZ.36 KIR-CD3 $\zeta$  para cada célula a la que se enfrentó. La línea discontinua de referencia (Ref.) indica la estimulación basal. Se representa el error estándar de la media cuando es  $\geq 0,1$ .

Las LCLs-B estudiadas representan los siguientes alelos HLA: A\*01, \*11, \*23, \*24, \*29, \*30, \*31, \*32, \*33, \*66, \*68; B\*07, \*27, \*41, \*44, \*48, \*51, \*73, \*81; C\*01, \*03, \*04, \*07, \*08, \*12, \*15, \*16, \*18. Por otra parte, en la sección 3.3.5 se analizaron células hematopoyéticas que expresaban los alelos HLA-A\*02, \*03, \*11, \*29; B\*07,

\*15, \*18, \*27, \*35, \*40, \*44, \*51, \*57; C\*01, \*02, \*03, \*04, \*06, \*07, no obteniéndose ningún estímulo específico y en la sección 3.3.2 se demuestra que los transfectantes de moléculas B\*35:03, C\*15:05, C\*03:04 y B\*73:01 tampoco fueron capaces de estimular al transfectante BWZ.36 2DL5-CD3 $\zeta$ .

Por otro lado, las líneas celulares epiteliales y fibroblastos analizadas en la sección 3.3.6, también expresaban los alelos HLA-A\*01, \*02, \*03, \*29, \*33; B\*07, \*08, \*13, \*15, \*18, \*41, \*44, \*50, \*51, \*57; C\*02, \*06, \*07, \*12, \*16, \*17. Como se muestra posteriormente, las estimulaciones obtenidas con estas líneas parecen independientes de HLA-I.

Por último, las LCLs expresan los alelos DRB1\*03, \*04, \*07, \*10, \*11, \*13 y \*15, lo que descarta estas moléculas de clase II y sus haplotipos DQ-DP asociados como posibles ligandos. Las células analizadas en las secciones 3.3.2 y 3.3.5 expresan los alelos DRB1\*01, \*03, \*04, \*10, \*11, \*13 y \*16. El tipaje HLA de todas las líneas celulares y células primarias hematopoyéticas analizadas se detalla en la tabla 10.

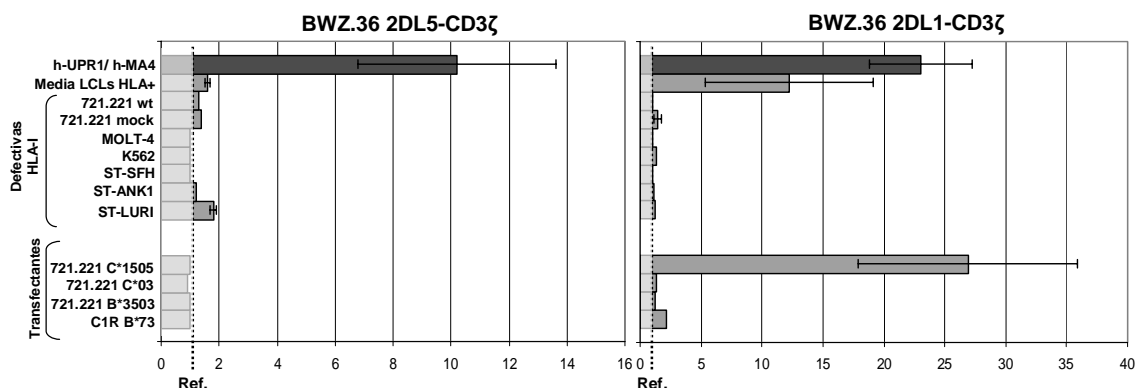
Célula	HLA expresado
NDS-JD	A*24:33, *68:01; B*07:02,*51:06; C*07:02,*12:04; DRB1*15:02; DRB5*01:02; DQB1*06:01
NDS-WW	A*23:01; B*07:02,*41:01; C*07:02,*08:02; DRB1* n.t.
PAR	A*11:01,24:02; B*27:06,*48:01; C*03:04,*08:02 DRB1*11:01,15:02; DRB3*02:02; DQB1*03:01,05:01
PITOUT	A*29:02, B*44:03; C*16:01; DRB1*07:01; DRB4*01:01, DQB1*02:02
C211	A*01,31; B*07:07,48:02; C*04,*07; DRB1*04:11,*11; DRB4*01; DQB1*03:03
LE023	A*66:01,32:01; B*51:01,73:01 C*01:02,15:05 DRB1*13:01/02; DRB3*01:01,*03:01; DQB1*06:04/06
GB92	A*29,30; B*44:07,81:01; C*07:06,18:01; DRB1*03,15; DRB3*02, DRB5*01; DQB1*02,*06:02
Raji	A*03:01; B*15:10; C*03:04,*04:01; DRB1*03:01,*10:01; DRB3*02; DQB1*02:01,*05:01
Jurkat	A*03; B*07,*35; C*04,*07; DR7, 15; DRB3, DRB4; DQB1*02, *06
NK3.3	A*03,*29; B*07, *57; C*06, *07; DRB4; DRB1*04, *07
U937	A3; B18,51; Cw1; DRB1*16:01
HMy-C1R	HLA-A y B negativa; C*04; DRB3, DRB4; DRB1*04,*12
Daudi	HLA clase I negativa; DRB1*13:01/02; DRB3*02:02,*03:01; DQB1*06:02/04
C011	A*02,*03; B*27:05,*44:05; C*02:02,*04:01; DRB1*11,*04, DRB3, DRB4, DQB1*03,*03
C043	A*02:01; B*27:05,*40:02; C*01:01,*02:02; DRB1*01,*04; DRB4; DQB1*05,*03:02
T2457	A2,3; B51,57; Cw n.t.; DR4,9; DQ n.t.
T2476	A2,11; B7,44; DRB1*15; DRB5*01; DQB1*06

**Tabla 10. Tipaje HLA de las células primarias y líneas celulares hematopoyéticas analizadas. n.t:** no tipificado.

### 3.3.2. Líneas celulares defectivas en moléculas HLA-I y transfectantes de moléculas HLA-B y C.

Los resultados anteriores sugieren que las moléculas HLA-I clásicas no son ligandos capaces de estimular al transfectante 2DL5-CD3 $\zeta$  de modo comparable al 2DL1-CD3 $\zeta$ . Para comprobar si las estimulaciones débiles observadas con las LCLs podrían o no deberse a una interacción específica con las moléculas HLA que expresan, enfrentamos la célula reportera BWZ.36 2DL5-CD3 $\zeta$  con células de distintos orígenes defectivas en moléculas HLA-I (721.221, K562 y MOLT-4), carentes de  $\beta_2m$  (Daudi) y con LCLs establecidas a partir de pacientes deficientes en TAP (ST-FSH, ST-ANK1 y ST-LURI).

Los niveles de estimulación con las líneas celulares defectivas fueron entre 1 (ausencia de activación) y 1,8 veces los basales, similares a los obtenidos con las LCLs que sí expresan moléculas HLA, lo que apoya que la mínima activación del transfectante no está mediada por moléculas HLA-I. Además, cuando se enfrenta aquél con los transfectantes que sobreexpresan moléculas B\*35:03, C\*15:05, C\*03:04 y B\*73:01 no se obtiene ninguna estimulación específica (Figura 41).



**Figura 41.** Niveles de activación relativos de los transfectantes BWZ.36 2DL5-CD3 $\zeta$  y 2DL1-CD3 $\zeta$  frente a líneas celulares defectivas en moléculas HLA-I y transfectantes de moléculas HLA-B y C.

Como era esperable, las líneas celulares defectivas en moléculas HLA-I, TAP o  $\beta_2m$  no estimularon al transfectante control BWZ.36 2DL1-CD3 $\zeta$  (Figura 41).

### 3.3.3. Transfectantes que sobreexpresan moléculas HLA no clásicas

Algunas moléculas MHC-I no clásicas, como HLA-G y HLA-E son ligandos de varios receptores de células NK (Rajagopalan y Long, 1999; Ponte et al, 1999; Navarro et al, 1999; Braud et al, 1998). La célula reportera BWZ.36 2DL5-CD3 $\zeta$  no se activó al enfrentarla a los transfectantes de HLA-G y HLA-E en células 721.221. Además, pese a que no hemos podido comprobarlo, la línea celular JEG-3 analizada en la sección 3.3.5, expresa HLA-G (Burt et al, 1991) y las LCLs utilizadas en los apartados previos, HLA-E (Lee et al, 1998), no obteniéndose ningún estímulo específico del transfectante de 2DL5-CD3 $\zeta$  en ninguno de los casos. Como era predecible, el transfectante control BWZ.36 2DL1-CD3 $\zeta$  tampoco fue estimulado por los transfectantes de HLA-G ni HLA-E (Figura 43).

Por otro lado, estudios recientes (Goodridge et al, 2013; 2010) describen la existencia de una interacción entre algunos KIR (KIR3DL2 y KIR2DS4) y tetrámeros de la molécula no clásica HLA-F, así como heterodímeros de HLA-F y otras moléculas MHC-I libres de péptido. La expresión de HLA-F en superficie está restringida a determinados tipos de células y líneas tumorales (la línea celular 721.221, se ha demostrado que expresa HLA-F; (Lee et al, 2010; Lee y Geraghty, 2003) y depende de su estado de activación. Ante esta limitada expresión, y la dificultad de demostrarla sobre las células 721.221 analizadas debido a que carecíamos de un anticuerpo específico, generamos un transfectante que sobreexpresaba HLA-F.

Existen discrepancias en cuanto a la dependencia de  $\beta_2m$  para la expresión de HLA-F (Goodridge et al, 2010; Lee et al, 2010; Lee y Geraghty, 2003), por lo que decidimos que nuestro transfectante coexpresara HLA-F junto con la  $\beta_2m$  humana, tanto para intentar

garantizar su expresión, como para asegurar su reconocimiento por W6/32. Así, generamos un transfectante estable BW5147- $\beta_2m$  que posteriormente retransfectamos con las construcciones pCDNA3-HLA-F ex7+ y pCDNA3-HLA-F ex7-, que representaban las dos variantes de transcritos maduros de HLA-F que incluyen o carecen de exón 7, respectivamente (Boyle et al, 2006).

Con el propósito de que la escasa expresión en superficie de moléculas HLA-F en el transfectante no fuera limitante para su posible interacción con KIR2DL5, lo precultivamos en frío para estabilizar las moléculas HLA-F en la superficie celular (Ljunggren et al, 1990). Como muestra la dinámica de tinción con W6/32 (Figura 42), la exposición a 25 °C durante 24 h aumentó la expresión de HLA-F en superficie entre 2 y 4 veces la expresión basal a 37 °C. La expresión decayó, según el transfectante, entre 1,7 y 2,9 veces tras reexponer 2 horas a 37 °C, llegándose a estabilizar en sus niveles basales entre las 6 y las 16 horas de incubación a dicha temperatura.

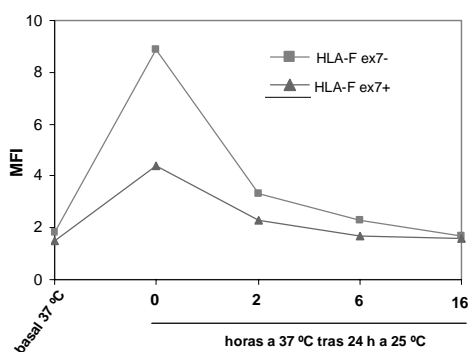
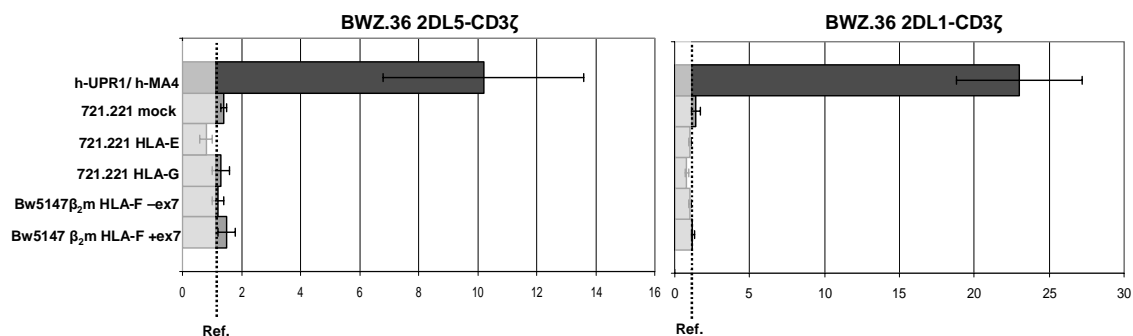


Figura 42. Dinámica de expresión de HLA-F.

El transfectante BWZ.36 2DL5-CD3 $\zeta$ . no se activó apreciablemente al enfrentarlo a los transfectantes de HLA-F (Figura 43). Como era predecible, tampoco lo hizo el transfectante control 2DL1-CD3 $\zeta$ .



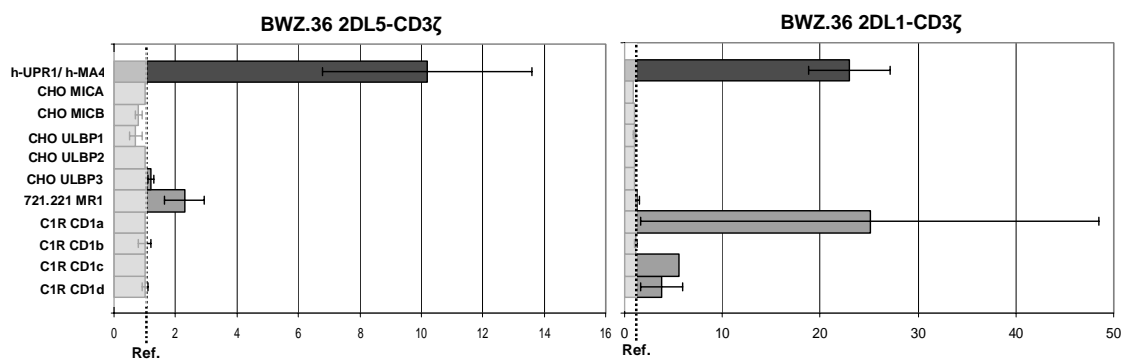
**Figura 43.** Niveles de activación relativos de los transfectantes BWZ.36 2DL5-CD3 $\zeta$  y 2DL1-CD3 $\zeta$  frente a transfectantes que sobreexpresan moléculas HLA no clásicas.

En resumen, estos resultados están en contra de HLA-G, E y F como posibles ligandos de 2DL5.

### 3.3.4. Transfectantes que sobreexpresan moléculas *MHC-like*.

Debido a que algunos ligandos de receptores de células NK son moléculas *MHC-like* (Steinle et al, 2001; Cosman et al, 2001; Bauer et al, 1999), enfrentamos las células BWZ.36 2DL5-CD3 $\zeta$  con transfectantes que sobreexpresan varias de dichas moléculas. No se observó inducción de actividad  $\beta$ -gal en niveles considerables por parte de la célula BWZ.36 2DL5-CD3 $\zeta$  con ninguno de los transfectantes de moléculas *MHC-like* asociadas (CD1a-d y MR1) o no (MICA/B, ULBP1-3) a  $\beta$ 2m (Figura 44).

El transfectante control 2DL1-CD3 $\zeta$ , presentó niveles elevados de activación con el transfectante C1R-CD1a, bajos con C1R- CD1c y CD1d o inexistentes con CD1b (al igual que sucedía con C1R-B\*73:01, sección 3.3.2). Esta variabilidad es probablemente atribuible a los distintos niveles de expresión de HLA-C\*04 por la célula C1R tras ser transfectada con distintos genes, o a variaciones en el perfil de péptidos unidos a HLA-C\*04:01.

