

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Biología Celular (Morfología Microscópica)



**TESIS DOCTORAL**

**Diversidad genética del complejo de receptores leucocitarios. Estudio  
descriptivo y de asociación con la esclerosis múltiple recurrente**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

David Ordóñez del Valle

Director

Carlos Vilches Ruiz

**Madrid, 2013**

# **Universidad Complutense de Madrid**

## **Facultad de Ciencias Biológicas**

Departamento de Biología Celular (Morfología Microscópica)



Tesis Doctoral

## **“Diversidad Genética del Complejo de Receptores Leucocitarios; Estudio Descriptivo y de Asociación con la Esclerosis Múltiple Recurrente”**

Memoria para optar al grado de Doctor presentada por:

**David Ordóñez del Valle**

Dirigida por

**Dr. Carlos Vilches Ruiz**

**Madrid, 2012**







A mis padres

A mi hermano

A Stefi



Esta Tesis ha podido ser elaborada gracias a la financiación por parte de proyectos concedidos por la Fundación LAIR y el Ministerio de Educación y Ciencia (BFU2005–04622).



## ***Abreviaturas***



Apo	Apolipoproteína
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
CD	Cluster Differentiation
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico Complementario
CEACAM	Carcinoembryonic Antigen-related Cell Adhesion Molecule
CNV	Variación en número de copias
D	Dominio tipo Ig
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleótido trifosfato
EBNA-1	EBV encoded nuclear antigen 1
EBV	Virus de Epstein-Barr
EDSS	Expanded Disability Status Scale
EM-PP	Esclerosis Múltiple Primaria Progresiva
EM-R	Esclerosis Múltiple Recurrente
EM-RR	Esclerosis Múltiple Recurrente-Remitente
EM-SP	Esclerosis Múltiple Secundaria Progresiva
FcRn	Receptor neonatal del fragmento cristalizable de la Ig G
Fc $\alpha$ R	Receptor del fragmento cristalizable de la Ig A
Fc $\epsilon$ R $\gamma$	Subunidad $\gamma$ del receptor del fragmento cristalizable de la Ig E
GPVI	Glicoproteína VI
GWAS	Genome Wide Association Studies
HC	Healthy Controls
hCMV	Human Citomegalovirus
HLA	Human Leukocyte Antigen
IFN- $\beta$	Interferón $\beta$
Ig	Inmunoglobulina
IL2RA	Cadena $\alpha$ del receptor de la Interleuquina 2
IL7R	Receptor de la Interleuquina 7
ILT	Ig-like Transcript
IPC	Internal positive control
IPD-KIR	Immuno Polymorphysm Database (KIR)
ITAM	Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif
ITIM	Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motifs
Kb	Kilobases
KDa	KiloDaltons
KIR	Killer-cell Ig-like Receptors
LAIR	Leukocyte Associated Ig-like Receptors
LD	Desequilibrio de Ligamiento
LILR	Leukocyte Ig-like Receptors
LILRA3-del	Forma delecionada del Leukocyte Ig-like Receptor member A3

LIR	Leukocyte Inhibitory Receptor
LRC	Complejo de Receptores Leucocitario
Mb	Megabases
mDC	Células dendríticas mieloides
MHC	Major Histocompatibility Complex
MIC	<u>M</u> H C class <u>I</u> chain related proteins
MIR	Monocyte Inhibitory Receptor
moDC	Células dendríticas derivadas de monocitos
MSSS	Multiple Sclerosis Severity Score
NCAM	neural cell adhesion molecule
NCR	Natural Cytotoxicity Receptor
NK	Natural Killer
OR	Odds Ratio
OSCAR	Osteoclast-Associated Receptor
pb	Pares de bases
PBMCs	Células mononucleares de sangre periférica
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pDC	Células dendríticas plasmacitoides
PI3K	Fosfatidilinositol-3 quinasa
PSG	Pregnancy - Specific Glycoproteins
RE	Retículo Endoplásmico
SIGLEC	Sialic acid binding Ig-like lectins
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Single Nucleotide Polymorphysm
SSOP	Sequence-specific oligonucleotide probe
SSP	Sequence-specific primer
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
TLR	Toll Like Receptors
UCLA	Universidad de California - Los Ángeles
UV-B	Radiación ultravioleta B





## ***Índice***



<b>Agradecimientos .....</b>	<b>1</b>
<b>Introducción .....</b>	<b>11</b>
1. Complejo de Receptores Leucocitarios .....	13
1.1) DAP1/12.....	13
1.2) CD66/PSG .....	14
1.3) FcGRT .....	15
1.4) SIGLEC (Sialic acid binding Ig-like lectins) .....	15
1.5) OSCAR (Osteoclast-Associated Receptor).....	15
1.6) LILR - LAIR – KIR .....	16
1.7) Fc $\alpha$ R (CD89).....	16
1.8) NKp46 (Natural Cytotoxicity Receptor I, NCR-I).....	16
1.9) GPVI (glicoproteína VI) .....	17
2. Leukocyte Ig-like Receptors (LILR) .....	17
2.1) Genética del Complejo LILR .....	17
2.2) Estructura y Función de los LILR .....	18
2.3) LILRA3 .....	19
2.3.1) Genética de LILRA3 .....	19
2.3.2) Estructura y función .....	20
2.3.3) Diversidad de LILRA3.....	20
3. Killer-cell Ig-like Receptors (KIR).....	22
3.1) Estructura y nomenclatura de los KIR .....	23
3.2) Función de los KIR .....	23
3.3) Ligandos .....	25
3.4) Regulación de la expresión de los KIR .....	26
3.5) Organización del Complejo KIR .....	27
3.5.1) Genes KIR.....	27
3.5.2) Haplotipos KIR .....	28
3.5.3) Polimorfismo alélico .....	29
3.5.4) Generación de la variabilidad en los haplotipos KIR .....	30
3.6) KIR y Enfermedad.....	31
3.7) <i>KIR2DS3</i> .....	32
3.8) <i>KIR2DS2*005</i> .....	32

4. Esclerosis Múltiple.....	33
4.1) Formas clínicas y seguimiento de la Esclerosis Múltiple .....	33
4.2) Factores asociados al riesgo de desarrollar Esclerosis Múltiple .....	35
4.2.1) Factores ambientales.....	35
4.2.2) Factores genéticos .....	36
4.3) Esclerosis Múltiple y Células NK .....	38
<b>Objetivos.....</b>	<b>41</b>
<b>Publicaciones.....</b>	<b>47</b>
1. Duplication, mutation and recombination of the human orphan gene KIR2DS3 contribute to the diversity of KIR haplotypes .....	49
2. The 5' intergenic, promoter, pseudoexon 3 and complete coding sequences of the hybrid gene KIR2DS3*002 .....	67
3. Molecular characterisation of KIR2DS2*005, a fusion gene associated with a shortened KIR haplotype.....	73
4. Multiple sclerosis associates with LILRA3 deletion in Spanish patients.....	93
5. Allelic diversity of the Leukocyte Immunoglobulin-like Receptor A3 and Multiple Sclerosis .....	111
<b>Discusión.....</b>	<b>137</b>
1. Contribución de <i>KIR2DS3</i> a la variabilidad en el Complejo KIR.....	139
2. Esclerosis Múltiple y diversidad en el LRC .....	143
2.1) Variabilidad en el Complejo KIR.....	143
2.2) Esclerosis Múltiple y LILRA3 .....	144
2.2.1) Deleción de LILRA3 .....	144
2.2.2) Variabilidad alélica de LILRA3.....	146
2.2.3) Deleción de <i>LILRA3</i> y la variabilidad en el Complejo KIR en la EM-R .....	146
2.2.4) Posible papel de LILRA3 en la EM-R.....	147
<b>Conclusiones.....</b>	<b>153</b>
<b>Referencias .....</b>	<b>157</b>





# ***Agradecimientos***

*“No conozco a la mitad de ustedes ni la mitad de lo que querría,  
y lo que yo querría es menos de la mitad de lo que la mitad de ustedes merece”*

**Bilbo Bolsón**



Tras analizar exhaustivamente la “*Normativa de desarrollo del régimen relativo a elaboración, tribunal, defensa y evaluación de la tesis doctoral, del Real Decreto bla, bla, bla, de la Universidad Complutense de Madrid*” no encontré ninguna referencia acerca de la extensión del apartado de agradecimientos, así que como dijo Josefina al pasar revista al Destacamento de Alabarderos: “Poneos en fila de a uno, que hay para todos”.

El primer agradecimiento que debe ser mencionado en este apartado es para mi Director de Tesis, el Dr. Carlos Vilches. Este corto párrafo se queda pequeño para agradecerle su enorme paciencia y saber hacer al dirigirme en este mundo de la Investigación. Es una de esas personas de las que, sin darte cuenta, vas aprendiendo cada día y te enseña el verdadero significado de “hacer ciencia”. Sin él como Director no hubiese llegado hasta aquí.

La segunda persona es una completa desconocida para la mayoría de los lectores, pero quien está en el origen de todo lo que vais a leer es María Victoria Pello, directora de la academia Mavi de Oviedo, ya que gracias a ella aprobé el BIR. En su momento confió en mí para darme una oportunidad que puede que no mereciese, pero que me permitió dar el primer paso para llegar a lo que es esta Tesis. Por extensión, agradecer la amistad a mis compañeros de Mavi más cercanos, David y Laura, Julián y Laura, Laurita Vinué, Cris y David, Diego, Javi, Nacho Ferrao (el Gallu), Jose Luis, Iñaki, Begoña, Manuel, “Nica” y María, Nisa (Nisaberta para los amigos), Vanesa, Yolanda y el pack de Salamanca, la “monjita”, la “cara-sartén”, la “montaña basura” y muchos más que me dejó en el tintero.

Por supuesto, agradecer al Servicio de Inmunología del Hospital Universitario Puerta de Hierro ( y Majadahonda) por acoger a un asturiano hace ya la friolera de 7 años, a pesar de no entender la mezcla de asturiano y castellano que hablaba en voz inaudible durante los primeros meses (y los siguientes años). Gracias a Fernando Díaz Espada y a Aresio Plaza, Jefe de Servicio y Tutor de Residentes, respectivamente; por su ayuda en mi llegada al Hospital y por estar disponibles para dudas y cuestiones (ya sean inmunológicas, automovilísticas o de otra índole). Agradecer también a Charo de Pablo el ayudarme a entender el mundo del HLA y los cultivos celulares; Luis Álvarez por ayudarme con las citometrías y a conformar el Frente

Asturiano CPH; y a María Moreno y Arantxa por mostrarme el mundillo de la Serología HLA. Si se me puede considerar Inmunólogo es gracias a vosotros.

Pero el Servicio de Inmuno también lo conforman otras gentes de bien, como son todas las técnicas de Laboratorio, Matilde, María José, Helena, Marisa, Mariví, Esperanza, Palmira, Sandra y María Azañedo; y también a la técnico-enfermera Isabel, a quien se le echa mucho de menos en el Servicio y siempre estaba dispuesta a sacarme sangre y organizar cafés. Gracias a todas por hacer tan ameno mi paso por el Hospital. Dejo para el final 2 recuerdos muy especiales, uno a Charo Solís, que fue la primera persona que me vio entrar en Inmuno un lunes 23 de mayo de 2005 a las 7:50 de la mañana y me recibió con esas sabias palabras que decían: “Quién eres y que haces aquí?” Muchísimos ánimos, Charo. El otro recuerdo es para Charo Martín, quien a pesar de no encontrarse ya entre nosotros sigue siendo la técnico de Autoinmunidad. Un beso muy fuerte allá donde estés.

También agradecer a los residentes que me precedieron y me siguieron en el Servicio de Inmunología. A Natalia por explicarme como era el Servicio de Inmuno, convencerme para que lo eligiese (nunca te lo perdonaré, je) y ayudarme a dar los primeros pasos y los últimos en el laboratorio. A Tito por enseñarme tantas cosas de los genes KIR y las charlas científicas... vale y también las deportivas y otras que no se deben comentar aquí. A Susana por compartir pupitre en mi llegada al Servicio y por darme muy buenos consejos. A Marta por ser la mejor R mayor posible (realmente fue la única) y por lo buena persona que es, agradecerle también el haberme enseñado la citometría y cultivos. Y a Mayarí por los buenos ratos que pasamos en el mes y medio que coincidimos.

Ahora vienen las que me siguen. Gracias a Marlene por compartir tantas cosas durante los 2 años que fuimos compañeros; a Manuela por enseñarme que en Rumanía existe una pequeña Galicia (con cariño); a Elisa por amenizar las jornadas laborales con canciones, por llamarlas de alguna manera, que conseguían sacarme de quicio y por su comprensión al explicarle los beneficios fiscales de ser un asturiano en Madrid. Por cierto, sois las únicas personas que conozco que ponen un timer cuenta atrás y se van por ahí de paseo, como si el timer se encargase de recoger sobrenadantes después de estar pitando media hora. A Kelly

porque aunque no lo quiera reconocer es mas rumbera que la Melody y mas Cristiana que Ronaldo; a Karyna por enseñarme que también se pueden preparar PCRs, cargar geles o montar portas escuchando música latina y muchísimas gracias a Natalia por dar un poco de tranquilidad en este nido de residentes desquiciadas. Y por último Águeda, la última incorporación al Servicio, ánimo que la Inmuno no es para tanto. Os quiero a todas, como dijo Napoleón al conocer el servicio de doncellas de Josefina. También recordar a los técnicos de apoyo en el laboratorio de Investigación, Javi, un amante del riesgo que vive a caballo entre laboratorios y aprendices de Fernando Alonso y a María Cañizares, por ponernos firmes con cosas secundarias en la investigación como son el orden, la limpieza... En este apartado entraría también Lizet Rosales, espero que no hayas quedado muy traumatizada tras tu paso por nuestro laboratorio. Está bien saber que tienes una buena amiga al otro lado del charco... En la Riviera Maya, por cierto.

Además, debo agradecer a mis compañeros investigadores del antiguo servicio de Inmuno de la CPH y del nuevo y reluciente Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda en la 3ª planta, que son legión. Los primeros en la lista son los chicos de Luis Álvarez Vallina, los "Vallinas", que diantres. Por orden cronológico, la primera es Laura Sanz, que combina perfectamente el espíritu montañero con el trabajo de laboratorio, también a Ángel, el hombre de 1ª piel blanca como la leche pasteurizada y uperisada y de 2ª piel negra como el tizón. Tu foto con la jarra de sangría en el congreso de Mallorca quedará grabada a fuego en los "anales" de la Ciencia. A David por ser un tipo genial, y también bastante freak, cosas que por ley deberían ser inseparables. A Vanesa de la que se puede decir lo mismo que de David, pero en femenino. Sois 2 compañeros de laboratorio inigualables. A Patricia, la tercera en discordia de mi quinta y que me adelantó por un pelín para llegar a ser Doctor. Muchísima suerte y te deseo todo lo mejor, que te lo mereces. A María, a Marta Sánchez (la pelirroja, no la del grupo "Ole Ole") a Pilar "la Breve". A AnaAlvarezdeCienfuegosSuarezInclan por ser una fuente inagotable de historias y situaciones delirantes a pesar de actuar como una "robamigos" profesional y ser más Mourinhista que Aitor Karanka. A Noelia por los buenos ratos pasados escuchando música decente en el Primavera y en la Santa Sebe. A Irene Guijarro por compartir tantas cosas siempre con una sonrisa en la cara y una carcajada fácil,

así era una gozada hacer chistes. A Rodrigo... te quedas solo, tío, con toda esa marabunta, pero tú puedes con ellas. A Elena, por ser una médico valiente que se adentra en el mundo de la investigación básica y además con esta tropa. A Ana Blanco por los buenos ratos en el laboratorio y en los jueves de cañas. Y a las últimas incorporaciones (y algunas posteriores *excorporaciones*, si se me permite el palabro) Nuria, Irene, Emma y Celia. Se os echará de menos a todos

Los siguientes en la lista son los chicos de “Oncología-como se llame” (últimamente parece que la llaman Onco-Hematología), los “Bonillas”, que diantres también. Muchas gracias a todos: José Miguel, Javi (Macho  $\alpha$ ), Gemma, Vanesa, Cristina, Merce, Irene, Alberto, Marta, Coral y Esther. Me habéis hecho pasar muy buenos ratos en la 3ª planta, en las cenas, en el Vicente Calderón... y vale, también en el karaoke, aunque eso de tomar cognacs a las 7 de la mañana debería estar penado por la ley. Besos para todos y abrazos para todas, ¿o era al revés?

También dar las gracias a la gente de Medicina Interna, las técnicas Concha y Gloria (aunque tengo que confesar que todavía no sé cual es el nombre de cada una, jajaja), a Raquel, María Jesús y Silvia. También a los adjuntos que pasaban alguna vez por allí y que son tan majetes, Pablo Tutor y Susana. Y por ultimo a sus Jefes, el Dr. Vargas y el Dr. Yebra. Habéis sido unos compañeros ideales tanto en “la cueva” del viejo hospital como en “la pecera” del nuevo.

No me olvido de las chicas de Hematología, Nuria, Sara y Belén con quienes había que pelearse un puesto en el antiguo secuenciador hasta que fueron mas listas y se compraron uno de 16 jeringas... Con ese maquinón hubiese acabado la tesis 2 años antes. Un besazo a las 3. Y hablando de secuenciadores, no debo olvidarme de la persona con la que mas conviví en esas labores. No puedo menos que agradecerle a Elvira sus ganas de aprender y, una vez aprendida, su paciencia y eficacia a la hora de procesar y “colgar” muestras y los buenos ratos que había entre medias. Esta tesis se debe en gran parte a ella también.

Un agradecimiento muy especial al laboratorio de Neuroimmunología, con el Dr. García Merino a la cabeza, por su apoyo durante tantos años dejándonos muestras y dando una visión más clínica de lo que hacíamos en el laboratorio. Agradecer a Antoñuco (el Dr. Antonio J Sánchez, no hay otro como el) las charlas de todo tipo de temas, los buenos consejos y esa

gracia que tiene que no se puede aguantar. Y a Paloma, de Anatomía Patológica, la única persona capaz de describir “Gladiator” como una película de la Edad Media protagonizada por George Clooney (tal cual)

Y a mucha más gente que si sigo, esto se haría interminable, pero aquí deben ser mencionados Víctor (Chechu), Jimena, Sandra, el Johnny, Mario, Cristina, Marian, Cati, todas mis alumnas de la escuela de técnicos (que decían que me querían, pero no sé yo), Cristina (Biblioteca), ...

No puedo olvidarme de mis amigos de Colegio y asociados, Pablo y Xana, Sergio y Virginia, Andrés y Naza, Alfon (“Gato gatito”, ya tu sabes), Guti, Adri, Peibol, Javi y Blanqui, Pedro y Tatin, Miguel, Santi, Javi, Albino y Pilar, Kiko, el Morin (y Marijke y I@s peques), Cesar y Sandra, las Covas, Carmen, Ana, Cristina, Lucrecia, María Álvarez, Jorge y Carmela, Maria... Gracias por seguir ahí tantos años después de haber dejado Asturias y, también, por crear una falsa imagen en el hospital de “lunes por la mañana después de un fin de semana ovetense” que para nada se ajustaba a la realidad.

Sigo también con los que iniciamos la aventura madrileña al mismo tiempo, Iván y Vero (luego llegó Samuelin), Aitor y Nagore y a Carla. También a todos los madrileños que me acogieron estupendamente, Arantxa y Olmo, Santi y Vero, Isa y Dani, Miguel y Rosi, Javier, Héctor, etc. También a los últimos en llegar, Carmen Jardón, Vicky y Jesús (y Carmencita) aunque estos 3 son asturianos, David y Elvira (y Dylan y el que está por venir), Carmen Gloria, María, Sara, Julia... Siempre podré decir que los madrileños no son tan malos como los pintan, sois geniales.

Un lugar especial en este apartado es para Sergio Dikembe (aka Sergio Pinto). Tío, sabes que nunca escatimo perífrasis verbales y metáforas en nuestras dedicatorias, pero no quiero que esta sección ocupe más que la de Materiales y Métodos, espero que lo comprendas, no sería serio. Aún así, eres una de las personas más grandes que ha calibrado a ojo una micropipeta multicanal, y lo sabes. Ponme a los pies de Vero. Recuerdos también a la gente barcelonesa del anti-karaoke y el Primavera Sound, a Repiso, a Campomanes, a Ceneyu...

Recuerdos también a la gente de La Paz, Maria Alba, Harold, Alex e Irina, Alberto, Carlos y Pilar. El Congreso de la SEI (que eh la Zei, Marta?) de Mallorca fue antológico y sin duda uno de los mejores recuerdos que me llevo de estos años.

Por último, tengo que agradecer a mis padres, a mi hermano Javi (15 años llamándote “*el pijo de mi hermano*” hace que sin la parte en cursiva suene raro) y a toda mi familia el cariño y apoyo durante todos los años distribuidos entre Pola de Siero, Oviedo y Madrid. Gracias a los que están y a los que no están: Pepe y Consuelo, Manuel y Palmira, José y Charo, Manolo y Anna (y Bodan), Luis y Paula (y Mario); Alicia e Isaías, Tino y Marisol, Yeyo y M<sup>a</sup> Jesús (y Angela) y Manuel y Lucia (y Lena). Esta tesis también es vuestra.

Os había engañado, el último y definitivo agradecimiento es para Estefi, por todo lo que me da, por su enorme interés en intentar entender que es lo que estaba haciendo cuando cojo una micropipeta y una ristra de tubos Eppendorf y, sobre todo, por aguantarme cuando necesito desahogar. Es una suerte haberte conocido y que sigas estando ahí.





## ***Introducción***

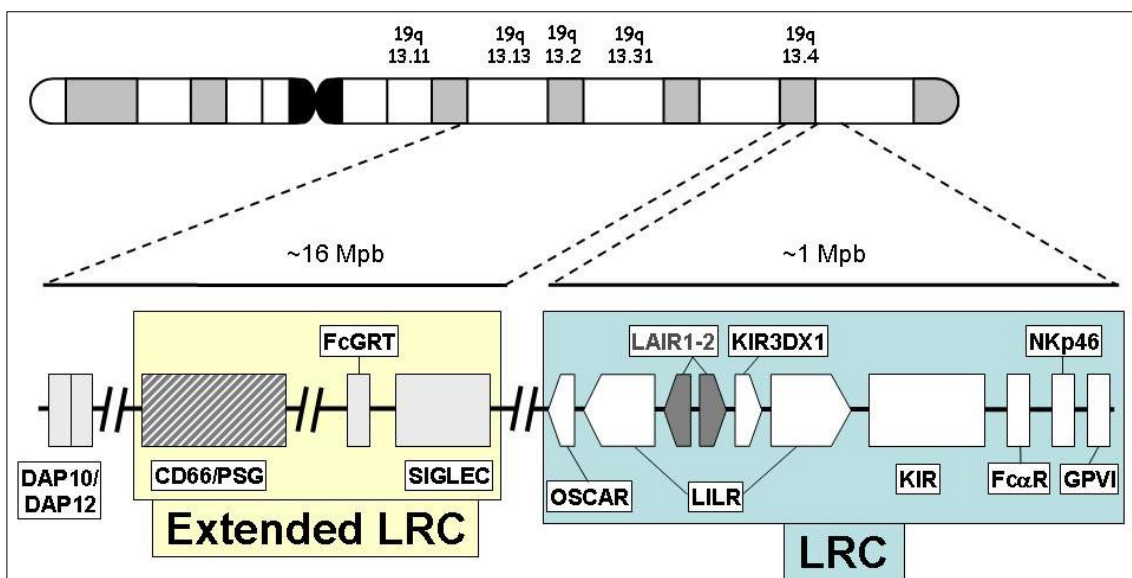
*“Ahí estaba yo. Es decir, Alex y mis tres drugos. O sea Pete, Georgie y Dim. Estábamos sentados en el Korova Milk Bar, exprimiéndonos las rasureras para encontrar algo con que ocupar la noche. En el Korova Milk Bar servían lacta plus. Leche con velloceta o con dencromina... que es lo que estábamos tomando. Eso nos aguzaba los sentidos y nos dejaba listos para una nueva sesión de ultra-violencia...”*

**La Naranja Mecánica. Stanley Kubrick**



## 1. Complejo de Receptores Leucocitarios:

El Complejo de Receptores Leucocitarios (*Leukocyte Receptor Complex - LRC*) es una región de ~1 Mb localizada en el brazo largo del cromosoma 19 (19q13) y en la que se encuentran, entre otras, familias génicas de receptores que participan en la regulación de la Respuesta Inmunitaria. Estos receptores comparten en su estructura la presencia de dominios tipo Inmunoglobulina (*Immunoglobulin-like, Ig-like*) C2 extracelulares y se expresan en células del Sistema Inmunológico y precursores hematopoyéticos. En una posición más centromérica se encuentra una zona conocida como “*Extended LRC*” que incluyen otras familias génicas de receptores con estructuras o funciones relacionadas con las del LRC (Fig. 1) [1, 2].



**Figura 1.** Esquema simplificado del LRC y del “*Extended LRC*” en el cromosoma 19, junto con los genes y las familias génicas que lo componen.

Los genes de estas moléculas se organizan de la siguiente manera (ordenados de posición centromérica a la telomérica):

### 1.1) DAP10/DAP12

Son dos moléculas adaptadoras que se asocian a un receptor y se encargan de la transmisión de señales activadoras. **DAP10** es una proteína transmembrana de 93 aminoácidos que actúa como molécula señalizadora del receptor NKG2D. DAP10 tiene 2 residuos de ácido aspártico en su región transmembrana que interactúan con una arginina de NKG2D, formando así el complejo NKG2D/DAP10, expresado en la membrana de células NK y

Linfocitos T. Cuando NKG2D reconoce sus ligandos MIC (*MHC class I chain related proteins*) A y B o ULBP1-4 (*UL16 binding proteins*) expresados en la célula diana, la señal de fosforilación iniciada por DAP10 mediante Grb2-vav1 y el enzima PI3K (Fosfatidilinositol-3 quinasa) resulta en una activación o co-estimulación de las células NK o Linfocitos T [3-5]

**DAP12** es una proteína de 133 aminoácidos de estructura similar a DAP10, aunque a diferencia de ésta, tiene una pequeña región extracelular. En la región transmembrana también hay un residuo de ácido aspártico que interacciona con aminoácidos cargados positivamente, como lisina o arginina, presentes en la región transmembrana de los receptores con los que se asocia. DAP12 se une a una gran variedad de receptores (incluidos los KIR) de células de las series mieloide y linfoide y participa como molécula señalizadora al presentar motivos ITAM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*) en su cola citoplásmica. Cuando el ligando expresado por la célula diana es reconocido por el receptor asociado a DAP12, los residuos de tirosina de los ITAM son fosforilados por Protein-tirosin quinasa. La molécula ZAP70 se asocia a los ITAM fosforilados y emite señales de activación a la célula [6-8]. DAP12, por último, parece tener un papel inhibitorio específico en macrófagos [9].

## 1.2) **CD66 / PSG:**

También conocidos como CEACAM (*Carcinoembryonic Antigen-related Cell Adhesion Molecule*), son un grupo de receptores implicados en adhesión intercelular mediante asociaciones homo o heterotípicas. La mayoría carece de motivos señalizadores, excepto CEACAM-1 y CEACAM-20, que presentan motivos inhibidores (ITIM - *Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motifs*) en su cola citoplásmica y CEACAM-3 que tiene motivos ITAM. Además de participar en la adhesión celular, pueden actuar como receptores directos para estructuras de bacterias patógenas como *Neisseria*, *Salmonella*, *Escherichia* o *Haemophilus* [10].

Los receptores PSG (*Pregnancy - Specific Glycoproteins*) están codificados por 11 loci incluidos entre los CEACAM y son secretados a la circulación materna por células del sincitiotrofoblasto, con funciones probablemente inmuno-reguladoras [11]. A ~200 kb en posición telomérica respecto a los CEACAM, se encuentran los genes de las apolipoproteínas,

moléculas implicadas en el metabolismo del colesterol y relacionadas con patologías neurodegenerativas, como el Alzheimer y la Esclerosis Múltiple [12]

### 1.3) **FcGRT**

Este gen codifica para la cadena pesada del receptor neonatal del fragmento cristalizante de la Inmunoglobulina G (FcRn). Es una molécula MHC-like, formada por un heterodímero de una cadena  $\alpha$  asociada a la  $\beta 2$ -microglobulina. Los dominios  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  se unen a las regiones CH2 - CH3 de la cadena pesada de la IgG [13, 14] y también es capaz de unirse a la albúmina. FcGRT se expresa en el endotelio vascular en las vesículas de endocitosis y, al unirse a la Inmunoglobulina G, evita que sea degradada por enzimas líticas incrementando así su vida media [15, 16]. También se detecta en células del sincitiotrofoblasto, donde participa en el transporte de la IgG de la madre al feto [17], en la barrera hemato-encefálica y en células de riñón, pulmones o células presentadoras de antígeno [18].

### 1.4) **SIGLEC (Sialic acid binding Ig-like lectins)**

Son 15 receptores que reconocen las distintas formas del ácido sialico [19, 20]. Los genes de SIGLEC-1 y SIGLEC-15 se encuentran en los cromosomas 20 y 18, respectivamente. Pueden tener hasta 6 dominios ITIM (SIGLEC-2 o CD22) en su región citoplásmica y al unir su ligando envían señales inhibitorias. SIGLEC-14 y SIGLEC-15 tienen una cola citoplásmica corta y se asocian a la proteína adaptadora DAP12 para enviar señales de activación a la célula [20]

### 1.5) **OSCAR (Osteoclast-Associated Receptor):**

OSCAR es un receptor expresado en la membrana de osteoclastos y células de la serie mieloide. Presenta 2 dominios *Ig-like* extracelulares, una región transmembrana con una arginina y una cola citoplásmica corta. A través de su región transmembrana se asocia con la molécula señalizadora  $Fc\epsilon R\gamma$ , que tiene motivos ITAM en su cola citoplásmica y se encarga de enviar señales activadoras al interior de la célula [21-23]. Su ligando es el colágeno [24]. En monocitos y células dendríticas, OSCAR está implicado en proceso de endocitosis y presentación de antígenos a Linfocitos T CD4<sup>+</sup>.

### 1.6) **LILR - LAIR - KIR:**

Las 3 familias génicas de los LILR (*Leukocyte Ig-like Receptors*), LAIR (*Leukocyte Associated Ig-like Receptors*) y los KIR (*Killer-cell Ig-like Receptors*) se encuentran muy próximas entre sí en el LRC (19q13.4). En los apartados 2 y 3 se comentarán las características de los LILR y los KIR, respectivamente. Están descritos los genes *LAIR1* y *LAIR2*. LAIR1 (CD305) es una proteína transmembrana con un dominio *Ig-like* extracelular y 2 regiones ITIM en su cola citoplásmica. Se expresa en prácticamente todas las células del Sistema Inmunológico [25] y reconoce varios tipos de colágeno, actuando como un potente inhibidor funcional al unirlos [26]. Por su parte, LAIR2 (CD306) comparte un 84% de identidad con LAIR1 en su secuencia proteica, pero carece de la región transmembrana y de la cola citoplásmica por lo que se expresa como un receptor soluble. También es capaz de unirse al colágeno y se cree que puede actuar como un competidor de LAIR1 regulando su función inhibitoria [27].

### 1.7) **Fc $\alpha$ R (CD89):**

Es una proteína de membrana que actúa como receptor para la Inmunoglobulina A [28-30]. Tiene 2 dominios *Ig-like* extracelulares y una arginina en su región transmembrana, que interacciona con un residuo de ácido aspártico presente también en la región transmembrana de la molécula adaptadora Fc $\epsilon$ R $\gamma$ . Fc $\alpha$ R puede expresarse en la membrana en ausencia de las moléculas adaptadoras y en este caso participa en la endocitosis y reciclaje de la Inmunoglobulina A [31].

### 1.8) **NKp46 (Natural Cytotoxicity Receptor I, NCR-I):**

NKp46, NKp30 y NKp44 forman el grupo de los NCR, receptores activadores de células NK. NKp46 es una glicoproteína con 2 dominios *Ig-like* extracelulares y una región transmembrana. Se asocia a otras moléculas adaptadoras con dominios ITAM como Fc $\epsilon$ R $\gamma$  o CD3 $\zeta$  para enviar señales de activación. Participa en la citotoxicidad de células NK reconociendo un ligando celular aún no conocido [32-34]; también se describió que es capaz de activar la célula NK reconociendo moléculas de hemaglutinina expresadas en células infectadas por el virus de la gripe [35].

