

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Ciencias Químicas

Departamento de Bioquímica

**POLIMORFISMO ESTRUCTURAL,
MECANISMOS EVOLUTIVOS Y
RECONOCIMIENTO CELULAR DEL
ANTIGENO HLA-A2**

A. Raúl Castaño García

Madrid, 1993

Colección Tesis Doctorales. N.º 96/93

© A. Raúl Castaño García

**Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía.
Escuela de Estomatología. Ciudad Universitaria.
Madrid, 1993.
Ricoh 3700
Depósito Legal: M-12291-1993**



La Tesis Doctoral de D. ...ANGEL.RAUL.CASTAÑO...
GARCIA

Titulada "POLIMOREISMO. ESTRUCTURAL. MECANISMOS.
EVOLUTIVOS Y RECONOCIMIENTO CELULAR DEL ANTI-
GENO HLA-A2"

Director Dr. D. ...J. A. LOPEZ DE CASTRO.....

fue leída en la Facultad de ..CIENCIAS QUIMICAS

de la UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID, el día .18...

de ...Noviembre..... de 19 .91., ante el tribunal

constituido por los siguientes Profesores:

PRESIDENTE ..D. AGUSTIN ZAPATA.....

VOCAL : ..D. MANUEL ORTIZ DE LANDAZURI.....

VOCAL ..D. SANTIAGO RODRIGUEZ DE CORDOBA.....

VOCAL ..D. MIGUEL ANGEL VEGA.....

SECRETARIO ..D. FERNANDO VIVANCO MARTINEZ.....

.....
habiendo recibido la calificación de *Apto. esus.*
laude por unanimidad.

Madrid, a 18 de Noviembre de 1991.

EL SECRETARIO DEL TRIBUNAL.

[Firma manuscrita]

TESIS DOCTORAL

A. RAUL CASTAÑO GARCIA

**POLIMORFISMO ESTRUCTURAL, MECANISMOS EVOLUTIVOS
Y RECONOCIMIENTO CELULAR DEL ANTIGENO HLA-A2.**

DIRECTOR: D. JOSE ANTONIO LOPEZ DE CASTRO

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

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA
MADRID, 1991.**

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

CERTIFICO que Angel Raúl Castaño García, Licenciado en Ciencias Químicas, ha llevado a cabo bajo mi dirección el trabajo que se expone en la presente Tesis Doctoral titulada: "Polimorfismo estructural, mecanismos evolutivos y reconocimiento celular del antígeno HLA-A2".

Y para que conste donde proceda firmo la presente.

Madrid, 7 de Octubre de 1991.

Fdo: José Antonio López de Castro.

A mi familia

1- INTRODUCCION	1
1.1- EL COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD	2
1.1.1- ORGANIZACION DEL MHC HUMANO	2
1.1.2- FUNCIONALIDAD DE LOS ANTIGENOS HLA	4
1.1.2.1- Reconocimiento alogénico	4
1.1.2.2- Reconocimiento restringido	5
1.1.2.3- Selección tímica	6
1.1.2.4- Otras funciones	6
1.1.3- POLIMORFISMO DE LOS ANTIGENOS HLA DE CLASE I	6
1.2- ANTIGENO HLA-A2	11
1.2.1- CARACTERISTICAS MOLECULARES	11
1.2.2- ESTRUCTURA GENICA	12
1.2.3- BIOSINTESIS Y MADURACION	14
1.3- ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE HLA-A2	15
1.4- DIVERSIDAD Y FUNCION DE HLA-A2	18
1.4.1- POLIMORFISMO NATURAL	18
1.4.1.1- Definición de subtipos	18
1.4.1.2- Caracterización de los subtipos	20
1.4.2- EPITOPOS SEROLOGICOS	21
1.4.2.1- Caracterización de epítotos reconocidos por anticuerpos monoclonales	21
1.4.2.2- Mimetismo con péptidos sintéticos	23
1.4.3- RECONOCIMIENTO POR CTLs	23
1.4.3.1- Epítotos conformacionales	23
1.4.3.2- Mapeo de epítotos celulares	24
1.4.3.3- Participación de péptidos endógenos en el reconocimiento alogénico	25
1.4.3.4- Papel de la interacción CD8- α 3	27
1.4.4- INTERACCION HLA-A2-PEPTIDOS	28
2- OBJETIVOS	31

3- MATERIALES Y METODOS	33
3.1- CULTIVOS CELULARES	34
3.1.1- LINEAS CELULARES	34
3.1.2- CONGELACION Y DESCONGELACION LINEAS CELULARES	34
3.2- REACTIVOS PARA INMUNOPRECIPITACION	35
3.2.1- ANTICUERPO MONOCLONAL PA21	35
3.2.1.1- Obtención del AcMo PA2.1	35
3.2.2.2- Acoplamiento de PA2.1 a sepharosa	36
3.2.2- PREPARACION DE PROTEINA A DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS	36
3.3- MAPEO PEPTIDICO COMPARATIVO	37
3.3.1- MARCAJE METABOLICO	37
3.3.2- PURIFICACION DE LA CADENA PESADA DE HLA-A2	39
3.3.2.1- Aislamiento de las proteínas de membrana	39
3.3.2.2- Aislamiento del antígeno HLA-A2	39
3.3.3- OBTENCION DE MAPAS PEPTIDICOS	42
3.3.3.1- Reducción, alquilación y digestión trípica	42
3.3.3.2- Separación de péptidos por HPLC	43
3.3.4- ANALISIS DE PEPTIDOS DE GRAN TAMAÑO	43
3.3.5- PURIFICACION CROMATOGRAFICA DE PEPTIDOS COELUYENTES	44
3.3.6- SECUENCIACION RADIOQUIMICA	45
3.4- AMPLIFICACION Y SECUENCIACION DE cDNA CODIFICANTE DE HLA-A2	45
3.4.1- CULTIVOS BACTERIANOS	45
3.4.1.1- Cepas bacterianas y vectores utilizados	45
3.4.1.2- Medios de cultivo y crecimiento bacteriano	46
3.4.1.3- Obtención de bacterias competentes	47
3.4.1.4- Trasformación de bacterias competentes	48
3.4.1.5- Aislamiento de plásmidos	48
3.4.2- GELES DE AGAROSA Y SOUTHERN BLOT	51
3.4.2.1- Geles de agarosa analíticos	51
3.4.2.2- Geles de agarosa preparativos y aislamiento de bandas	51
3.4.2.3- Southern blot	51

3.4.3- OLIGONUCLEOTIDOS UTILIZADOS	52
3.4.3.1- Descripción	52
3.4.3.2- Purificación de oligonucleótidos	53
3.4.3.3- Marcaje radiactivo de sondas	54
3.4.4- OBTENCION DE cDNA DE ANTIGENOS DE CLASE I	55
3.4.4.1- Aislamiento de RNA	55
3.4.4.2- Síntesis de cDNA	55
3.4.5- AMPLIFICACION DEL cDNA DE ANTIGENOS DE CLASE I MEDIANTE PCR	56
3.4.6- CLONAJE DEL cDNA AMPLIFICADO POR PCR	58
3.4.6.1- Aislamiento y clonaje en pUC	58
3.4.6.2- Aislamiento y selección de colonias recombinantes	58
3.4.7- SUBCLONAJE EN M13mp18 DEL cDNA DE A2 CLONADO EN pUC	59
3.4.7.1- Aislamiento y subclonaje en M13 del cDNA de A2 introducido en pUC	59
3.4.7.2- Aislamiento y crecimiento de M13 recombinante	60
3.4.8- SECUENCIACION DE M13-A2	60
3.4.8.1- Aislamiento de DNA M13-A2 monocatenario	60
3.4.8.2- Reacciones de secuenciación	61
3.4.8.3- Electroforesis en geles de poliacrilamida para secuencia. ...	61
4- RESULTADOS	63
4.1- CARACTERIZACION BIOQUIMICA DEL ANTIGENO HLA-A*0209 EXPRESADO EN LA LINEA OZB	64
4.1.1- LOCALIZACION DE UN UNICO PEPTIDO DE DIFERENCIA ENTRE LAS MOLECULAS A2-OZB (A*0209) Y A*0201 EN EL DOMINIO $\alpha 3$	64
4.1.2- DELIMITACION DE LA REGION DE DIFERENCIA AL PEPTIDO 233-243	69
4.1.3- IDENTIFICACION DE UN UNICO CAMBIO DE ALA-->GLU EN LA POSICION 236 DE LA VARIANTE A2-OZB (A*0209)	77
4.2- BASES MOLECULARES DE LA REACTIVIDAD DE LA LINEA ALOGENICA ESPECIFICA DE HLA-A2, CTL14. ANALISIS ESTRUCTURAL DE LOS ANTIGENOS HLA-A2 EXPRESADOS EN LAS LINEAS CELULARES SCHU, ARC Y ESST	88

4.2.1-	ANALISIS ESTRUCTURAL DEL ANTIGENO HLA-A2 EXPRESADO EN LA LINEA SCHU	90
4.2.1.1-	Mapeo peptídico comparativo entre los antígenos HLA-A2 de SCHU y A*0201	90
4.2.2-	Mapeo peptídico comparativo entre los antígenos HLA-A2 de SCHU y A*0206	94
4.2.2-	ANALISIS ESTRUCTURAL DE LOS ANTIGENOS HLA-A2 EXPRESADOS EN LAS LINEAS ARC Y ESST	97
4.2.3-	SECUENCIACION DEL cDNA CODIFICANTE DEL ANTIGENO HLA-A2 EXPRESADO EN LA LINEA SCHU	97
4.2.3.1-	Obtención y secuenciación de cDNA del antígeno HLA-A2 de la línea celular SCHU	100
4.3-	CARACTERIZACION DE LOS ANTIGENOS HLA-A*0204 Y HLA-A*0211	105
4.3.1-	OBTENCION Y SECUENCIACION DE cDNA DEL ALELO HLA-A*0204 EXPRESADO EN LA LINEA RML	105
4.3.2-	OBTENCION Y SECUENCIACION DE cDNA DEL ALELO HLA-A*0211 EXPRESADO EN LA LINEA KIME	108
5-	DISCUSION	114
5.1-	ANTIGENO HLA-A*0209 EXPRESADO EN OZB: polimorfismo en el dominio $\alpha 3$	115
5.2-	REACTIVIDAD DE LA LINEA ALOGENICA CTL14: reconocimiento alogénico de HLA-A2 mediado por péptidos endógenos	118
5.3-	ANTIGENOS HLA-A*0204 Y HLA-A*0211: La selección natural como motor de la diversificación del antígeno HLA-A2	122
5.4-	DISCUSION GENERAL: implicaciones funcionales y evolutivas del polimorfismo de HLA-A2. Recapitulación	127
6-	CONCLUSIONES	135
7-	BIBLIOGRAFIA	138
8-	APENDICE	153

ABREVIATURAS

AcMo	Anticuerpo monoclonal
ATP	Adenosin trifosfato
β2m	β 2-microglobulina
BSA	Albúmina de suero bovina
CNBr	Bromuro de cianógeno
CPM	Cuentas por minuto
CTL	Linfocito T citotóxico
dITP	Deoxiinosintrifosfato
DNA	Acido desoxirribonucleico
dNTP	Deoxinucleótido
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Acido etilén-diamino-tetra-acético
HLA	Antígeno de histocompatibilidad humano
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
IEF	Isoelectroenfoque
IPTG	Isopropiltiogalactósido
Kb	Kilobase
kD	Kilodalton
LCL	Línea celular linfoblástica
MHC	Complejo Principal de Histocompatibilidad
min	Minutos
NP-40	Nonidet P-40
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pI	Punto isoeléctrico
PM	Peso molecular
SACI	Proteína A de Staphilococcus aureus
SNC	Suero normal de conejo
RNA	Acido ribonucleico
SDS	Dodecil sulfato sódico

seg	Segundos
STFI	Suero de ternera fetal inactivado
TCR	Receptor del antígeno de la célula T
TFA	Acido trifluoracético
T_m	Temperatura media de disociación

1. INTRODUCCION

INTRODUCCION

1.1 EL COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD.

La definición en 1937 por P.A. Gorer de un antígeno determinante de la susceptibilidad o resistencia al trasplante de tumores en ratones (1) supuso la primera prueba de la existencia de genes marcadores de la individualidad genética capaces de controlar la respuesta inmune, a los que se denominó antígenos de trasplante o de histocompatibilidad. Posteriormente se comprobó la existencia de un conjunto de antígenos codificados en una misma región del genoma responsables del rechazo agudo de trasplantes (2), frente a otra serie de antígenos que provocan una respuesta mucho menos vigorosa y mas tardía, y que se denominan antígenos menores (3). El conjunto de genes así definido se denominó Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) y ha sido descrito en todos los vertebrados analizados (4) y en protocordados (5).

1.1.1 Organización del MHC humano.

El MHC humano comprende una región de 3600 kb situada en la región 6p21.3-6p21.23 del brazo corto del cromosoma 6 (fig. 1.1) (6, 7) y engloba una serie de genes que codifican para 3 tipos de moléculas con características estructurales y funcionales diferentes:

- Antígenos HLA de clase I, formados por una cadena pesada de 44kD que se une no covalentemente a una cadena ligera de 12 kD denominada β 2-microglobulina (8), codificada en el cromosoma 15 (9). Existen 3 loci que codifican para los 3 antígenos clásicos HLA-A, -B y -C que presentan un gran polimorfismo alélico y se expresan en todas las células nucleadas del organismo (10). Un número variable de genes codifican para antígenos no clásicos, entre ellos HLA-E, -F y -G, de distribución tisular muy restringida y funcionalidad desconocida, y diversos pseudogenes no funcionales. Esta región comprende unas 1600 kb del extremo telomérico del MHC (11, 12).

- Antígenos HLA de clase II, formados por heterodímeros $\alpha\beta$ con un PM de 25-33 kD y de 24-29 kD respectivamente (13). Existen 3 tipos diferentes denominados HLA-DR, -DP y -DQ codificados por una serie de genes A y B para las cadenas α y β , respectivamente, en subregiones diferentes, incluyendo pseudogenes no funcionales. Presentan un alto nivel de polimorfismo en las cadenas β y mucho mas restringido en las α , expresándose en linfocitos B, linfocitos T activados, macrófagos, células dendríticas, etc (14). Esta región ocupa unas 1000 kb del extremo centromérico del MHC.

- Proteínas no relacionadas estructural ni funcionalmente con los anteriores, pero que, en

general, están relacionadas con el sistema inmune, como las proteínas de choque térmico (HSP70-1, HSP70-2, HSP70-Hom) (15), factor de necrosis tumoral (TNFA y TNFB) (16), proteínas del sistema del complemento (C2, C4A, C4B y Bf) (17), etc. Existe además una serie de genes (BAT2-9) cuyos productos no han sido caracterizados (18).

1.1.2 *Funcionalidad de los antígenos HLA.*

La capacidad de discernir entre lo propio y lo extraño constituye la característica funcional esencial del sistema inmune (19). Los antígenos de histocompatibilidad, como marcadores de la individualidad genética determinada por su extremado polimorfismo, juegan un papel central en el reconocimiento inmunológico. Son reconocidos por los 2 tipos de células efectoras fundamentales del sistema inmune, a través de las moléculas encargadas del reconocimiento específico: inmunoglobulinas en los linfocitos B y el receptor de antígeno en los linfocitos T. Las 2 subclases mayoritarias de linfocitos T reconocen diferencialmente las 2 clases de antígenos HLA: linfocitos CD4⁺ (fenotipo mayoritariamente cooperador) reconocen antígenos de clase II, mientras que linfocitos CD8⁺ (fenotipo mayoritariamente citolítico) reconocen antígenos de clase I (20, 21). Esta especificidad de reconocimiento se produce por interacciones moleculares directas entre las moléculas CD4 y CD8 de la superficie de las células T, con los antígenos de clase II y clase I, respectivamente, de la superficie de las células diana (22-24), lo que aumenta la avidéz del reconocimiento por el TCR (25).

1.1.2.1 Reconocimiento alogénico.

Aloinjertos de individuos histoincompatibles generan una respuesta de linfocitos B con producción de anticuerpos específicos de los antígenos HLA extraños, y de células T cooperadoras y efectoras capaces de reconocer y lisar específicamente las células alogénicas (26). Este reconocimiento alogénico es reproducible "in vitro" obteniéndose tanto linfocitos T cooperadores como linfocitos T citolíticos específicos de los antígenos HLA alogénicos (27).

Si bien el rechazo de injertos no constituye una función biológica que ocurra de modo natural en humanos, sí tiene lugar en especies inferiores del tipo de los protocordados, como los tunicados, donde se produce contacto entre individuos diferentes, llegando eventualmente a la fusión de individuos y su inclusión en colonias. La presencia de marcadores de la individualidad semejantes a los HLA que permiten desarrollar una respuesta frente a individuos extraños, permite la supervivencia del individuo o la colonia frente a invasiones de colonias diferentes. Así

pues, aun cuando el reconocimiento alogénico no constituya la función primordial de los antígenos HLA, si parece ser un reflejo de la función primigenia de estas moléculas (28).

1.1.2.2 Reconocimiento restringido.

La función fisiológica fundamental de las moléculas del MHC consiste en la presentación de antígenos extraños a las células T, que reconocen específicamente el complejo antígeno-HLA propio, en un fenómeno conocido como restricción (29). La caracterización del receptor de la célula T como una entidad molecular única confirmó el reconocimiento conjunto del antígeno extraño y la molécula HLA, frente a especulaciones sobre la naturaleza dual del receptor (30).

La base bioquímica de este reconocimiento asociativo se deriva del procesamiento al que se ven sometidos los antígenos extraños en el interior celular, existiendo 2 vías diferentes, según sean presentados por moléculas de clase II o de clase I. Los antígenos presentados por proteínas de clase II son captados en la superficie celular y, por medio de vesículas endocíticas, internalizados a compartimentos ácidos donde son procesados (31). A estos compartimentos llegan las moléculas de clase II, guiadas, presumiblemente, por la cadena invariante (Ii) a la que están asociadas y que impide la unión de péptidos durante el transporte (32-34). Aquí se disocian de ésta y captan los péptidos producto del procesamiento. Su posterior expresión en la superficie celular permite el reconocimiento por los linfocitos específicos CD4⁺.

Los antígenos de clase I presentan antígenos procedentes de proteínas sintetizadas en el interior celular (35). Así, las proteínas extrañas procedentes de infecciones virales, neoantígenos tumorales o antígenos menores, son sintetizadas y parte de ellas degradadas en el retículo endoplásmico o en el interior citoplásmico, siendo posteriormente transportados los péptidos procesados al RE (36-38). En este momento se produce la asociación de los péptidos generados con las moléculas de clase I que son exportadas a la superficie celular, donde son reconocidas por los linfocitos CD8⁺ (39-41). Las moléculas de clase I son incapaces de presentar proteínas antigénicas intactas presentes en el exterior celular. Sin embargo, la necesidad de procesamiento puede ser obviada por la adición de fragmentos de las proteínas antigénicas, asociándose los péptidos añadidos exógenamente a las moléculas HLA de clase I (42). Análogamente, los complejos péptido-molécula de clase II, pueden formarse de esta manera sin necesidad de procesamiento interno (43). Además, pueden compartir, en algunos casos, la vía de procesamiento de proteínas endógenas de los antígenos de clase I (44).

La especificidad de restricción de los antígenos HLA se debe a la variabilidad de su

estructura primaria que determina el péptido antigénico que es capaz de presentar (45).

1.1.2.3 Selección tímica.

Previo al proceso de dirección de la respuesta de linfocitos T frente a antígenos extraños, los antígenos HLA juegan un papel esencial en la selección del repertorio de células T de las que dispondrá el individuo para generar una respuesta inmune (46). Esta selección se realiza en los primeros estadios de la ontogenia, fundamentalmente en el timo (47). Las células que expresan receptores de alta afinidad por los antígenos HLA propio sufren una selección negativa que permite asegurar la tolerancia del sistema inmune hacia lo propio. Análogamente, receptores con baja afinidad son eliminados por su incapacidad de responder a los estímulos necesarios. Las células que presentan una afinidad intermedia por los antígenos HLA del timo, susceptibles de aumentar en combinaciones particulares de antígeno-HLA, proliferan y pasan a periferia proveyendo al individuo con el repertorio del que dispondrá para la respuesta inmune (48).

1.1.2.4 Otras funciones.

Funciones de muy diversa índole, tanto inmunológicas como no, han sido descritas para los antígenos HLA de clase I. En general se han descrito funciones como transductores de señales de activación positivas en células T activadas vía CD2 (49), o de señales negativas en activaciones vía CD3, con PHA o ionóforos (50). También se ha descrito la asociación y regulación de funciones de receptores del sistema inmune, como el de la interleukina 2 (51), o ajenos al sistema, como el del factor de crecimiento epidérmico (EPGF) (52) o el de la insulina (53), así como la interacción con la penicilina (54) o neuropéptidos (55). Por ello, se ha sugerido la implicación de los antígenos HLA en interacciones celulares generales, de forma que el reconocimiento específico por parte del sistema inmune sería una especialización dentro de su funcionalidad genérica (56).

1.1.3 Polimorfismo de los antígenos HLA de clase I.

La base molecular de la funcionalidad de los antígenos HLA de clase I radica en su elevado polimorfismo, determinado por la existencia de 3 loci distintos con multitud de alelos definidos serológica, celular o bioquímicamente en cada uno (57).

El análisis de la variabilidad de 40 alelos de los 3 loci, muestra la existencia de 20 posiciones de alta variabilidad, situadas todas ellas en el sitio de unión de péptido (58). Este es una cavidad formada por los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$, delimitada en el fondo por una lámina β y en las paredes

laterales por dos hélices α (ver apartados 1.2.1 y 1.2.3) (59). El dominio α_3 , por su parte, está muy conservado. La distribución de estas posiciones en los 3 loci es similar en el dominio α_2 , pero difiere sustancialmente en α_1 , donde los antígenos del locus A sólo tienen 3 posiciones variables, los del locus B 11, de las cuales 4 son constantes en el locus A y 8 lo son en el C, y los del C una única posición de alta variabilidad (tabla I).

Todas las posiciones de alta variabilidad, excepto la 71 (que es constante en el locus A), son residuos que pueden interactuar con el péptido (17 residuos) o con el receptor de la célula T (3) (ver apartado 1.2.3). Por tanto, el polimorfismo en estas moléculas tiene una evidente implicación funcional sugiriendo la existencia de una presión selectiva hacia la variabilidad en los dominios α_1 y α_2 (60). Esto lo apoya también la marcada acumulación de mutaciones en las bases 1 y 2 (70% de los cambios, que se traduce en una relación cambio/silenciosa de 3.4) de los codones codificantes de estos dominios, frente a la acumulación de mutaciones silenciosas en la 3ª base del codón en el dominio α_3 (el 75% de los cambios de base, con una relación cambio/silenciosa de 0.33) (61).

La distribución de las posiciones polimórficas en el sitio de unión de péptido tampoco es al azar, aunque casi todos los residuos de esta región presentan alguna variabilidad. Así, la hélice α de α_1 presenta 11 posiciones de alta variabilidad, frente a 2 en la del dominio α_2 . Por su parte, la lámina B de α_2 es muy variable, mientras que la de α_1 apenas tiene residuos variables, siendo las posiciones M5, Y7, F22 y G62 de contacto directo con el péptido, invariantes, y A24 y M45, constantes en el locus A. Esto se ha relacionado con posibles características estructurales conservadas en los péptidos presentados. Se ha resaltado la conservación de 5 Tyr en posiciones de contacto directo con el péptido en todos los antígenos HLA secuenciados, como característica estructural que definiría motivos estructurales comunes a todos los péptidos presentados.

La comparación entre las secuencias proteicas de los distintos antígenos de clase I muestra una mayor similitud entre los antígenos de los loci B y C (25-40 aminoácidos de diferencia), siendo los de los loci A y C los más diferentes (35-50 aminoácidos). Esto, unido a la presencia de posiciones específicas de locus compartidas entre B y C en mucho mayor número (el 43% a nivel génico) que entre A y B (el 29%) o entre A y C (sólo el 4%), sugiere la generación del locus C a partir de una duplicación del locus B (62) (fig. 1.2.A).

La comparación entre las secuencias génicas muestra una distribución trimodal del número de diferencias, en función de las moléculas comparadas: alelos del mismo locus muestran entre 1 y 50 bases de diferencia, alelos de loci diferentes entre 50 y 100 y alelos de distintas especies

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

Posición	Variabilidad			Contacto potencial ^b
	HLA-A	HLA-B	HLA-C	
<u>$\alpha 1$</u>				
9	9.1	4.8	10.0	Péptido
24		7.0		Péptido
45		10.0		Péptido
62	13.9			TCR + Péptido
63	4.2			Péptido
67		13.5		Péptido
69		4.8		TCR
70		6.4		Péptido
77		6.2		Péptido
80		7.0		Péptido
81		5.0		Péptido
82		5.5		TCR
<u>$\alpha 2$</u>				
95	5.4	5.0		Péptido
97	5.8	5.0		Péptido
99			5.2	Péptido
114	8.3	6.2		Péptido
116	6.3	15.9	10.2	Péptido
152	5.9		5.5	Péptido
156	8.3	5.6	10.3	Péptido
163		8.1		TCR + Péptido

a) Variabilidad determinada por Bjorkman y Parham mediante el método de Wu y Kabat. Se consideran posiciones de alta variabilidad aquellas que tienen un índice mayor de 4.0 (58).

b) Contacto potencial de acuerdo con su localización en la estructura tridimensional (59).

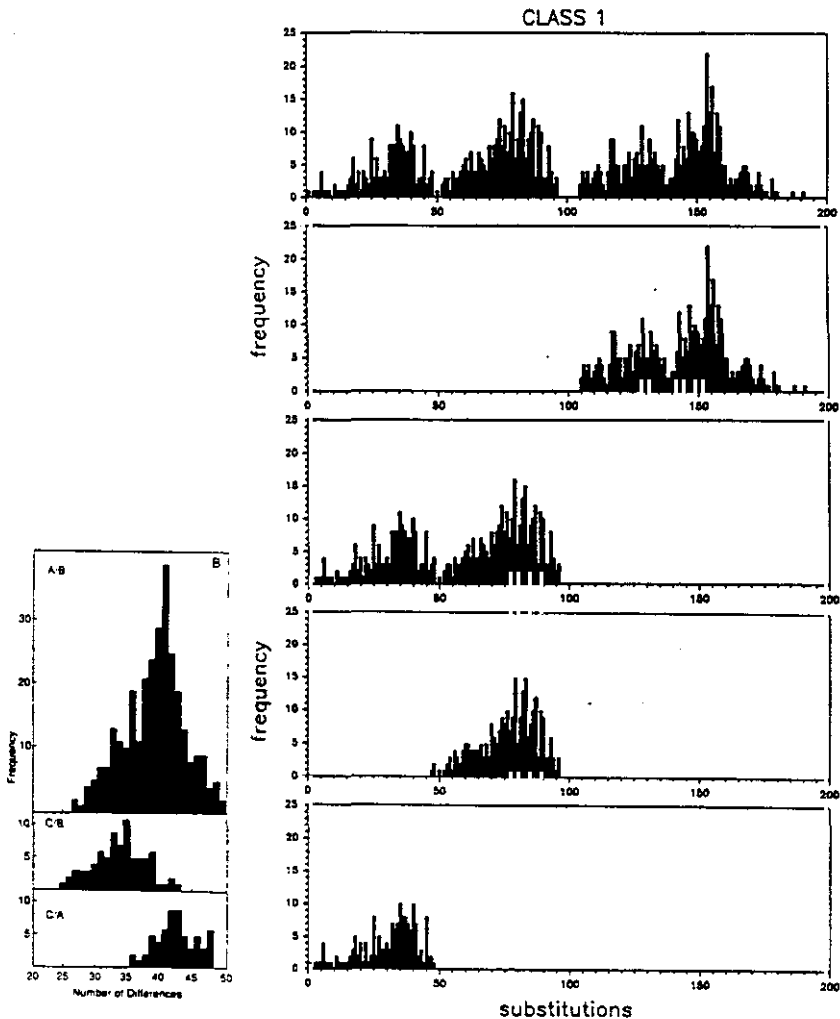


Figura 1.2- A) Distribución del número de diferencias en comparaciones entre parejas de antígenos HLA de distintos loci: A/B compara antígenos HLA-A con B, C/B antígenos HLA-C con B y C/A antígenos HLA-C con A. B) Distribución del número de diferencias en las comparaciones de secuencias de nucleótidos entre parejas de alelos de clase I: resultado de todas las comparaciones 1), comparaciones entre pares de genes de distintas especies (humanos, murinos, vaca, conejo y cerdo) 2), comparaciones entre genes de la misma especie 3), comparaciones entre genes humanos de distintos loci 4) y comparaciones entre alelos humanos del mismo locus 5).

entre 100 y 150 (fig. 1.2.B). Sin embargo, cuando se comparan especies muy relacionadas como el hombre y el chimpancé, o ratón y rata, los antígenos de las distintas especies no son identificables por su número de diferencias, siendo adscribibles a los distintos loci de una especie (63). Así, 5 de las secuencias conocidas de chimpancé se han asignado al locus B (ChLA-B), 3 al locus A (ChLA-A), 1 al C (ChLA-C) y 1 al F (ChLA-F). Por tanto, se ha sugerido un modelo de evolución transespecies, en el cual, un significativo número de polimorfismos son heredadas de antecesores anteriores a la especiación (que en el caso de humanos y chimpancé sería posterior a la duplicación del locus B), de forma que las especies relacionadas compartirían numerosos elementos de variabilidad (64-66). Posteriormente, los mecanismos generadores de polimorfismo seguirían operando proveyendo de nuevos alelos a las diferentes especies.

Tres son los mecanismos generadores de polimorfismo en estas moléculas (61):

- Mutación puntual, que sería la fuente de generación de nuevo polimorfismo, como se ha sugerido al analizar los subtipos de HLA-A2 (posición 43 de HLA-A*0202) o de HLA-B27 (posición 59 de HLA-B*2703).

- Conversión génica o recombinación no recíproca, que consiste en la transferencia de un fragmento de DNA de un gen a otro (67). Este mecanismo posibilita tanto la generación de polimorfismo en aquellas regiones para las que existe presión selectiva para la diversidad y con un cierto número de alelos diferentes, como el mantenimiento de la homogeneidad en regiones mas conservadas. Se ha sugerido su operatividad en la generación de HLA-B13.1 a partir de HLA-B13.2, que se diferencian en 6 nucleótidos en un segmento de 10, pudiendo haber operado como donador el antígeno HLA-B41 (68). Análogamente, HLA-B38 y B39 se diferencian únicamente en 6 aminoácidos en un segmento de 10, presentando cada uno de ellos en este segmento una secuencia compartida por otros alelos del locus B (69). Parece que, frente a lo detectado en otras especies (70), la conversión génica funciona fundamentalmente entre alelos del mismo locus.

- Recombinación recíproca, en la que exones de diferentes alelos se combinan para dar uno nuevo. Así, HLA-Bw42 comparte los exones 1 y 2 de HLA-B7 y los exones 3-8 de HLA-B8 (61). Análogamente, HLA-Aw69 presenta los exones 1 y 2 de HLA-Aw68.1 y los exones 3-8 de HLA-A2.1 (71).

La combinación de estos mecanismos conlleva la continua generación de nuevos alelos en los que la ventaja evolutiva presentada por aquellos que son capaces de mejorar la respuesta inmune frente a patógenos operantes en la población, la presión selectiva hacia la heterozigosis y quizá otros procesos, guían el proceso evolutivo hacia la fijación de nuevas especificidades (63).

1.2 ANTIGENO HLA-A2.

El antígeno HLA-A2 fue la primera especificidad serológica descrita en humanos, denominada inicialmente Mac (73). Es uno de los antígenos más frecuentes en la población y ha sido exhaustivamente analizado, por lo que nos centraremos en la descripción de sus características como ejemplo representativo de antígeno HLA de clase I.

1.2.1 Características moleculares.

Se distinguen 3 regiones estructural y funcionalmente diferenciables: extracelular, transmembranal e intracitoplásmica (74).

- Región extracelular.

Está formada por los 280 aminoácidos N-terminales de la cadena pesada y la $\beta 2m$. Puede ser liberada mediante ruptura proteolítica con papaína en la posición 271 (75). Se definen 3 dominios de unos 90 aminoácidos en esta porción de la cadena pesada, denominados $\alpha 1$ (1-90), $\alpha 2$ (91-182) y $\alpha 3$ (183-274). Los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ son homólogos entre sí, mientras que el dominio $\alpha 3$, muy conservado, presenta gran homología con los dominios constantes de las inmunoglobulinas (76).

En la Asn₁₀₀ del dominio $\alpha 1$ existe un enlace N-glicosídico con el carbohidrato de la molécula. Presenta un peso molecular de 3,3 kD, compuesto por 13-16 residuos de galactosa, manosa, N-acetilglutamina y ácido siálico (N-acetilneuramínico) en número variable (entre 0 y 3 residuos) dando lugar a una heterogeneidad molecular detectable por IEF (77).

Los dominios $\alpha 2$ y $\alpha 3$ contienen un puente disulfuro intracatenario entre las Cys 101-164 y 203-259, respectivamente, que engloban 60 aminoácidos, de forma semejante a los presentes en las inmunoglobulinas (78).

Asociada a la región extracelular se encuentra la $\beta 2$ -microglobulina, proteína invariante de 98 aminoácidos, homóloga a los dominios constantes de las inmunoglobulinas, con un puente disulfuro entre las Cys 25 y Cys 81 (79). Interacciona con los tres dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ (80). Su asociación con la cadena pesada del antígeno es reversible, dando lugar al intercambio con $\beta 2$ -microglobulina exógena presente en el medio de cultivo, produciendo cambios conformacionales que alteran determinantes serológicos en ambas cadenas (81).

- Región de transmembrana.

Comprende los residuos 281-307 de la cadena pesada, de naturaleza mayoritariamente hidrofóbica, lo que permite la interacción con la bicapa lipídica.

- Región intracitoplásmica.

Comprende los residuos C terminales de la molécula, comenzando con un agrupamiento de residuos básicos que permite el anclaje a la membrana citoplásmica mediante su interacción con los grupos fosfatos de los fosfolípidos. Contiene algunos residuos susceptibles de ser fosforilados, como la Ser 335, que se encuentra fosforilada "in vivo" (82). La conservación de la secuencia del sitio de fosforilación, tanto en humanos como en ratón, ha sugerido su papel como transductor de señales al interior celular, en la interacción con proteínas del citoesqueleto y en la internalización de la molécula. De hecho, la eliminación de los aminoácidos 325-340 de HLA-A2 bloquea su internalización, mientras que otras zonas de la región citoplásmica no influyen en este proceso. La Ser 335 está comprendida en el segmento ³³¹GSDSVS³³⁵ que ha sido descrito como el elemento estructural común a diversas proteínas que sufren procesos de internalización (83).

1.2.2 Estructura génica

La estructura del gen codificante de HLA-A2 refleja la organización segmental de la molécula en los dominios estructurales anteriormente descritos (84, 85) (fig. 1.3). Así, existen 8 exones que cubren un segmento de unas 3.5 kb, separadas por 7 intrones de longitud variable. El exón 1, de 73 nucleótidos, codifica para un péptido señal de 24 aminoácidos de naturaleza hidrofóbica, que interviene en el transporte de la molécula a través del retículo endoplásmico y que es liberado por enzimas proteolíticas durante el proceso de maduración. Los exones 2 (270 nucleótidos), 3 y 4 (276 nucleótidos cada uno) codifican cada uno de los dominios extracitoplásmicos $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$. El exón 5, de 117 nucleótidos, codifica la región transmembranal y las regiones flanqueantes, incluyendo el grupo de residuos básicos que interaccionan con los grupos fosfato de la bicapa lipídica. Los exones 6 (33 nucleótidos) y 7 (48 bases), codifican la porción intracelular. El exón 8, de unos 400 nucleótidos, codifica el aminoácido C-terminal y el codón de terminación, y contiene la región 3' no traducida que incluye la señal canónica de poliadenilación AATAAA (86).

En la región 5' se encuentran las regiones que regulan la transcripción y expresión del gen. Las secuencias promotoras que dirigen la interacción de la RNA polimerasa, "CAT box" y "TATA box", formadas por la secuencia clásica GCCAAT y la variante TCTAAA respectivamente, se sitúan a -72 y -45 nucleótidos, respectivamente, del codón de iniciación. Las regiones reguladoras de la frecuencia de transcripción se sitúan en una región comprendida entre las bases -180 y -60, e incluyen el "enhancer B" (que comprende la "CAT box"), la secuencia consenso de respuesta

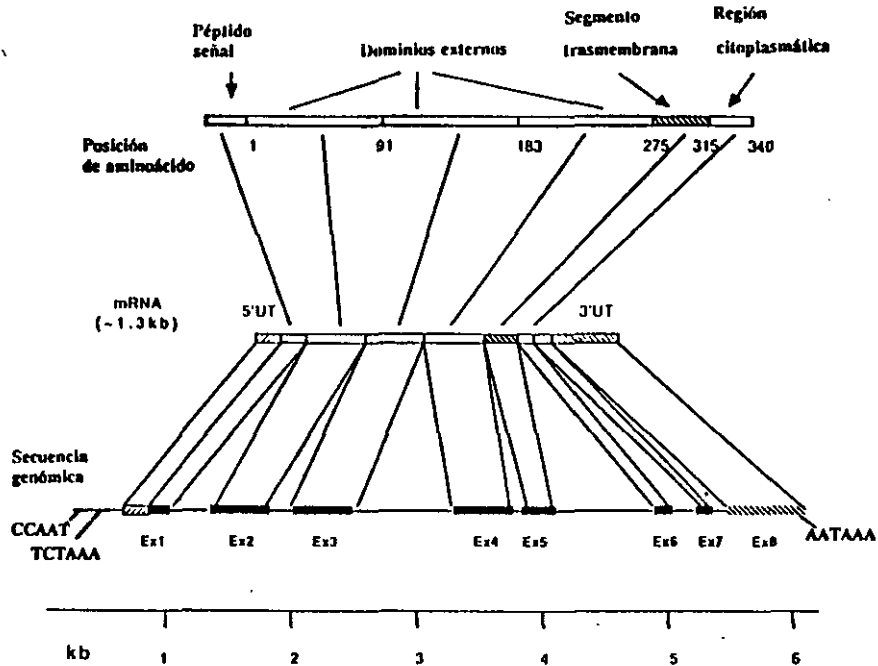


Figura 1.3.- Organización del gen codificante de HLA-A2, el mRNA correspondiente y la proteína, incluyendo el péptido señal que es liberado antes de la expresión en la superficie celular. La secuencia genómica se representa a escala (84).

al interferón (ICS) y el "enhancer A" (10). Estas regiones se encuentran muy conservadas en los productos de cada locus, existiendo mayor divergencia entre los distintos loci, especialmente en la ICS, lo que justifica la diferente regulación de la expresión de los distintos antígenos de cada locus en respuesta al IFN en distintos tipos celulares (87).