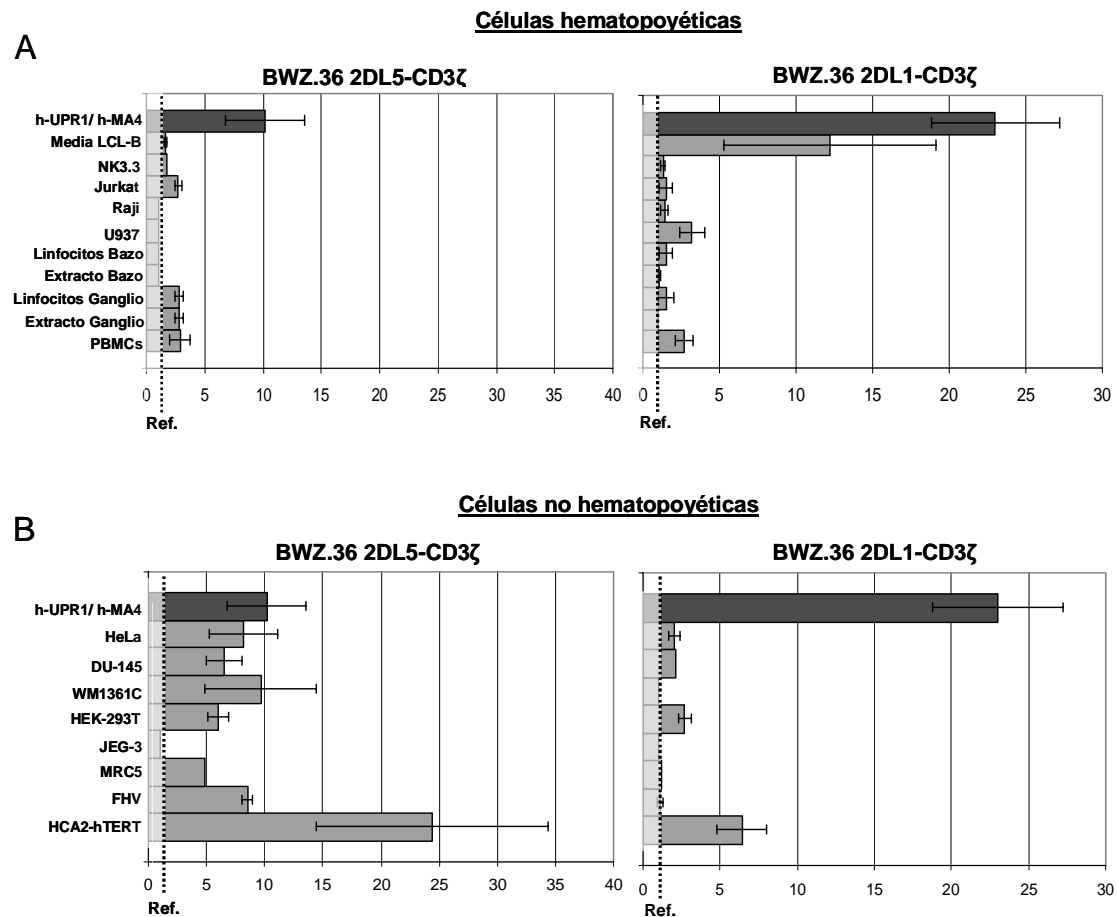


**Figura 44.** Niveles de activación relativos de los transfectantes BWZ.36 2DL5-CD3 $\zeta$  y 2DL1-CD3 $\zeta$  frente a transfectantes que sobreexpresan moléculas MHC-like.

### 3.3.5. Líneas celulares y células primarias humanas de origen hematopoyético y no hematopoyético

No habiendo encontrado interacciones relevantes entre el transfectante 2DL5-CD3 $\zeta$  y moléculas HLA y MHC-like, analizamos líneas celulares que abarcaban las distintas estirpes hematopoyéticas linfoides NK (NK3.3), T (Jurkat) y B (Raji), las cuales, no estimularon al transfectante o lo hicieron en niveles bajos (entre 1 y 2,7 veces los basales), de modo similar a las LCL-B estudiadas anteriormente. Por otro lado, células humanas de origen monocítico (U937) y eritroide (K562), tampoco activaron al transfectante de KIR2DL5 (Figura 45A).

Ante la posibilidad de que el ligando de 2DL5 se exprese preferentemente en células no tumorales de sangre periférica o en células de ganglios y bazo, enfrentamos el transfectante BWZ.36 2DL5-CD3 $\zeta$  con células primarias no purificadas y linfocitos de bazo de dos donantes distintos, no obteniéndose estimulación alguna. Se alcanzaron niveles bajos de activación (2,8-2,9 veces los niveles basales) con linfocitos y células primarias no purificadas de ganglio, así como PBMCs de tres donantes (Figura 45A).



**Figura 45.** Niveles de activación relativos de los transfectantes BWZ.36 2DL5-CD3 $\zeta$  y 2DL1-CD3 $\zeta$  frente a líneas celulares y células primarias humanas de origen hematopoyético (A) y líneas celulares humanas de origen epitelial y mesenquimatoso (B).

Ante la posibilidad de que KIR2DL5 pudiera interactuar con moléculas no-MHC o de expresión predominante en células no hematopoyéticas, como se ha descrito para algunos receptores de células NK (Brusilovsky et al, 2013; Ito et al, 2006), enfrentamos al transfectante BWZ.36 2DL5-CD3 $\zeta$  con varias líneas celulares de origen epitelial y mesenquimatoso (Tabla 11).

Nombre	Estirpe	Procedencia/Tejido	HLA expresado(
HeLa	Epitelial	Adenocarcinoma cervix	A*68:02, B*15:03; C*12:03
DU-145	Epitelial	Carcinoma próstata	A*03,*33; B*50,*57; C*06:02
WM1361C	Epitelial	Melanoma metastático	B*50:02; C*06:02
JEG-3	Epitelial	Coriocarcinoma	HLA-A y B negativa; C*04
MRC5	Fibroblasto	Pulmón	A*02,*29; B*07:02,*44:02; C*05:01,*07:01
FHV	Fibroblasto	Desconocido	A* n.t.; B*44,*51; C*02,*16:01
HCA2-hTERT	Fibroblasto	Dermis	A*01, B*08,*41, C*07,*17
HEK293T	Fibroblasto	Riñón embrionario	A*02; B*07, C*07

**Tabla 11. Líneas celulares humanas de origen epitelial y fibroblastos analizados.** n.t: no tipificado

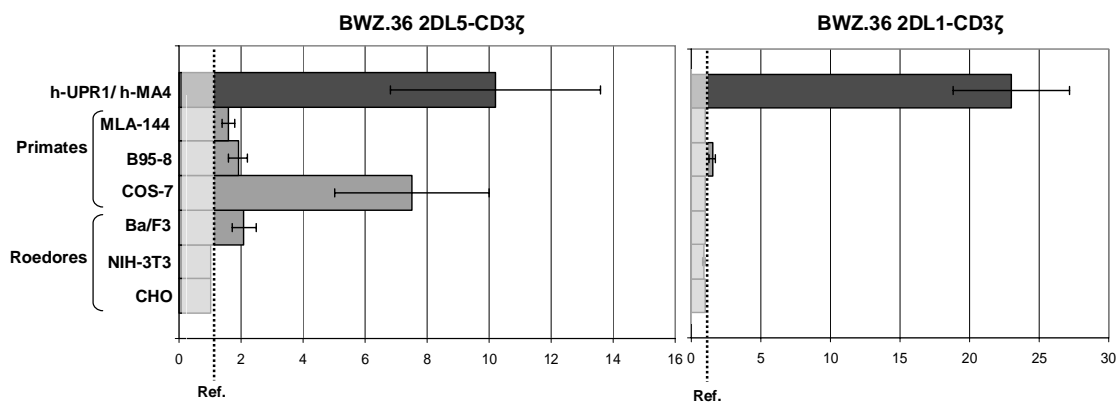
Inesperadamente, los niveles de estimulación con varias células tumorales de tipo epitelial (HeLa, DU-145, WM1361c), fibroblastos (MRC5, HCA2-hTERT y FHV) y con las células HEK-293T, fueron significativamente mayores que los obtenidos con células hematopoyéticas, oscilando entre 5 y 67 veces la estimulación alcanzada con la célula control, en función del experimento y la línea celular (Figura 45B). Estos niveles de estimulación fueron comparables e incluso superiores a los obtenidos con la célula control positivo, el hibridoma de UP-R1 (Figura 8). Únicamente la célula JEG-3 (coriocarcinoma) entre las epiteliales fue incapaz de activar al transfectante BWZ.36 2DL5-CD3ζ.

Como era previsible, debido a la menor expresión de moléculas HLA (Campoli y Ferrone, 2008; Restifo et al, 1993), los niveles de activación del transfectante 2DL1-CD3ζ fueron menores al enfrentarlo a células epiteliales que expresan su ligando (HCA2-hTERT (HLA-C\*17), JEG-3 (C\*04), DU-145 (C\*06)) que a las LCL-B.

### 3.3.6. Líneas celulares no humanas.

En cuanto a las células de primates, mientras que las células de *Hylobates lar* de estirpe T (MLA-144) y de *Callithrix jacchus* de estirpe B (B95-8) estimularon levemente al transfectante BWZ.36-2DL5 CD3ζ (1,6 y 1,9 veces los niveles con célula control), éste alcanzó unos niveles de activación 7,5 veces superiores al basal al enfrentarlo a fibroblastos de *Cercopithecus aethiops* (COS-7) (Figura 46).

Por el contrario, no hubo producción de  $\beta$ -gal con líneas celulares de ratón (*Mus musculus*) de estirpe linfoide B (Ba/F3) ni fibroblastos de embrión (NIH/3T3), ni tampoco en células CHO (células epiteliales de ovario de hámster, *Cricetulus griseus*).



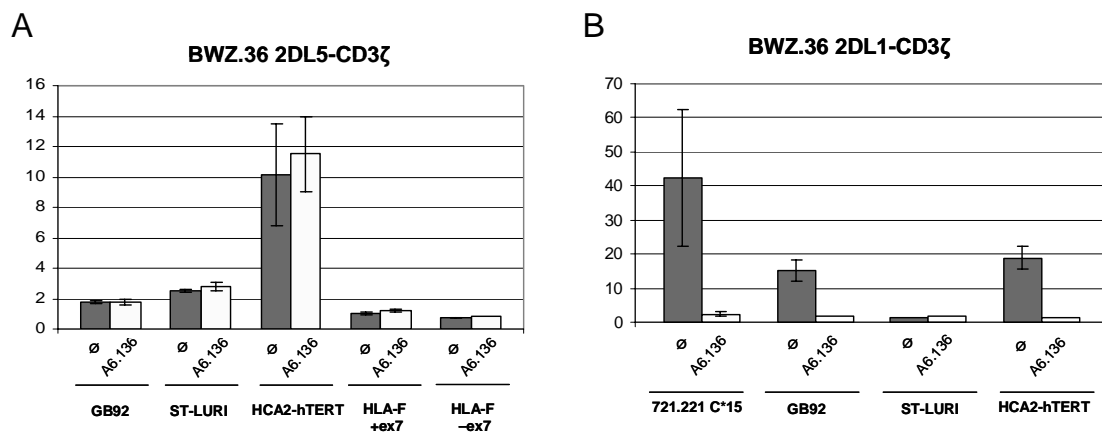
**Figura 46.** Niveles de activación relativos de los transfectantes BWZ.36 2DL5-CD3 $\zeta$  y 2DL1-CD3 $\zeta$  frente a líneas celulares no humanas.

Como era esperable, debido a la inexistencia del epítipo C2 en roedores y primates no hominoides, el transfectante control 2DL1-CD3 $\zeta$  no se activó frente a ninguna de las células analizadas.

### 3.4. Experimentos de bloqueo

Para descartar que la activación del transfectante BWZ.36 2DL5-CD3 $\zeta$  se debiera a la interacción de KIR2DL5 con moléculas HLA-I expresadas en las células a las que se enfrenta, realizamos experimentos de bloqueo de dichas moléculas HLA con el AcMo A6.136, que reconoce de manera específica moléculas HLA-I clásicas y no clásicas y es capaz de bloquear la interacción KIR-HLA (Stewart et al, 2005). Los bloqueos los realizamos sobre varias líneas que habían dado distintos grados de estimulación de 2DL5-CD3 $\zeta$  (desde el basal con HLA-F, hasta el máximo con HAC2-hTERT). A6.136 no inhibió la activación del transfectante BWZ.36 2DL5-CD3 $\zeta$  cuando se enfrentó a la

línea celular HCA2-hTERT (HLA-A\*01; B\*08, B\*41; C\*07 y C\*17), ni modificó su respuesta a una LCL-B normal (GB92), TAP<sup>-</sup> (ST-LURI), ni a los transfectantes de HLA-F (Figura 47A). Como control, el AcMo A6.136 bloqueó la interacción del transfectante control BWZ.36 2DL1-CD3 $\zeta$  con las moléculas HLA-C que presentan el epítipo C2 expresadas en la superficie tanto de la línea HCA2 (HLA-C\*17) como del transfectante 721.221-C\*15 y de la LCL GB92 (HLA-C\*18) (Figura 47B).



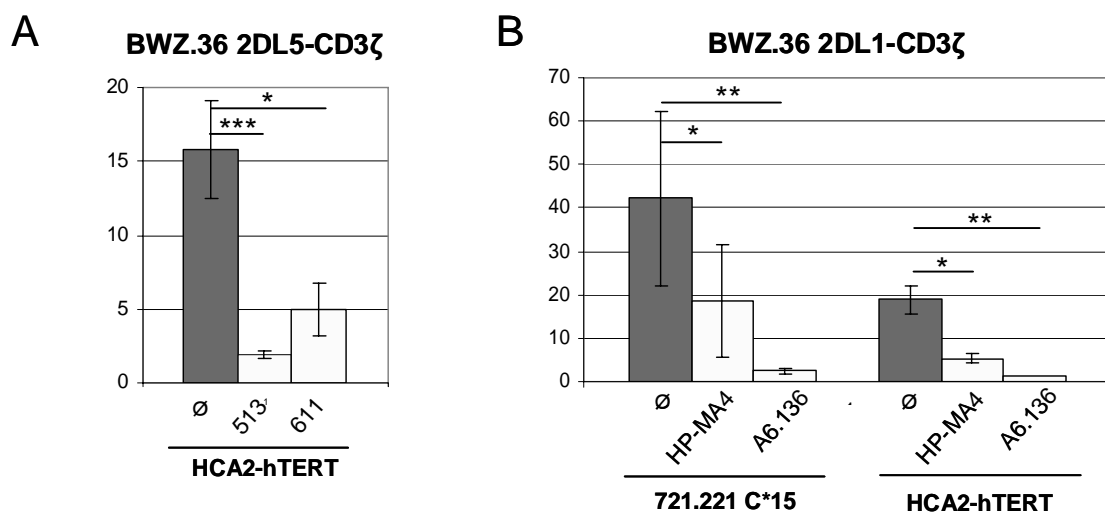
**Figura 47.** Experimentos de bloqueo de la interacción de KIR2DL5 y KIR2DL1 con moléculas HLA expresadas en distintas células diana.

De acuerdo con lo reportado previamente (Stewart et al, 2005), el AcMo W6/32 no bloqueó la interacción HLA-I-2DL1, ni inhibió la interacción de dichas células con 2DL5-CD3 $\zeta$  (resultados no mostrados).

Los resultados del bloqueo con el AcMo anti-2DL5, UP-R1 fueron inconsistentes, observándose estimulación e inhibición variables en función del experimento y la diana (no mostrado). Por ello, usamos otros AcMo que reconocen 2DL5 y otros KIR no definidos (amablemente proporcionados por Jeffrey Houchins, *R&D Systems*, no comercializados). Al bloquear las moléculas KIR2DL5 en el transfectante BWZ.36 en cocultivo con células HCA2-hTERT con los AcMo 513 y 611,

la señal de activación disminuyó, en función del AcMo utilizado, entre un 62 y 85% (Figura 48A).