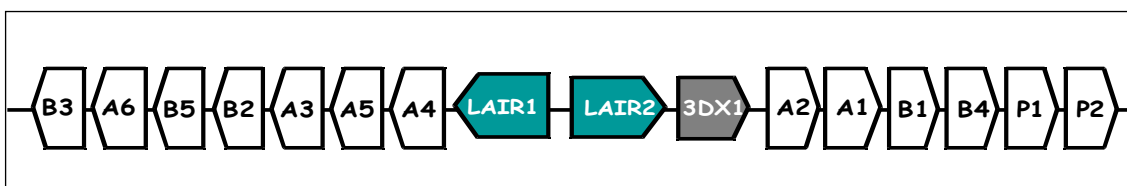
### 1.9) GPVI (glicoproteína VI):

Es una proteína de membrana de 58 KDa expresada en plaquetas y células del Sistema Inmunológico. Su ligando es el colágeno e induce la activación y agregación de las plaquetas tras una lesión. Carece de cola citoplásmica y se asocia a la  $Fc\epsilon R\gamma$ , que inicia señales de activación celular. Dado que ambos reconocen el mismo ligando, GPVI es un competidor de LAIR-1 [36]. En las fases 1 y 2 de la maduración de los megacariocitos, ambos receptores son co-expresados en su superficie [37].

## 2. Leukocyte Ig-like Receptors (LILR)

### 2.1) Genética del Complejo LILR

Los LILR (CD85) son una familia de receptores expresados por todas las células del Sistema Inmunológico y reconocen moléculas HLA de clase I. El complejo LILR se compone de 11 genes (*LILRA1-6* y *LILRB1-5*) y 2 pseudogenes (*LILRP1-P2*) localizados dentro del LRC de manera consecutiva y con regiones intergénicas de longitudes que varían entre ~5 y ~20 kb [38-42]. En la región central se intercalan los genes *LAIR1* y *2*, orientados en sentido contrario [43], y el pseudogén *KIR3DX1*. Los distintos genes LILR mantienen la orientación definida por los LAIR (Fig. 2) estableciendo 2 agrupaciones, una centromérica y otra telomérica, dentro del Complejo LILR [43]. Debido a esta particular ordenación y a la alta homología en la secuencia y características de genes LILR pertenecientes a distintas agrupaciones, como la existente entre los genes *LILRA1-LILRB1* con el par *LILRA3-LILRB2* [44] se cree que el complejo LILR se originó por procesos de duplicación inversa [43]. El locus más telomérico de la familia LILR es *LILRP2* y se encuentra a tan solo ~10kb del primer locus del Complejo KIR (*KIR3DL3*). Los LILR reciben otros nombres no oficiales; *Ig-like Transcript* (ILT), *Leukocyte Inhibitory Receptor* (LIR), *Monocyte Inhibitory Receptor* (MIR) o *HM transcripts*.



**Figura 2.** Estructura de la familia genética de los LILR en el LRC. Se presentan también los 2 genes LAIR intercalados, el pseudogén KIR3DX1 y la orientación opuesta de las dos agrupaciones centromérica y telomérica.

## 2.2) Estructura y Función de los LILR.

Los LILR son receptores de membrana que presentan 4 dominios Ig-like extracelulares, excepto LILRB4 (ILT3) y LILRA5 (ILT11) que tienen solo dos dominios. Se distinguen los LILR inhibidores (LILRB) de cola citoplásmica larga con 2 o 4 motivos ITIM y los LILR activadores (LILRA) de cola citoplásmica corta. Estos últimos tienen en su región transmembrana un residuo de arginina mediante el que se asocian a la molécula señalizadora  $Fc\epsilon R\gamma$  [45], al igual que el receptor para la IgA (Fig. 3). LILRA3 tiene una estructura que no se ajusta a la de un LILR activador o inhibidor al ser un receptor soluble que carece de región transmembrana y de cola citoplásmica [44].

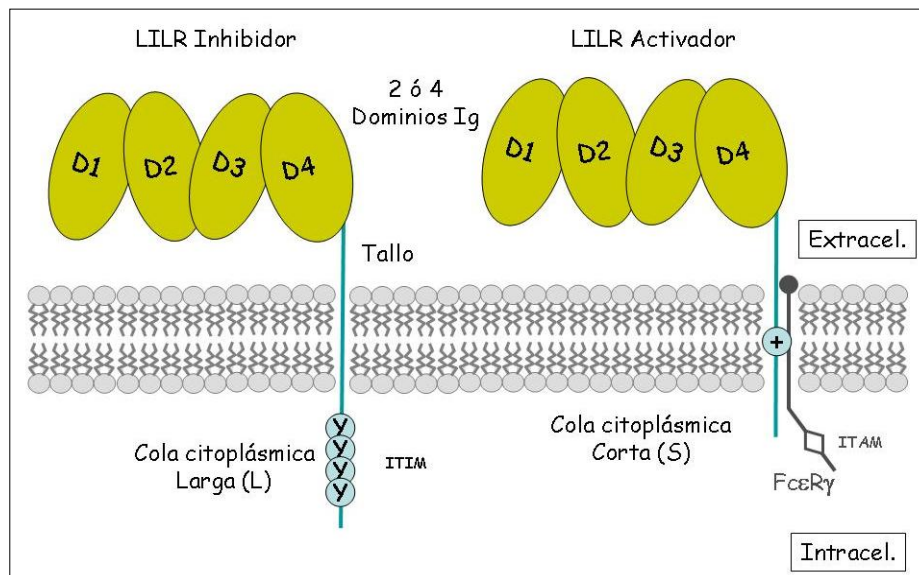


Figura 3. Estructura de los receptores LILR inhibidores y activadores

Los LILR se expresan preferentemente en monocitos, macrófagos y en las células dendríticas mieloides (mDC), plasmacitoides (pDC) y derivadas de monocitos (moDC). Algunos LILR pueden ser expresados por células de la serie linfóide, LILRB1 se expresa en células NK y en Linfocitos T y B y LILRA2, en células NK [46]. Algunos LILR reconocen la expresión en membrana de moléculas HLA de clase I [38-40, 47] y también moléculas MHC-like, como la proteína UL18 (codificada por el hCMV) reconocida por LILRB1 con una afinidad 1000 veces mayor que a las moléculas HLA [40, 48] o la molécula CD1d, reconocida por LILRB2 [49].

Al reconocer la expresión de su ligando en la membrana de la célula diana, los LILR envían señales de activación o inhibición en función del receptor. Además, debido al amplio rango de expresión de los LILR, su efecto puede ser distinto. Los LILRB tienen una función

inhibidora [50], pero también están descritas funciones inhibitoras en receptores LILR que señalizan a través de motivos ITAM. Así, LILRA4 inhibe la secreción de citoquinas por las pDC [51] y LILRA2 inhibe procesos propios de células presentadoras de antígenos como la diferenciación de células dendríticas, la presentación antigénica y la estimulación por los TLR's [52]. La expresión de LILRB1 se considera como un marcador de linfocitos T de memoria [53, 54].

## 2.3) LILRA3

### 2.3.1) Genética de LILRA3.

*LILRA3* consta de 7 exones, los 2 primeros codifican para el péptido-señal, los 4 siguientes para los dominios *Ig-like* y el último exón codifica para un tallo corto (Fig. 4) [44]. Si comparamos la secuencia de este último exón con la de otros genes LILR, encontramos que *LILRA3* incluye parte de la siguiente secuencia intrónica, que tiene un codón de parada en pauta de lectura. Por este motivo, en la proteína madura no están presentes la región transmembrana ni la cola citoplásmica. Este fenómeno se observa en otros genes LILR, como resultado de un procesamiento alternativo del intrón 6 que también genera formas solubles de receptores expresados normalmente en membrana [55]. Existe una isoforma de LILRA3 generada por procesamiento alternativo que afecta al extremo 5' del exón 4, eliminando 192 pb de su secuencia.

El promotor de *LILRA3* se asemeja en su estructura al de *LILRA2*. Por homología con éste, encontramos secuencias reconocidas por los factores de transcripción PU.1 y AML-1 (posiciones -132 y -144, respectivamente), además de un *heat shock element* en la posición -101 con el motivo -NGAAN-. A diferencia de otros genes de la familia LILR como *LILRA1*, *LILRB1* o *LILRB2*; *LILRA3* no presenta un exón adicional no traducido en su extremo 5' (Fig 4) [56].

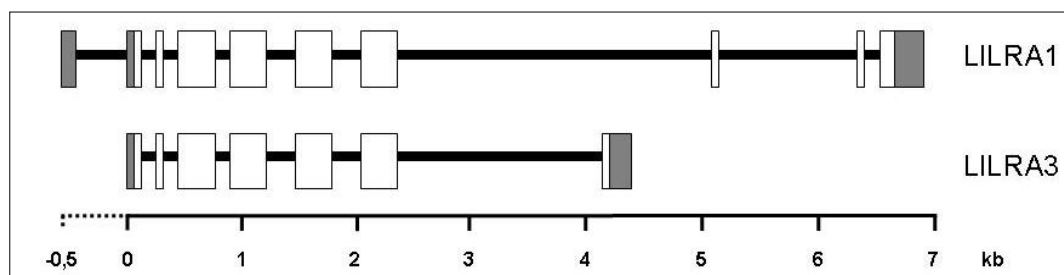


Figura 4. Comparación del tamaño y estructura exónica de LILRA1 y LILRA3. En gris, las regiones no traducidas.

### 2.3.2) Estructura y función.

LILRA3 es una proteína de 439 aminoácidos (~47.5 kDa) secretada principalmente por monocitos y se detecta en suero (~2700 pg/ml) y en líquido sinovial de pacientes con Artritis Reumatoide [57]. Recientemente se ha descrito su capacidad para unirse a HLA-A\*02:01, HLA-G1 [58] y a la cadena  $\alpha$  libre de la molécula HLA-C [59], aunque se desconoce el efecto fisiológico. La isoforma corta de LILRA3 daría lugar a un receptor secretado de menor tamaño (375 aminoácidos) y peso (40.3 kDa); desconociéndose también su implicación fisiológica.

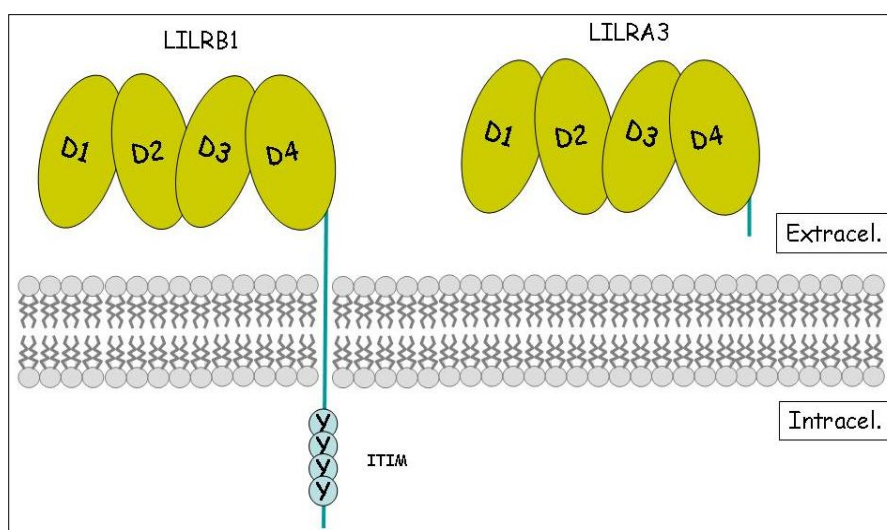


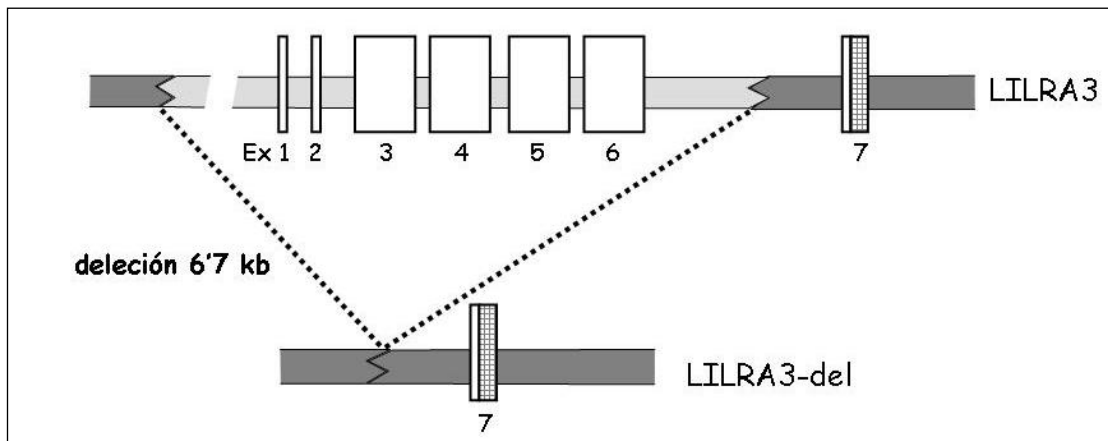
Figura 5. Estructura proteica del receptor soluble LILRA3 en comparación con un LILR de membrana inhibidor

### 2.3.3) Diversidad de LILRA3

Hasta el momento están descritas 21 secuencias de LILRA3 que codifican para 11 proteínas distintas (*LILRA3\*001* - *LILRA3\*012N*; Nomenclatura no oficial - [60]). De estas 21 secuencias, la única que incluye la secuencia genómica completa es la del alelo *LILRA3\*00301*, la mayoría son secuencias parciales que no incluyen el intrón 6 y el exón 7 [60, 61] mientras que las secuencias de los alelos *LILRA3\*002* y *\*004* se obtuvieron a partir de ADNc. Se considera a *LILRA3\*00301* (AF014923) como la secuencia consenso y, además, este alelo es el más frecuente en población Caucasoide [60]. *LILRA3\*001* sólo se diferencia de la secuencia consenso en un polimorfismo en el exón 1, que se traduce en un cambio de aminoácido Pro→Ser 3 en el péptido señal, por lo que el receptor maduro que codifica *LILRA3\*001* sería idéntico al de *LILRA3\*003*. Por otra parte, *LILRA3\*006* es el alelo más

frecuente en poblaciones Negroides [62]. No existen datos de frecuencias alélicas de *LILRA3* en población Mongoloide.

En la población sana está descrita la presencia de una forma alterada de *LILRA3* por una deleción de 6765 pb que recibió el nombre no oficial *LILRA3\*005* [44, 60], aunque a partir de ahora nos referiremos a ella como *LILRA3-del* (Fig. 6). La deleción comienza 3.5 Kb más arriba del codón de inicio de *LILRA3*, incluye a la región promotora y a los exones que codifican para el péptido señal y los cuatro dominios *Ig-like*, y finaliza en la región 3' del intrón 6, a 752 pb del exón 7. Esta deleción, por tanto, afecta a la práctica totalidad de la secuencia codificante en *LILRA3*. Su frecuencia es de un 20-30% de la población sana Caucasoide [63-65] con una frecuencia alélica de 0.26 en población británica [60] y puede llegar hasta un 70-85% de los individuos de poblaciones de raza Mongoloide [61, 66].



**Figura 6.** Esquema de la deleción que afecta a la práctica totalidad de la secuencia codificante de *LILRA3*

Esta alteración en la secuencia de *LILRA3* puede tener una implicación funcional sobre la regulación del Sistema Inmunológico, ya que existen trabajos publicados que detectan un aumento de la frecuencia de *LILRA3-del* en pacientes de enfermedades de base autoinmune como la Esclerosis Múltiple [64] o el Síndrome de Sjögren [65]. Por el contrario, no se ha encontrado asociación entre la presencia de la deleción y un mayor riesgo de desarrollar psoriasis [63].

En poblaciones de Asia Oriental se han descrito otras formas alteradas de *LILRA3* que presentan codones de parada prematuros y pueden llegar a estar presentes hasta en un 20% de la población sana [61]:

LILRA3\*011N. Este alelo tiene una mutación G>C en el último nucleótido del intrón 1, alterando la maduración del ARNm. Como consecuencia, por procesos de procesamiento alternativo se generan distintos ARNm con inserciones y deleciones de secuencias que alteran la traducción de LILRA3. Este alelo también presenta la deleción de una citosina en la posición 340, en el primer dominio *Ig-like* (D1). Esta deleción altera la pauta de lectura y 5 codones más adelante genera un codón de parada prematuro.

LILRA3\*012N: Comparte con el anterior la mutación G>C del último nucleótido del intrón 1 y además tiene una mutación G>T en la posición 159 (D1) que da lugar a otro codón de parada prematuro.

Estas alteraciones no permiten que se forme un receptor LILRA3 funcional, por lo que las formas aberrantes de *LILRA3* tendrían un significado fisiológico similar a la deleción, y tampoco se puede descartar que se genere un fragmento proteico alterado. La presencia de los alelos *LILRA3\*011N* y *\*012N* no ha sido analizada en poblaciones Caucasoides ni en las series de pacientes con enfermedades de base autoinmune.

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

En el LRC se encuentran los genes que codifican para los receptores KIR (CD158) en una región de ~150 kb del LRC conocida como el Complejo KIR, en una posición más telomérica respecto a los LILR (19q13.4). En el complejo KIR hay 16 loci que incluyen 14 genes (*KIR3DS1*, *KIR3DL1-3*, *KIR2DS1-5* y *KIR2DL1-5*) y dos pseudogenes (*KIR3DP1* y *KIR2DP1*) [67, 68], además del pseudogén *KIR3DX1* que se encuentra en una posición distinta dentro del LRC [69, 70]. Los KIR se expresan en la membrana de linfocitos con actividad citotóxica (células NK y Linfocitos T CD8<sup>+</sup>) [71] y algunos Linfocitos T CD4<sup>+</sup> [72]. Algunos tienen como ligando las moléculas HLA de clase I, participando en la vigilancia de su expresión en las células del organismo [73, 74].

### 3.1) Estructura y nomenclatura de los KIR

Los KIR son proteínas de membrana que pueden presentar 2 ó 3 dominios *Ig-like* extracelulares (KIR2D y KIR3D, respectivamente), una región transmembrana y una cola citoplásmica de longitud variable. Al igual que en los LILR, los KIR inhibidores tienen una cola citoplásmica larga (long - L) con 2 motivos ITIM y los KIR activadores tienen una cola citoplásmica corta (short - S) que carece de motivos señalizadores, pero tienen en la región transmembrana un residuo de lisina que les permite su asociación con la molécula activadora DAP12 (Fig. 7). El número final en el nombre de un KIR se refiere a loci o grupos alélicos distintos de receptores KIR con estructuras similares. De esta manera, KIR3DL1 es uno de los receptores descritos con 3 dominios *Ig-like* extracelulares y una cola larga que envía señales de inhibición [75].

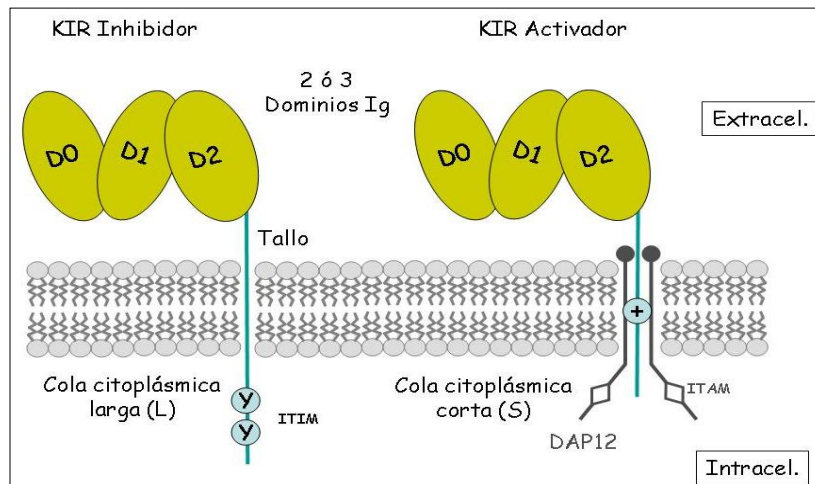


Figura 7. Estructura de los receptores KIR inhibidores y activadores

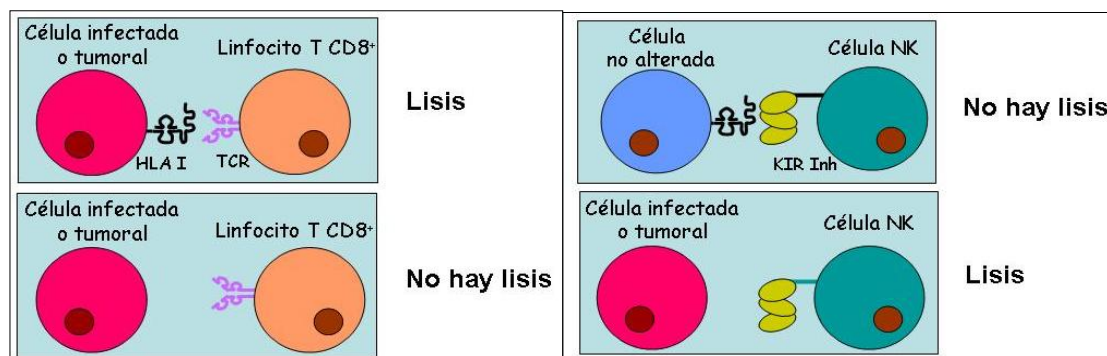
### 3.2) Función de los KIR

Como resultado de la interacción KIR-HLA, la célula citotóxica puede recibir señales activadoras o inhibitoras según el receptor que está participando. En este sentido, está bien descrito el papel que desempeñan los receptores KIR inhibidores, ajustándose a la hipótesis del "missing self" [76].

Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> detectan la presencia de células neoplásicas o infectadas por virus reconociendo péptidos extraños presentados en HLA clase I. Como resultado, se produce la activación del linfocito T liberando el contenido de sus gránulos de granzima y perforina para lisar a la célula diana (Fig. 8). En células tumorales o infectadas por virus, la presentación

antigénica puede verse alterada al bloquearse la expresión en membrana de moléculas HLA de clase I. Por ejemplo, el Citomegalovirus humano (hCMV) presenta varios mecanismos que alteran la expresión en membrana de la molécula HLA de clase I [77, 78]: i) las proteínas US2 y US11 se expresan en el retículo endoplásmico (RE) e inducen la degradación de la cadena  $\alpha$  del HLA de clase I por el proteasoma; ii) la proteína US6 impide la carga del péptido en el HLA bloqueando el transporte de péptidos desde el citoplasma al interior del RE a través de TAP; iii) US3 y US10 bloquean el transporte de la molécula HLA de clase I con el péptido cargado desde el RE al aparato de Golgi, quedando retenida en el RE. La proteína E19 del adenovirus retiene la molécula HLA en el RE interfiriendo en la asociación de la molécula HLA con la tapasina, o induciendo su transporte de vuelta del aparato de Golgi al RE [79, 80]. El virus del herpes simplex tipo I también bloquea el paso de péptidos a la luz del RE a través de TAP mediante la proteína ICP47 [81, 82]. Otro ejemplo es el herpesvirus asociado al Sarcoma de Kaposi, que codifica para dos proteínas K3 y K5 que disminuyen la expresión de membrana del HLA induciendo procesos de endocitosis por vesículas revestidas de clatrina [83, 84].

Estas alteraciones de la expresión antigénica evita la detección y posterior lisis de células infectadas o tumorales por parte de los linfocitos T citotóxicos. Cuando una célula NK reconoce, mediante un KIR inhibitor, la presencia de moléculas HLA de clase I en la membrana de células sanas se frena la respuesta citotóxica. Por el contrario, si la expresión de las moléculas HLA se ve disminuida o bloqueada (Fig. 8), la señalización por los KIR inhibitor se ve afectada al no reconocer la expresión del ligando en la célula alterada y ésta sería lisada por la célula NK [85-87], si además presenta estructuras reconocidas por los receptores activadores.



**Figura 8.** Comparación de la lisis de células diana mediada por células citotóxicas al reconocer la expresión del ligando en el caso del Receptor de Linfocitos T (*T Cell Receptor* -TCR, izq.) o por la ausencia del ligando en el caso de los KIR según la hipótesis del “missing self” (der.). La expresión de receptores activadores de células NK se ha omitido para simplificar la figura

El papel activador de los KIR asociados a la molécula DAP12 no encaja en la hipótesis del “missing self” aunque se cree que pueden actuar como moléculas coestimuladoras de células citotóxicas en presencia de su ligando en la célula diana. Así, KIR2DS1 reconoce la expresión de HLA-C2, aunque con menor afinidad que su homólogo inhibidor KIR2DL1, y es capaz de activar por sí sólo a células NK para lisar células transformadas con el EBV, o Linfoblastos T y células dendríticas alogénicas que presentan su ligando [88]. KIR2DS4 reconoce diferentes moléculas HLA-C y también a HLA-A\*11, y la unión con este último es capaz de activar a las células NK en ensayos de citotoxicidad [89]. KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS5 y KIR3DS1 no tienen ligando descrito, aunque este último podría reconocer a HLA-Bw4, al igual que su homólogo inhibidor KIR3DL1 [90].

### 3.3) Ligandos

Los KIR participan en el reconocimiento de moléculas HLA de clase I, que se expresan en la membrana de prácticamente todas las células nucleadas del organismo [73, 74]. No todos los KIR tienen un ligando conocido (Tabla 1). La afinidad por el ligando es variable para cada KIR; así, KIR2DL1 y KIR2DS1 reconocen el mismo ligando con afinidades distintas, siendo la de KIR2DL1 por su ligando 3 veces superior a la de KIR2DS1 [91]. Lo mismo ocurre con KIR2DL2 y KIR2DL3, en el que el primero tiene una mayor afinidad por las moléculas HLA-C1 que KIR2DL3 [92]. También existe variabilidad alélica en la afinidad por el ligando de un KIR. Así, existen alelos de *KIR3DL1* que codifican para receptores con una gran afinidad por las moléculas HLA-Bw4 (*KIR3DL1\*00501* - *\*00101*), con afinidad intermedia (*KIR3DL1\*01501* - *\*020*) o de baja afinidad (*KIR3DL1\*007*) [93]. Recientemente se ha descrito la posibilidad de reconocer otros ligandos no-HLA por parte de KIR3DL2, como es el caso de productos microbianos como los olinonucleótidos CpG, que son reconocidos por el D0 de KIR3DL2 e internalizados en endosomas para llegar a su receptor en células NK, el Toll-like Receptor 9 (TLR9) [94]:

Receptor	Ligando	Receptor	Ligando
KIR2DL1	HLA-C2	KIR2DS1	HLA-C2
KIR2DL2/3	HLA-C1 HLA-B*46/*73 Algunos HLA-C2	KIR2DS2	?
KIR2DL4	HLA-G	KIR2DS3	?
KIR2DL5	?		
KIR3DL1	HLA-Bw4 Incluyendo HLA-A*23 - A*24 - A*32	KIR2DS4	HLA-A *11 Algunos HLA-C
KIR3DL2	HLA-A*03/A*11 HLA-B*27 homodim. CpG	KIR2DS5	?
KIR3DL3	?	KIR3DS1	?

**Tabla 1.** Representación de los ligandos HLA conocidos de los diferentes receptores KIR. Las moléculas HLA-C se dividen en 2 grupos en función del aminoácido que presentan en la posición 80 de la proteína madura. HLA-C1 tiene un residuo de asparagina mientras que HLA-C2 tienen un residuo de lisina.

### 3.4) Regulación de la expresión de los KIR

Aunque en el LRC pueden estar presentes todos los genes KIR, no todos se expresan por igual en todas las Células NK y Linfocitos T, sino que lo hacen de manera clonal, regulando la expresión de cada uno de los KIR y manteniendo la expresión de un número determinado de receptores en cada clon. La expresión de los genes KIR en células NK y Linfocitos T se mantiene estable por modificaciones epigenéticas en el promotor. Así, la metilación de las islas CpG en los promotores KIR proximales impide la expresión del receptor, mientras que la desmetilación permite su expresión [95-97]. Existen algunas diferencias a este nivel entre los promotores de las Células NK y los Linfocitos T. En los linfocitos T, el promotor tiene una secuencia de al menos 60 pb, mientras que en las Células NK esta secuencia debe ser de 120 pb [98, 99]. La posición -98 es crítica en la expresión de los KIR, hasta el punto que una mutación en ella, observada en alelos de *KIR2DL5B* y *KIR3DP1* bloquea completamente la transcripción del gen [100].

Otra diferencia importante en la expresión de los KIR en células NK y linfocitos T es que, mientras en las células NK la expresión se detecta al finalizar su maduración, la expresión en linfocitos T parece producirse cuando estas células adquieren un fenotipo “de memoria” y el porcentaje de linfocitos T que expresa KIR aumenta con la edad [72, 101].

### 3.5) Organización del Complejo KIR.

#### 3.5.1) Genes KIR.

Al igual que en el Complejo LILR, los genes KIR se localizan de manera consecutiva, con la excepción ya comentada del pseudogén *KIR3DX1* [67, 68]. A diferencia de los LILR, las secuencias intergénicas entre los KIR tienen un tamaño de ~2'5 kb, con la excepción de los genes *KIR3DP1-KIR2DL4*, entre los que la distancia intergénica es mayor (~5 kb) [100]. El tamaño de un gen KIR es variable (9 - 16kb) y, como regla general, los genes KIR constan de 9 exones. Los exones 1 y 2 codifican para el péptido señal; los exones 3-4-5, para los dominios *Ig-like* (D0-D1-D2, respectivamente); los exones 6 y 7 codifican para la porción del tallo y la región transmembrana y, por último, los exones 8 y 9 para la cola citoplásmica [102]. Esta estructura es variable y en función de ella, los distintos genes KIR se agrupan en 3 tipos:

- **KIR3D:** Incluye a los genes *KIR3DL1-3*, *KIR3DS1*, al pseudogén *KIR3DP1* y a *KIR3DX1*. Estos genes tienen la estructura típica de 9 exones, con las excepciones de *KIR3DL3*, que carece del exón 6 [103], y de *KIR3DP1* en el que están presentes sólo los 5 primeros exones (*KIR3DP1\*003/\*005/\*006/\*010* no tienen el exón 2) y un exón 6 distinto al descrito en el resto de genes KIR [100]. *KIR3DL3* sólo presenta un motivo ITIM en su cola citoplásmica porque tiene un codón de parada anterior al 2º motivo ITIM [104]. *KIR3DL1* y *KIR3DS1* fueron descritos inicialmente como 2 genes distintos, pero actualmente se consideran como 2 variantes de un mismo locus *KIR3DL1/S1* en la región telomérica de los haplotipos KIR.

*KIR3DP1* es un pseudogén debido a una mutación en su región promotora que bloquea su transcripción, aunque está descrito un alelo recombinante (*KIR3DP1\*004*) en el que el promotor y el exón 1 proceden del gen *KIR2DL5A*. Al sustituir el promotor alterado de *KIR3DP1* por otro de un gen funcional, se pudo detectar ARNm de *KIR3DP1\*004* y este alelo podría traducirse en un receptor soluble al carecer de la región transmembrana y la cola citoplásmica [100].

*KIR3DX1* es un gen KIR ancestral detectado en primates y en la especie *Bos taurus*. Su locus se encuentra a continuación del gen *LAI2*, en una posición 180 kb centromérica respecto al complejo KIR. Este gen tiene una delección de 7 pb en el exón 5 que genera un codón de parada prematuro [69, 70]. Hasta el momento no hay datos acerca de la expresión de *KIR3DX1* y está considerado como un pseudogén.

- KIR2D con dominios tipo D1-D2: Incluye a los genes *KIR2DL1-3*, *KIR2DS1-5* y al pseudogén *KIR2DP1*. Estos genes tienen como característica común que su exón 3 es realmente un pseudoexón, ya que es eliminado durante el procesamiento y maduración del transcrito primario. Por tanto, el receptor codificado por este tipo de genes carece del dominio D0 [105]. *KIR2DL1* y *KIR2DL2* tienen un exón 7 más corto porque presentan una deleción de 3 pb en su secuencia. *KIR2DL2* y *KIR2DL3*, al igual que *KIR3DL1* y *KIR3DS1* se consideran como 2 formas alélicas de un mismo locus *KIR2DL2/L3*. El pseudogén *KIR2DP1* presenta un codón de parada prematuro en el exón 4 [106].

- KIR2D con dominios tipo D0-D2: A este grupo pertenecen los genes *KIR2DL4* y *KIR2DL5*. En los genes que codifican estos receptores se ha producido la deleción del exón 4, por lo que carecen del dominio D1 [106]. *KIR2DL4* presenta 2 particularidades. Es un receptor que, a diferencia de otros KIR inhibidores, sólo presenta un motivo ITIM en su cola citoplásmica [107-109] y un residuo de arginina, en lugar de lisina como en el resto de KIR activadores, en su región transmembrana para asociarse con la molécula señalizadora FcεRγ [110-113]. *KIR2DL5* puede ocupar 2 loci distintos dentro del complejo KIR, uno en la región centromérica y el otro en la telomérica debido a una duplicación. Para diferenciarlos se añade una letra al final del nombre *KIR2DL5A* y *KIR2DL5B* (telomérico y centromérico, respectivamente [114]. *KIR2DL5* es un receptor inhibidor que se expresa en linfocitos T y células NK, aunque hasta el momento sólo se ha detectado la expresión en membrana del alelo *KIR2DL5A\*001* [115].