1.2.3. *Biosíntesis y maduración*

El proceso de biosíntesis, maduración y transporte a la superficie celular está regulado por una serie de interacciones moleculares. En el interior citoplásmico se detectan 2 especies moleculares identificables por su diferente reactividad frente a anticuerpos (88). La primera en aparecer, presenta un grupo glicídico con alto contenido en manosa, eliminable por la endoglicosidasa H, y que es reconocida por anticuerpos dirigidos frente a la cadena pesada desnaturalizada de HLA (anti-H).

A los 10-15 min de la biosíntesis, esta especie molecular se asocia con la $\beta 2$ -microglobulina, produciéndose un cambio conformacional en el cual el heterodímero es reconocido por anticuerpos específicos de HLA-A2 pero no por anti-H. Este complejo madura en el Golgi por transformación del oligosacárido de alto contenido en manosa a uno complejo con ácido siálico, susceptible a la acción de neuraminidasa, pero resistente a Endo H. Esta especie molecular madura aparece a los 20-30 min y se expresa en la superficie a los 60-80 min. La interacción con la $\beta 2$ -microglobulina es esencial para la maduración y transporte a la membrana; como lo indica la paralización en la forma de alto contenido en manosa del proceso de biosíntesis en mutantes incapaces de interactuar con dicha proteína o en células que no la expresan (89, 90).

La presencia de cadenas correctas de $\beta 2$ -m y cadena pesada de HLA-A2, no es condición suficiente para la normal expresión del antígeno. Existen mutantes inducidos (LBL 721.174) que sintetizan normalmente ambas moléculas, localizándose en el citoplasma la forma glicosilada de la cadena pesada. Sin embargo, no se produce el procesamiento a la forma compleja del carbohidrato, la asociación con la $\beta 2$ -m, ni la fosforilación de la cadena pesada (91). La anomalía de estos mutantes se localiza en una gran delección en la región de clase II (92). Análogamente, se ha detectado una línea tumoral de ratón (RMA-S) que presenta un defecto similar en la asociación de las cadenas pesadas de clase I y $\beta 2$ -microglobulina (93). La adición del péptido M58-68 de la proteína de la matriz del virus de la gripe, que es presentado por HLA-A2 a CTLs específicos, promueve la asociación con la $\beta 2$ -microglobulina (94). Ello induce un cambio conformacional detectable con el AcMo específico MA2.1. el procesamiento a la forma glicosilada

compleja y la expresión en la superficie celular. La adición de péptidos que no son presentados por HLA-A2, no tiene ningún efecto sobre el procesamiento de la molécula. Este proceso puede ser bloqueado por adición de brefeldina, que impide la salida de proteínas del retículo endoplásmico al aparato de Golgi (41). Por tanto, la asociación trimolecular entre la cadena pesada, la β 2-m y el péptido endógeno capaz de interactuar específicamente con la molécula de clase I, es un requerimiento previo para el correcto plegamiento y posterior maduración y expresión de la molécula.

Por tanto, esta línea celular es incapaz de proveer al antígeno HLA-A2 con péptidos procedentes del procesamiento de proteínas endógenas, necesarios para la estabilización de la interacción con la β 2-m (95). Recientemente se ha demostrado que la anomalía genética se debe a la delección de un gen que mapea en la región de clase II del MHC, entre los genes DN y DO (96). Este gen codifica para una proteína relacionada con la familia de proteínas transportadoras dependientes de ATP, que incluyen proteínas de multiresistencia a drogas y una serie de proteínas transportadoras de péptidos y proteínas a través de membrana (96-99). Esta proteína, denominada factor proveedor de péptidos, PSF, podría funcionar como bomba de péptidos endógenos del citosol al interior del retículo endoplásmico, donde participarían en el plegamiento del antígeno de clase I. De hecho, la transfección del gen codificante, restablece la expresión de HLA-A2 en la citada línea celular (100).

1.3 ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE HLA-A2.

La determinación en 1987 por Bjorkman et al. (80) de la estructura cristalográfica de HLA-A2 mediante difracción de rayos X, supuso un paso esencial en la comprensión de las características estructurales y funcionales de este antígeno.

Su porción extracelular consiste en 2 pares de dominios estructuralmente similares, α 1- α 2 y α 3- β 2-m, que forman una estructura proteica de 70 Å de altura y 50x40 Å de sección transversal. Los dominios α 1 y α 2, situados en el extremo distal a la superficie celular, presentan el mismo plegamiento terciario, mientras que el plegamiento del dominio α 3 es análogo al de la β 2-m y al de los dominios constantes de las Ig, situándose cerca de la membrana celular (fig. 1.4.A).

Los dominios α 1 y α 2 consisten cada uno en una lámina β con 4 cadenas β antiparalelas N-terminales, seguida de una larga región helicoidal (fig. 1.4.B). Esta consiste, en α 1, en 2 hélices α (aminoácidos 50-55 y 58-84) que forman un ángulo de 110°, la mayor de las cuales está curvada. El dominio α 2 presenta 3 hélices α (aminoácidos 138-148, 151-173 y 177-181), la última de las

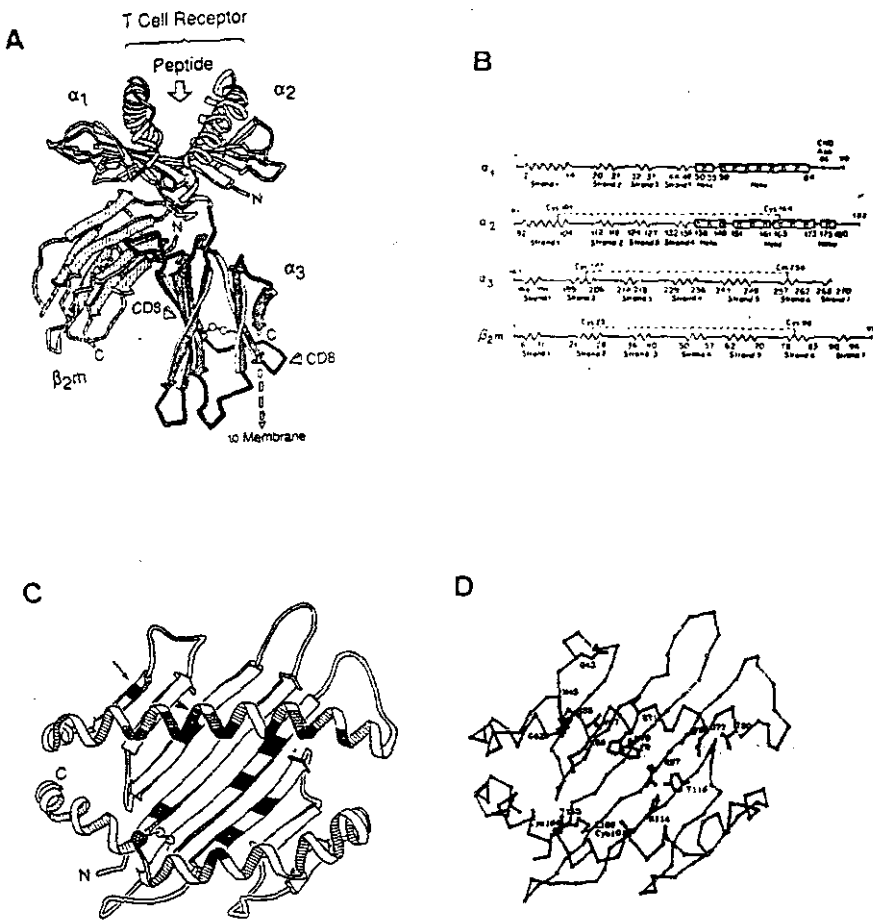


Figura 1.4)- A) Representación esquemática de la estructura tridimensional de la porción extracitoplásmica de HLA-A2. B) Esquema de la estructura secundaria de la molécula. C) Representación del sitio de unión del antígeno formado por los dominios α_1 y α_2 . D) Esqueleto de carbonos α del sitio de unión del antígeno, con las cadenas laterales de los residuos de alta variabilidad (59.80).

cuales conecta los dominios $\alpha 2$ y $\alpha 3$, y las otras dos forman un ángulo de 130° . La hélice α larga de este dominio está unida mediante un puente disulfuro con la lámina β (Cys 164-Cys 101) y se encuentra doblada en el residuo 162. Estos 2 dominios se agrupan mediante un eje de simetría binario, de forma que las 4 cadenas β de cada dominio forman una única lámina β de 8 cadenas antiparalelas, coronada por las hélices α de cada dominio, separadas entre sí unos 18 \AA en la zona central, formando una especie de tenaza (fig. 1.4.C).

El dominio $\alpha 3$ y la $\beta 2$ -m presentan la estructura de sandwich β compuesto por 2 láminas de 4 y 3 cadenas β antiparalelas, típica de los dominios constantes de las inmunoglobulinas (79). Sin embargo, al contrario que éstos, que se relacionan entre sí mediante un eje de simetría binario interaccionando las 2 láminas de 4 cadenas β , la $\beta 2$ -m y el dominio $\alpha 3$ se relacionan mediante un eje de rotación de 146° y un desplazamiento de la $\beta 2$ -m hacia arriba sobre el eje de rotación, de 13 \AA . De esta manera, la $\beta 2$ -m interacciona también con la lámina β de los dominios $\alpha 1$ - $\alpha 2$, de forma mas intensa incluso que con $\alpha 3$, lo que explica su papel central en la estabilización del plegamiento de los antígenos de clase I.

La peculiar estructura de los dominios $\alpha 1$ - $\alpha 2$ conforma una oquedad en la parte mas alejada de la membrana celular, de 25 \AA de longitud, 10 \AA de anchura y 11 \AA de profundidad, delimitada en su base por la lámina β y en los laterales por las hélices α de cada dominio y que constituye el sitio de unión de péptidos (59). En el análisis cristalográfico se determinó la existencia de una nube de densidad electrónica que no forma parte de la cadena peptídica de A2 y que no pudo ser resuelta, lo que sugería la existencia de una mezcla de péptidos que son purificados y co-cristalizados con la molécula de clase I. La estructura primaria del antígeno de clase I en el sitio de unión de péptidos, determinaría tanto la conformación como la naturaleza del conjunto de péptidos que pueden ser presentados, lo que proporciona la base física del fenómeno de restricción antigénica. Las cadenas laterales de los residuos de las hélices α que apuntan hacia arriba, interaccionarían directamente con el TCR, participando en el reconocimiento de los antígenos de clase I por las células T.

El sitio de unión del antígeno muestra la existencia de una serie de cavidades donde pueden alojarse las cadenas laterales de los péptidos antigénicos presentados (101). Estas determinan, tanto por su forma, como por su distribución de cargas, la especificidad de dichos péptidos. Se observan 3 cavidades principales, en torno a las posiciones Met45 (delimitada por los residuos Val 67, Val 34, Gly 26, Ala 24), Met 5 y Leu 156, así como la existencia de un estrechamiento en la hendidura motivado por la His 70 y Tyr 9 y un surco prominente en la lámina β formado por la

Arg 97 e His 114. Las cavidades de las posiciones 5 y 45 deben ser comunes, salvo pequeñas variaciones, a todos los antígenos HLA de clase I y a los del locus A, respectivamente, pues están delimitadas por residuos constantes o muy poco variables. La comparación de la estructura tridimensional con la de Aw68.1, que difiere en 10 residuos del sitio de unión del antígeno, muestra una total conservación de la conformación general, limitándose las desviaciones en las cadenas laterales vecinas a los residuos de diferencia a $1/10 \text{ \AA}$ (102). Sin embargo, existe una total alteración en la forma y distribución de cargas en las cavidades del sitio. Así, aunque en Aw68.1 se conserva la cavidad de la posición 45, la boca de la cavidad está alterada y se ha generado una cavidad cercana en la Asn 63, ausente en HLA-A2. Así mismo desaparece la cavidad Leu 156 por impedimentos estéricos del Trp 156. Existen 2 cavidades en torno al Asp 74 y la Tyr 118, que en HLA-A2 no están accesibles debido a la presencia de Arg 97 e His 74 en la primera, y la Tyr 116 en la segunda. Es de resaltar que tanto la His 74 como la combinación His 114-Tyr 116 son únicas de HLA-A2, estando ausentes en los demás antígenos de clase I, por lo que, probablemente, participarán de forma esencial en la selección del repertorio de péptidos que pueden ser presentados.

1.4 DIVERSIDAD Y FUNCION DEL ANTIGENO HLA-A2

1.4.1 *Polimorfismo natural.*

La especificidad serológica HLA-A2 engloba un conjunto de antígenos estrechamente relacionados, denominados subtipos o variantes, que se diferencian en un número limitado (1 a 6) de residuos (103). El análisis estructural, funcional y de distribución en poblaciones de estos subtipos, ha permitido profundizar en el conocimiento de los mecanismos operantes en la generación del polimorfismo, la importancia diferencial de las distintas zonas del sitio de unión del antígeno en el reconocimiento por el TCR y en la interacción con péptidos antigénicos, la naturaleza de los eptopos serológicos de la molécula y la evolución de HLA-A2.

1.4.1.1 *Definición de subtipos.*

La primera evidencia de la heterogeneidad de HLA-A2 la proporcionó W. E. Biddison analizando la respuesta de CTLs específicos de influenza restringidos por HLA-A2 en diversos individuos (104). Comprobó cómo en un panel de 11 individuos A2⁺, los PBLs del individuo M7 infectados con el virus no eran reconocidos por CTLs específicos (105). Recíprocamente, CTLs antivirales restringidos por el antígeno HLA-A2 de M7 eran incapaces de reconocer los antígenos

virales presentados por las moléculas HLA-A2 de los demás individuos. Generó entonces CTLs alogénicos específicos de HLA-A2 frente a uno de los donantes, comprobando que tenían el mismo patrón: reconocían todos los individuos HLA-A2* excepto M7. A su vez, CTLs generados por estimulación con M7 sólo eran capaces de reconocer PBLs de este individuo. Además, se pudieron generar CTLs específicos de HLA-A2 en respuesta de M7 frente a estimulaciones con otros individuos HLA-A2*. Así pues, M7 presentaba un antígeno HLA-A2 funcionalmente diferente, tanto en reconocimiento alogénico como de restricción. La extensión de este estudio a 27 individuos más, detectó la existencia de otros 3 individuos (entre ellos DK1) que expresaban antígenos HLA-A2 diferenciables funcionalmente tanto de M7 como del antígeno normal (106). Esta heterogeneidad funcional se correlacionó con diferencias bioquímicas en el punto isoeléctrico, siendo el antígeno HLA-A2 de M7 una unidad de carga más básica que el normal y el de DK1 una unidad más ácida.

El estudio sistemático de un panel más amplio confirmó la heterogeneidad detectada. Así, se definieron 3 subtipos, uno mayoritario presente en el 90% de los individuos analizados, denominado A2.a, y otros 2 minoritarios, A2.b y A2.c (107). Los subtipos A2.a y A2.b eran reconocidos específicamente por CTLs alogénicos dirigidos frente a cada uno de ellos, pero A2.c no era reconocido por ninguna de estas líneas, ni era capaz de estimular la generación de CTLs específicos al enfrentarlos con células de los otros subtipos. El análisis por IEF confirmó que los individuos del subtipo A2.b presentaban un antígeno HLA-A2 una unidad de carga más básica que el subtipo mayoritario, mientras que A2.c era heterogéneo, con individuos que expresaban un antígeno HLA-A2 una unidad de carga más ácida e individuos con un antígeno indistinguible del subtipo A2.a (108). Se definieron así 4 subtipos denominados A2.1, A2.2, A2.3 y A2.4, con una frecuencia relativa en la población analizada del 90%, 5%, 2% y 3% respectivamente. Además, en el transcurso de estos análisis se detectó un individuo (OZB) que expresaba un antígeno funcionalmente correspondiente al subtipo A2.1, pero con un pI idéntico a A2.3 (109).

Líneas de CTLs alogénicos específicos del subtipo A2.4 se generaron mediante estimulación con células A2.4* de PBLs de individuos HLA-A2, y que compartían el resto de los antígenos de clase I. La reactividad de estas líneas mostraba la completa heterogeneidad de este subtipo, de tal forma que todos los individuos A2.4* (CLA, KNE, KLO y SCHU) eran diferencialmente reconocidos por el conjunto de las líneas (109).

Mediante el uso de CTLs específicos de influenza restringidos por HLA-A2.2, se comprobó que este subtipo era heterogéneo, existiendo 2 grupos (A2.2Y y A2.2F) representados por los

individuos M7 y WT49 (110).

El uso de anticuerpos monoclonales específicos de HLA-A2 ha permitido también detectar variantes (A2-LEE, A2.3-DW Y A2.3-KC), si bien sólo una de ellas (A2-LEE) fue inequívocamente definida (111).

Finalmente, los 2 últimos subtipos detectados hasta el momento, lo fueron mediante IEF durante el X Workshop de Histocompatibilidad. Uno de ellos, representado por el individuo RML, era una unidad de carga más ácido que A2.1, pero con un pI ligeramente más ácido que A2.3. El otro subtipo, encontrado únicamente en el individuo KIME, presenta un pI 2 unidades de carga más ácido que A2.1 (112).

1.4.1.2 Caracterización de los subtipos.

Desde la primera definición de la heterogeneidad de HLA-A2, diversos laboratorios han trabajado en la caracterización estructural de los subtipos definidos. En la tabla II se resumen los datos obtenidos hasta el presente, salvo los presentados en esta tesis.

TABLA II. Subtipos de HLA-A2

Denominación		Residuos variables ^b										Origen	Ref.
Clásica	Nueva ^a	9	43	66	95	99	107	149	152	156			
A2.1	A*0201	F	Q	K	V	Y	W	A	V	L		JY, LCL721	76, 86, 113
A2.2F	A*0202	-	R	-	L	-	-	-	-	W		M7	114, 115
A2.3	A*0203	-	-	-	-	-	-	T	E	W		DK1	115, 116, 117
A2.2Y	A*0205	Y	R	-	L	-	-	-	-	W		WT49, AM	117
A2.4a	A*0206	Y	-	-	-	-	-	-	-	-		CLA, T7527	118, 119
A2.4b	A*0207	-	-	-	-	C	-	-	-	-		KNE	120
A2.4c	A*0208	Y	R	N	L	-	-	-	-	W		KLO	121
A2-LEE	A*0210	Y	-	-	-	F	G	-	-	-		XLI-ND	122

a) Non-enclatura adoptada en el 10º "Workshop" de Histocompatibilidad (145).

b) Posiciones en las que se han encontrado diferencias entre los distintos subtipos de HLA-A2.

Se observa, como característica fundamental, que todos los subtipos difieren en un reducido número de aminoácidos (1-6), que se sitúan en 3 tipos de localizaciones de los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$:

- residuos en el sitio de unión del antígeno que apuntan hacia el interior del sitio y que, por tanto, podrían interactuar con el péptido: 9, 66, 95, 99, 152, 156.

- residuos en el sitio de unión del antígeno que apuntan hacia arriba de la α hélice y que supuestamente interactuarían principalmente con el TCR: 149.

- residuos fuera del sitio que, presumiblemente, no influyen directamente en el reconocimiento por CTLs y que van acompañados de otros cambios en uno de los sitios anteriores: 43 y 107.

Las implicaciones funcionales y evolutivas de estos datos serán analizadas en la discusión de la presente tesis.

1.4.2 *Epítomos serológicos.*

La caracterización de los determinantes serológicos reconocidos en HLA-A2 ha constituido un continuo objetivo de estudio desde su descubrimiento. Dado que la especificidad serológica viene determinada por una combinación particular de residuos polimórficos, se intentó correlacionar la secuencia proteica con los posibles determinantes reconocidos, mediante la comparación de la secuencia de A2 con la de otros antígenos, especialmente con la de aquellos mas relacionados serológicamente, como A28. En estos primeros análisis, la localización de zonas de alta variabilidad en las regiones 60-80 y 105-116 y 177-194, sugirió que estas regiones soportarían los determinantes antigénicos reconocidos serológicamente (76). En cualquier caso, desde estos primeros estudios resultó evidente que la contribución a la aloantigenicidad vendría determinada por diversas regiones de la molécula, si bien alguna de ellas serían de importancia mas primordial. La comparación de un número mucho mayor de secuencias y la aplicación de algoritmos para la localización de determinantes antigénicos basados en la naturaleza, variabilidad y estructura secundaria de las distintas posiciones no han contribuido de manera decisiva a la resolución de este objetivo, debido a la complejidad de los epítomos que configuran una especificidad serológica.

1.4.2.1 *Caracterización de epítomos reconocidos por anticuerpos monoclonales.*

La obtención de AcMo por inmunización de ratones con células que expresan HLA-A2 ha permitido la localización de alguno de sus epítomos serológicos. Especialmente útiles han sido

aquellos AcMo específicos de A2 que reconocen a la vez otro antígeno, puesto que la comparación de la secuencia primaria de ambos alelos con la del resto de antígenos conocidos, permite la localización de residuos específicos que potencialmente pueden formar parte fundamental del epítipo reconocido (62). Así, el determinante A2/Aw69 definido por los AcMo BB7.2, MA2.2 y PA2.1 debe tener como residuo crítico el W_{107} , pues es el único residuo común a ambos antígenos y diferente del resto (123). El determinante A2/Aw68/Aw69, definido por 4BB, A2A28M1 y CR11-351, debe localizarse en la región 142-145, que presenta la secuencia TTKKH, siendo los residuos Thr₁₄₂ y His₁₄₅ exclusivos de estos antígenos (124). El determinante A2/B17 definido por MA2.1 debe situarse en torno a la G_{65} única a estos antígenos (125). Los cuatro residuos señalados se encuentran en posiciones de los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ con las cadenas laterales dirigidas hacia el exterior del sitio de unión del antígeno y, por tanto, accesibles a la interacción con anticuerpos, lo que refuerza la asignación realizada.

El estudio de la interacción de los monoclonales descritos con mutantes de A2 obtenidos mediante mutagénesis dirigida ha confirmado la asignación propuesta. Así, PA2.1, MA2.2 y BB7.2 no reconocen el mutante A2M(107) que presenta Gly en la posición 107, ni con el subtipo A*0210 que presenta esa misma sustitución (126, 111). MA2.1 no reconoce mutantes con cambios en las posiciones 62, 65 ni 66, por lo que esta región de la α hélice de $\alpha 1$ participa en el epítipo reconocido por MA2.1 y compartido por B17. Por su parte, en el análisis de la reactividad del determinante A2/Aw68/Aw69 se comprobó que el subtipo A*0203, con cambios únicamente en las posiciones 149, 152 y 156, no era reconocido por los monoclonales CR11-351 ni A2A28M1 (127). Mediante mutagénesis dirigida se comprobó que únicamente el cambio del residuo 149 alteraba el epítipo, así como cambios no conservativos en la 152 (128). Por tanto, este epítipo se localiza en una región de la α hélice de $\alpha 2$ que incluye los residuos expuestos en el segmento 149-152.

El estudio de estos mutantes, ha permitido localizar las regiones que participan en los epítipos reconocidos por otros AcMo. Así, por ejemplo, los residuos R_{98} y N_{98} son esenciales para el reconocimiento por 1082C5, monoclonal específico del locus A, lo que sugiere que una parte de los determinantes públicos con especificidad de locus, se localizan en la α hélice de $\alpha 1$ (129).

Por último, el análisis de mutantes inducidos seleccionados por su falta de reactividad con PA2.1 y BB7.2, localizó la mutación responsable en el segmento 98-108 en dos de los mutantes (130), y en la posición 161 (131), muy cercana espacialmente a la 107, en el tercero, reforzando la localización ya definida y confirmando que los determinantes antigénicos están formados por

epítos conformacionales, que pueden ser discontinuos en la secuencia lineal.

Por tanto, la mayoría de los determinantes serológicos parecen localizarse en regiones limitadas de la molécula, accesibles al medio externo, en uno de los dominios $\alpha 1$ o $\alpha 2$, si bien alteraciones sustanciales en el otro dominio (exon shuffling) pueden alterar dichos determinantes (132).

1.4.2.2 Mimetismo con péptidos sintéticos.

Otra aproximación experimental al estudio de la antigenicidad de HLA-A2 ha sido la búsqueda de péptidos derivados de su estructura primaria, capaces de generar anticuerpos específicos y que eventualmente reconocieran el antígeno nativo. Aunque la mayoría de los anticuerpos reconocen epítos conformacionales en regiones que pueden ser discontinuas en la secuencia lineal y a pesar de que la conformación del péptido en solución puede ser muy diferente de la presente en la molécula nativa se han logrado obtener antisueros específicos de péptidos derivados de la secuencia de A2. Antisueros generados frente al péptido 56-69, reconocen específicamente los antígenos HLA-A2 y HLA-B17 desnaturalizados, pero no las moléculas nativas (133). Por su parte, el péptido 56-69 es capaz de inhibir la interacción de MA2.1 con HLA-A2. Por tanto, esta aproximación experimental permite confirmar que esta región presenta un epítoto específico de A2/B17 común a ambos antígenos, tanto en su estructura nativa, como desnaturalizada, si bien el epítoto reconocido depende de la conformación que adopte el antígeno.

1.4.3. Reconocimiento por CTLs.

1.4.3.1 Epítotos conformacionales.

Tanto los CTLs alogénicos como los específicos de antígenos restringidos por la molécula de clase I, reconocen en ésta epítotos conformacionales complejos en los que intervienen fundamentalmente los dos dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ que conforman el sitio de unión del antígeno. Un ejemplo claro lo proporciona la reactividad del antígeno HLA-Aw69. Este presenta el dominio $\alpha 1$ de Aw68.1 y los dominios $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de HLA-A2 (71). Por ser una molécula híbrida natural retiene la funcionalidad propia de estos antígenos, sin alteraciones artificiales que puedan modificar la conformación global de la molécula. Así, se ha comprobado cómo tan sólo el 15% de los clones de CTLs generados frente a HLA-A2, Aw68.1 o Aw69 presentan un patrón de reactividad compatible con el reconocimiento de un epítoto en uno sólo de los dominios (la reactividad

cruzada frente a HLA-A2 y Aw69 podría indicar el reconocimiento de $\alpha 2$ y la reactividad frente a HLA-Aw68.1 y Aw69 el de $\alpha 1$, si bien es claro, que la similitud de los antígenos estudiados no excluye la probable participación del otro dominio en la formación de los epítomos reconocidos (134). Especialmente significativa es la presencia de determinantes comunes a las moléculas HLA-A2 y Aw68.1, ausentes en el híbrido Aw69. La misma situación ha sido descrita en respuestas restringidas, al analizar el reconocimiento por CTLs específicos del virus de Epstein-Barr (135).

1.4.3.2 Mapeo de epítomos celulares.

El análisis de la importancia de distintas regiones de la molécula en el reconocimiento por las células T se ha beneficiado del empleo de subtipos caracterizados estructuralmente. Se pueden obtener las siguientes conclusiones generales acerca de la naturaleza de los epítomos reconocidos:

- La integridad estructural de los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ es esencial para el reconocimiento, pues alteraciones en cualquiera de los dos dominios modifican la interacción con el TCR. Por tanto, los determinantes aloantigénicos y de restricción de HLA-A2 están formados por los dos dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ que conforman el sitio de unión del antígeno. Así se ha visto, que la mayoría de los CTLs específicos de A*0201 no reconocen A*0203, con cambios localizados exclusivamente en $\alpha 2$, ni otros antígenos de los subgrupos A2.4 y A2.2 con cambios en $\alpha 1$ (108, 109).

- Los epítomos reconocidos por las células T son sensibles a cambios únicos en la estructura primaria, lo que subraya la alta especificidad de la interacción del TCR con la molécula de clase I. Ello ha quedado demostrado en la falta de reconocimiento de los subtipos A*0206 y A*0207 (posiciones 9 y 99) por CTLs específicos de A*0201 y de A*0205 y A*0208 (posiciones 9 y 66) por CTLs anti-A*0202 (109, 110, 119, 136-138).

- La integridad del segmento 149-156 de HLA-A2 es crucial para su reconocimiento. Así, la mayoría de los clones de CTLs y de las líneas policlonales dirigidos frente a A*0201 no reconocen al subtipo A*0203, con cambios en las posiciones 149, 152 y 156 (108).

- Tanto los CTLs alogénicos como los restringidos son altamente sensibles a cambios en posiciones del sitio de unión del antígeno no accesibles al TCR y que presumiblemente interaccionan con los péptidos alojados en el sitio, alterando su capacidad de presentación, como en los subtipos A*0206 y A*0207 (posiciones 9 y 99) (109, 110, 119, 136-138). Esto sugiere que tanto en el reconocimiento alogénico como en el restringido, es esencial la interacción con los péptidos endógenos presentados por HLA-A2 y por tanto ambas reactividades compartirían similares bases estructurales.

Una mayor precisión en la definición del papel de las distintas posiciones en el reconocimiento por las células T, se ha logrado mediante mutantes que presentan cambios únicos respecto de A*0201, obtenidos por mutagénesis dirigida o mutagénesis de saturación. Como resumen de los datos obtenidos en este tipo de estudios, aplicables tanto al reconocimiento alogénico como al restringido, podemos concluir:

- La posición 152 juega un papel esencial en el reconocimiento, puesto que su alteración provoca la falta de reconocimiento por una gran mayoría de los CTLs analizados (128, 137, 139-141).

- La posición 156 juega un papel importante, pero mucho menor que la 152, estando, en general, asociado su no reconocimiento con el de esta posición (142).

- La posición 149, alterada individualmente, no afecta a ninguno de los clones analizados y sólo juega un cierto papel en la formación o alteración de epítotos en conjunción con cambios en la posición 152.

- Los aminoácidos 62-63 son importantes para una serie de clones estudiados, si bien dada la importante alteración en la naturaleza de los aminoácidos cambiados, Gly₆₂ a Arg₆₂, no es posible adscribir directamente el efecto observado a estas posiciones. La posición 66 también altera el reconocimiento de una fracción importante de CTLs (138, 143).

- Los cambios en las posiciones 43 y 107, situadas fuera del sitio de unión del antígeno, no alteran el reconocimiento de ninguno de los clones específicos de A*0201 (119, 143): Tan sólo la combinación de cambios en la posición 43 con cambios en las posiciones 152 ó 156 puede alterar dicho reconocimiento, lo que sugiere una mínima contribución de la posición 43 a la integridad estructural de algunos epítotos (143).

- Todos los cambios en las posiciones polimórficas del sitio de unión a péptido analizadas, alteran el reconocimiento por alguno de los clones estudiados, lo que demuestra la importancia del polimorfismo de los antígenos de clase I, así como la gran diversidad de la respuesta de CTLs.

1.4.3.3 Participación de péptidos endógenos en el reconocimiento alogénico.

El reconocimiento restringido de antígenos extraños en el contexto de las moléculas de clase I tiene su base en el procesamiento de las proteínas sintetizadas endógenamente y la correspondiente presentación de los péptidos antigénicos derivados de este procesamiento (35). Análogamente, se ha especulado sobre la naturaleza del reconocimiento alogénico y la posibilidad de que participen los péptidos endógenos unidos constitutivamente (144). Distintas líneas de

evidencia sugieren esta posibilidad. Así, hemos visto cómo cambios únicos en localizaciones del sitio de unión al antígeno sólo accesibles a los péptidos presentados, alteran ambos tipos de reconocimiento. Así mismo, la frecuente reacción cruzada que presentan CTLs restringidos específicos de antígenos con antígenos de clase I alogénicos, sugiere la participación de péptidos endógenos en la formación de complejos péptido endógeno-aloantígeno que mimetizan el complejo péptido antigénico-antígeno de clase I propio (145, 146). Evidencias adicionales como la dependencia de la especificidad del reconocimiento aloantigénico de dos genes distintos de HLA (147-149), el correconocimiento de dos antígenos de clase I distintos (150, 151), la dependencia de la especificidad del reconocimiento con el tipo celular (152-154), o la influencia de péptidos endógenos añadidos a las células diana en la aloespecificidad (155-157), sugieren el reconocimiento por parte de los TCR aloespecíficos del complejo antígeno de clase I-péptido endógeno. Así el reconocimiento alogénico sería en realidad un reconocimiento alorrestringido.

Sin embargo, el hecho de que líneas celulares mutantes incapaces de procesar antígenos sintetizados endógenamente sean resistentes a la lisis por CTLs restringidos, pero no por CTLs alogénicos, sugiere la posibilidad del reconocimiento de la molécula de clase I sin la participación de péptidos endógenos por CTLs alogénicos (158).

Los datos sobre el papel de los péptidos endógenos en el reconocimiento aloespecífico de HLA-A2 también son contradictorios. La implicación de péptidos endógenos en el reconocimiento alogénico es sugerida por los modelos de ratones transgénicos con el gen de A*0201, que son capaces de generar CTLs frente a células humanas A*0201 con la misma frecuencia que ratones normales, no respondiendo frente a inmunizaciones con células murinas transfectadas con este gen (159, 160). Además, la estimulación de ratones normales con células de los transgénicos, generan dos poblaciones distintas de CTLs: una que reconoce específicamente el antígeno A*0201 expresado en células murinas y otra que reconoce células tanto humanas como de ratón que expresan dicho antígeno (161). Otra evidencia en este sentido proviene de la inhibición específica del reconocimiento por CTLs específicos de A*0201 por los péptidos 98-113 y 94-112 de su secuencia, sugiriendo que los CTLs analizados reconocen específicamente un fragmento de la molécula de A2, que podría ser presentado por este mismo antígeno (162). El péptido 56-69, por su parte, es capaz de inhibir la lisis de un clon específico de HLA-A2 y B17, que, como hemos visto, comparten un epítipo serológico en esta región. Además, la incubación con este péptido de dianas Aw69⁺, sensibiliza dichas dianas haciéndolas susceptibles a la lisis por dicho clon, lo que sugiere el reconocimiento conjunto del péptido y la molécula de HLA (163). Como evidencia en

contra de la participación de péptidos endógenos en el reconocimiento alogénico, se ha comprobado que CTLs específicos de HLA-A2 reconocen este antígeno reconstituido en ausencia de péptidos a partir de la cadena pesada y la $\beta 2m$, obtenidas por desnaturalización de la molécula nativa y posterior filtración en gel, lo que sugiere el reconocimiento de la molécula HLA-A2 vacía y la no participación de péptidos endógenos unidos en el alorreconocimiento (164).

1.4.3.4 Papel de la interacción CD8- $\alpha 3$.

La molécula de CD8 presente en la superficie de los linfocitos T específicos de antígenos de clase I, interacciona con éstos formando, probablemente, un complejo trimolecular TCR-antígeno de clase-CD8 que aumenta la avidéz de la interacción TCR-antígeno de clase I. Así, clones de CTLs de baja avidéz, requieren la participación de la molécula de CD8 para el reconocimiento, que es inhibido por AcMo específicos de CD8, mientras que CTLs de alta afinidad no requieren la formación del complejo trimolecular y no son inhibidos por dichos AcMo (25).

El sitio de unión de CD8 en los antígenos de clase I se localiza en el dominio $\alpha 3$. Se ha comprobado que cambios en las posiciones 245 (Aw68.1 y Aw68.2) (posición central de la cadena B5 de $\alpha 3$) y en la posición 227 afectan severamente la interacción con CD8 (165). Tres regiones participan, de manera diferente, en esta interacción. El segmento 223-229 que forma un giro entre las cadenas B3 y B4, con un agrupamiento conservado de residuos ácidos, es crítico e interacciona directamente con CD8. Las posiciones 245 y 247 participarían, probablemente, por el efecto indirecto que en la conformación de este giro (posiciones 227 y 228) tienen sustituciones de aminoácido con grandes cadenas laterales. Las posiciones 233-235 parecen contactar directamente con CD8, pero su efecto en la interacción es más limitado.

La interacción entre $\alpha 3$ y CD8 juega un papel esencial en la generación de respuesta de CTLs. Desde los primeros estudios de reconocimiento de células transfectadas, se había sugerido la existencia de barreras entre especies que dificultaban el reconocimiento por CTLs específicos del antígeno transfectado (166). Posteriormente se comprobó cómo la interacción entre CD8 y $\alpha 3$ es necesaria para el reconocimiento de una fracción de CTLs y se sugirió la ausencia de interacción entre el CD8 murino y los dominios $\alpha 3$ humanos (167). Ello explicaría, además, la dificultad de obtención de respuestas xenogénicas (168) o de utilización del antígeno A*0201 como elemento de restricción en ratones transgénicos (161, 169).

Se ha determinado que el intercambio del dominio $\alpha 3$ de A*0201 por el del antígeno murino

K^b , aumenta en 5-10 veces la capacidad de reconocimiento por CTLs aloespecíficos de A*0201 dependientes de CD8 (170, 171). Mas aún, la introducción del dominio $\alpha 3$ murino permite obtener respuestas xenogénicas mediante estimulación *in vitro*, como ocurre con la respuesta alogénica. Por su parte, la introducción del dominio $\alpha 3$ de HLA-A2 en K^b , disminuye en 7-15 veces la respuesta alogénica obtenida *in vivo*, independientemente del repertorio de CTLs del individuo. La interacción CD8- $\alpha 3$ influye esencialmente en la estimulación primaria de la respuesta de CTLs, pero apenas interviene en las reestimulaciones sucesivas, una vez activada la población policlonal de CTLs específicos CD8⁺ dirigidos frente a los determinantes formados por los dominios $\alpha 1$ - $\alpha 2$, si bien, es probable la desaparición de aquellas especificidades de mas baja afinidad, que no pueden ser reestimuladas. Por tanto, el papel crítico de CD8 en la generación de respuestas de CTLs es distinto al de moléculas accesorias que aumentan la avidéz general de la interacción celular, independientemente de la especificidad del reconocimiento (172).

1.4.4. *Interacción HLA-A2-péptidos.*

La capacidad presentadora de péptidos antigénicos de HLA-A2 ha sido analizada desde múltiples perspectivas. Las primeras aproximaciones experimentales, consistentes en la incubación de células dianas A2⁺ con péptidos derivados de la secuencia de proteínas antigénicas reconocidas por CTLs específicos, permitió la definición de una serie de epítotos reconocidos en distintas respuestas antivirales (112, 173, 174)). Ello posibilitó el análisis funcional de las posiciones de HLA-A2 que participan en la interacción, si bien, es difícil distinguir si la influencia ejercida es debido a la incapacidad de presentación del péptido antigénico o a la influencia del cambio en el reconocimiento de dicho péptido por el TCR. Así, el análisis de los cambios detectados en el subtipo A*0203 con clones que reconocen el péptido 55-73 (57-68) de la matriz del virus de la gripe, mediante el uso de mutantes únicos en esas posiciones, determinó que los mutantes con cambios en las posiciones 152 (V-->E o V-->A), 156 y 149-156, no eran reconocidos en presencia del péptido por 24 de los 25 clones, pero si el mutante de la posición 149 (141). El otro clon estudiado reconocía dicho péptido presentado por los mutantes 152 (V-->A) y 156, lo que sugiere que estos cambios y el de la posición 149 no anulan la capacidad de unión del péptido, pero alteran, por tanto, su reconocimiento (posiciones 152 y 156). La cinética de presentación por el mutante 149 era distinta a la de los otros mutantes, por lo que si bien el cambio en esta posición no impide la presentación, si participa, en alguna medida, en la interacción con el péptido.