Como control, el bloqueo de 2DL1-CD3 $\zeta$  con el AcMo específico HP-MA4 también produjo una disminución de la señal de activación al cocultivarlas con el transfectante 721.221 C\*15 y con la línea celular HCA2-hTERT, 55% y 70%, respectivamente, con respecto al control sin bloquear (Figura 48B).



**Figura 48.** Experimentos de bloqueo de la moléculas KIR2DL5 y KIR2DL1 de los transfectantes BWZ.36 KIR-CD3 $\zeta$ . \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

Los resultados de los bloqueos con anticuerpos monoclonales anti-KIR/ anti-HLA demuestran que la activación de los transfectantes BWZ.36 en los cocultivos es específica (mediada por los receptores KIR2DL5 o KIR2DL1) y que, en el caso de KIR2DL5, no es consecuencia de su interacción con moléculas HLA-I.

Por otro lado, en su conjunto, los resultados hasta ahora obtenidos muestran que los niveles de estimulación del transfectante de BWZ.36 2DL5-CD3 $\zeta$  al enfrentarlo a células epiteliales y fibroblastos son mucho mayores y más consistentes que los obtenidos con células hematópoyéticas con o sin expresión de HLA.

### 3.5. Validación de los resultados de los ensayos de activación mediante citometría de flujo con proteínas de fusión KIR-Fc

Nos propusimos confirmar mediante un abordaje diferente si el ligando de KIR2DL5 podría encontrarse mayoritariamente en células de origen no hematopoyético. Para confirmar las interacciones de los transfectantes BWZ.36 KIR-CD3 $\zeta$  con las células del panel detectadas en los ensayos de activación, así como su especificidad, generamos proteínas de fusión KIR2DL5-Fc y KIR2DL1-Fc (esta última como control) (Figura 49) con las que teñimos mediante citometría de flujo algunas de las células que parecían expresar o no sus ligandos: Jurkat, las LCL-B C211, 721.221-C\*15 y 721.221-mock como células hematopoyéticas y HEK-293T, HeLa, COS7 y DU-145 como ejemplos de líneas celulares no hematopoyéticas que generaban una mayor estimulación. Además, contábamos con otra proteína de fusión KIR2DL5-Fc comercial (*R&D Systems*) que nos sirvió como réplica.

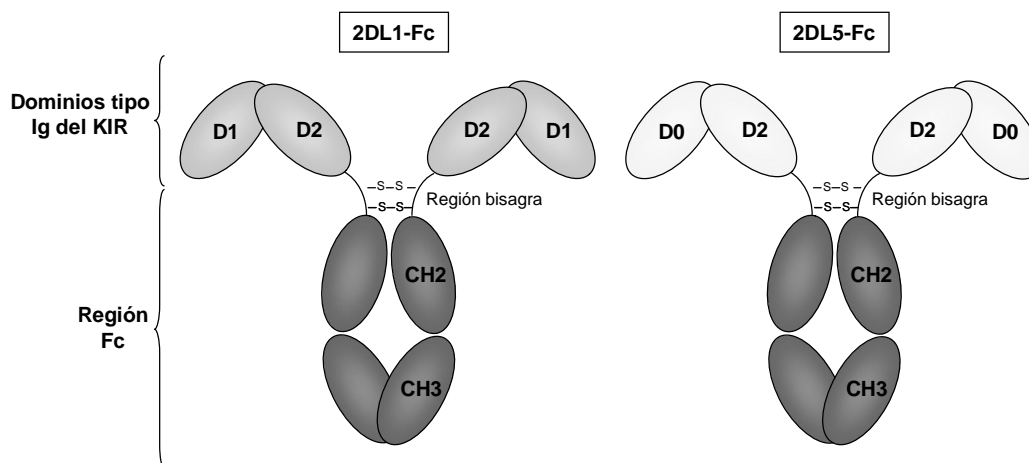


Figura 49. Estructura de las proteínas de fusión KIR-Fc.

Como muestra la figura 50, todas las líneas celulares humanas no hematopoyéticas se tiñeron con intensidad variable con la proteína de fusión KIR2DL5-Fc excepto JEG-3, que no estimulaba al transfectante BWZ.36 2DL5-CD3 $\zeta$ .

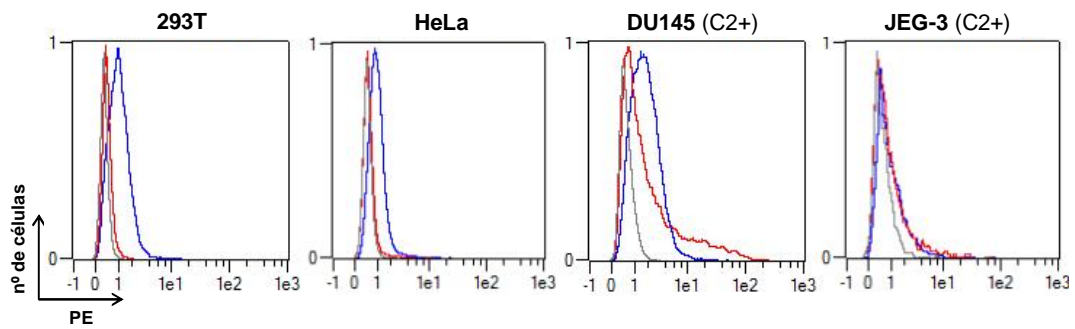
Las células COS7 y CHO (cercopiteco y hamster, respectivamente) también se tiñeron con la proteína de fusión 2DL5-Fc (Figura 50). La tinción positiva de las células CHO contrasta con la falta de estimulación del transfectante 2DL5- CD3 $\zeta$  , siendo éste el único resultado discrepante obtenido.

Por otro lado, en cuanto a las células hematopoyéticas que habían activado débilmente (índices entre 1 y 2,7) al transfectante BWZ.36 2DL5-CD3 $\zeta$ , la proteína de fusión KIR2LD5-Fc no se unió apreciablemente a ninguna de ellas (Figura 50).

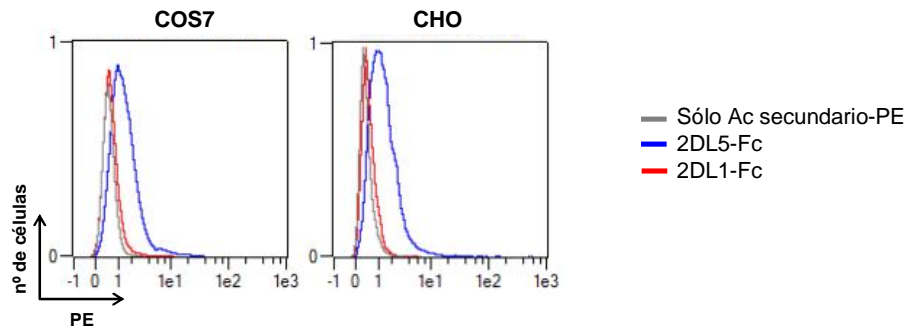
Las tinciones con la proteína 2DL5-Fc comercial replicaron todos los resultados obtenidos con la generada por nosotros, obteniendo unas señales de mayor intensidad en los casos en los que hubo tinción con nuestra proteína 2DL5-Fc (resultados no mostrados).

Las células hematopoyéticas C211 y 721.221-C\*15 y la no hematopoyética DU-145, positivas para el epítipo C2, se tiñeron muy visiblemente con la proteína de fusión 2DL1-Fc. En cambio, las líneas celulares Jurkat y JEG-3 (ambas HLA-C\*04), que no estimularon al transfectante BWZ.36 2DL1- CD3 $\zeta$  tampoco se tiñeron con la proteína de fusión 2DL1-Fc o lo hicieron en niveles muy bajos, lo que atribuimos a la baja expresión en superficie de sus moléculas HLA-C.. Por último, la proteína 2DL1-Fc no se unió a ninguna de las células negativas para el epítipo C2 (721.221-mock, HeLa y HEK-293T).

## No hematopoyéticas humanas:



## No hematopoyéticas no humanas:



## Hematopoyéticas:

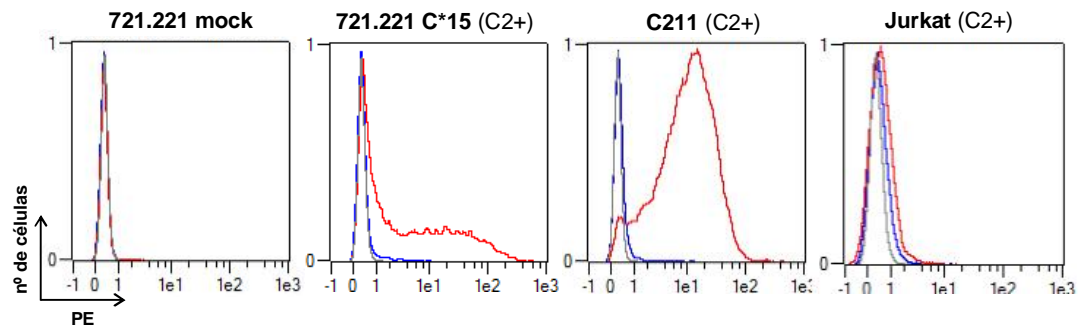


Figura 50. Experimentos de citometría de flujo de distintas líneas celulares con las proteínas de fusión 2DL5-Fc y 2DL1-Fc.

Los resultados de citometría de flujo con las proteínas de fusión 2DL5-Fc y 2DL1-Fc confirman en general los obtenidos en los ensayos de activación con los transfectantes BWZ.36 KIR-CD3 $\zeta$  y en su conjunto indican que el ligando de KIR2DL5 podría no ser una molécula HLA ni MHC-like sino una molécula de expresión mayoritaria en células de origen no hematopoyético, posiblemente conservada en primates.



**Discusión**

---



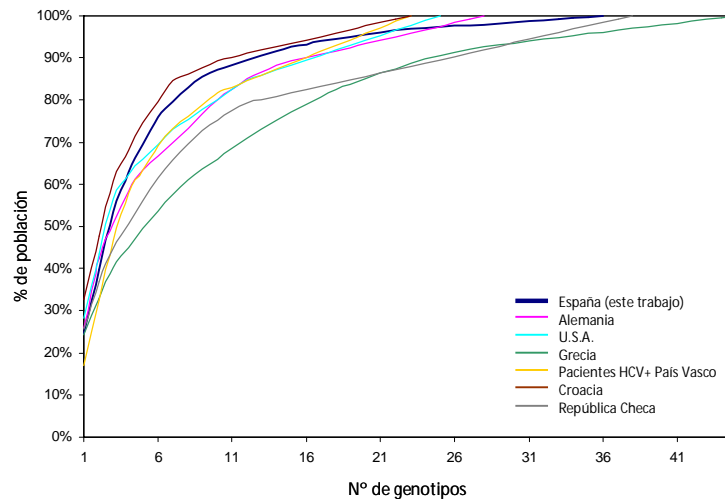
## 1. Estudio de la variabilidad genética del complejo *KIR* en población española

Nuestro análisis de la distribución de genotipos y haplotipos *KIR* así como la descripción de los nuevos haplotipos recombinantes que portan nuevos alelos y genes híbridos contribuye a profundizar en el conocimiento de la diversidad del complejo *KIR* así como de algunos aspectos funcionales, facilitando una correcta y más completa interpretación de los estudios genéticos de asociación.

En población española, son varios los trabajos donde se estudia la asociación entre *KIR* y diversas enfermedades autoinmunes e infecciosas (Díaz-Peña et al, 2016; 2015; Vidal-Castiñeira et al, 2014; Campillo et al, 2013; Moraru et al, 2012; García-León et al, 2011; Gumà et al, 2004). Las frecuencias de los genes *KIR* de los grupos control de estos estudios son similares a las reportadas en este trabajo. Probablemente por su distinto propósito, la mayoría de ellos se limitan a la estimación de las frecuencias de los distintos genes *KIR* y carecen de ningún análisis de la distribución de genotipos ni haplotipos *KIR* en población sana. Por tanto, nuestro trabajo podría considerarse el primer estudio sobre la diversidad y la distribución de genotipos y haplotipos *KIR* en la población española.

El análisis de la distribución de los genotipos *KIR* de la población estudiada revela, como era predecible, que ésta es desigual, de manera que unos pocos genotipos más comunes representan a la mayoría de individuos. Sin embargo, en comparación con algunas otras poblaciones caucasoides analizadas (Figura 51) la desigualdad en la nuestra es relativamente menor. En dichas poblaciones, parece existir una mayor diversidad de genotipos, requiriendo de un mayor número de ellos para representar un mismo porcentaje de población (Figura 51). Esta mayor diversidad en otros estudios de poblaciones cercanas podría deberse, en parte, a errores en los métodos de tipificación que sobreestiman la frecuencia de genotipos atípicos contribuyendo a aumentar el ruido y no reflejando la verdadera diversidad. Por tanto, cabe destacar la importancia de confirmar los nuevos perfiles de genotipos *KIR* que pudieran aparecer mediante

repetición del mismo método u otro alternativo, o mediante amplificación específica y secuenciación de los genes o regiones sospechosas, como se ha realizado en este trabajo.



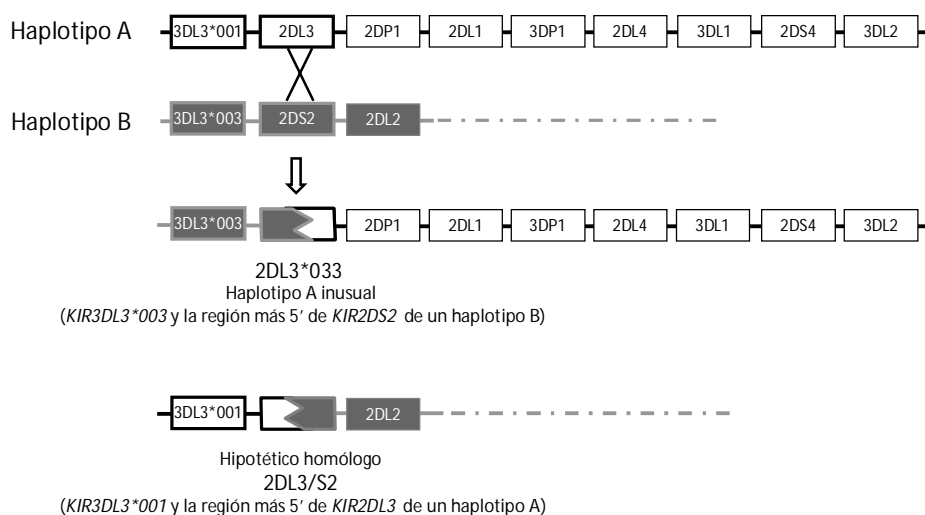
**Figura 51. Comparativa de la distribución de frecuencias de los genotipos KIR en distintas poblaciones caucásicas.** La gráfica muestra la proporción de la población que puede ser representada por un número dado de genotipos. Cada genotipo se añade a los acumulados en orden decreciente de frecuencia. (1) Cisneros et al, 2016 (no publicado), (2) (Uhrberg et al, 2002), (3) (Hsu et al, 2002b) (4) (Niokou et al, 2003), (5) (Santín et al, 2006), (6) (Burek et al, 2013), (7) (Pavlova et al, 2008).