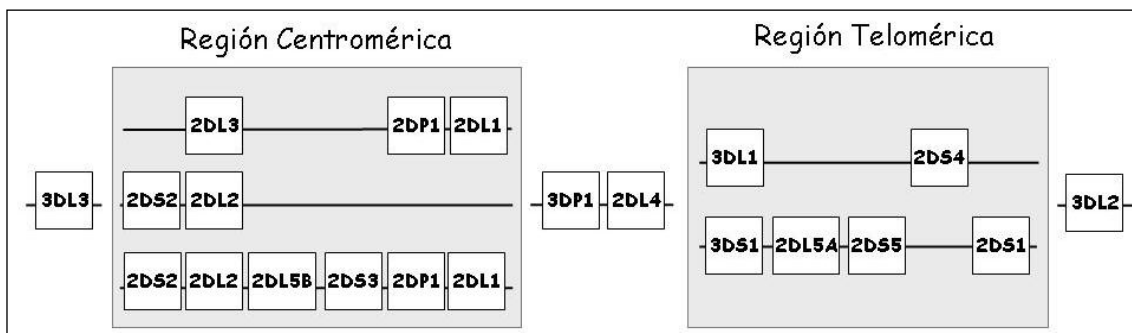
### 3.5.2) Haplotipos KIR.

El “haplotipo KIR” es la disposición de los genes KIR en cada cromosoma 19. Una característica diferencial de los haplotipos KIR es la variación en el contenido génico. De esta manera, existen unos genes que están presentes en el ~100% de los haplotipos KIR descritos y que se conocen como “*framework genes*”. *KIR3DL3* y *KIR3DL2* delimitan respectivamente, los extremos centromérico y telomérico del haplotipo KIR, mientras que los loci *KIR3DP1* y *KIR2DL4* conforman la zona central. Estos genes definen las regiones centroméricas y teloméricas y dentro de ellas hay una gran variabilidad entre haplotipos por los genes que están presentes (Fig. 9) [116]. Ésta es una diferencia importante con los genes del Complejo

LILR, en el que no hay variación en el número de copias de los genes presentes con la excepción de *LILRA3*.

Se distinguen dos grupos de haplotipos KIR. El haplotipo A tiene una dotación génica constante que incluye los loci *KIR3DL3*, *KIR2DL3*, *KIR2DP1*, *KIR2DL1*, *KIR3DP1*, *KIR2DL4*, *KIR3DL1*, *KIR2DS4* y *KIR3DL2*. Este haplotipo es el mayoritario y solo porta un gen que codifica para un receptor activador (*KIR2DS4*) que, en un 75% de la población Caucasoide, está representado por alelos que tienen una delección de 22pb en el exón 5 (D2) y generan una forma corta de *KIR2DS4* de significado fisiológico desconocido [117]. Por tanto, en la mayoría de los casos el haplotipo A solo porta receptores inhibidores de la respuesta citotóxica. La variabilidad entre distintos haplotipos A se consigue gracias a diferentes combinaciones de polimorfismos alélicos de los loci que incluye.

Cualquier variación por exceso respecto a esta dotación génica de los haplotipos A se considera un haplotipo B. En el haplotipo B hay una mayor heterogeneidad génica y puede incluir regiones centroméricas y teloméricas de haplotipos A. Esto se debe a que muchos de los haplotipos B se generan por procesos de recombinación a nivel de la región intergénica entre *KIR3DP1* y *KIR2DL4*. En los haplotipos B hay una mayor presencia de receptores activadores, con una importante variabilidad en el número de genes de estos receptores que pueden estar representados en los distintos haplotipos.



**Figura 9.** Representación de las diferentes organizaciones génicas de un haplotipo KIR en las regiones centroméricas y teloméricas.

### 3.5.3) Polimorfismo alélico.

Además de la variación en número de copias de cada locus, otro factor que añade variabilidad a los haplotipos KIR es el polimorfismo alélico. En la última actualización de la base de datos de la web IPD-KIR (<http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/>) estaban registrados un total de 614

alelos KIR, siendo *KIR3DL3* el gen más polimórfico con 107 secuencias descritas. Esta variabilidad alélica, sumada a la variación en número de copias de los loci KIR, hace que la posibilidad de que 2 individuos no emparentados tengan 2 haplotipos KIR idénticos sea muy baja. A pesar de ello, están descritos disequilibrios de ligamiento entre alelos de distintos loci. Así, por ejemplo, en Caucasoides la ordenación centromérica más frecuente en haplotipos B sería la formada por los alelos *KIR2DL4\*005* - *KIR3DS1\*013* - *KIR2DL5A\*001* - *KIR2DS5\*002* - *KIR2DS1\*002* - *KIR3DL2\*007* [118].

Los polimorfismos alélicos en los genes KIR, entendidos como cambios de base que no alteren el procesamiento del ARNm ni generan alelos nulos, pueden tener un diferente significado funcional. Por una parte, pueden afectar a la unión del KIR con su ligando, como por ejemplo, polimorfismos presentes en *KIR2DL2* hacen que este receptor tenga una mayor afinidad por HLA-C1 que *KIR2DL3* [119], por lo que su efecto en la fisiología de la célula NK es importante. En el caso del locus *KIR3DL1/S1*, el efecto de los polimorfismos es aún más patente, ya que alteran tanto la afinidad por el ligando como la función del receptor. Por otra, estos polimorfismos pueden alterar modificaciones post-traduccionales, como glicosilaciones, y reducir sus niveles de expresión o impedir que el receptor llegue a la membrana [120, 121]. Aún así, la mayoría de los polimorfismos en la secuencia de los KIR tienen un significado aún desconocido.

#### **3.5.4) Generación de la variabilidad en los haplotipos KIR.**

La gran variabilidad existente en los haplotipos KIR se genera por procesos de recombinación homóloga, mutaciones puntuales o combinaciones de ambas. La recombinación homóloga puede tener lugar entre los mismos loci KIR. Si ocurre entre loci distintos aparecen como resultado haplotipos KIR con duplicaciones y deleciones de varios genes KIR [100, 122, 123] y, además, se generan alelos KIR quiméricos [100, 122, 123]. *KIR2DS4* y *KIR3DL2* son capaces de reconocer HLA-A\*11 debido a que en el exón 4 comparten una misma secuencia de 14-31 pb con polimorfismos específicos de *KIR3DL2*, como Pro71-Val72 [89]. Por último, los polimorfismos puntuales en la secuencia de los genes KIR por sustitución, deleción, etc., son los principales causantes de la generación de variabilidad alélica en estos loci.

### 3.6) KIR y Enfermedad

Las células NK participan en la defensa frente a infecciones víricas y la diferente respuesta a estas enfermedades puede estar relacionada con la variabilidad genética del Complejo KIR. La presencia combinada de alelos *HLA-Bw4<sup>80lle</sup>* (isoleucina en la posición 80) y el gen *KIR3DS1* se traduce en una progresión más lenta del VIH, con menor carga viral y menores complicaciones por infecciones oportunistas, que en otras combinaciones KIR/HLA [90]. Este efecto protector también se observó en el aclaramiento del virus de la hepatitis C, en la que la combinación de *HLA-Bw4<sup>80lle</sup>* y *KIR3DS1* era la más efectiva [124]. Este trabajo definía a *KIR2DL3* como factor protector en presencia de su ligando, HLA-C1.

La deficiencia de células NK o alteraciones en su función citolítica son factores de susceptibilidad para sufrir infecciones por Herpesvirus [125] y, por otra parte, Herpesvirus como el hCMV son capaces de modular la respuesta de células NK mediante la expresión de UL18 en la célula infectada, una molécula homóloga a las moléculas HLA de clase I, reconocido por el receptor inhibitor LILRB1 [40, 48, 126]. El hCMV es capaz de alterar la expresión en membrana de las moléculas de HLA de clase I, con la excepción de HLA-E [127] y células dendríticas infectadas por el hCMV son capaces de inducir la expresión del receptor inhibitor NKG2A en células NK NKG2C<sup>+</sup> [128]. El papel directo de los KIR frente a infecciones por Herpesvirus no está completamente definido, aunque en presencia de *KIR2DL2* y su ligando se ha observado una mayor predisposición a las reactivaciones del virus Herpes simplex tipo I [129, 130] o que los KIR activadores protegen frente a la reactivación del hCMV en trasplantes de médula ósea [131]. Respecto al virus de Epstein-Barr (EBV), no existen trabajos acerca del efecto variabilidad KIR en la mononucleosis infecciosa, pero *KIR3DS1* y *KIR2DS1* parecen tener un papel protector frente al desarrollo del linfoma Hodgkin en adultos jóvenes [132].

La variabilidad KIR también ha sido relacionada con patologías de base autoinmune. La psoriasis es un proceso inflamatorio que se produce en la piel en el que la presencia de *KIR2DS1* es un factor de riesgo [133, 134]. La frecuencia de genotipos *KIR2DS2<sup>+</sup>/KIR2DL2<sup>-</sup>* se encuentra significativamente incrementada en pacientes con Esclerodermia respecto a la población sana [135] y en la inflamación vascular asociada a la Artritis Reumatoide [136]. Sin embargo, no existían referencias sobre la variabilidad KIR y su posible efecto en la Esclerosis Múltiple, una enfermedad que ha sido relacionada con el EBV.

### 3.7) **KIR2DS3**

*KIR2DS3* es un gen que pertenece al grupo KIR2D con dominios tipo D1 y D2. El receptor que codifica tendría una estructura similar a los KIR activadores que reconocen la expresión de moléculas HLA-C [137]. Además de los 2 dominios *Ig-like* extracelulares, presenta una cola citoplásmica corta que se asociaría a la molécula señalizadora DAP12 debido a un residuo de lisina en su región transmembrana. Hasta el momento no está demostrada la posible expresión de *KIR2DS3* ni tampoco hay referencias de anticuerpos monoclonales que lo reconozcan específicamente.

En el momento de inicio de este trabajo, en la base de datos IPD-KIR estaban descritas cinco secuencias de *KIR2DS3* que se traducían en 2 proteínas distintas. *KIR2DS3\*001* se encuentra estrechamente ligado a *KIR2DL5B\*002* en la región centromérica de los haplotipos B y estaban descritas cuatro variantes alélicas, (*KIR2DS3\*00101/02/03/04*) [137, 138] que se diferenciaban entre sí por la presencia de polimorfismos sinónimos. Por su parte, *KIR2DS3\*002* es una secuencia única que se diferencia de las cuatro anteriores en un polimorfismo en el exón 8, traducido en un cambio Asp→Asn 250 en la cola citoplásmica. *KIR2DS3\*002* no parecía estar ligado a *KIR2DL5B\*002* y existían indicios de que se asocia al alelo *KIR2DL5A\*005*, localizado en la región telomérica de algunos haplotipos B [139]. Así, el locus *KIR2DS3* podría estar duplicado, al igual que *KIR2DL5*, en las regiones centromérica y telomérica de los haplotipos KIR.

### 3.8) **KIR2DS2\*005**

*KIR2DS2*, al igual que *KIR2DS3*, es un gen KIR2D con 2 dominios *Ig-like* extracelulares D1 y D2, una cola citoplásmica corta que se asocia a la proteína señalizadora DAP12 [140] y se expresa en la membrana de Células NK y Linfocitos T [141]. *KIR2DS2* ha perdido la capacidad de reconocer moléculas HLA-C1 que poseen sus homólogos inhibidores *KIR2DL2* y *KIR2DL3* [142]. Existen varios anticuerpos monoclonales capaces de reconocer *KIR2DS2*, aunque ninguno lo hace específicamente, ya que reconocen epítopos también presentes en *KIR2DL2* y *KIR2DL3* y no se puede discriminar la señal debida a la expresión de cada uno de los genes.

Una característica que dificulta aún más el análisis de la expresión de *KIR2DS2* es que está en desequilibrio de ligamiento casi completo con *KIR2DL2* definiendo la región centromérica de muchos haplotipos B [143], aunque en la base de datos <http://www.allelefreqencies.net> están descritos un total de 105 genotipos KIR poco comunes en los que uno de los dos genes está ausente (62 *KIR2DS2<sup>-</sup>/KIR2DL2<sup>+</sup>* y 43 *KIR2DS2<sup>+</sup>/KIR2DL2<sup>-</sup>*). Hasta el momento están descritas 22 secuencias de *KIR2DS2* que codifican para 8 proteínas distintas. De estas secuencias, sólo *KIR2DS2\*003* y *KIR2DS2\*005* están descritos en individuos *KIR2DL2<sup>-</sup>* [144].

*KIR2DS2\*005* es un alelo descrito a partir de una muestra de cDNA que presenta polimorfismos de *KIR2DS3* en los exones 7, 8 y 9 [144]. La ausencia de información de su secuencia genómica no permite determinar su posible origen recombinante o por evolución convergente al ir acumulando polimorfismos, tampoco existe información del haplotipo en el que esta incluido y, aunque está descrita su secuencia de ARNm, no hay información de su expresión en membrana.

## 4. Esclerosis Múltiple.

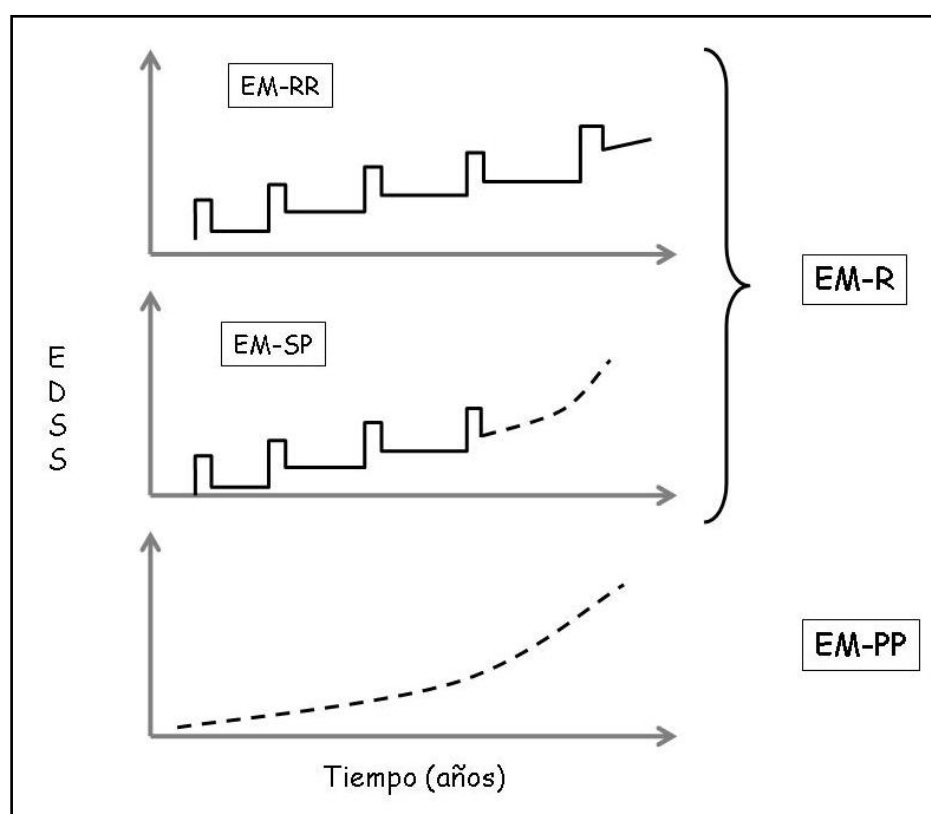
La Esclerosis Múltiple es una enfermedad desmielinizante y neurodegenerativa del Sistema Nervioso Central (SNC). Es la principal causa de incapacidad crónica en adultos jóvenes, con una prevalencia de 40-60 casos por cada 100.000 habitantes en España [145]. Se caracteriza por el desarrollo de procesos inflamatorios del SNC mediados por células del Sistema Inmunológico, desmielinización y posterior degeneración axonal [146].

### 4.1) Formas clínicas y seguimiento de la Esclerosis Múltiple:

En un 80-85% de los casos, la Esclerosis Múltiple se manifiesta con brotes puntuales y autolimitados de inflamación en el SNC (*recurrencias*) seguidos con fases de recuperación de los síntomas (*remitencias*), aunque con frecuencia tras la remitencia no se llega a recuperar totalmente el estado neurológico inicial y se va acumulando un cierto grado de incapacidad. (Fig. 10). Esta forma clínica se conoce como Esclerosis Múltiple Recurrente-Remitente (EM-RR). En algunos pacientes está descrita una evolución “benigna” a lo largo de los años sin

incremento de la discapacidad mientras que en un 1-3% de los casos la Esclerosis Múltiple evoluciona de manera muy agresiva (Esclerosis Múltiple maligna). Tras unos años de evolución, un 60% de los pacientes de RR-MS comienza a incrementar el grado de incapacidad de manera progresiva e independiente de los brotes inflamatorios, dando así lugar a otra forma clínica denominada Esclerosis Múltiple Secundaria Progresiva (EM-SP). Por tanto, a RR-MS y la SP-MS podrían considerarse como 2 fases de una misma enfermedad y en ocasiones pacientes diagnosticados de cualquiera de las dos formas clínicas se agrupan en una misma entidad que recibe el nombre de Esclerosis Múltiple Recurrente (EM-R) [146].

En un 10% de los pacientes de Esclerosis Múltiple existe otra evolución en la que el incremento del grado de discapacidad se produce de manera gradual ya desde las primeras manifestaciones de la enfermedad (Fig. 10). Esta forma clínica recibe el nombre de Esclerosis Múltiple Primaria Progresiva (EM-PP) [146].



**Figura 10.** Evolución del valor del EDSS en las distintas formas clínicas de la Esclerosis Múltiple.

Para determinar el estado puntual de afectación neurológica del paciente de Esclerosis Múltiple se ha desarrollado un parámetro denominado Escala Ampliada del Grado de Discapacidad (*Expanded Disability Status Scale*, EDSS - [147]) que varía en un rango de 0 a

10, siendo el 0 un valor de exploración neurológica normal y 10, fallecimiento. El parámetro MSSS (*Multiple Sclerosis Severity Score*) es un índice de la gravedad del curso clínico de la Esclerosis Múltiple que relaciona el grado de discapacidad (EDSS) con el tiempo que se ha tardado en alcanzarlo. El MSSS también se considera como un factor predictivo. Al igual que con el índice anterior, los valores del MSSS varían entre 0 y 10 [148].

#### **4.2) Factores asociados al riesgo de desarrollar Esclerosis Múltiple:**

La Esclerosis Múltiple es una enfermedad de etiología desconocida, se considera que se produce por factores ambientales que afectan a individuos genéticamente predispuestos a desarrollarla. Están descritos varios factores ambientales y genéticos que se asocian a un mayor riesgo de desarrollar la Esclerosis Múltiple.

##### **4.2.1) Factores ambientales.**

###### a) Latitud geográfica:

Aunque esta idea está en constante revisión, durante muchos años se consideró que la Esclerosis Múltiple presentaba una distribución geográfica con un gradiente Norte-Sur por el que la prevalencia de la enfermedad era más alta en regiones del Norte de Europa y América y disminuía gradualmente en países situados en latitudes inferiores. También se observaba un efecto migratorio según el que en territorios del hemisferio sur colonizados por Noreuropeos, como por ejemplo Australia o Nueva Zelanda, había una mayor prevalencia de la enfermedad [149].

###### b) Exposición solar - Vitamina D:

Ambos factores se encuentran muy relacionados entre sí y con la latitud geográfica, ya que la latitud influye directamente en la duración e intensidad de la exposición a la luz solar. La exposición a la radiación ultravioleta B (UV-B; 290-320nm) de la luz solar inicia el proceso de síntesis de la vitamina D [150]. Se ha observado que tanto la exposición solar prolongada como los niveles elevados de vitamina D en sangre se asocian a una mayor protección frente al desarrollo de la Esclerosis Múltiple [151-153].

###### c) Infección por el virus de Epstein Barr:

El virus de Epstein-Barr (EBV) es el agente que causa la mononucleosis infecciosa. Infecta a los linfocitos B y, una vez resuelta la infección, permanece en ellos de manera latente

[154, 155]. La similitud en las epidemiologías de la Esclerosis Múltiple y la mononucleosis infecciosa propició la idea de la existencia de una posible relación entre ambas entidades [155]. La causa de esta asociación no está definida aún, aunque una posible explicación podría ser el mimetismo molecular entre antígenos del EBV y componentes de las vainas de mielina de los axones [156]. Así, están descritos linfocitos T CD4+ específicos frente a EBNA-1 (*EBV encoded nuclear antigen*) cuyos niveles están significativamente aumentados en pacientes de Esclerosis Múltiple [157-159] o la existencia de péptidos inmunorreactivos procedentes de proteínas del EBV en el líquido cefalorraquídeo de pacientes de Esclerosis Múltiple [160, 161]. El EBV también puede afectar a la función de los linfocitos B, ya que se han encontrado folículos linfoides secundarios ectópicos en meninges de algunos pacientes de SP-MS [162]. En resumen, se considera que la infección por el EBV en individuos genéticamente predispuestos puede ser un factor desencadenante de la enfermedad.

Otro factor determinante en el desarrollo de la Esclerosis Múltiple puede ser la edad a la que se produce la infección por el EBV. Así, la incidencia de la Esclerosis Múltiple se incrementa significativamente cuando se produce un contacto con el EBV a edades más tardías ( $\geq 20$  años), mientras que si la infección tiene lugar en la infancia, la incidencia de la MS se reduce en un 50% [163]. Esta observación concuerda con la “hipótesis de la higiene” [152], según la cual un contacto más temprano con el agente infeccioso sería protector frente al desarrollo de la Esclerosis Múltiple.

#### 4.2.2) Factores genéticos.

##### a) Sistema HLA.

En una región de un tamaño aproximado de 3'5 Mb en el brazo corto del cromosoma 6 (6p23.1) se encuentran los genes del complejo principal de histocompatibilidad humano, junto con otros genes relacionados con la respuesta inmunológica. Se distinguen los genes de las cadenas  $\alpha$  de las moléculas de clase I (HLA-A, B, C, E, F y G) y los genes que codifican para las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de las moléculas de clase II (HLA-DR, DQ, DP, DM y DO). La primera referencia de una asociación entre genes del HLA y Esclerosis Múltiple fue la existente con el haplotipo HLA-A\*03 y B\*07 [164]. La especificidad serológica DR2, que engloba a los alelos de clase II *HLA-DRB1\*15* y *HLA-DRB1\*16*, se encuentra en desequilibrio de ligamiento con los

anteriores y también se asociaba con un mayor riesgo de desarrollar la Esclerosis Múltiple [165, 166]. Actualmente se considera que el haplotipo de clase II que incluye los alelos *DRB1\*15:01* - *DRB5\*01:01* - *DQB1\*06:02* - *DQA1\*01:02* (también conocido como haplotipo DR15) es el principal marcador genético de riesgo [167-169]. El alelo *HLA-DRB1\*15:01* se encuentra significativamente aumentado en pacientes de Esclerosis Múltiple y su presencia aumenta 3.5 veces el riesgo de desarrollar la enfermedad en población sueca [170]. La mayor frecuencia de *HLA-DRB1\*15:01* se observó también en otras poblaciones [168] incluida la española (OR= 2.69 - 3.1) [171-173]. Además de este efecto directo, existen interacciones epistáticas entre *HLA-DRB1\*15:01* y otros genes de HLA de clase I y clase II [174].

#### b) Otros genes implicados

En los *Genome Wide Association Studies* (GWAS) se han ido encontrando otros marcadores genéticos asociados a un mayor riesgo a desarrollar la Esclerosis Múltiple, como por ejemplo polimorfismos presentes en los genes de los receptores de las interleuquinas 2 y 7 (*IL2RA* - *IL7R*; OR= 1.3 - 1.24, respectivamente; [175]), o con un papel protector como es el caso de *STAT3* (OR= 0.87; [176]) o *CD58* (OR= 0.82; [177]). En la región 19q13 se han detectado marcadores de riesgo [178-180]. En el “*Extended LRC*” se describió la existencia de un microsatélite en el intrón 1 de *ApoC2* (Apolipoproteína C2, 19q13.2) que incrementaba el riesgo de desarrollar Esclerosis Múltiple [181]. También en el “*Extended LRC*”, alelos de otras apolipoproteínas como el  $\epsilon 4$  de la *ApoE* se relacionan con un peor curso de la enfermedad [182, 183]. En una posición ~10 Mb más telomérica respecto a los genes *ApoC2* y *ApoE*, se propuso que la delección de *LILRA3* (19q13.4) es un factor de riesgo genético asociado al desarrollo de la Esclerosis Múltiple en población alemana (OR= 2.2; [64]). *LILRA3-del* no ha sido analizado en ninguna otra población, incluyendo la española, en el contexto de la Esclerosis Múltiple y se desconoce si se trata de un factor de riesgo primario o asociado por desequilibrio de ligamiento a otros factores de riesgo localizados en el LRC, como por ejemplo la variabilidad KIR. Se desconoce, por otra parte, el posible efecto de las formas aberrantes de *LILRA3* o de su variabilidad alélica en la etiopatogenia de la Esclerosis Múltiple. Así mismo, nunca se han analizado posibles interacciones epigenéticas de *LILRA3-del* con otros factores de riesgo presentes en otros cromosomas, principalmente *HLA-DRB1\*15:01*.

### 4.3) Esclerosis Múltiple y Células NK:

Las células NK ejercen una doble función, por un lado son capaces de lisar células infectadas o con transformaciones neoplásicas y también pueden secretar citoquinas como IFN- $\gamma$ . Se distinguen las células NK CD56<sup>bright</sup> (de alta expresión del marcador CD56; *neural cell adhesion molecule* - NCAM) KIR<sup>-</sup> que al activarse proliferan y se encargan de la secreción de citoquinas; y las CD56<sup>dim</sup> (de baja expresión de CD56) KIR<sup>+</sup> y tienen capacidad citolítica. Estas 2 poblaciones de Células NK están muy relacionadas entre sí y se considera a las CD56<sup>bright</sup> como posibles precursoras de las CD56<sup>dim</sup> [184].

El papel de las células NK en la patogenia de la Esclerosis Múltiple aún no está definido. Las células CD56<sup>bright</sup> parecen ejercer un papel beneficioso en la Esclerosis Múltiple al aumentar sus niveles en respuesta a los diferentes tratamientos como daclizumab [185], interferon- $\beta$  [186] y ciclofosfamida [187]. Por otra parte, las primeras referencias de estudios de células NK en la Esclerosis Múltiple reflejaron que la disminución de la actividad citolítica de las células NK se correlacionaba con las exacerbaciones de la sintomatología mientras que en las remitencias, las células NK recuperaban su actividad [188-190]. Por otra parte se ha observado una capacidad citolítica de las células NK frente a oligodendrocitos y otras poblaciones de células gliales (astrocitos y microglía) mediada por el receptor NKG2D [191].

Los KIR participan en la defensa frente a infecciones causadas por Herpesvirus [78, 129], que pueden ser el factor desencadenante de desarrollar la Esclerosis Múltiple por su asociación con el EBV, y los niveles de expresión de los KIR en Linfocitos T o en células NK se ven afectados por el curso clínico y por tratamientos como el IFN- $\beta$  [192, 193]. La gran variabilidad existente en el Complejo KIR nunca ha sido analizada en el contexto de la Esclerosis Múltiple y, por la proximidad del Complejo KIR a un posible factor de riesgo como *LILRA3-del*, puede existir una asociación primaria entre los KIR y la Esclerosis Múltiple o por desequilibrio de ligamiento de los KIR y *LILRA3-del*.





# **Objetivos**

*“Gracias... Pero, como usted bien sabe, las apariencias engañan, lo que me lleva a pensar en el motivo por el que estamos aquí. No estamos aquí porque seamos libres. Si estamos aquí es porque no lo somos. No existen motivos para huir, ni hay razón para negar el objetivo, porque ambos sabemos que sin un objetivo, no existiríamos...”*

**Agente Smith, The Matrix**



1. Determinar el modo de herencia y las asociaciones haplotípicas de las variantes de *KIR2DS3*.
2. Determinar la organización de los nuevos haplotipos KIR con duplicaciones y deleciones de varios genes.
3. Analizar la variabilidad del complejo de genes KIR como factor de riesgo para la EM-R
4. Estudiar en población española la deleción de *LILRA3* como factor de riesgo para el desarrollo de la EM-R y su posible interacción con el alelo *HLA-DRB1\*15:01*.
5. Analizar el posible efecto de las formas aberrantes de *LILRA3* y los polimorfismos de su secuencia en la predisposición a desarrollar la EM-R y en su curso clínico.







## ***Publicaciones***

*“Todas las verdades son fáciles de entender una vez descubiertas.*

*El caso es descubrirlas”*

**Galileo Galilei**



## **Artículo 1**

**Publicado en Genes & Immunity (2008) 9, 431–437**



## Duplication, mutation and recombination of the human orphan gene KIR2DS3 contribute to the diversity of KIR haplotypes

D Ordoñez<sup>1</sup>, A Meenagh<sup>2</sup>, N Gómez-Lozano<sup>1</sup>, J Castaño<sup>1</sup>, D Middleton<sup>2</sup> and C Vilches<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Servicio de Inmunología, Hospital Universitario Puerta de Hierro, Madrid, Spain and* <sup>2</sup>*Northern Ireland Regional Histocompatibility and Immunogenetics Laboratory, Belfast City Hospital, Belfast, UK*

### Abstract

The KIR2DS3 gene is an activating homologue of the inhibitory killer-cell immunoglobulin-like receptors (KIR) that recognize HLA-C molecules, enabling NK cells to survey the normal function of endogenous antigen presentation. The genetics of KIR2DS3 is complicated by the existence of alleles with similar coding sequences that map to different regions of the KIR complex in chromosome 19, or whose location in this complex is unknown. Here, by studying the family segregation of the KIR alleles 2DS3\*001, \*002 and \*003N, and the distribution of these in unrelated individuals, we demonstrate the existence of two paralogous KIR2DS3 genes that can be inherited separately or, as it happens frequently in Caucasoids due to linkage disequilibrium, together. Each KIR2DS3 gene is almost invariably associated in its 5'-end to a different copy of KIR2DL5, a gene previously shown to be duplicated in humans. KIR2DL5 and KIR2DS3 thus form two highly homologous gene clusters situated in the centromeric and the telomeric intervals of KIR haplotypes. Recombination between those clusters is the likely origin of new haplotypes, characterized in this study, which harbour further duplications or deletions of multiple KIR genes. Our results help understand the genetics of KIR2DS3 and the diversity of human KIR genotypes.

Keywords: gene duplications; innate immunity; NK cell receptors; orphan genes

## Introduction

The human killer-cell immunoglobulin (Ig)-like receptor (KIR) genes are organized in a complex of ~150 - 200 kb in chromosome 19<sup>1,2</sup>. This is an extremely variable and rapidly evolving region of the mammals' genome that encodes a family of receptors expressed on the surface of NK- and T-lymphocyte subpopulations<sup>3-6</sup>. Some KIR inhibit lymphocyte function upon recognition of HLA class I molecules on potential target cells. By means of these KIR, NK cells survey the normal function of the endogenous antigen presentation pathway, and eliminate infected and tumour cells in which HLA expression is subverted<sup>7</sup>. The KIR complex also codes for activating receptors of unclear physiological role, some of which are structurally homologous to certain inhibitory KIR<sup>8</sup>. Several of those activating KIR are recognized by the same monoclonal antibodies as their inhibitory counter-parts, and appear to interact with the identical ligands, albeit with much lower affinity<sup>9,10</sup>. In contrast, other activating KIR, which have no inhibitory homologues<sup>11</sup>, are detected by none of the available monoclonal antibodies, and their structures, ligands and functions remain unknown or only hypothetical.