La interacción entre péptido y HLA-A2 ha sido también analizada mediante el uso de

péptidos análogos al reconocido con cambios en las distintas posiciones, estudiándose su capacidad de reconocimiento por los CTLs específicos y la inhibición de la respuesta frente al epítipo natural. Se determinó que el 55% de las sustituciones en los 8 residuos centrales del péptido 57-68 eliminaban el reconocimiento y que tan sólo el 14% de los cambios no influyen significativamente (175). Cambios en tres de las posiciones centrales, aunque alteraban la capacidad de reconocimiento, no alteraban la capacidad inhibitoria del análogo en ensayos de competición, y por tanto estas tres posiciones interactuarían con el TCR y no con HLA-A2. Otras tres posiciones sí participarían en la interacción con A2, pues su sustitución impedía la inhibición por el análogo. El estudio de la inhibición del reconocimiento por una serie de péptidos no relacionados, mostró que el 25% de ellos podía inhibir el reconocimiento restringido por A*0201 y por tanto, unirse a este antígeno (176). Un estudio similar del reconocimiento del péptido 335-350 de la nucleoproteína del virus de la influenza restringido por HLA-B37 determinó que hasta un 40% de los péptidos podían inhibir dicho reconocimiento y, por tanto, ser presentados por B37 (177). Ninguno de los péptidos inhibía en ambos sistemas, lo que sugería que ambos antígenos presentan conjuntos diferentes de péptidos. Sin embargo, estos datos de capacidad de presentación de tan amplia variedad de péptidos hay que tomarlos con cautela, pues los ensayos de inhibición se realizan a una concentración de péptido competidor hasta 1000 veces superior al péptido sensibilizante (concentraciones 500 μ M). Esta posibilidad de presentación en condiciones no fisiológicas, probablemente no refleje la posibilidad real de presentación de péptidos endógenos, que pueden sensibilizar células diana a concentraciones picomolares-nanomolares (178).

Otra forma de estudio de la interacción ha sido mediante ensayos de unión directa. La incubación de péptidos del virus de la gripe reconocidos por CTLs restringidos por A*0201, con una preparación purificada de este alelo y la posterior cuantificación de los complejos formados mediante filtración en gel, demuestra que menos del 0.3% de las moléculas de HLA-A2 pueden unir péptido, mostrando cada péptido cierta especificidad de unión (179).

La última aproximación al estudio de la interacción péptidos endógenos-antígenos de clase I, ha sido el aislamiento de los péptidos unidos a las moléculas de clase I expresadas en la superficie celular. El conjunto de péptidos eluidos es distinto en cada antígeno, siendo limitado el número de péptidos mayoritarios (180). La secuenciación del material peptídico eluido de HLA-A2 demuestra que este antígeno presenta nonapéptidos con motivos estructurales específicos (181). Así, en el extremo C-terminal existe Val como aminoácido dominante aunque se detecta

también Leu en mucha menor proporción. En el segundo residuo se detecta únicamente la presencia de Leu como aminoácido dominante y Met. En los residuos 6 y 8 el conjunto de péptidos presentan mayoritariamente Val y Lys respectivamente, con menores proporciones de otros aminoácidos. En cambio, las posiciones 1, 3 y 5 no reflejan restricción alguna en los residuos que pueden presentar los péptidos unidos a A*0201. Estas características estructurales de los péptidos presentados son específicas de cada antígeno y se correlacionan con la estructura única del sitio del unión del péptido, de la que es la contrapartida complementaria.

2. OBJETIVOS

2- OBJETIVOS.

Los objetivos generales de la presente tesis han sido el estudio del polimorfismo del antígeno HLA-A2, sus mecanismos de generación, las bases estructurales que determinan su selección y el reconocimiento alogénico por CTLs específicos.

Las aproximaciones experimentales seguidas han sido:

1- Caracterización estructural de subtipos no definidos funcionalmente, lo que permite analizar las características del polimorfismo, sin sesgo debido a un criterio funcional de detección. Se han caracterizado los subtipos A*0204, A*0209 y A*0211, bien mediante mapeo peptídico comparativo con el antígeno A*0201 y posterior secuenciación radioquímica de los péptidos de diferencia, o bien mediante secuenciación del cDNA codificante obtenido mediante amplificación por PCR. Este tipo de análisis permite determinar los mecanismos que operan en la diversificación del antígeno HLA-A2, las bases estructurales que determinan la selección del polimorfismo generado y la influencia de nuevas posiciones polimórficas en la funcionalidad del antígeno.

2- Caracterización de los antígenos HLA-A2 expresados por células diana reconocidas diferencialmente por CTLs alogénicos específicos que presentan reacción cruzada entre los subtipos A*0201, A*0206 y A*0207. El análisis se ha realizado mediante mapeo peptídico comparativo con antígenos HLA-A2 de secuencia conocida y mediante secuenciación del cDNA obtenido por PCR. Se han caracterizado así los antígenos A2.1 expresados por las líneas ARC y ESST y el antígeno A2.4 expresado por la línea SCHU. Este tipo de aproximación permite analizar las bases moleculares del reconocimiento alogénico mediante la comparación de las secuencias de los antígenos diferencialmente reconocidos.

3. MATERIALES Y METODOS

3. MATERIALES Y METODOS.

3.1 CULTIVOS CELULARES.

3.1.1 *Líneas celulares.*

Los estudios desarrollados en la presente tesis han tenido como fuente de material tanto proteico como de cDNA codificante de los antígenos HLA de clase I, líneas linfoblásticas obtenidas por transformación de linfocitos B de sangre periférica con el virus de Epstein-Barr. Estas líneas presentan una densidad de antígeno en la superficie celular 35-50 veces superior a los linfocitos normales, constituyendo el 0.5% del total de las proteínas de membrana (182). Esta característica, junto con su permanente disponibilidad y facilidad de cultivo, las convierten en excelentes fuentes de material.

Las líneas utilizadas han sido las siguientes:

- JY (HLA-A*0201, B7, DR4,W6)
- OZB (HLA-A*0209, 3, B16, 35)
- CLA (HLA-A*0206, 31, B8, 35)
- ESST (HLA-A2.1, B5, Cw2, w4, DR4, 7)
- ARC (HLA-A2.1, 1, B7, 8, Cw6, DR1, 4)
- SCHU (HLA-A2.4, 31, B5, 12, Cw1, w5, DR5, w6)
- RML (HLA-A*0204, B5)
- KIME (HLA-A*0211, 32; Bw32, w61; Cw6)

Estas líneas son cultivadas en medio RPMI 1640 suplementado con un 10% de suero bovino fetal o suero de caballo, 2 mM de L-Glutamina, 50 IU/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomycin (todos los reactivos de Flow Laboratories). Se mantienen a una concentración de 200.000-700.000 células/ml a 37°C en atmósfera al 5% en CO₂.

3.1.2 *Congelación y descongelación de líneas celulares.*

Para su congelación, 1-5 10⁶ células se concentran en 200-500 µl de medio de cultivo. A continuación, se añade gota a gota, con agitación continua, una cantidad igual de medio de congelación mantenido a 4°C, compuesto por:

- 40% RPMI 1640
- 40% Suero ternera fetal
- 20% DMSO
- 25 IU/ml de penicilina

- 25 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomicina

Inmediatamente se introducen a -70°C y se mantienen durante 24 h., al cabo de las cuales se guardan en contenedores de nitrógeno líquido.

Para descongelar estas líneas, se descongela el vial en baño a 37°C y se añade, gota a gota, igual cantidad de medio de cultivo. El contenido del vial se deposita en un tubo que contiene 10 ml de medio de cultivo y se centrifuga 5 min a 400 g. Tras dos lavados sucesivos en las mismas condiciones, las células están listas para su cultivo.

3.2 REACTIVOS PARA INMUNOPRECIPITACION.

El aislamiento y purificación del antígeno HLA-A2 se hizo por inmunoprecipitación, con diversos reactivos:

- Suero normal de conejo (SNC) que permite la inmunoprecipitación de las sustancias que se unen inespecíficamente a los anticuerpos.

- Suspensión de *Staphilococcus Aureus* de la cepa Cowan I (SACL, proteína A) que contiene proteína A expresada en la pared bacteriana y que une específicamente las subclases IgG2a y IgG2b de ratón y todas las Ig de conejo, lo que permite precipitar los anticuerpos usados (183).

- Anticuerpo monoclonal de ratón PA2.1 que reconoce un epítipo común de HLA-A2 y Aw69, lo que permite su aislamiento selectivo. Pertenece a la subclase IgG1, que no se une a la proteína A (184).

- Suero de conejo anti-cadena pesada de HLA desnaturalizada (anti-H) que permite el aislamiento de la cadena pesada de HLA-A2 tras su desnaturalización (88).

3.2.1 *Anticuerpo monoclonal PA2.1*

3.2.1.1 Obtención del AcMo PA2.1

El hibridoma productor del AcMo se cultiva de forma análoga a las líneas linfoblásticas. El anticuerpo se obtiene inyectando intraperitonealmente 2-4 millones de células del hibridoma suspendidas en 0.5 ml de solución de Earle (Flow Laboratories), en ratones Balb/c que han recibido una inyección intraperitoneal de 0.5 ml de pristano una semana antes. El aumento del tamaño del peritoneo indica el desarrollo del tumor y por ello, el momento adecuado para proceder a la extracción de la ascitis que contiene el anticuerpo, típicamente tras 2-3 semanas de incubación. Se centrifuga la ascitis obtenida a 300 g para eliminar células presentes en el líquido y sustancias grasas, guardándose a -80°C para su conservación y posterior utilización.

3.2.1.2 Acoplamiento de PA2.1 a Sepharosa.

El AcMo PA2.1, por ser de la subclase IgG1, no se une a proteína A, por lo cual es necesario acoplarlo a sepharosa para las inmunoprecipitaciones. Para ello se procede a la precipitación del anticuerpo de la ascitis con un volumen igual de sulfato amónico al 33% de saturación, incubando durante 45 min a 37°C y centrifugando durante 20 min a 2500 g. El precipitado, que contiene la fracción de γ -globulinas, se resuspende en sulfato amónico y se vuelve a centrifugar.

Se disuelve el precipitado obtenido en tampón bicarbonato sódico 0.1 M, pH 8, NaCl 0.5 M y se dializa en este tampón durante 18 horas. Se calcula la cantidad de proteína presente midiendo la densidad óptica de la muestra a 280 y 340 nm.

El acoplamiento se realiza a Sepharosa 4B activada con CNBr (Pharmacia). 5 g de Sepharosa se lavan 3 veces con 1 l de HCl 1 mM cada vez. Posteriormente se lava 2 veces con tampón bicarbonato sódico 0.1 M, pH 8 y se resuspende en el mínimo volumen posible de dicho tampón.

A continuación se añade el anticuerpo previamente obtenido, manteniendo una relación de 30 mg de proteína/g de sepharosa. La mezcla se agita durante 18 horas a 4°C o durante 2 h, a temperatura ambiente. Se elimina el exceso de proteína con 2 lavados con el tampón anterior (rendimiento aproximado del 80%). Posteriormente se bloquean los posibles grupos activos libres por agitación en 50 ml de glicina 1 M, pH 8 durante 3 h a temperatura ambiente y se realiza un ciclo de 3 lavados sucesivos con acetato sódico 0.1 M, NaCl 0.5 M, pH 4 y con Tris 0.1 M, NaCl 0.5 M, pH 8. Finalmente se lava con el tampón bicarbonato sódico 0.1 M, pH 8 y se resuspende en este tampón, añadiendo igual volumen de NET (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 5mM, NaN, 0.02%, pH 7.4), 0.5% Nonidet P-40, 1 mgr/ml de ovoalbúmina.

3.2.2 Preparación de proteína A de *Staphilococcus Aureus*

La inmunoprecipitación de los complejos solubles antígeno-anticuerpo se realiza en base a su interacción con suspensiones con proteína A de la cepa Cowan 1 de *Staphilococcus Aureus* (SACI).

Las suspensiones de SACI, preparadas por tratamiento con calor y formaldehído según el método de Kressler (183), se almacenan a -70°C en alícuotas de 1 ml al 10% (v/v en tubo de hematocrito) en PBS-azida al 0.1%.

Para su utilización, la alícuota descongelada se centrifuga durante 15 min a 4°C a 560 g. El sobrenadante se elimina y el precipitado se disuelve en 900 µl de tampón NET, 0.5% NP40, incubándose 15 min a 0-4°C. Se vuelve a centrifugar, suspendiéndose el precipitado en 900 µl de NET, 0.05% NP40. Una última centrifugación permite resuspender el precipitado bacteriano en 900 µl de tampón NET, 0.05% NP40, 1 mg/ml de ovoalbúmina, donde la suspensión es estable a 0-4°C durante, al menos, 48 h.

Posteriormente se puso a punto un protocolo más rápido, en el que las centrifugaciones se realizan en microfuga durante 1.5 min a 11600 g, y se incuba la solución bacteriana durante 15 min a 0-4°C en cada tampón de lavado.

3.3 MAPEO PEPTIDICO COMPARATIVO

El mapeo peptídico comparativo permite el análisis bioquímico de proteínas homólogas que se diferencian en un limitado número de cambios en su secuencia de aminoácidos (114). Consiste en la comparación de la proteína que interesa analizar con una proteína homóloga de secuencia conocida mediante fraccionamiento cromatográfico conjunto de digeridos enzimáticos de ambas proteínas. El marcaje metabólico con aminoácidos radioactivos de ¹⁴C para la proteína patrón y de ³H para la proteína problema, permite la detección de los péptidos de diferencia y su posterior secuenciación radioquímica (185). El marcaje con diversos aminoácidos, en función de la secuencia de dichos péptidos, permite el mapeo de todas las posiciones y la localización y determinación de los cambios entre ambas proteínas.

3.3.1 *Marcaje metabólico.*

Un cultivo de 10⁷ células se centrifuga durante 8 min a 400 g. Las células se resuspenden en 10 ml de solución salina de Earle y nuevamente se centrifugan. A continuación se resuspenden en un medio análogo al de cultivo, pero carente del aminoácido con que se desea marcar (preparado a partir del Select-Amino Kit de Gibco), a una concentración de 10⁶ células/ml.

En el caso de marcaje con alanina se utiliza medio esencial mínimo de Eagle modificado (MEM de Flow Laboratoires) que no contiene glutamina, ni alanina. Para el marcaje con leucina se utiliza este mismo medio, pero carente además de este aminoácido. El marcaje con glutamina se lleva a cabo en ausencia de glutamina y glutámico, con el objeto de propiciar la incorporación simultánea de glutamato mediante la interconversión metabólica de la glutamina. En este caso, las células se incuban durante 1 h a 37°C en el medio de marcaje antes de añadir el aminoácido

radioactivo. Para el marcaje con aspártico, se añade ácido oxoaminoacético a una concentración final de 1 mM (preparado en solución de Earle a pH 7.2), que incrementa la eficacia de incorporación de Asp (en células murinas aumenta 20 veces), debido a la inhibición de transaminasas que utilizan el Asp como sustrato (185).

La línea que expresa el antígeno HLA-A2 de secuencia conocida es marcada con 250 μ Ci del aminoácido correspondiente marcado con 14 C, mientras que la línea con el antígeno HLA-A2 a analizar lo es con 0.5-1 mCi del mismo aminoácido marcado con 3 H. En la tabla 3.1 se muestran los aminoácidos utilizados en el presente trabajo.

Las células son cultivadas con el aminoácido marcado durante 14 h a 37°C, tiempo suficiente para la renovación de todos los antígenos HLA de clase I de la superficie celular. Ocasionalmente se utilizó el sobrenadante del marcaje para volver a marcar un nuevo lote de células.

Tabla III. Aminoácidos radioactivos utilizados.

L-(2,3- 3 H)-Arg	L-(U- 14 C)-Arg
L-(4,5- 3 H)-Lys	L-(U- 14 C)-Lys
L-(2,3- 3 H)-Ala	L-(U- 14 C)-Ala
L-(4,5- 3 H)-Leu	L-(U- 14 C)-Leu
L-(3- 3 H)-Thr	L-(U- 14 C)-Thr
L-(2,3,4,5- 3 H)-Pro	L-(U- 14 C)-Pro
L-(3- 3 H)-Ser	L-(U- 14 C)-Ser
L-(3,4(n)- 3 H)-Val	L-(U- 14 C)-Val
L-(2,5- 3 H)-His	L-(U- 14 C)-His
L-(2,3,5,6- 3 H)-Tyr	L-(U- 14 C)-Tyr
L-(2,3,4,5,6- 3 H)-Phe	L-(U- 14 C)-Phe
L-(G- 3 H)-Gln	L-(G- 14 C)-Gln
L-(2,3- 3 H)-Asp	

3.3.2 Purificación de la cadena pesada de HLA-A2

3.3.2.1 Aislamiento de las proteínas de membrana

El método de aislamiento que se ha seguido consiste en la solubilización de las proteínas de membrana en detergentes no iónicos del tipo éteres de aril polioxiétileno, que preservan la estructura tridimensional de la proteína y, por tanto, los determinantes antigénicos de la molécula nativa (186). Se basa en la capacidad de solubilización del detergente Triton X-114 a bajas temperaturas (0-4°C) en fase acuosa, y la separación de fases que tiene lugar a temperaturas superiores (20°C), de forma que las proteínas anfífilicas permanecen en la fase orgánica. El procedimiento completo del aislamiento de HLA-A2 se resume en la figura 3.1.

Las células marcadas con el aminoácido apropiado son recogidas por centrifugación. Se lavan dos veces con 10 ml de tampón 10 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 7.4 y 0.005% PMSF (fluoruro de p-metilsulfonilo). A continuación se procede a la solubilización de células en 1 ml del tampón anterior, con un 1% de Triton X-114, produciéndose la lisis celular durante 1 h a 0-4°C. Se eliminan las materias insolubles (residuos celulares, núcleos, etc) por centrifugación a 7900 g durante 15 min. Los dos sobrenadantes (³H y ¹⁴C) se dividen en dos alícuotas cada uno, que serán procesadas de igual manera, de forma independiente. Cada alícuota se deposita sobre 250 µl del tampón de lisado, que contiene 0.5% de Triton X-114 y 10% sacarosa, y se incuba 3 min a 37°C, produciéndose la separación de fases. La centrifugación durante 3 min a 11600 g proporciona un precipitado que corresponde al detergente y un sobrenadante al que se le añaden 50 µl de Triton X-114 al 10%. Se incuba durante 3 min a 0-4°C esta fase acuosa y posteriormente otros 3 min a 37°C, procediéndose nuevamente a su centrifugación. Sobre las dos fase orgánicas obtenidas se adicionan 200 µl de NET y se juntan las que provienen de cada alícuota. La radioactividad que se recupera en este punto supone un 15-20% de la presente en el lisado celular.

3.3.2.2 Aislamiento del antígeno HLA-A2

La fracción de proteínas de membrana aisladas según el protocolo descrito son preadsorbidas con 100 µl de proteína A durante 20 min a 0-4°C para retirar las sustancias adsorbidas inespecíficamente. Se centrifuga durante 4 min a 11600 g y al sobrenadante se adicionan 10 µl de SNC, incubándose 1 h a 0-4°C. El objetivo de esta segunda preadsorción es la eliminación de las sustancias que se unen inespecíficamente a los anticuerpos, que serían precipitadas en el proceso de aislamiento del antígeno. Se precipita el SNC con 100 µl de proteína A durante 20 min a 0-4°C y se centrifuga. Al sobrenadante se adicionan 100 µl de la suspensión de sepharosa acoplada

Figura 3.1- Esquema de la purificación de la cadena pesada de HLA-A2 y de la obtención de mapas tripticos comparativos.

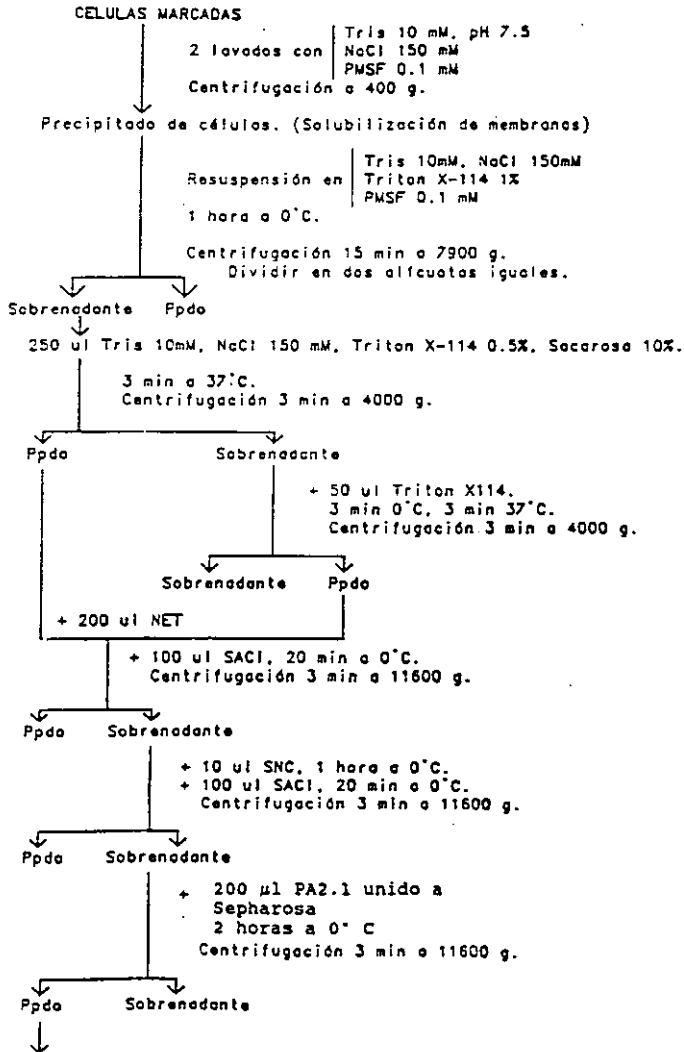
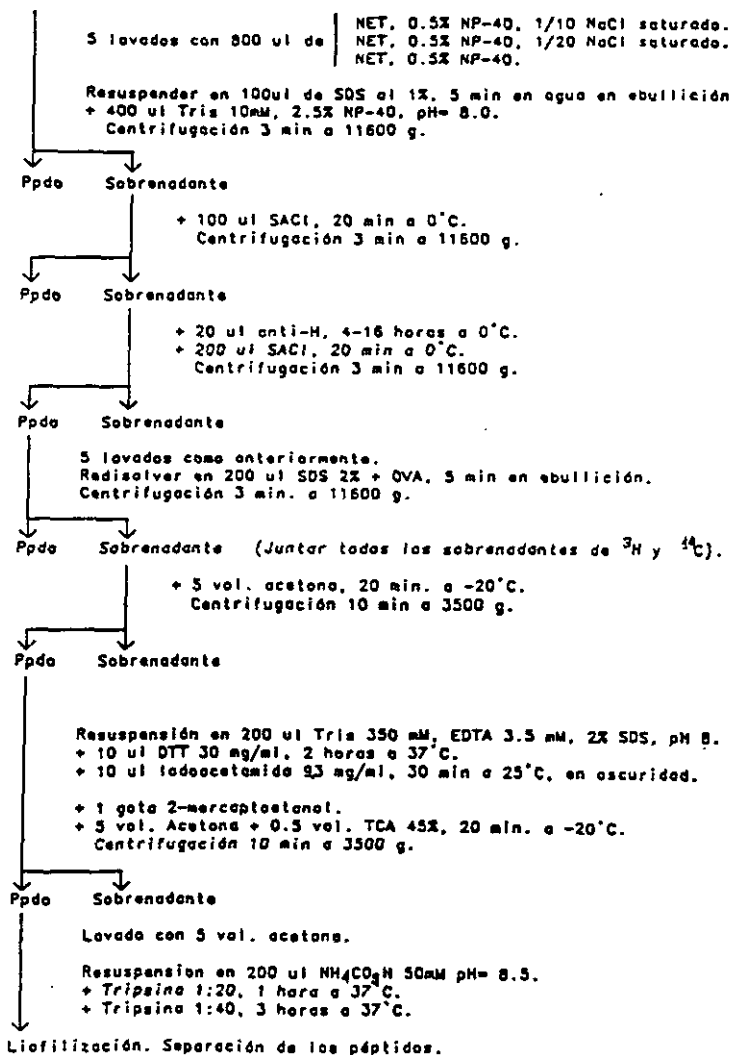


Figura 3.1- Continuación



con PA2.1 y se deja en agitación a 4°C durante 2 h. El inmunoprecipitado obtenido centrifugando 4 min a 11600 g, contiene HLA-A2 con alguna contaminación, de actina principalmente. El precipitado se somete a 6 lavados según el siguiente protocolo:

- 2 lavados con 750 μ l de tampón NET, 0.5% NP-40 y 1/10 NaCl saturado.
- 2 lavados con 750 μ l de NET, 0.5% NP-40 y 1/20 NaCl saturado.
- 2 lavados con 750 μ l de NET, 0.5% NP-40.

La extracción de los inmunocomplejos se realiza disolviendo los precipitados en 100 μ l de dodecilsulfato sódico (SDS) al 1% y calentando en agua hirviendo 5 min. Se añaden a continuación 400 μ l de Tris-HCl, 2.5% NP-40, pH 7.5 y se centrifuga. En el sobrenadante queda extraída la molécula de HLA-A2 desnaturalizada y disociada de la β 2-microglobulina, así como otras impurezas que puedan haber contaminado el inmunoprecipitado. A continuación se purifica la cadena pesada del antígeno HLA-A2 mediante un segundo proceso de inmunoprecipitación. Para ello, se realiza un preadsorción con 100 μ l de Proteína A durante 20 min a 0-4°C, se centrifuga y se añade al sobrenadante 20 μ l de anti-H. Tras una incubación a 0-4°C durante un periodo mínimo de 4 h, se precipita con 200 μ l de Proteína A durante 20 min, procediéndose al lavado de los precipitados en las mismas condiciones descritas para PA2.1. El precipitado final contiene pura la cadena pesada de HLA-A2.

3.3.3 *Obtención de mapas peptídicos*

3.3.3.1 *Reducción, alquilación y digestión triptica.*

El inmunoprecipitado conteniendo la cadena pesada de HLA-A2 se disuelve en 200 μ l de SDS al 2% y se procede a la extracción en agua hirviendo durante 4 min a 11600 g. En este momento se juntan los sobrenadantes de ^3H y ^{14}C en un tubo de vidrio, procesándose los dos antígenos conjuntamente.

Se precipitan las proteínas añadiendo 5 volúmenes de acetona durante 20 min a -20°C y centrifugando 20 min a 2500 g. El precipitado se lava de nuevo con acetona y se disuelve en 200 μ l de Tris-HCl 350 mM, 3.5 mM EDTA, 2% SDS, pH 7.5, procediéndose a su reducción en presencia de DTT 10 mM durante 2 h a 37°C y posterior alquilación con iodoacetamida 25 mM durante 30 min a temperatura ambiente en oscuridad. La reacción se detiene añadiendo una gota de 2-mercapto etanol. Se precipitan las proteínas con 5 volúmenes de acetona y 0.5 de ácido tricloroacético al 45% (peso/volumen), durante 20 min a -20°C. Tras centrifugar 20 min a 3500 g, el precipitado se lava en acetona y se resuspende en 200 μ l de bicarbonato amónico 50 mM, pH

7.7.

A continuación se digiere con tripsina-TPCK (Worthington) a una relación enzima sustrato 1:20 sobre la cantidad de proteína extraída de cada alícuota de proteína A usada en la inmunoprecipitación del anti-H (1.5 mgr/200 μ l de proteína A) durante 1h a 37°C. Se vuelve a añadir tripsina a una relación 1:40, prosiguiéndose la digestión durante 3 horas a 37°C. La reacción se termina congelando la muestra a -80°C y liofilizando.

3.3.3.2 Separación de péptidos por HPLC.

Los péptidos generados en la digestión triptica son separados mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC) en fase reversa. Se usó un cromatógrafo Waters equipado con una columna μ Bondapak C18, de 0.39 x 30 cm.

La muestra se disuelve en 200 μ l de acetato amónico 10 mM, pH 6.5, se centrifuga 4 min a 11600 g y se inyecta en la columna. La separación se realiza en un gradiente del tampón acetato amónico-acetonitrilo en las siguientes condiciones:

- Tampón acetato amónico durante 20 fracciones (8 min).
- Gradiente lineal 0-30% de acetonitrilo en el tampón acetato amónico durante 55 min (138 fracciones).
- Mezcla de acetonitrilo-acetato amónico al 30% durante 30 fracciones (12 min).
- Acetonitrilo puro durante 18 min. Se recogen las 20 primeras fracciones de esta fase.

El flujo de la columna se mantiene a 1.5 ml/min, recogiendo fracciones de 0.6 ml. La detección de los péptidos de las moléculas de HLA-A2 se realiza mediante contajes de la radioactividad de alícuotas que contienen 1/2 - 1/5 de cada fracción en Aquasol (New England Nuclear). El contaje se realiza en un contador de centelleo líquido Beckman LS2800 equipado con un programa para contaje simultáneo de ^3H y ^{14}C con cálculo de DPM.

El mapa peptídico se obtiene representando conjuntamente en la relación de escala apropiada la radioactividad de ^3H y ^{14}C , frente al número de fracciones. Las fracciones que componen cada pico son agrupadas y liofilizadas para, en su caso, posterior secuenciación radioquímica.

3.3.4 Análisis de péptidos de gran tamaño.

El gran tamaño de algunos péptido tripticos dificulta su análisis mediante mapeo con todos los aminoácidos que presentan y su secuenciación radioquímica. Para obviar esta dificultad, el

péptido tríptico aislado del mapa peptídico es liofilizado y digerido con otras proteasas que generan péptidos de menor tamaño susceptibles de ser analizados con mayor facilidad.

En algunos experimentos se procedió a la digestión de los péptidos trípticos con clostripaina (Clostridiopeptidasa B, Worthington) que presenta especificidad de ruptura en el extremo carboxílico de los enlaces peptídicos de arginina y actúa también sobre los enlaces arginina-prolina, poco susceptibles a la hidrólisis tríptica (187). La enzima ha de ser activada previamente, disolviéndose en acetato cálcico 1 mM con DTT 2.5 mM durante 2-3 h a una concentración de 2-5 mgr/ml. Una vez activada, la digestión se realiza en tampón fosfato sódico 75 mM, pH 7.6 con 100 µg de ovoalbúmina como proteína fría. En condiciones normales, la digestión se realiza a una relación enzima/sustrato de 1:25 durante 6 h., con una segunda adición en idénticas condiciones. En ocasiones se realizaron digestiones a relaciones 1:5 durante 12 h, con una segunda adición.

En otros experimentos, péptidos trípticos fueron digeridos con proteasa de *Staphilococcus Aureus*, cepa V8 (Miles Laboratories). La muestra se disuelve en 400 µl de acetato amónico 50 mM, pH 4 con 100 µg de ovoalbúmina tripsinizada, a una relación enzima/sustrato de 1:5 durante 12 h a 37°C. Se realiza una segunda adición en idénticas condiciones. En estas condiciones se produce una hidrólisis selectiva del enlace carboxi-terminal de los residuos de glutámico (188, 189). Ocasionalmente se realizó una tercera adición para conseguir la ruptura de enlaces especialmente resistentes.

Tras la digestión con estas enzimas, se añaden 400 µg de un digerido tríptico de ovoalbúmina, disuelto en 400 µl del mismo tampón de digestión del péptido. La muestra se congela a -80°C y se liofiliza para su posterior fraccionamiento por HPLC.

3.3.5 Purificación cromatográfica de péptidos coeluyentes.

Los péptidos trípticos que coeluyen en el sistema cromatográfico descrito pueden ser separados mediante un segundo fraccionamiento en un gradiente de agua-TFA/acetronitrilo-TFA en las siguientes condiciones:

- Agua con 0.16% de ácido trifluoracético (TFA) durante 8 min (12 fracciones).
 - Gradiente lineal del 0 al 40% de acetronitrilo con 0.1% de TFA a pH 2.1 en el solvente anterior, durante 55 min (92 fracciones).
 - Mezcla al 40% de los dos solventes durante 12 min (20 fracciones).
 - Acetonitrilo con 0.1% de TFA a pH 2.1 durante 12 min (20 fracciones).
- El flujo de la columna se mantiene a 1 ml/min, recogiendo fracciones de 0.6 ml.

3.3.6 *Secuenciación radioquímica.*

La secuenciación radioquímica de los péptidos obtenidos se realizó en presencia de 10 nmoles de apomioglobina en un secuenciador Beckman de fase líquida. Posteriormente dispusimos de un secuenciador de fase gaseosa (Applied Biosystems, 470A), llevándose a cabo la secuenciación en ausencia de proteína fría, usando un programa O3CMAC. Las fracciones son contadas con 4 ml de Aquasol en los contadores Beckman LS-255 o LS-2800 de centelleo líquido, con doble canal de ^3H y ^{14}C y cálculo de DPM en el 2º caso.

3.4 AMPLIFICACION Y SECUENCIACION DE cDNA CODIFICANTE DE HLA-A2.

3.4.1 *Cultivos bacterianos* (190).

3.4.1.1 *Cepas bacterianas y vectores utilizados.*

Para el clonaje de los antígenos HLA-A2 analizados en esta tesis, se han usado dos vectores de clonación distintos:

- Plásmido pUC18, de 2.7 kb, que contiene un sitio de clonaje múltiple con secuencia de restricción de las enzimas Eco RI y Hind III. Contiene un gen de resistencia a ampicilina, lo que permite la selección de bacterias transformadas con este vector.

- Fago M13mp18, de 7.2 kb, que contiene un sitio de clonaje múltiple idéntico al de pUC18, con los sitios de restricción de Eco RI y Hind III.

Estos vectores fueron introducidos, para su crecimiento, en dos cepas bacterianas:

- DH5 α F⁻, para el vector pUC18, derivada de la cepa DH1. Presenta una alta frecuencia de transfección, con un genotipo Sup E44, [lac U169 (ϕ 80 lac Z M15)], hsd R17, rec A, end A1, gyr A96, thi-1 red A1.

- XL1-blue, para el fago M13, que presenta un episoma con un gen resistente a tetraciclina, lo que permite seleccionar las cepas susceptibles de ser transformadas. Tiene un genotipo sup E44, hsd R17, rec A1, end A1, gyr A46, rel A1 lac- F'[pro AB+ lac Iⁿ lac Z M15 Tn10 (tet^r)].

Estas dos cepas contienen el fragmento C terminal del gen de la β -galactosidasa (genotipo lac Z M15), que puede dar lugar a la enzima activa en presencia de vectores (pUC, M13, etc) que lleven el fragmento N terminal del citado gen (lac Z), mediante el fenómeno conocido como α -complementación. Las bacterias transformadas con estos vectores son fácilmente reconocibles, pues forman colonias azules en presencia del sustrato cromogénico X-gal (5-bromo, 4-cloro, 3-idolil β -D-galactósido). Sin embargo, vectores recombinantes en los que se ha introducido un

inserto en el sitio de clonaje múltiple situado en el gen *lac Z*, generan un fragmento N-terminal que no puede dar lugar a la α -complementación. Las colonias transformadas con estos vectores son incapaces de usar el sustrato X-gal, dando una coloración blanca que permite su detección visual.

3.4.1.2 Medios de cultivo y crecimiento bacteriano.

Los medios utilizados para el crecimiento de bacterias fueron:

- LB (Luria-Bertoni) compuesto de:

- 1% bactotripton
- 0.5% extracto de levadura
- 1% NaCl

- 2xYT:

- 1.6% bactotripton
- 1% extracto de levadura
- 1% NaCl

- TB (Terrific broth), que permite un rendimiento 4-7 veces superior en la obtención de plásmidos:

- 1.2% bactotripton
- 2.4% extracto de levadura
- 0.4% glicerol

En el momento de utilización se añade un volumen 1/10 de una solución 0.72 M K_2HPO_4 y 0.17 M KH_2PO_4 .

Todas las soluciones se esterilizan mediante autoclavado a 120°C durante 25 min.

Para la preparación de placas de cultivo de medio sólido, se añade Bacto-agar hasta el 1.5% antes del autoclavado, y se depositan posteriormente 5 ml del medio en placas de Petri de 10 cm, donde se dejan gelificar. Para la preparación de "top agar" usado en el plaqueo de M13, la proporción de Bacto-agar añadido es del 0.7%.

Para la selección de las distintas colonias, los medios se suplementan con:

- 50-100 μ gr/ml de ampicilina, para la selección de colonias transformadas con pUC.
- 50-150 μ gr/ml de tetraciclina, para la selección de bacterias XL1-blue con episoma, susceptibles de transformación.
- 50 μ gr/ml de X-gal y 100 μ M de IPTG (isopropil β -D-tiogalacopiranosido, inductor de la

síntesis de la galactosidasa), para la selección de colonias transformadas con los vectores recombinantes, que dan coloración blanca en los cultivos en placa.

Habitualmente, el crecimiento se realiza durante 8-12 h a 37°C, en baño de agitación en el caso de los cultivos líquidos. Las colonias bacterianas pueden ser conservadas 1 semana en medio líquido a 0-4°C, hasta un mes en placa de agar a 4°C e indefinidamente en medio de cultivo con 7% de DMSO a -70°C.

3.4.1.3 Obtención de bacterias competentes.

Para hacer posible la incorporación de DNA extraño, las bacterias han de estar en un estado competente que permita la transformación (191). El protocolo seguido para la obtención de bacterias competentes, se basa en someter a las bacterias a un choque térmico en presencia de cationes divalentes.

Una colonia bacteriana cultivada en placa de Petri se crece en 5-10 ml de medio LB hasta alcanzar una densidad óptica a 590 nm de 0.3-0.6. 1 ml de este cultivo se crece en 100 ml de SOC-Mg hasta alcanzar una densidad óptica de 0.48. El cultivo se enfría en hielo y se centrifuga a 4°C durante 7 min a 2000 g.

Se retira todo el sobrenadante y se resuspende el precipitado bacteriano en 30 ml de TIBI con suavidad, en frío, dejándose en hielo 15 min para el caso de XL1-blue.

Se centrifuga nuevamente y el precipitado se resuspende en 4 ml de TIBII, y se hacen alicuotas de 200-400 μ l que se congelan inmediatamente en nitrógeno líquido. Las bacterias competentes son estables durante meses a -70°C.