Por otro lado, la interpretación conservadora de los haplotipos llevada a cabo en nuestro estudio puede hacer que algunos haplotipos recombinantes pasen desapercibidos, ocultos bajo un genotipo aparentemente canónico, subestimando la diversidad de haplotipos *KIR*. En parte, este hecho ha sido resuelto mediante la búsqueda dirigida de genes híbridos que son marcadores de algunos haplotipos recombinantes y para los que se han desarrollado métodos de detección específicos como *3DPI\*004*, *2DS2\*005* o *2DL3\*033* (Ordóñez et al, 2008; Gómez-Lozano, 2005 y este trabajo). Aún así, no podemos descartar la presencia de haplotipos inusuales en la población estudiada que hayan escapado a nuestros sistemas de detección. Actualmente, el desarrollo de métodos de tipificación *KIR* que permiten detectar variaciones en el número de copias de los genes

los postula como una herramienta útil que aumenta la capacidad de detección y facilita la caracterización de haplotipos inusuales (Roberts et al, 2014; Pontikos et al, 2014; Traherne et al, 2010).

La compilación y comparación de diversos estudios de poblaciones revela la gran variabilidad de genotipos *KIR* dentro de las poblaciones humanas y las diferencias entre ellas. Las recombinaciones en el complejo *KIR* no parecen ocurrir en todos los puntos por igual sino que tienden a concentrarse en determinadas regiones. La secuencia única que separa *3DP1* y *2DL4* y divide el complejo *KIR* en los segmentos centromérico y telomérico parece haber constituido un sitio para múltiples eventos de recombinación recíproca que han dado lugar a la mayoría de los haplotipos *KIR* observados en la población (Yawata et al, 2002a; Hsu et al, 2002b). Además, la alta similitud de secuencia entre los distintos genes, su orientación cabeza-cola y su proximidad han facilitado la recombinación asimétrica (Martin et al, 2003) en otras zonas del complejo *KIR* originando una menor proporción de haplotipos recombinantes, como los descritos en este trabajo, que presentan duplicaciones y deleciones de uno o varios genes, así como genes quiméricos cuando la recombinación tiene lugar dentro de un gen.

Un evento de recombinación asimétrica en el intrón 6 de los genes *KIR2DS2* y *KIR2DL3* podría ser el origen del nuevo alelo híbrido descrito en este trabajo, *KIR2DL3\*033*. Como producto recíproco de la recombinación podría haberse generado un hipotético homólogo *KIR2DL3/S2*, no descrito hasta ahora, que formaría parte de un nuevo haplotipo B que contendría el correspondiente alelo de *KIR3DL3* y la mitad 5' de *KIR2DL3* provenientes de un haplotipo A (Figura 52).



**Figura 52. Predicción de la recombinación originaria de KIR2DL3\*033 y de su hipotético homólogo KIR2DL3/S2.**

Los *KIR* presentan una elevada densidad de elementos repetidos en sus intrones entre los que se encuentran repeticiones en tandem como los micro y minisatélites, las secuencias Alu o elementos dispersos transponibles de distinta longitud (Wilson et al, 2000). Estas familias de repeticiones se han asociado a deleciones y recombinaciones a lo largo de todo el genoma y en el caso del complejo *KIR*, los puntos de rotura de varios genes híbridos se ha reportado que se localizan dentro o cerca de secuencias Alu y otros tipos de repeticiones, lo que sugiere que estos elementos repetidos incorporados a lo largo de los genes *KIR* han facilitado su diversificación (Traherne et al, 2010; Guethlein et al, 2007).

Una secuencia Alu de 279 pb localizada a 53pb de la posible zona de recombinación en el intrón 6 de *KIR2DL3\*033* (no mostrado) sugiere su implicación en la formación del gen híbrido. También en el intrón 6, una secuencia de tipo MER (*Medium Reiteration frequency Repeats*) ha sido implicada en la formación del gen quimérico descrito por nuestro grupo *KIR2DS2\*005* (Pyo et al, 2013; Ordóñez et al, 2011). Secuencias Alu en el intrón 5 se han implicado también en la formación de los genes

híbridos *2DL3/2DL1* y *3DL1/L2* (Traherne et al, 2010; Norman et al, 2009). Por tanto, las regiones intrónicas de los *KIR* que dividen los segmentos que codifican para las dominios extracelulares de los de las regiones intracelulares, parecen propensos a la recombinación, facilitando el intercambio de las regiones señalizadoras y de unión a ligando entre los distintos *KIR*.

Nuestros resultados demuestran que el gen *KIR2DL3\*033* es transcrito y procesado como sus genes homólogos. El análisis de su secuencia completa nos ha permitido hacer una predicción de la estructura de su producto: los dominios D1 y D2 así como la región del tallo serían como las del receptor *KIR2DS2* mientras que tendría la región transmembrana y una cola citoplasmática larga con dominios ITIM como correspondería con el receptor *KIR2DL3*. Al compartir las regiones transmembrana e intracitoplásmica con *2DL3* se le presupone su misma capacidad inhibidora. Sin embargo, al poseer la región extracelular de *KIR2DS2* resulta difícil definir su función debido a la controversia respecto a si dicho receptor reconoce o no HLA-C (Liu et al, 2014; David et al, 2013; Moesta et al, 2010; Stewart et al, 2005; Winter et al, 1998). Además, el haplotipo asociado a *KIR2DL3\*033* resulta particular: mientras que la inmensa mayoría de los haplotipos *KIR* contienen un receptor inhibidor funcional para el epítipo C1 (*KIR2DL3* en los haplotipos A y *KIR2DL2* en los B) el haplotipo recombinante portador de *KIR2DL3\*033* constituye uno de los haplotipos raros que carece de ambos receptores en su forma común. Si se confirmara la capacidad de unión de *2DS2* al epítipo C1, *KIR2DL3\*033* sustituiría la función de *KIR2DL2* y *KIR2DL3* en el haplotipo recombinante y por tanto, seguiría presentando un receptor con escasa afinidad para C1. Sin embargo, si su capacidad de interacción con C1 fuera descartada, el haplotipo resultante portador de *KIR2DL3\*033* carecería de un receptor inhibidor funcional para C1, lo que podría afectar a distintos aspectos de la funcionalidad de la

célula NK como su educación y su capacidad de respuesta. Sin embargo, no podemos descartar que KIR2DS2 pueda reconocer moléculas distintas a su homólogo inhibidor, no sólo otras moléculas HLA, como HLA-A\*11 (Liu et al, 2014), sino complejos HLA-péptido específicos o moléculas no HLA. El reconocimiento de un ligando codificado o inducido por un virus, por ejemplo, transduciría una señal contraria a la esperada (inhibitoria en vez de activadora) lo que podría ser determinante en la respuesta frente a la infección.

Un componente que aporta una importante diversidad al complejo *KIR* es *KIR2DL5*. La variable representación de *KIR2DL5* en la población y su duplicación en algunos haplotipos se traduce en que distintos individuos puedan tener entre 0 y 4 copias de este gen (o hasta 6 cuando *2DL5A* está duplicado). Además, como se deduce de la organización de varios de los haplotipos inusuales definidos u observados en este trabajo, el grupo *KIR2DL5-KIR2DS3S5*, está directamente implicado en diversos procesos de recombinación, algunos de ellos asimétricos, que han dado lugar a haplotipos expandidos y contraídos, algunos portadores de genes o alelos híbridos (Hou et al, 2012; Ordóñez et al, 2011; 2008; Gómez-Lozano et al, 2007; 2005; Martin et al, 2003; Gómez-Lozano et al, 2002). La presencia de dos segmentos altamente homólogos en dos partes distintas del complejo *KIR* motiva o explica, en parte, su participación en este tipo de sobrecruzamientos. Además, la estructura de algunos de los haplotipos inusuales identificados en este trabajo indica que el propio gen *KIR2DL5* funciona como un “punto caliente” de recombinación dentro del complejo *KIR*. Un ejemplo, es el nuevo alelo *KIR2DL5B\*002-EC*, que presenta una región promotora de tipo III idéntica a la de *KIR2DL5B\*0020106* y similar a la de *KIR2DL5B\*003* y una secuencia codificante como la del alelo *KIR2DL5B\*00202* (los exones 1 y 2 son idénticos en ambos alelos). Un minisatélite en el intrón1, presente también en el resto de *KIR* (Trowsdale et al, 2001), podría ser el lugar donde ocurre el sobrecruzamiento, como se ha sugerido para la

mayoría de alelos de *KIR2DL5* cuyas estructuras generales no son más que distintas combinaciones de dos fragmentos polimórficos: el que va del promotor al exón 2 y del exón 3 al 9.

Aunque no hemos podido demostrarlo formalmente, el alelo *KIR2DL5B\*002-EC* tendría capacidad de transcribirse ya que presenta un sitio intacto para el factor de transcripción RUNX. Además, la identidad de secuencia de sus dominios extracelulares con *KIR2DL5A\*005*, permite anticipar su mismo comportamiento (ver detalles más adelante en esta discusión).

## **2. Implicación de los polimorfismos en la región extracelular de *KIR2DL5* sobre su expresión en superficie y su reconocimiento por UP-R1**

Los alelos no transcritos de *KIR2DL5B*, que presentan mutado el sitio de unión del factor de transcripción RUNX (por ejemplo, los alelos más frecuentes de *KIR2DL5B\*002*), obviamente son indetectables en condiciones normales sobre la superficie de las células NK. Sin embargo, de los alelos más comunes cuyo sitio de unión para RUNX está intacto, únicamente se ha demostrado formalmente la expresión en superficie de *KIR2DL5A\*001*. Por el contrario, ningún producto es detectado sobre la superficie de células NK de donantes positivos para *KIR2DL5A\*005*. El origen de esta discrepancia entre genotipo (presencia de un alelo con un sitio intacto para RUNX) y fenotipo (ausencia de un producto detectable) de *KIR2DL5* no se había demostrado formalmente.

Los estudios de western-blot, microscopía confocal y citometría de flujo sobre células transfectadas con las construcciones 2DL5-FLAG realizados en este trabajo demuestran por primera vez que *KIR2DL5A\*005* es sintetizado normalmente, pero presenta un sitio menos de N-glicosilación y es mayoritariamente retenido en el interior

celular, mostrando una limitada expresión en superficie. Además, la comparación de los perfiles de citometría de flujo obtenidos con anticuerpos dirigidos frente al receptor y el epítipo artificial FLAG revelan que UP-R1, el único AcMo específico disponible, se une a KIR2DL5A\*005 peor que a KIR2DL5A\*001. La explicación a este fenotipo particular radica en los dos polimorfismos en el dominio extracelular D2 que lo distinguen de KIR2DL5A\*001. De ellos, la serina en la posición 174 contribuye de manera más notoria al fenotipo de KIR2DL5A\*005, siendo suficiente para inducir su retención intracelular y dificultar su reconocimiento por UP-R1 mientras que la asparragina 152 parece tener una repercusión menor. Este mismo fenotipo se puede anticipar también para varios alelos centroméricos dirigidos por promotores que se predice sean funcionales y que codifican polipéptidos maduros idénticos a KIR2DL5A\*005, como son KIR2DL5B\*0020106, \*00202 y el nuevo alelo caracterizado en este trabajo KIR2DL5B\*002-EC.

La repercusión de los polimorfismos en las regiones extracelulares de los KIR sobre su expresión en superficie se ha demostrado para varios alelos de *KIR2DL1*, *2DL2*, *2DL4* y *3DL1* (Hilton et al, 2015; Goodridge et al, 2007; VandenBussche et al, 2006; Pando et al, 2003). En el más reciente de estos estudios, Hilton et al (2015), demuestran que la sustitución de glicina por serina en la posición 179 de KIR2DL1\*014 (correspondiente a la 174 de KIR2DL5) es la responsable de su retención intracelular. Dicha sustitución causa un desplazamiento de la tirosina 134 que parece ser incompatible con el correcto plegamiento de la molécula. En nuestro modelo estructural de KIR2DL5A\*005, la serina 174 también genera un desplazamiento del residuo correspondiente en la misma posición (fenilalanina 129) el cual podría de manera similar, desorganizar la arquitectura del dominio D2 de *KIR2DL5A\*005* impidiendo su correcto plegamiento y forzando su retención intracelular. Por otro lado, la desorganización del dominio D2

podría también explicar que un aminoácido que se encuentra parcialmente escondido afecte al reconocimiento por el anticuerpo UP-R1. El hecho de que la glicina 174 esté conservada en los KIR (tanto en humanos como en primates hominoides), respalda la importancia de dicho residuo en la adquisición del plegamiento correcto de la molécula.

La peor unión de UP-R1 a 2DL5A\*005 sugiere que la estructura del epítipo desconocido reconocido por UP-R1 se ve afectada por los polimorfismos que lo diferencian de 2DL5A\*001. Como se ha propuesto, la desorganización de la arquitectura del dominio D2 de KIR2DL5A\*005 que podría ocasionar la Ser174 explicaría no sólo su peor reconocimiento por UP-R1 sino también, por qué KIR2DL5A\*005 es peor reconocido que KIR2DL5A\*001 por otros AcMo que se unen a KIR2DL5 de una forma no monoespecífica, como los proporcionados por J. Houchins (*R&D Systems*) utilizados en el apartado 3.4 de los Resultados de esta tesis o el AcMo 53.1, que reconoce también KIR2DL4 (M. Colonna) (resultados no mostrados). Por ello, los aminoácidos 152 y 174 podrían no formar parte directa del epítipo de UP-R1.

Por otro lado, el papel de la glicosilación en la adquisición del plegamiento correcto de las proteínas es variable. Aunque, en algunos casos, la deglicosilación completa o parcial parece no tener efectos sobre el plegamiento, también han sido descritos la agregación y el plegamiento incorrecto de algunas proteínas (Shental-Bechor y Levy, 2008), lo que sugiere que algunos sitios de glicosilación son más importantes que otros para la adquisición de un plegamiento correcto. Pese al alto grado de conservación de la asparragina 152 en todos los KIR, nuestros resultados sugieren que su efecto aislado sobre la estabilidad y/o el plegamiento de la molécula KIR2DL5A es menor.

Cabe señalar que nuestras construcciones mutantes individuales G174S y N152D, imprescindibles para nuestro estudio, no representan ningún alelo natural de KIR2DL5 ya que no existe ninguno que presente únicamente uno de los dos

polimorfismos (Tabla 3 de la Introducción) estando por tanto ambas posiciones ligadas al 100% (Asn152/Gly174 o Asp152/Ser174).

Si trasladamos nuestros resultados al contexto de una célula NK, podemos afirmar que la ausencia de tinción con UP-R1 de células NK de individuos *KIR2DL5A\*005* positivos, es resultado de una combinación de dos factores: la escasa expresión en superficie de *KIR2DL5A\*005* y la modificación del epítipo de UP-R1. Ambos fenómenos son consecuencia de polimorfismos que afectan a los residuos 152 y 174 y contribuyen en distinto grado y de manera independiente al fenotipo de *KIR2DL5A\*005*. El efecto que la modificación del epítipo de UP-R1 por sí mismo puede tener sobre el fenotipo de *KIR2DL5A\*005*, se ve aumentado por el hecho de que pocas o ninguna molécula de *KIR2DL5A\*001* alcanza la superficie celular, siendo la consecuencia final el fenotipo de “no unión” de UP-R1.

Curiosamente, algunos KIR que son secuestrados mayoritariamente en el interior celular tienen frecuencias considerablemente elevadas en la población, como es el caso de *KIR3DL1\*004* (~20%), el segundo alelo *KIR3DL1* más frecuente en caucasoides, o de la mayoría de alelos de *KIR2DL4* (Rajagopalan et al, 2006; Goodridge et al, 2003). Estudios de poblaciones indican que el alelo *KIR2DL5A\*005* tampoco es un alelo raro, con una frecuencia de ~11-13% en caucasoides (Middleton y González, 2010; Gómez-Lozano et al, 2007 y nuestra frecuencia) lo que sugiere que es mantenido por selección balanceada (*balancing selection*), la cual favorece la persistencia de aquellos polimorfismos que resultan útiles para la supervivencia del individuo bajo distintas presiones selectivas. La selección balanceada parece también haber actuado sobre el resto de alelos de *KIR2DL5* ya que ambos loci, *KIR2DL5A* y *KIR2DL5B*, están representados con frecuencias significativas en distintas poblaciones por alelos que se sabe o se espera que se expresen en la superficie de la célula (por ejemplo, *KIR2DL5A\*001*, *KIR2DL5B\*00602*) y por otros

que no, ya sea por silenciamiento de su transcripción (los alelos más comunes de KIR2DL5B) o por su retención intracelular (KIR2DL5A\*005).