KIR genes vary greatly between different individuals, which is explained by two causes. First, KIR genes have evolved rapidly by mutation and recombination to generate multiple alleles at every locus<sup>12,13</sup>. Second and even more conspicuous, the KIR-gene content of different genomes is variable<sup>1,2,14</sup>. Only the genes that mark the ends (*KIR3DL3* and *KIR3DL2*) and the middle (*KIR3DP1* and *KIR2DL4*) of the KIR complex are shared by the vast majority of individuals, and they define two variably arranged regions or intervals: one centromeric (the genes between *KIR3DL3* and *KIR3DP1*) and one telomeric (between *KIR2DL4* and *KIR3DL2*). All other KIR genes appear at different and varying frequencies in each population (reference Middleton et al.<sup>15</sup> and [www.allele-frequencies.net](http://www.allele-frequencies.net)). The different combinations of KIR genes inherited together in a given order are called haplotypes, some of which are more frequent than others<sup>16</sup>. A common combination of nine genes (from centromer to telomer, *KIR3DL3*, *2DL3*, *2DP1*, *2DL1*, *3DP1*, *2DL4*, *3DL1*, *2DS4* and *3DL2*) is often referred to as the 'A' haplotype. In addition, a variety of 'B' haplotypes is formed by the combination of another eight KIR genes (*2DL2*, *2DL5A* and B, *2DS1*, *2DS2*, *2DS3*, *2DS5* and *3DS1*) among them, and also with the previous ones (for example, *KIR2DS4* and *3DL1* are present in ~50% of B haplotypes<sup>16</sup>). The *KIR2DS3* gene (KIR with two Ig-like domains and a short cytoplasmic tail, number 3) is most

similar to the genes encoding activating KIR specific for HLA-C<sup>11</sup>. However, the *KIR2DS3* product and its function are yet to be defined due to a lack of specific reagents. Seven *KIR2DS3* sequences are currently recognized by the Immuno Polymorphism Database (IPD-KIR)<sup>17</sup>. Four of those sequences differ from each other by only synonymous base changes: *2DS3\*00101*<sup>11</sup>, *\*00102* (EMBL/Gen-Bank/DDBJ X97231, R Biassoni), *2DS3\*00103*<sup>18</sup> and *\*00104* (EMBL/GenBank/DDBJ EU277007, C Hurley), to which we will refer collectively as *KIR2DS3\*001*. Another sequence, designated *KIR2DS3\*002*, differs from *\*001* by a base change that induces the substitution of Asn for Asp in the putative *KIR2DS3* cytoplasmic region<sup>19</sup>. Two additional *KIR2DS3* alleles were assigned recently: *KIR2DS3\*003N* is identical to *\*002* except for a nucleotide change in exon 5 that creates a premature termination codon<sup>20</sup>, while *KIR2DS3\*004* is closest to *\*001*, from which it differs by base substitutions in exons 5 and 8.

The precise positions of *KIR2DS3* alleles in KIR haplotypes have not been fully elucidated. Whereas the locations of the newer alleles *KIR2DS3\*003N* and *\*004* are unknown, each of *KIR2DS3\*001* and *\*002* appears to map to a different place of the KIR complex. *KIR2DS3\*00103* is in the centromeric region of KIR haplotypes, forming part of the gene cluster *2DS2-2DL2-2DL5B\*002-2DS3-2DP1-2DL1* (EMBL/GenBank/DDBJ AY320039, unpublished KIR haplotype of cell line WT47, by C Gassner et al). In contrast, *KIR2DS3\*002* was recently reported in Japanese individuals to be located in the telomeric region, between the *KIR3DS1-KIR2DL5A\*005* cluster and *KIR2DS1*<sup>19</sup>. Of note, *KIR2DS3\*001* and *\*002* map immediately 3' of a different copy of the duplicated gene *KIR2DL5*<sup>21</sup> — the centromeric *KIR2DL5B\*002* in the case of *KIR2DS3\*001* and the telomeric *KIR2DL5A\*005* in *KIR2DS3\*002*. These different locations open the possibility that *KIR2DS3\*001* and *\*002*, such as *KIR2DL5A* and *B*, are inherited as two different genes co-existing in the same haplotype, but this possibility has never been specifically explored. Here, we will study the inheritance of *KIR2DS3\*001* and *\*002* to clarify their genetic relationship, and will investigate the diversity of haplotypes containing a *KIR2DS3* gene.

## Results

### 1 - Two *KIR2DS3* genes in the same haplotype: *KIR2DS3\*001* and *\*002*.

To investigate the existence of KIR haplotypes carrying two different copies of *KIR2DS3*, we analysed the segregation of *KIR2DS3\*001* and *\*002* in families of Spanish and Northern Irish Caucasoid origin. To simplify the analysis of inheritance, we selected families in which one parent had both *KIR2DS3\*001* and *\*002*, and the other carried neither. Five such families were identified and, in all of them, part of the *offspring* inherited both *KIR2DS3\*001* and *\*002* (Figure 1.1), which demonstrated that the two *KIR2DS3* variants were not true alleles, but two paralogous genes located in the same haplotype. In two of these families, other siblings were negative for *KIR2DS3* (H241 and H260, Figure 1.1), supporting further the proposed model of inheritance. In another two (H274 and 10/01, Figure 1.1), some children had inherited haplotypes with both *KIR2DS3* variants, whereas the others had received haplotypes carrying *KIR2DS3\*001* alone, revealing that one parent was homozygous for *KIR2DS3\*001* but hemizygous for *KIR2DS3\*002*. Of note, the haplotypes that carried both *KIR2DS3\*001* and *\*002* also contained the identical combination of 14 KIR genes in all five families (Figure 1.1).

<b>Family H241</b>			
Parent 1			
a)	3DL3-2DS2-2DL2- <b>2DL5B*002-2DS3*001</b> -2DP1-2DL1-3DP1-2DL4-3DS1- <b>2DL5A*005-2DS3*002</b> -2DS1-3DL2		
b)	3DL3- -2DL3-	-2DP1-2DL1-3DP1-2DL4-3DL1-	-2DS4-3DL2
Parent 2			
c)	3DL3- -2DL3-	-2DP1-2DL1-3DP1-2DL4-3DL1-	-2DS4-3DL2
d)	3DL3- -2DL3-	-2DP1-2DL1-3DP1-2DL4-3DL1-	-2DS4-3DL2
Sib 1 (a/c or a/d), sib 2 (b/c or b/d)			
<b>Families H260 and 11/99</b>			
Parent 1			
a)	3DL3-2DS2-2DL2- <b>2DL5B*002-2DS3*001</b> -2DP1-2DL1-3DP1-2DL4-3DS1- <b>2DL5A*005-2DS3*002</b> -2DS1-3DL2		
b)	3DL3- -2DL3-	-2DP1-2DL1-3DP1-2DL4-3DL1-	-2DS4-3DL2
Parent 2			
c)	3DL3-2DS2-2DL2-	-3DP1-2DL4-3DL1-	-2DS4-3DL2
d)	3DL3- -2DL3-	-2DP1-2DL1-3DP1-2DL4-3DL1-	-2DS4-3DL2
Family H260: sib 1 (a/c), sib 2 (a/d), sibs 3 and 4 (b/c)			
Family 11/99: sib 1 (a/c)			
<b>Families H274 and 10/01</b>			
Parent 1			
a)	3DL3-2DS2-2DL2- <b>2DL5B*002-2DS3*001</b> -2DP1-2DL1-3DP1-2DL4-3DS1- <b>2DL5A*005-2DS3*002</b> -2DS1-3DL2		
b)	3DL3-2DS2-2DL2- <b>2DL5B*002-2DS3*001</b> -2DP1-2DL1-3DP1-2DL4-3DL1-		-2DS4-3DL2
Parent 2			
c)	3DL3- -2DL3-	-2DP1-2DL1-3DP1-2DL4-3DL1-	-2DS4-3DL2
d)	3DL3- -2DL3-	-2DP1-2DL1-3DP1-2DL4-3DL1-	-2DS4-3DL2
Family H274: sib 1 (a/c or a/d), sibs 2 and 3 (b/c or b/d)			
Family 10/01: sib 1 (a/c or a/d), sib 2 (b/c or b/d)			

**Figure 1.1** Killer-cell immunoglobulin-like receptors (KIR) haplotypes of five Caucasoid families (three Spanish: H241, H260 and H274; and two Northern Irish: 11/99 and 10/01) in which one parent has two *KIR2DS3* alleles and the other lacks *KIR2DS3*: all five families have KIR haplotypes carrying two copies of the *KIR2DS3* gene. The haplotypes inherited by each sibling are indicated below the parental haplotypes. *KIR2DL5* and *KIR2DS3* alleles are highlighted in boldface. Spaces were inserted for aligning identical or homologous genes.

## **2 - Distribution of *KIR2DS3* alleles in the Spanish Caucasoid population.**

We analysed the frequencies and gene associations of *KIR2DS3\*001* and *\*002* in 130 Spanish unrelated healthy donors, 36 of whom had at least one *KIR2DS3* gene (27.7%). In total, 13 individuals had both *KIR2DS3\*001* and *\*002* (10, 36.11% of *KIR2DS3*); 17 carried *KIR2DS3\*001* alone (13.07; 47.22% of *KIR2DS3* positives) and 6 had only *KIR2DS3\*002* (4.61, 16.67% of *KIR2DS3*). Analysis of these data indicated that not only are *KIR2DS3\*001* and *\*002* inherited as different genes, but that they are also in linkage disequilibrium (LD, haplotype frequency: 0.051; LD = 0.042; relative LD = 0.63;  $p < 0.0001$ ).

Of note, the 13 individuals who carried both *KIR2DS3\*001* and *\*002* also had KIR genotypes that always included all 14 genes previously shown to make up haplotypes with two *KIR2DS3* loci (Figure 1.1). Furthermore, with a single exception that is analysed subsequently in detail, each of the two *KIR2DS3* variants was found in the previous sample of Spanish Caucasoids in bi-directional and complete association with one allele of each of the two *KIR2DL5* genes: *2DL5B\*002* with *2DS3\*001*, and *2DL5A\*005* with *2DS3\*002*. These associations are in agreement with the previously reported locations of *KIR2DS3\*001* and *\*002*, that is next to the centromeric and the telomeric *KIR2DL5* loci.

*KIR2DS3\*002* and *KIR2DS5* map to the same location in the telomeric part of the KIR gene complex and they associate with the identical group of genes (*KIR3DS1*, *2DL5A* and *2DS1*), albeit with different *KIR2DL5A* alleles (*2DL5A\*005* and *\*001*, respectively). We therefore investigated whether *KIR2DS5*, present in 41 individuals, was, such as *KIR2DS3\*002*, in LD with *KIR2DS3\*001*. On the contrary, we found *KIR2DS3\*001* and *KIR2DS5* together in only five donors (haplotype frequency = 0.019), implying that these genes are in weakly negative LD (LD = - 0.002; relative LD = 0.085;  $p < 0.05$ ).

## **3 - The novel *KIR2DS3\*003N* is inherited as an allele of *KIR2DS3\*002*.**

After completion of our study on *KIR2DS3\*001* and *\*002*, two new *KIR2DS3* sequences were officially recognized by the IPD-KIR Database. *KIR2DS3\*003N*, identified in three Caucasoid individuals, differs from *KIR2DS3\*002* by one base substitution that produces a premature stop codon in exon 5 (Ig-like domain 2)<sup>20</sup>. *KIR2DS3\*004*, isolated by Dr Carolyn K Hurley from an African American cell, differs from *KIR2DS3\*001* by one base substitution in

each of exons 5 and 8 (<http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/align.html>, unpublished). We screened all of our *KIR2DS3* samples for the new alleles and found neither *KIR2DS3\*004* nor another novel partial *KIR2DS3* sequence, still unrecognized in the IPD-KIR Database, identified by Luo et al<sup>20</sup> in one Caucasoid. In contrast, one Spanish individual, originally typed as *KIR2DS3\*002*, had the new *KIR2DS3\*003N* allele (0.77; 3.33% of *KIR2DS3* positives). Study of segregation in her offspring demonstrated that *KIR2DS3\*003N* was inherited together with *KIR2DS3\*001*. Furthermore, the new allele appeared to substitute for *KIR2DS3\*002* in the aforementioned 14-gene haplotype that contains two *KIR2DS3* genes (Figure 1.2).

Family C50	
Parent 1	
a) 3DL3-2DS2-2DL2-2DL5B*002-2DS3*001-2DP1-2DL1-3DP1-2DL4-3DS1-2DL5A*005-2DS3*003N-2DS1-3DL2	
b) 3DL3- -2DL3-	-2DP1-2DL1-3DP1-2DL4-3DL1- -2DS4-3DL2
Parent 2	
c) 3DL3-2DS2-2DL2-	-2DP1-2DL1-3DP1-2DL4-3DS1- 2DL5A*005-2DS3*002 -2DS1-3DL2
d) 3DL3- -2DL3-	-2DP1-2DL1-3DP1-2DL4-3DS1- 2DL5A*001- 2DS5 -2DS1-3DL2
Sib 1 (a/c), sib 2 (a/d)	

**Figure 1.2** KIR haplotypes of the Spanish family C50: the gene content of haplotype 'a', carrying *2DS3\*001* and *2DS3\*003N*, is identical to that of haplotypes carrying *2DS3\*001* and *2DS3\*002* (Figure 1.1), indicating that *2DS3\*003N* is an allele of the telomeric *2DS3* locus.

#### **4 - Unusual association of *KIR2DL5B\*002* and *KIR2DS3\*002* due to deletion of the intervening genes.**

One of the 130 Spanish Caucasoids presented an exception to the associations of *KIR2DL5B\*002* with *2DS3\*001*, and of *2DL5A\*005* with *2DS3\*002*, as she had *2DL5B\*002* in apparent association with *2DS3\*002* (Figure 1.3, sibling 1). Analysis of KIR genes in her progenitors and four siblings (family C43) confirmed that *KIR2DL5B\*002* and *2DS3\*002* segregated together within an unusual haplotype, which had *KIR2DS2*, *2DL2* and *2DS1*, but lacked other genes frequently linked to these, including *KIR2DP1*, *2DL1*, *3DS1* and *2DL5A*. Furthermore, allelic typing of the family members showed that all of *KIR3DL1*, *2DS4* and the framework KIR genes *3DP1* and *2DL4* were also absent from that haplotype. In summary, the results of PCR studies confirmed with both sequence-specific primers (SSP) and sequence-specific oligonucleotide probes (SSOP) that the donor had inherited a chromosome that carried the 5'- and 3'- most genes of a typical B haplotype, but lacked seven genes that usually lie in their midst—*KIR2DS3\*001*, *2DP1*, *2DL1*, *3DP1*, *2DL4*, *3DS1* and *2DL5A\*005* (Figure 1.3).

Furthermore, we corroborated that *KIR2DL5B\*002* was followed by *KIR2DS3\*002* after long-range PCR across their intergenic regions ('KIR gene walking'). In other words, the unusual association of *KIR2DL5B\*002* with *KIR2DS3\*002* in this family reflects deletion of all the genes that normally separate them in the aforementioned 14-gene haplotype containing two *KIR2DL5* and two *KIR2DS3* loci.

Family C43		Deleted genes	
Parent 1			
a)	3DL3-2DS2-2DL2- <b>2DL5B*002</b> - <del>2DS3*001-2DP1-2DL1-3DP1*003-2DL4</del> - 3DS1*013 - 2DL5A*005- <b>2DS3*002</b> -2DS1 - 3DL2		
b)	3DL3-2DS2-2DL2-2DL5B*002-2DS3*001-2DP1-2DL1-3DP1*003-2DL4*00102-3DL1*01502-		-2DS4*001-3DL2
Parent 2			
c)	3DL3-2DS2-2DL2-	-3DP1*001-2DL4*00102-3DL1*002-	-2DS4*001-3DL2
d)	3DL3- -2DL3-	-2DP1-2DL1-3DP1*003-2DL4*005 - 3DL1*005-	-2DS4*003-3DL2
Sibs 1 and 2 (a/c), sibs 3, 4 and 5 (a/d), sib 6 (b/c)			

**Figure 1.3** Killer-cell immunoglobulin-like receptors (KIR) haplotypes of the Spanish family C43: seven KIR genes that normally separate *KIR2DL5B\*002* from *KIR2DS3\*002* (light grey), including the central framework genes, are deleted in haplotype 'a' of progenitor 1. The deletion results in an uncommon association of the centromeric gene *KIR2DL5B\*002* with the telomeric *KIR2DS3\*002* (both boldfaced); juxtaposition of the two genes was demonstrated by KIR gene walking.

### **5 - Unexpected association of *KIR2DL5A\*005* and *KIR2DS3\*001* in the boundary of a six-gene tandem duplication**

We observed another exception to the usual associations of *KIR2DL5* and *KIR2DS3* alleles in an Irish Caucasoid family (12/04) in which two *KIR2DL5A* alleles (*2DL5A\*001* and *\*005*) had been observed previously to segregate together in the same haplotype<sup>16</sup>. In that haplotype, *KIR2DL5A\*005* appeared to be accompanied by *KIR2DS3\*001*, instead of *KIR2DS3\*002*. Relative mapping by the KIR gene walking technique showed that the 3'-end of *KIR2DL5A\*005* was indeed followed, successively, by *KIR2DS3\*001* and *KIR2DP1*, two genes normally lying in the centromeric interval of KIR haplotypes. Using a similar approach, we demonstrated that the haplotype of interest contained both *KIR2DL5A\*001* and *\*005*, as well as two copies of the *KIR2DL4-KIR3DS1* gene group, one preceding each of the *KIR2DL5A* genes; and that the usual arrangement *KIR2DL5A\*001-KIR2DS5-KIR2DS1* was preserved (Figure 1.4). Furthermore, allelic typing by PCR-SSOP showed that two different *KIR2DL1* alleles (*2DL1\*003* and *\*004*) were inherited together in this haplotype, evidencing a duplication of *KIR2DL1*. Figure 1.4 depicts the inheritance of KIR genes in this family and the most likely arrangement of the unusual haplotype. Six KIR genes (*2DP1*, *2DL1*, *3DP1*, *2DL4*, *3DS1* and *2DL5A*) are duplicated in tandem. *KIR2DS3\*001*, one of the genes normally preceding such cluster, separates the two

repeats, thus constituting, with the *KIR2DL5A\*005* allele of the centromeric repeat, the unusual association that characterizes the haplotype. A seemingly identical duplication was observed in a KIR haplotype of another Northern Irish family, 30/00, having no demonstrable relationship with the previous one (data not shown). Of note, the extra genes found in the eighteen-gene haplotype characterized herein match exactly the seven deleted genes in the seven-gene haplotype analysed in the previous section (Figures 1.3 and 1.4).

Family 12/04	
Parent 1	
a) 3DL3-	-2DL3*001- <b>-2DP1-2DL1*003-3DP1-2DL4*005 = 3DS1*013=<b>2DL5A*005</b>=2DS3*001-2DP1-2DL1*004-3DP1-2DL4*005=3DS1*013=2DL5A*001</b> -2DS5=2DS1-3DL2
b) 3DL3-	-2DL3*002- -2DP1-2DL1*002-3DP1-2DL4*00201-3DL1*004- -2DS4-3DL2
Parent 2	
c) 3DL3-2DS2-2DL2*001-2DL5B*002-2DS3*001-2DP1-2DL1*004-3DP1-2DL4*00202-3DL1*009-	-2DS4-3DL2
d) 3DL3-	-2DL3*002- -2DP1-2DL1*002-3DP1-2DL4*00102-3DL1*007- -2DS4-3DL2
Sibs 1, 2 and 3 (a/c), sib 4 (b/c), sib 5 (b/d)	

**Figure 1.4** Killer-cell immunoglobulin-like receptors (KIR) haplotypes of the Northern Irish family 12/04: the genes that normally separate the centromeric and the telomeric *KIR2DL5-KIR2DS3* clusters are duplicated in a KIR haplotype ('a') characterized by presence of two *KIR2DL5A* genes and the unusual association of *KIR2DL5A\*005* and *KIR2DS3\*001* (in bold). The genes duplicated are boxed; double hyphens represent gene contiguities demonstrated experimentally by KIR gene walking.

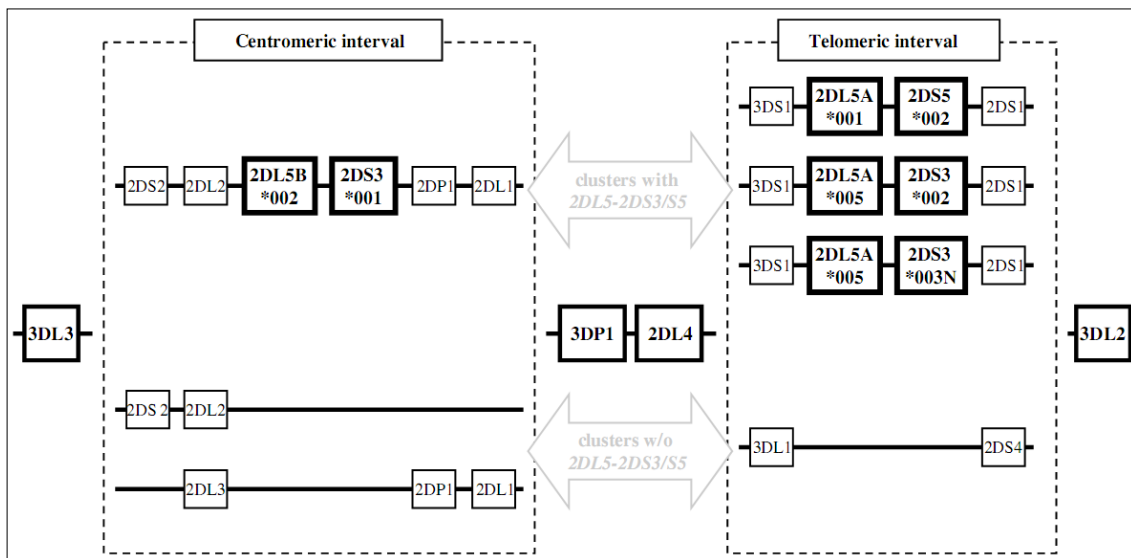
## Discussion

The gene *KIR2DS3* is represented by at least two common variants, *2DS3\*001* and *\*002*, in the few populations in which its polymorphism has been studied<sup>19,20</sup>. Here, by showing that *2DS3\*001* and *\*002* frequently co-exist in the same chromosome, we have demonstrated that these variants are in fact two different *KIR2DS3* genes that can be inherited separately or, nearly as frequently, together. This result is consistent with previous studies that mapped *KIR2DS3* to either or both the centromeric and the telomeric intervals of the KIR complex<sup>19,22,23</sup>, where *KIR2DS3* is part of the characteristic gene arrangements of the 'B'-type haplotypes of Caucasoids (Figure 1.5). Both *KIR2DS3* paralogues are invariably preceded by *KIR2DL5*, indicating that the two genes possibly duplicated in tandem in a single genetic event. Given the strong LD between *KIR2DS3\*001* and *\*002*, and the frequent integration of both in a characteristic 14-gene haplotype (Figure 1.1), the duplication of *KIR2DS3* is likely recent, although natural selection might have contributed to maintain those genes together.

As we have also shown here, the recently reported sequence *KIR2DS3\*003N* is inherited with the same group of genes as *KIR2DS3\*002* (Figure 1.6), from which it differs by only a premature termination codon<sup>20</sup>. Thus, despite a lack of physical mapping data, *KIR2DS3\*003N* behaves as an allele of the telomeric *KIR2DS3* locus. Furthermore, *2DS5\*002*, the predominant *KIR2DS5* allele in most ethnic groups<sup>15</sup>, maps to an identical position as *KIR2DS3\*002*<sup>1</sup>. Therefore, although *KIR2DS3\*002* and *\*003N* on one hand, and *KIR2DS5\*002* on the other, are currently assigned to different KIR genes due to distinctive sequence motifs, all three sequences can be considered alleles of a single *KIR2DS3/2DS5* locus, situated between *KIR2DL5A* and *KIR2DS1* in the telomeric interval of multiple KIR haplotypes of the 'B'-type. According to this model, haplotypes carrying both *KIR2DS3* and *KIR2DS5* in Caucasoids should always have *KIR2DS3\*001*, and never *2DS3\*002* or *\*003N*, unless they contain unusual gene arrangements like those described here (Figure 1.4). This prediction is met by all the KIR haplotypes of Spanish Caucasoids we have studied (not shown).

The genetic relationship between *KIR2DS5* and the telomeric *KIR2DS3* alleles is further supported by their sequence identity in exons seven through nine, including the 3'-untranslated region (our own unpublished observation). In contrast, exons one through six of *KIR2DS3\*002* and *\*003N* diverge by 25–26 nucleotides from those of *KIR2DS5\*002* and match exactly, or

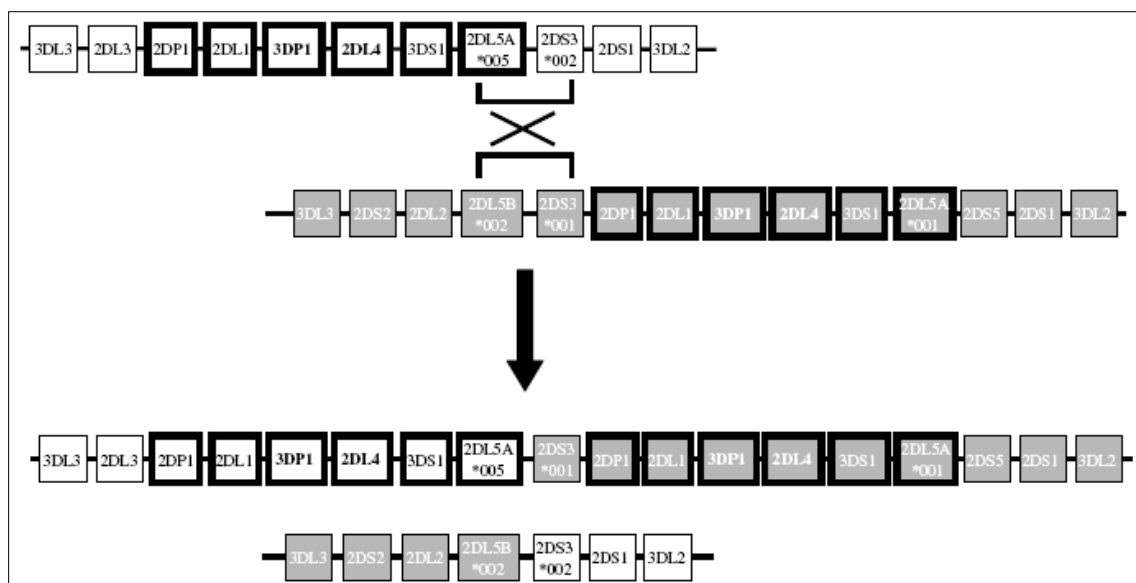
nearly so, the corresponding regions of the centromeric *KIR2DS3\*001*; which, in turn, differs from the telomeric *KIR2DS3/2DS5* alleles in its 3'-end (exon 7 and the 3'-untranslated region). This pattern of sequence homologies suggests that duplication, gene conversion and point mutation all contributed to the diversity of these KIR. The facts that *KIR2DS3\*001* is frequently seen in haplotypes both with and without *KIR2DS3\*002*, while the latter gene is less commonly found in the absence of *KIR2DS3\*001*, suggest a more recent origin for *KIR2DS3\*002*, which might derive from recombination of *KIR2DS3\*001* with *KIR2DS5*.



**Figure 1.5** Common arrangements of killer-cell immunoglobulin-like receptors (KIR) genes in Caucasoids. Intergenic regions are not drawn to scale, but elongated where needed for aligning identical or homologous genes.

Further supporting the recent duplication of *KIR2DS3* and *KIR2DL5*, their centromeric and telomeric paralogues have very similar coding regions—*KIR2DL5B\*002* and *2DS3\*001* differ by one nucleotide substitution from *2DL5A\*005* and *2DS3\*002*, respectively<sup>19,24</sup>. Moreover, the intergenic region is indistinguishable in the two *KIR2DL5-KIR2DS3* clusters (our own unpublished observation), which therefore constitute two continuous segments of nearly identical sequence, each spanning more than 20 kb. These regions are possibly prone to chromatid misalignment during meiosis, and to further asymmetrical recombination between the centromeric and the telomeric regions of the KIR gene complex. This is likely the origin of two unusual KIR haplotypes also characterized here (Figures 1.3 and 1.4), which are distinguished by the deletion and the duplication of all the genes that lie in the middle of the two *KIR2DL5-KIR2DS3* clusters. Both haplotypes, identified in Caucasoid families of Spanish and Northern Irish origin, could therefore derive from the same unequal crossingover event, as depicted in

Figure 1.6. Of note, human *KIR2DL5* was previously known to be encoded by two genes, *KIR2DL5A* and *B<sup>21</sup>*; the duplication of the *KIR2DL5A* locus described herein opens the possibility that haplotypes with three copies of *KIR2DL5* might have been formed by symmetric recombination of the new haplotype with ones containing a *KIR2DL5B* gene in the centromeric interval. To our knowledge, such haplotypes with three *KIR2DL5* genes have never been reported. However, little work has been performed on haplotypes and, in haplotypes that have been reported, there is always the possibility of two copies of *KIR2DL5A* gene being present with the same allele, accompanied by the *KIR2DL5B* gene and thus not being detected by regular genotyping methods.



**Figure 1.6.** Recombination between the centromeric and the telomeric *KIR2DL5-KIR2DS3* clusters would generate KIR haplotypes with gene deletions and duplications like those characterized in our study (Figures 1.3 and 1.4). The two *KIR2DL5-KIR2DS3* clusters have nearly identical sequences; therefore, recombinations at different places within them would give rise to the same result. Genes derived from each original chromosome are marked with white or grey boxes; duplicated genes are boxed with thicker lines and the central framework genes *KIR3DP1* and *KIR2DL4* are represented in bold type.

The functional implications of the *KIR2DS3* sequence diversity are unknown. Several of the changes that distinguish *KIR2DS3* alleles are synonymous or lie in untranslated regions. Furthermore, the receptors encoded by *KIR2DS3\*001* and *\*002* are predicted to have identical extracellular domains and, therefore, to recognize the same ligands, while they should differ in their cytoplasmic tails (aspartate vs asparagine in amino-acid residue 250, respectively). Development of specific antibodies should help elucidate the functional relevance of the *KIR2DS3* polymorphism and other unknown aspects of its biology.

## Materials and methods

### Genotyping

The distribution of *KIR2DS3* alleles was studied in 130 DNA samples isolated from unrelated Spanish Caucasoid voluntary donors, and in nine families selected on the basis of their KIR genotypes, assigned in previous studies. Families 11/99, 10/01, 12/04 and 30/00 were of Northern Irish origin, and families H241, H260, H274, C43 and C50 were Spanish Caucasoids. Presence or absence of every KIR gene in the genome was assessed by PCR-SSP or PCR-SSOP<sup>25,26</sup>. Allelic typing of *KIR2DL1*, *2DL2*, *2DL3*, *2DL4*, *2DL5*, *3DL1*, *3DS1* and *3DP1* was performed by PCR-SSOP or PCR-SSP (<sup>24,27–32</sup> and unpublished results). Subtyping of *KIR2DS3* was performed by means of two PCR-SSP reactions, each of which combined the reverse primer Rg1238 (acacctctgatgtgcc) with either Fg1160 (for *KIR2DS3\*001*, tcatcgtggtgctccg) or Fcon1160 (for *KIR2DS3\*002*, tcatcgtggtgctcca). PCR conditions were: 95°C 2min, 10 cycles of 20 s at 94°C, 10 s at 65°C, 1min at 72°C and 20 cycles of 20 s at 94°C, 10 s at 61°C, 1min at 72°C. The reactions for *KIR2DS3\*001* and *2DS3\*002* cross-amplified *2DS2\*005* and *2DS5*, respectively. To resolve the first indetermination, we ruled out the presence of *KIR2DS2\*005* by PCR-SSP with LFt970 (gctcttccgtgactctccctat) and LRg1160 (ctgcttcgtgagactactttttgtc). To identify a potentially concealed *KIR2DS3\*002* allele in cells having both *KIR2DS5* and *KIR2DS3\*001*, we performed a sequence-based typing approach. To this end, exons 6 through 8 of *KIR2DS3* (5 kb, approximately) were amplified by PCR with primers LFcon1019b (ctctcctgtctcatattctagaaacc) and LRg1192 (ttctgttccccgcaggcc), using LA Taq polymerase (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) in the following conditions: 95°C 2min, 10 cycles of 10 s at 95°C, 8min at 72°C and 20 cycles of 10 s at 95°C, 8min at 68°C. Then, exons 6 and 7 were sequenced with primers Ri6+104 (tcggagatggtggaagac) and R5i71 (tctgtgagctgaaggcag), using the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and a local 3100-Avant automated DNA Sequencer (Applied Biosystems). The new allele *KIR2DS3\*003N* and a partial *KIR2DS3* sequence lacking an official designation<sup>20</sup> were detected using the PCR primers Fa796 + Ra925 (agcgtgacctgtctctga and gcatctgtaggttctct) and Fc551 + Rt682 (agagaggggacgtttaacc and ggtcactgggagctgaa), respectively, in the PCR conditions described elsewhere<sup>25</sup>. To discriminate *KIR2DS3\*001* from the novel allele *KIR2DS3\*004*, we used a PCR-restriction fragment length polymorphism technique. PCR products generated with

the primers Fg1160 and Rg1238 in the above conditions were treated with the restriction endonuclease PstI (Pharmacia, Uppsala, Sweden), which has a cleavage site in exon 8 of *KIR2DS3\*004*, but not *\*001* (ctgcag vs ctgcgg at nucleotides 845–850 of the coding sequence, not shown). As positive controls, we used amplicons produced with the PCR primers Fg1160 and Rcon1238 (gacacctctgatggtct) from the homologous regions of *KIR2DS1* and *KIR2DS4*, genes which share with *KIR2DS3\*004* the PstI-cleavage site in exon 8<sup>33</sup>. Statistical significance of LD was estimated using the  $X^2$ -test.