Los medios utilizados en este protocolo son:

- SOC-Mg:- 2% bactotriptona
- 0.5% extracto de levadura
- 10 mM NaCl
- 2.5 mM KCl
- 20 mM MgCl₂
- 20 mM MgSO₄
- TIBI: - 100 mM RbCl
- 50 mM MnCl₂
- 30 mM acetato potásico
- 10 mM CaCl₂

- 15% glicerol

Se ajusta a pH 5.8 con ácido acético.

- TBII: - 10 mM MOPS (ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico) pH 7.0
 - 10 mM RbCl
 - 75 mM CaCl₂
 - 15% glicerol

El pH de MOPS se ajusta con NaOH.

3.4.1.4 Transformación de bacterias competentes.

70-100 μ l de bacterias competentes se descongelan a temperatura ambiente, y se mantienen a 0-4°C durante 15-30 min.

El DNA del vector transformante es añadido en un volumen no superior a 1/10 del volumen bacteriano, manteniéndose durante 20 min a 0-4°C. Se da un choque térmico a 42°C durante 90 seg y se mantienen 5 min a 0-4°C.

En el caso de bacterias transformadas con pUC18, se añaden 4 volúmenes de SOC-Mg-Glucosa (solución de SOC-Mg con glucosa 20 mM) y se crecen 45 min a 37°C en baño de agitación. A continuación se centrifugan 10 seg a 11600 g y se resuspenden en 100 μ l de medio LB para plaqueo en placas de medio LB con ampicilina.

En el caso de transformación con M13, 2.5 ml de "top agar" se funden a 45°C y se añade tetraciclina a una concentración final de 100 μ g/ml y 300 μ l de un cultivo de XL1-blue, que servirá como césped bacteriano para el crecimiento del fago. Se añaden las bacterias transformadas y se extiende la mezcla sobre una placa de medio LB, cultivándose 8 h a 37°C.

3.4.1.5 Aislamiento de plásmidos.

Los métodos utilizados en esta tesis para el aislamiento de plásmidos se basan en la lisis alcalina de las bacterias hospedadoras, variando los protocolos en función de la cantidad de DNA a aislar y del grado de pureza necesario en función de su uso posterior.

A- Maxipreparación.

Este protocolo está diseñado para el aislamiento de grandes cantidades de plásmido.

1 ml de cultivo de bacterias transformadas se adiciona a 250 ml de medio TB y se crece en agitación a 37°C. A las 8-12 h se centrifugan 15 min a 4°C a 2000 g. El precipitado bacteriano se

lava con 100 ml de STE (solución 0.1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0). El precipitado se resuspende en 3 ml de una solución 50 mM Glucosa, 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0 y se mantiene 30 min a 0-4°C. Se añaden 8 ml de una solución recién preparada de NaOH 0.2 M y SDS al 1%, se agita suavemente y se mantiene 10 min a 0-4°C. A continuación se añaden 6 ml acetato potásico 3 M pH 4.8 frío, con agitación suave y se mantiene 15 min a 0-4°C. Se centrifuga durante 30 min a 0-4°C a 2500 g para precipitar el DNA cromosómico, RNA de alto peso molecular y los complejos de membrana celular, proteínas y SDS.

El sobrenadante que contiene el DNA del plásmido se extrae con 18 ml de una mezcla de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico en proporciones 25:24:1 (a partir de ahora la denominaremos fenol/cloroformo), centrifugándose 15 min a 4°C a 2500 g.

A la fase acuosa se le añaden 0.6 volúmenes de isopropanol y se incuba 15 min a T. A. Se centrifuga 15 min a 2500 g a T. A. para evitar la precipitación de sales y el precipitado de DNA de plásmido se seca 5-15 min a T. A. Se disuelve posteriormente en 1-4 ml de TE y se trata con una mezcla de ribonucleasa A a una concentración de 100 µg/ml y ribonucleasa T1 a 100 U/ml durante, al menos, 30 min a 37°C. Tras dos extracciones con fenol/cloroformo y una con cloroformo (mezcla de cloroformo y alcohol isoamílico en proporción 24:1) el DNA del plásmido está listo para su uso.

B- Minipreparación (192).

1.5 ml de cultivo bacteriano se centrifugan 30 seg a 11600 g, retirándose exhaustivamente el sobrenadante. Se añaden 100 µl de una solución TE-sacarosa (25 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 25 mM sacarosa) y se resuspende el precipitado en vortex, incubándose a continuación 15 min a T.A. y 5 min a 0-4°C. Se añaden 200 µl de una solución de NaOH 0.2 M, 1% SDS y se mantiene 5 min a 0-4°C. A continuación se añaden 150 µl de una solución 3 M de acetato sódico o potásico pH 8 y se incuban 45 min o 15 min respectivamente a 0-4°C. Se centrifuga 10 min a 11600 g y se añaden 200 µl de isopropanol, incubándose 15 min a T. A. Se centrifuga la suspensión 10 min a T. A. y el precipitado se lava con 200 µl de etanol y se seca en bomba de vacío. A continuación se resuspende el precipitado en 50 µl de TE y se incuba con ribonucleasa A y T1 a 100 µg/ml y 100 U/ml respectivamente durante 30 min a 37°C. Se realizan extracciones con fenol/cloroformo y cloroformo y se precipita el DNA con la adición de 1/10 volúmenes de acetato sódico 3 M y 2.5 de etanol, incubando 20 min a -20°C. Se centrifuga 30 min a 11600 g a 4°C y el precipitado del plásmido se resuspende en 100 µl de agua.

Para purificar el DNA, se añaden 40 μ l de polietilenglicol (PEG) 6000 al 25% y 16 μ l de NaCl 5 M, incubándose 1 h a 0-4°C. Se centrifuga 30 min a 11600g a 4°C y se retira el sobrenadante suavemente.

El DNA del plásmido así purificado, puede resuspenderse en agua y someterse a un proceso de extracciones con fenol/cloroformo, cloroformo y precipitación con acetato sódico y etanol, quedando un DNA extremadamente puro listo para su uso.

Si va a ser usado en secuenciación, en vez del proceso descrito, el DNA del plásmido se resuspende en 100 μ l de NaOH 0.2 M recién preparada en agua bidestilada y se añaden 4 μ l de EDTA 50 mM y 1-2 μ l del oligonucleótido iniciador a una concentración 1mM. Se incuba 30 min a 37°C y se precipita el DNA desnaturalizado con 10 μ l de acetato amónico 7.5 M y 2.5 volúmenes de etanol, incubándose 30 min a -20°C. Se centrifuga en las condiciones habituales y el precipitado se resuspende en la cantidad de agua necesaria para la secuenciación.

C- Minipreparación rápida.

Para el control del plásmido recombinante obtenido en colonias transfectadas, se siguió un método rápido de aislamiento de pequeñas cantidades (kit miniprep plus de Pharmacia) que rinde un DNA puro, pero con contaminaciones de sales que lo hacen inadecuado para su uso en muchas reacciones de biología molecular.

1.4 ml de cultivo bacteriano se centrifugan 1 min a 11600 g, retirándose exhaustivamente el sobrenadante. Se añaden 100 μ l de la solución I (50ml Tris pH 8.0, 50 mM glucosa, 10 mM EDTA, 0.15% Kathon) y se resuspende el precipitado por agitación en vortex. Tras 5 min de incubación a 0-4°C se añaden 200 μ l de la solución II (0.8 M NaOH, 4% Triton X-100), mezclándose por inversión. Tras incubar 5 min a 0-4°C se añaden 150 μ l de la solución III (3 M acetato sódico pH 4.8) y se incuba otros 5 min a 0-4°C. Se microfuga la suspensión 5 min a T. A. y se retira el sobrenadante al que se adicionan 450 μ l de isopropanol. Tras incubar 5-10 min y centrifugar, se lava el plásmido con 250 μ l de isopropanol y se deja secar al aire, resuspendiéndose en 50 μ l de TE. Tras el tratamiento con ribonucleasas y posterior proceso de extracciones con fenol/cloroformo, cloroformo y precipitación con acetato sódico y etanol, se obtiene el DNA del plásmido recombinante para su análisis en geles de agarosa.

3.4.2 Geles de agarosa y Southern blot.

3.4.2.1. Geles de agarosa analíticos.

El análisis del DNA se realiza en geles de agarosa (Bio Rad o FMC) al 0.6-1% en TAE (40 mM Tris-acetato pH 8.0, 1mM EDTA), con bromuro de etidio 1 μ gr/ml para la detección de DNA mediante luz ultravioleta.

La muestra se deposita en un tampón de carga con 0.01% de azul de bromofenol, 0.01% xilencianol, 0.01 M Na₂EDTA, 0.1% SDS y 5% de glicerol.

La electroforesis se realiza a voltaje constante de 90 V durante 30-120 min, en función del tamaño del DNA a analizar, en TAE.

3.4.2.2 Geles de agarosa preparativos y aislamiento de bandas.

Para la extracción de bandas de DNA separadas por electroforesis, se realizan geles de agarosa de bajo punto de fusión (Bio Rad o FMC) en las mismas condiciones que los analíticos.

Para el aislamiento de las bandas de interés, se usó el kit de Geneclean (Bio 101), cuyo protocolo se describe a continuación.

Se corta la banda de DNA deseada, procurando que contenga la mínima cantidad de agarosa posible, y se añaden 2.5-3 vol de NaI 6M (estimando un volumen de 1 μ l por mg de banda). Se mantiene 5 min a 55°C con agitaciones frecuentes para disolver la agarosa y se añaden 5 μ l de Glassmilk (matriz de sílice que une DNA), manteniéndose 5 min a 0-4°C con agitaciones cada minuto. Este soporte adsorbe DNA bicatenario de 200-5000 bp, muy poco DNA monocatenario y RNA y no adsorbe proteínas ni sales. Se centrifuga 5 seg a 11600 g y el precipitado se lava 3 veces con 10-50 vol de New Wash frío (solución de Tris/NaCl/EDTA/50% etanol). El precipitado se redissuelve en 10 μ l de agua y se incuba 3 min a 45-55°C, microfugándose 30 seg. El sobrenadante contiene el DNA extraído del gel. El precipitado vuelve a ser extraído con otros 10 μ l de agua, recuperándose un 20% del DNA extraído anteriormente.

3.4.2.3 Southern blot.

El análisis de la especificidad del DNA presente en geles de agarosa, se realiza mediante Southern blot, que consiste en la transferencia a filtros adecuados del DNA presente en el gel y su hibridación con sondas específicas (193). El procedimiento usado fue la transferencia alcalina a membranas Z-probe (Bio Rad).

2 trozos de papel Whatman 3M previamente humedecidos, se colocan en una superficie

horizontal en contacto con un reservorio de NaOH 0.4 M (tampón de transferencia). Se coloca el gel de agarosa, evitando la formación de burbujas, y sobre éste una lámina de Z-probe humedecida. A continuación se colocan 2 láminas húmedas de papel Whatman 3M y toallas de papel para absorber la solución de transferencia. Tras un mínimo de 4 h de transferencia, la membrana de Z-probe se lava en 2xSSC (0.3 M NaCl, 30 mM citrato sódico pH 7) y se realiza una prehibridación de 30-60 min a 5°C por debajo de la temperatura media de fusión de la sonda a utilizar (calculada según la fórmula: $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$) en el tampón:

- 5xSSPE (0.75 M NaCl, 50 mM NaHPO₄, 50 mM EDTA, pH 7.0)
- 10xDenhardt (0.2% Ficoll, 0.2% polivinilpirrolidona, 0.2% albúmina de suero bovina)
- 0.1% SDS
- 40 mgr/ml DNA de esperma de salmón

La hibridación con la sonda elegida se realiza durante un mínimo de 3 h a 5°C por debajo de la temperatura de fusión, en un tampón análogo al anterior, excepto que es 5xDenhardt.

Una vez hibridada, la membrana de transferencia se lava 2 veces durante 20 min a T. A. en 6xSSC y 3 min a la temperatura de hibridación. Las bandas con DNA complementario a la sonda usada, se localizan mediante autoradiografía en película Kodak X-Omat S a -70°C, usando unas pantallas amplificadoras Valtarrar 6 (Valca).

3.4.3 *Oligonucleótidos utilizados.*

3.4.3.1 Descripción.

Diversos oligonucleótidos se han usado tanto como iniciadores de las diversas reacciones de síntesis, como sondas específicas para detectar la presencia de DNA de HLA-A2.

- 5' LP HIII: 5'-GCAAGCTTATGACGGTCATGGCTCCCGAACC-3'

Oligonucleótido utilizado como iniciador de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Abarca los residuos 1-24 del exón 1, con una cola de 8 bases en el extremo 5' que incorpora un sitio de restricción Hind III (subrayado). No es específico del antígeno HLA-A2, sino que es homólogo a todos los alelos de clase I (194).

- 3' UT RI: 5'-GCGAATTCAGTCCACACAAGCCAGCTG-3'

Oligonucleótido utilizado como iniciador de la síntesis de cDNA por la transcriptasa reversa y en la PCR. Es complementario al extremo 5' de la región 3' no traducida de la hebra "+" de los antígenos de clase I, e incorpora un sitio de restricción para Eco RI (subrayado) (194).

- A2a1: 5'-GACGGGGAGACACGGAAAGTGAAG-3'

Oligonucleótido utilizado como iniciador de la polimerasa en las reacciones de secuenciación. Abarca los residuos 180-203 del exón 2 del antígeno HLA-A2, siendo específico de este alelo.

- A2 α 2: 5'-TGGCAGCTCAGACCAAGCACAAAGT-3'

Iniciador en las reacciones de secuenciación y sonda específica de HLA-A2. Abarca los residuos 142-168 del exón 3 de éste.

- A2 α 3: 5'-GAGCTCGTGGAGACCAAG-3'

Iniciador de la síntesis por la polimerasa en las reacciones de secuenciación. Abarca los residuos 138-154 del exón 3 de HLA-A2.

La figura 3.2 representa la localización de los distintos oligonucleótidos en la cadena de cDNA de antígenos de clase I.

Los oligonucleótidos descritos fueron sintetizados en un sintetizador automático de DNA, modelo 391 de Applied Biosystems.

3.4.3.2 Purificación de oligonucleótidos.

Debido a los errores en el proceso de síntesis, los oligonucleótidos han de ser purificados por separación electroforética en geles de poliacrilamida, compuestos de:

- 20% acrilamida
 - 1% bis-acrilamida (N,N'-bis-metilen acrilamida)
 - 48% urea
 - 0.06% persulfato amónico
 - 0.03% TEMED (tetrametilendiamina)
- en tampón TBE (0.9 M Tris-borato pH 8.0, 2 mM EDTA).

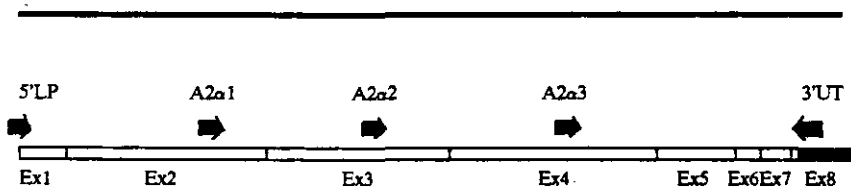


Figura 3.2.- Esquema a escala del cDNA codificante de HLA-A2, en el que se indican la posición de los distintos exones y de los oligonucleótidos utilizados en la PCR y en la secuenciación.

El oligonucleótido liofilizado anteriormente se disuelve por agitación en vortex en un tampón al 90% de formamida, 0.1% azul de bromofenol y 0.1% xilencianol. Se calienta en baño en ebullición durante 2-3 min guardándose a 0-4°C hasta su carga en el gel. La electroforesis se realiza a un voltaje constante de 500 V durante 2 h en tampón TBE.

Mediante iluminación con luz ultravioleta del gel colocado sobre un soporte de gel de sílice, se visualiza el oligonucleótido. El gel se corta justo por debajo de la banda y se coloca sobre una bandeja horizontal, solapando la banda con una tira de papel Whatman DE81. Con 2 piezas de papel Whatman 3M colocadas sobre el extremo inicial del gel y sobre el final del Whatman DE81 respectivamente y en contacto con 2 reservorios de TBE, se establece un puente salino que permite realizar una electroforesis en las mismas condiciones anteriores. El oligonucleótido se transfiere al papel de celulosa, quedando retenido en él.

Mediante iluminación con luz UV se delimita la zona donde ha quedado retenido. Esta zona se coloca en una solución 20 mM de Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 0.1 M NaCl y se agita en vortex hasta su completa disgregación.

Con una columna con un filtro de vidrio sinterizado que retiene el papel, se elimina el tampón de disgregación. Se añaden 5 ml de un tampón de elución 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 1 M NaCl, recogiendo fracciones de 400 μ l a las que se añade 1 ml de etanol y se guardan a -70°C 18 h. Tras centrifugar 30 min a 11600 g a 4°C, se decanta el sobrenadante y se seca al vacío cada tubo. El precipitado de cada tubo se solubiliza en agua, juntándose todas las fracciones. Mediante la determinación de la absorbancia a 260 nm, se calcula la cantidad de oligonucleótido purificado, teniendo en cuenta que una concentración de 20 mgr/ml presenta una unidad de absorbancia.

3.4.3.3 Marcaje radioactivo de sondas

Para su utilización como sondas de hibridación, se procede al marcaje radioactivo de oligonucleótidos en su extremo 5' con la T4 polinucleótido quinasa:

- 50 pmoles de oligonucleótido
- 25 μ Ci de γ -³²P-ATP (actividad específica 3000Ci/mmo)
- 100 mM Tris-HCl pH 8.0
- 13.3 mM MgCl₂
- 5.6 mM DTT
- 1 mM ATP

La reacción se lleva a cabo durante 45 min a 37°C, añadiendo 1.5 μ l de quinasa.

3.4.4 Obtención de cDNA de antígenos de clase I

3.4.4.1 Aislamiento de RNA.

1-5.10⁶ células lavadas en PBS, se resuspenden en 1 ml de PBS y se centrifugan 10 seg a 11600 g. Tras retirar cuidadosamente el sobrenadante, se lisan en 200 μ l de una solución de NP-40 al 0.5% y 10 mM de vanadil ribonucleótidos (VRN) en TSM, mediante agitación en vortex e incubación a 0-4°C durante 5 min. Se agita en vortex brevemente y se precipitan los núcleos celulares mediante centrifugación a 11600 g 1 min a 4°C. Al sobrenadante se añade un volumen de una solución de SDS al 1% en TSE y se agita en vortex brevemente.

A continuación se procede a una serie de extracciones en fenol/cloroformo con 0.1% de β -mercaptoetanol, hasta la total extracción de los VRN (eliminación de la coloración oscura, típicamente tras 10-12 extracciones). Tras una última extracción en cloroformo, se precipita el RNA con acetato sódico y etanol, incubando 15 min a -70°C y centrifugando 30 min a 11600 g a 4°C. El precipitado se seca a T. A. durante 15 min y se resuspende en 400 μ l de acetato sódico 0.15 M. Se añaden 880 μ l de etanol y se incuba 18 h a -20°C. Tras centrifugar en las condiciones anteriores, se repite el mismo proceso con el precipitado obtenido.

El precipitado de RNA se resuspende en 50 μ l de agua y se almacena a -20°C. Una alícuota se cuantifica espectrofotométricamente a 260 y 280 nm, asumiendo una concentración de 40 mg/ml por unidad de absorbancia.

Las soluciones usadas en este aislamiento se preparan a partir de agua tratada con 0.1% de dietilpirocarbonato, para destruir las ribonucleasas presentes, durante 18 h a T. A. y autoclavada:

TSM: - 0.1 M Tris-HCL ph 7.6

- 0.15 M NaCl

- 0.002 M MgCl₂

TSE: - 0.1 M Tris-HCl pH 7.6

- 0.15 M NaCl

- 0.005 M EDTA

El rendimiento típico de este proceso es de unos 10 μ g RNA/10⁶ células.

3.4.4.2 Síntesis de cDNA.

La síntesis de cDNA codificante de antígenos de clase I se realiza a partir de 5-20 μ g de

RNA, usando el oligonucleótido 3' UT RI como iniciador de la reacción de la transcriptasa reversa, en 50 μ l de la mezcla de reacción:

- 1 μ M 3' UT RI
- 200 μ M de cada dNTP
- 2mM DTT
- 10 mM Tris-HCl pH 8.3
- 50 mM KCl
- 1.5 mM MgCl₂,
- 0.01% gelatina
- 2 U inhibidor pancreático de la ribonucleasa
- 2 U transcriptasa reversa del virus de la mieloblastosis avícola

La reacción transcurre durante 1 h a 42°C. El cDNA así sintetizado se guarda a -20°C.

3.4.5 Amplificación cDNA de antígenos de clase I mediante PCR.

La estrategia seguida para la obtención del cDNA de antígenos de clase I se basa en la PCR, que permite la amplificación selectiva de fragmentos de DNA, mediante la utilización de pares de oligonucleótidos específicos que hibridan en los extremos 5' y 3' del material a amplificar (195). Así, desnaturalizando el DNA de partida e hibridando con los oligonucleótidos iniciadores, se consigue, en presencia de una polimerasa termoestable, la síntesis de una hebra complementaria al DNA molde con cada iniciador, duplicando la cantidad de DNA específico presente en la muestra. Sometiendo la muestra a un nuevo ciclo de desnaturalización, hibridación con los iniciadores y síntesis de DNA por la polimerasa, se consigue la amplificación exponencial del DNA.

La especificidad de la reacción es muy dependiente de las condiciones en que se lleva a cabo. Tanto la elección en cada proceso, como los tiempos de cada paso, el tampón de reacción y las cantidades de material de partida, van a determinar la especificidad y fiabilidad de la reacción. Debido a la multitud de parámetros que influyen en el proceso, se realizó la PCR en condiciones estándar de temperaturas y tiempos de reacción previamente establecidos (194) y que fueron adaptados a nuestro sistema (termociclo programable, Hybaid). Se usaron dos tampones estándar de reacción con diversas cantidades de catión Mg²⁺, que determinan tanto la especificidad como el rendimiento de la reacción.

Se usaron 2 oligonucleótidos que mapean en el extremo 5' de la región 3' no traducida (3'

UT RI) y en el extremo 5' del exón 1 (5' LP HIII). Dado que estas dos regiones son muy homólogas en todos los antígenos de clase I y que existen múltiples transcritos de RNA codificante de los diversos antígenos de clase I de la célula (al menos 6 en una célula heterocigota) no es posible el diseño de oligonucleótidos que permitan la amplificación específica de uno determinado. Además, aun cuando ello fuera posible en el caso de una combinación concreta de antígenos presentes en un individuo, la gran capacidad de esta técnica y las condiciones superóptimas en las que se lleva a cabo, darían lugar a la amplificación de los transcritos codificantes de otros antígenos HLA presentes en la célula, aunque en menor proporción que el deseado, pero que imposibilitarían la secuenciación directa del material amplificado. Es necesario, por tanto, clonar el material amplificado para la selección del cDNA que codifica para el antígeno HLA-A2 (113). Por ello, los oligonucleótidos indicados presentan un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción Eco RI (3' UT RI) y para Hind III (5' LP HIII) que permite introducir el DNA amplificado en los vectores adecuados.

Los tampones en los que se llevaron a cabo las reacciones fueron:

- A:
- 10 mM Tris-HCl pH 8.3
 - 50 mM KCl
 - 0.01% gelatina
 - MgCl₂ a diversas concentraciones: 0.5 mM, 1mM, 1.5 mM, 2 mM, 3mM y 4mM.
- B:
- 6 mM Tris-HCl pH 8.3
 - 30 mM KCl
 - 0.006 % gelatina
 - 1.6 mM MgCl₂

La reacción tiene lugar a partir del cDNA sintetizado a partir de 1-2 µg de RNA, en 50 µl del tampón elegido en presencia de una concentración 130 µM de dNTP, 1 mM de los oligonucleótidos iniciadores y 1.25-2.5 U de la DNA polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq polimerasa). Previamente a la adición de la enzima, la mezcla de reacción se calienta a 95°C 5 min para desnaturalizar el complejo RNA-cDNA.

La reacción se lleva a cabo en 30 ciclos de amplificación consistentes en:

- hibridación de iniciadores: 220 seg 35.5°C
- elongación del DNA por la polimerasa: 10 min a 72°C
- desnaturalización del DNA sintetizado: 110 seg a 92°C

Posteriormente se realiza un ciclo final de extensión en las mismas condiciones, pero con un

tiempo de elongación de 15 min.

El análisis de la reacción se realiza por electroforesis en gel de agarosa al 0.6% de 1/10 de cada reacción, para determinar el tamaño del material amplificado, y posterior Southern blot con la sonda A2a2 para detectar la presencia de cDNA de HLA-A2 entre el material amplificado.

3.4.6 Clonaje del cDNA amplificado por PCR

3.4.6.1 Aislamiento y clonaje en pUC.

Las reacciones de amplificación que rinden una banda de un tamaño aproximado de 1.1 kb, correspondiente al tamaño esperado del cDNA de transcritos enteros de antígenos de clase I, y que contiene HLA-A2 detectado por Southern blot, son cargadas en geles de agarosa de bajo punto de fusión y sometidas a electroforesis en las condiciones descritas. Se aísla la banda de 1.1 kb con GeneClean (Bio 101 Inc.) y se somete a digestión con 10 U de las enzimas Eco RI y Hind III en un tampón 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 5 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 1 mM 2-mercaptoetanol durante 3 h a 37°C.

Paralelamente, 1-2 µg de pUC18 se digieren con 2 U de Eco RI y Hind III en las mismas condiciones, para generar extremos compatibles donde introducir el material amplificado.

Tras un proceso de extracción en fenol/cloroformo y cloroformo, y posterior precipitación con acetato sódico y etanol, se procede al ligamiento del material amplificado con 200-300 ng de pUC18, a distintas relaciones inserto/vector. La reacción tiene lugar en 20 µl del tampón de ligamiento con 1 U de T4 DNA ligasa (Boehringer Mannheim) a 15°C durante un mínimo de 4h. El tampón de ligamiento que se usa es el siguiente:

- 2mM ATP
- 66 mM Tris-HCl pH 7.5
- 5mM MgCl₂
- 1mM DTE

Bacterias DH5 α F competentes se transforman con 1/3-1/2 de cada reacción de ligamiento en las condiciones descritas y se siembran en placas Petri de 10 cm con medio LB con IPTG, X-gal y ampicilina, incubándose 12 h a 37°C.

3.4.6.2 Aislamiento y selección de colonias recombinantes.

Las colonias transformadas con vectores recombinantes son seleccionadas por su coloración blanca, frente a las que incorporan vectores sin inserto, que presentan coloración azul.

Estas colonias se transfieren simultáneamente a dos placas de Petri, una con membrana de nylon (Hybon-N, Amersham) colocada sobre el medio de cultivo LB y otra de medio de cultivo LB con ampicilina, que servirán para la identificación de las colonias que presentan cDNA de HLA-A2 mediante hibridación y para el crecimiento de las colonias, respectivamente.

Tras incubar 12 h a 37°C, la placa normal se guarda a 4°C y la membrana se procesa para su hibridación con la sonda A2 α 2, según el protocolo siguiente (196):

- Desnaturalización en una solución 0.5 N NaOH, 1 M NaCl, 5 min a T. A.
- Neutralización en 1 M Tris-HCl, 3 M NaCl 5 min a T. A.
- Lavado en 2xSSC 5 min a T. A.
- Secado 30 min a T. A.
- Fijación del DNA a la membrana durante 2 h a 80°C.

El filtro con el DNA de las colonias recombinantes es prehibridado 0.5-1 h a 10°C por debajo de la temperatura media de fusión de la sonda en las mismas condiciones descritas para el Southern blot. La hibridación y lavados se realizan en las mismas condiciones, salvo que se utiliza un temperatura de hibridación 10°C por debajo de la T_m.

Las colonias que presentan cDNA de HLA-A2 se crecen en 1 ml de medio LB y se congelan a -70°C en 7% DMSO. Algunas de ellas se crecen en 10 ml de medio LB con ampicilina para el aislamiento y subclonaje del vector.

3.4.7 Subclonaje en M13mp18 del cDNA de A2 clonado en pUC.

Para facilitar la secuenciación del DNA codificante de A2, el material clonado en pUC y que hibridaba con la sonda específica de HLA-A2, se subclonó en la forma replicativa del fago M13mp18, que al infectar bacterias XL1-blue libera al medio un DNA monocatenario fácilmente aislable y de alta pureza que permite su secuenciación.

3.4.7.1 Aislamiento y subclonaje en M13 del DNA de A2 introducido en pUC.

Plásmidos recombinantes que contienen cDNA de HLA-A2 son aislados por minipreparaciones, según el método descrito. Mediante digestión con Eco RI y Hind III y electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión, se genera una banda de 1.1 kb correspondiente al DNA de HLA-A2 clonado, que se aísla por el método de GeneClean.

Cantidades variables de este DNA se ligan con 200 ng de M13mp18 RF tratado con Eco RI y Hind III en las mismas condiciones que para el clonaje en pUC, procediéndose a la

transformación de bacterias XL1-blue competentes con 1/3-1/2 de la mezcla de ligamiento. Mediante plaqueo en "top agar" con X-gal, IPTG y tetraciclina, e incubando 8 h a 37°C, se obtiene un cesped bacteriano con placas de lisis generadas por el fago.

3.4.7.2 Aislamiento y crecimiento de M13 recombinante.

La presencia de X-gal e IPTG permite la selección de fago recombinante por la ausencia de color en las placas de lisis. El agar de estas zonas se recoge con pipetas Pasteur estériles y se deposita en tubos Eppendorf con 0.5-1 ml de medio 2xYT, permitiendo la difusión del fago durante 30-60 min a T. A, tras lo cual se guarda a 4°C, donde M13 es estable por tiempo indefinido.

Para el crecimiento del fago se cultivan 50 µl de la dilución de fago en 5 ml de 2xYT con tetraciclina al que se le añaden 200 µl de un cultivo XL1-blue durante 6-8 h a 37°C. Las bacterias se precipitan por centrifugación a 1000 g durante 5 min y el sobrenadante con el fago se guarda a 4°C para su posterior uso.

3.4.8 Secuenciación de M13-A2.

3.4.8.1 Aislamiento de DNA de M13-A2 monocatenario.

1.2 ml de fago obtenido como se detalla anteriormente, se centrifugan 5 min a 11600 g para eliminar las bacteria presentes. El sobrenadante se vuelve a centrifugar, recogándose el nuevo sobrenadante con cuidado para evitar la contaminación bacteriana.

A continuación se añaden 250 µl de PEG 6000 al 20%, 2.5 M NaCl y se incuba 30 min a 0-4°C, precipitándose el DNA monocatenario por centrifugación de 5 min a 11600 g a T. A. Se retira el sobrenadante con cuidado, centrifugándose nuevamente durante 10 seg para permitir la retirada total de líquido.

Al precipitado de DNA se añaden 100 µl de una solución 20 mM Tris-HCl pH 7.2, 0.2 M NaCl, 1 mM EDTA (o 100 µl de TE) y se extrae con 100 µl de fenol, agitando en vortex 1 min y permitiendo la separación de fases durante 15 min a T. A. Se centrifugan 5 min a 11600 g y se vuelve a extraer la fase acuosa con 100 µl de cloroformo, precipitándose el DNA con acetato sódico y etanol. El precipitado se lava con 100 µl de etanol al 90% y se disuelve en 10 µl de agua bides.ílada, quedando listo para su secuenciación.

3.4.8.2 Reacciones de secuenciación.

La secuenciación del M13-A2 monocatenario se realizó por el método de dideoxi (197), utilizando el kit de Sequenasa (U.S.B.) y los oligonucleótidos descritos:

1- Hibridación de la mezcla:

- 7 μ l de DNA de M13-A2
- 2 μ l de tampón de secuencia (200 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM MgCl₂, 250 mM NaCl)
- 1 μ l de oligonucleótido iniciador 0.5-2 μ M

Se calienta durante 2 min a 65°C y se deja enfriar lentamente hasta menos de 35°C para permitir la hibridación del iniciador.

2- Reacción de marcajes:

A la mezcla de hibridación se añaden:

- 1ul DTT 0.1 M
- 2ul mezcla de marcaje (1.5 μ M dGTP, 1.5 μ M dCTP, 1.5 μ M dTTP)
- 0.5 μ l ³²S-dATP (actividad específica 1000Ci/mmol)
- 2 μ l Sequenasa diluida (3 U de Sequenasa en 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM DTT

0.05% BSA)

Se realiza la reacción de marcaje a T.A. durante 2-5 min.

3- Reacción de terminación:

A 4 tubos conteniendo cada uno 2.5 μ l de una mezcla de terminación (solución 80 μ M de cada dNTP, 50 mM NaCl y 8 μ M del ddNTP correspondiente) se les añaden 3.5 μ l de la reacción de marcaje y se incuban durante 5 min a 37°C. La reacción se para añadiendo 4 μ l de una solución de parada que contiene 95% formamida, 20 mM EDTA, 0.05% azul de bromofenol y 0.05% xilencianol.

La reacción de secuencia puede guardarse a 0-4°C hasta su carga.

Para resolver compresiones en el gel de secuencia, se realizan secuencias con dITP, en las que la mezcla de marcaje es 3 μ M dITP, 1.5 μ M dCTP, 1.5 μ M dTTP y las mezclas de terminación son 160 μ M dITP, 80 μ M dATP, 80 μ M dCTP, 80 μ M dTTP, 50 mM NaCl y 8 μ M del ddNTP correspondiente.

3.4.8.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida para secuencia.

Las electroforesis se realizan en geles de poliacrilamida de 0.4 mm de espesor y 40 cm de

longitud, compuestos de:

- 42% urea
- TBE (0.09 M Tris-borato, 0.002 M EDTA)
- 8% acrilamida
- 0.05% persulfato amónico
- 0.03% TEMED

La electroforesis se realiza a potencia constante de 45 W, dando un voltaje de 1500-2000 V y una intensidad de 35 mA en tampón TBE.

Una vez realizada la electroforesis, el gel se seca sobre papel Whatman 3M al vacío a 80°C y se autoradiografía en películas X-Omat de Kodak.

4. RESULTADOS

4-RESULTADOS

4.1 CARACTERIZACION BIOQUIMICA DEL ANTIGENO HLA-A*0209 EXPRESADO EN LA LINEA OZB.

Mediante la combinación de IEF y de estudios de reactividad de CTLs alogénicos se comprobó la existencia de 4 subtipos de HLA-A2: A2.1, A2.2, A2.3 y A2.4. Los tres primeros son distinguibles mediante IEF, siendo A2.2 una unidad de carga más básico que A2.1, y A2.3 una unidad de carga más ácido. A2.4 presenta el mismo punto isoeléctrico que A2.1.

En el mismo estudio que definió estos subtipos (109), se detectó la existencia de una variante del antígeno HLA-A2 que no se ajustaba a este patrón de correlación entre pI y reactividad frente a CTLs. PBLs del individuo portador de esta variante (OZB) eran reconocidos como A2.1⁺ por CTLs específicos de este subtipo, pero presentaba un pI una unidad de carga más ácida, idéntico al del subtipo A2.3. En esta primera parte de la tesis hemos analizado esta variante de A2 con el objeto de definir los cambios estructurales que determinan las características funcionales y bioquímicas descritas.

La estrategia seguida para el análisis de la variante HLA-A2 expresada en la línea OZB, fue la del mapeo peptídico comparativo con el antígeno A*0201 expresado en la línea JY, cuya secuencia es conocida (86).

*4.1.1 Localización de un único péptido de diferencia entre las moléculas A2-OZB (A*0209) y A*0201 en el dominio $\alpha 3$.*

La comparación entre los antígenos A2-OZB y A*0201, se realizó mediante mapeo peptídico comparativo con los aminoácidos Tyr, His, Lys, Pro, Leu y Ala, que cubren todos los péptidos trípticos de la porción extracelular del antígeno HLA-A2.

Los mapas de Tyr e His muestran la identidad de todos los péptidos que contienen estos aminoácidos (fig. 4.1.1.A y B). Los mapas de Leu (fig. 4.1.2.A), Lys (fig. 4.1.3.A) y Pro (fig. 4.1.3.B) muestran la presencia de un pico de diferencia de ^3H (picos L3, K5 y P5, respectivamente) y un pico de diferencia de ^{14}C (picos L4, K6 y P6, respectivamente), que eluyen en posiciones análogas en los tres mapas (fracciones 68-70 para el pico de diferencia de ^3H y 74-76 para el de ^{14}C). El mapa de Ala presenta un único pico de diferencia de ^{14}C (A5) que eluye en la posición 76, pero carece de pico de diferencia de ^3H (fig. 4.1.4).

El pico de diferencia de ^3H L3, que contenía también radioactividad de ^{14}C , fue purificado en gradiente de TFA, mostrando la presencia de un único pico de diferencia de ^3H . L3.2, y un pico

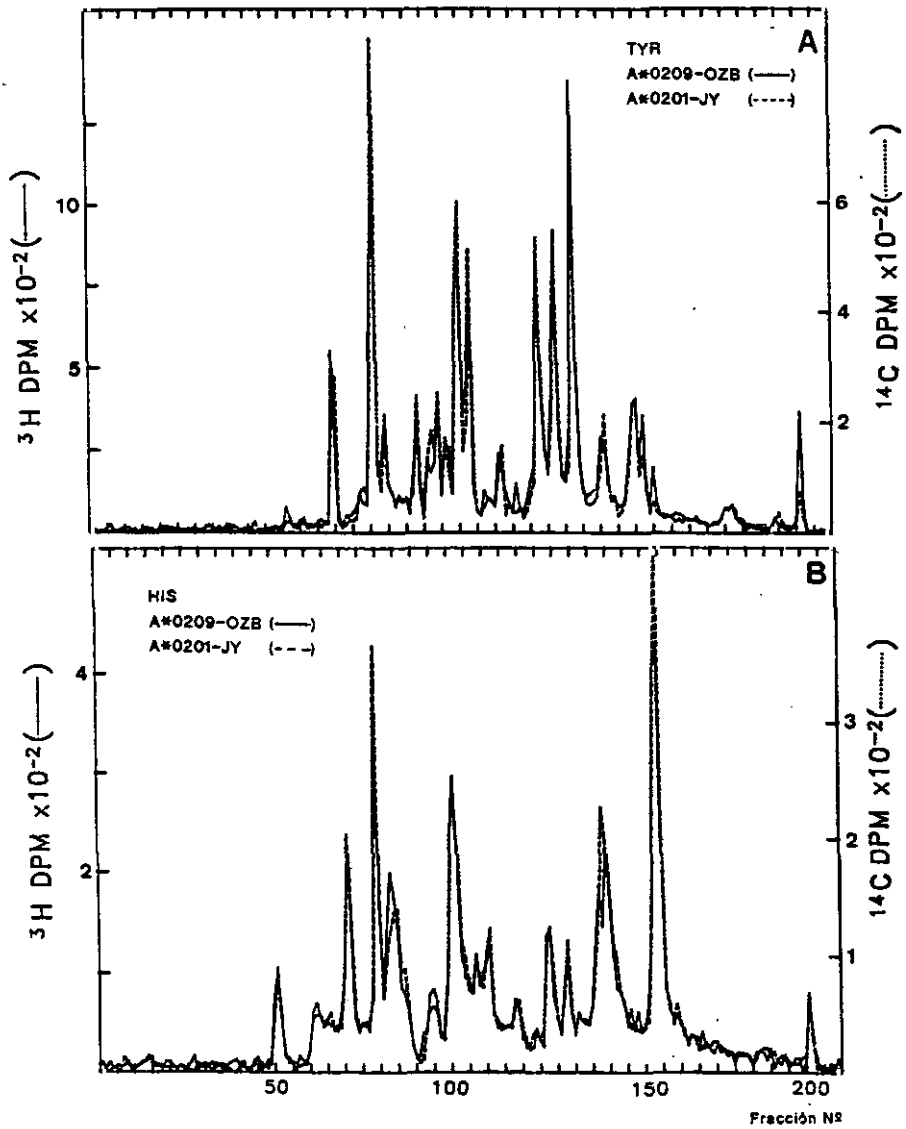


Figura 4.1.1- Mapas trípticos comparativos entre los antígenos A2-OZB y A*0201 correspondientes al marcaje con Tyr (A) e His (B).