Los divergentes niveles de expresión sobre la superficie de la célula NK de los alelos de *KIR2DL5*, podrían afectar a la magnitud de las respuestas inhibitorias frente a un supuesto ligando. De esta manera, la presencia en las células NK del alelo *KIR2DL5A\*001* podría haber supuesto una desventaja evolutiva en algún momento al ser activadas con menor eficacia en un contexto de infección viral, por ejemplo. *KIR2DL5A\*005* podría haber surgido como contrapunto, facilitando la activación de las células frente a la infección. En este sentido, *KIR3DL1\*004*, que también es retenido en el interior de la célula, es el alelo de *3DL1* que ejerce una mayor protección frente a la progresión del VIH en presencia de su ligando, el epítipo Bw4 (Martin et al, 2007), siendo las pocas moléculas que alcanzan la superficie de la célula las únicas que parecen ser funcionales (Taner et al, 2011), sugiriendo la pérdida de funcionalidad del receptor (a través de las variaciones en el plegamiento) como una forma de modular las funciones de los KIR, pudiendo ser también el caso de *KIR2DL5A\*005*. Alternativamente, *KIR2DL5A\*005* podría señalar desde el interior de la célula, al igual que se ha propuesto que lo hace *KIR2DL4* desde su localización endosómica tras ser endocitado junto con HLA-G (Rajagopalan, 2010; 2006). De cualquier manera, el efecto real de la expresión intracelular de *KIR2DL5A\*005* es especialmente difícil de predecir sin conocer su ligando.

La principal implicación de estos resultados es que el análisis del repertorio de células NK y los estudios genéticos de asociación con el objetivo de entender la relación entre *KIR2DL5* y las distintas condiciones de la salud sólo tendrán sentido si son tenidos en consideración el polimorfismo alélico y los distintos perfiles de expresión que provoca.

### **3. Búsqueda de ligandos potenciales de KIR2DL5**

El conocimiento de las interacciones de KIR2DL5 con sus potenciales ligandos se hace imprescindible para comprender su función y su papel en la inmunidad. Las características particulares de KIR2DL5 (baja proporción de células NK que lo expresan y escaso aumento en células expandidas) hacen poco apropiado el uso de un escenario experimental inhibitor cercano a lo fisiológico para el rastreo de sus ligandos. Sin embargo, el sistema celular reportero utilizado en este trabajo, basado en la cuantificación de señales positivas sobre células modificadas con expresión elevada y homogénea de KIR2DL5, nos ha permitido obtener los primeros datos que evidencian la existencia de ligandos celulares para el mismo.

El hecho de que en nuestro sistema la interacción KIR-ligando ocurra célula-célula lo acerca a un escenario fisiológico donde receptor y ligando se acumulan en la sinapsis inmunológica. De esta manera, la probabilidad de detectar interacciones de baja afinidad es mayor en comparación con otros métodos basados sólo en el uso de moléculas KIR solubles.

El uso de una célula reportera murina podría haber restado sensibilidad a nuestro sistema si requiriera para su activación a través de KIR2DL5 alguna molécula accesoria cuyo ligando no existiera en células diana humanas. El efecto del PMA solventaría esta limitación al omitir la necesidad de una estimulación accesoria de membrana. Además, los niveles de estimulación del transfectante KIR2DL5-CD3 $\zeta$  obtenidos con líneas celulares epiteliales y fibroblastos de origen humano parecen descartar que el uso de una célula reportera murina haya podido suponer una barrera de especie.

Estos mayores y más consistentes niveles de estimulación con líneas celulares epiteliales y fibroblastos, comparados con los de células hematopoyéticas, apuntan a que el ligando de KIR2DL5 es, inesperadamente, expresado mayoritariamente en

células no hematopoyéticas, al contrario que las moléculas HLA. Además, los bajos o inexistentes niveles de activación con células que sobreexpresan moléculas HLA clásicas, no clásicas y MHC-like, indistinguibles de los obtenidos con células defectivas en HLA, sugieren que el ligando de KIR2DL5 no es una molécula HLA o relacionada.

Nuestro sistema celular reportero ha demostrado ser altamente específico, de manera que el transfectante control BWZ.36-2DL1-CD3 $\zeta$  nunca se activó cuando se enfrentó a células que no expresaban su ligando (el epítipo C2). Sin embargo, la falta de estimulación de nuestra célula control 2DL1-CD3 $\zeta$  con la LCL positiva para el epítipo C2, LE023, y con las líneas celulares no hematopoyéticas C1R y JEG-3, no permite descartar interacciones de baja afinidad del transfectante BWZ.36-2DL5-CD3 $\zeta$  con moléculas HLA o interacciones con moléculas con baja expresión que pudieran estar por debajo del límite de detección de nuestro sistema. Sin embargo, el transfectante 2DL5-CD3 $\zeta$  se activó en niveles igualmente bajos con células con baja expresión de moléculas HLA-I (como la línea celular 721.221) o con una elevada expresión de las mismas (transfectantes que sobreexpresan determinadas moléculas HLA y las LCLs) lo que refuerza que el ligando no sea una molécula MHC.

Los experimentos de citometría de flujo con las proteínas de fusión solubles 2DL1-Fc y 2DL5-Fc nos permitieron validar y confirmar los resultados obtenidos en los ensayos de activación con los transfectantes BWZ.36 KIR-CD3 $\zeta$  y sugieren que no son necesarias interacciones adicionales entre célula diana y reportera para la mera unión de KIR2DL5 a su ligando. Sin embargo, los resultados discrepantes obtenidos mediante ambos métodos con la línea epitelial de hámster CHO, la cuál no activó al transfectante 2DL5-CD3 $\zeta$  pero sí se tiñó con la proteína de fusión KIR2DL5-Fc, podrían sugerir la necesidad de señales adicionales para que la interacción observada tuviera una implicación funcional. En este sentido, aunque es poco probable, la célula CHO podría

carecer excepcionalmente de una molécula accesoria conservada en ratón, primates y humanos que se asociara a algo desconocido en la célula BWZ.36 y permitiera la activación de la célula. En cualquier caso, el origen de dicha discrepancia es desconocido.

Aunque la función de las células NK está regulada en parte por las moléculas MHC-I expresadas en las células diana existen varios estudios que revelan que también poseen receptores inhibidores específicos de ligandos no-MHC, presentes en tejido conectivo y en células epiteliales. El receptor LAIR-1 (*Leukocyte Associated Ig-like Receptor-1*), expresado en prácticamente todas las células del sistema inmune (Meyaard et al, 1997), reconoce varios tipos de colágeno y desencadena una potente señal inhibitoria que es capaz evitar la lisis de la célula diana (Lebbink et al, 2006). Por otro lado, moléculas de adhesión relacionadas con el antígeno carcinoembrionario humano (CEACAMs) son reconocidas a través del receptor inhibidor CEACAM1, expresado en células NK activadas, linfocitos T y otros leucocitos, inhibiendo la citotoxicidad frente a células epiteliales (Markel et al, 2002). KLRG1 (*Killer cell lectin-like receptor G1*), un receptor inhibidor de la familia de las lectinas (Hanke et al, 1998; Guthmann et al, 1995) reconoce un motivo altamente conservado de otra molécula de adhesión, la cadherina-E (probablemente también de la -N y -R) (Ito et al, 2006; Grundemann et al, 2006), expresada en células epiteliales. Ito et al (2006), demostraron que la interacción del receptor con la E-cadherina previene la lisis de la célula que la expresa. La disminución de la expresión de la E-cadherina en tumores epiteliales facilita su motilidad y su capacidad invasora lo que sugiere un papel del receptor KLRG1 como sistema de inmunovigilancia tumoral independiente de MHC que detecta la expresión de E-cadherina (Cowin et al, 2005). En este sentido, que el potencial ligando de KIR2DL5 parezca no ser una molécula MHC

junto con el hecho de que se exprese mayoritariamente en células epiteliales y fibroblastos, podría sugerir un papel similar de KIR2DL5.

En lo que respecta a los KIR, dos estudios recientes han descrito interacciones de varios de ellos con ligandos no-HLA. Moléculas de heparán sulfato parecen ser capaces de interactuar directamente con el receptor KIR2DL4 e iniciar la transducción de señales de activación así como de actuar como un regulador alostérico modulando la capacidad del receptor de unirse a otros ligandos (Brusilovsky et al, 2014; 2013). Por otro lado, KIR3DL2 (y en menor medida KIR3DL1, 3DS1 y 2DL4) reconoce oligodesoxinucleótidos CpG y los internaliza permitiendo que sean reconocidos por TLR9 en los endosomas (Sivori et al, 2010).

Ambas interacciones podrían guardar relación con la alta carga positiva del dominio D0 de estos KIR, que ha sido directamente implicado en la unión a ambos ligandos (Brusilovsky et al, 2013; Sivori et al, 2010). De igual modo, la carga positiva del dominio D0 de KIR2DL5 (4,8 a pH=7), comparable a la de KIR2DL4, plantea la posibilidad de que también sea capaz de unirse a ligandos con una elevada carga negativa.

Los primeros datos sobre la distribución y la naturaleza de un potencial ligando de KIR2DL5 obtenidos en este trabajo, facilitan encauzar futuras estrategias dirigidas a su identificación. A partir de entonces, entender cómo las interacciones KIR2DL5-ligando son integradas en un contexto fisiológico y cómo las señales resultantes modulan la respuesta de la célula NK para llegar a comprender el papel del KIR2DL5 en la inmunidad constituirá un nuevo reto.



## **Conclusiones**

---



1. Hemos realizado el primer análisis detallado en población española sobre la distribución de genotipos y haplotipos KIR, tanto canónicos como atípicos. Casi uno de cada veinte individuos presentó haplotipos atípicos.
2. Existen haplotipos *KIR* inusuales que presentan un gen híbrido *KIR2DL3\*033*, que parece derivar de un sobrecruzamiento desigual entre *KIR2DS2* y *KIR2DL3* y es transcrito normalmente.
3. Existen haplotipos *KIR* inusuales donde el bloque *KIR2DL5B-2DS3* se localiza en un haplotipo A. Un nuevo alelo *KIR2DL5B* potencialmente transcribible se asocia a dicho haplotipo recombinante.
4. El anticuerpo UP-R1 reconoce a *KIR2DL5A\*005* peor que a *KIR2DL5A\*001*.
5. El producto del alelo *KIR2DL5A\*005* es retenido mayoritariamente en el interior celular, probablemente por defectos en el plegamiento de la molécula.
6. La serina 174 del dominio D2 de *KIR2DL5A\*005* es el principal factor que dificulta su expresión en superficie y su reconocimiento por UP-R1.
7. El sistema celular reportero BWZ.36 KIR-CD3 $\zeta$  ha demostrado ser un sistema válido para el análisis de la distribución de los potenciales ligandos de los KIR.
8. No hay evidencia de que el ligando de *KIR2DL5* sea una molécula MHC.
9. El ligando de *KIR2DL5* parece expresarse mayoritariamente en células de origen no hematopoyético y está posiblemente conservado en primates.



## **Bibliografía**

---



- Alter G, Martin MP, Teigen N, Carr WH, Suscovich TJ, Schneidewind A et al., 2007. Differential natural killer cell-mediated inhibition of HIV-1 replication based on distinct KIR/HLA subtypes: *J.Exp.Med.*, v. 204, no. 12, p. 3027-3036.
- Alter G, Rihn S, Walter K, Nolting A, Martin M, Rosenberg ES et al., 2009. HLA class I subtype-dependent expansion of KIR3DS1+ and KIR3DL1+ NK cells during acute human immunodeficiency virus type 1 infection: *J.Virol.*, v. 83, no. 13, p. 6798-6805.
- Anderson SK, Ortaldo JR y McVicar DW, 2001. The ever-expanding Ly49 gene family: repertoire and signaling: *Immunol.Rev.*, v. 181, p. 79-89.
- Anfossi N, Andre P, Guia S, Falk CS, Roetynck S, Stewart CA et al., 2006. Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I: *Immunity.*, v. 25, no. 2, p. 331-342.
- Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL et al., 1999. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA: *Science*, v. 285, no. 5428, p. 727-729.
- Bontadini A, Testi M, Cuccia MC, Martinetti M, Carcassi C, Chiesa A et al., 2006. Distribution of killer cell immunoglobulin-like receptors genes in the Italian Caucasian population: *J.Transl.Med.*, v. 4, p. 44.
- Borges L, Hsu ML, Fanger N, Kubin M y Cosman D, 1997. A family of human lymphoid and myeloid Ig-like receptors, some of which bind to MHC class I molecules: *J.Immunol.*, v. 159, no. 11, p. 5192-5196.
- Boyle LH, Gillingham AK, Munro S y Trowsdale J, 2006. Selective export of HLA-F by its cytoplasmic tail: *J.Immunol.*, v. 176, no. 11, p. 6464-6472.
- Braud VM, Allan DS, O'Callaghan CA, Soderstrom K, D'Andrea A, Ogg GS et al., 1998. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C: *Nature*, v. 391, no. 6669, p. 795-799.
- Brusilovsky M, Cordoba M, Rosental B, Hershkovitz O, Andrade MD, Pecherskaya A et al., 2013. Genome-wide siRNA screen reveals a new cellular partner of NK cell receptor KIR2DL4: heparan sulfate directly modulates KIR2DL4-mediated responses: *J.Immunol.*, v. 191, no. 10, p. 5256-5267.
- Brusilovsky M, Radinsky O, Yossef R, Campbell KS y Porgador A, 2014. Carbohydrate-mediated modulation of NK cell receptor function: structural and functional influences of heparan sulfate moieties expressed on NK cell surface: *Front Oncol.*, v. 4, p. 185.
- Burek MK, Grubic Z, Stingl K y Zunec R, 2013. Distribution of KIR genes in the Croatian population: *Hum.Immunol.*, v. 74, no. 8, p. 952-956.
- Burshtyn DN, Scharenberg AM, Wagtmann N, Rajagopalan S, Berrada K, Yi T et al., 1996. Recruitment of tyrosine phosphatase HCP by the killer cell inhibitor receptor: *Immunity.*, v. 4, no. 1, p. 77-85.