### ***KIR gene walking***

The KIR gene content and order in a haplotype of family 12/04, bearing a *KIR2DL5A* duplication, was investigated in the DNA sample MIS6448 (parent 1 in Figure 1.4), using a KIR gene walking protocol similar to those we have reported previously<sup>24,34</sup>. In summary, the intergenic region of interest, along with the preceding and consecutive exons of the flanking KIR genes, was amplified by combining one gene-specific and one KIR-generic primers in a long-range PCR in the following cycling conditions: 95°C 2min, 10 cycles of 10 s at 95°C, 10-20min at 72°C and 20 cycles of 10 s at 95°C, 10 - 20min at 68 - 70°C. The same technique was used in cell C43 (sibling 1 in Figure 1.3) to demonstrate the juxtaposition of *KIR2DL5B\*002* and *KIR2DS3\*002*. The precise PCR profiles and primer combinations used in every reaction are available upon request. Gene order was determined by analysing the nucleotide sequence of the PCR products as described above.

### **Abbreviations**

KIR, killer-cell Ig-like receptor; LD, linkage disequilibrium; SSOP, sequence-specific oligonucleotide probe; SSP, sequence-specific primer.

### **Acknowledgements**

This work was supported by grant BFU2005–04622 from the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia (to CV).

### **Conflict of interest**

The authors have no financial or commercial conflicts of interest.

## References

1. Wilson MJ, Torkar M, Haude A, Milne S, Jones T, Sheer D et al. Plasticity in the organization and sequences of human KIR/ILT gene families. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 4778–4783
2. Martin AM, Freitas EM, Witt CS, Christiansen FT. The genomic organization and evolution of the natural killer immunoglobulin-like receptor (KIR) gene cluster. *Immunogenetics* 2000; 51: 268–280.
3. Colonna M, Samaridis J. Cloning of immunoglobulin super-family members associated with HLA-C and HLA-B recognition by human natural killer cells. *Science* 1995; 268: 405–408.
4. Wagtmann N, Biassoni R, Cantoni C, Verdiani S, Malnati MS, Vitale M et al. Molecular clones of the p58 NK cell receptor reveal immunoglobulin-related molecules with diversity in both the extra- and intracellular domains. *Immunity* 1995; 2: 439–449.
5. Moretta L, Moretta A. Killer immunoglobulin-like receptors. *Curr Opin Immunol* 2004; 16: 626–633.
6. Vilches C, Parham P. KIR: Diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 2002; 20:217–251.
7. Kärre K. How to recognize a foreign submarine. *Immunol Rev* 1997; 155: 5–9.
8. Biassoni R, Cantoni C, Falco M, Verdiani S, Bottino C, Vitale M et al. The human leukocyte antigen (HLA)-C-specific ‘activatory’ or ‘inhibitory’ natural killer cell receptors display highly homologous extracellular domains but differ in their transmembrane and intracytoplasmic portions. *J Exp Med* 1996; 183:645–650.
9. Biassoni R, Pessino A, Malaspina A, Cantoni C, Bottino C, Sivori S et al. Role of amino acid position 70 in the binding affinity of p50.1 and p58.1 receptors for HLA-Cw4 molecules. *Eur J Immunol* 1997; 27: 3095–3099.
10. Winter CC, Gumperz JE, Parham P, Long EO, Wagtmann N. Direct binding and functional transfer of NK cell inhibitory receptors reveal novel patterns of HLA-C allotype recognition. *J Immunol* 1998; 161: 571–577.
11. Dohring C, Samaridis J, Colonna M. Alternatively spliced forms of human killer inhibitory receptors. *Immunogenetics* 1996; 44: 227–230.

12. Norman PJ, Abi-Rached L, Gendzekhadze K, Korbel D, Gleimer M, Rowley D et al. Unusual selection on the KIR3DL1/S1 natural killer cell receptor in Africans. *Nat Genet* 2007; 39: 1092–1099; e-pub 12 Aug 2007.
13. Marsh SG, Parham P, Dupont B, Geraghty DE, Trowsdale J, Middleton D et al. Killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) nomenclature report, 2002. *Tissue Antigens* 2003; 62: 79–86.
14. Uhrberg M, Valiante NM, Shum BP, Shilling HG, Lienert-Weidenbach K, Corliss B et al. Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. *Immunity* 1997; 7: 753–763.
15. Middleton D, Meenagh A, Moscoso J, Arnaiz-Villena A. Killer immunoglobulin receptor gene and allele frequencies in Caucasoid, Oriental and Black populations from different continents. *Tissue Antigens* 2008; 71: 105–113.
16. Middleton D, Meenagh A, Gourraud PA. KIR haplotype content at the allele level in 77 Northern Irish families. *Immunogenetics* 2007; 59: 145–158.
17. Robinson J, Waller MJ, Fail SC, Marsh SG. The IMGT/HLA and IPD databases. *Hum Mutat* 2006; 27: 1192–1199.
18. Valiante NM, Uhrberg M, Shilling HG, Lienert-Weidenbach K, Arnett KL, D'Andrea A et al. Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors. *Immunity* 1997; 7: 739–751.
19. Yawata M, Yawata N, Draghi M, Little AM, Partheniou F, Parham P. Roles for HLA and KIR polymorphisms in natural killer cell repertoire selection and modulation of effector function. *J Exp Med* 2006; 203: 633–645.
20. Luo L, Du Z, Sharma SK, Cullen R, Spellman S, Reed EF et al. Chain-terminating natural mutations affect the function of activating KIR receptors 3DS1 and 2DS3. *Immunogenetics* 2007; 59: 779–792.
21. Gomez-Lozano N, Gardiner CM, Parham P, Vilches C. Some human KIR haplotypes contain two KIR2DL5 genes: KIR2DL5A and KIR2DL5B. *Immunogenetics* 2002; 54: 314–319.
22. Hsu KC, Chida S, Geraghty DE, Dupont B. The killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genomic region: gene order, haplotypes and allelic polymorphism. *Immunol Rev* 2002; 190: 40–52.

23. Carrington M, Norman P. The KIR Gene Cluster. National Library of Medicine, National Center for Biotechnology Information: Bethesda, MD, 2003.
24. Gómez-Lozano N, Trompeter HI, de Pablo R, Estefanía E, Uhrberg M, Vilches C. Epigenetic silencing of potentially functional KIR2DL5 alleles: implications for the acquisition of KIR repertoires by NK cells. *Eur J Immunol* 2007; 37: 1954–1965.
25. Vilches C, Castaño J, Gómez-Lozano N, Estefanía E. Facilitation of KIR genotyping by a PCR-SSP method that amplifies short DNA fragments. *Tissue Antigens* 2007; 70: 415–422.
26. Middleton D, Curran M, Maxwell L. Natural killer cells and their receptors. *Transpl Immunol* 2002; 10: 147–164.
27. Keaney L, Williams F, Meenagh A, Sleator C, Middleton D. Investigation of killer cell immunoglobulin-like receptor gene diversity III. KIR2DL3. *Tissue Antigens* 2004; 64: 188–194.
28. Halfpenny IA, Middleton D, Barnett YA, Williams F. Investigation of killer cell immunoglobulin-like receptor gene diversity: IV. KIR3DL1/S1. *Hum Immunol* 2004; 65: 602–612.
29. Maxwell LD, Williams F, Gilmore P, Meenagh A, Middleton D. Investigation of killer cell immunoglobulin-like receptor gene diversity: II. KIR2DS4. *Hum Immunol* 2004; 65: 613–621.
30. Williams F, Meenagh A, Sleator C, Middleton D. Investigation of killer cell immunoglobulin-like receptor gene diversity: I. KIR2DL4. *Hum Immunol* 2004; 65: 31–38.
31. Gómez-Lozano N, Vilches C. Genotyping of human killer-cell immunoglobulin-like receptor genes by polymerase chain reaction with sequence-specific primers: an update. *Tissue Antigens* 2002; 59: 184–193.
32. Gómez-Lozano N, Estefanía E, Williams F, Halfpenny I, Middleton D, Solís R et al. 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* 2005; 35: 16–24.
33. García CA, Robinson J, Guethlein LA, Parham P, Madrigal JA, Marsh SG. Human KIR sequences 2003. *Immunogenetics* 2003;55: 227–239.
34. Vilches C, Gardiner CM, Parham P. Gene structure and promoter variation of expressed and non-expressed variants of the KIR2DL5 gene. *J Immunol* 2000; 165: 6416–6421.

## **Artículo 2**



## NEW ALLELE Alerts

**The 5' intergenic, promoter, pseud exon 3 and complete coding sequences of the hybrid gene *KIR2DS3\*002***

D. Ordóñez, N. Gómez-Lozano &amp; C. Vilches

Servicio de Inmunología, Hospital Universitario Puerta de Hierro, Madrid, Spain

**Key words:** innate immunity; KIR; natural killer cells; polymorphism

Genomic and mRNA sequences support the *KIR2DS3\*002* gene being a hybrid of *KIR2DS3\*00103* and *KIR2DS5*.

The *KIR2DS3* gene belongs to the lineage of killer-cell immunoglobulin-like receptors (KIR) that recognise human leukocyte antigen-C molecules, but its encoded product and ligand are yet to be identified. In the populations in which *KIR2DS3* polymorphism has been analysed, the predominant sequence is *KIR2DS3\*00103*, which associates in its 5' end to the *KIR2DL5B\*002* gene. Second in frequency is *KIR2DS3\*002*, discovered in the Japanese population by Yawata et al. (1), who obtained a partial mRNA sequence and mapped it to the telomeric end of *KIR2DL5A\*005*. The latter *KIR*, in turn, had been isolated from a Spanish Caucasoid haplotype that also contained a *KIR2DS3* gene (2). We have recently shown *KIR2DS3\*002* to be a paralogue, not an allele, of *KIR2DS3\*001* (3). To explore further the polymorphism of *KIR2DS3* in

different ethnic groups, we amplified its cDNA from the original Spanish Caucasoid cell in which *KIR2DL5A\*005* was characterised, using three different combinations of gene-specific and *KIR*-generic polymerase chain reaction (PCR) primers (oligonucleotide sequences and PCR conditions available upon request). The cDNA sequence obtained from that cell (EM06, EMBL/GenBank/DDBJ accession no. AM851002) matched exactly the partial *KIR2DS3\*002* coding sequence reported in the Japanese, and extended it to 36 and 242 base pairs into the 5' and 3' untranslated regions (UTR), respectively. The name *KIR2DS3\*002* was officially assigned to AM851002 as a confirmation of the previously available sequence, following the policy established in the KIR Nomenclature Report (4). In the coding region, *KIR2DS3\*002* shows a complete match to *KIR2DS3\*00103* except for the already known substitution in exon 7 that distinguishes *KIR2DS3\*002* from *KIR2DS3\*001* (codon 250: AAC, asparagine, for GAC, aspartate). In the 3' UTR, we found an additional change (nucleotide 75, G to C) that differentiates *KIR2DS3\*002* from all *KIR2DS3\*001* alleles

in which such region has been determined. At both positions, as well as in the rest of exons 7–9, *KIR2DS3\*002* shares its sequence with *KIR2DS5\*002* (5).

To characterise other relevant non-coding regions of *KIR2DS3\*002*, we amplified, from genomic DNA of EM06, a 6.5-kbp-long segment that spans from the last exon of *KIR2DL5A\*005* to exon 4 of *KIR2DS3\*002* (PCR primers: LF1450 cttctaggagacaacagccctg, and LRg621, gccctgccaggtcttgc; conditions available upon request). Sequence analysis of the PCR product (EMBL/GenBank/DBJ FM164425) enabled us to show the contiguity of the genes *KIR2DL5A\*005* and *KIR2DS3\*002* in cell EM06; to characterise their intergenic region and to determine the nucleotide sequence of *KIR2DS3\*002* at the promoter, 5' UTR and pseudoexon 3 regions. In all of these, the *KIR2DS3\*002* sequence matches exactly those reported previously for *KIR2DS3\*00103* [reference (6) and EMBL/GenBank/DBJ AY320039; C. Gassner, L. M. Williams, T. Yamashita, A. Selvakumar, B. Dupont, D. E. Geraghty, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA (unpublished data; *KIR* haplotype of cell line WT47)]. In summary, we present here the 5' intergenic, promoter, pseudoexon and complete coding sequences of *KIR2DS3\*002* in a Caucasoïd individual. Comparison of *KIR2DS3\*002* with other *KIR* shows its identity with *KIR2DS3\*00103* in the 5' end (from the 5' intergenic region through exon 6), and with *KIR2DS5\*002* in the 3' exons (seventh through ninth), further supporting that *KIR2DS3\*002* might have been evolved by duplication and gene conversion (1). Our study also shows that the *KIR2DS3\*002* coding sequence and its genetic linkage with *KIR2DL5A\*005* are conserved in both Caucasoïd and Mongoloïd populations.

#### Correspondence

Carlos Vilches  
Servicio de Inmunología  
Hospital Universitario Puerta de Hierro

San Martín de Porres 4  
28035 Madrid  
Spain  
Tel: +34 9 1344 5459  
Fax: +34 9 1316 0644  
e-mail: carlos.vilches@yahoo.com

Received 12 July 2008; accepted 29 July 2008  
doi: 10.1111/j.1399-0039.2008.01126.x

#### Acknowledgment

This work was funded by a grant from the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia (BFU-2005-04622).

#### References

1. Yawata M, Yawata N, Draghi M, Little AM, Partheniou F, Parham P. Roles for HLA and KIR polymorphisms in natural killer cell repertoire selection and modulation of effector function. *J Exp Med* 2006; **203**: 633–45.
2. Gómez-Lozano N, Trompeter HI, de Pablo R, Estefanía E, Uhrberg M, Vilches C. Epigenetic silencing of potentially functional KIR2DL5 alleles: implications for the acquisition of KIR repertoires by NK cells. *Eur J Immunol* 2007; **37**: 1954–65.
3. Ordóñez D, Meenagh A, Gómez-Lozano N, Castaño J, Middleton D, Vilches C. Duplication, mutation and recombination of the human orphan gene *KIR2DS3* contribute to the diversity of KIR haplotypes. *Genes Immun* 2008; **9**: 431–7.
4. Marsh SGE, Parham P, Dupont B et al. Killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) nomenclature report, 2002. *Tissue Antigens* 2003; **62**: 79–86.
5. Vilches C, Pando MJ, Rajalingam R, Gardiner CM, Parham P. Discovery of two novel variants of KIR2DS5 reveals this gene to be a common component of human KIR 'B' haplotypes. *Tissue Antigens* 2000; **56**: 453–6.
6. Vilches C, Pando MJ, Parham P. 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* 2000; **51**: 639–46.





## **Artículo 3**

**Publicado en Genes & Immunity (2011) 12, 544-551**



## Molecular characterisation of KIR2DS2\*005, a fusion gene associated with a shortened KIR haplotype

D Ordóñez, N Gómez-Lozano, L Rosales and C Vilches

*Inmunogenética—HLA, Hospital Universitario Puerta de Hierro, Majadahonda, Spain*

### Abstract

KIR2DS2 is an activating homologue of KIR2DL2, an inhibitory killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) that surveys expression of major histocompatibility complex-C allotypes bearing a C1 epitope. We have studied here its allele KIR2DS2\*005, which shows a hybrid structure—it is identical to other KIR2DS2 alleles in the ectodomain, but has transmembrane and cytoplasmic regions identical to those of KIR2DS3\*001, a short-tailed KIR of uncertain expression and function. Our results reveal that KIR2DS2\*005 is a fusion gene—the product of an unequal crossing over by which the genes KIR2DS2 and KIR2DS3 recombined within a 400 base pair region of complete identity in intron 6. Also resulting from that recombination was a shortened KIR haplotype of the B group, in which three genes commonly linked to KIR2DS2 (KIR2DL2, KIR2DL5B and KIR2DS3) are deleted. Population studies indicate that KIR2DS2\*005 is still associated to such haplotype, and it can be found in approximately 1.2% of Caucasoids. Using a combination of two monoclonal antibodies, we also demonstrate that KIR2DS2\*005 encodes a molecule expressed on the surface of natural killer- and T-lymphocytes.

**Keywords:** copy number variation; killer-cell immunoglobulin-like receptors; major histocompatibility complex; natural killer cells; recombination; allelic polymorphism

## **Artículo 4**

**Publicado en Genes & Immunity (2009) 6, 579-85**



## Multiple sclerosis associates with LILRA3 deletion in Spanish patients

D Ordóñez<sup>1</sup>, AJ Sánchez<sup>2</sup>, JE Martínez-Rodríguez<sup>3</sup>, E Cisneros<sup>1</sup>, E Ramil<sup>2</sup>, N Romo<sup>4</sup>, M Moraru<sup>1</sup>, E Munteis<sup>3</sup>, M López-Botet<sup>4</sup>, J Roquer<sup>3</sup>, A García-Merino<sup>2</sup> and C Vilches<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Inmunogenética - HLA, Hospital Universitario Puerta de Hierro, Majadahonda, Spain;* <sup>2</sup>*Neuroinmunología, Hospital Universitario Puerta de Hierro, Majadahonda, Spain;* <sup>3</sup>*Neurología, Hospital del Mar-Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM), Barcelona, Spain and* <sup>4</sup>*Molecular Immunopathology Unit, IMIM-Hospital del Mar, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain*

### Abstract

The genetic susceptibility to multiple sclerosis (MS) is only partially explained, and it shows geographic variations. We analyse here two series of Spanish patients and healthy controls and show that relapsing MS (R-MS) is associated with a gene deletion affecting the hypothetically soluble leukocyte immunoglobulin (Ig)-like receptor A3 (LILRA3, 19q13.4), in agreement with an earlier finding in German patients. Our study points to a gene-dose-dependent, protective role for LILRA3, the deletion of which synergizes with HLA-DRB1\*1501 to increase the risk of R-MS. We also investigated whether the risk of suffering R-MS might be influenced by the genotypic diversity of killer-cell Ig-like receptors (KIRs), located only ~400 kb telomeric to LILRA3, and implicated in autoimmunity and defence against viruses. The relationship of LILRA3 deletion with R-MS is not secondary to linkage disequilibrium with a KIR gene, but we cannot exclude some contributions of KIR to the genetic susceptibility to R-MS.

## Introduction

Multiple sclerosis (MS) is a demyelinating disease in which inflammation associates with progressive degeneration of the central nervous system. Its most common clinical form, relapsing-remitting MS (RR-MS), is characterized by episodes of inflammatory lesions in the central nervous system (relapses or exacerbations), followed by the remission of symptoms. In most cases, RR-MS progresses into secondary progressive MS, in which established demyelination and axonal loss cause permanent and progressive disability. RR-MS and secondary progressive MS are considered two stages of the same disease, to which we will refer here as relapsing MS (R-MS). The aetiology of MS is unknown, but this autoimmune disease is believed to be triggered, in a predisposing genetic context, by infection<sup>1</sup>.

The strongest and the best characterized predisposing genetic factor for MS lies, as in many autoimmune diseases, in the major histocompatibility complex of chromosome 6: the HLA-DRB1\*1501 allele<sup>2,3</sup>. Polymorphisms of other genes related to the immunological response, namely IL7R and IL2RA, also contribute, albeit more modestly, to the risk of suffering MS (odds ratio (OR) values: 1.18–1.34)<sup>4–7</sup>. In Germans<sup>8</sup>, RR-MS is associated with deficiency of the A3 member of the leukocyte immunoglobulin (Ig)-like receptor family (LILRA3, CD85e), molecule earlier referred to as Ig-like transcript 6 (ILT6), leukocyte Ig-like receptor 4 (LIR-4) or HM43<sup>9–11</sup>.

The LILRA3 gene maps to the leukocyte receptor complex<sup>12</sup> (LRC, 19q13.4), which encodes multiple polymorphic proteins with Ig-like extracellular domains. Those receptors, expressed in leukocytes of both the lymphoid and the myelomonocytic lineages, belong to three families: the LILR (CD85), the leukocyte-associated inhibitory receptors (LAIRs, CD305) and the killer-cell Ig-like receptors (KIRs, CD158). Members of the LILR and the KIR families also share the capacity of transmitting inhibitory or activating signals upon recognition of human leukocyte antigen (HLA) class I molecules<sup>13,14</sup>.

Among LILRs, which are mainly expressed by myelomonocytic cells, LILRB1 (CD85j) is the best characterized, and it is detected also in T, B and natural killer lymphocytes<sup>11</sup>. LILRB1 modulates leukocyte function and survival upon recognition of self HLA class I molecules in target cells. LILRB1 also recognizes the major histocompatibility complex homologue UL18 protein of human cytomegalovirus with  $\sim 10^3$  –fold greater affinity than that for HLA molecules.

The implications of this putative immune-evasion mechanism in the pathogenicity of cytomegalovirus remain ill defined<sup>15-17</sup>.

Encoded in the central region of the LILR gene complex, LILRA3 diverges from the canonical LILR structure as it lacks transmembrane and cytoplasmic regions due to a termination codon in the stalk. LILRA3 is likely expressed as a secreted, instead of membrane-anchored, receptor. Some Caucasoids carry a grossly aberrant LILRA3 allele in which the first seven of its eight exons are deleted<sup>12</sup>, a defect that has been associated with RR-MS in Germans<sup>8,18</sup>. In the same study, French MS patients had an LILR3 deletion frequency similar to that of German patients, but that frequency was not compared with one of a French healthy control group. Therefore, whether LILRA3 deletion indeed associates with MS in other populations, and whether its association is primary or secondary to linkage to other polymorphic genes in its vicinity, warrants further studies.

Approximately 400 kb telomeric to LILRA3, and only ~10 kb apart from the last LILR gene, maps the KIR complex, which has an enormously variable content of polymorphic genes<sup>19-21</sup>. Of the 17 KIR genes currently recognized, only the two that mark the 5' - and 3' - ends of the KIR complex are shared by all human genomes, whereas most individuals lack one or more of the other KIR genes. Both the frequency of each KIR gene and the manner in which they combine in haplotypes vary substantially among different populations, variations that have been associated with autoimmune and infectious diseases<sup>22-24</sup>.

By means of clonally distributed KIRs that recognize different HLA class I molecules, natural killer cells survey alterations in antigen presentation that often take place in infected cells<sup>22,25</sup>. Best known among pathogens that tamper major histocompatibility complex class I expression are herpesviruses, which can alter T- and natural killer-lymphocyte function by subverting the expression of host major histocompatibility complex molecules, or by encoding viral homologues of these<sup>26-31</sup>. As all of the polymorphisms of the LRC in chromosome 19, natural killer cells, herpesviruses and HLA class I molecules have been implicated in the susceptibility or pathogenesis of MS<sup>8,32-39</sup>, it is also of interest to determine whether the genotypic diversity of KIR is associated with MS and whether such an association could explain, by linkage disequilibrium (LD), the reported relationship between MS and deletion of LILRA3.

## Results and Discussion

### 1 - Association between LILRA3 deletion and R-MS in Spanish patients.

To determine whether the association between the LILRA3 gene deletion and MS previously reported in Germans<sup>8,18</sup> is also seen in a Mediterranean genetic context, we studied 126 R-MS patients and 174 healthy unrelated controls of Spanish origin (Hospital Universitario Puerta de Hierro, Madrid, Table 4.1).

	<i>HUPH</i>	<i>HdM</i>	<i>Total</i>
Female-to-male ratio	4.25	2.23	3.13
<i>Age at onset</i>			
Mean $\pm$ s.d.	26.8 $\pm$ 8.3	30.2 $\pm$ 9.1	28.4 $\pm$ 8.8
Range	11–65	11–58	11–65
<i>Age at time of analysis</i>			
Mean $\pm$ s.d.	38.9 $\pm$ 9.2	42.0 $\pm$ 10.5	40.3 $\pm$ 9.9
Range	19–67	23–68	19–68
<i>Expanded disability status scale</i>			
Mean $\pm$ s.d.	2.92 $\pm$ 2.16	2.99 $\pm$ 2.29	2.95 $\pm$ 2.21
Range	0–8.5	0–9	0–9
<i>Multiple sclerosis severity score</i>			
Mean $\pm$ s.d.	3.30 $\pm$ 2.59	3.74 $\pm$ 2.81	3.51 $\pm$ 2.70
Range	0.05–9.59	0.05–9.79	0.05–9.79
<i>Disease course</i>			
RR	111	79	190
SP	15	20	35
Total	126	99	225

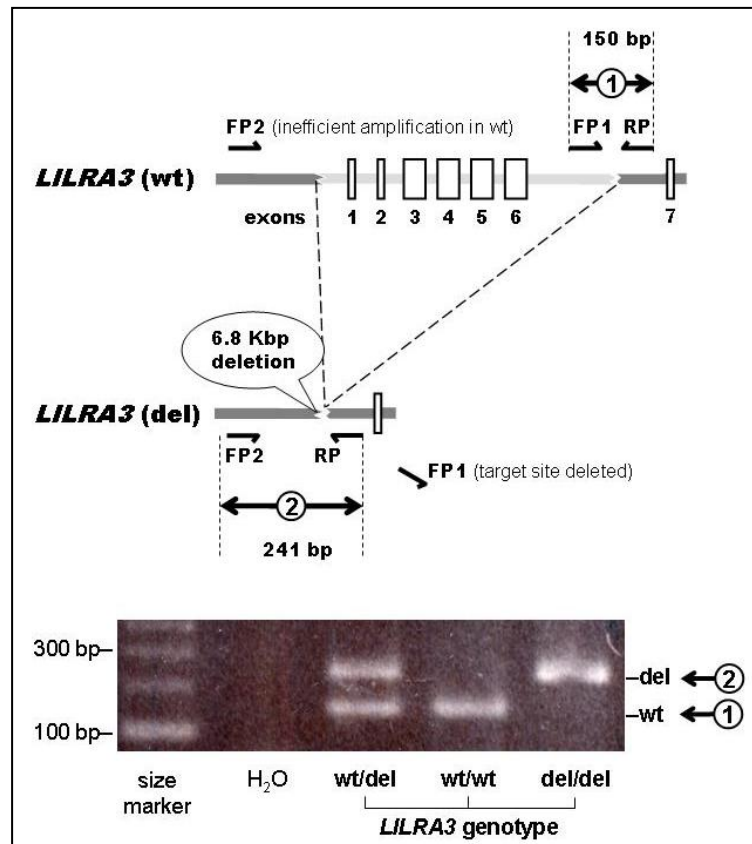
**Table 4.1.** Characteristics of the patients<sup>a</sup>.

Abbreviations: RR, relapsing-remitting; SP, secondary progressive.

<sup>a</sup> HUPH: Hospital Universitario Puerta de Hierro (Madrid); HdM: replication series from Hospital del Mar (Barcelona). Only patients with definite RR- or SP-MS diagnosis, according to accepted clinical criteria<sup>40</sup>, were included in the study. Controls were healthy unrelated voluntary donors collected from the same geographical region as each series of patients (174 and 157 healthy controls for the HUPH and the HdM series, respectively).

To simplify and facilitate the analysis of LILRA3 genotypes in a clinical context, we designed a single-tube PCR that amplifies both the wild-type and the deleted LILRA3 alleles, which are then distinguished by their different electrophoretic mobilities in regular agarose gels

(Figure 4.1). This method simplifies further the approach used by Hirayasu et al<sup>41</sup> by using a single reverse PCR primer.



**Figure 4.1** Strategy for LILRA3 genotyping. Both the complete and the deleted forms of LILRA3 in homozygous and heterozygous combinations were detected in a single-tube PCR with three primers: two forward (FP1, FILT6i7+967, 5'-gactgtaagggttaaaaagccaa-3'; and FP2, FILT6e2-3638, 5'-catctcgatctgccactgacac-3'), and one reverse (RP, RILT6i7+1071, 5'-gacagcagattctaaaaacagtgg-3') oligonucleotides. One hundred nanograms of DNA were amplified with 15 pmol of each primer in 15 ml of PCR buffer (67mM Tris-HCl, pH 8.8, 16mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01% Tween-20) containing 0.3U Taq polymerase (EcoTaq, Ecogen, Madrid, Spain) and 100 mM deoxyribonucleotide triphosphates. PCR conditions were 95°C for 2min; 10 cycles of 10 s at 94°C and 40 s at 65°C; and 20 cycles of 10 s at 94°C, 20 s at 61°C and 30 s at 72°C. In the complete LILRA3 form, FP1 and RP produce a 150-bp amplicon, whereas FP2 anneals with the DNA, but does not yield a product due to excessive amplicon length (~7 kb). In the deleted form, FP2 and RP yield a 241-bp product, whereas the FP1 target site is lost. The two amplicons were separated by electrophoresis in 2% agarose gels and revealed with ethidium bromide. Exons and introns are not drawn to scale.

Using such a method, we found that LILRA3 deficiency is associated with MS also in Spain (Table 4.2): 31.0% of patients, but only 20.1% of controls, had LILRA3 deleted in at least one chromosome. To further confirm the association between LILRA3 deletion and R-MS, we replicated the study in another series of 99 patients from a different centre (Hospital del Mar, Barcelona, Table 4.1). These showed a similarly higher frequency of the deletion in comparison with 157 healthy controls of the same geographical origin (35.4 vs 26.8%, Table 4.2), being this

increase marginally significant. Taking together both series of patients and controls, deletion of LILRA3 has a statistically significant OR of 1.62 ( $P < 0.01$ ), the aetiologic fraction (percentage of attributable risk<sup>42</sup>) of this genetic marker being 12.6%.

LILRA3 deletion	Patients			Controls			OR	95% CI	P-value
HUPH	31.0% (n = 126)			20.1% (n = 174)			1.78	1.01–3.13	0.016
HdM	35.4% (n = 99)			26.8% (n = 157)			1.50	0.84–2.67	0.072
Total	32.9% (n = 225)			23.3% (n = 331)			1.62	1.09–2.40	0.006

>LILRA3 genotype	Patients			Controls			OR	
	HUPH	HdM	Total	HUPH	HdM	Total		
wt/wt	87	64	67.1%	139	115	76.7%	1.00 <sup>b</sup>	
del/wt	32	33	28.9%	32	38	21.1%	1.56	
del/del	7	2	4.0%	3	4	2.1%	2.16	Linear trend: $P = 0.010$

**Table 4.2.** Deletion of the LILRA3 gene is increased in Spanish R-MS patients <sup>a</sup>.

Abbreviations: OR, odds ratio; R-MS, relapsing multiple sclerosis.

<sup>a</sup> Frequencies of individual markers were compared with the  $\chi^2$  test or with the Fisher's test when any expected frequency was lower than five individuals. To confirm the association of MS with deletion of LILRA3, we used a one-sided P-value. The aetiologic fraction indicated in the text (percentage of risk attributable to a given factor) was calculated with the formula  $F(OR-1)/OR$ , where F is the phenotypic frequency of the risk factor in patients<sup>42</sup>.

<sup>b</sup> The linear trend between increasing R-MS risk and decreasing LILRA3 gene dose was evaluated with the Mantel–Haenszel  $\chi^2$  test for trend, using EpiInfo-v6. OR values are referred in this case to the LILRA3-wt/wt genotype, which is assigned a reference OR of 1.

Analysis of genotypes showed that both homo- and heterozygosity for LILRA3 deletion tended to be more common in R-MS patients than in controls (LILRA3-del/del: 4.0 vs 2.1%; LILRA3-del/wt: 28.9 vs 21.1%, respectively, in the sum of the two series), although the increase of homozygotes separately was only marginally significant and not seen in the replication series. The global divergence in the distribution of genotypes, however, showed a statistically significant linear trend (Table 4.2). According to that trend, the risk of suffering MS is highest in individuals lacking LILRA3 completely in their genome, intermediate in heterozygotes and lowest in individuals having two full-length LILRA3 alleles. The OR values of homozygosity and heterozygosity for LILRA3 deletion, in comparison with homozygosity for the wild-type LILRA3, were 2.16 and 1.56, respectively, greater than those reported for IL2RA and ILR7 polymorphisms<sup>5,6,35,43</sup>. The distribution of genotypes in each series, and in the sum of both, did not diverge significantly from the Hardy–Weinberg equilibrium. The clinical parameters of patients with two complete copies of LILRA3 did not differ significantly from those who carried

the deletion (MS severity score  $3.42 \pm 2.59$  vs  $3.70 \pm 2.92$ , respectively), either in homo- or in heterozygosis (not shown).