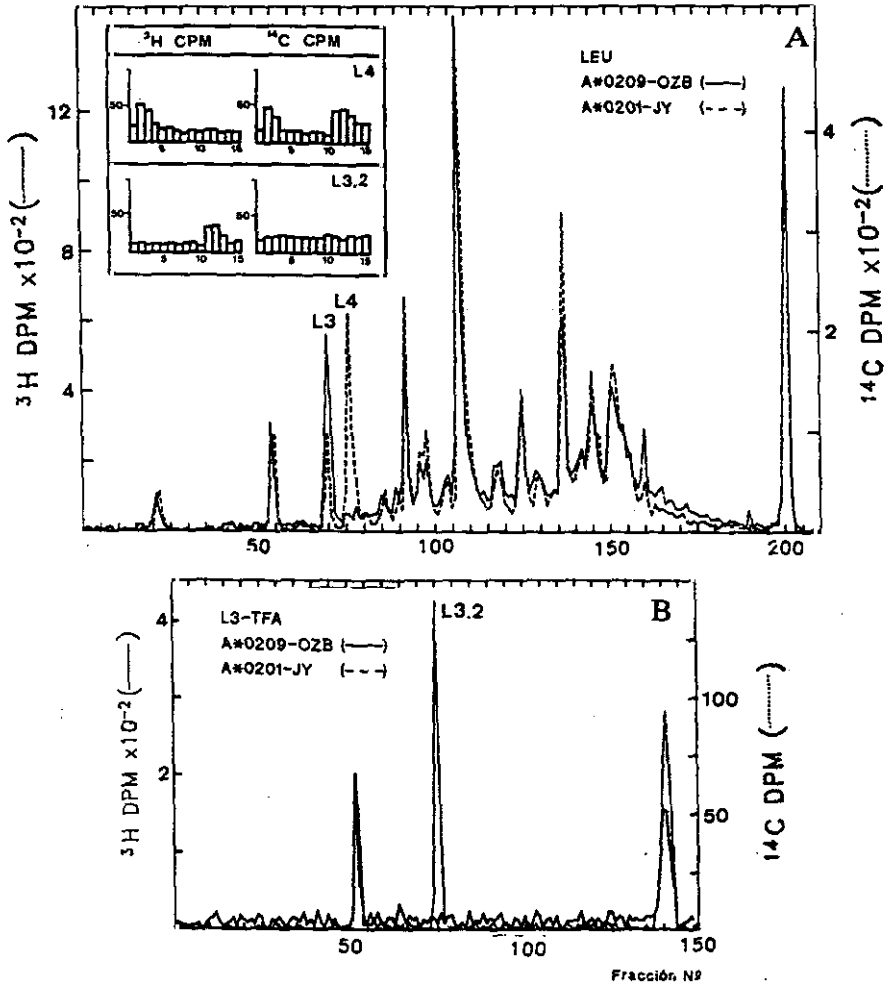


Figura 4.1.2- A) Mapa tripartito comparativo entre los antígenos A2-OZB y A*0201 correspondiente al marcaje con Leu. Incluye la secuencia radioquímica de los picos L4 y L3.2. B) Purificación en gradiente de TFA del péptido L3.

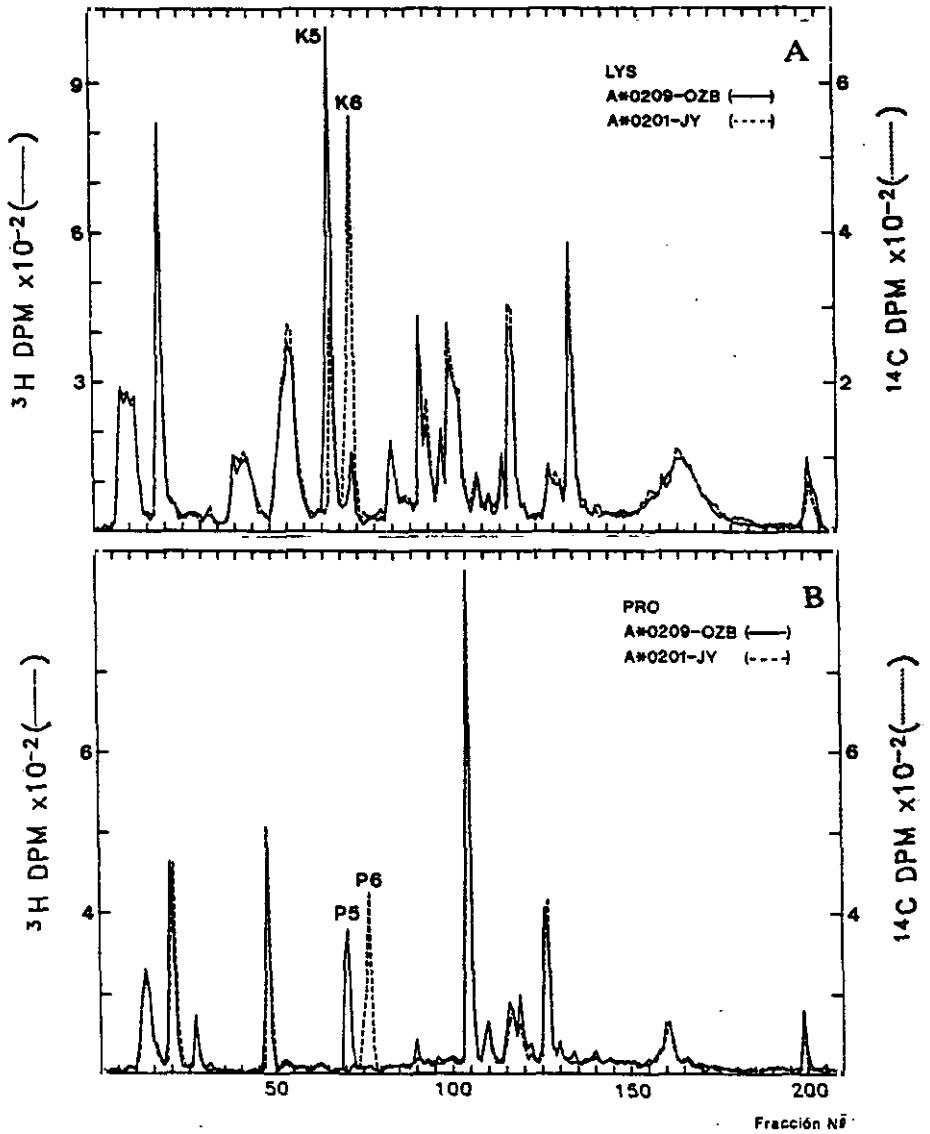


Figura 4.1.3- Mapas tríplicos comparativos entre los antígenos A2-OZB y A*0201 correspondientes a los marjajes con Lys (A) y Pro (B).

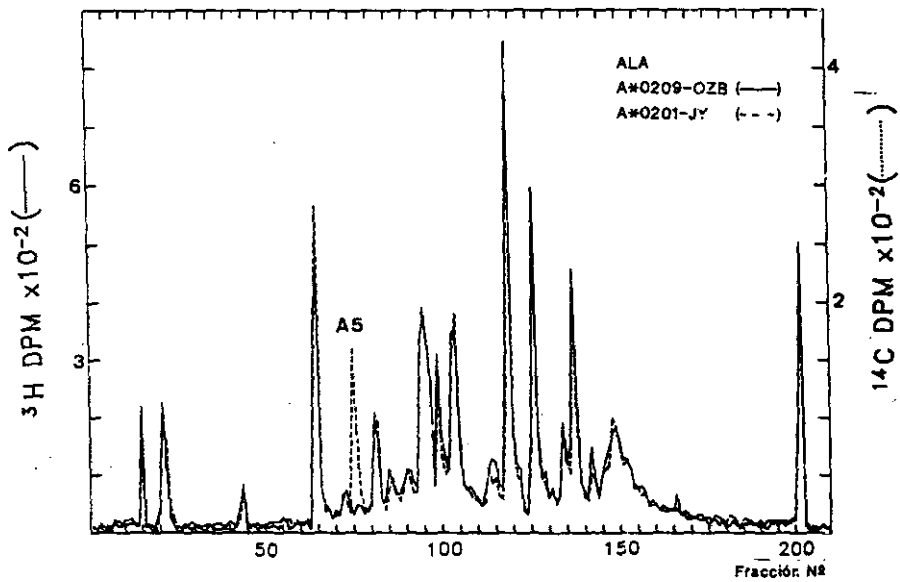


Figura 4.1.4- Mapa triptico comparativo entre los antigenos A2-OZB y A*0201 correspondiente al marcaje con Ala.

idéntico que coeluye en el mapa de Leu (fig. 4.1.2.B).

Estos datos indican la existencia de un único péptido de diferencia entre las dos moléculas, que contiene Leu, Lys y Pro, pero que no contiene His ni Tyr. La ausencia de un pico de diferencia de ^3H en el mapa de Ala, indica que este péptido contiene Ala en la molécula de A*0201, pero no en la de A2-OZB, que habría sido sustituida por otro aminoácido.

La secuencia radioquímica de los picos L3.2 y L4 indica que el péptido de diferencia contiene Leu en la posición 11 (fig. 4.1.2.A). El pico L4 presenta, además, radioactividad de ^3H y ^{14}C en el ciclo 2, debido a la presencia de un péptido idéntico contaminante, pues no existe ningún péptido tríptico de la molécula de A2 que tenga Leu en las posiciones 2 y 11 (tabla IV). El único péptido tríptico que presenta Leu en la posición 11 es el que cubre los residuos 220-243 (DGEDQTQDTELVETRPAGDGTQK), que contiene residuos de Pro, Lys y Ala, pero no de Tyr ni His. Por tanto, el único péptido de diferencia entre los antígenos A2-OZB y A*0201 es el péptido 220-243 que se localiza en el dominio $\alpha 3$. La ausencia de un pico de diferencia de ^3H en el mapa de Ala indica, además, que en la molécula A2-OZB debe haber al menos un cambio, localizado en el residuo 236 (Ala en A*0201).

4.1.2 Delimitación de la región de diferencia al péptido 233-243.

El análisis radioquímico de la estructura primaria del péptido 220-243 requiere, dado su gran tamaño, la fragmentación en péptidos menores que posibilite la secuenciación radioquímica del péptido marcado con los distintos aminoácidos. Dada la presencia de un enlace parcialmente resistente a la hidrólisis tríptica en la molécula de A*0201 ($\text{Arg}_{236}\text{-Pro}_{235}$), se intentó su ruptura en condiciones más drásticas de reacción. Puesto que el péptido 220-243 contiene 4 residuos de Thr distribuidos a ambos lados del enlace, se realizó el mapa correspondiente a este aminoácido con el objeto de delimitar la zona de diferencia entre los dos antígenos.

Como se esperaba, los únicos picos de diferencia presentes en el mapa de Thr, T4 y T5, son los que corresponden a los péptidos 220-243 de las moléculas A2-OZB y A*0201 (fig. 4.1.5). Ambos picos fueron recogidos y digeridos conjuntamente con tripsina a una relación enzima/sustrato de 1:5 y recromatografiados (fig. 4.1.6.A). En el cromatograma se observa una digestión parcial del péptido de ^{14}C correspondiente a A*0201, pero no del péptido variante. La digestión a una relación enzima/sustrato de 1:1 revela la total hidrólisis de enlace $\text{Arg}_{236}\text{-Pro}_{235}$ de A*0201, pero la absoluta resistencia a la misma de la molécula variante (fig. 4.1.6.B). Realizamos entonces una digestión con clostripaina, enzima que presenta especificidad de hidrólisis del enlace

Tabla IV. Péptidos tripticos de la molécula de HLA-A2*.

¹ GSHSMR ⁴
⁷ YFFTSVSR ¹⁴ .PGR ¹⁷
¹⁴ GEPR ²¹
²² FLAVGYVDDTQFVR ²⁵
²⁶ FSDAASQR ⁴⁴
⁴⁵ MEPR ⁴⁸
⁴⁹ APWIEQEGPEYWDGETR ⁶⁵
⁶⁶ KVK ⁶⁸
⁶⁹ AHSQTHR ⁷³
⁷⁶ VDLGTLR ⁸²
⁸³ GYNQSEAGSHTVQR ⁸⁷
⁹⁶ MYGCDVGS DWR ¹⁰⁸
¹⁰⁹ FLR ¹¹¹
¹¹² GYHQYAYDGK ¹²¹
¹²² DYIALK ¹²⁷ . ¹²⁸ EDLR ¹³¹
¹³² SWTAADMAAQITK ¹⁴⁴
¹⁴³ HK ¹⁴⁶ . ¹⁴⁷ WEAAHVAEQLR ¹⁵⁷
¹⁵⁸ AYLEGTCVEWLR ¹⁶⁹ .R ¹⁷⁰
¹⁷¹ YLENGK ¹⁷⁶
¹⁷⁷ ETLQR ¹⁸¹
¹⁸² TDAPK ¹⁸⁶
¹⁸⁷ THMTHHAVSDHEATLR ²⁰²
²⁰³ CWALGFYPAEITLTWQR ²¹⁹
²²⁰ DGEDQTQDTELVETR ²²⁴ . ²²⁵ PAGDGTFEK ²⁴³
²⁴⁴ WAAWVVPSPGQEQR ²⁵⁶
²⁵⁷ YTCHVQHEGLPK ²⁶⁸ . ²⁶⁹ PLTLR ²⁷³

*) Se indica la posición de ruptura posible con tripsina y el péptido de mayor rendimiento (en cada línea) en aquellas localizaciones donde se produce ruptura parcial.

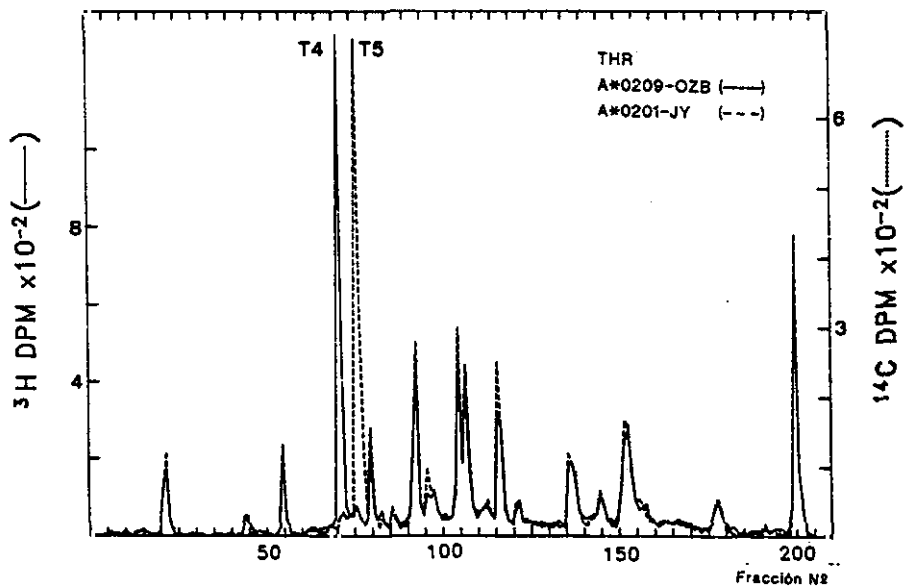


Figura 4.1.5- Mapa triptico comparativo entre los antigenos A2-OZB y A*0201 correspondiente al marcaje con Thr.

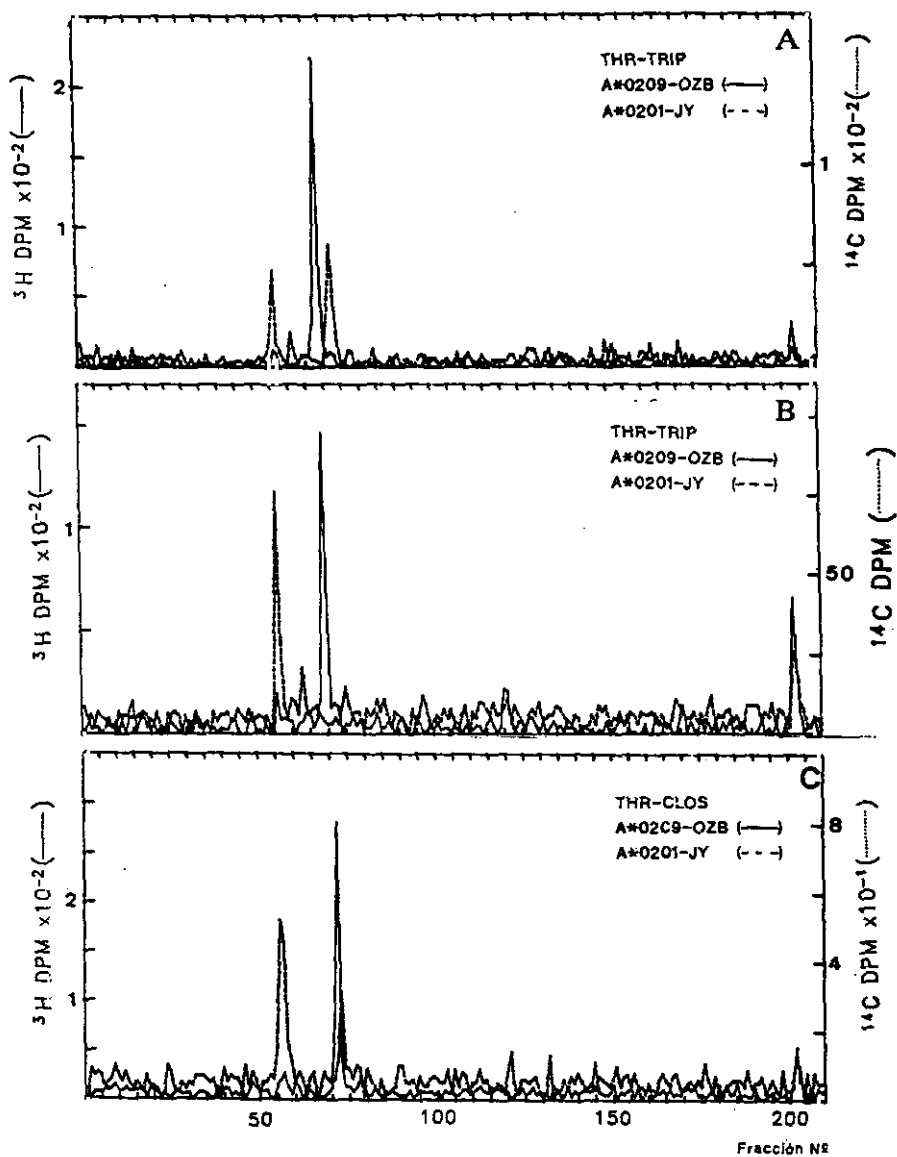


Figura 4.1.6- Cromatograma correspondiente a la digestión trípica de los picos T4 y T5 del mapa de Thr a relación enzima/sustrato de 1:5 (A) y 1:1 (B). C) Cromatograma correspondiente a la digestión con clostripaina una relación enzima/sustrato de 1:20 de los picos T4 y T5 del mapa de Thr.

peptídico del extremo C-carboxilo de la Arg (187), obteniéndose el mismo resultado (fig. 4.1.6.C). Estos resultados demuestran que los cambios en la molécula de A2-OZB aumentan la resistencia a la hidrólisis del enlace Arg₁₈₇-Pro₁₈₈ que no puede ser procesado por las endopeptidasas específicas de residuos básicos en las condiciones más drásticas.

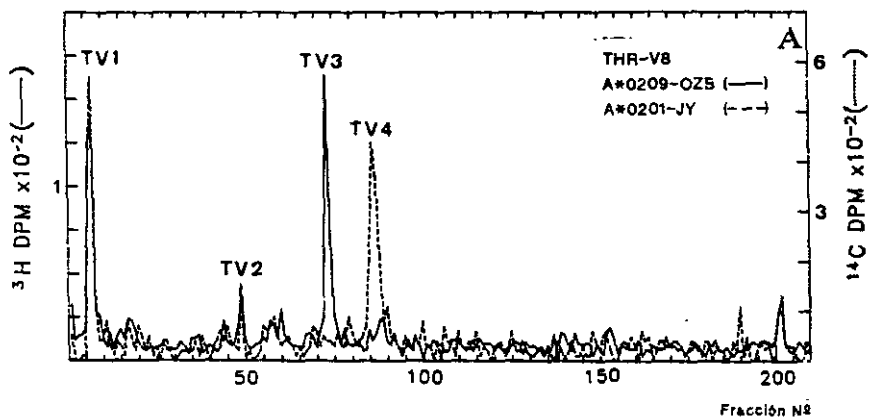
Diseñamos entonces una estrategia basada en el procesamiento del péptido 220-243 con la proteasa V8 de Staphilococcus Aureus, que hidroliza enlaces peptídicos en los extremos C-carboxílicos de residuos de Glu, y en condiciones especiales o más drásticas de reacción, los de Asp (188, 189).

La digestión conjunta de los picos T4 y T5 con V8 generó 2 picos idénticos (TV1 y TV2), un pico de diferencia de ³H (TV3) y otro de ¹⁴C (TV4) (fig. 4.1.7.A). Las secuencias radioquímicas que se representan en la fig. 4.1.7.B muestran la presencia de Thr en las posiciones 3 y 6 de los picos TV1 y TV2, lo que indica que corresponden a péptidos idénticos en ambas moléculas que comienzan en la posición 223. Las secuencias de los picos TV3 y TV4 muestran la presencia en los ciclos 1 y 8 de radioactividad de ³H y ¹⁴C respectivamente, indicando que corresponden a los péptidos 233-243 de A2-OZB y A*0201, respectivamente (TRPAGDGTFFQK en A*0201).

A continuación se obtuvo el mapa triptico de Val (fig 4.1.8.A), aislándose los dos picos de diferencia V4 y V5, que fueron sometidos a digestión con V8. El cromatograma correspondiente muestra la presencia de dos picos idénticos, VV1 y VV2 (fig. 4.1.8.B). La secuencia del pico VV1 demostró la existencia de Val en la posición 2, que corresponde al péptido 230-232 (LVE), no detectado en el marcaje con Thr por carecer de este aminoácido. VV2, en cambio, que eluye en la misma posición que TV2, exhibe radioactividad en el ciclo 9, correspondiente al péptido 223-232 (DQTQDTELVE) generado por ruptura parcial del enlace Glu₂₂₃-Leu₂₂₁. Por tanto, el pico TV2 corresponde, análogamente, al péptido 223-232, mientras que TV1 constituye el pico del péptido 223-229.

Los péptidos de Thr y Val generados por el tratamiento con V8 cubren todo el péptido triptico de diferencia 220-243, excepto el tripéptido 220-222 (DGE), mostrando que el segmento 223-232 es idéntico en los 2 antígenos comparados.

Para completar el análisis de todos los péptidos generados por V8 a partir del péptido triptico 220-243, se repitió esta estrategia tras el marcaje con Asp. Debido al bajo nivel de incorporación metabólica de este aminoácido, no fue posible realizar el mapa triptico comparativo, sino que los dos antígenos fueron marcados con ³H-Asp, digeridos con tripsina y cromatografiados separadamente (fig. 4.1.9. A y B). Los picos D5 de ambos mapas fueron digeridos con V8 y



B

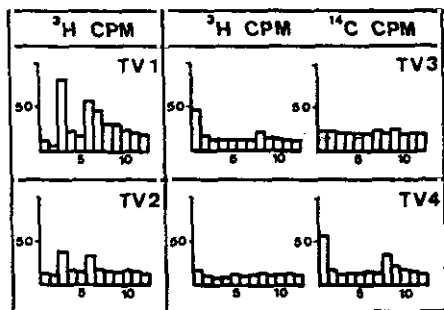


Figura 4.1.7- A) Cromatograma correspondiente a la digestión con V8 de los picos T4 y T5 del mapa de Thr. B) Secuencia radioquímica de los picos TV1, TV2, TV3 y TV4. Se representa la radioactividad detectada frente al ciclo de la secuencia.

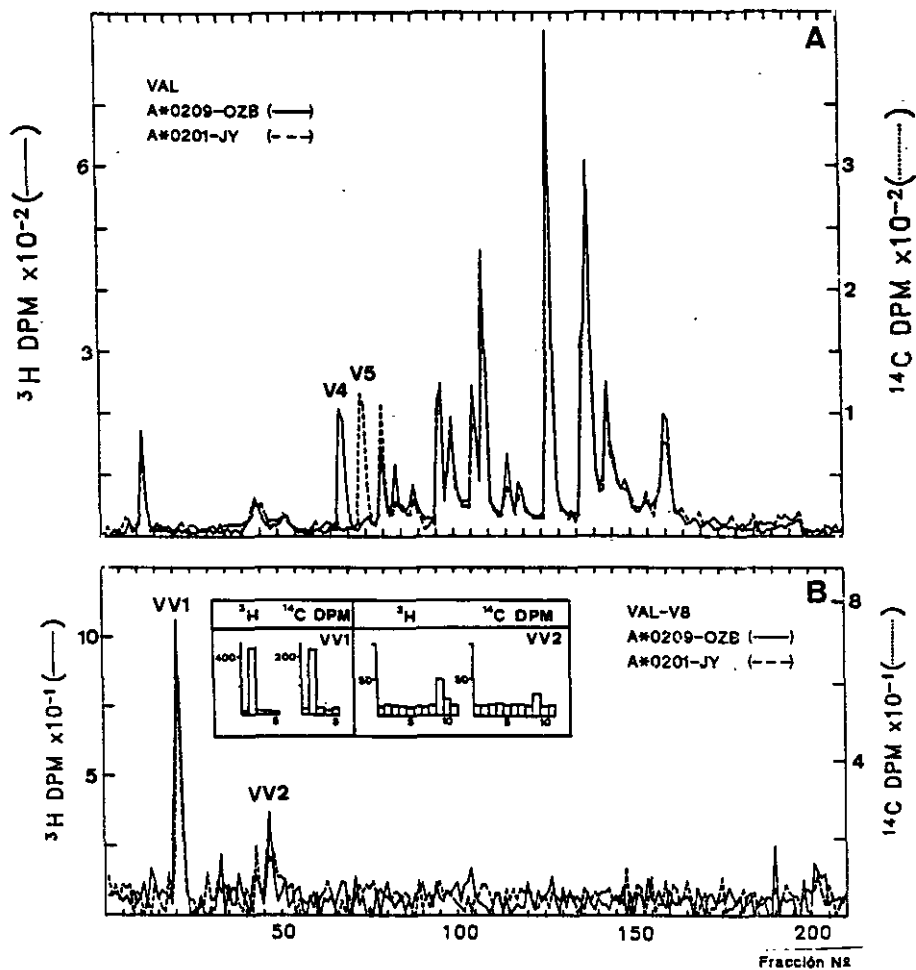


Figura 4.1.8- A) Mapa tríptico comparativo entre los antígenos A2-OZB y A*0201 correspondiente al marcaje con Val. B) Cromatograma correspondiente a la digestión con V8 de los picos V4 y V5. Incluye la secuencia radioquímica de los picos VV1 y VV2.

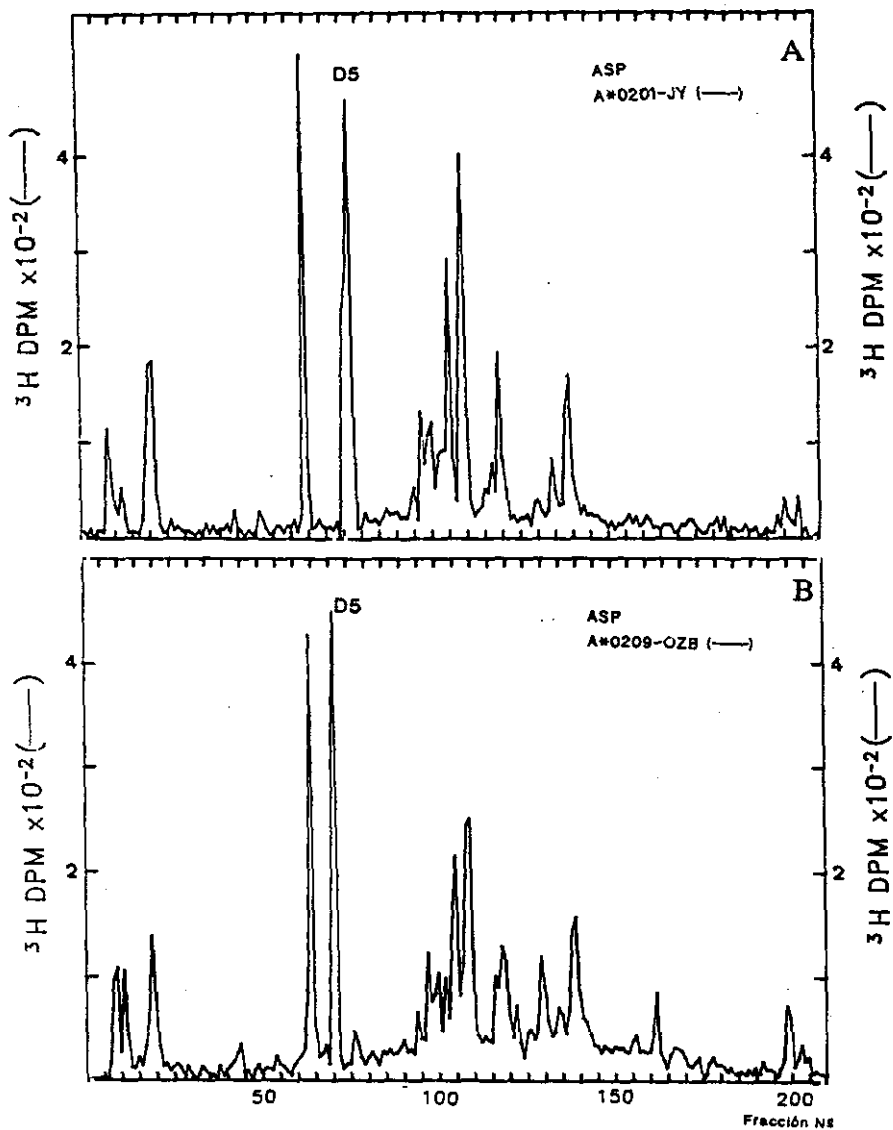


Figura 4.1.9.- Mapa triptico correspondiente al marcaje con Asp del antígeno A*0201 (A) y A2-OZB (B).

recromatografiados separadamente. La fig. 4.1.10.A muestra la representación superpuesta de los dos cromatogramas, en la que se observa la existencia de 2 picos idénticos, DV1 y DV2, y los 2 picos de diferencia correspondientes a los péptidos 233-243 de A2-OZB (DV3) y A*0201 (DV4). Puesto que el Asp está presente en el tripéptido 220-222, no mapeado hasta el momento, y no se había detectado ningún pico nuevo, era previsible que este péptido coeluyese con alguno de los péptidos ya cubiertos. Al ser un péptido de pequeño tamaño y con 4 cargas netas, debía interaccionar mínimamente con el soporte cromatográfico utilizado, por lo que sospechamos debía estar presente en el pico DV1. Por ello, los picos DV1 de las dos moléculas fueron fraccionados en gradiente de TFA separadamente, obteniéndose 4 picos. La representación conjunta de los dos fraccionamientos muestra la identidad de los 4 picos en las dos moléculas comparadas (fig. 4.1.10.B). La secuenciación de los picos mas sobresalientes, DV1.1 y DV1.3, mostró la presencia de radioactividad en el ciclo 1 y en los ciclos 1 y 5, respectivamente, correspondiente a los péptidos 220-222 (DGE) y 223-229 (DQTQDTE), respectivamente. El resto de los picos no fue analizado. La multiplicidad de picos se debe, probablemente, a rupturas parciales en los enlaces de Asp, que también son sensibles a la hidrólisis por V8, aunque su ruptura total requiere otras condiciones de reacción. DV2, que eluye en la misma posición que TV2 y VV2, presenta, así mismo, radioactividad en los ciclos 1 y 5, correspondiente al péptido 223-232, obtenido por ruptura parcial. El pico DV3, equivalente a TV3, presenta Asp en la posición 6, confirmando la presencia de este aminoácido en el péptido 233-243 de A2-OZB.

De todos los datos expuestos, se deduce que el único péptido de diferencia entre los antígenos HLA-A2 expresados en las líneas OZB y JY, es el que cubre los residuos 233-243.

4.1.3 Identificación de un único cambio de Ala → Glu en la posición 236 de la variante A2-OZB (A*0209).

De los datos expuestos hasta el momento se deduce que la molécula de A2-OZB se diferencia de A*0201 únicamente en el péptido 233-243, existiendo al menos un cambio en la posición 236. Además, puesto que A2-OZB es una unidad de carga más ácida, y teniendo en cuenta la total resistencia a la hidrólisis del enlace Arg₂₃₄-Pro₂₃₅, se sospechó la existencia de un cambio de la Ala₂₃₆ a un residuo de Glu (hemos visto como el Asp no está presente en esa posición del pico DV3) o bien un cambio adicional en la Arg₂₃₄.

Para analizar la primera posibilidad, realizamos el marcaje con Gln, que sufre interconversión metabólica a Glu (185), suplementada con 300 μ Ci de 3 H-Glu en el caso de OZB.

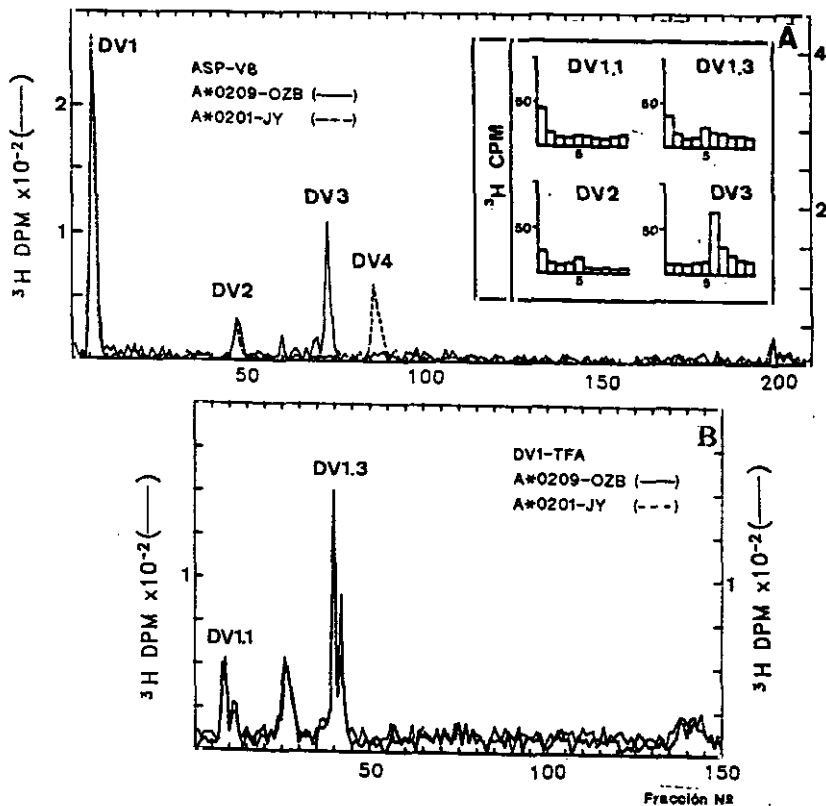


Figura 4.1.10- A) Representación superpuesta de los cromatogramas correspondientes a las digestiones proteolíticas con V8 de los picos V5 obtenidos en los mapas de Asp de los antígenos A2-OZB y A*0201. Incluye la secuencia radioquímica de los picos DV1.1, DV1.3, DV2 y DV3. B) Representación superpuesta de las purificaciones en gradiente de TFA de los picos DV1 de los mapas de la figura A.

Del mapa correspondiente (fig. 4.1.11.A), los picos Q7 y Q8 fueron tratados conjuntamente con V8 y recromatografiados. Se obtuvieron 3 picos idénticos (QV1, QV2 y QV3), un pico de diferencia de ^3H , QV4, y un pico de diferencia de ^{14}C , QV5 (fig. 4.1.11.B). Análogamente al pico DV1, QV1 fue fraccionado en TFA, obteniéndose 5 picos idénticos (fig. 4.1.11.C), de los cuales fueron secuenciados los picos principales. QV1.1, equivalente en su posición de elución a DV1.3, liberaba radioactividad en los ciclos 2, 4 y 7, indicando que se trataba del péptido 223-229 (DQTQDTE). El bajo nivel de radioactividad del ciclo 7 indica la presencia de un residuo de Glu, que incorpora mucha menor radioactividad que la Gln. QV1.2 estaba marcado en las posiciones 3, 5 y 7, con menor radioactividad en el ciclo 3, lo que indica la presencia de Glu. Por tanto, QV1.2 corresponde al péptido 220-229 (DGEDQTQDTE) generado por la hidrólisis parcial del enlace $\text{Glu}_{222}\text{-Asp}_{223}$. Los picos minoritarios observados, deben generarse en la ruptura parcial de los enlaces de Asp, como ya hemos comentado.

El pico QV2, que eluye en la misma posición que VV1, presenta radioactividad en el ciclo 3 de la secuencia, por lo que se trata del péptido 230-232 (LVE). QV3, por tratarse de un péptido parcial de bajo rendimiento, no pudo ser secuenciado. Los picos de diferencia QV4 y QV5, que eluyen en posiciones equivalentes a TV3 o DV3 y TV4 o DV4, respectivamente, corresponden a los péptidos 233-243 de A2-OZB y A*0201 (TRPAGDGTFQK). La secuencia de QV4 muestra radioactividad en los ciclos 4 y 10. La liberación de radioactividad en el ciclo 10 indica la presencia de la Gln_{236} en el péptido de A2-OZB. La cantidad de radioactividad liberada en el ciclo 4 revela que este residuo está mucho menos marcado que el de la posición 10, pues de lo contrario, el rendimiento repetitivo en cada ciclo de secuenciación habría sido del 97%, cuando el valor medio obtenido habitualmente se sitúa en el 88%. Además, el péptido termina en la posición 11 con un residuo de Lys, que induce la pérdida en los lavados de los péptidos cortos, disminuyendo notablemente el rendimiento aparente de la reacción de Edman (185). Por tanto, al igual que en las posiciones 3 y 7 de los picos QV1.2 y QV1.1 respectivamente, se asignó un residuo de Glu en la posición 4 del péptido. Esto indica la sustitución de Ala por Glu en la posición 236 de la molécula de A2-OZB.