- Burt D, Johnston D, Rinke de WT, Van den EP y Stern PL, 1991. Cellular immune recognition of HLA-G-expressing choriocarcinoma cell line Jeg-3: *Int.J.Cancer Suppl*, v. 6, p. 117-122.
- Campbell KS, Dessing M, López-Botet M, Cella M y Colonna M, 1996. Tyrosine phosphorylation of a human killer inhibitory receptor recruits protein tyrosine phosphatase 1C: *J.Exp.Med.*, v. 184, no. 1, p. 93-100.
- Campillo JA, Legaz I, López-Álvarez MR, Bolarin JM, Las HB, Muro M et al., 2013. KIR gene variability in cutaneous malignant melanoma: influence of KIR2D/HLA-C pairings on disease susceptibility and prognosis: *Immunogenetics*, v. 65, no. 5, p. 333-343.
- Campoli M y Ferrone S, 2008. HLA antigen changes in malignant cells: epigenetic mechanisms and biologic significance: *Oncogene*, v. 27, no. 45, p. 5869-5885.
- Cantoni C, Falco M, Pessino A, Moretta A, Moretta L y Biassoni R, 1999. P49, a putative HLA-G1 specific inhibitory NK receptor belonging to the immunoglobulin Superfamily: *J.Reprod.Immunol.*, v. 43, no. 2, p. 157-165.
- Cantoni C, Verdiani S, Falco M, Pessino A, Cilli M, Conte R et al., 1998. p49, a putative HLA class I-specific inhibitory NK receptor belonging to the immunoglobulin superfamily: *Eur.J.Immunol.*, v. 28, no. 6, p. 1980-1990.
- Carr WH, Rosen DB, Arase H, Nixon DF, Michaelsson J y Lanier LL, 2007. Cutting Edge: KIR3DS1, a gene implicated in resistance to progression to AIDS, encodes a DAP12-associated receptor expressed on NK cells that triggers NK cell activation: *J.Immunol.*, v. 178, no. 2, p. 647-651.
- Chan HW, Kurago ZB, Stewart CA, Wilson MJ, Martin MP, Mace BE et al., 2003. DNA methylation maintains allele-specific KIR gene expression in human natural killer cells: *J.Exp.Med.*, v. 197, no. 2, p. 245-255.
- Chan HW, Miller JS, Moore MB y Lutz CT, 2005. Epigenetic control of highly homologous killer Ig-like receptor gene alleles: *J.Immunol.*, v. 175, no. 9, p. 5966-5974.
- Chapman TL, Heikeman AP y Bjorkman PJ, 1999. The inhibitory receptor LIR-1 uses a common binding interaction to recognize class I MHC molecules and the viral homolog UL18: *Immunity*, v. 11, no. 5, p. 603-613.
- Cichocki F, Miller JS y Anderson SK, 2011. Killer immunoglobulin-like receptor transcriptional regulation: a fascinating dance of multiple promoters: *J.Innate.Immun.*, v. 3, no. 3, p. 242-248.
- Colonna M, Borsellino G, Falco M, Ferrara GB y Strominger JL, 1993. HLA-C is the inhibitory ligand that determines dominant resistance to lysis by NK1- and NK2-specific natural killer cells: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 90, no. 24, p. 12000-12004.
- Colonna M, Navarro F y López-Botet M, 1999. A novel family of inhibitory receptors for HLA class I molecules that modulate function of lymphoid and myeloid cells: *Curr.Top.Microbiol.Immunol.*, v. 244, p. 115-122.

- Cook MA, Moss PA y Briggs DC, 2003. The distribution of 13 killer-cell immunoglobulin-like receptor loci in UK blood donors from three ethnic groups: *Eur.J.Immunogenet.*, v. 30, no. 3, p. 213-221.
- Cooper MA, Fehniger TA y Caligiuri MA, 2001. The biology of human natural killer-cell subsets: *Trends Immunol.*, v. 22, no. 11, p. 633-640.
- Cosman D, Fanger N, Borges L, Kubin M, Chin W, Peterson L et al., 1997. A novel immunoglobulin superfamily receptor for cellular and viral MHC class I molecules: *Immunity.*, v. 7, no. 2, p. 273-282.
- Cosman D, Mullberg J, Sutherland CL, Chin W, Armitage R, Fanslow W et al., 2001. ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor: *Immunity.*, v. 14, no. 2, p. 123-133.
- Cowin P, Rowlands TM y Hatsell SJ, 2005. Cadherins and catenins in breast cancer: *Curr.Opin.Cell Biol.*, v. 17, no. 5, p. 499-508.
- David G, Djaoud Z, Willem C, Legrand N, Rettman P, Gagne K et al., 2013. Large spectrum of HLA-C recognition by killer Ig-like receptor (KIR)2DL2 and KIR2DL3 and restricted C1 SPECIFICITY of KIR2DS2: dominant impact of KIR2DL2/KIR2DS2 on KIR2D NK cell repertoire formation: *J.Immunol.*, v. 191, no. 9, p. 4778-4788.
- Davies GE, Locke SM, Wright PW, Li H, Hanson RJ, Miller JS et al., 2007. Identification of bidirectional promoters in the human KIR genes: *Genes Immun.*, v. 8, no. 3, p. 245-253.
- Díaz-Peña R, Vidal-Castiñeira JR, Moro-García MA, Alonso-Arias R y Castro-Santos P, 2016. Significant association of the KIR2DL3/HLA-C1 genotype with susceptibility to Crohn's disease: *Hum.Immunol.*, v. 77, no. 1, p. 104-109.
- Díaz-Peña R, Vidal-Castiñeira JR, Mulero J, Sánchez A, Queiro R y López-Larrea C, 2015. Activating killer immunoglobulin-like receptors genes are associated with increased susceptibility to ankylosing spondylitis: *Clin.Exp.Immunol.*, v. 180, no. 2, p. 201-206.
- Doshi PD y DiPersio JF, 1994. Three conserved motifs in the extracellular domain of the human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor subunit are essential for ligand binding and surface expression: *Blood*, v. 84, no. 8, p. 2539-2553.
- Du Z, Sharma SK, Spellman S, Reed EF y Rajalingam R, 2008. KIR2DL5 alleles mark certain combination of activating KIR genes: *Genes Immun.*, v. 9, no. 5, p. 470-480.
- Estefanía E, Flores R, Gómez-Lozano N, Aguilar H, López-Botet M y Vilches C, 2007. Human KIR2DL5 is an inhibitory receptor expressed on the surface of NK and T lymphocyte subsets: *J.Immunol.*, v. 178, no. 7, p. 4402-4410.
- Fan QR, Mosyak L, Winter CC, Wagtmann N, Long EO y Wiley DC, 1997. Structure of the inhibitory receptor for human natural killer cells resembles haematopoietic receptors: *Nature*, v. 389, no. 6646, p. 96-100.

Faure M y Long EO, 2002. KIR2DL4 (CD158d), an NK cell-activating receptor with inhibitory potential: *J.Immunol.*, v. 168, no. 12, p. 6208-6214.

García-León JA, Pinto-Medel MJ, García-Trujillo L, López-Gómez C, Oliver-Martos B, Prat-Arrojo I et al., 2011. Killer cell immunoglobulin-like receptor genes in Spanish multiple sclerosis patients: *Mol.Immunol.*, v. 48, no. 15-16, p. 1896-1902.

Gómez-Lozano N, Estefanía E, Williams F, Halfpenny I, Middleton D, Solis R et al., 2005. The silent KIR3DP1 gene (CD158c) is transcribed and might encode a secreted receptor in a minority of humans, in whom the KIR3DP1, KIR2DL4 and KIR3DL1/KIR3DS1 genes are duplicated: *Eur.J.Immunol.*, v. 35, no. 1, p. 16-24.

Gómez-Lozano N, Gardiner CM, Parham P y Vilches C, 2002. Some human KIR haplotypes contain two KIR2DL5 genes: KIR2DL5A and KIR2DL5B: *Immunogenetics*, v. 54, no. 5, p. 314-319.

Gómez-Lozano N, Trompeter HI, de PR, Estefanía E, Uhrberg M y Vilches C, 2007. Epigenetic silencing of potentially functional KIR2DL5 alleles: Implications for the acquisition of KIR repertoires by NK cells: *Eur.J.Immunol.*, v. 37, no. 7, p. 1954-1965.

González-Galarza FF, Christmas S, Middleton D y Jones AR, 2011. Allele frequency net: a database and online repository for immune gene frequencies in worldwide populations: *Nucleic Acids Res.*, v. 39, no. Database issue, p. D913-D919.

Goodridge JP, Burian A, Lee N y Geraghty DE, 2010. HLA-F complex without peptide binds to MHC class I protein in the open conformer form: *J.Immunol.*, v. 184, no. 11, p. 6199-6208.

Goodridge JP, Burian A, Lee N y Geraghty DE, 2013. HLA-F and MHC class I open conformers are ligands for NK cell Ig-like receptors: *J.Immunol.*, v. 191, no. 7, p. 3553-3562.

Goodridge JP, Lathbury LJ, Steiner NK, Shulse CN, Pullikotil P, Seidah NG et al., 2007. Three common alleles of KIR2DL4 (CD158d) encode constitutively expressed, inducible and secreted receptors in NK cells: *Eur.J.Immunol.*, v. 37, no. 1, p. 199-211.

Goodridge JP, Witt CS, Christiansen FT y Warren HS, 2003. KIR2DL4 (CD158d) genotype influences expression and function in NK cells: *J.Immunol.*, v. 171, no. 4, p. 1768-1774.

Gourraud PA, Meenagh A, Cambon-Thomsen A y Middleton D, 2010. Linkage disequilibrium organization of the human KIR superlocus: implications for KIR data analyses: *Immunogenetics*, v. 62, no. 11-12, p. 729-740.

Graef T, Moesta AK, Norman PJ, bi-Rached L, Vago L, Older Aguilar AM et al., 2009. KIR2DS4 is a product of gene conversion with KIR3DL2 that introduced specificity for HLA-A\*11 while diminishing avidity for HLA-C: *J.Exp.Med.*, v. 206, no. 11, p. 2557-2572.

Grundemann C, Bauer M, Schweier O, von ON, Lassing U, Saudan P et al., 2006. Cutting edge: identification of E-cadherin as a ligand for the murine killer cell lectin-like receptor G1: *J.Immunol.*, v. 176, no. 3, p. 1311-1315.

- Guethlein LA, Older Aguilar AM, bi-Rached L y Parham P, 2007. Evolution of killer cell Ig-like receptor (KIR) genes: definition of an orangutan KIR haplotype reveals expansion of lineage III KIR associated with the emergence of MHC-C: *J.Immunol.*, v. 179, no. 1, p. 491-504.
- Gumà M, Angulo A, Vilches C, Gómez-Lozano N, Malats N y López-Botet M, 2004. Imprint of human cytomegalovirus infection on the NK cell receptor repertoire: *Blood*, v. 104, no. 12, p. 3664-3671.
- Gumperz JE, Litwin V, Phillips JH, Lanier LL y Parham P, 1995. The Bw4 public epitope of HLA-B molecules confers reactivity with natural killer cell clones that express NKB1, a putative HLA receptor: *J.Exp.Med.*, v. 181, no. 3, p. 1133-1144.
- Guthmann MD, Tal M y Pecht I, 1995. A secretion inhibitory signal transduction molecule on mast cells is another C-type lectin: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 92, no. 20, p. 9397-9401.
- Hanke T, Corral L, Vance RE y Raulet DH, 1998. 2F1 antigen, the mouse homolog of the rat "mast cell function-associated antigen", is a lectin-like type II transmembrane receptor expressed by natural killer cells: *Eur.J.Immunol.*, v. 28, no. 12, p. 4409-4417.
- Hansasuta P, Dong T, Thananchai H, Weekes M, Willberg C, Aldemir H et al., 2004. Recognition of HLA-A3 and HLA-A11 by KIR3DL2 is peptide-specific: *Eur.J.Immunol.*, v. 34, no. 6, p. 1673-1679.
- Hiby SE, Walker JJ, O'shaughnessy KM, Redman CW, Carrington M, Trowsdale J et al., 2004. Combinations of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success: *J.Exp.Med.*, v. 200, no. 8, p. 957-965.
- Hilton DJ, Watowich SS, Katz L y Lodish HF, 1996. Saturation mutagenesis of the WSXWS motif of the erythropoietin receptor: *J.Biol.Chem.*, v. 271, no. 9, p. 4699-4708.
- Hilton HG, Guethlein LA, Goyos A, Nemat-Gorgani N, Bushnell DA, Norman PJ et al., 2015. Polymorphic HLA-C Receptors Balance the Functional Characteristics of KIR Haplotypes: *J.Immunol.*, v. 195, no. 7, p. 3160-3170.
- Hou L, Chen M, Jiang B, Wu D, Ng J y Hurley CK, 2010. Thirty allele-level haplotypes centered around KIR2DL5 define the diversity in an African American population: *Immunogenetics*, v. 62, no. 8, p. 491-498.
- Hou L, Chen M, Ng J y Hurley CK, 2012. Conserved KIR allele-level haplotypes are altered by microvariation in individuals with European ancestry: *Genes Immun.*, v. 13, no. 1, p. 47-58.
- Houchins JP, Lanier LL, Niemi EC, Phillips JH y Ryan JC, 1997. Natural killer cell cytolytic activity is inhibited by NKG2-A and activated by NKG2-C: *J.Immunol.*, v. 158, no. 8, p. 3603-3609.
- Hsu KC, Chida S, Geraghty DE y Dupont B, 2002a. The killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genomic region: gene-order, haplotypes and allelic polymorphism: *Immunol.Rev.*, v. 190, p. 40-52.

Hsu KC, Liu XR, Selvakumar A, Mickelson E, O'Reilly RJ y Dupont B, 2002b. Killer Ig-like receptor haplotype analysis by gene content: evidence for genomic diversity with a minimum of six basic framework haplotypes, each with multiple subsets: *J.Immunol.*, v. 169, no. 9, p. 5118-5129.

Ito M, Maruyama T, Saito N, Koganei S, Yamamoto K y Matsumoto N, 2006. Killer cell lectin-like receptor G1 binds three members of the classical cadherin family to inhibit NK cell cytotoxicity: *J.Exp.Med.*, v. 203, no. 2, p. 289-295.

Jiang W, Johnson C, Jayaraman J, Simecek N, Noble J, Moffatt MF et al., 2012. Copy number variation leads to considerable diversity for B but not A haplotypes of the human KIR genes encoding NK cell receptors: *Genome Res.*, v. 22, no. 10, p. 1845-1854.

Joncker NT, Shifrin N, Delebecque F y Raulot DH, 2010. Mature natural killer cells reset their responsiveness when exposed to an altered MHC environment: *J.Exp.Med.*, v. 207, no. 10, p. 2065-2072.

Jordan M, Schallhorn A y Wurm FM, 1996. Transfecting mammalian cells: optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation: *Nucleic Acids Res.*, v. 24, no. 4, p. 596-601.

Karre K, Ljunggren HG, Piontek G y Kiessling R, 1986. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy: *Nature*, v. 319, no. 6055, p. 675-678.

Khakoo SI y Carrington M, 2006. KIR and disease: a model system or system of models?: *Immunol.Rev.*, v. 214, p. 186-201.

Kiessling R, Klein E, Pross H y Wigzell H, 1975. "Natural" killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell: *Eur.J.Immunol.*, v. 5, no. 2, p. 117-121.

Kievits F y Ivanyi P, 1987. Monomorphic anti-HLA monoclonal antibody (W6/32) recognizes polymorphic H-2 heavy-chain determinants exposed by association with bovine or human but not murine beta 2-microglobulin: *Hum.Immunol.*, v. 20, no. 2, p. 115-126.

Kikuchi-Maki A, Catina TL y Campbell KS, 2005. Cutting edge: KIR2DL4 transduces signals into human NK cells through association with the Fc receptor gamma protein: *J.Immunol.*, v. 174, no. 7, p. 3859-3863.

Kim S, Poursine-Laurent J, Truscott SM, Lybarger L, Song YJ, Yang L et al., 2005. Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules: *Nature*, v. 436, no. 7051, p. 709-713.

Lanier LL, 1998. NK cell receptors: *Annu.Rev.Immunol.*, v. 16, p. 359-393.

Lanier LL, 2005. NK cell recognition: *Annu.Rev.Immunol.*, v. 23, p. 225-274.

Lanier LL, Le AM, Civin CI, Loken MR y Phillips JH, 1986. The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes: *J.Immunol.*, v. 136, no. 12, p. 4480-4486.

Le Page ME, Goodridge JP, John E, Christiansen FT y Witt CS, 2014. Killer Ig-like receptor 2DL4 does not mediate NK cell IFN-gamma responses to soluble HLA-G preparations: *J.Immunol.*, v. 192, no. 2, p. 732-740.