## **2 - Analysis of epistatic interaction between deletion of LILRA3 and HLA-DRB1\*1501.**

To determine whether there is epistatic interaction between the associations of R-MS with LILRA3 deletion and the classical risk factor, *DRB1\*1501*, we studied the presence of this HLA allele in patients and controls (41.3 vs 16.6%, respectively, OR 3.54). To enhance the statistical power of all subsequent analyses, the two series of patients and controls derived from each hospital were analysed together (each data set is available upon request). The distribution of positive and negative individuals for each of the LILRA3 deletion and *HLA-DRB1\*1501* was then determined (Table 3), and the interaction between the two genetic markers was studied as recommended by Svejgaard and Ryder<sup>45</sup>.

The increase of the LILRA3 deletion was more conspicuous among *DRB1\*1501*-positive than among *DRB1\*1501*-negative patients (OR 3.08 and 1.40, respectively), but in both cases it lacked significance due to loss of statistical power after stratification and correction for multiple comparisons (Table 4.3). On the other hand, the association of *HLA-DRB1\*1501* with the disease is even stronger when LILRA3 is deleted (OR 6.57 vs 2.99 in the absence of the deletion), and, in isolation, it was stronger than that of the LILRA3 deletion alone (OR 2.13). Finally, and in line with the earlier findings, having a LILRA3 deletion and *HLA-DRB1\*1501* together conferred the highest risk (OR 9.2 when compared with the absence of both markers), indicating that they act synergistically to increase the risk of suffering R-MS.

The severity indexes of *HLA-DRB1\*1501* patients did not differ from those without this HLA allele (not shown), but patients carrying both a LILRA3 deletion and *DRB1\*1501* had significantly worse disability indexes (MS severity score:  $4.76 \pm 3.04$ ) than patients with other genotypes (MS severity score:  $3.32 \pm 2.60$ ,  $P = 0.0081$ ), including patients having *DRB1\*1501*, but lacking the LILRA3 deletion (MS severity score:  $3.32 \pm 2.56$ ,  $p = 0.0248$ ). The apparent influence of the genotype *LILRA3<sup>del</sup>-DRB1\*1501* on the prognosis of R-MS warrants confirmation on larger series of patients.

<b>Table 3</b> Combined analysis of <i>LILRA3</i> deletion and HLA-DRB1*1501 as risk factors for R-MS						
<i>LILRA3</i> deletion	HLA-DRB1*1501 <sup>a</sup>	Patients (n = 225)	Controls (n = 331)			
+	+	32 (14.2%)	8 (2.4%)			
+	-	42 (18.7%)	69 (20.8%)			
-	+	61 (27.1%)	47 (14.2%)			
-	-	90 (40.0%)	207 (62.5%)			
				OR	P-value	P <sub>c</sub> <sup>b</sup>
Is <i>LILRA3del</i> associated in the presence of DRB1*1501 (++) vs (-+)? <sup>c</sup>		32 vs 61	8 vs 47	3.08	0.0086	0.074
Is <i>LILRA3del</i> associated in the absence of DRB1*1501 (+- vs --)?		42 vs 90	69 vs 207	1.40	0.1477	NS
Is DRB1*1501 associated in the presence of <i>LILRA3del</i> (++) vs (+-)?		32 vs 42	8 vs 69	6.57	4.8 × 10 <sup>-6</sup>	4.3 × 10 <sup>-5</sup>
Is DRB1*1501 associated in the absence of <i>LILRA3del</i> (-+ vs --)?		61 vs 90	47 vs 207	2.99	1.5 × 10 <sup>-6</sup>	1.3 × 10 <sup>-5</sup>
Is DRB1*1501 more strongly associated than <i>LILRA3del</i> (-+ vs +-)?		61 vs 42	47 vs 69	2.13	0.0057	0.050
Is there a combined association of <i>LILRA3del</i> and DRB1*1501 (++) vs (--)?		32 vs 90	8 vs 207	9.20	<10 <sup>-7</sup>	<10 <sup>-6</sup>

**Table 4.3** Combined analysis of *LILRA3* deletion and HLA-DRB1\*15:01 as risk factors for R-MS.

Abbreviations: NS, not significant; OR, odds ratio; R-MS, relapsing multiple sclerosis.

<sup>a</sup> The HLA-DRB1\*1501 allele was determined using a sequence-based typing method based on Kotsch et al<sup>44</sup>.

<sup>b</sup> Correction of P-values for multiple comparisons was performed according to Svejgaard and Ryder<sup>45</sup>.

<sup>c</sup> The symbols ++, + -, -+ and - - refer to the four subgroups of patients and controls indicated in the upper part of the table; the first symbol represents the presence or absence of the *LILRA3* deletion, and the second symbol, that of HLA-DRB1\*1501.

### **3 - The relationship of R-MS with *LILRA3* deletion that we have observed is not secondary to association of either with a KIR gene.**

We next searched whether the genotypic diversity of KIRS, which map ~400 kb telomeric to *LILRA3*, could be a primary risk factor for R-MS and whether the association of *LILRA3* deletion with the disease could just reflect LD with a primarily associated KIR gene. We studied by PCR<sup>46</sup> the presence or absence of each KIR in the genome of 224 R-MS patients and 289 healthy controls, from whom enough DNA was available. Both groups had rather similar frequencies at all KIR genes, except for KIR3DS1, under-represented among R-MS patients (OR 0.69, p < 0.05, Table 4.4). The lower frequency of KIR3DS1, however, lost statistical significance after correcting the P-value for the number of comparisons, and the difference was not significant when the two series of patients and controls were compared separately (not shown). No significant LD of *LILRA3* genotypes with KIR3DS1 was found in either patients or controls; therefore, the deviations in the frequencies of *LILRA3* deletion and KIR3DS1 are unrelated to each other.

Analysis of LD between *LILRA3* deletion and other KIR genes revealed only modestly positive values in healthy controls, but not in patients, for the KIR2DS2-KIR2DL2 pair and for KIR2DS1 (LD 0.04 and 0.03; relative LD, 0.51 and 0.38, respectively), but they were not significant (corrected P-value > 0.05). This is consistent with the lack of LD between *LILRA3*

deletion and KIR genes observed by Norman et al<sup>47</sup>. in British Caucasoids. Furthermore, stratification for the presence or absence of the LILRA3 deletion showed again no significant difference between patients and controls in the frequency of any KIR gene or genotype after correcting P-values for multiple comparisons, although deviations of the genes in LD with LILRA3 in healthy controls were apparent (KIR2DS2, KIR2DL2 and KIR2DS1, Table 4). Finally, no differences between MS patients and controls were appreciated in the distribution of 'A'- and 'B'-type haplotypes (for example, 29.5% 'AA' genotypes in patients vs 24.2% in controls).

<b>Table 4</b> Distribution of frequencies (in %) of variable KIR genes in R-MS patients and healthy controls <sup>a</sup>													
Total		2DS2	2DL2	2DS3	2DL3	2DP1	2DL1	3DL1	2DS4	3DS1	2DL5	2DS5	2DS1
Patients	N = 224	58.0	58.7	33.5	84.8	95.5	95.5	94.2	94.2	34.8*	53.6	29.0	37.9
Controls	N = 289	59.2	59.5	32.2	88.6	96.2	96.2	97.2	97.2	43.6*	57.1	31.5	44.3
<i>Stratified for deletion of LILRA3</i>													
<i>Positive for LILRA3del</i>													
Patients	N = 74	52.7*	52.1*	37.8	86.5	98.6	98.6	87.8	87.8	37.8	52.7	29.7	37.8*
Controls	N = 67	70.1*	70.1*	40.3	92.4	98.5	98.5	95.5	95.5	53.7	64.2	34.3	55.2*
<i>Negative for LILRA3del</i>													
Patients	N = 150	60.7	62.0	31.5	83.9	94.0	94.0	97.3	97.3	33.3	54.0	28.7	38.0
Controls	N = 222	55.9	56.3	29.7	87.8	95.5	95.5	97.7	97.7	40.5	55.0	30.6	41.0

**Table 4.** Distribution of frequencies (in %) of variable KIR genes in R-MS patients and healthy controls <sup>a</sup>

Abbreviation: R-MS, relapsing multiple sclerosis.

\*Uncorrected P-value <0.05; P-value not significant after correcting for multiple comparisons.

<sup>a</sup> Presence or absence in the genome of each KIR gene was determined as described earlier<sup>46</sup>. The gene order is based on that of the KIR complex<sup>21,53</sup>—the genes that define the 'A' type of haplotype (KIR2DL3 through KIR2DS4) are represented in the middle, preceded and followed, respectively, by genes characteristic of the centromeric and the telomeric parts of 'B' haplotypes. Framework genes and pseudogenes found in all individuals are not shown. Frequencies were compared using the  $\chi^2$  or Fisher's test, as appropriate, and P-values were corrected for multiple comparisons according to Svejgaard and Ryder<sup>45</sup>

In summary, we have confirmed that the deletion of LILRA3 associates with R-MS in Spain, as reported in German patients, and we have shown for the first time that it synergizes with HLA-DRB1\*1501 in increasing susceptibility to the disease. On account of the nature of this genetic trait—a 6.7-kb deletion—it could not be detected by the genome-wide scans for susceptibility loci that focused on micropolymorphisms. Furthermore, among the markers that flank the LRC in chromosome 19 and were studied in earlier genomic scans<sup>4,5,38,48,49</sup>, D19S601 and D19S571 are the closest to LILRA3, but they lie more than 1.5Mb away from it. LD is generally not detectable across such a distance<sup>47,50–52</sup>, which may have prevented detecting the association of LILRA3 with MS through secondary association of flanking linked markers. For the same reason, previously reported associations of markers in chromosome region 19q13 with MS (reviewed in Pericak-Vance et al<sup>38</sup>. and Yeo et al<sup>49</sup>.) are possibly unrelated with those

of LILRA3. Finally, scans of markers within the LRC itself have been complicated by the fact that the complex is constituted by highly homologous duplicated genes (LILR and KIR) variably arranged in tightly packed tandems<sup>19</sup>.

Nevertheless, an apparent under-representation of KIR3DS1 in patients might indicate a minor and independent protective role of KIR haplotypes carrying this gene; or else, it could be a fortuitous result because of the multiple comparisons performed in this study. To circumvent the latter problem and elucidate the possible influence of KIR3DS1 on the susceptibility to MS, specific studies on that gene in additional series of patients are required.

In favour of a primary role for LILRA3 in the protection from MS is its homology to LILRB1, a receptor expressed in several leukocyte lineages, which recognizes both self-HLA class I molecules and the product of at least one member of herpesviridae<sup>15-17</sup>, family of viruses implicated in the pathogeny of MS<sup>35,36</sup>. Against such a primary role could be a study on Finnish MS patients published during preparation of our manuscript by Bonetti et al.<sup>52</sup>, who found only a minor, nonsignificant increase of the LILRA3<sup>del/del</sup> genotype. This study, however, did not analyse the LILRA3 deletion in heterozygosity, but only in the homozygous state, which, analysed isolately, was not significantly elevated in our own series. In addition, the Finnish study did not distinguish R-MS patients from those with a non-relapsing disease. Yet, the genetic background of Finnish MS patients might differ from that of Spaniards and Germans. Intriguingly, mutations causing LILRA3 deficiency are common in the Japanese population, who has a low MS incidence rate and a high frequency of non-classical forms<sup>41</sup>. Establishing whether the association of MS with LILRA3 deletion is primary or secondary to LD of this defect with another, as yet unidentified, risk locus, requires further studies on polymorphisms located in the LILR gene complex and functional studies on LILRA3 itself, still hampered by a lack of specific antibodies.

## References

1. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet* 2008; 372:1502–1517.
2. Schmidt H, Williamson D, Ashley-Koch A. HLA-DR15 haplotype and multiple sclerosis: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2007; 165: 1097–1109.
3. Svejgaard A. The immunogenetics of multiple sclerosis. *Immunogenetics* 2008; 60: 275–286.
4. Haines JL, Bradford Y, Garcia ME, Reed AD, Neumeister E, Pericak-Vance MA et al. Multiple susceptibility loci for multiple sclerosis. *Hum Mol Genet* 2002; 11: 2251–2256.
5. Hafler DA, Compston A, Sawcer S, Lander ES, Daly MJ, De Jager PL et al. Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *N Engl J Med* 2007; 357: 851–862.
6. Gregory SG, Schmidt S, Seth P, Oksenberg JR, Hart J, Prokop A et al. Interleukin 7 receptor alpha chain (IL7R) shows allelic and functional association with multiple sclerosis. *Nat Genet* 2007; 39: 1083–1091.
7. Lundmark F, Duvefelt K, Iacobaeus E, Kockum I, Wallstrom E, Khademi M et al. Variation in interleukin 7 receptor alpha chain (IL7R) influences risk of multiple sclerosis. *Nat Genet* 2007; 39: 1108–1113.
8. Koch S, Goedde R, Nigmatova V, Epplen JT, Muller N, de Seze J et al. Association of multiple sclerosis with ILT6 deficiency. *Genes Immun* 2005; 6: 445–447.
9. Arm JP, Nwankwo C, Austen KF. Molecular identification of a novel family of human Ig superfamily members that possess immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs and homology to the mouse gp49B1 inhibitory receptor. *J Immunol* 1997;159: 2342–2349.
10. Borges L, Hsu ML, Fanger N, Kubin M, Cosman D. A family of human lymphoid and myeloid Ig-like receptors, some of which bind to MHC class I molecules. *J Immunol* 1997; 159: 5192–5196.
11. Colonna M, Navarro F, Bellon T, Llano M, Garcia P, Samaridis J et al. A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells. *J Exp Med* 1997; 186: 1809–1818.

12. Torkar M, Haude A, Milne S, Beck S, Trowsdale J, Wilson MJ. Arrangement of the ILT gene cluster: a common null allele of the ILT6 gene results from a 6.7-kbp deletion. *Eur J Immunol* 2000; 30: 3655–3662.
13. López-Botet M, Bellón T. Natural killer cell activation and inhibition by receptors for MHC class I. *Curr Opin Immunol* 1999; 11: 301–307.
14. Lanier LL. Face off – the interplay between activating and inhibitory immune receptors. *Curr Opin Immunol* 2001; 13: 326–331.
15. Cosman D, Fanger N, Borges L, Kubin M, Chin W, Peterson L et al. A novel immunoglobulin superfamily receptor for cellular and viral MHC class I molecules. *Immunity* 1997; 7: 273–282.
16. Chapman TL, Heikeman AP, Bjorkman PJ. The inhibitory receptor LIR-1 uses a common binding interaction to recognize class I MHC molecules and the viral homolog UL18. *Immunity* 1999; 11: 603–613.
17. Valés-Gómez M, Shiroishi M, Maenaka K, Reyburn HT. Genetic variability of the major histocompatibility complex class I homologue encoded by human cytomegalovirus leads to differential binding to the inhibitory receptor ILT2. *J Virol* 2005; 79: 2251–2260.
18. Kabalak G, Koch S, Dobberstein B, The YH, Matthias T, Schnarr S et al. Immunoglobulin-like transcripts as risk genes for autoimmunity. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1110: 10–14.
19. Wilson MJ, Torkar M, Haude A, Milne S, Jones T, Sheer D et al. Plasticity in the organization and sequences of human KIR/ILT gene families. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 4778–4783.
20. Vilches C, Parham P. KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 217–251.
21. Norman PJ, Parham P. Complex interactions: the immunogenetics of human leukocyte antigen and killer cell immunoglobulin-like receptors. *Semin Hematol* 2005; 42: 65–75.
22. Parham P. MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 201–214.

23. Khakoo SI, Carrington M. KIR and disease: a model system or system of models? *Immunol Rev* 2006; 214: 186–201.
24. Estefanía E, Gómez-Lozano N, Portero F, de Pablo R, Solís R, Sepúlveda S et al. Influence of KIR-gene diversity on the course of HSV-1 infection: resistance to the disease is associated with the absence of KIR2DL2 and KIR2DS2. *Tissue Antigens* 2007; 70: 34–41.
25. Moretta A, Locatelli F, Moretta L. Human NK cells: from HLA class I-specific killer Ig-like receptors to the therapy of acute leukemias. *Immunol Rev* 2008; 224: 58–69.
26. Reyburn HT, Mandelboim O, Vales-Gomez M, Davis DM, Pazmany L, Strominger JL. The class I MHC homologue of human cytomegalovirus inhibits attack by natural killer cells. *Nature* 1997; 386: 514–517.
27. Farrell HE, Davis-Poynter NJ, Andrews DM, Degli-Esposti MA. Function of CMV-encoded MHC class I homologues. *Curr Top Microbiol Immunol* 2002; 269: 131–151.
28. Gumá M, Angulo A, Lopez-Botet M. NK cell receptors involved in the response to human cytomegalovirus infection. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006; 298: 207–223.
29. Rensing ME, Horst D, Griffin BD, Tellam J, Zuo J, Khanna R et al. Epstein–Barr virus evasion of CD8 and CD4 T cell immunity via concerted actions of multiple gene products. *Semin Cancer Biol* 2008; 25:25.
30. Pappworth IY, Wang EC, Rowe M. The switch from latent to productive infection in Epstein–Barr virus-infected B cells is associated with sensitization to NK cell killing. *J Virol* 2007; 81: 474–482.
31. Guerreiro-Cacais AO, Uzunel M, Levitskaya J, Levitsky V. Inhibition of heavy chain and beta2-microglobulin synthesis as a mechanism of major histocompatibility complex class I downregulation during Epstein–Barr virus replication. *J Virol* 2007; 81: 1390–1400.
32. Christensen T. Human herpesviruses in MS. *Int MS J* 2007; 14: 41–47.
33. Morandi B, Bramanti P, Bonaccorsi I, Montalto E, Oliveri D, Pezzino G et al. Role of natural killer cells in the pathogenesis and progression of multiple sclerosis. *Pharmacol Res* 2008; 57: 1–5.
34. Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol* 2005; 23: 683–747.

35. Lunemann JD, Kamradt T, Martin R, Munz C. Epstein–Barr virus: environmental trigger of multiple sclerosis? *J Virol* 2007; 81: 6777–6784.
36. Serafini B, Rosicarelli B, Franciotta D, Magliozzi R, Reynolds R, Cinque P et al. Dysregulated Epstein–Barr virus infection in the multiple sclerosis brain. *J Exp Med* 2007; 204: 2899–2912.
37. Friese MA, Jakobsen KB, Friis L, Etzensperger R, Craner MJ, McMahon RM et al. Opposing effects of HLA class I molecules in tuning autoreactive CD8+ T cells in multiple sclerosis. *Nat Med* 2008; 14: 1227–1235.
38. Pericak-Vance MA, Rimmler JB, Martin ER, Haines JL, Garcia ME, Oksenberg JR et al. Linkage and association analysis of chromosome 19q13 in multiple sclerosis. *Neurogenetics* 2001; 3: 195–201.
39. Yeo TW, De Jager PL, Gregory SG, Barcellos LF, Walton A, Goris A et al. A second major histocompatibility complex susceptibility locus for multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2007; 61: 228–236.
40. McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2001; 50: 121–127.
41. Hirayasu K, Ohashi J, Kashiwase K, Takanashi M, Satake M, Tokunaga K et al. Long-term persistence of both functional and non-functional alleles at the leukocyte immunoglobulin-like receptor A3 (LILRA3) locus suggests balancing selection. *Hum Genet* 2006; 119: 436–443.
42. Green A. The epidemiologic approach to studies of association between HLA and disease. II. Estimation of absolute risks, etiologic and preventive fraction. *Tissue Antigens* 1982; 19: 259–268.
43. Consortium IMSG. Refining genetic associations in multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2008; 7: 567–569.
44. Kotsch K, Wehling J, Blasczyk R. Sequencing of HLA class II genes based on the conserved diversity of the non-coding regions: sequencing based typing of HLA-DRB genes. *Tissue Antigens* 1999; 53: 486–497.

45. Svejgaard A, Ryder LP. HLA and disease associations: detecting the strongest association. *Tissue Antigens* 1994; 43: 18–27.
46. Vilches C, Castaño J, Gómez-Lozano N, Estefanía E. Facilitation of KIR genotyping by a PCR-SSP method that amplifies short DNA fragments. *Tissue Antigens* 2007; 70: 415–422.
47. Norman PJ, Cook MA, Carey BS, Carrington CV, Verity DH, Hameed K et al. SNP haplotypes and allele frequencies show evidence for disruptive and balancing selection in the human leukocyte receptor complex. *Immunogenetics* 2004; 56:225–237.
48. Sawcer S, Ban M, Maranian M, Yeo TW, Compston A, Kirby A et al. A high-density screen for linkage in multiple sclerosis. *Am J Hum Genet* 2005; 77: 454–467.
49. Yeo TW, Roxburgh R, Maranian M, Singlehurst S, Gray J, Hensiek A et al. Refining the analysis of a whole genome linkage disequilibrium association map: the United Kingdom results. *J Neuroimmunol* 2003; 143: 53–59.
50. Abecasis GR, Noguchi E, Heinzmann A, Traherne JA, Bhattacharyya S, Leaves NI et al. Extent and distribution of linkage disequilibrium in three genomic regions. *Am J Hum Genet* 2001; 68: 191–197.
51. Dunning AM, Durocher F, Healey CS, Teare MD, McBride SE, Carlomagno F et al. The extent of linkage disequilibrium in four populations with distinct demographic histories. *Am J Hum Genet* 2000; 67: 1544–1554.
52. Bonetti A, Koivisto K, Pirttila T, Elovaara I, Reunanen M, Laaksonen M et al. A follow-up study of chromosome 19q13 in multiple sclerosis susceptibility. *J Neuroimmunol* 2009; 208: 119–124.
53. Yawata M, Yawata N, Abi-Rached L, Parham P. Variation within the human killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) gene family. *Crit Rev Immunol* 2002; 22: 463–482



## **Artículo 5**

(Enviado a la revista Multiple Sclerosis)



## Allelic diversity of the Leukocyte Immunoglobulin-like Receptor A3 and Multiple Sclerosis

David Ordóñez<sup>1</sup>, Antonio J. Sánchez<sup>2</sup>, José E. Martínez-Rodríguez<sup>3</sup>, Elvira Ramil<sup>2</sup>, Elvira Munteis<sup>3</sup>, Miguel López-Botet<sup>4</sup>, Antonio García-Merino<sup>2</sup> and Carlos Vilches<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Inmunogenética - HLA, Hospital Universitario Puerta de Hierro, Majadahonda, Spain*

<sup>2</sup>*Neuroinmunología, Hospital Universitario Puerta de Hierro, Majadahonda, Spain*

<sup>3</sup>*Neurología, Hospital del Mar-Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM), Barcelona, Spain*

<sup>4</sup>*Molecular Immunopathology Unit, Universitat Pompeu Fabra, and IMIM-Hospital del Mar, Barcelona, Spain*

**Running title:** Multiple Sclerosis and LILRA3 allelic polymorphism

**Correspondence:** Carlos Vilches, Inmunología, Hospital Universitario Puerta de Hierro, Manuel de Falla 1, 28220 Majadahonda, Spain. E-mail address: carlos.vilches@yahoo.com. Telephone +34 911916766; Fax +34 911916806

**Keywords:** Case-Control Studies, genetic variation, HLA-DR Antigens/Genetics, Humans, Immune System, Immunologic Receptors/Genetics, Multiple Sclerosis Genetics

**Abstract**

**Background:** The secreted Leukocyte Immunoglobulin (Ig)-like Receptor A3 (LILRA3) recognises HLA class I molecules. *LILRA3* deletion associates with susceptibility to relapsing MS (R-MS), and, together with *HLA-DRB1\*15:01*, with higher severity score (MSSS). *LILRA3* comprises multiple functional and non-functional alleles, whose distribution in MS is unknown.

**Objective:** To determine the influence of *LILRA3* mutations and polymorphisms on R-MS susceptibility and prognosis.

**Methods:** High resolution *LILRA3* genotyping was achieved using novel gene amplification and sequencing methods. The distribution of *LILRA3* alleles was compared in 203 R-MS patients versus 316 healthy controls (HC), and possible influence of *LILRA3* polymorphism on MSSS was evaluated.

**Results:** One R-MS patient carried a non-functional *LILRA3* allele. Two novel alleles were discovered, one of them in an R-MS patient. The distribution of *LILRA3* alleles does not differ significantly between patients and HC. *LILRA3* polymorphisms appear to increase the R-MS susceptibility conferred by gene deletion/inactivation, but have no consistent influence on MSSS, independently or in combination with *HLA-DRB1\*15:01*.

**Conclusion:** Inactivating point mutations in *LILRA3* do not contribute significantly to the genetic risk for R-MS in Spain. *LILRA3* polymorphisms may add to the genetic risk conferred by gene deletion, but they neither constitute independent risk factors nor modify R-MS severity.







## Discusión

*Anacreonte español, no hay quien os tope,  
Que no diga con mucha cortesía,  
Que ya que vuestros pies son de elegía,  
Que vuestras suavidades son de arrope.*

*¿No imitaréis al terenciano Lope,  
Que al de Belerofonte cada día  
Sobre zuecos de cómica poesía  
Se calza espuelas, y le da un galope?*

*Con cuidado especial vuestros antojos  
Dicen que quieren traducir al griego,  
No habiéndolo mirado vuestros ojos.*

*Prestádselos un rato a mi ojo ciego,  
Porque a luz saque ciertos versos flojos,  
Y entenderéis cualquier gregüesco luego.*

**Góngora a Quevedo**

*Yo te untaré mis obras con tocino  
Porque no me las muerdas, Gongorilla  
Perro de los ingenios de Castilla,  
Docto en pullas, cual mozo de camino.*

*Apenas hombre, sacerdote indino,  
Que aprendiste sin christus la cartilla;  
Chocarrero de Córdoba y Sevilla  
Y en la Corte, bufón a lo divino.*

*¿Por qué censuras tú la lengua griega  
siendo sólo rabí de la judía,  
cosa que tu nariz aun no lo niega?*

*No escribas versos más, por vida mía;  
Aunque aquesto de escribas se te pega,  
Por tener de sayón la rebeldía.*

**Quevedo a Góngora**



## 1. Contribución de *KIR2DS3* a la variabilidad en el Complejo KIR

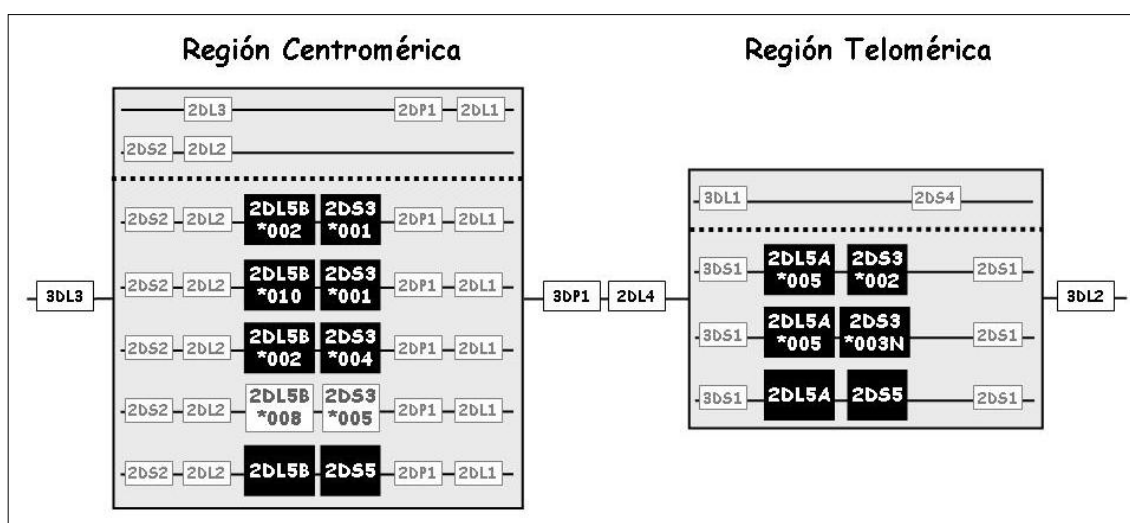
El Complejo KIR tiene una extremada diversidad que se debe a presentar un número de copias variable en los genes KIR y a la propia variabilidad alélica de cada locus. La recombinación es un importante factor en la generación de esta diversidad. En la región central del complejo KIR están los genes *KIR3DP1* y *KIR2DL4*, separados entre sí por ~5 Kb, y a lo largo de esta zona intergénica se han producido las recombinaciones que han generado la mayoría de los haplotipos KIR observados en la población. También se han producido recombinaciones asimétricas en otras zonas del complejo KIR que han generado haplotipos con duplicaciones y deleciones de varios genes y también alelos quiméricos que presentan estructuras de genes KIR distintos.

Inicialmente, *KIR2DS3* estaba representado por los alelos *KIR2DS3\*00101-02-03-04* y *\*002*, aunque existían indicios de que este último podía ocupar una posición distinta dentro del Complejo KIR [116, 139, 194]. Confirmamos esta posibilidad al demostrar la herencia de un haplotipo KIR de 14 genes que contiene los alelos *KIR2DS3\*00103* y *KIR2DS3\*002*, en las regiones centromérica y telomérica respectivamente. Este fenómeno se observa también en el gen *KIR2DL5* del que nuestro grupo ha descritos dos loci, uno centromérico (*KIR2DL5B*) y otro telomérico (*KIR2DL5A*) [114]. Cada locus de *KIR2DL5* está íntimamente asociado al correspondiente de *KIR2DS3* y, de esta manera, se establece un desequilibrio de ligamiento casi total entre los alelos *KIR2DL5B\*002-KIR2DS3\*001* en la región centromérica y entre *KIR2DL5A\*005-KIR2DS3\*002* en la telomérica. Por tanto, se puede concluir que *KIR2DS3\*001* y *\*002* son realmente dos loci distintos en lugar de dos formas alélicas del locus *KIR2DS3*.

La región telomérica de los haplotipos B suele estar definida por los genes *KIR3DS1-KIR2DL5A\*001-KIR2DS5-KIR2DS1*. Describimos una nueva ordenación de esta región en la que *KIR2DS3\*002* sustituye a *KIR2DS5* entre *KIR2DL5A* y *KIR2DS1* que, de manera simultánea, también fue descrita por Du et al mediante estudios de desequilibrio de ligamiento [195], aunque sin determinar el alelo de *KIR2DS3* implicado. Esto nos lleva a considerar que *KIR2DS3\*002* y *KIR2DS5* son en realidad secuencias de un mismo locus *KIR2DS3S5* telomérico (*KIR2DS3S5T*, según la futura nomenclatura oficial) y que se encuentran en desequilibrio de ligamiento con alelos distintos de *KIR2DL5A* (Fig. 11). De mismo modo se

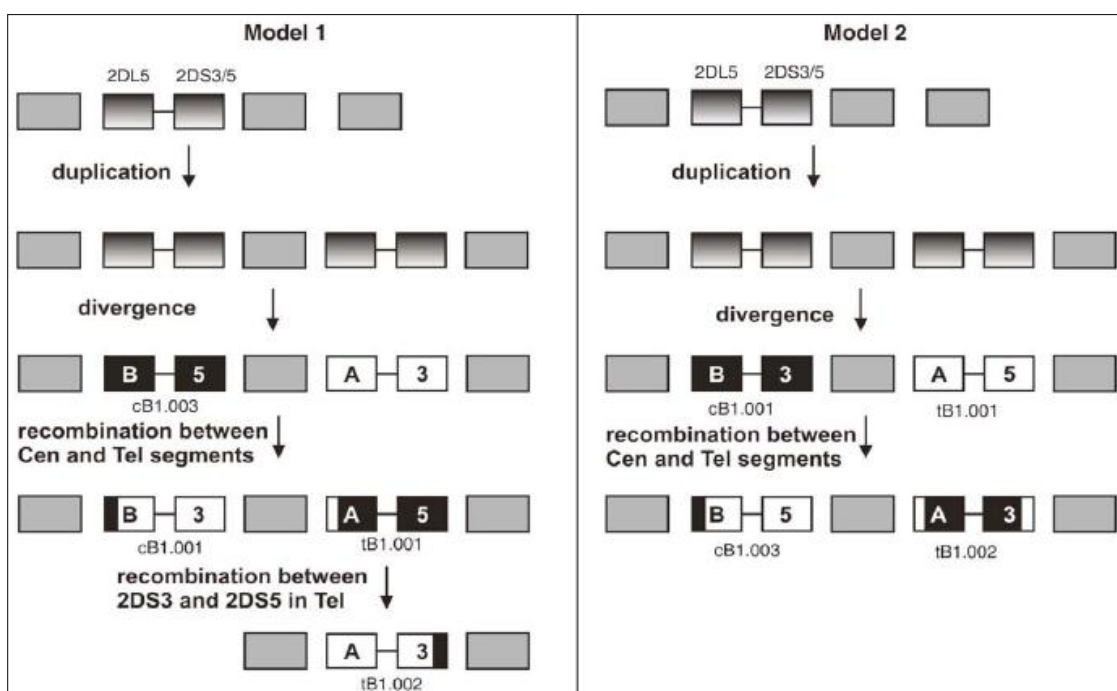
definió la existencia de otro locus *KIR2DS3S5* centromérico (*KIR2DS3S5C*) en los haplotipos KIR y que estaba ligado al locus *KIR2DL5B* (Fig. 11).