Para completar la secuencia del péptido de diferencia 220-243 de la variante OZB, se realizaron los marcajes con Phe, Ser y Arg. El mapa de Phe se realizó, análogamente al caso de Asp, mediante marcaje con ^3H -Phe de las líneas JY y OZB y el procesamiento separado de los antígenos A2, representándose conjuntamente el mapa tríptico obtenido en cada caso (fig. 4.1.12.A). Los picos de diferencia de cada mapa (F2 y F3 en la representación conjunta) fueron

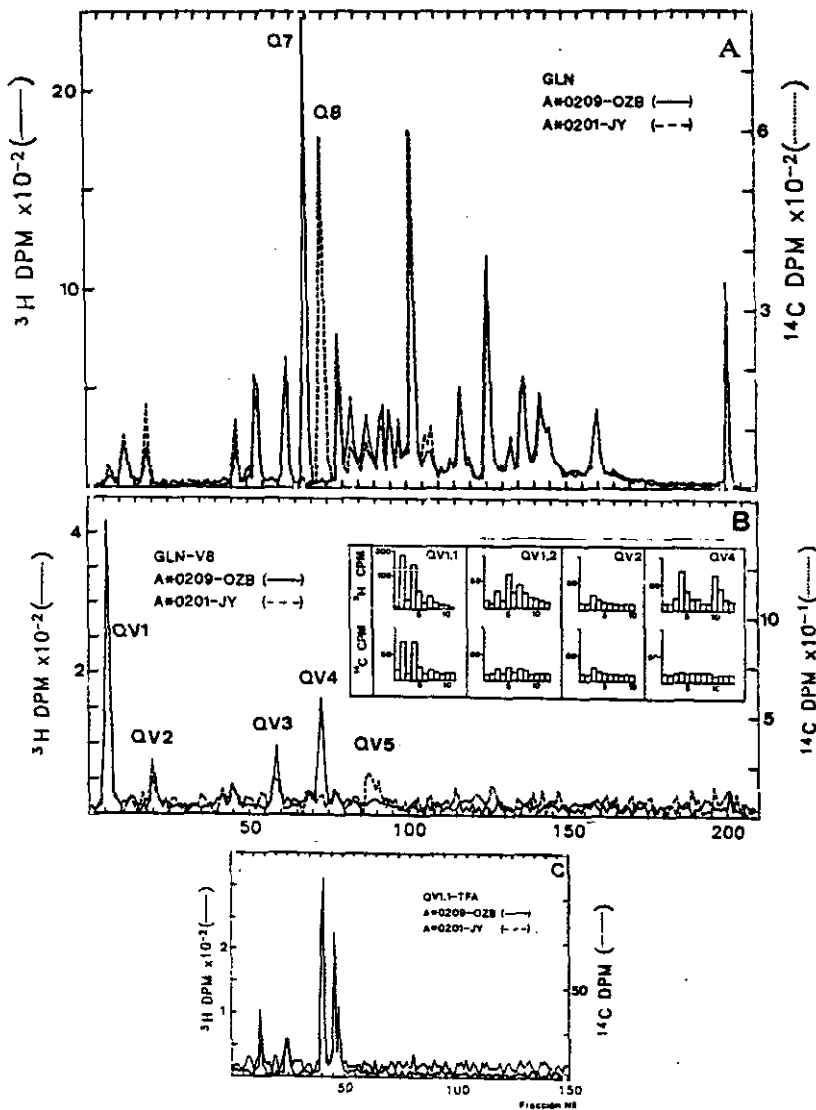


Figura 4.1.11- A) Mapa triptico comparativo entre los antígenos A2-OZB y A*0201 correspondiente al marcaje con Gln. B) Cromatograma correspondiente a la digestión con V8 de los picos Q7 y Q8. Incluye la secuencia radioquímica de los picos QV1.1, QV1.2, QV2 y QV3. C) Purificación en gradiente de TFA del pico QV1.

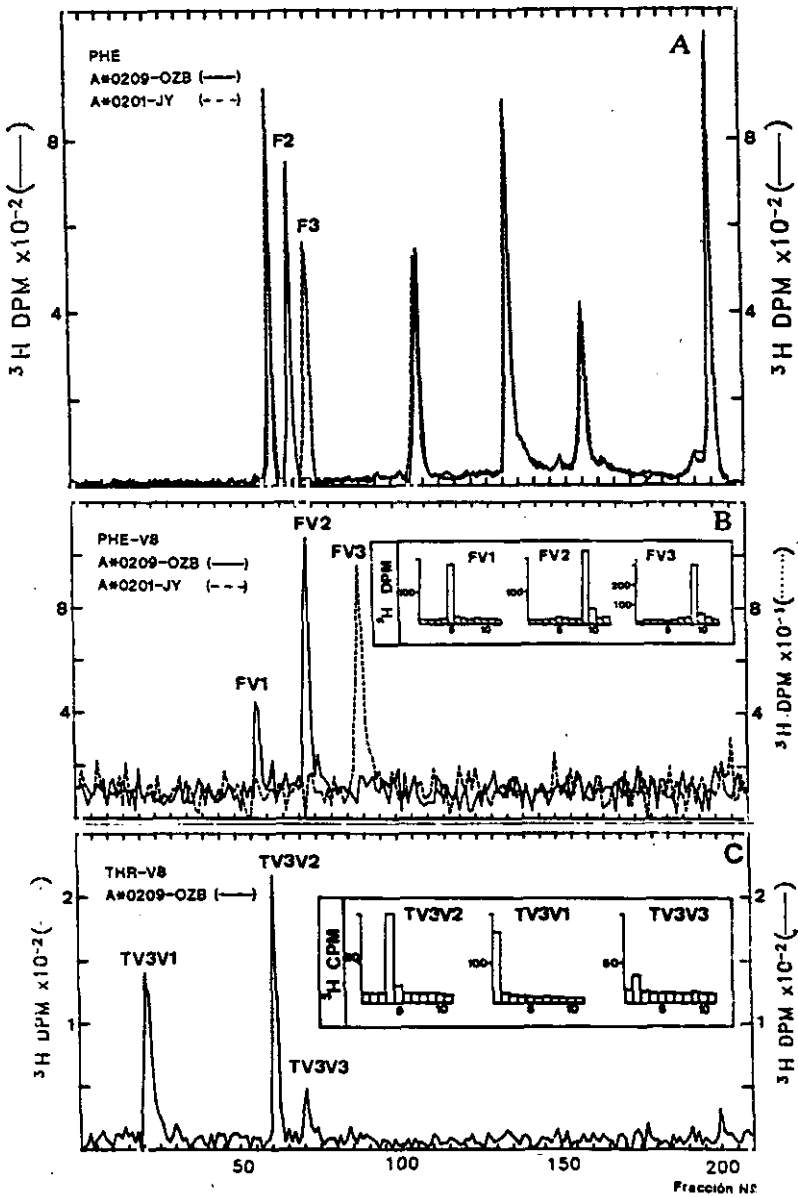


Figura 4.1.12- A) Representación superpuesta de los mapas tríplicos correspondientes a los antígenos A2-OZB y A*0201 marcados con Phe. B) Representación superpuesta de los cromatogramas correspondientes a las digestiones con V8 de los picos F2 y F3 de la figura A. Incluye la secuencia radioquímica de los picos FV1, FV2 y FV3. C) Cromatograma correspondiente a la digestión del péptido 220-243 de A2-OZB marcado con Thr, con V8 en condiciones de ruptura drástica. Incluye la secuencia radioquímica de los picos TV3V1, TV3V2 y TV3V3.

digeridos con V8. Como hasta el momento no se había observado nunca la hidrólisis del enlace $\text{Glu}_{236}\text{-Gly}_{237}$ de la variante OZB, tratamos los dos péptidos en condiciones más drásticas, con una tercera adición de V8, para forzar la hidrólisis de dicho enlace. El cromatograma conjunto (fig. 4.1.12.B) muestra la presencia de 2 picos de diferencia de ^3H , debidos a la ruptura parcial del enlace. Así, FV1 presenta radioactividad en el ciclo 5 de su secuencia radioquímica, correspondiente al péptido 237-243 (GDGTFQK), y FV2 en el ciclo 9, correspondiente al péptido 233-243 (TRPEGDGTFQK). El único péptido de diferencia de ^{14}C , FV3, presenta Phe en la posición 9, correspondiente al péptido 233-243 de A*0201 (TRPAGDGTFQK).

Con el objeto de conseguir la ruptura total en el Glu_{236} , se realizó un marcaje de la línea OZB con ^3H -Thr, aislándose el péptido 220-243 del mapa tríptico. El péptido fue digerido con V8 en las condiciones habituales, generándose los mismos picos de ^3H que en la fig. 4.1.8.A. El pico TV3, correspondiente al péptido 233-243, fue entonces tratado con V8 en un tampón 50 mM de fosfato sódico a pH 7.8, en el cual se produce la hidrólisis tanto de los residuos de Glu como de Asp (188). La digestión se realizó con 3 adiciones sucesivas de V8 a una relación enzima/sustrato de 1:5, con periodos de incubación de 12 h. a 37°C . En estas condiciones, conseguimos la ruptura total del enlace $\text{Glu}_{236}\text{-Gly}_{237}$ y la parcial del enlace $\text{Asp}_{238}\text{-Gly}_{239}$, generándose 3 picos (fig. 4.12.C). Así, el pico TV3V1 presenta radioactividad en el ciclo 1, correspondiente al péptido 233-236 (TRPE). El pico TV3V2 presenta Thr en la posición 4, correspondiendo al péptido 237-243 (GDGTFQK). El pico TV3V3 representa la ruptura parcial del enlace 238-239 que genera el péptido 239-243 con Thr en la posición 2 (GTFQK). De esta manera, se confirma la presencia de Glu en la posición 236 de A2-OZB.

El mapeo de los residuos de Gly se realizó aprovechando el alto nivel de interconversión metabólica que sufre la Ser por la pérdida del fragmento monocarbonado, en una reacción catalizada por la enzima serina-hidroximetil-transferasa (198). El nivel de interconversión en estas líneas celulares oscila entre el 30-50% de la serina incorporada (185). Dada la diferente distribución isotópica de los átomos de ^3H y ^{14}C en la molécula de Ser, determinada por la presencia uniforme de ^{14}C en los tres carbonos de la molécula y la presencia de ^3H unido únicamente al CB, sólo se genera Gly radioactiva en el marcaje con ^{14}C -Ser. Por tanto, para localizar las Gly del péptido de diferencia, la línea OZB fue marcada con ^3H -Ser y ^{14}C -Ser, realizándose el mapa comparativo entre los antígenos A2-OZB procedentes de los dos marcajes (fig. 4.1.13.A). El pico de diferencia de ^{14}C , G1, generado por la presencia de Gly en el péptido 220-243 y la ausencia de Ser, fue aislado y digerido con V8, obteniéndose 2 picos (fig. 4.1.13.B).

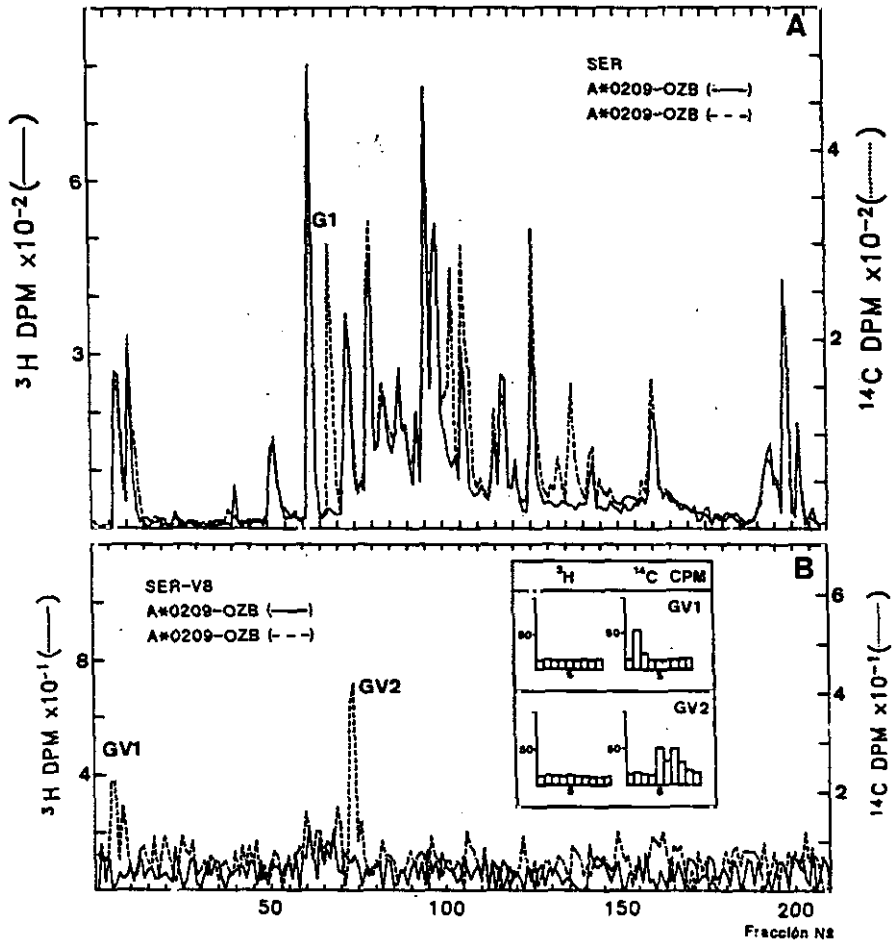


Figura 4.1.13- A) Mapa triptico comparativo entre el antigeno A2-OZB marcado con ^3H -Ser y el marcado con ^{14}C -Ser. B) Cromatograma correspondiente a la digestión con V8 del pico G1. Incluye la secuencia radioquímica de los picos de Gly, GV1 y GV2.

GV1 presenta radioactividad en el ciclo 2 correspondiente al péptido 220-222 (DGE). GV2, que eluye en las mismas posiciones que TV3, DV3 y QV4, mostró la presencia de Gly en las posiciones 5 y 7 del péptido de diferencia 233-243 de A2-OZB, confirmando la presencia de la Gly₂₃₇ y Gly₂₃₈.

Para establecer la presencia de la Arg₂₃₆, se realizó el marcaje de OZB con ³H-Arg y se aisló el pico R12 que eluye en la fracción correspondiente al péptido 220-243 de A2-OZB (fracción 71, fig. 4.1.14.A). La secuenciación del péptido RV obtenido en el tratamiento con V8 (fig. 4.1.14.B), mostró la presencia de radioactividad en el ciclo 2, confirmando la presencia de la Arg₂₃₆ en el péptido 233-243.

Los picos P5 y P6 del mapa de Pro (fig. 4.1.3.B) fueron tratados con V8, generando 2 péptidos de diferencia correspondientes a los péptidos 233-243 de las dos moléculas (fig. 4.1.15). La presencia de radioactividad en el ciclo 3 de la secuencia de ambos péptidos, confirma su adscripción y la presencia de la Pro₂₃₅ en la molécula de A2-OZB.

Así pues, se pudieron asignar directamente, mediante secuenciación radioquímica, los aminoácidos presentes en todas las posiciones del péptido de diferencia de A2-OZB (220-243), como se representa en la fig. 4.1.16. Tan sólo la Lys₂₄₃ no fue asignada directamente por la dificultad de secuenciar este residuo localizado en la última posición. Su adscripción se realizó en base a la presencia de Lys en el correspondiente péptido tríptico (fig. 4.1.3.A) y su ausencia en otra posición del péptido.

Todos los datos expuestos, demuestran la existencia de un único cambio en la posición 236 de la molécula de A2-OZB, consistente en la sustitución del aminoácido Ala presente en A*0201 por un residuo de Glu. La molécula así caracterizada, fue designada por el comité de nomenclatura de la OMS como el aloantígeno A*0209 (57).

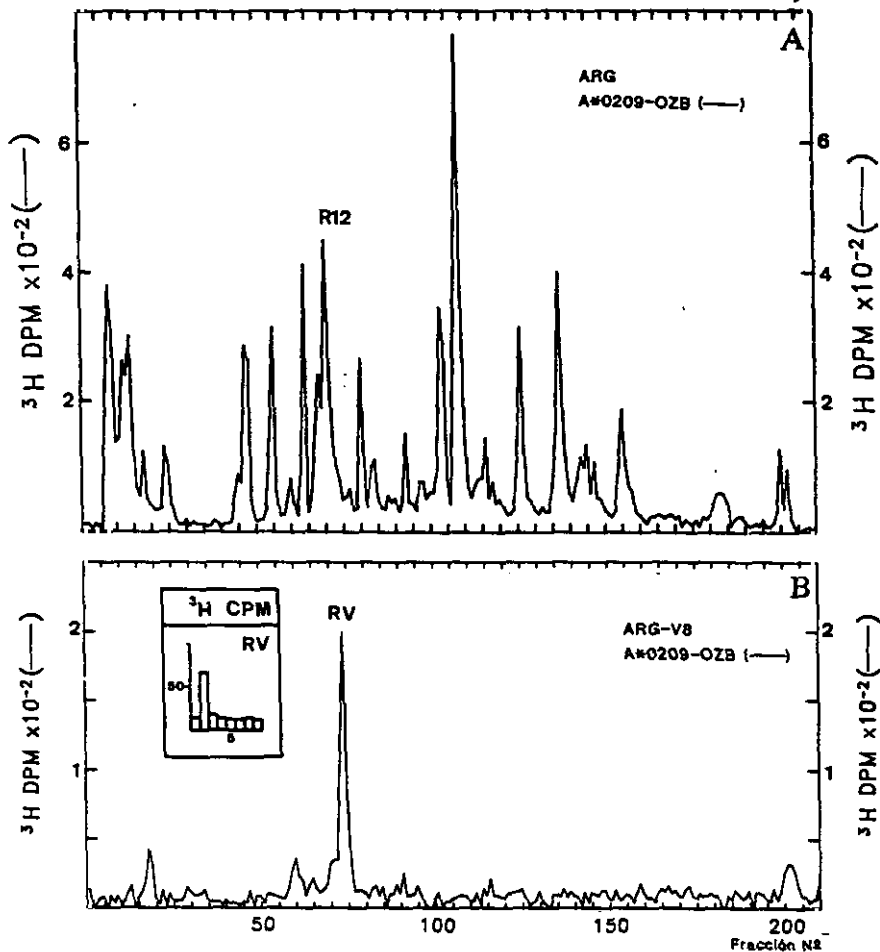


Figura 4.1.14- A) Mapa tríptico del antígeno A2-OZB correspondiente al marcaje con Arg. B) Cromatograma correspondiente a la digestión con V8 del pico R12. Incluye la secuencia radioquímica del pico RV.

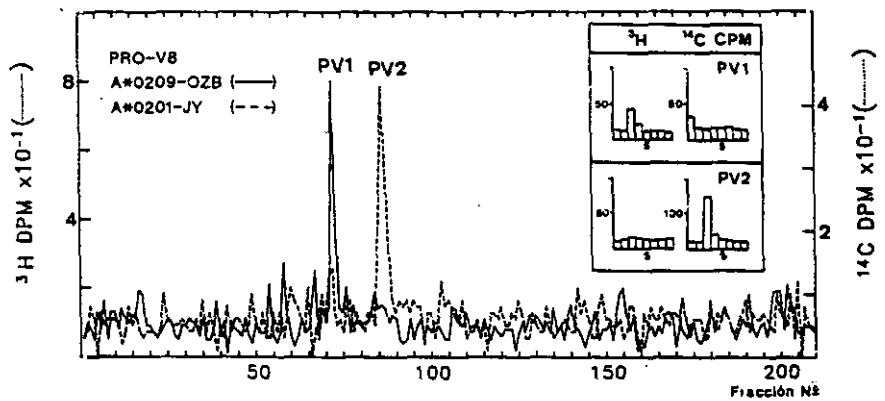


Figura 4.1.15- Cromatograma correspondiente a la digestión con V8 de los picos P5 y P6 del mapa de Pro. Incluye la secuencia radioquímica de los picos obtenidos.

4.2 BASES MOLECULARES DE LA REACTIVIDAD DE LA LINEA ALOGENICA ESPECIFICA DE HLA-A2, CTL14. ANALISIS ESTRUCTURAL DE LOS ANTIGENOS HLA-A2 EXPRESADOS POR LAS LINEAS CELULARES SCHU, ARC Y ESST.

La estimulación en cultivos mixtos de linfocitos (CML) de respondedores HLA-A2 por estimuladores HLA-A2.4* permitió la obtención de líneas policlonales alogénicas específicas de HLA-A2 cuyos patrones de reactividad frente a HLA-A2.4 revelaron la heterogeneidad de este subtipo (fig. 4.2.1) (109). La reactividad de las líneas CTL12, CTL13, CTL14 y CTL15 definió la existencia de 3 subtipos de HLA-A2.4 presentes en las líneas celulares CLA (A*0206), KNE (A*0207) y KLO (A*0208) (tabla V) que fueron posteriormente caracterizados (118, 120, 121). La línea CTL14, generada en un CML de un respondedor HLA-A1, 30, B8, 27 frente al estimulador KNE (HLA-A1, 2, B8,27) reconocía la líneas KNE (A*0207) y CLA (A*0206), pero no reconocía KLO (A*0208) ni SCHU (A2.4). Así mismo, reconocía una fracción de células HLA-A2.1*, lo que sugería la existencia de 2 subgrupos dentro de este subtipo.

En esta segunda parte de la presente tesis, hemos pretendido analizar la base molecular de la reactividad alogénica de la línea CTL14, mediante el análisis de los antígenos HLA-A2 reconocidos diferencialmente. Por ello, hemos estudiado los antígenos HLA-A2 expresados por las líneas SCHU (antígeno A2.4 no reconocido), ESST (antígeno A2.1 no reconocido) y ARC (antígeno A2.1 reconocido).

Tabla V. Patrones de reactividad de CTLs dirigidos frente a individuos del subtipo A2.4.*

Individuo	Subtipo	CTL12	CTL13	CTL14	CTL15
CLA	A*0206	+	+	+	+
SCHU		+	+	-	+
KNE	A*0207	+	-	+	-
KLO	A*0208	+	-	-	-

* Adaptado de la ref. 109.

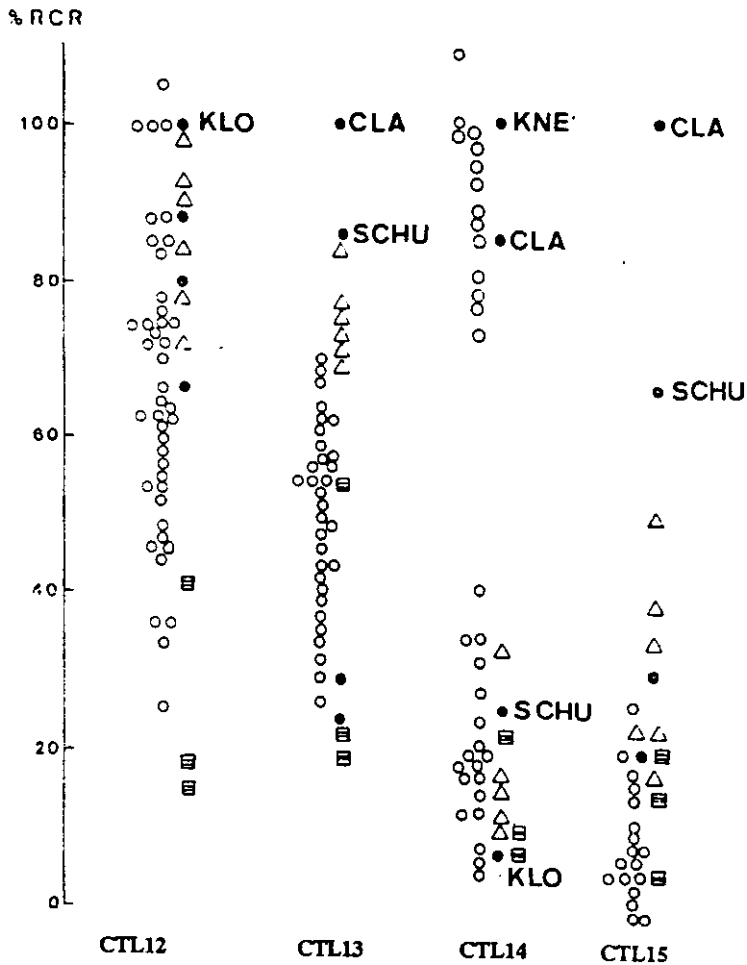


Figura 4.2.1- Patrón de reactividad de las líneas policlonales de CTLs generadas por estimulación con individuos HLA-A2.4*. Se representa la lisis relativa respecto de la obtenida con la línea estimuladora. El símbolo ○ representa individuos HLA-A2.1*, △ individuos HLA-A2.2*, ◻ individuos HLA-A2.3* y ● individuos HLA-A2.4*. La línea CTL14 divide los individuos HLA-A2.4* en un grupo que es reconocido (individuos KNE y CLA, que presentan los antígenos A*0207 y A*0206, respectivamente) y otro no reconocido (KLO, con el antígeno A*0208 y SCHU). Análogamente, divide a los individuos HLA-A2.1*, siendo ARC un representante del grupo reconocido y ESST del no reconocido (adaptado de van der Poel, J., et al., Hum. Immunol. 16:247-258 (1986)).

4.2.1 *Análisis estructural del antígeno HLA-A2 expresado en la línea SCHU.*

La estrategia seguida para el estudio del antígeno HLA-A2 de la línea SCHU fue el mapeo peptídico comparativo con antígenos HLA-A2 de secuencia conocida, de forma análoga al estudio realizado con el antígeno HLA-A*0209 de OZB.

La diferencia fundamental se centra en que logramos el marcaje metabólico de las líneas celulares con ^3H -Arg y ^{14}C -Arg lo cual permitió la comparación de los dos antígenos realizando únicamente los mapas de Lys y Arg, que cubren la totalidad de los péptidos trípticos de la molécula. De esta manera se pueden detectar rápidamente las diferencias entre las dos moléculas analizadas e inferir, por la posición de elución de los picos de diferencia, los posibles péptidos a los que corresponden.

4.2.1.1 *Mapeo peptídico comparativo entre los antígenos HLA-A2 de SCHU y A*0201.*

Mediante los mapas trípticos de Lys y Arg comparamos los antígenos HLA-A2 expresados en las líneas SCHU (A2.4) y JY (A*0201). Como se puede apreciar en la fig. 4.2.2, no existe ninguna diferencia en los péptidos que contienen Lys entre las dos moléculas. En cambio, en el mapa de Arg se detectan 2 picos de diferencia de ^3H , R20 y R22 y otros 2 de ^{14}C , R21 y R23 (fig. 4.2.3.A). La purificación del pico R20 en gradiente de TFA (fig. 4.2.3.B) muestra la existencia de un pico de diferencia de ^3H , R20.1, que coeluye con un pico idéntico en el mapa de Arg, lo que justifica la presencia de ^3H y ^{14}C en dicho pico.

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio sugerían que estos picos podrían corresponder, por su posición de elución, a los péptidos 7-14 y 7-17 (YFFTSVSRPGR), que se generan por hidrólisis parcial del enlace $\text{Arg}_{14}\text{-Pro}_{15}$ resistente a la hidrólisis por tripsina (118). Para corroborar esta hipótesis se realizó el marcaje con Tyr. El mapa tríptico correspondiente (fig. 4.2.4.A) muestra la presencia de 2 picos de diferencia de ^3H , Y16 y Y18, y otros 2 de ^{14}C , Y17 y Y19, en posiciones análogas a los del mapa de Arg, como habíamos supuesto. La purificación del pico Y16 muestra, al igual que el caso de R20, la presencia de un pico de diferencia de ^3H , Y16.1, y un pico idéntico de ^3H y ^{14}C , que coeluyen en el gradiente de acetato amónico/acetoneitrilo (fig. 4.2.4.B).

A su vez, la purificación del pico Y17 genera un pequeño pico de diferencia de ^3H , Y17.1, un pico de diferencia de ^{14}C que también contiene ^3H , Y17.2, y un pico idéntico Y17.3 (fig. 4.2.4.C) lo que evidencia la coelución de diversos péptidos en el gradiente de acetato amónico/acetoneitrilo.

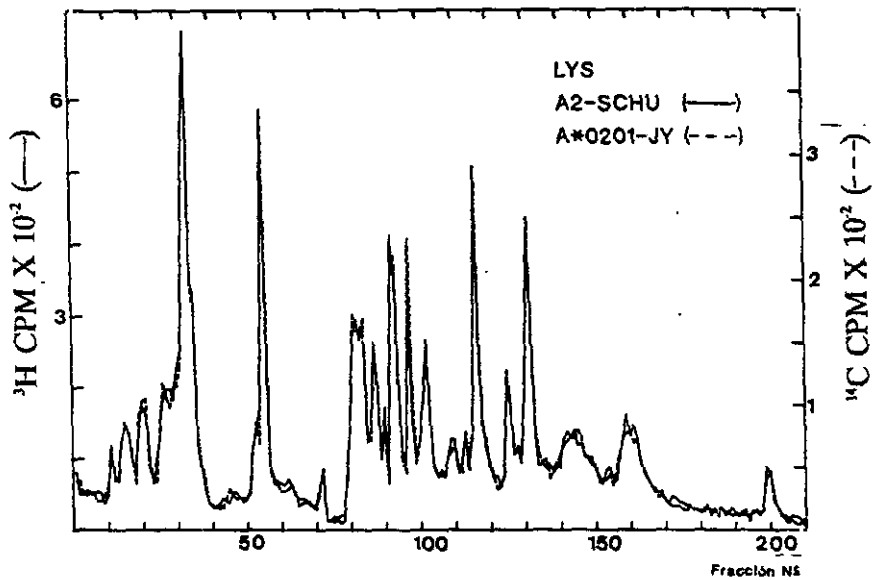


Figura 4.2.2- Mapa triptico comparativo entre los antigenos A2-SCHU y A*0201 correspondiente al marcaje con Lys.

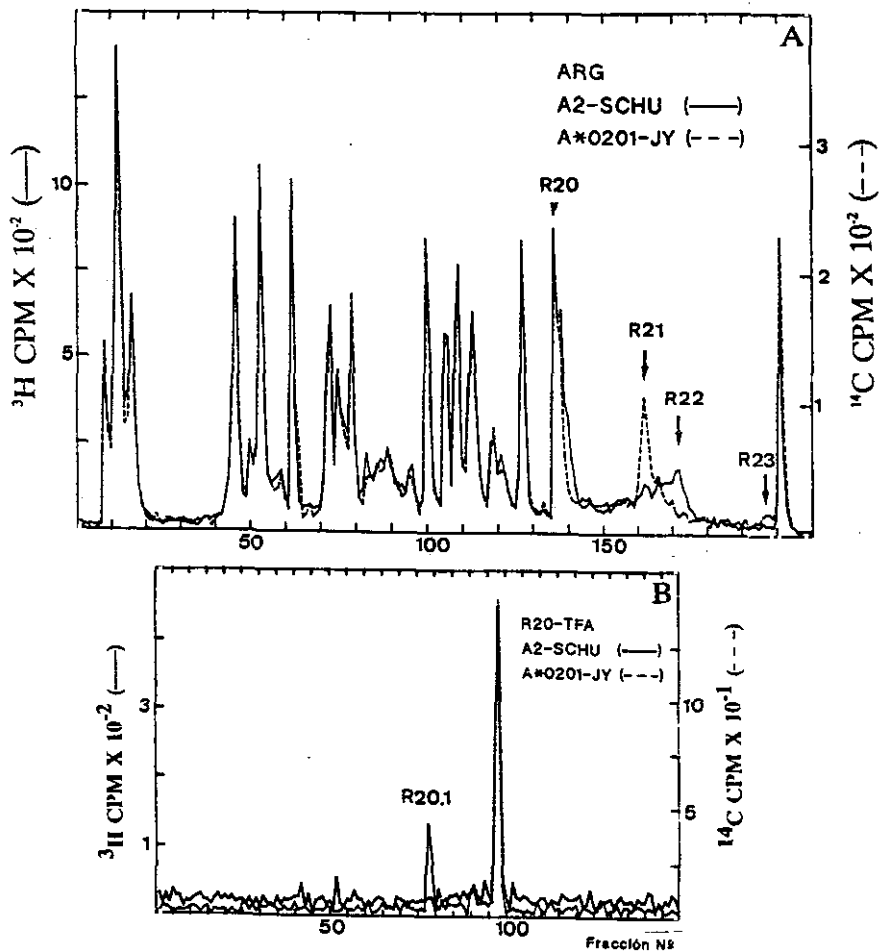


Figura 4.2.3- A) Mapa triptico comparativo entre los antigenos A2-SCHU y A*0201 correspondiente al marcaje con Arg. B) Purificación en gradiente de TFA del pico R20.

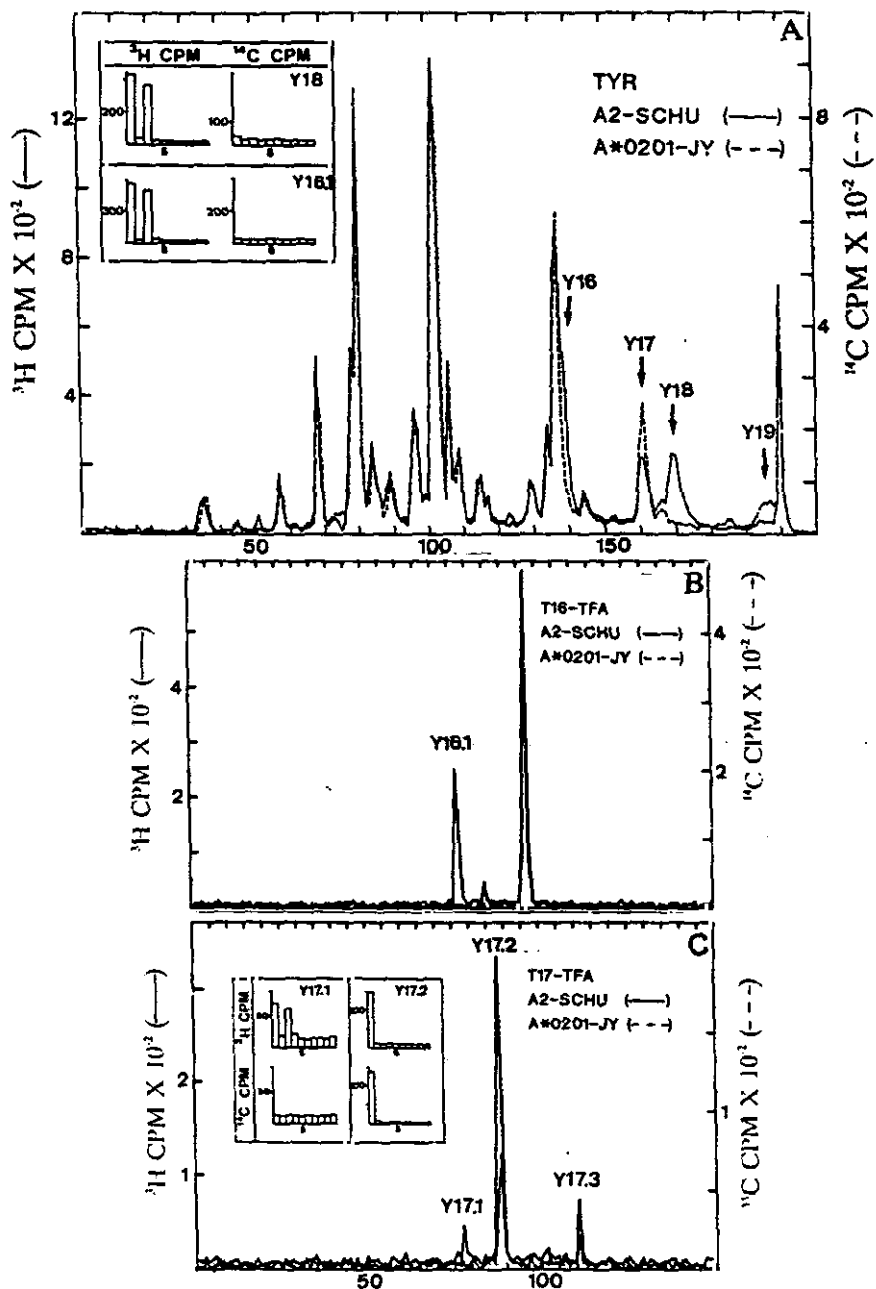


Figura 4.2.4- A) Mapa triptico comparativo entre los antigenos A2-SCHU y A*0201 correspondiente al marcaje con Tyr. Incluye la secuencia radioquímica de los picos Y18 e Y16.1. B) Purificación en gradiente de TFA del pico Y16. C) Purificación en gradiente de TFA del pico Y17. Incluye la secuencia radioquímica de los picos Y17.1 e Y17.2.

La secuenciación radioquímica de los picos Y16.1 e Y18 revela la presencia de Tyr en los ciclos 1 y 3 (fig 4.2.4.A). De todos los antígenos HLA-A2 de secuencia conocida, los únicos péptidos trípticos con Tyr en las posiciones 1 y 3 son los que cubren los residuos 7-14 y 7-17 de los antígenos A*0205, A*0206, A*0208 y A*0210 (117, 118, 121, 122). Todos los demás antígenos A2 presentan Phe en la posición 9 de la molécula, lo que sugiere que A2-SCHU difiere de A*0201 en un cambio de Phe→Tyr en dicha posición.

También se secuenciaron los picos de diferencia obtenidos en la purificación de Y17 (fig. 4.2.4.C). El pico Y17.1, obtenido en muy bajo rendimiento, presenta radioactividad de ^3H en las posiciones 1 y 3, confirmando la secuencia obtenida en Y16.1 y Y18, lo que sugiere que se trata de una pequeña contaminación de uno de estos picos. Por su parte, el pico Y17.2 presenta radioactividad de ^3H y ^{14}C en el ciclo 1, pero en una relación $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ de 1:2, muy inferior a la mantenida en la obtención del mapa tríptico (1,5:1), lo que sugiere la presencia de un pico de diferencia de ^{14}C coeluyendo con un pico idéntico de ^3H y ^{14}C . Por tanto, este pico debe contener el péptido 7-17 de la molécula de A*0201, que presenta ^{14}C -Tyr únicamente en la posición 1, y, probablemente, el péptido 257-268 de A2-SCHU y A*0201 que también contiene únicamente Tyr en la posición 1, siendo ambos péptidos inseparables en las condiciones cromatográficas reseñadas.