Lebbink RJ, de RT, Adelmeijer J, Brenkman AB, van Helvoort JM, Koch M et al., 2006. Collagens are functional, high affinity ligands for the inhibitory immune receptor LAIR-1: *J.Exp.Med.*, v. 203, no. 6, p. 1419-1425.

Lee N y Geraghty DE, 2003. HLA-F surface expression on B cell and monocyte cell lines is partially independent from tapasin and completely independent from TAP: *J.Immunol.*, v. 171, no. 10, p. 5264-5271.

Lee N, Ishitani A y Geraghty DE, 2010. HLA-F is a surface marker on activated lymphocytes: *Eur.J.Immunol.*, v. 40, no. 8, p. 2308-2318.

Lee N, Llano M, Carretero M, Ishitani A, Navarro F, Lopez-Botet M et al., 1998. HLA-E is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2A: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 95, no. 9, p. 5199-5204.

Lewontin RC, 1964. The Interaction of Selection and Linkage. I. General Considerations; Heterotic Models: *Genetics*, v. 49, no. 1, p. 49-67.

Lewontin RC y Dunn LC, 1960. The Evolutionary Dynamics of a Polymorphism in the House Mouse: *Genetics*, v. 45, no. 6, p. 705-722.

Li Y y Mariuzza RA, 2014. Structural basis for recognition of cellular and viral ligands by NK cell receptors: *Front Immunol.*, v. 5, p. 123.

Liu J, Xiao Z, Ko HL, Shen M y Ren EC, 2014. Activating killer cell immunoglobulin-like receptor 2DS2 binds to HLA-A\*11: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 111, no. 7, p. 2662-2667.

Ljunggren HG, Stam NJ, Ohlen C, Neeffjes JJ, Hoglund P, Heemels MT et al., 1990. Empty MHC class I molecules come out in the cold: *Nature*, v. 346, no. 6283, p. 476-480.

López-Botet M, Pérez-Villar JJ, Carretero M, Rodríguez A, Melero I, Bellón T et al., 1997. Structure and function of the CD94 C-type lectin receptor complex involved in recognition of HLA class I molecules: *Immunol.Rev.*, v. 155, p. 165-174.

Markel G, Wolf D, Hanna J, Gazit R, Goldman-Wohl D, Lavy Y et al., 2002. Pivotal role of CEACAM1 protein in the inhibition of activated decidual lymphocyte functions: *J.Clin.Invest*, v. 110, no. 7, p. 943-953.

Marras F, Bozzano F, Ascierio ML y De MA, 2014. Baseline and Dynamic Expression of Activating NK Cell Receptors in the Control of Chronic Viral Infections: The Paradigm of HIV-1 and HCV: *Front Immunol.*, v. 5, p. 305.

- Marsh SG, Parham P, Dupont B, Geraghty DE, Trowsdale J, Middleton D et al., 2003. Killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) nomenclature report, 2002: *Tissue Antigens*, v. 62, no. 1, p. 79-86.
- Martin AM, Freitas EM, Witt CS y Christiansen FT, 2000. The genomic organization and evolution of the natural killer immunoglobulin-like receptor (KIR) gene cluster: *Immunogenetics*, v. 51, no. 4-5, p. 268-280.
- Martin MP, Bashirova A, Traherne J, Trowsdale J y Carrington M, 2003. Cutting edge: expansion of the KIR locus by unequal crossing over: *J.Immunol.*, v. 171, no. 5, p. 2192-2195.
- Martin MP, Gao X, Lee JH, Nelson GW, Detels R, Goedert JJ et al., 2002. Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS: *Nat.Genet.*, v. 31, no. 4, p. 429-434.
- Martin MP, Qi Y, Gao X, Yamada E, Martin JN, Pereyra F et al., 2007. Innate partnership of HLA-B and KIR3DL1 subtypes against HIV-1: *Nat.Genet.*, v. 39, no. 6, p. 733-740.
- Maxwell LD, Williams F, Gilmore P, Meenagh A y Middleton D, 2004. Investigation of killer cell immunoglobulin-like receptor gene diversity: II. KIR2DS4: *Hum.Immunol.*, v. 65, no. 6, p. 613-621.
- McQueen KL, Dorigi KM, Guethlein LA, Wong R, Sanjanwala B y Parham P, 2007. Donor-recipient combinations of group A and B KIR haplotypes and HLA class I ligand affect the outcome of HLA-matched, sibling donor hematopoietic cell transplantation: *Hum.Immunol.*, v. 68, no. 5, p. 309-323.
- Meyaard L, Adema GJ, Chang C, Woollatt E, Sutherland GR, Lanier LL et al., 1997. LAIR-1, a novel inhibitory receptor expressed on human mononuclear leukocytes: *Immunity.*, v. 7, no. 2, p. 283-290.
- Michel T, Poli A, Cuapio A, Briquemont B, Iserentant G, Ollert M et al., 2016. Human CD56bright NK Cells: An Update: *J.Immunol.*, v. 196, no. 7, p. 2923-2931.
- Middleton D, González A y Gilmore PM, 2007. Studies on the expression of the deleted KIR2DS4\*003 gene product and distribution of KIR2DS4 deleted and nondeleted versions in different populations: *Hum.Immunol.*, v. 68, no. 2, p. 128-134.
- Middleton D y González F, 2010. The extensive polymorphism of KIR genes: *Immunology*, v. 129, no. 1, p. 8-19.
- Moesta AK, Graef T, bi-Rached L, Older Aguilar AM, Guethlein LA y Parham P, 2010. Humans differ from other hominids in lacking an activating NK cell receptor that recognizes the C1 epitope of MHC class I: *J.Immunol.*, v. 185, no. 7, p. 4233-4237.
- Moesta AK, Norman PJ, Yawata M, Yawata N, Gleimer M y Parham P, 2008. Synergistic polymorphism at two positions distal to the ligand-binding site makes KIR2DL2 a stronger receptor for HLA-C than KIR2DL3: *J.Immunol.*, v. 180, no. 6, p. 3969-3979.

- Moffett-King A, 2002. Natural killer cells and pregnancy: *Nat.Rev.Immunol.*, v. 2, no. 9, p. 656-663.
- Moradi S, Berry R, Pymm P, Hitchen C, Beckham SA, Wilce MC et al., 2015. The structure of the atypical killer cell immunoglobulin-like receptor, KIR2DL4: *J.Biol.Chem.*, v. 290, no. 16, p. 10460-10471.
- Moraru M, Cisneros E, Gómez-Lozano N, de PR, Portero F, Cañizares M et al., 2012. Host genetic factors in susceptibility to herpes simplex type 1 virus infection: contribution of polymorphic genes at the interface of innate and adaptive immunity: *J.Immunol.*, v. 188, no. 9, p. 4412-4420.
- Mulrooney TJ, Hou L, Steiner NK, Chen M, Belle I, Ng J et al., 2008. Promoter variants of KIR2DL5 add to diversity and may impact gene expression: *Immunogenetics*, v. 60, no. 6, p. 287-294.
- Navarro F, Llano M, Bellón T, Colonna M, Geraghty DE y López-Botet M, 1999. The ILT2(LIR1) and CD94/NKG2A NK cell receptors respectively recognize HLA-G1 and HLA-E molecules co-expressed on target cells: *Eur.J.Immunol.*, v. 29, no. 1, p. 277-283.
- Niokou D, Spyropoulou-Vlachou M, Darlamitsou A y Stavropoulos-Giokas C, 2003. Distribution of killer cell immunoglobulin-like receptors in the Greek population: *Hum.Immunol.*, v. 64, no. 12, p. 1167-1176.
- Norman PJ, bi-Rached L, Gendzekhadze K, Hammond JA, Moesta AK, Sharma D et al., 2009. Meiotic recombination generates rich diversity in NK cell receptor genes, alleles, and haplotypes: *Genome Res.*, v. 19, no. 5, p. 757-769.
- Norman PJ, bi-Rached L, Gendzekhadze K, Korbel D, Gleimer M, Rowley D et al., 2007. Unusual selection on the KIR3DL1/S1 natural killer cell receptor in Africans: *Nat.Genet.*, v. 39, no. 9, p. 1092-1099.
- Norman PJ, Carrington CV, Byng M, Maxwell LD, Curran MD, Stephens HA et al., 2002. Natural killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) locus profiles in African and South Asian populations: *Genes Immun.*, v. 3, no. 2, p. 86-95.
- Norman PJ, Stephens HA, Verity DH, Chandanayingyong D y Vaughan RW, 2001. Distribution of natural killer cell immunoglobulin-like receptor sequences in three ethnic groups: *Immunogenetics*, v. 52, no. 3-4, p. 195-205.
- O'Connor GM, Guinan KJ, Cunningham RT, Middleton D, Parham P y Gardiner CM, 2007. Functional polymorphism of the KIR3DL1/S1 receptor on human NK cells: *J.Immunol.*, v. 178, no. 1, p. 235-241.
- Olcese L, Cambiaggi A, Semenzato G, Bottino C, Moretta A y Vivier E, 1997. Human killer cell activatory receptors for MHC class I molecules are included in a multimeric complex expressed by natural killer cells: *J.Immunol.*, v. 158, no. 11, p. 5083-5086.
- Ordóñez D, Gómez-Lozano N, Rosales L y Vilches C, 2011. Molecular characterisation of KIR2DS2\*005, a fusion gene associated with a shortened KIR haplotype: *Genes Immun.*, v. 12, no. 7, p. 544-551.

- Ordóñez D, Meenagh A, Gómez-Lozano N, Castaño J, Middleton D y Vilches C, 2008. Duplication, mutation and recombination of the human orphan gene KIR2DS3 contribute to the diversity of KIR haplotypes: *Genes Immun.*, v. 9, no. 5, p. 431-437.
- Ordóñez D, Moraru M, Gómez-Lozano N, Cisneros E y Vilches C, 2012. KIR typing by non-sequencing methods: polymerase-chain reaction with sequence-specific primers: *Methods Mol.Biol.*, v. 882, p. 415-430.
- Ordóñez D, Sánchez AJ, Martínez-Rodríguez JE, Cisneros E, Ramil E, Romo N et al., 2009. Multiple sclerosis associates with LILRA3 deletion in Spanish patients: *Genes Immun.*, v. 10, no. 6, p. 579-585.
- Pando MJ, Gardiner CM, Gleimer M, McQueen KL y Parham P, 2003. The protein made from a common allele of KIR3DL1 (3DL1\*004) is poorly expressed at cell surfaces due to substitution at positions 86 in Ig domain 0 and 182 in Ig domain 1: *J.Immunol.*, v. 171, no. 12, p. 6640-6649.
- Parham P, 2005. MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival: *Nat.Rev.Immunol.*, v. 5, no. 3, p. 201-214.
- Pavlova Y, Kolesar L, Striz I, Jabor A y Slavcev A, 2008. Distribution of KIR genes in the Czech population: *Int.J.Immunogenet.*, v. 35, no. 1, p. 57-61.
- Pende D, Biassoni R, Cantoni C, Verdiani S, Falco M, di DC et al., 1996. The natural killer cell receptor specific for HLA-A allotypes: a novel member of the p58/p70 family of inhibitory receptors that is characterized by three immunoglobulin-like domains and is expressed as a 140-kD disulphide-linked dimer: *J.Exp.Med.*, v. 184, no. 2, p. 505-518.
- Perussia B, Trinchieri G, Jackson A, Warner NL, Faust J, Rumpold H et al., 1984. The Fc receptor for IgG on human natural killer cells: phenotypic, functional, and comparative studies with monoclonal antibodies: *J.Immunol.*, v. 133, no. 1, p. 180-189.
- Ponte M, Cantoni C, Biassoni R, Tradori-Cappai A, Bentivoglio G, Vitale C et al., 1999. Inhibitory receptors sensing HLA-G1 molecules in pregnancy: decidua-associated natural killer cells express LIR-1 and CD94/NKG2A and acquire p49, an HLA-G1-specific receptor: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 96, no. 10, p. 5674-5679.
- Pontikos N, Smyth DJ, Schuilenburg H, Howson JM, Walker NM, Burren OS et al., 2014. A hybrid qPCR/SNP array approach allows cost efficient assessment of KIR gene copy numbers in large samples: *BMC.Genomics*, v. 15, p. 274.
- Presnell SR, Zhang L, Chlebowy CN, Al-Attar A y Lutz CT, 2012. Differential transcription factor use by the KIR2DL4 promoter under constitutive and IL-2/15-treated conditions: *J.Immunol.*, v. 188, no. 9, p. 4394-4404.
- Pyo CW, Guethlein LA, Vu Q, Wang R, bi-Rached L, Norman PJ et al., 2010. Different patterns of evolution in the centromeric and telomeric regions of group A and B haplotypes of the human killer cell Ig-like receptor locus: *PLoS.One.*, v. 5, no. 12, p. e15115.

- Pyo CW, Wang R, Vu Q, Cereb N, Yang SY, Duh FM et al., 2013. Recombinant structures expand and contract inter and intragenic diversification at the KIR locus: *BMC.Genomics*, v. 14, p. 89.
- Rajagopalan S, 2010. Endosomal signaling and a novel pathway defined by the natural killer receptor KIR2DL4 (CD158d): *Traffic.*, v. 11, no. 11, p. 1381-1390.
- Rajagopalan S, Bryceson YT, Kuppasamy SP, Geraghty DE, van der MA, Joosten I et al., 2006. Activation of NK cells by an endocytosed receptor for soluble HLA-G: *PLoS.Biol.*, v. 4, no. 1, p. e9.
- Rajagopalan S y Long EO, 1999. A human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G-specific receptor expressed on all natural killer cells: *J.Exp.Med.*, v. 189, no. 7, p. 1093-1100.
- Rajagopalan S y Long EO, 2005. Understanding how combinations of HLA and KIR genes influence disease: *J.Exp.Med.*, v. 201, no. 7, p. 1025-1029.
- Rajagopalan S y Long EO, 2012. KIR2DL4 (CD158d): An activation receptor for HLA-G: *Front Immunol.*, v. 3, p. 258.
- Rajalingam R, Krausa P, Shilling HG, Stein JB, Balamurugan A, McGinnis MD et al., 2002. Distinctive KIR and HLA diversity in a panel of north Indian Hindus: *Immunogenetics*, v. 53, no. 12, p. 1009-1019.
- Restifo NP, Esquivel F, Kawakami Y, Yewdell JW, Mule JJ, Rosenberg SA et al., 1993. Identification of human cancers deficient in antigen processing: *J.Exp.Med.*, v. 177, no. 2, p. 265-272.
- Roberts CH, Jiang W, Jayaraman J, Trowsdale J, Holland MJ y Traherne JA, 2014. Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor gene linkage and copy number variation analysis by droplet digital PCR: *Genome Med.*, v. 6, no. 3, p. 20.
- Robinson J, Halliwell JA, McWilliam H, Lopez R y Marsh SG, 2013. IPD--the Immuno Polymorphism Database: *Nucleic Acids Res.*, v. 41, no. Database issue, p. D1234-D1240.
- Sambrook JG, Bashirova A, Andersen H, Piatak M, Vernikos GS, Coghill P et al., 2006. Identification of the ancestral killer immunoglobulin-like receptor gene in primates: *BMC.Genomics*, v. 7, p. 209.
- Sanderson S y Shastri N, 1994. LacZ inducible, antigen/MHC-specific T cell hybrids: *Int.Immunol.*, v. 6, no. 3, p. 369-376.
- Santín I, de Nancrales GP, Calvo B, Gaafar A, Castaño L y Bilbao JR, 2006. Killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genes in the Basque population: association study of KIR gene contents with type 1 diabetes mellitus: *Hum.Immunol.*, v. 67, no. 1-2, p. 118-124.
- Santourlidis S, Graffmann N, Christ J y Uhrberg M, 2008. Lineage-specific transition of histone signatures in the killer cell Ig-like receptor locus from hematopoietic progenitor to NK cells: *J.Immunol.*, v. 180, no. 1, p. 418-425.