Posteriormente fueron descritos nuevos alelos de *KIR2DS3*. Uno es el alelo nulo *KIR2DS3\*003N* [196], del que disponíamos de una muestra en nuestra serie. Mediante estudios familiares fuimos capaces de definir el haplotipo en el que estaba incluido y su probable posición dentro de él determinando que, al igual que *KIR2DS3\*002*, es una variante alélica del locus *KIR2DS3S5T* asociada a *KIR2DL5A\*005*. Otro aspecto que relaciona a *KIR2DS3\*002* y *KIR2DS3\*003N* es que ambos comparten los polimorfismos en exones 7, 8 y 9 idénticos a *KIR2DS5* y distintos de *KIR2DS3\*001*. Otros alelos descritos son *KIR2DS3\*004* y *\*005*, pero al no disponer en nuestra serie de ninguna muestra portadora no se pudo realizar ningún análisis. *KIR2DS3\*004* se describió en un individuo afroamericano (GM17114, IPD-KIR Database) y se incluye en el locus *KIR2DS3S5C* asociado a *KIR2DL5B\*002* [197]. *KIR2DS3\*005* se describió en un individuo Caucasoide (NMDP-68, IPD-KIR Database, del que se dispone del genotipo KIR completo) y parece compartir el locus *KIR2DS3S5C* con los alelos *KIR2DS3\*001* y *\*004*.



**Figura 11.** Representación de las asociaciones *KIR2DL5-KIR2DS3S5* en las regiones centromérica y telomérica del Complejo KIR. Los bloques en fondo negro se refieren a asociaciones alélicas confirmadas por mapeo físico o por estudios de herencia familiar. La asociación *KIR2DL5B\*008 - KIR2DS3\*005* es una predicción basada en el genotipo KIR de la célula donde fue descrita (NMDP-68, IPD-KIR Database). Existen varias asociaciones *KIR2DL5-KIR2DS5* descritas en las regiones centromérica y telomérica [143, 197] que no han sido incluidas para simplificar la figura.

El origen de la duplicación de *KIR2DL5-KIR2DS3S5* en el Complejo KIR fue planteada por Pyo et al [143] y consideran que la copia inicial se encontraba en una posición centromérica del Complejo KIR. En un momento indeterminado tuvo lugar la duplicación y transposición de *KIR2DL5-KIR2DS3S5* a la región telomérica. A partir de aquí se proponen 2 modelos para explicar la evolución divergente de ambos grupos centromérico y telomérico. El modelo 1 parte de la suposición de que *KIR2DL5B-KIR2DS5* se encontraba en la región centromérica y, por al menos 3 recombinaciones con el locus *KIR2DL5A-KIR2DS3* telomérico, generaba el resto de formas descritas. En el 2º modelo, sería *KIR2DS3* el que se encuentra inicialmente en la posición centromérica y con 2 recombinaciones se explicarían el resto de combinaciones descritas (Fig. 12).



**Figura 12.** Esquema que resume la evolución de los loci *KIR2DL5-KIR2DS3S5* y los modelos que tratan de explicar el origen de las distintas formas centroméricas y teloméricas descritas actualmente [143].

Como consecuencia de la existencia de 2 copias de *KIR2DL5-KIR2DS3S5*, se han producido recombinaciones posteriores entre integrantes de las regiones centroméricas y teloméricas del Complejo KIR, como las descritas en este trabajo, y que dieron lugar a nuevos haplotipos con duplicaciones y deleciones de varios genes KIR. *KIR2DS3* está implicado en otras recombinaciones generando alelos quiméricos como *KIR2DS2\*005*, resultado de una recombinación asimétrica entre *KIR2DS2* y *KIR2DS3\*001*

Aunque no se haya determinado el papel funcional de KIR2DS3, sí se ha descrito un posible papel genético en la predisposición a patologías autoinmunes como la diabetes [198], en el empeoramiento de infecciones víricas como el Ébola [199] o en la cronificación de la infección por el virus de la Hepatitis C [200]. Se ha propuesto que la ausencia de *KIR2DS3* en donantes de células madre hematopoyéticas mejora el resultado de este tratamiento frente a la leucemia mieloide [201], pero este resultado no se ha reproducido en otros trabajos que analizaban series con un mayor número de pacientes y que observan un efecto beneficioso en donantes con haplotipos B [202, 203]. En resumen, aunque se desconoce la expresión de KIR2DS3 y su ligando, este receptor podría tener un papel funcional en la regulación de las células NK.

Otro aspecto que impide el análisis de la expresión de KIR2DS3 es la ausencia de anticuerpos monoclonales específicos. En este sentido, VandenBussche et al proponen que los cambios de aminoácido de KIR2DS3 respecto a KIR2DS1, de manera simultánea en las posiciones -18 y -7 (péptido-señal), 123 y 150 (dominio D2) y 234 (región transmembrana), bloquean su expresión en la membrana [204]. Nuestros datos obtenidos sobre KIR2DS2\*005 muestran que los polimorfismos de las regiones transmembrana y citoplásmica no afectarían por sí solos a la expresión de KIR2DS3.

KIR2DS2 es un homólogo activador de KIR2DL2/L3, aunque recientemente se ha demostrado que no reconoce moléculas HLA de clase I, por lo que el ligando y función de KIR2DS2 son desconocidas [142]. En la gran mayoría de los casos, *KIR2DS2* se encuentra en el Complejo KIR junto a *KIR2DL2* y la ausencia de anticuerpos monoclonales específicos dificulta analizar individualmente su función en la regulación de la respuesta de células citotóxicas. En su región transmembrana presenta un residuo de lisina que le permite asociarse a la molécula DAP12 para enviar señales de activación. Las regiones transmembrana y citoplásmica de KIR2DS2\*005 son distintas a las de otros KIR2DS2 al presentar los polimorfismos propios de KIR2DS3\*001. Estos polimorfismos también están presentes en KIR2DS5, con la excepción de un cambio Asp→Asn 250 en la región transmembrana. Recientemente se ha demostrado la expresión en membrana de KIR2DS5 y su capacidad para activar una respuesta citotóxica y de secreción de citoquinas en células NK mediante un

entrecruzamiento con anticuerpos específicos [205], así que predecimos que KIR2DS2\*005 podría comportarse de la misma manera.

## 2. Esclerosis Múltiple y diversidad en el LRC.

### 2.1) Variabilidad en el Complejo KIR.

La variabilidad genética en el Complejo KIR ha demostrado su implicación en enfermedades de base autoinmune como la psoriasis [206], diabetes mellitus [207] o esclerodermia [135, 208]. La EM-R es una enfermedad autoinmune de carácter multifactorial con un importante componente genético. Se han encontrado polimorfismos de susceptibilidad en el cromosoma 19 [209] y también está descrita la implicación de la apolipoproteína E (ApoE, 19q13.2) como posible factor asociado con un peor pronóstico de la EM-R (revisado por Pinholt et al, [210]). En una región relativamente cercana, 19q13.4, se había descrito la delección de *LILRA3* como otro posible factor que predispone a desarrollar la EM-R en población alemana aunque sin precisar si se trata de un factor primario o secundario [64].

La variabilidad del Complejo KIR, por el contrario, nunca había sido analizada en la Esclerosis Múltiple. Encontramos un posible papel protector de *KIR3DS1*, que es un gen incluido en la región telomérica de los haplotipos B *KIR3DS1-KIR2DL5A-KIR2DS3S5-KIR2DS1*. En estudios posteriores, esta región (concretamente la presencia de *KIR2DS1*) también manifestó un efecto protector frente a la MS en población italiana [211]. *KIR3DS1* es un receptor activador que interacciona epistáticamente con HLA-Bw4, ligando de su homólogo inhibidor *KIR3DL1*, observándose una progresión mas lenta del SIDA [212]. La presencia de alelos del grupo HLA-Bw4 parece proteger frente al desarrollo de la Esclerosis Múltiple [213], aunque resulta contradictorio que el efecto combinado de la presencia de *KIR3DS1* y *HLA-Bw4* haya resultado en un aumento del riesgo en otro estudio en población española [214]. Todos los análisis efectuados hasta la fecha se resumen en la tabla 2, sin demostrar ningún efecto concluyente de la implicación de la variabilidad KIR en la EM-R, por lo que serán necesarios análisis en series más largas para confirmar el papel real de la variabilidad KIR en la Esclerosis Múltiple.

	OR (p)	Pacientes	N	Otras observaciones	Ref.
<i>KIR3DS1</i> <i>KIR2DS1</i>	<b>0.69</b> (0.044) 0.77 (ns)	EM-R	224		Este trabajo
<i>KIR3DS1</i> <i>KIR2DS1</i>	0.64 (ns) <b>0.38</b> (0.016)	EM-RR	121	<i>KIR2DL5</i> - 0.49 (ns)	[211]
<i>KIR3DS1</i> <i>KIR2DS1</i>	0.9 (ns) 0.78 (0.06)	EM-R/PP	631	<i>KIR3DL1</i> - <b>1.94</b> (0.04) <i>KIR2DS4</i> - <b>2.21</b> (0.03) <i>KIR2DL1</i> - <b>0.37</b> (0.007)	[213]
<i>KIR3DS1</i> <i>KIR2DS1</i>	<b>1.55</b> (0.032) 1.32 (ns)	EM-R/PP	200	<i>KIR2DL5</i> - <b>1.72</b> (0.006) <i>KIR3DS1</i> + <i>HLA-Bw4</i> - <b>2.07</b> (0.006)	[214]
<i>KIR3DS1</i> <i>KIR2DS1</i>	1.1 (ns) 0.86 (ns)	EM-R/PP	321	<i>KIR2DL3</i> - <b>0.26</b> ( $<10^{-4}$ ) <i>KIR2DS5</i> - 0.67 (0.08)	[215]
<i>KIR3DS1</i> <i>KIR2DS1</i>	<b>0.57</b> (0.003) - -	Pacientes EM Afroamericanos <sup>(1)</sup>		<i>KIR3DS1</i> + <i>HLA-Bw4</i> OR = <b>0.43</b> (0.0002)	Pando, Oksenberg et al <sup>(2)</sup>

**Tabla 2.** Resumen de los estudios de asociación de la variabilidad del Complejo KIR con el desarrollo de la MS en el que se analiza la reproducibilidad de nuestro resultado observado en *KIR3DS1* y *KIR2DS1*. Los valores de la Odds Ratio (OR) en negrita son aquellos que alcanzan la significación estadística. Valores de significación no corregidos por el test de Bonferroni.

<sup>(1)</sup> El resto de trabajos están realizados en individuos caucásicos

<sup>(2)</sup> Trabajo presentado en el KIR Workshop de Estocolmo, junio 2011.

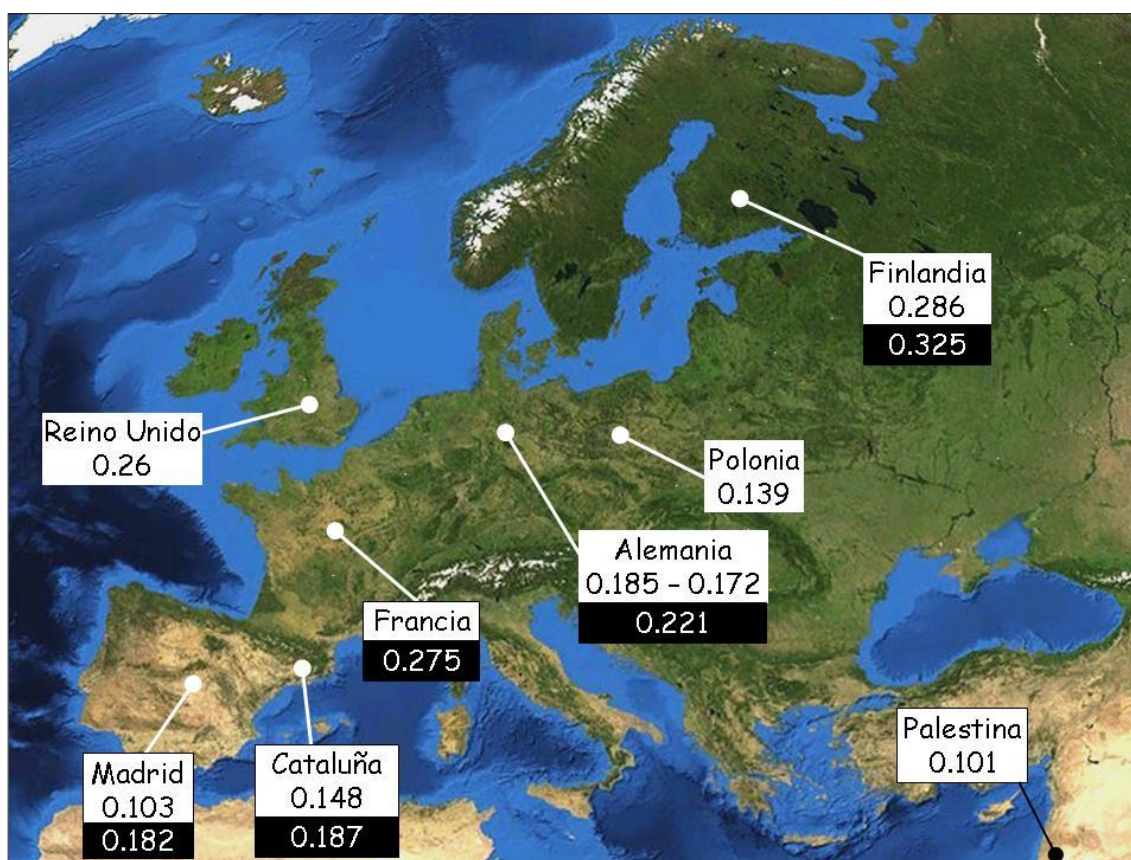
## 2.2) Esclerosis Múltiple y LILRA3:

### 2.2.1) Deleción de LILRA3.

En enfermos de EM-R españoles replicamos el resultado obtenido en población alemana que asociaba la deleción de LILRA3 con el incremento del riesgo a desarrollar la enfermedad. Además, describimos por primera vez que este aumento sigue una tendencia lineal por la que el riesgo se incrementa de manera significativa al estar presente la deleción de LILRA3 en homocigosis. Este resultado también se observaba en el estudio realizado en población alemana, aunque no había sido comentado por los autores [64].

En otro análisis de la deleción en homocigosis realizado en población finlandesa se observó una mayor frecuencia en pacientes con EM-R, aunque no llegaba a ser significativa [209]. No existen más trabajos que analicen la frecuencia de la deleción de LILRA3 en la Esclerosis Múltiple, pero sí se analiza en otras patologías como la Psoriasis [63], la enfermedad celíaca [216] o el Síndrome de Sjögren [65] y sólo en la última se observaron diferencias

significativas entre pacientes y controles. Si comparamos la frecuencia de la delección de *LILRA3* en población española con la del resto de poblaciones europeas se observa un gradiente Norte-Sur, siendo mínima su frecuencia en España (Figura 13). No existen más datos de distribución de la delección en países de la cuenca mediterránea, con la excepción de un análisis realizado en Palestina que presenta unos valores similares a los de España [62]. Este gradiente Norte-Sur observado en la distribución de *LILRA3-del*, se asemeja al descrito en la epidemiología de la Esclerosis Múltiple [149], lo que podría concordar con una posible implicación de *LILRA3* en la EM-R.



**Figura 13.** Distribución de las frecuencias alélicas de la delección de *LILRA3* en Finlandia, Alemania ([64, 65]), Reino Unido ([60]), Polonia ([63]) y Palestina ([62]). Las frecuencias en España proceden de nuestro trabajo y el valor en Finlandia no está publicado, proviene de una referencia personal del autor (Dr. PJ Tienari; Helsinki University Central Hospital, Haartmaninkatu, 4, Helsinki, Finlandia). En fondo negro, los valores de frecuencia de la delección en enfermos de EM-R

### 2.2.2) Variabilidad alélica de *LILRA3*:

Las formas alteradas de *LILRA3* (alelos *LILRA3\*011N* y *\*012N*) descritas en población asiática [61] nunca habían sido analizadas en los estudios de asociación de *LILRA3* con las enfermedades autoinmunes y se incluían dentro de la forma no delecionada de *LILRA3*, a pesar de que sus alteraciones en la secuencia pueden afectar completamente a la

funcionalidad del receptor. Estos alelos son relativamente comunes poblaciones del Este de Asia y se desconocía su frecuencia en población Caucasoide, con la excepción de una pequeña serie de 59 controles sanos de la Foundation Jean Dausset - Centre d'Etude du Polymorphisme Humain (CEPH, Paris) y en la que en ninguno de ellos fue detectado [66]. Dado que la ausencia de un receptor LILRA3 funcional es un factor de riesgo para el desarrollo de la EM-R, analizamos la presencia de estos alelos aberrantes de *LILRA3* en nuestras series de controles y pacientes (519 individuos en total) y solo encontramos un paciente *LILRA3<sup>+del</sup>* con una de las formas no funcionales (*LILRA3\*011N*). Este resultado indica que los alelos *LILRA3\*011N* y *\*012N* son muy infrecuentes en la población española y dificulta su evaluación como posible factor de riesgo. En cualquier caso, la hipotética implicación de estos alelos en la etiología de la EM-R en España sería mínima por su baja frecuencia.

También analizamos las variantes alélicas posiblemente funcionales de *LILRA3* en ambas series. Su distribución en controles sanos de origen caucasoide ya se había realizado en población del Reino Unido [60] y nuestra serie es la primera referencia en población europea del área mediterránea. No encontramos diferencias significativas entre las distribuciones alélicas y genotípicas de nuestras series de pacientes con EM-R y controles, ni tampoco observamos una aceleración del curso clínico de la enfermedad. En cambio, sí detectamos un posible efecto aditivo con la presencia de la delección incrementando el riesgo a desarrollar la EM-R. Este resultado se ajusta la hipótesis por la que la ausencia de alteraciones o de variabilidad en el receptor *LILRA3* es un factor protector al desarrollo de la R - MS.

### 2.2.3) Delección de *LILRA3* y la variabilidad en el Complejo KIR en la EM-R

Los Complejos LILR y KIR se encuentran contiguos en el LRC, lo que nos llevó a evaluar la posible existencia de un desequilibrio de ligamiento entre ellos que explicase la desviación observada en la frecuencia de la delección en pacientes con EM-R. Nuestros datos concuerdan con un trabajo previo en el que no se observa un desequilibrio de ligamiento significativo entre la *LILRA3-del* y ninguno de los genes KIR [62], por lo que el Complejo KIR no determina la asociación de la delección con la EM-R. El locus más centromérico del Complejo KIR es *KIR3DL3* y su intrón 5 es un punto caliente de recombinaciones [118, 217]. Esta

variabilidad junto con la distancia cromosómica entre LILRA3 y KIR3DL3 (~400 kb) pueden ser las causas de la ausencia de equilibrio de ligamiento entre el Complejo KIR y *LILRA3-del*.

#### 2.2.4) Posible papel de LILRA3 en la EM-R

La EM-R es una enfermedad multifactorial en la que se produce una desregulación del Sistema Inmunológico y en la que la ausencia de LILRA3 o una disminución de sus niveles podrían estar implicadas. LILRA3 parece tener un efecto anti-inflamatorio, en contraposición a otros receptores activadores como LILRA1 y LILRA2, dado que su secreción “in vitro” por monocitos se ve favorecida por la presencia de citoquinas anti-inflamatorias (IL-10) o por la privación de factores pro-inflamatorios como el TNF $\alpha$  [57]. Respecto a la EM-R, en las recurrencias tienen lugar procesos inflamatorios que se asocian a reacciones autoinmunes sobre las vainas de mielina que acaban provocando daños axonales en el SNC. La función de LILRA3 en este contexto podría ser la de regular la inflamación en el SNC y su ausencia o la disminución de sus niveles podrían estar implicadas tanto en el origen e intensidad de los procesos inflamatorios como en su resolución. De nuestros datos no se puede extraer estas conclusiones, aunque si observamos que el curso clínico de la enfermedad se acelera por la presencia conjunta del alelo *HLA-DRB1\*15:01* y de la delección de *LILRA3*.

Se ha descrito la presencia de LILRA3 de manera constitutiva en el suero de controles sanos y sus niveles se ven aumentados en pacientes de Artritis Reumatoide, una enfermedad de base autoinmune. En estos pacientes, LILRA3 también se detecta en muestras de líquido sinovial procedente de las lesiones inflamatorias [57]. Aún no ha sido analizada la posible presencia de LILRA3 en muestras de líquido cefalo-raquídeo de pacientes con EM-R, ya sea de manera constitutiva o debida a la enfermedad. Por otra parte, en el tratamiento con IL-10 frente a la psoriasis se incrementan de manera significativa los niveles de ARNm de *LILRA3* en monocitos [218], resultados reproducidos “in vitro” al analizar PBL’s procedentes de pacientes de Artritis Reumatoide [57].

Dado que los monocitos producen mayor cantidad de LILRA3 en presencia de estímulos anti-inflamatorios, en pacientes con genotipos *LILRA3<sup>+/+</sup>* o *LILRA3<sup>+/-</sup>* se podría realizar una estimulación de monocitos “ex-vivo” y volver a administrarle estos monocitos activados. Otra aproximación sería diseñar fármacos que estimulen a los monocitos de manera

específica, como se pudo observar en el caso de la administración de IL-10, sin necesidad de realizar tratamientos *“in vitro”*. Debido a que el efecto de la administración de IL-10 es de acción inespecífica, ya que estimula o inhibe a otros genes, lo ideal sería diseñar fármacos que incrementen la producción de ARNm de LILRA3 de la forma más específica posible.

Si se confirma que la alteración de LILRA3, ya sea por la completa inactivación de su expresión o por modificaciones de su funcionalidad, está implicada en la patogenia de la EM-R o de otras enfermedades autoinmunes se podría tratar de restaurar los niveles del receptor en pacientes *LILRA3<sup>+/-</sup>* mediante la administración de LILRA3 producido *“in vitro”*. Esta aproximación supondría un mayor riesgo en el caso de pacientes *LILRA3<sup>-/-</sup>* debido a la posibilidad de desarrollar reacciones de hipersensibilidad ya que su sistema inmunológico no estaría tolerizado frente a LILRA3. Una última posibilidad en estos pacientes *LILRA3<sup>-/-</sup>*, aunque con más dificultades técnicas, sería intentar reconstituir la expresión de LILRA3 mediante terapia génica sobre sus propias células progenitoras del Sistema Inmunológico.





## ***Conclusiones***

*“Me he dedicado a investigar la vida y no sé por qué ni para qué.”*

**Severo Ochoa**



1. Las secuencias *KIR2DS3\*001* y *KIR2DS3\*002* pertenecen a dos loci distintos. El centromérico (*KIR2DS3S5C*) incluye a *KIR2SD3\*001*, *\*004* y varias secuencias de *KIR2DS5*. El telomérico (*KIR2DS3S5T*) incluye a *KIR2DS3\*002*, *\*003N* y al alelo común de *KIR2DS5*.
2. Recombinaciones a nivel de los loci *KIR2DS3S5* centromérico y telomérico han generado nuevos haplotipos con duplicaciones y deleciones de varios genes y también el alelo quimérico *KIR2DS2\*005*, expresado en la membrana de Células NK y Linfocitos T.
3. El haplotipo telomérico B, compuesto por *KIR3DS1-KIR2DL5A-KIR2DS3S5-KIR2DS1*, podría tener un efecto protector frente a la EM-R.
4. La deleción de *LILRA3* se asocia al desarrollo de la EM-R en España e interacciona con *HLA-DRB1\*15:01* incrementando el riesgo de desarrollar la enfermedad y, posiblemente, acelerando su curso clínico.
5. Los alelos aberrantes de *LILRA3* son muy infrecuentes en España, lo que impide evaluarlos como posible factor de riesgo.
6. Los polimorfismos de *LILRA3* no incrementan significativamente el riesgo a desarrollar la EM-R ni empeoran su curso clínico, aunque si observamos un posible efecto aditivo sobre el riesgo conferido por la deleción.
7. No existen interacciones consistentes entre los polimorfismos de *LILRA3* y el alelo *HLA-DRB1\*15:01*.







## **Referencias**

*Dicebat Bernardus Carnotensis nos esse quasi nanos, gigantium humeris insidentes, ut possimus plura eis et remotiora videre, non utique proprii visus acumine, aut eminentia corporis, sed quia in altum subvenimur et extollimur magnitudine gigantea*

*Decía Bernardo de Chartres que somos como enanos a los hombros de gigantes. Podemos ver más, y más lejos que ellos, no por alguna distinción física nuestra, sino porque somos levantados por su gran altura.*

**Juan de Salisbury, Metalogicon (1159)**



1. Barrow, A.D. and J. Trowsdale, *The extended human leukocyte receptor complex: diverse ways of modulating immune responses*. Immunol Rev, 2008. **224**: p. 98-123.
2. Trowsdale, J., et al., *The genomic context of natural killer receptor extended gene families*. Immunol Rev, 2001. **181**: p. 20-38.
3. Wu, J., et al., *An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10*. Science, 1999. **285**(5428): p. 730-2.
4. Bauer, S., et al., *Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA*. Science, 1999. **285**(5428): p. 727-9.
5. Roda-Navarro, P. and H.T. Reyburn, *Intercellular protein transfer at the NK cell immune synapse: mechanisms and physiological significance*. FASEB J, 2007. **21**(8): p. 1636-46.
6. Lanier, L.L., et al., *Immunoreceptor DAP12 bearing a tyrosine-based activation motif is involved in activating NK cells*. Nature, 1998. **391**(6668): p. 703-7.
7. Tomasello, E., et al., *Gene structure, expression pattern, and biological activity of mouse killer cell activating receptor-associated protein (KARAP)/DAP-12*. J Biol Chem, 1998. **273**(51): p. 34115-9.
8. McVicar, D.W. and D.N. Burshtyn, *Intracellular signaling by the killer immunoglobulin-like receptors and Ly49*. Sci STKE, 2001. **2001**(75): p. re1.
9. Hamerman, J.A., et al., *Enhanced Toll-like receptor responses in the absence of signaling adaptor DAP12*. Nat Immunol, 2005. **6**(6): p. 579-86.
10. Hauck, C.R., et al., *Cellular adhesion molecules as targets for bacterial infection*. Eur J Cell Biol, 2006. **85**(3-4): p. 235-42.
11. Motran, C.C., et al., *Human pregnancy-specific glycoprotein 1a (PSG1a) induces alternative activation in human and mouse monocytes and suppresses the accessory cell-dependent T cell proliferation*. J Leukoc Biol, 2002. **72**(3): p. 512-21.
12. Fazekas, F., et al., *The impact of our genes: consequences of the apolipoprotein E polymorphism in Alzheimer disease and multiple sclerosis*. J Neurol Sci, 2006. **245**(1-2): p. 35-9.
13. Simister, N.E. and A.R. Rees, *Isolation and characterization of an Fc receptor from neonatal rat small intestine*. Eur J Immunol, 1985. **15**(7): p. 733-8.
14. Burmeister, W.P., et al., *Crystal structure at 2.2 Å resolution of the MHC-related neonatal Fc receptor*. Nature, 1994. **372**(6504): p. 336-43.
15. Telleman, P. and R.P. Junghans, *The role of the Brambell receptor (FcRB) in liver: protection of endocytosed immunoglobulin G (IgG) from catabolism in hepatocytes rather than transport of IgG to bile*. Immunology, 2000. **100**(2): p. 245-51.
16. Simister, N.E., et al., *New functions of the MHC class I-related Fc receptor, FcRn*. Biochem Soc Trans, 1997. **25**(2): p. 481-6.
17. Leach, J.L., et al., *Isolation from human placenta of the IgG transporter, FcRn, and localization to the syncytiotrophoblast: implications for maternal-fetal antibody transport*. J Immunol, 1996. **157**(8): p. 3317-22.

18. Roopenian, D.C. and S. Akilesh, *FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(9): p. 715-25.
19. Crocker, P.R., et al., *Siglecs: a family of sialic-acid binding lectins*. Glycobiology, 1998. **8**(2): p. v.
20. von Gunten, S. and B.S. Bochner, *Basic and clinical immunology of Siglecs*. Ann N Y Acad Sci, 2008. **1143**: p. 61-82.
21. Kim, N., et al., *A novel member of the leukocyte receptor complex regulates osteoclast differentiation*. J Exp Med, 2002. **195**(2): p. 201-9.
22. Nemeth, K., et al., *The role of osteoclast-associated receptor in osteoimmunology*. J Immunol, 2011. **186**(1): p. 13-8.
23. Merck, E., et al., *OSCAR is an FcRgamma-associated receptor that is expressed by myeloid cells and is involved in antigen presentation and activation of human dendritic cells*. Blood, 2004. **104**(5): p. 1386-95.
24. Barrow, A.D., et al., *OSCAR is a collagen receptor that costimulates osteoclastogenesis in DAP12-deficient humans and mice*. J Clin Invest, 2011. **121**(9): p. 3505-16.
25. Meyaard, L., et al., *LAIR-1, a novel inhibitory receptor expressed on human mononuclear leukocytes*. Immunity, 1997. **7**(2): p. 283-90.
26. Lebbink, R.J., et al., *Collagens are functional, high affinity ligands for the inhibitory immune receptor LAIR-1*. J Exp Med, 2006. **203**(6): p. 1419-25.
27. Lebbink, R.J., et al., *The soluble leukocyte-associated Ig-like receptor (LAIR)-2 antagonizes the collagen/LAIR-1 inhibitory immune interaction*. J Immunol, 2008. **180**(3): p. 1662-9.
28. Albrechtsen, M., G.R. Yeaman, and M.A. Kerr, *Characterization of the IgA receptor from human polymorphonuclear leucocytes*. Immunology, 1988. **64**(2): p. 201-5.
29. Ding, Y., et al., *Crystal structure of the ectodomain of human FcalphaRI*. J Biol Chem, 2003. **278**(30): p. 27966-70.
30. Herr, A.B., E.R. Ballister, and P.J. Bjorkman, *Insights into IgA-mediated immune responses from the crystal structures of human FcalphaRI and its complex with IgA1-Fc*. Nature, 2003. **423**(6940): p. 614-20.
31. Launay, P., et al., *Alternative endocytic pathway for immunoglobulin A Fc receptors (CD89) depends on the lack of FcRgamma association and protects against degradation of bound ligand*. J Biol Chem, 1999. **274**(11): p. 7216-25.
32. Pessino, A., et al., *Molecular cloning of NKp46: a novel member of the immunoglobulin superfamily involved in triggering of natural cytotoxicity*. J Exp Med, 1998. **188**(5): p. 953-60.
33. Sivori, S., et al., *NKp46 is the major triggering receptor involved in the natural cytotoxicity of fresh or cultured human NK cells. Correlation between surface density of NKp46 and natural cytotoxicity against autologous, allogeneic or xenogeneic target cells*. Eur J Immunol, 1999. **29**(5): p. 1656-66.

34. Magri, G., et al., *NKp46 and DNAM-1 NK-cell receptors drive the response to human cytomegalovirus-infected myeloid dendritic cells overcoming viral immune evasion strategies*. *Blood*, 2011. **117**(3): p. 848-56.
35. Mandelboim, O., et al., *Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells*. *Nature*, 2001. **409**(6823): p. 1055-60.
36. Jandrot-Perrus, M., et al., *Cloning, characterization, and functional studies of human and mouse glycoprotein VI: a platelet-specific collagen receptor from the immunoglobulin superfamily*. *Blood*, 2000. **96**(5): p. 1798-807.
37. Steevels, T.A., et al., *Co-expression of the collagen receptors leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor-1 and glycoprotein VI on a subset of megakaryoblasts*. *Haematologica*, 2010. **95**(12): p. 2005-12.
38. Borges, L., et al., *A family of human lymphoid and myeloid Ig-like receptors, some of which bind to MHC class I molecules*. *J Immunol*, 1997. **159**(11): p. 5192-6.
39. Colonna, M., et al., *A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells*. *J Exp Med*, 1997. **186**(11): p. 1809-18.
40. Cosman, D., et al., *A novel immunoglobulin superfamily receptor for cellular and viral MHC class I molecules*. *Immunity*, 1997. **7**(2): p. 273-82.
41. Samaridis, J. and M. Colonna, *Cloning of novel immunoglobulin superfamily receptors expressed on human myeloid and lymphoid cells: structural evidence for new stimulatory and inhibitory pathways*. *Eur J Immunol*, 1997. **27**(3): p. 660-5.
42. Wagtmann, N., et al., *A new human gene complex encoding the killer cell inhibitory receptors and related monocyte/macrophage receptors*. *Curr Biol*, 1997. **7**(8): p. 615-8.
43. Wende, H., A. Volz, and A. Ziegler, *Extensive gene duplications and a large inversion characterize the human leukocyte receptor cluster*. *Immunogenetics*, 2000. **51**(8-9): p. 703-13.
44. Torkar, M., et al., *Arrangement of the ILT gene cluster: a common null allele of the ILT6 gene results from a 6.7-kbp deletion*. *Eur J Immunol*, 2000. **30**(12): p. 3655-62.
45. Nakajima, H., et al., *Human myeloid cells express an activating ILT receptor (ILT1) that associates with Fc receptor gamma-chain*. *J Immunol*, 1999. **162**(1): p. 5-8.
46. Anderson, K.J. and R.L. Allen, *Regulation of T-cell immunity by leucocyte immunoglobulin-like receptors: innate immune receptors for self on antigen-presenting cells*. *Immunology*, 2009. **127**(1): p. 8-17.
47. Navarro, F., et al., *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*, 1999. **29**(1): p. 277-83.
48. Chapman, T.L., A.P. Heikeman, and P.J. Bjorkman, *The inhibitory receptor LIR-1 uses a common binding interaction to recognize class I MHC molecules and the viral homolog UL18*. *Immunity*, 1999. **11**(5): p. 603-13.