La ausencia de otros péptidos de diferencia sugería que A2-SCHU debía ser similar a A*0206 (línea CLA), que difiere de A*0201 en un único cambio de Phe→Tyr en la posición 9 de la molécula (118), por lo que procedimos a la comparación directa de ambas moléculas.

4.2.1.2 Mapeo peptídico comparativo entre los antígenos HLA-A2 de SCHU y A*0206.

La comparación entre los antígenos A2-SCHU y A*0206 se realizó mediante el marcaje con Lys y Arg, cuyos mapas trípticos demuestran la absoluta identidad entre las dos moléculas (fig 4.2.5.A y B). Para comprobar el cambio detectado, realizamos el mapa comparativo correspondiente al marcaje con Phe, que corrobora la identidad entre ambas moléculas (fig. 4.2.6). Puesto que apenas se detecta el pico análogo a los picos R22 y Y18 (péptido 7-14), se realizó la secuencia radioquímica del pico de la posición 174, que corresponde a los picos citados (pico F5). La presencia de radioactividad de ^3H y ^{14}C únicamente en el ciclo 2 demuestra la presencia del péptido 7-14 en el cromatograma y la presencia de Phe únicamente en la posición 8 de las moléculas A2-SCHU y A*0206 y su ausencia en la posición 9, que cambia a Tyr respecto de la secuencia de A*0201, como ya habíamos demostrado. Así pues, los antígenos HLA-A2 expresados por las líneas SCHU y CLA son indistinguibles por mapeo peptídico comparativo, lo que sugiere

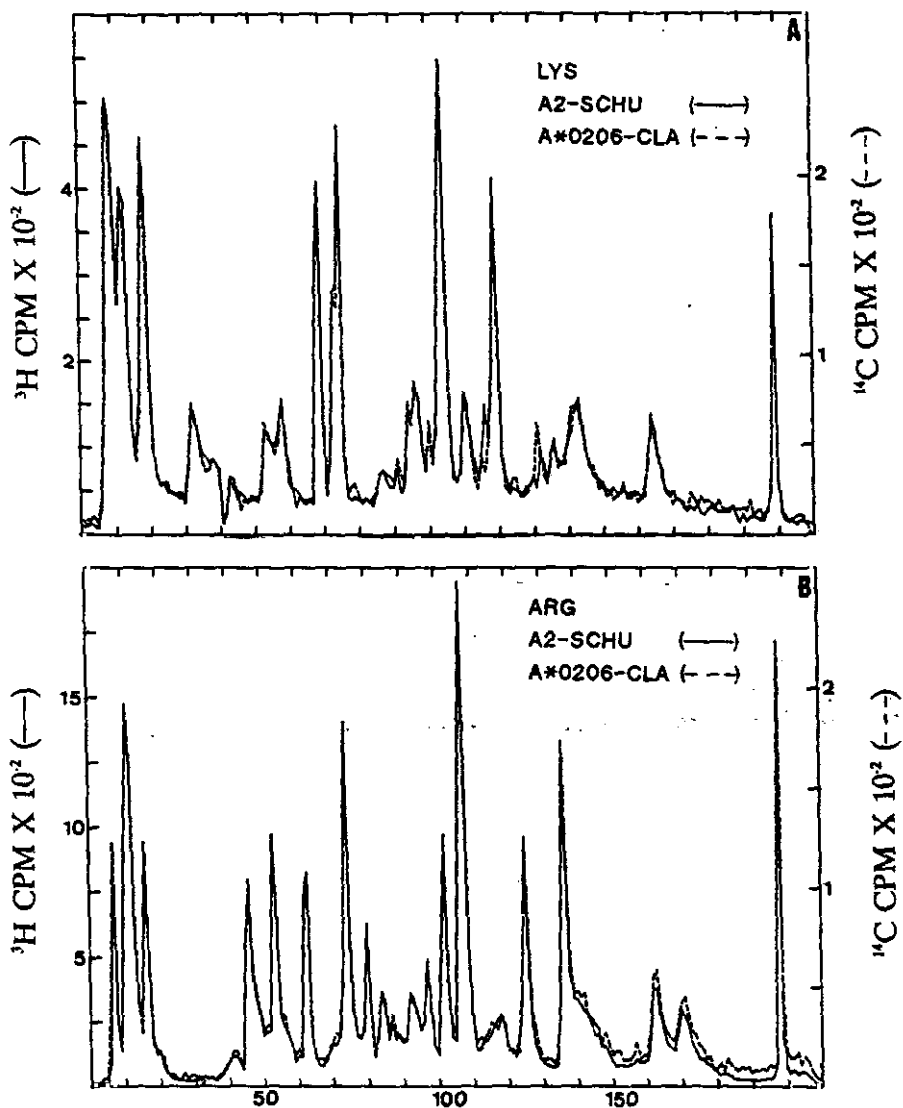


Figura 4.2.5- Mapas tripticos comparativos entre los antigenos A2-SCHU y A*0206 correspondientes a los marcajes con Lys (A) y Arg (B).

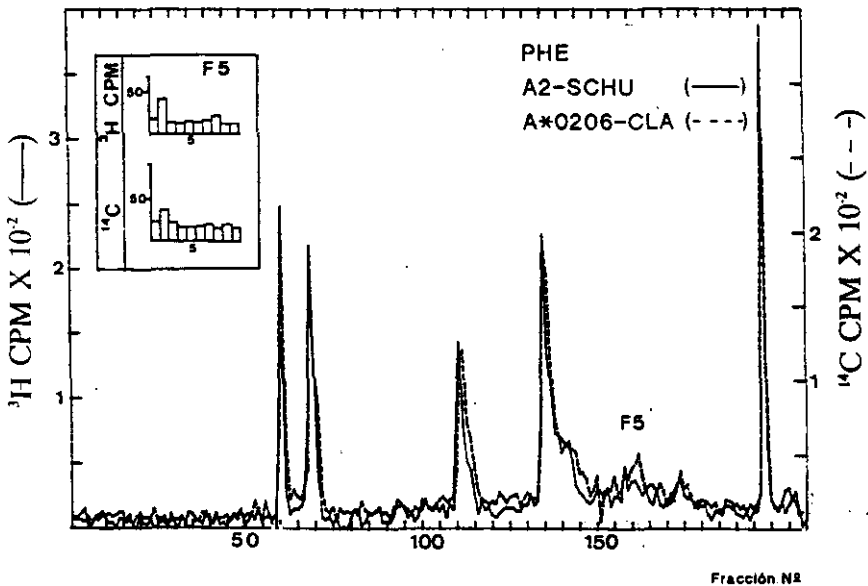


Figura 4.2.6- Mapa triptico comparativo entre los antigenos A2-SCHU y A*0206 correspondiente al marcaje con Phe. Incluye la secuencia radioquimica del pico F5.

que la diferenciación funcional establecida por CTL14, debe basarse en diferencias entre los PBLs de los individuos analizados no presentes en la estructura primaria del aloantígeno reconocido.

4.2.2 Análisis estructural de los antígenos HLA-A2 expresados en las líneas ARC y ESST.

La identidad mostrada entre los dos antígenos HLA-A2.4 reconocidos diferencialmente por la línea CTL14 sugería la posibilidad de que esta línea distinguiese entre los antígenos A2.1 del panel de PBLs analizados en base a otros factores diferentes de la estructura primaria de estos antígenos.

Para analizar esta posibilidad, procedimos al estudio de los antígenos HLA-A2.1 provenientes de los 2 subgrupos diferenciados por CTL14. Para ello, aislamos los antígenos de las líneas ARC y ESST, derivadas de linfocitos reconocidos y no reconocidos, respectivamente, por CTL14 y los comparamos con el antígeno A*0201.

La fig. 4.2.7 muestra la comparación de A2-ARC con A*0201 mediante marcajes con Lys (A) y Arg (B). Ambos mapas son idénticos entre las dos moléculas, lo que sugiere que el antígeno HLA-A2 expresado en ARC es idéntico a A*0201.

La comparación de A2-ESST con A*0201 se realizó de manera análoga mediante los mapas trípticos de Lys (fig. 4.2.8.A) y Arg (fig. 4.2.8.B) que muestran la identidad entre ambas moléculas.

Así pues, los antígenos HLA-A2.1 expresados por las líneas ARC y ESST distinguibles funcionalmente por CTL14, son idénticos entre sí en base a la identidad de ambos con A*0201 expresado en JY. CTL14 parece distinguir, por tanto, entre las células HLA-A2.1' en base a diferencias no atribuibles a la secuencia de aminoácidos del aloantígeno expresado por dichas células.

4.2.3 Secuenciación del cDNA codificante del antígeno HLA-A2 expresado en la línea SCHU.

El mapeo peptídico comparativo es una técnica analítica de gran sensibilidad que ha permitido la determinación de cambios muy conservativos entre proteínas que difieren en un reducido número de aminoácidos. La secuenciación del DNA codificante de algunas de estas proteínas, ha corroborado totalmente la secuencia de aminoácidos determinada por esta técnica, demostrando su alto nivel de sensibilidad y fiabilidad (119, 199, 200). Sin embargo, es claro que no puede excluirse formalmente la posibilidad de cambios altamente conservativos entre las proteínas analizadas que no afecten a la interacción con el soporte cromatográfico del péptido correspondiente, o que tengan lugar en péptidos obtenidos en muy bajo rendimiento que puedan

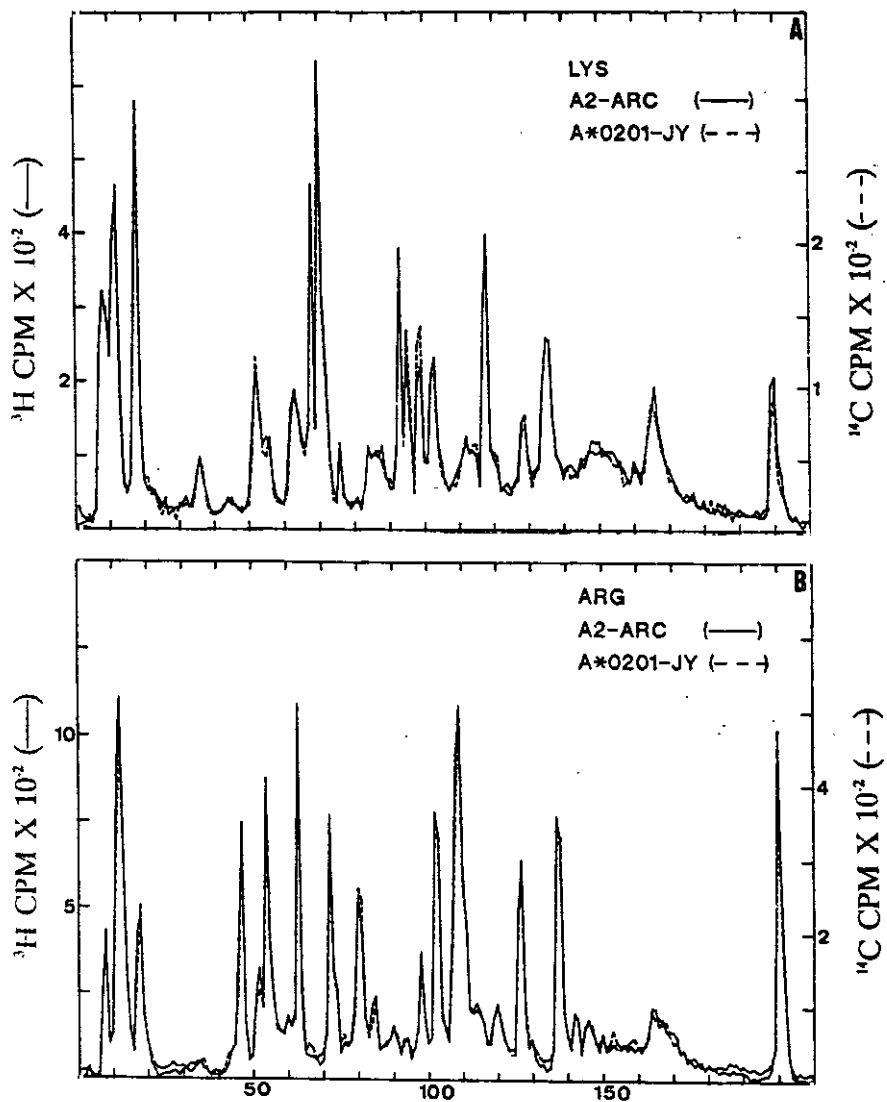


Figura 4.2.7- Mapas tríplicos comparativos entre los antígenos A2-ARC y A*0201 correspondientes a los marcajes con Lys (A) y Arg (B).

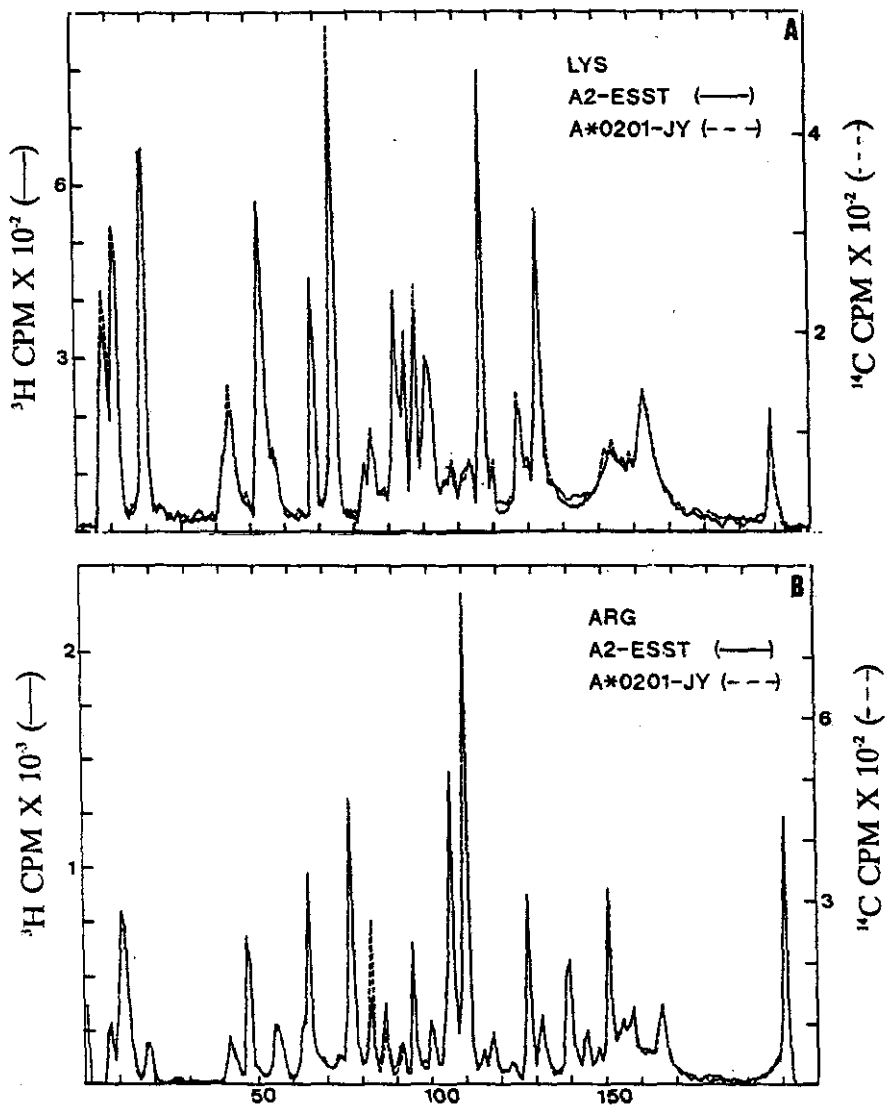


Figura 4.2.8- Mapas trípticos comparativos entre los antígenos A2-ESST y A*0201 correspondientes a los marcajes con Lys (A) y Arg (B).

ser enmascarados en el perfil cromatográfico por péptidos de mayor rendimiento. Para poder demostrar la identidad entre las moléculas A2-SCHU y A*0206, fue necesario acudir a la secuenciación del cDNA codificante del antígeno HLA-A2 expresado en SCHU.

La estrategia seguida para ello fue la amplificación, mediante PCR, de transcritos enteros de mRNA codificante de antígenos de clase I. La homología existente entre los alelos de clase I y las características de la reacción de amplificación no permiten la amplificación específica del cDNA del alelo deseado. Por ello es necesario clonar el material amplificado para la selección del cDNA que codifica para el antígeno HLA-A2.

4.2.3.1 Obtención y secuenciación de cDNA del antígeno HLA-A2 de la línea celular SCHU.

Se aisló RNA citoplásmico a partir de 5×10^6 células, obteniendo 46 μg de RNA. 13 μg fueron utilizados para la obtención de cDNA, del cual se amplificaron 5 alícuotas conteniendo 1/7 del cDNA sintetizado (unos 2 μg originales de RNA) en el tampón A (ver materiales y métodos) a diversas concentraciones de catión Mg^{2+} con 2.5 U de Taq polimerasa en presencia de una concentración 130 μM de dNTPs. Otra alícuota fue amplificada en el tampón B (materiales y métodos) en las mismas condiciones. Como puede apreciarse en la fig. 4.2.9, tan sólo la alícuota amplificada en el tampón B generó cantidades suficientes de material amplificado de un tamaño compatible con el cDNA de antígenos de clase I (1.1 kb). El análisis por Southern blot muestra la presencia de cDNA específico de HLA-A2 entre el material amplificado (fig. 4.2.9.B). Con un tiempo mayor de exposición se detectó la presencia de material amplificado específico de A2, en los pocillos 3 y 5 correspondientes a amplificaciones en tampón A en presencia de concentraciones 1 y 3 mM de MgCl_2 . Se comprueba, por tanto, como las condiciones específicas en las que se lleva a cabo la reacción de amplificación, determinan absolutamente su rendimiento, para un mismo tipo de DNA molde.

El material amplificado en el tampón B fue sometido a electroforesis en geles de agarosa de bajo punto de fusión (fig 4.2.9.C) y la banda de > 1 kb fue aislada por el método de GeneClean, procediéndose a su digestión con 20 U de Eco RI y Hind III. Cantidades variables del material digerido (20-50%) fueron ligadas con 100 ng de pUC18 tratado con Eco RI y Hind III, realizándose el clonaje mediante transformación de bacterias DH5 α F'. Se obtuvieron 122 colonias recombinantes, de las cuales 89 contenían DNA específico de A2 (fig. 4.2.10.A).

Cinco colonias diferentes que resultaron positivas en la hibridación con la sonda A2 α 2 (colonias A1, C1, E9, E16 y F3) fueron crecidas y el plásmido recombinante aislado en las

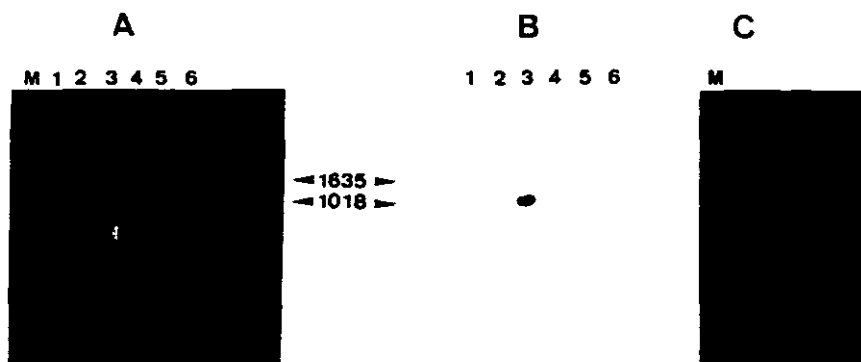


Figura 4.2.9- A) Electroforesis en gel de agarosa de alícuotas de las amplificación por PCR del cDNA de SCHU. Los pocillos 1, 2, 4, 5, 6 y 7 contienen las PCR realizadas en el tampón A en presencia de concentraciones 0,5, 1, 1,5, 2, 3 y 4 mM de Mg_2Cl . La reacción PCR3 se realizó en el tampón B y es la única que presenta material amplificado del tamaño correspondiente al cDNA de antígenos de clase I. Se indica la posición de marcadores de DNA con un tamaño de 1019 y 1615 pb. B) Southern blot del gel anterior con la sonda específica A2 α 2. C) Gel de agarosa de bajo punto de fusión con el material amplificado en PCR3.

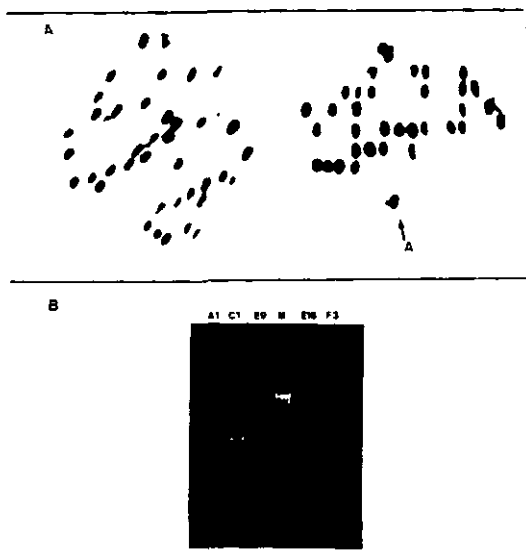


Figura 4.2.10- A) Hibridación con la sonda A2 α 2 de las colonias bacterianas portadoras de plásmido recombinante obtenido por clonaje en pUC del material amplificado en la PCR3 de la figura 4.2.9. La flecha indica la posición de una colonia que contiene un plásmido de pUC con el cDNA de A*0201, como control positivo de la hibridación. B) Gel de agarosa que muestra la banda de cDNA de A2 de 1.1 kb, obtenida a partir de los clones A1, C1, E9, E19 y F3.

condiciones descritas. Se procedió a la digestión con las enzimas Eco RI y Hind III de los 5 clones de pUC-A2-SCHU, procediéndose a la separación y aislamiento del material clonado insertado en el plásmido (banda de 1.1 kb) en geles de agarosa de bajo punto de fusión.

Un 5% del material extraído en cada aislamiento (fig 4.2.10.B) fue subclonado en 100 ng de M13 digerido con Eco RI y Hind III, mediante transformación de bacterias XL1-blue. 10 colonias recombinantes conteniendo M13-A2, de cada clon de A2-SCHU, fueron aisladas y usadas como fuente para la obtención de DNA monocatenario.

Un subclon de M13 proveniente de cada clon de pUC-A2, conteniendo el transcrito entero de cDNA de A2-SCHU, fue secuenciado con los oligonucleótidos iniciadores A2a1, A2a2, A2a3 y el iniciador universal de M13. Se determinó la secuencia completa (1098 pb) de 3 clones (E9, E16 y F3) y la secuencia parcial de otros dos (bases 1-305 y 1-214 en los clones C1 y A1, respectivamente, y 515-1098 en ambos). Así mismo, se realizó la secuencia con dITP del clon F3, para eliminar las compresiones que afectan a algunas zonas de estructura secundaria que dificultan la lectura. Las secuencias obtenidas en los 5 clones fueron idénticas entre sí, e idénticas a la secuencia de A*0206, diferenciándose de A*0201 en un cambio en el codón 9 (T a A en el nucleótido 98) y un cambio silencioso en el codón 10 (A a C en el nucleótido 102), que generan un cambio de Tyr a Phe en la posición 9 de la molécula (fig. 4.2.11 y 4.2.12). Así, pues, se demostró que el antígeno HLA-A2 expresado en la línea celular SCHU es idéntico al de la línea CLA (A*0206) y que, por tanto, la línea policlonal CTL14 reconoce diferencias no atribuibles a la estructura primaria del aloantígeno.

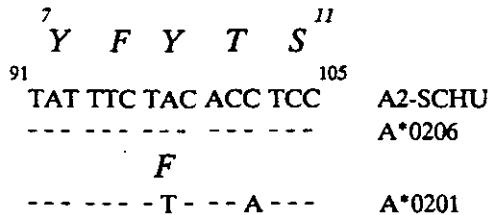


Figura 4.2.11- Secuencia de aminoácidos y de cDNA del antígeno A2-SCHU entre los codones 7 y 11 del exón 2, comparada con la de los antígenos A*0201 y A*0206. Las líneas indican identidad con la secuencia de A2-SCHU.

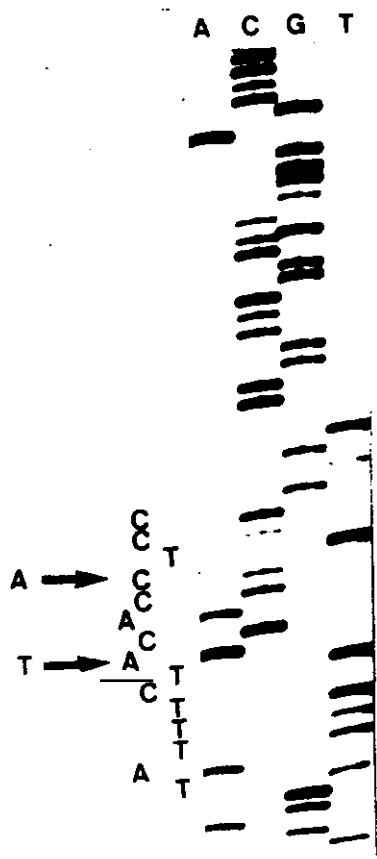


Figura 4.2.12- Gel de secuencia del clon E9 entre los nucleótidos 86 y 133. Se señalan las diferencias de A2-SCHU respecto de A*0201 en las bases 98 y 102.

4.3 CARACTERIZACION DE LOS ANTIGENOS HLA-A*0204 Y HLA-A*0211.

Durante los trabajos del X Workshop Internacional de Histocompatibilidad fueron detectados, mediante IEF, dos nuevos subtipos: el subtipo A2.4 (A*0204), con un pI ligeramente más ácido que el subtipo A*0203, encontrado en dos amerindios sudamericanos no relacionados, y el subtipo A*0211, dos unidades de carga más ácido que el subtipo A*0201, encontrado en un único individuo del sudeste asiático (112). Con la caracterización de estos dos nuevos subtipos se completa el total de variantes de HLA-A2 descritas, por lo cual procedimos a su análisis.

4.3.1 Obtención y secuenciación de cDNA del alelo HLA-A*0204 expresado en la línea RML.

A partir de 2×10^6 células de la línea RML (HLA-A*0204, B51, DRw16, Dw22, DQw7) se obtuvieron 20 μ g de RNA citoplásmico. 1 μ g fue utilizado para la obtención de cDNA. Se amplificaron 5 alícuotas conteniendo 1/7 del cDNA en el tampón A y otra en el tampón B, en presencia de una concentración 130 μ M de dNTPs. Se obtuvo amplificación de material con un tamaño de 1.1 kb en los pocillos 2, 3 y 6 (fig 4.3.1 A y B), correspondientes a concentraciones de $MgCl_2$ de 1mM, 1.5mM en el tampón A y 1.5mM en el B, respectivamente. El material obtenido en la reacción de mayor rendimiento (PCR2), fue sometido a electroforesis en geles de agarosa de bajo punto de fusión, aislándose la banda de 1.1 kb, procediéndose a su digestión con 10 U de Eco RI y Hind III. Se realizaron ligamientos de diversas cantidades del material digerido (10-60%) con 100 ng de pUC18 previamente digerido, procediéndose al clonaje mediante transformación de bacterias DH5 α F' competentes con 1/2 de la mezcla de ligamiento. Se recogieron 134 colonias recombinantes, de las cuales 92 hibridaban con la sonda específica de A2 (fig 4.3.1.C). El plásmido recombinante de cuatro de estas colonias (A1, B8, C15 y D1) fue aislado y tratado con Eco RI y Hind III (fig 4.3.1.D), procediéndose al subclonaje de la banda de 1.1 kb en M13mp18, para su secuenciación. Se realizó la secuencia completa de los cuatro clones, resolviéndose las compresiones en determinadas zonas mediante secuenciación con diPTG del clon B8.

Las secuencias de los clones B8 y D1 fueron idénticas entre sí, difiriendo de la de A*0201 en un único cambio de base de G a T en la posición 362 (fig 4.3.2). Esta posición corresponde a la segunda base del codón 97 e implica un cambio de aminoácido de Arg a Met. Las secuencias de A1 y C15 presentan este mismo cambio, además de cambios adicionales diferentes en cada clon (tabla VI). Todos los cambios adicionales se encontraron únicamente en uno de los 4 clones secuenciados y correspondían a transiciones que involucran cambios de purinas o pirimidinas.

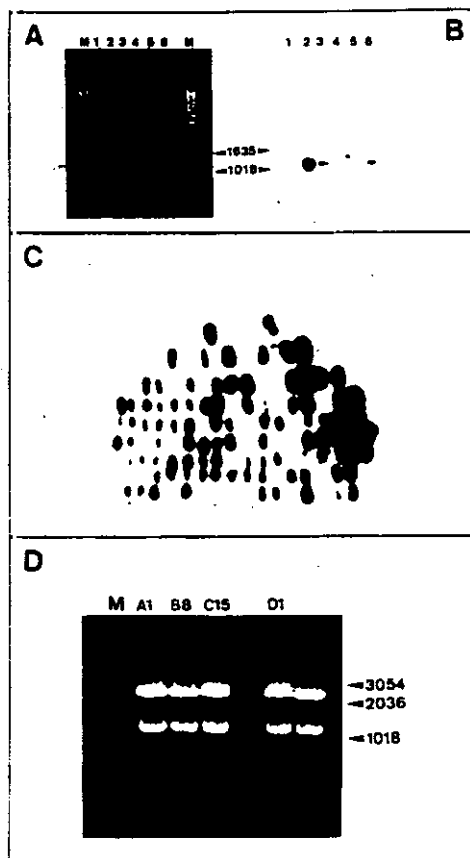


Figura 4.3.1- A) Electroforesis en gel de agarosa de alícuotas de las amplificación por PCR del cDNA de RML. Los pocillos 1, 2, 3, 4 y 5 contienen las PCR realizadas en el tampón A. en presencia de concentraciones 0.5, 1, 1.5, 2 y 3 mM de Mg_2Cl . La reacción PCR6 se realizó en el tampón B. B) Southern blot del gel anterior con la sonda específica A2 α 2. C) Hibridación con la sonda A2 α 2 de las colonias bacterianas portadoras de plásmido recombinante obtenido por clonaje en pUC del material amplificado en la PCR2. D) Gel de agarosa de la digestión con Eco RI y Hind III de los plásmidos aislados a partir de las colonias A1, B8, C15 y D1.

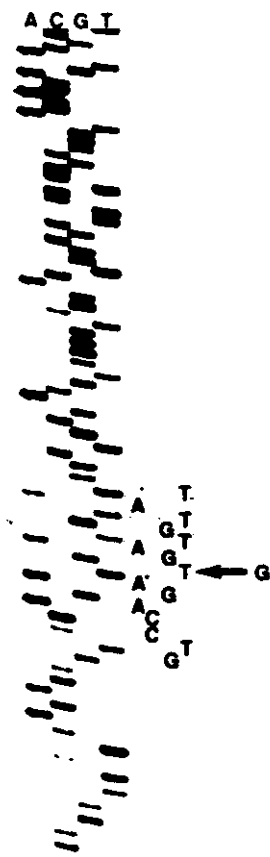


Figura 4.3.2- Gel de secuencia del clon A1 entre las bases 341-422, en el que se muestra el cambio de la posición 362, respecto de A*0201.

Tabla VI. Cambios de nucleótidos en los clones de cDNA de A*0204 amplificado por PCR*.

<u>Clon</u>	<u>Nucleótido</u>	<u>Aminoácido</u>	<u>Polimorfismo en la posición del cambio</u>
B8	G ₃₄₂ → T	R ₉₇ → M	Polimórfica
D1	G ₃₄₂ → T	R ₉₇ → M	Polimórfica
A1	G ₃₄₂ → T	R ₉₇ → M	Polimórfica
	T ₃₃₁ → C	L ₁₀₀ → P	Conservada
	G ₃₈₁ → A	R ₁₇₀ → K	Conservada
	T ₇₀₃ → C	P ₂₁₀ : Silencioso	Conservada
C15	G ₃₄₂ → T	R ₉₇ → M	Polimórfica
	A ₃₄₀ → G	R ₂₃₆ : Silencioso	Conservada
	T ₆₀₁ → C	S ₂₇₇ : Silencioso	Conservada

* Los cambios se relacionan con la secuencia de A*0201. Las letras en negrilla indican los cambios encontrados en todos los clones.

Estos cambios al azar implicarían sustituciones de aminoácido en posiciones conservadas entre todos los antígenos de clase I, o bien, serían silenciosos, lo que confirma que se deben a errores introducidos por la polimerasa durante la reacción de la PCR. Por tanto, los resultados obtenidos indican que A*0204 difiere de A*0201 en un único cambio de base de G₃₄₂ a T₃₄₂ que implica un único cambio de aminoácido de Arg₉₇ a Met₉₇ (fig 4.3.3).

4.3.2 Obtención y secuenciación de cDNA del alelo HLA-A*0211 expresado en la línea KIME.

A partir de 10⁶ células de la línea KIME (HLA-A2.5, 32; Bw32, w61; Cw6) se obtuvieron 2 µg de RNA citoplásmico total, de los cuales 0.1 µg fueron utilizados como molde para la síntesis de transcritos completos de cDNA codificante de antígenos de clase I. La PCR en las mismas condiciones que en el caso anterior dio origen a una única banda de 1.1 kb en el tampón A con una concentración 1.5 mM de MgCl₂ y 130 µM de dNTPs. A partir de este material aislado en gel

	Exon 2	
ATGACGGTCATGGCTCCCCAACCTCGTCTGCTACTCTGGGGGCTCTGGCCGTGACCCAGACCTGGGGGGCTCTCACTCCATGAGGTATTTCTTC		99
T S V S R P G R G E P R F I A V G Y V D D T Q F V R F D S D A A S		42
ACATCCGTGTCCCGCCCGGCCCGGGAGCCCGCTTCA TGGCAGTGGCTACGTGGACGACACGCA GTTCGTGCGGTTGAGACGGACGCCCGGAGGC		198
Q R M E P R A P W I E Q E G P E Y W D G E T R K V K A H S Q T N R		75
CAGAGGATGGAGCCGGGGCCGGTGGATAGAGCAGGAGGGTCCGGAGTAT TGGGACGGGGAGACACGGAAAGTGAAGCCCACTCACAGACTCACCGA		297
	Exon 3	
V D L G T L R G Y Y W Q S E A G S H T Y V Q R H Y G C D V G S D W R		108
GTGACCTGGGACCTCGEGGGCTACTACAACAGAGGGAGGGCCGGTTCACACCGTCCAGATGATGATGGCTGGCAGCTGGGTGGACTGGCC		396
F L R G Y H Q Y A Y D G K D Y I A L K E D L R S W T A A D M A A O		141
YTCTCTGCGGGTACCAACAGTACGCTACGACGGCAAGGATYACATCCCCCTGAAGAGGACCTGGCTGT7TGGACCGCGCGGACATGGCAGCTCAG		495
T T K H K W E A A N Y A E Q L R A Y L E G T C V E W L R R Y L E W		174
ACCACCAAGCACAAAGTGGGAGGCCGCCATGTGGCGGAGCAGTIGAGAGCCTACCTGGAGGGCAGCTGCCTGGATGGCTCCCGAGATACCTGGAGAAC		594
G K E T L Q R T D A P K T N M T H A V S D H E A T L R C M A L S		207
GGGAAGGACACCGCTGACCGGACGGACGCCCCCAAAACGATATGACTCACACCGTGTCTCTGACCATGAAGCCACCTGAGGTGCTGGCCCTGAGC		693
F Y P A E I T L T W O R D G E D O T O D T E L V E T R P A G D G T		240
YTCTACCTGCGGAGTCACTGACTGACCTGGCAGCGGATGGGGAGCACAGCTCAGGATACCGGATCTCTGGAGACCAAGCTGGAGGGATGGAAAC		792
F Q K W A A V V V P S G Q E O R Y T C K V Q H E G L P K P L T L R		373
TTCCAGAGTGGCGGCTGTGGTGGTGCCTTCTGGACAGGACAGAGATACACCTGCCATGTGCAGCATGAGGTTTGGCCAAAGCCCTCACCTGAGA		891
	Exon 5	
W E P S S Q P T I P I V G I I A G L V L F G A V I T G A V V A A Y		406
TGGAGCGCTCTCCAGCCACCATCCCATCTGGGCGATCATTTGCTGGCTGCTTCTT7TGGAGCTGTGATCACTGGAGCTGTGGTCCGTGCTGTG		990
	Exon 6	Exon 7
M W R R K S S D R K G G S Y S O A A S S D S A O G S D V S L T A C		439
ATGTGGAGGAGGAGGCTCAGATAGAAAAAGGAGGGGACTACTCTCAGGCTGCAAGCAGTGCAGTGCCTAGGCTCTGATGTGTCTCACAGCTGT		1089
	Exon 8	
K V		441
AAAGTGTGA		1098

Figura 4.3.3- Secuencia consenso de cDNA y de aminoácidos del antígeno A*0204 analizado. Los 24 primeros nucleótidos se corresponden con la secuencia del oligonucleótido iniciador LPH 5III usado en la PCR. El cambio respecto de A*0201 se encuentra subrayado.

de agarosa de bajo punto de fusión (fig 4.3.4.A y B), se obtuvieron por clonaje en pUC y transformación de bacterias DH5 α F⁻, 65 colonias recombinantes, de las cuales 27 hibridaban con la sonda específica de HLA-A2 (Fig 4.3.4.C). Los clones de cDNA amplificado correspondientes a los transcritos completos de A*0211 de tres de estas colonias (A4, B4 y D8) fueron aislados y subclonados en M13 en la forma descrita, realizándose su completa secuenciación, así como la secuencia con dITP del clon B4. Las tres secuencias fueron idénticas entre sí, salvo una transición de C a T en el nucleótido 53 en el clon A4 (tabla VII), que se atribuyó a una mutación al azar introducida por la polimerasa durante el proceso de amplificación y que implicaría un cambio de Ala a Val en la posición -7 del péptido señal. La secuencia consenso de los tres clones (fig 4.3.5) difiere de A*0201 en dos nucleótidos en las posiciones 290 (cambio de C a T) y 292 (C a G) (fig 4.3.6). Estos cambios corresponden a la segunda posición del codón 73 y a la primera del 74, respectivamente, del exón 2, e implican dos cambios de aminoácidos de Thr₇₃ a Ile₇₃ y de His₇₄ a Asp₇₄. Esta última sustitución justifica el patrón de electroenfoque de este antígeno, que difiere en dos unidades de carga de A*0201, siendo el subtipo más ácido de HLA-A2.

Tabla VII. Cambios de nucleótidos en los clones de cDNA de A*0211 amplificado por PCR*.