- Santourlidis S, Trompeter HI, Weinhold S, Eisermann B, Meyer KL, Wernet P et al., 2002. Crucial role of DNA methylation in determination of clonally distributed killer cell Ig-like receptor expression patterns in NK cells: *J.Immunol.*, v. 169, no. 8, p. 4253-4261.
- Sharma D, Bastard K, Guethlein LA, Norman PJ, Yawata N, Yawata M et al., 2009. Dimorphic motifs in D0 and D1+D2 domains of killer cell Ig-like receptor 3DL1 combine to form receptors with high, moderate, and no avidity for the complex of a peptide derived from HIV and HLA-A\*2402: *J.Immunol.*, v. 183, no. 7, p. 4569-4582.
- Shental-Bechor D y Levy Y, 2008. Effect of glycosylation on protein folding: a close look at thermodynamic stabilization: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 105, no. 24, p. 8256-8261.
- Shi FD, Ljunggren HG, La CA y Van KL, 2011. Organ-specific features of natural killer cells: *Nat.Rev.Immunol.*, v. 11, no. 10, p. 658-671.
- Shilling HG, Guethlein LA, Cheng NW, Gardiner CM, Rodriguez R, Tyan D et al., 2002. Allelic polymorphism synergizes with variable gene content to individualize human KIR genotype: *J.Immunol.*, v. 168, no. 5, p. 2307-2315.
- Sierra-Filardi E, Estechea A, Samaniego R, Fernandez-Ruiz E, Colmenares M, Sanchez-Mateos P et al., 2010. Epitope mapping on the dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing non-integrin (DC-SIGN) pathogen-attachment factor: *Mol.Immunol.*, v. 47, no. 4, p. 840-848.
- Sivori S, Falco M, Carlomagno S, Romeo E, Soldani C, Bensussan A et al., 2010. A novel KIR-associated function: evidence that CpG DNA uptake and shuttling to early endosomes is mediated by KIR3DL2: *Blood*, v. 116, no. 10, p. 1637-1647.
- Smith KM, Wu J, Bakker AB, Phillips JH y Lanier LL, 1998. Ly-49D and Ly-49H associate with mouse DAP12 and form activating receptors: *J.Immunol.*, v. 161, no. 1, p. 7-10.
- Steinle A, Li P, Morris DL, Groh V, Lanier LL, Strong RK et al., 2001. Interactions of human NKG2D with its ligands MICA, MICB, and homologs of the mouse RAE-1 protein family: *Immunogenetics*, v. 53, no. 4, p. 279-287.
- Stephens M y Donnelly P, 2003. A comparison of bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data: *Am.J.Hum.Genet.*, v. 73, no. 5, p. 1162-1169.
- Stephens M, Smith NJ y Donnelly P, 2001. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data: *Am.J.Hum.Genet.*, v. 68, no. 4, p. 978-989.
- Stewart CA, Laugier-Anfossi F, Vely F, Saulquin X, Riedmuller J, Tisserant A et al., 2005. Recognition of peptide-MHC class I complexes by activating killer immunoglobulin-like receptors: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 102, no. 37, p. 13224-13229.
- Taner SB, Pando MJ, Roberts A, Schellekens J, Marsh SG, Malmberg KJ et al., 2011. Interactions of NK cell receptor KIR3DL1\*004 with chaperones and conformation-

specific antibody reveal a functional folded state as well as predominant intracellular retention: *J.Immunol.*, v. 186, no. 1, p. 62-72.

Teasdale RD y Jackson MR, 1996. Signal-mediated sorting of membrane proteins between the endoplasmic reticulum and the golgi apparatus: *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.*, v. 12, p. 27-54.

Thananchai H, Gillespie G, Martin MP, Bashirova A, Yawata N, Yawata M et al., 2007. Cutting Edge: Allele-specific and peptide-dependent interactions between KIR3DL1 and HLA-A and HLA-B: *J.Immunol.*, v. 178, no. 1, p. 33-37.

Toneva M, Lepage V, Lafay G, Dulphy N, Busson M, Lester S et al., 2001. Genomic diversity of natural killer cell receptor genes in three populations: *Tissue Antigens*, v. 57, no. 4, p. 358-362.

Torkar M, Norgate Z, Colonna M, Trowsdale J y Wilson MJ, 1998. Isotypic variation of novel immunoglobulin-like transcript/killer cell inhibitory receptor loci in the leukocyte receptor complex: *Eur.J.Immunol.*, v. 28, no. 12, p. 3959-3967.

Tormo J, Natarajan K, Margulies DH y Mariuzza RA, 1999. Crystal structure of a lectin-like natural killer cell receptor bound to its MHC class I ligand: *Nature*, v. 402, no. 6762, p. 623-631.

Tortorella D, Gewurz BE, Furman MH, Schust DJ y Ploegh HL, 2000. Viral subversion of the immune system: *Annu.Rev.Immunol.*, v. 18, p. 861-926.

Traherne JA, Martin M, Ward R, Ohashi M, Pellett F, Gladman D et al., 2010. Mechanisms of copy number variation and hybrid gene formation in the KIR immune gene complex: *Hum.Mol.Genet.*, v. 19, no. 5, p. 737-751.

Trinchieri G, 1989. Biology of natural killer cells: *Adv.Immunol.*, v. 47, p. 187-376.

Trompeter HI, Gomez-Lozano N, Santourlidis S, Eisermann B, Wernet P, Vilches C et al., 2005. Three structurally and functionally divergent kinds of promoters regulate expression of clonally distributed killer cell Ig-like receptors (KIR), of KIR2DL4, and of KIR3DL3: *J.Immunol.*, v. 174, no. 7, p. 4135-4143.

Trowsdale J, Barten R, Haude A, Stewart CA, Beck S y Wilson MJ, 2001. The genomic context of natural killer receptor extended gene families: *Immunol.Rev.*, v. 181, p. 20-38.

Trundley AE, Hiby SE, Chang C, Sharkey AM, Santourlidis S, Uhrberg M et al., 2006. Molecular characterization of KIR3DL3: *Immunogenetics*, v. 57, no. 12, p. 904-916.

Uhrberg M, Parham P y Wernet P, 2002. Definition of gene content for nine common group B haplotypes of the Caucasoid population: KIR haplotypes contain between seven and eleven KIR genes: *Immunogenetics*, v. 54, no. 4, p. 221-229.

Uhrberg M, Valiante NM, Shum BP, Shilling HG, Lienert-Weidenbach K, Corliss B et al., 1997. Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes: *Immunity.*, v. 7, no. 6, p. 753-763.

Valiante NM, Uhrberg M, Shilling HG, Lienert-Weidenbach K, Arnett KL, D'Andrea A et al., 1997. Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors: *Immunity.*, v. 7, no. 6, p. 739-751.

vanBergen J., Stewart CA, van den Elsen PJ y Trowsdale J, 2005. Structural and functional differences between the promoters of independently expressed killer cell Ig-like receptors: *Eur.J.Immunol.*, v. 35, no. 7, p. 2191-2199.

VandenBussche CJ, Dakshanamurthy S, Posch PE y Hurley CK, 2006. A single polymorphism disrupts the killer Ig-like receptor 2DL2/2DL3 D1 domain: *J.Immunol.*, v. 177, no. 8, p. 5347-5357.

VandenBussche CJ, Mulrooney TJ, Frazier WR, Dakshanamurthy S y Hurley CK, 2009. Dramatically reduced surface expression of NK cell receptor KIR2DS3 is attributed to multiple residues throughout the molecule: *Genes Immun.*, v. 10, no. 2, p. 162-173.

Vidal-Castiñeira JR, López-Vázquez A, Martínez-Borra J, Martínez-Cambor P, Prieto J, López-Rodríguez R et al., 2014. Diversity of killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genotypes and KIR2DL2/3 variants in HCV treatment outcome: *PLoS.One.*, v. 9, no. 6, p. e99426.

Vierra-Green C, Roe D, Hou L, Hurley CK, Rajalingam R, Reed E et al., 2012. Allele-level haplotype frequencies and pairwise linkage disequilibrium for 14 KIR loci in 506 European-American individuals: *PLoS.One.*, v. 7, no. 11, p. e47491.

Vilches C, Castaño J, Gómez-Lozano N y Estefanía E, 2007. Facilitation of KIR genotyping by a PCR-SSP method that amplifies short DNA fragments: *Tissue Antigens*, v. 70, no. 5, p. 415-422.

Vilches C, Gardiner CM y Parham P, 2000a. Gene structure and promoter variation of expressed and nonexpressed variants of the KIR2DL5 gene: *J.Immunol.*, v. 165, no. 11, p. 6416-6421.

Vilches C, Pando MJ y Parham P, 2000b. Genes encoding human killer-cell Ig-like receptors with D1 and D2 extracellular domains all contain untranslated pseudoexons encoding a third Ig-like domain: *Immunogenetics*, v. 51, no. 8-9, p. 639-646.

Vilches C y Parham P, 2002. KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity: *Annu.Rev.Immunol.*, v. 20, p. 217-251.

Vilches C, Rajalingam R, Uhrberg M, Gardiner CM, Young NT y Parham P, 2000c. KIR2DL5, a novel killer-cell receptor with a D0-D2 configuration of Ig-like domains: *J.Immunol.*, v. 164, no. 11, p. 5797-5804.

Wagtman N, Rajagopalan S, Winter CC, Peruzzi M y Long EO, 1995. Killer cell inhibitory receptors specific for HLA-C and HLA-B identified by direct binding and by functional transfer: *Immunity.*, v. 3, no. 6, p. 801-809.

Wilson MJ, Torkar M, Haude A, Milne S, Jones T, Sheer D et al., 2000. Plasticity in the organization and sequences of human KIR/ILT gene families: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 97, no. 9, p. 4778-4783.

Wilson MJ, Torkar M y Trowsdale J, 1997. Genomic organization of a human killer cell inhibitory receptor gene: *Tissue Antigens*, v. 49, no. 6, p. 574-579.

Winter CC, Gumperz JE, Parham P, Long EO y Wagtmann N, 1998. Direct binding and functional transfer of NK cell inhibitory receptors reveal novel patterns of HLA-C allotype recognition: *J.Immunol.*, v. 161, no. 2, p. 571-577.

Winter CC y Long EO, 1997. A single amino acid in the p58 killer cell inhibitory receptor controls the ability of natural killer cells to discriminate between the two groups of HLA-C allotypes: *J.Immunol.*, v. 158, no. 9, p. 4026-4028.

Winter CC y Long EO, 2000. Binding of soluble KIR-Fc fusion proteins to HLA class I: *Methods Mol.Biol.*, v. 121, p. 239-250.

Yawata M, Yawata N, bi-Rached L y Parham P, 2002a. Variation within the human killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) gene family: *Crit Rev.Immunol.*, v. 22, no. 5-6, p. 463-482.

Yawata M, Yawata N, McQueen KL, Cheng NW, Guethlein LA, Rajalingam R et al., 2002b. Predominance of group A KIR haplotypes in Japanese associated with diverse NK cell repertoires of KIR expression: *Immunogenetics*, v. 54, no. 8, p. 543-550.

Yu J, Freud AG y Caligiuri MA, 2013. Location and cellular stages of natural killer cell development: *Trends Immunol.*, v. 34, no. 12, p. 573-582.



**Anexo**

---



Parte de los resultados de esta tesis se recogen en las siguientes publicaciones:

1. **Cisneros E**, Estefanía E, Vilches C. Allelic polymorphism determines surface expression or intracellular retention of the human NK cell receptor KIR2DL5A (CD158f). *J Immunol. Manuscrito enviado.*

2. **Cisneros E\***, Moraru M\*, Gómez-Lozano N, López-Botet M and Vilches C. (\*These authors contributed equally to this work). KIR2DL5: an orphan inhibitory receptor displaying complex patterns of polymorphism and expression. *Frontiers Immunology* 2012 3:289.

Además, el trabajo realizado durante este periodo de formación postgrado se ha materializado en una serie de publicaciones que se recogen en el siguiente listado:

3. de la Fuente S, Citores MJ, Duca A, **Cisneros E**, Baños I, Vilches C, Cuervas-Mons V. Interleukin-28B TT genotype is frequently found in patients with hepatitis C virus cirrhosis but does not influence hepatocarcinogenesis. *Clin Exp Med.* 2016 Apr 15.

4. Muntasell A, Pupuleku A, **Cisneros E**, Vera A, Moraru M, Vilches C, López-Botet M. Relationship of NKG2C Copy Number with the Distribution of Distinct Cytomegalovirus-Induced Adaptive NK Cell Subsets. *J Immunol.* 2016 May 1;196(9):3818-27.

5. Duca AM, de la Fuente S, Citores MJ, Cuenca AB, **Cisneros E**, Escamilla N, Baños I, Vilches C, Cuervas-Mons V. CC genotype at rs12979860 of IL28B is associated with lower risk of new-onset diabetes after transplantation in adult patients with liver transplantation for hepatitis C cirrhosis. *Transplant Proc.* 2014 Nov;46(9):3114-6.

6. Moraru M, Yebra-Bango M, **Cisneros E**, Mellor S, Tutor P, Díaz-Espada F. Cryofibrinogenemia triggered by a monoclonal paraprotein successfully treated with cyclophosphamide. *J Clin Rheumatol.* 2014 Jan;20(1):34-7.

7. **Cisneros E**, Martínez-Pomar N, Vilches M, Martín P, de Pablo R, Nuñez Del Prado N, Nieto A, Matamoros N, Moraru M, **Vilches C**. Advancing allele group-specific amplification of the complete HLA-C gene-isolation of novel alleles from three allele groups (C\*04, C\*07 and C\*08). *Tissue Antigens.* 2013 Aug 27.

8. Ordoñez D, Moraru M, Gómez-Lozano N, **Cisneros E**, Vilches C. KIR typing by non-sequencing methods: polymerase-chain reaction with sequence-specific primers (PCR-SSP). *Methods in Molecular Biology. Immunogenetics* 2012; 882:415-30.

9. **Cisneros E**, Baños I, Citores MJ, Duca A, Salas C, Noblejas A, Cañizares M, Millán I, Cuervas-Mons Valentín, Vilches C. Increased risk of severe HCV recurrence after liver transplantation in patients with a T allele of IL28B rs12979860. *Transplantation* 2012 Aug 15;94(3):275-280.
10. Moraru M, **Cisneros E**, Gómez-Lozano N, de Pablo R, Portero F, Cañizares M, Vaquero M, Roustán G, Millán I, López-Botet M, Vilches C. Host genetic factors in susceptibility to Herpes Simplex Tipe 1 Virus infection: Contribution of polymorphic genes at the interface of innate and adaptative immunity. *Journal of Immunology*. 2012 May 1;188(9):4412-20.
11. Silva J\*, García V\*, Rodriguez M, Compte M, **Cisneros E**, Veguillas P, García JM, Dominguez G, Campos-Martin Y, Cuevas J, Peña C, Herrera M, Díaz R, Mohammed N, Bonilla F. (\*These authors contributed equally to this work). Analysis of exosome release and its prognostic value in human colorectal cancer. *Genes Chromosomes and Cancer*. 2012 Apr;51(4):409-18.
12. **Cisneros E**, Moraru M, de Pablo R, Vilches C. A method for simple and accurate identification of the multiple sclerosis associated allele HLADRB1\*1501 in neuroscience research laboratories. *Journal of Neuroimmunology*. 2010, 225:143-8.
13. Ordóñez D, Sánchez AJ, Martínez-Rodríguez JE, **Cisneros E**, Ramil E, Romo N, Moraru M, Munteis E, López-Botet M, Roquer J, García-Merino A, Vilches C. Multiple sclerosis associates with LILRA3 deletion in Spanish patients. *Genes and Immunity*, 2009. 10: 579-585.