49. Li, D., et al., *Ig-like transcript 4 inhibits lipid antigen presentation through direct CD1d interaction*. J Immunol, 2009. **182**(2): p. 1033-40.
50. Borges, L. and D. Cosman, *LIRs/ILTs/MIRs, inhibitory and stimulatory Ig-superfamily receptors expressed in myeloid and lymphoid cells*. Cytokine Growth Factor Rev, 2000. **11**(3): p. 209-17.
51. Cao, W., et al., *Plasmacytoid dendritic cell-specific receptor ILT7-Fc epsilonRI gamma inhibits Toll-like receptor-induced interferon production*. J Exp Med, 2006. **203**(6): p. 1399-405.
52. Lee, D.J., et al., *LILRA2 activation inhibits dendritic cell differentiation and antigen presentation to T cells*. J Immunol, 2007. **179**(12): p. 8128-36.
53. Young, N.T., et al., *Differential expression of leukocyte receptor complex-encoded Ig-like receptors correlates with the transition from effector to memory CTL*. J Immunol, 2001. **166**(6): p. 3933-41.
54. Romo, N., et al., *Association of atherosclerosis with expression of the LILRB1 receptor by human NK and T-cells supports the infectious burden hypothesis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011. **31**(10): p. 2314-21.
55. Jones, D.C., et al., *Alternative mRNA splicing creates transcripts encoding soluble proteins from most LILR genes*. Eur J Immunol, 2009. **39**(11): p. 3195-206.
56. Nakajima, H., et al., *Transcriptional regulation of ILT family receptors*. J Immunol, 2003. **171**(12): p. 6611-20.
57. An, H., et al., *Soluble LILRA3, a potential natural antiinflammatory protein, is increased in patients with rheumatoid arthritis and is tightly regulated by interleukin 10, tumor necrosis factor-alpha, and interferon-gamma*. J Rheumatol, 2010. **37**(8): p. 1596-606.
58. Ryu, M., et al., *LILRA3 binds both classical and non-classical HLA class I molecules but with reduced affinities compared to LILRB1/LILRB2: structural evidence*. PLoS One, 2011. **6**(4): p. e19245.
59. Jones, D.C., et al., *HLA class I allelic sequence and conformation regulate leukocyte Ig-like receptor binding*. J Immunol, 2011. **186**(5): p. 2990-7.
60. Norman, P.J., et al., *DNA sequence variation and molecular genotyping of natural killer leukocyte immunoglobulin-like receptor, LILRA3*. Immunogenetics, 2003. **55**(3): p. 165-71.
61. Hirayasu, K., et al., *Long-term persistence of both functional and non-functional alleles at the leukocyte immunoglobulin-like receptor A3 (LILRA3) locus suggests balancing selection*. Hum Genet, 2006. **119**(4): p. 436-43.
62. Norman, P.J., et al., *SNP haplotypes and allele frequencies show evidence for disruptive and balancing selection in the human leukocyte receptor complex*. Immunogenetics, 2004. **56**(4): p. 225-37.
63. Wisniewski, A., et al., *Distribution of LILRA3 (ILT6/LIR4) deletion in psoriatic patients and healthy controls*. Hum Immunol, 2003. **64**(4): p. 458-61.

64. Koch, S., et al., *Association of multiple sclerosis with ILT6 deficiency*. Genes Immun, 2005. **6**(5): p. 445-7.
65. Kabalak, G., et al., *Association of immunoglobulin-like transcript 6 deficiency with Sjogren's syndrome*. Arthritis Rheum, 2009. **60**(10): p. 2923-5.
66. Hirayasu, K., et al., *Evidence for natural selection on leukocyte immunoglobulin-like receptors for HLA class I in Northeast Asians*. Am J Hum Genet, 2008. **82**(5): p. 1075-83.
67. Martin, A.M., et al., *The genomic organization and evolution of the natural killer immunoglobulin-like receptor (KIR) gene cluster*. Immunogenetics, 2000. **51**(4-5): p. 268-80.
68. Wilson, M.J., et al., *Plasticity in the organization and sequences of human KIR/ILT gene families*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(9): p. 4778-83.
69. Sambrook, J.G., et al., *Identification of the ancestral killer immunoglobulin-like receptor gene in primates*. BMC Genomics, 2006. **7**: p. 209.
70. Guethlein, L.A., et al., *The expanded cattle KIR genes are orthologous to the conserved single-copy KIR3DX1 gene of primates*. Immunogenetics, 2007. **59**(6): p. 517-22.
71. Moretta, L. and A. Moretta, *Killer immunoglobulin-like receptors*. Curr Opin Immunol, 2004. **16**(5): p. 626-33.
72. van Bergen, J., et al., *Phenotypic and functional characterization of CD4 T cells expressing killer Ig-like receptors*. J Immunol, 2004. **173**(11): p. 6719-26.
73. Wagtmann, N., et al., *Molecular clones of the p58 NK cell receptor reveal immunoglobulin-related molecules with diversity in both the extra- and intracellular domains*. Immunity, 1995. **2**(5): p. 439-49.
74. Colonna, M. and J. Samaridis, *Cloning of immunoglobulin-superfamily members associated with HLA-C and HLA-B recognition by human natural killer cells*. Science, 1995. **268**(5209): p. 405-8.
75. Uhrberg, M., et al., *Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes*. Immunity, 1997. **7**(6): p. 753-63.
76. Karre, K., et al., *Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy*. Nature, 1986. **319**(6055): p. 675-8.
77. Lopez-Botet, M., A. Angulo, and M. Guma, *Natural killer cell receptors for major histocompatibility complex class I and related molecules in cytomegalovirus infection*. Tissue Antigens, 2004. **63**(3): p. 195-203.
78. Guma, M., A. Angulo, and M. Lopez-Botet, *NK cell receptors involved in the response to human cytomegalovirus infection*. Curr Top Microbiol Immunol, 2006. **298**: p. 207-23.
79. Andersson, M., et al., *Impaired intracellular transport of class I MHC antigens as a possible means for adenoviruses to evade immune surveillance*. Cell, 1985. **43**(1): p. 215-22.
80. Cox, J.H., et al., *Antigen presentation requires transport of MHC class I molecules from the endoplasmic reticulum*. Science, 1990. **247**(4943): p. 715-8.

81. Fruh, K., et al., *A viral inhibitor of peptide transporters for antigen presentation*. Nature, 1995. **375**(6530): p. 415-8.
82. Hill, A., et al., *Herpes simplex virus turns off the TAP to evade host immunity*. Nature, 1995. **375**(6530): p. 411-5.
83. Coscoy, L. and D. Ganem, *Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes two proteins that block cell surface display of MHC class I chains by enhancing their endocytosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(14): p. 8051-6.
84. Ishido, S., et al., *Downregulation of major histocompatibility complex class I molecules by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K3 and K5 proteins*. J Virol, 2000. **74**(11): p. 5300-9.
85. Valiante, N.M., et al., *Killer cell receptors: keeping pace with MHC class I evolution*. Immunol Rev, 1997. **155**: p. 155-64.
86. Farag, S.S., et al., *Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect*. Blood, 2002. **100**(6): p. 1935-47.
87. Velardi, A., et al., *NK cells: a lesson from mismatched hematopoietic transplantation*. Trends Immunol, 2002. **23**(9): p. 438-44.
88. Sivori, S., et al., *Natural killer cells expressing the KIR2DS1-activating receptor efficiently kill T-cell blasts and dendritic cells: implications in haploidentical HSCT*. Blood, 2011. **117**(16): p. 4284-92.
89. Graef, T., et al., *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, 2009. **206**(11): p. 2557-72.
90. Martin, M.P., et al., *Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS*. Nat Genet, 2002. **31**(4): p. 429-34.
91. Stewart, C.A., et al., *Recognition of peptide-MHC class I complexes by activating killer immunoglobulin-like receptors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(37): p. 13224-9.
92. Winter, C.C., et al., *Direct binding and functional transfer of NK cell inhibitory receptors reveal novel patterns of HLA-C allotype recognition*. J Immunol, 1998. **161**(2): p. 571-7.
93. Thananchai, H., et al., *Cutting Edge: Allele-specific and peptide-dependent interactions between KIR3DL1 and HLA-A and HLA-B*. J Immunol, 2007. **178**(1): p. 33-7.
94. Sivori, S., et al., *A novel KIR-associated function: evidence that CpG DNA uptake and shuttling to early endosomes is mediated by KIR3DL2*. Blood, 2010. **116**(10): p. 1637-47.
95. Santourlidis, S., et al., *Crucial role of DNA methylation in determination of clonally distributed killer cell Ig-like receptor expression patterns in NK cells*. J Immunol, 2002. **169**(8): p. 4253-61.
96. Chan, H.W., et al., *DNA methylation maintains allele-specific KIR gene expression in human natural killer cells*. J Exp Med, 2003. **197**(2): p. 245-55.

97. Gomez-Lozano, N., et al., *Epigenetic silencing of potentially functional KIR2DL5 alleles: Implications for the acquisition of KIR repertoires by NK cells*. Eur J Immunol, 2007. **37**(7): p. 1954-65.
98. Stewart, C.A., J. Van Bergen, and J. Trowsdale, *Different and divergent regulation of the KIR2DL4 and KIR3DL1 promoters*. J Immunol, 2003. **170**(12): p. 6073-81.
99. Xu, J., et al., *Distinct transcriptional control mechanisms of killer immunoglobulin-like receptors in natural killer (NK) and in T cells*. J Biol Chem, 2005. **280**(25): p. 24277-85.
100. Gomez-Lozano, N., et al., *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, 2005. **35**(1): p. 16-24.
101. Anfossi, N., et al., *Biology of T memory type 1 cells*. Immunol Rev, 2001. **181**: p. 269-78.
102. Vilches, C. and P. Parham, *KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 217-51.
103. Torkar, M., et al., *Isotypic variation of novel immunoglobulin-like transcript/killer cell inhibitory receptor loci in the leukocyte receptor complex*. Eur J Immunol, 1998. **28**(12): p. 3959-67.
104. Trundley, A.E., et al., *Molecular characterization of KIR3DL3*. Immunogenetics, 2006. **57**(12): p. 904-16.
105. Vilches, C., et al., *KIR2DL5, a novel killer-cell receptor with a D0-D2 configuration of Ig-like domains*. J Immunol, 2000. **164**(11): p. 5797-804.
106. Vilches, C., C.M. Gardiner, and P. Parham, *Gene structure and promoter variation of expressed and nonexpressed variants of the KIR2DL5 gene*. J Immunol, 2000. **165**(11): p. 6416-21.
107. Selvakumar, A., U. Steffens, and B. Dupont, *NK cell receptor gene of the KIR family with two IG domains but highest homology to KIR receptors with three IG domains*. Tissue Antigens, 1996. **48**(4 Pt 1): p. 285-94.
108. Cantoni, C., et al., *p49, a putative HLA class I-specific inhibitory NK receptor belonging to the immunoglobulin superfamily*. Eur J Immunol, 1998. **28**(6): p. 1980-90.
109. Faure, M. and E.O. Long, *KIR2DL4 (CD158d), an NK cell-activating receptor with inhibitory potential*. J Immunol, 2002. **168**(12): p. 6208-14.
110. Rajagopalan, S., et al., *Activation of NK cells by an endocytosed receptor for soluble HLA-G*. PLoS Biol, 2006. **4**(1): p. e9.
111. Rajagopalan, S., J. Fu, and E.O. Long, *Cutting edge: induction of IFN-gamma production but not cytotoxicity by the killer cell Ig-like receptor KIR2DL4 (CD158d) in resting NK cells*. J Immunol, 2001. **167**(4): p. 1877-81.
112. Yusa, S., T.L. Catina, and K.S. Campbell, *SHP-1- and phosphotyrosine-independent inhibitory signaling by a killer cell Ig-like receptor cytoplasmic domain in human NK cells*. J Immunol, 2002. **168**(10): p. 5047-57.

113. Kikuchi-Maki, A., T.L. Catina, and K.S. Campbell, *Cutting edge: KIR2DL4 transduces signals into human NK cells through association with the Fc receptor gamma protein*. J Immunol, 2005. **174**(7): p. 3859-63.
114. Gomez-Lozano, N., et al., *Some human KIR haplotypes contain two KIR2DL5 genes: KIR2DL5A and KIR2DL5B*. Immunogenetics, 2002. **54**(5): p. 314-9.
115. Estefania, E., et al., *Human KIR2DL5 is an inhibitory receptor expressed on the surface of NK and T lymphocyte subsets*. J Immunol, 2007. **178**(7): p. 4402-10.
116. Hsu, K.C., et al., *The killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genomic region: gene-order, haplotypes and allelic polymorphism*. Immunol Rev, 2002. **190**: p. 40-52.
117. Maxwell, L.D., et al., *A common KIR2DS4 deletion variant in the human that predicts a soluble KIR molecule analogous to the KIR1D molecule observed in the rhesus monkey*. Tissue Antigens, 2002. **60**(3): p. 254-8.
118. Hou, L., et al., *Conserved KIR allele-level haplotypes are altered by microvariation in individuals with European ancestry*. Genes Immun, 2012. **13**(1): p. 47-58.
119. Moesta, A.K., et al., *Synergistic polymorphism at two positions distal to the ligand-binding site makes KIR2DL2 a stronger receptor for HLA-C than KIR2DL3*. J Immunol, 2008. **180**(6): p. 3969-79.
120. Pando, M.J., et al., *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, 2003. **171**(12): p. 6640-9.
121. Campbell, K.S. and A.K. Purdy, *Structure/function of human killer cell immunoglobulin-like receptors: lessons from polymorphisms, evolution, crystal structures and mutations*. Immunology, 2011. **132**(3): p. 315-25.
122. Martin, M.P., et al., *Cutting edge: expansion of the KIR locus by unequal crossing over*. J Immunol, 2003. **171**(5): p. 2192-5.
123. Traherne, J.A., et al., *Mechanisms of copy number variation and hybrid gene formation in the KIR immune gene complex*. Hum Mol Genet, 2010. **19**(5): p. 737-51.
124. Khakoo, S.I., et al., *HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection*. Science, 2004. **305**(5685): p. 872-4.
125. Orange, J.S., *Human natural killer cell deficiencies and susceptibility to infection*. Microbes Infect, 2002. **4**(15): p. 1545-58.
126. Leong, C.C., et al., *Modulation of natural killer cell cytotoxicity in human cytomegalovirus infection: the role of endogenous class I major histocompatibility complex and a viral class I homolog*. J Exp Med, 1998. **187**(10): p. 1681-7.
127. Tomasec, P., et al., *Surface expression of HLA-E, an inhibitor of natural killer cells, enhanced by human cytomegalovirus gpUL40*. Science, 2000. **287**(5455): p. 1031.
128. Saez-Borderias, A., et al., *IL-12-dependent inducible expression of the CD94/NKG2A inhibitory receptor regulates CD94/NKG2C+ NK cell function*. J Immunol, 2009. **182**(2): p. 829-36.

129. Estefania, E., et al., *Influence of KIR gene diversity on the course of HSV-1 infection: resistance to the disease is associated with the absence of KIR2DL2 and KIR2DS2*. Tissue Antigens, 2007. **70**(1): p. 34-41.
130. Moraru, M., et al., *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, 2012. **188**(9): p. 4412-20.
131. Cook, M., et al., *Donor KIR genotype has a major influence on the rate of cytomegalovirus reactivation following T-cell replete stem cell transplantation*. Blood, 2006. **107**(3): p. 1230-2.
132. Besson, C., et al., *Association of killer cell immunoglobulin-like receptor genes with Hodgkin's lymphoma in a familial study*. PLoS One, 2007. **2**(5): p. e406.
133. Suzuki, Y., et al., *Genetic polymorphisms of killer cell immunoglobulin-like receptors are associated with susceptibility to psoriasis vulgaris*. J Invest Dermatol, 2004. **122**(5): p. 1133-6.
134. Holm, S.J., et al., *Distinct HLA-C/KIR genotype profile associates with guttate psoriasis*. J Invest Dermatol, 2005. **125**(4): p. 721-30.
135. Momot, T., et al., *Association of killer cell immunoglobulin-like receptors with scleroderma*. Arthritis Rheum, 2004. **50**(5): p. 1561-5.
136. Yen, J.H., et al., *Major histocompatibility complex class I-recognizing receptors are disease risk genes in rheumatoid arthritis*. J Exp Med, 2001. **193**(10): p. 1159-67.
137. Dohring, C., J. Samaridis, and M. Colonna, *Alternatively spliced forms of human killer inhibitory receptors*. Immunogenetics, 1996. **44**(3): p. 227-30.
138. Valiante, N.M., et al., *Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors*. Immunity, 1997. **7**(6): p. 739-51.
139. Yawata, M., et al., *Roles for HLA and KIR polymorphisms in natural killer cell repertoire selection and modulation of effector function*. J Exp Med, 2006. **203**(3): p. 633-45.
140. Colonna, M., *Immunology. Unmasking the killer's accomplice*. Nature, 1998. **391**(6668): p. 642-3.
141. Bottino, C., et al., *Identification and molecular characterization of a natural mutant of the p50.2/KIR2DS2 activating NK receptor that fails to mediate NK cell triggering*. Eur J Immunol, 2000. **30**(12): p. 3569-74.
142. Moesta, A.K., et al., *Humans differ from other hominids in lacking an activating NK cell receptor that recognizes the C1 epitope of MHC class I*. J Immunol, 2010. **185**(7): p. 4233-7.
143. Pyo, C.W., et al., *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, 2010. **5**(12): p. e15115.
144. Rajalingam, R., et al., *Identification of seventeen novel KIR variants: fourteen of them from two non-Caucasian donors*. Tissue Antigens, 2001. **57**(1): p. 22-31.

145. Pugliatti, M., et al., *The epidemiology of multiple sclerosis in Europe*. Eur J Neurol, 2006. **13**(7): p. 700-22.
146. Compston, A. and A. Coles, *Multiple sclerosis*. Lancet, 2008. **372**(9648): p. 1502-17.
147. Kurtzke, J.F., *Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS)*. Neurology, 1983. **33**(11): p. 1444-52.
148. Roxburgh, R.H., et al., *Multiple Sclerosis Severity Score: using disability and disease duration to rate disease severity*. Neurology, 2005. **64**(7): p. 1144-51.
149. Kurtzke, J.F., *Epidemiology and etiology of multiple sclerosis*. Phys Med Rehabil Clin N Am, 2005. **16**(2): p. 327-49.
150. Holick, M.F., *Vitamin D: A millenium perspective*. J Cell Biochem, 2003. **88**(2): p. 296-307.
151. van der Mei, I.A., et al., *Regional variation in multiple sclerosis prevalence in Australia and its association with ambient ultraviolet radiation*. Neuroepidemiology, 2001. **20**(3): p. 168-74.
152. Leibowitz, U., et al., *Epidemiological study of multiple sclerosis in Israel. II. Multiple sclerosis and level of sanitation*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1966. **29**(1): p. 60-8.
153. Munger, K.L., et al., *Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis*. JAMA, 2006. **296**(23): p. 2832-8.
154. Joseph, A.M., G.J. Babcock, and D.A. Thorley-Lawson, *EBV persistence involves strict selection of latently infected B cells*. J Immunol, 2000. **165**(6): p. 2975-81.
155. Warner, H.B. and R.I. Carp, *Multiple sclerosis and Epstein-Barr virus*. Lancet, 1981. **2**(8258): p. 1290.
156. Lang, H.L., et al., *A functional and structural basis for TCR cross-reactivity in multiple sclerosis*. Nat Immunol, 2002. **3**(10): p. 940-3.
157. Lunemann, J.D., et al., *EBNA1-specific T cells from patients with multiple sclerosis cross react with myelin antigens and co-produce IFN-gamma and IL-2*. J Exp Med, 2008. **205**(8): p. 1763-73.
158. Lunemann, J.D., et al., *Increased frequency and broadened specificity of latent EBV nuclear antigen-1-specific T cells in multiple sclerosis*. Brain, 2006. **129**(Pt 6): p. 1493-506.
159. Lossius, A., F. Vartdal, and T. Holmoy, *Vitamin D sensitive EBNA-1 specific T cells in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis*. J Neuroimmunol, 2011. **240-241**: p. 87-96.
160. Cepok, S., et al., *Identification of Epstein-Barr virus proteins as putative targets of the immune response in multiple sclerosis*. J Clin Invest, 2005. **115**(5): p. 1352-60.
161. Franciotta, D., et al., *Cerebrospinal BAFF and Epstein-Barr virus-specific oligoclonal bands in multiple sclerosis and other inflammatory demyelinating neurological diseases*. J Neuroimmunol, 2011. **230**(1-2): p. 160-3.
162. Serafini, B., et al., *Dysregulated Epstein-Barr virus infection in the multiple sclerosis brain*. J Exp Med, 2007. **204**(12): p. 2899-912.

163. Thacker, E.L., F. Mirzaei, and A. Ascherio, *Infectious mononucleosis and risk for multiple sclerosis: a meta-analysis*. Ann Neurol, 2006. **59**(3): p. 499-503.
164. Bertrams, H.J. and E.K. Kuwert, *Association of histocompatibility haplotype HLA-A3-B7 with multiple sclerosis*. J Immunol, 1976. **117**(5 Pt.2): p. 1906-12.
165. Stewart, G.J., et al., *HLA family studies and multiple sclerosis: A common gene, dominantly expressed*. Hum Immunol, 1981. **3**(1): p. 13-29.
166. Yaouanq, J., et al., *Evidence for linkage disequilibrium between HLA-DRB1 gene and multiple sclerosis. The French Research Group on Genetic Susceptibility to MS*. Science, 1997. **276**(5313): p. 664-5.
167. Oksenberg, J.R. and L.F. Barcellos, *Multiple sclerosis genetics: leaving no stone unturned*. Genes Immun, 2005. **6**(5): p. 375-87.
168. Schmidt, H., D. Williamson, and A. Ashley-Koch, *HLA-DR15 haplotype and multiple sclerosis: a HuGE review*. Am J Epidemiol, 2007. **165**(10): p. 1097-109.
169. Svejgaard, A., *The immunogenetics of multiple sclerosis*. Immunogenetics, 2008. **60**(6): p. 275-86.
170. Masterman, T., et al., *HLA-DR15 is associated with lower age at onset in multiple sclerosis*. Ann Neurol, 2000. **48**(2): p. 211-9.
171. Fernandez, O., et al., *DQB1\*0602 allele shows a strong association with multiple sclerosis in patients in Malaga, Spain*. J Neurol, 2004. **251**(4): p. 440-4.
172. Pina, M.A., et al., *Study of HLA as a predisposing factor and its possible influence on the outcome of multiple sclerosis in the sanitary district of Calatayud, northern Spain*. Neuroepidemiology, 1999. **18**(4): p. 203-9.
173. Uria, D.F., et al., *HLA class II susceptibility and resistance genes in patients with multiple sclerosis from northern Spain, by DNA-RFLP genotyping*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1993. **56**(6): p. 722-3.
174. Cisneros, E., et al., *A method for simple and accurate identification of the multiple sclerosis associated allele HLA-DRB1\*1501 in neuroscience research laboratories*. J Neuroimmunol, 2010. **225**(1-2): p. 143-8.
175. Hafler, D.A., et al., *Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study*. N Engl J Med, 2007. **357**(9): p. 851-62.
176. Jakkula, E., et al., *Genome-wide association study in a high-risk isolate for multiple sclerosis reveals associated variants in STAT3 gene*. Am J Hum Genet, 2010. **86**(2): p. 285-91.
177. De Jager, P.L., et al., *The role of the CD58 locus in multiple sclerosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(13): p. 5264-9.
178. Barcellos, L.F., et al., *Chromosome 19 single-locus and multilocus haplotype associations with multiple sclerosis. Evidence of a new susceptibility locus in Caucasian and Chinese patients*. JAMA, 1997. **278**(15): p. 1256-61.

179. Pericak-Vance, M.A., et al., *Investigation of seven proposed regions of linkage in multiple sclerosis: an American and French collaborative study*. Neurogenetics, 2004. **5**(1): p. 45-8.
180. Kenealy, S.J., et al., *A second-generation genomic screen for multiple sclerosis*. Am J Hum Genet, 2004. **75**(6): p. 1070-8.
181. Zouali, H., L. Faure-Delanef, and G. Lucotte, *Chromosome 19 locus apolipoprotein C-II association with multiple sclerosis*. Mult Scler, 1999. **5**(2): p. 134-6.
182. Zhang, H.L., J. Wu, and J. Zhu, *The immune-modulatory role of apolipoprotein E with emphasis on multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis*. Clin Dev Immunol, 2010. **2010**: p. 186813.
183. Evangelou, N., et al., *Association of the APOE epsilon4 allele with disease activity in multiple sclerosis*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1999. **67**(2): p. 203-5.
184. Nagler, A., et al., *Comparative studies of human FcRIII-positive and negative natural killer cells*. J Immunol, 1989. **143**(10): p. 3183-91.
185. Bielekova, B., et al., *Regulatory CD56(bright) natural killer cells mediate immunomodulatory effects of IL-2/Ralpha-targeted therapy (daclizumab) in multiple sclerosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(15): p. 5941-6.
186. Saraste, M., H. Irljala, and L. Airas, *Expansion of CD56Bright natural killer cells in the peripheral blood of multiple sclerosis patients treated with interferon-beta*. Neurol Sci, 2007. **28**(3): p. 121-6.
187. Perini, P., et al., *The safety profile of cyclophosphamide in multiple sclerosis therapy*. Expert Opin Drug Saf, 2007. **6**(2): p. 183-90.
188. Benczur, M., et al., *Dysfunction of natural killer cells in multiple sclerosis: a possible pathogenetic factor*. Clin Exp Immunol, 1980. **39**(3): p. 657-62.
189. Kastrukoff, L.F., et al., *A role for natural killer cells in the immunopathogenesis of multiple sclerosis*. J Neuroimmunol, 1998. **86**(2): p. 123-33.
190. Kastrukoff, L.F., et al., *Clinical relapses of multiple sclerosis are associated with 'novel' valleys in natural killer cell functional activity*. J Neuroimmunol, 2003. **145**(1-2): p. 103-14.
191. Saikali, P., et al., *NKG2D-mediated cytotoxicity toward oligodendrocytes suggests a mechanism for tissue injury in multiple sclerosis*. J Neurosci, 2007. **27**(5): p. 1220-8.
192. Martinez-Rodriguez, J.E., et al., *Natural killer receptors distribution in multiple sclerosis: Relation to clinical course and interferon-beta therapy*. Clin Immunol, 2010. **137**(1): p. 41-50.
193. Martinez-Rodriguez, J.E., et al., *Natural killer cell phenotype and clinical response to interferon-beta therapy in multiple sclerosis*. Clin Immunol, 2011. **141**(3): p. 348-56.
194. Hsu, K.C., et al., *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, 2002. **169**(9): p. 5118-29.

195. Du, Z., et al., *KIR2DL5 alleles mark certain combination of activating KIR genes*. *Genes Immun*, 2008. **9**(5): p. 470-80.
196. Luo, L., et al., *Chain-terminating natural mutations affect the function of activating KIR receptors 3DS1 and 2DS3*. *Immunogenetics*, 2007. **59**(10): p. 779-92.
197. Hou, L., et al., *Thirty allele-level haplotypes centered around KIR2DL5 define the diversity in an African American population*. *Immunogenetics*, 2010. **62**(8): p. 491-8.
198. Rodacki, M., et al., *Altered natural killer cells in type 1 diabetic patients*. *Diabetes*, 2007. **56**(1): p. 177-85.
199. Wauquier, N., et al., *Association of KIR2DS1 and KIR2DS3 with fatal outcome in Ebola virus infection*. *Immunogenetics*, 2010. **62**(11-12): p. 767-71.
200. Dring, M.M., et al., *Innate immune genes synergize to predict increased risk of chronic disease in hepatitis C virus infection*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(14): p. 5736-41.
201. Wu, G.Q., et al., *The beneficial impact of missing KIR ligands and absence of donor KIR2DS3 gene on outcome following unrelated hematopoietic SCT for myeloid leukemia in the Chinese population*. *Bone Marrow Transplant*, 2010. **45**(10): p. 1514-21.
202. Cooley, S., et al., *Donors with group B KIR haplotypes improve relapse-free survival after unrelated hematopoietic cell transplantation for acute myelogenous leukemia*. *Blood*, 2009. **113**(3): p. 726-32.
203. Cooley, S., et al., *Donor selection for natural killer cell receptor genes leads to superior survival after unrelated transplantation for acute myelogenous leukemia*. *Blood*, 2010. **116**(14): p. 2411-9.
204. VandenBussche, C.J., et al., *Dramatically reduced surface expression of NK cell receptor KIR2DS3 is attributed to multiple residues throughout the molecule*. *Genes Immun*, 2009. **10**(2): p. 162-73.
205. Della Chiesa, M., et al., *Evidence that the KIR2DS5 gene codes for a surface receptor triggering natural killer cell function*. *Eur J Immunol*, 2008. **38**(8): p. 2284-9.
206. Martin, M.P., et al., *Cutting edge: susceptibility to psoriatic arthritis: influence of activating killer Ig-like receptor genes in the absence of specific HLA-C alleles*. *J Immunol*, 2002. **169**(6): p. 2818-22.
207. Shastry, A., et al., *Combination of KIR 2DL2 and HLA-C1 (Asn 80) confers susceptibility to type 1 diabetes in Latvians*. *Int J Immunogenet*, 2008. **35**(6): p. 439-46.
208. Pellett, F., et al., *KIRs and autoimmune disease: studies in systemic lupus erythematosus and scleroderma*. *Tissue Antigens*, 2007. **69 Suppl 1**: p. 106-8.
209. Bonetti, A., et al., *A follow-up study of chromosome 19q13 in multiple sclerosis susceptibility*. *J Neuroimmunol*, 2009. **208**(1-2): p. 119-24.
210. Pinholt, M., J.L. Frederiksen, and M. Christiansen, *The association between apolipoprotein E and multiple sclerosis*. *Eur J Neurol*, 2006. **13**(6): p. 573-80.
211. Fusco, C., et al., *KIRs and their HLA ligands in remitting-relapsing multiple sclerosis*. *J Neuroimmunol*, 2010. **229**(1-2): p. 232-7.

212. Alter, G., et al., *Differential natural killer cell-mediated inhibition of HIV-1 replication based on distinct KIR/HLA subtypes*. J Exp Med, 2007. **204**(12): p. 3027-36.
213. Lorentzen, A.R., et al., *Killer immunoglobulin-like receptor ligand HLA-Bw4 protects against multiple sclerosis*. Ann Neurol, 2009. **65**(6): p. 658-66.
214. Garcia-Leon, J.A., et al., *Killer cell immunoglobulin-like receptor genes in Spanish multiple sclerosis patients*. Mol Immunol, 2011. **48**(15-16): p. 1896-902.
215. Jelcic, I., et al., *Killer immunoglobulin-like receptor locus polymorphisms in multiple sclerosis*. Mult Scler, 2011.
216. Moodie, S.J., et al., *Analysis of candidate genes on chromosome 19 in coeliac disease: an association study of the KIR and LILR gene clusters*. Eur J Immunogenet, 2002. **29**(4): p. 287-91.
217. Jones, D.C., et al., *Nature of allelic sequence polymorphism at the KIR3DL3 locus*. Immunogenetics, 2006. **58**(8): p. 614-27.
218. Jung, M., et al., *Expression profiling of IL-10-regulated genes in human monocytes and peripheral blood mononuclear cells from psoriatic patients during IL-10 therapy*. Eur J Immunol, 2004. **34**(2): p. 481-93.