<u>Clon</u>	<u>Nucleótido</u>	<u>Aminoácido</u>	<u>Polimorfismo en la posición del cambio</u>
B4	C ₂₉₀ → T	T ₇₃ → I	Polimórfica
	C ₂₉₂ → G	H ₇₄ → D	Polimórfica
D8	C ₂₉₀ → T	T ₇₃ → I	Polimórfica
	C ₂₉₂ → G	H ₇₄ → D	Polimórfica
A4	C ₅₃ → T	A ₋₇ → V	Conservada
	C ₂₉₀ → T	T ₇₃ → I	Polimórfica
	C ₂₉₂ → G	H ₇₄ → D	Polimórfica

* Los cambios se relacionan con la secuencia de A*0201. Las letras en negrilla indican los cambios encontrados en todos los clones.

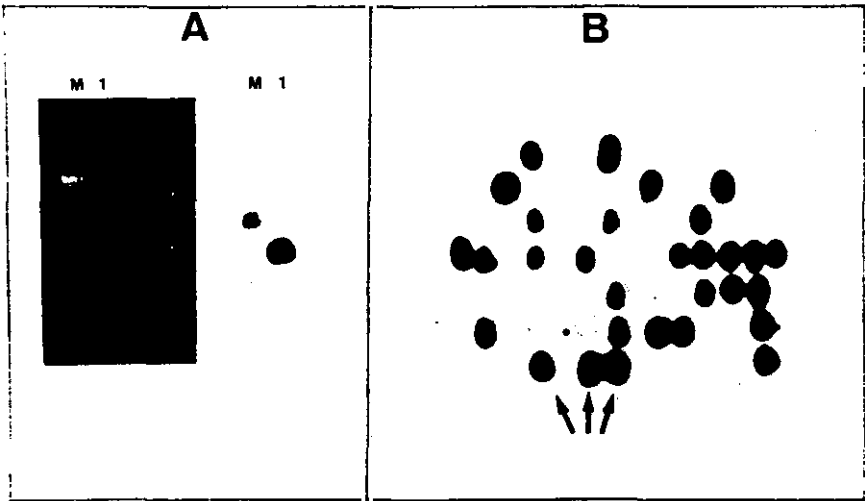


Figura 4.3.4- A) Gel de agarosa de bajo punto de fusión con el material amplificado en la reacción de PCR a partir del cDNA de KIME y Southern blot con la sonda A2 α 2 de una alícuota del material anterior. B) Hibridación con la sonda A2 α 2 de las colonias bacterianas portadoras de plásmido recombinante obtenido por clonaje en pUC del material amplificado por PCR. Las flechas indican las posiciones de colonias con pUC-A*0201, como control de la hibridación.

	Exon 2	
ATGACGGTCATGGCTCCCCGAACCTTCGTCTGCTACTCTCGGGGGCTCTGGCCCTGACCCAGACCTGGGCGGGCTCTCACTCCATGAGGTATTCTTC	L V L L L S G A L A L T G T W A G S N S M R Y F F	9 99
T S V S R P G R G E P R F I A V G Y V D D T O F V R F D S D A A S		42 198
ACATCCGTGTCCCGGCCCGGGCCGGGGAGCCCGCTTCATCGCAGTGGGCTACGTGGACGACACCGAGTTCGTGCGGTTGACACGCGAGGCCCGGAGC		
Q R H E P R A P U I E Q E G P E Y W D G E T R K Y K A H S Q I D R		75 297
CAGAGGATGGAGCCCGGGCCCGTGGATAGACGAGCGGGTCCGGAGTATTGGGACGGGAGACCGGAAGTGAAGGCCCACTCACAGATTGACCGA		
V D L G T L R G Y Y N O S E A G S R T V O R M Y G C D V G S D W R	Exon 3	108 396
GTGGACCTGGGGAACCTGCGCGGCTACTACAACGAGCGAGGCCGGTTCACACCGTCCAGAGGATGTATGGCTGCGAGTGGGTCGGACTGGCGC		
F L R G Y H Q Y A Y D G K D Y J A L K E D L R S V T A A D M A A D		141 495
TTCCCTCCGGGTACCAACAGTACGCTACGACGGCAAGGATTACATCGCCCTGAAAGAGGACCTGCCCTCTTGGACCCGGCGGACATGGCAGCTCAG		
T T K H K W E A A H V A E Q L R A Y L E G T E V E M L R R Y L E H		174 594
ACCACCAAGCACAAAGTGGGAGCGGGCCATGTGGCGGAGCAGTTCAGAGCCTACCTGGAGGGCAGTGGTGGATGGCTCCGCAGATACCTGGAGAAC		
G K E T L Q R T D A P K T H M T H H A V S D H E A T L R C W A L S	Exon 4	207 693
GGGAAGGAGACGCTGCAGCGCACGGACGCCCCCAAACGCATATGACTCACACCGCTGTCTGACCATGAAGCCACCTCAGGTGCTGGCCCTGAGC		
F Y P A E I T L T W O R D G E D G T Q D T E L V E T R P A G D G T		240 792
TTCTACCTCGCGGATACACTGACCTGGCAGCGGGATGGGAGGACCAGACCCAGGACACCGAGCTCGTGGAGCACGACCTCGCAGGGATGGAAAC		
F Q K W A A V V V P S G Q E O R Y T C H V D H E C L P K P L T L R		373 891
TTCCAGAGTGGCGGCTGTGGTGGCTTCTGGACAGGAGCAGAGATACACCTGCCATGTGCAGCATGAGGTTTCCCAAGCCCTCACCCTGAGA		
W E P S S O P T I P I V G I I A G L V L F G A V I T G A V V A A V	Exon 5	406 990
TGGAGCCGCTTCCDAGCCACCATCCCATCGTGGCATCATTGCTGGCCTGGTCTCTTTGGAGCTGTGATCACTGGAGCTGTGGTCCGCTGCTGTG		
M W R R K S S D R K G G S Y S O A A S S D S A G G S D V S L T A C	Exon 6	439 1089
ATGTGGAGGAGGAAGAGCTCAGATAGAAAAGGGGAGCTACTCTCAGGCTGCAAGCAGTGCAGTGCACAGGCTCTGATGTGTCTCACAGCTTGT	Exon 7	
K V	Exon 8	441 1098
AAAGTGTGA		

Figura 4.3.5- Secuencia consenso de cDNA y de aminoácidos del antígeno A*0211 analizado. Los 24 primeros nucleótidos se corresponden con la secuencia del oligonucleótido iniciador LPH III usado en la PCR. Los cambios respecto de A*0201 se encuentran subrayados.

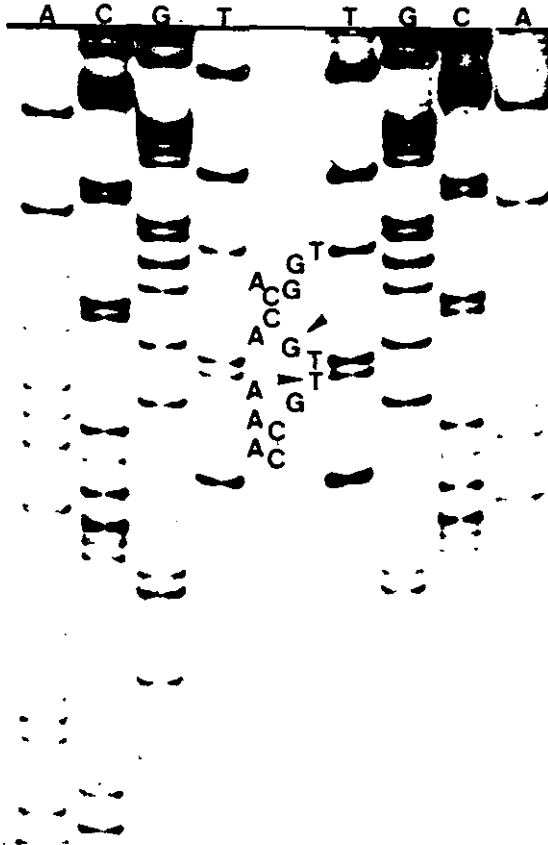


Figura 4.3.6- Gel de secuencia de los clones B4 y D8 entre las bases 263-320. en el que se muestra el cambio de las posiciones 290 y 292, que presentan T y G, respectivamente.

5. *DISCUSSION*

5. DISCUSION

5.1 ANTIGENO HLA-A*0209 EXPRESADO EN OZB: POLIMORFISMO EN EL DOMINIO

$\alpha 3$.

Como hemos visto, la heterogeneidad inmunológica y estructural de la familia de antígenos HLA-A2 ha sido muy ampliamente analizada. En este estudio, hemos analizado la relación estructural de la variante de A2 expresada en el individuo OZB con los demás subtipos conocidos, mediante el mapeo peptídico comparativo con A*0201 y secuenciación radioquímica de los péptidos de diferencia. El único cambio detectado de Glu en sustitución de Ala en la posición 236 de la variante A*0209 de OZB, justifica la diferencia de patrón de electroenfoque entre estas dos moléculas (una unidad de carga) y establece que la identidad de pI con el subtipo A*0203 no implica una mayor similitud estructural con dicho subtipo. En realidad, A*0209 es más análogo al subgrupo A2.4 (antígenos A*0206 y A*0207) puesto que presentan también una única diferencia de aminoácido respecto de A*0201, pero en el caso de A*0209 esta diferencia implica un cambio de carga. El hecho de que este cambio de aminoácido pueda resultar de un único cambio de base en la secuencia nucleotídica (GCA a GAA) sugiere que puede haberse generado por mutación puntual, puesto que además no está presente en ningún otro antígeno de clase I. Así, esta variante constituye un ejemplo más de la significativa contribución de este mecanismo al proceso de diversificación del antígeno HLA-A2 (120, 121). Esta situación contrasta con su aparente ausencia en la generación de mutantes murinos de H-2 (70) y sugiere que la serie de mutantes bm de ratón sólo es un ejemplo de parte de los mecanismos genéticos que contribuyen a la generación del polimorfismo en las moléculas de clase I. Análogamente, en el caso de HLA-B27, la conversión génica, o mecanismos análogos, son predominantes en la generación de polimorfismo (199, 103). Por tanto, es concebible que para distintos loci o alelos de clase I la frecuencia con que operan los distintos mecanismos de diversificación sea diferente.

La variante A*0209 es única entre todas las de clase I en el hecho de que el único cambio detectado respecto del subtipo mayoritario se localiza en el dominio $\alpha 3$. Todas las demás variantes de HLA y mutantes de H-2 presentan cambios en los dominios $\alpha 1$ y/o $\alpha 2$, pero no en $\alpha 3$. Como ya hemos descrito, la mayoría de las posiciones polimórficas de los antígenos de clase I se localizan en los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$, siendo el polimorfismo en $\alpha 3$ mucho más limitado. A nivel de DNA, los cambios de base en el exón 4 codificante de $\alpha 3$ tienden a ocurrir preferentemente en la tercera base del codón (75% de los cambios detectados), mientras que la frecuencia de cambios en las tres posiciones del codón en los exones 2 y 3 es similar (61). Esto se traduce en la

generación de mucha mayor variabilidad de aminoácidos en $\alpha 1$ y $\alpha 2$ respecto de $\alpha 3$, mientras que la diversidad a nivel de DNA es similar. Tal patrón de variabilidad reflejaría la existencia de presiones selectivas a favor de un mayor polimorfismo en $\alpha 1$ y $\alpha 2$, y hacia la conservación de $\alpha 3$. Las bases funcionales de esta distribución diferencial del polimorfismo se encuentran en la participación de los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ en el reconocimiento por CTLs, mientras que $\alpha 3$ tendría un papel estructural en la interacción con la $\beta 2$ -microglobulina y con CD8 y en la estabilización de la estructura de $\alpha 1$ y $\alpha 2$ (201, 80). Por ello, los cambios en el dominio $\alpha 3$ estarían severamente restringidos. Puesto que $\alpha 3$ presenta un plegamiento en láminas β , similar a las inmunoglobulinas, es probable que cambios no conservativos en este dominio no puedan acomodarse en las cadenas β . De hecho, la estructura tridimensional de HLA-A2 muestra que la posición 236 se localiza justamente al final de una cadena β ($\beta 4$), donde los requerimientos estructurales podrían ser menos estrictos (fig. 5.1).

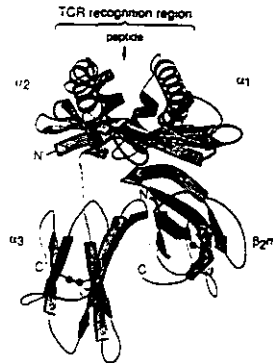


Figura 5.1- Localización de la posición 236, sustituida en A*0209, en la estructura terciaria de HLA-A2.

La caracterización de una variante natural con cambios solamente en $\alpha 3$ proporciona una nueva herramienta para el estudio de la participación de este dominio en el reconocimiento por de los antígenos de clase I por CTLs. El papel de $\alpha 1$ y $\alpha 2$ en la determinación de la especificidad de reconocimiento por CTLs ha sido muy claramente establecido por distintas líneas de evidencia. En primer lugar, la mayoría de las posiciones polimórficas se localizan en estos dos dominios (58). En segundo lugar, un reducido número de cambios de aminoácidos en estos dominios, como los presentes en las variantes de HLA, los mutantes de H-2 o los generados por mutagénesis dirigida, afectan drásticamente al reconocimiento por CTLs (103). En tercer lugar, los estudios de intercambio de exones han demostrado que la especificidad del reconocimiento por CTLs de las moléculas híbridas se correlaciona con los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$, mientras que $\alpha 3$ sólo juega un papel en la destrucción de algunos epítomos reconocidos en los otros dominios (202), al contrario de lo que ocurre con anticuerpos que sí son capaces de reconocer específicamente el dominio $\alpha 3$. Los estudios con moléculas híbridas no han detectado CTLs capaces de reconocer polimorfismo en $\alpha 3$ (202). Estos datos coinciden con los derivados del estudio de líneas policlonales de CTLs específicos de A*0201, que no son capaces de diferenciar ambos antígenos (109). Sin embargo, algunos clones alógenicos específicos de A2 son capaces de diferenciar A*0201 de A*0209 (203), lo que sugiere que el cambio observado en esta variante afecta al reconocimiento individual de algunos clones. Un estudio previo demostró que CTLs generados frente a moléculas de clase I truncadas carentes de los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ eran capaces de reconocer polimorfismo en $\alpha 3$, si bien estos CTLs no podían reconocer moléculas intactas de clase I (204). También se ha demostrado el reconocimiento diferencial por CTLs de los alelos murinos de B2m, con cambios en la posición 85, cercana a los residuos 1 y 3 que se sitúan en la interfase $\beta 2m-\alpha 2$ y por tanto pueden alterar la estructura del sitio de unión del antígeno (205-207). Estas evidencias, junto con los datos de A*0209, sugieren que cambios estructurales limitados localizados fuera de los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ pueden influir en el reconocimiento por CTLs. Los clones específicos de A2 cuya reactividad se ve alterada por el cambio en la posición 236 de A*0209, también reconocen cambios en $\alpha 1$ y $\alpha 2$, puesto que no reconocen otros subtipos con cambios en estos dominios (203). Esto sugiere que, o bien estos clones reconocen epítomos conformacionales formados por residuos de los tres dominios, o, lo que es más probable, que el cambio en la posición 236 tiene un efecto indirecto en los epítomos localizados en los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$. Esta posibilidad es sugerida por la localización de la posición 236 en una zona de la estructura terciaria de la molécula involucrada en contactos entre dominios (101). El átomo de oxígeno del grupo carbonilo de la Ala₂₃₆ interacciona mediante

puentes de hidrógeno con las cadenas laterales de los aminoácidos 12 y 24 de la $\beta 2m$. Por su parte, los residuos adyacentes 234, 235, 237 y 238 interactúan con las posiciones 8, 10, 12, 26, 65 y 99 de $\beta 2m$ y el residuo 234, además, se encuentra en las proximidades de los aminoácidos 27 y 33 de $\alpha 1$ (101). Es posible, por tanto, que este cambio no conservativo provoque alteraciones en la estructura de la molécula que influyan en la conformación de la lámina β del sitio de unión de péptido y altere la capacidad presentadora de HLA-A2. Por tanto, el efecto de la mutación en A*0209 sobre el reconocimiento alogénico es de naturaleza diferente al observado en las moléculas Aw68.1 y D^q(34.2.12^a) (24, 208). En estos antígenos, los cambios en las posiciones 245 y 227, respectivamente, impiden la interacción del antígeno de clase I con la molécula CD8 de los CTLs, alterando la capacidad de reconocimiento por CTLs específicos de baja avididad, que necesitan la interacción del complejo trimolecular CD8-TCR-antígeno de clase I para la lisis de la célula diana (165). El cambio en la posición 236 no afecta a la interacción con CD8, que si se ve afectada por alteraciones conservativas en las posiciones 233 y 235, que interactuarían directamente, aunque no de manera esencial, con CD8. Al contrario que en el resto de las variantes de HLA, el cambio detectado no forma parte del sitio de unión del antígeno donde se localizan los residuos de $\alpha 1$ y $\alpha 2$ que participan esencialmente en el reconocimiento por células T (59). En cualquier caso, la correlación de la estructura de A*0209 con el patrón de su reconocimiento diferencial por algunos clones de CTLs indica que el polimorfismo en $\alpha 3$ puede influir en la especificidad de reconocimiento por CTLs en un antígeno natural de clase I. Así pues, la determinación de la estructura de A*0209 puede servir para generar CTLs que reconozcan específicamente cambios en $\alpha 3$, y valorar la contribución del polimorfismo de esta región a la capacidad de HLA-A2 como molécula presentadora de antígenos.

5.2 REACTIVIDAD DE LA LINEA ALOGÉNICA CTL14: RECONOCIMIENTO ALOGÉNICO DE HLA-A2 MEDIADO POR PEPTIDOS ENDOGENOS.

El análisis estructural de antígenos de clase I homogéneos serológicamente pero reconocidos diferencialmente por CTLs alogénicos ha permitido correlacionar la falta de reactividad con cambios en la estructura primaria del aloantígeno (103). Frecuentemente tales cambios se localizan en las α -hélices del sitio de unión del péptido, con las cadenas laterales de los residuos implicados dirigidas hacia el interior del sitio. Algunas veces, como es el caso de A*0206 y A*0207, un único aminoácido situado en la lámina β , en el fondo del sitio, es el responsable de las diferencias en el reconocimiento por CTLs. Esto sugiere que el efecto del polimorfismo de

subtipos en el reconocimiento alógeno es debido a la modulación en la unión de péptidos antes que a un efecto directo en la estructura del aloantígeno. Sin embargo, esta última posibilidad no puede ser descartada pues puede argüirse que un cambio de aminoácido puede influenciar la orientación de cadenas laterales vecinas más accesibles al TCR.

En esta parte de la tesis hemos examinado la estructura de moléculas de HLA-A2 que eran diferencialmente reconocidas por poblaciones policlonales de CTLs específicos de este antígeno y demostrado que tal distinción se realizaba entre antígenos con la misma secuencia de aminoácidos. Para ello hemos utilizado dos técnicas: mapeo peptídico comparativo y secuenciación de transcritos enteros de cDNA amplificados por PCR. La primera aproximación no permite descartar formalmente que hayan tenido lugar cambios de aminoácidos altamente conservativos sin efecto en el perfil cromatográfico de los péptidos correspondientes. Sin embargo, la alta sensibilidad de esta técnica ha quedado demostrada en múltiples estudios en los que la secuencia de aminoácidos así determinada fue totalmente confirmada por secuenciación del DNA correspondiente (119, 199, 200). Mediante mapeo peptídico hemos proporcionado evidencia de la identidad estructural de dos antígenos A2.4, A2-SCHU y A*0206, distinguidos por CTL14. También hemos demostrado que los antígenos A2.1 expresados por células diana susceptibles y resistentes a la lisis por CTL14, eran indistinguibles de A*0201 por esta técnica, lo que sugiere que ambos antígenos eran moléculas A*0201 idénticas. La secuenciación de múltiples clones correspondientes a transcritos enteros de cDNA obtenidos por amplificación mediante PCR, es una aproximación fiable para la determinación de la secuencia de antígenos de clase I (113). Con esta aproximación hemos demostrado que A2-SCHU es idéntico al antígeno A*0206 expresado en CLA, diana susceptible a la lisis por CTL14. Así, a nivel de DNA, A2-SCHU difiere, como A*0206 en CLA, de A*0201 en un único cambio no sinónimo en el codón 9 (T a A en el nucleótido 98) y un cambio silencioso en el 10 (A a C en el nucleótido 102).

Existen dos posibles interpretaciones para estos resultados. Según la primera, CTL14 reconocería A*0201 y A*0206, pero la susceptibilidad a la lisis de las correspondientes células diana dependería de diferencias en factores no específicos que influyen en la avidéz, como los patrones de glicosilación de la superficie celular o la densidad de moléculas de adhesión. Esta posibilidad es muy improbable, ya que el patrón de reactividad de CTL14 fue establecido con linfocitos de sangre periférica de múltiples individuos y las mismas dianas fueron utilizadas con otros CTLs, mostrando patrones de reactividad totalmente diferentes (109). Una segunda alternativa más probable, sería que CTL14 reconoce un péptido asociado a HLA-A2. Este péptido

estaría presente únicamente en una fracción de los individuos A2*, puesto que CTL14 reacciona con 14 de los 33 individuos A2.1* analizados. Una posible explicación es que el péptido implicado provenga de una proteína polimórfica expresada únicamente en el 50% de los individuos analizados. Otra posibilidad sería la existencia de polimorfismo en las proteasas o proteínas transportadoras de péptidos que participan en el procesamiento intracitoplásmico, si bien esta alternativa implicaría una mayor frecuencia de este tipo de reactividades en los análisis de CTLs, tanto alogénicos, como restringidos. Ambas interpretaciones suponen que al menos parte de los CTLs alorreactivos dependen críticamente en su especificidad, del reconocimiento conjunto de péptidos específicos unidos al aloantígeno, por lo que serían CTLs alorrestringidos.

La interpretación sugerida del patrón de reactividad de CTL14 implica que una fracción considerable de los clones alorreactivos de esta población policlonal debe reconocer un péptido presentado por HLA-A2. Sin embargo, es presumible que múltiples péptidos endógenos estén unidos al aloantígeno, lo que requiere una explicación a la aparente limitación de especificidades clonales en la línea CTL14. El antígeno estimulador utilizado para generar CTL14, fue A*0207, que difiere de los otros subtipos reconocidos por CTL14, A*0201 y A*0206, en uno y dos aminoácidos respectivamente, localizados en la lámina B del fondo del sitio de unión del antígeno y que alteran la capacidad de presentación de péptidos por HLA-A2 (119, 137, 138). Es previsible que sólo una fracción de los péptidos endógenos presentados por A*0207 puedan ser presentados también por A*0201 y A*0206. De esta manera, sólo aquellos clones capaces de reconocer péptidos en asociación con estos tres subtipos serían los responsables de la reacción cruzada que presenta CTL14. Dos características de la reactividad de esta línea sugieren que una mayoría de su población de células T presentan esta especificidad: primero, la eficiencia lítica hacia las dianas susceptibles que presentan cualquiera de los tres subtipos era muy similar; segundo, los estudios de inhibición fría mostraban una fuerte inhibición de la lisis de las células estimuladoras tanto por dianas A*0201 como A*0206 frías. Estos estudios también descartan la posibilidad de que dos subpoblaciones distintas de células T sean responsables de la reacción cruzada con células A*0201 o A*0206. Por tanto, parece que bajo las condiciones en que fue obtenida CTL14, un complejo concreto de péptido + HLA-A2 habría tenido una estructura inmunodominante contra la que se dirigió la mayor parte de la respuesta alorreactiva. El aislamiento de péptidos endógenos unidos a antígenos de clase I ha demostrado que el número de péptidos mayoritarios unidos a un determinado antígeno en la superficie celular puede ser relativamente limitado (180). Por tanto, es posible que el número de complejos MHC + péptido con alto poder de estimulación alogénica

sea reducido. Además, la naturaleza de los epítomos inmunodominantes puede ser influenciada por la combinación específica de respondedor y estimulador utilizada.

Una cuestión fundamental es en que medida los péptidos endógenos unidos constitutivamente afectan esencialmente a la especificidad del alorreconocimiento. El análisis mediante mapeo peptídico comparativo de 3 variantes de HLA-B7 definidas por CTLs (B*0702, B7.1 y B7.4) que eran reconocidas diferencialmente por una serie de clones específicos de HLA-B7 (209), mostró que eran indistinguibles de B*0702 (210). Esto sugiere también que los clones de CTLs utilizados en la definición de dichas variantes podrían reconocer B*0702 en una manera alorrestringida en asociación con péptidos diferencialmente expresados en la población. La misma situación ha sido descrita en antígenos de clase II, donde CTLs alogénicos dirigidos frente a una especificidad DR, diferencian células dianas provenientes de individuos diferentes que portan la misma cadena β (211). Asimismo, han sido descritos diversos ejemplos de CTLs alogénicos cuya reactividad depende, presumiblemente, del reconocimiento de péptidos endógenos derivados del MHC, presentados por el aloantígeno (147-151, 155-157, 212). Sin embargo, es probable que la mayoría de los péptidos endógenos no sean polimórficos dentro de una misma especie, por lo que los CTLs alorreactivos que reconocerían estos péptidos en el contexto de un aloantígeno dado no revelarían su naturaleza alorrestringida en los análisis de panel, especialmente si se utilizan células diana de linajes similares. La dependencia del reconocimiento o patrón de especificidad fina de algunos clones alorreactivos del tipo celular de las células diana, apoya esta hipótesis (152-154). Además, pueden generarse gran número de precursores de CTLs alorrestringidos en condiciones adecuadas de estimulación "in vitro" de linfocitos T periféricos con células alogénicas infectadas con virus, lo que indica que los complejos péptido+aloantígeno pueden producir respuestas alorrestringidas (213).

En resumen, nuestros datos sugieren la naturaleza alorrestringida de una línea de CTLs alogénicos, debido a la identidad estructural de los antígenos diana reconocidos diferencialmente. Esto se añade a la evidencia en otros sistemas experimentales que muestran la implicación de péptidos en el alorreconocimiento y la capacidad de las poblaciones de células T de generar CTLs alorrestringidos, por lo que sugerimos que el reconocimiento conjunto de péptidos y antígenos del MHC es una característica frecuente entre las células alorreactivas. Por tanto, el reconocimiento alogénico y el restringido compartirían similares bases estructurales, al menos en una fracción de los CTLs alogénicos.

5.3 ANTIGENOS HLA-A*0204 Y HLA-A*0211: LA SELECCION NATURAL COMO MOTOR DE LA DIVERSIFICACION DE HLA-A2.

La secuencia de A*0204 revela la existencia de una única sustitución de Arg₉₇ por Met₉₇, lo que justifica el patrón de electroenfoque de este subtipo, pues implica la pérdida de una unidad de carga positiva respecto de A*0201, siendo su carga neta idéntica a A*0203 (112). La pequeña deferencia en el pI entre estos dos subtipos es atribuible a la diferente naturaleza de los residuos cargados sustituidos en ambos subtipos (Val₁₃₃ a Glu₁₃₃ en A*0203) y a la influencia de estos cambios en el pK de residuos cercanos a cada uno de ellos. Un efecto análogo en el patrón de IEF de sustituciones que no involucran cambio de carga ha sido observado entre los subtipos de HLA-B27, B*2704 y B*2705 (214).

Entre A*0204 y A*0201 existe un único cambio de base en la posición 362 que es el responsable del cambio de aminoácido en la posición 97. Esto sugiere que A*0204 deriva de A*0201 por un único proceso de mutación puntual. La metionina en la posición 97 se encuentra en otras moléculas del locus A, pero asociada a cambios en posiciones muy cercanas como la 95 en el caso de A68.1 y Aw19 (A29, A31, A32 y Aw33) (61). Por ello, parece improbable que este cambio haya sido introducido por medio de conversión génica interalélica, pues uno de los puntos de ruptura en el intercambio de DNA estaría muy cercano al de la mutación detectada (base 356). Si esta interpretación es correcta, la introducción de la Met₉₇ mediante mutación puntual indicaría que mutaciones recurrentes pueden introducir el mismo cambio en la misma posición mas de una vez durante el proceso de diversificación de los antígenos de clase I. Sin embargo, no es descartable la existencia de conversiones génicas que afecten a segmentos muy limitados y que introduzcan cambios únicos. Los antígenos A31, Aw33 y A68.1 podrían actuar como donadores en un fenómeno de conversión génica de estas características, por transferencia del fragmento 356-390, como máximo, de su secuencia de DNA. A*0204 ha sido detectado únicamente en indios sudamericanos y podría estar presente en una alta proporción en esta población. Además, este subtipo está ausente entre los indios norteamericanos y mejicanos examinados, lo que sugiere su reciente aparición, probablemente tras la diferenciación étnica de los indios americanos ocurrida hace 16000-40000 años (215). Significativamente, el antígeno A31 está presente en una alta proporción en las poblaciones indias, por lo que podría ser un candidato idóneo para proporcionar el DNA donador en una hipotética conversión génica.

A*0211 presenta dos únicas sustituciones a nivel de DNA en las posiciones 290 (C a T) y 292 (C a G) lo que se traduce en dos cambios en la secuencia de aminoácidos en las posiciones

73 (Thr a Ile) y 74 (His a Asp), la última de las cuales explica el patrón de IEF, en el que A*0211 difiere de A*0201 en dos unidades de carga (112).

La secuencia encontrada en A*0211 de Ile₇₃-Asp₇₄ es muy poco frecuente entre los antígenos HLA de clase I y sólo se ha encontrado en HLA-A31 y Aw33 (216). La presencia de esta secuencia en subtipos de HLA-A2 es particularmente sorprendente puesto que el residuo 73 es Thr en todos los antígenos A y B, excepto A*0211, A31 y A33, mientras que el Asp₇₄ es frecuente entre los antígenos de los tres loci excepto en los antígenos HLA-A2 que presentan His de manera exclusiva en esta posición. Existen dos posibles explicaciones para el origen de A*0211. Una sería una conversión génica interalélica en la que participarían HLA-A31, -Aw33 u otro antígeno desconocido con esta secuencia, como genes donadores, según sugiere la identidad de las secuencias de DNA en esta región (fig 5.2). Una segunda posibilidad sería que la secuencia de A*0211 derive de un precursor común a todos los antígenos HLA-A2, que contuviera la secuencia consenso de HLA, ACT GAC, en los codones 73-74 (61). Dos mutaciones independientes en este ancestro hubieran generado A*0211 (A₁₁T GAC) y la secuencia de todos los demás subtipos (ACT CAC). Las secuencias de A31 y Aw33 en estos codones se habrían generado a partir de los precursores correspondientes que tuvieran la secuencia consenso ACT GAC, mediante una mutación recurrente en el codón 73. No hay ninguna evidencia sustancial que favorezca una de estas alternativas. Sin embargo, apoyamos la primera posibilidad en base a los patrones de distribución de los subtipos de HLA-A2. Así, A*0201, el subtipo mayoritario, se encuentra en todos los grupos étnicos principales, mientras que los demás subtipos tienen una distribución étnica mas restringida. Por ello es probable que la mayoría de los subtipos (excepto los del subgrupo A2.2) deriven de A*0201 en vez de un antepasado común a HLA-A2. Además,

	70					77			281				303
HLA-A2	H	S	Q	T	H	R	V	D	CACTCACAGACTCACCGAGTGGAC				
HLA-A*0211	-	-	-	I	D	-	-	-	-----T-G-----				
HLA-Aw33	-	-	-	I	D	-	-	-	-----T-G-----				
HLA-A31	-	-	-	I	D	-	-	-	-----T-G-----				
A-CONSENSUS	-	-	-	-	D	-	-	-	-----G-----				

Figura 5.2- Comparación de las secuencias de aminoácidos y de DNA entre A*0211 y otros alelos HLA en la región de diferencia con A*0201 (216).

la segunda explicación implicaría que A*0211 se habría generado en tiempos muy remotos (antes de la divergencia entre A*0201 y A2.2, que precede a la aparición del homo sapiens) (117) y habría permanecido intacto, sin sufrir ningún tipo de diversificación posterior, lo cual, teniendo en cuenta la dinámica del sistema descrita en esta tesis, es altamente improbable. Una situación análoga se observa entre los subtipos de HLA-B27. Por tanto, la conversión génica interalélica proporcionaría un mecanismo de generación de A*0211 mediante un único acontecimiento genético a partir de A*0201. Si bien este mecanismo es difícil de probar mediante la determinación de secuencias, ha sido propuesto como mecanismo esencial en la generación del polimorfismo de los antígenos HLA (61), incluyendo la generación de otros subtipos de HLA-A2 como A*0203, A*0205, A*0206 y A*0210 (117, 115, 119, 122). Además, hay que resaltar el hecho de que las poblaciones orientales y de indios americanos presentan las más altas frecuencias de Aw33 y A31, respectivamente, lo que favorece la posibilidad de conversión génica en HLA-A2 con fragmentos de DNA de estos genes donadores (217).

El residuo 97 se localiza en la cadena B1 del dominio $\alpha 2$, que cubre los residuos 92-104, situada en la lámina β del fondo del sitio de unión del antígeno, con su cadena lateral dirigida hacia el interior del sitio. Participa en la formación de los subsitios C y E y es parte esencial del surco prominente que cruza la lámina β en HLA-A2 (79, 101). Por tanto, el cambio de A*0204 puede afectar a la unión de péptidos y, por ello, al reconocimiento por células T. Así pues, al igual que los demás subtipos de HLA-A2, A*0204 debe ser un alelo funcionalmente distinto.

Por su parte los dos residuos 73 y 74 alterados en A*0211 se localizan en la hélice α larga del dominio $\alpha 1$ dirigidos hacia el interior del sitio de unión del antígeno. Por tanto, como hemos descrito que ocurre en el polimorfismo de los subtipos, su localización espacial puede influenciar la unión de péptido y el reconocimiento por células T, puesto que forman parte esencial del subsitio C. Así, el cambio único de la posición 74 altera tanto el reconocimiento por CTLs alogénicos (143) como el de CTLs específicos de nucleoproteína de influenza restringidos por A*0201 (137). Por ello, son susceptibles de sufrir presión selectiva en base a la funcionalidad de HLA-A2 como molécula presentadora.

Si analizamos la localización espacial de las posiciones polimórficas de todos los subtipos de HLA-A2, encontramos un sorprendente agrupamiento de los residuos polimórficos en una zona limitada de la lámina β en el fondo del sitio de unión del péptido (fig. 5.3). De las 13 posiciones polimórficas detectadas en los subtipos, 10 se localizan en el sitio de unión del antígeno. De ellas tres, las posiciones 95 (cambiada en A*0202, A*0205 y A*0208), 97 (A*0204) y 99 (A*0207 y

A*0210), ocupan posiciones alternantes en la misma cadena B (cadena B1 del dominio $\alpha 2$). Una cuarta, la posición 9 (A*0205, A*0206 y A*0208) se sitúa en una cadena B adyacente (cadena B1 de $\alpha 1$), estando en contacto con las tres posiciones 95, 97 y 99. En los diferentes subtipos pueden producirse cambios en cada una de estas cuatro posiciones separadamente o en combinación con otras de este grupo, encontrándose hasta 3 aminoácidos diferentes en la posición 99 en los diferentes subtipos. Así, existen siete combinaciones diferentes con estas cuatro posiciones en los once subtipos de HLA-A2 analizados, lo que iguala el número total de combinaciones encontrado entre todas las demás especificidades del locus A de secuencia conocida (tabla VIII). Estos cuatro residuos dirigen sus cadenas laterales hacia el interior del sitio de unión del antígeno, por lo que su variación puede modular la especificidad de la unión del péptido y contribuir significativamente a la diferencia en las propiedades como moléculas presentadoras de antígenos de los distintos subtipos. De hecho, el cambio individual de las posiciones 9, 95 y 99 altera la capacidad de reconocimiento en células T tanto alogénicas como restringidas (109, 117, 119, 137, 141, 143). Los residuos 73 y 74 cambiados en A*0211, se encuentran espacialmente muy cercanos al agrupamiento de las posiciones polimórficas 9, 95, 97 y 99 de la lámina B. El residuo 74 en particular, está en contacto con los residuos 95 y 97 y la sustitución de His_n por Asp_n, origina un subsitio cargado negativamente delimitado también por las cadenas laterales de los residuos 9, 70, 73, 95 y 97 (101, 102). Las cuatro posiciones polimórficas restantes del sitio de unión del antígeno se sitúan en la hélice α de $\alpha 1$ (residuo 66 en A*0208) o en la de $\alpha 2$ (residuos 149, 152 y 156 en A*0203, y 152 en A*0202, A*0205 y A*0208). Tan sólo tres combinaciones diferentes han sido generadas por el polimorfismo de los subtipos de HLA-A2 en el agrupamiento de la hélice α del segmento 149-156.

Este patrón de polimorfismo encontrado en HLA-A2 es muy diferente del observado entre los subtipos de HLA-B27, que constituye el otro grupo de alelos de clase I cuyo polimorfismo ha sido analizado en profundidad (103). El agrupamiento de residuos en la lámina B que genera la mayor parte del polimorfismo en HLA-A2 está conservado en los seis subtipos conocidos de HLA-B27. Por el contrario, existen cuatro combinaciones diferentes de residuos polimórficos en el segmento de la hélice α que cubre los residuos 74-81. Este segmento, cuya relevancia en el reconocimiento por células T ha sido suficientemente demostrada, está totalmente conservado entre todos los subtipos de HLA-A2, excepto la posición 74 de A*0211. Esto sugiere que la diversificación de subtipos entre antígenos de clase I tiende a ocurrir preferencialmente en zonas del sitio de unión del antígeno espacialmente localizadas, con relevancia funcional, siendo dichas

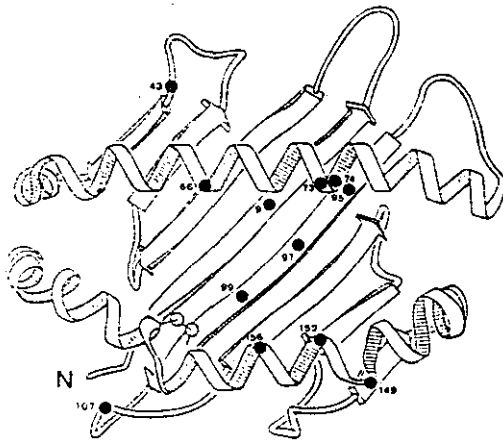


Figura 5.3- Localización en el sitio de unión del antígeno de los residuos polimórficos en los subtipos de HLA-A2, excepto el cambio en la posición 236 de $\alpha 3$ presente en A*0209.4

Table VIII. Patrones de polimorfismo de la lámina β en los subtipos de HLA-A2*.

SUBTIPO	POSICION			
	9	95	97	99
A*0201. 03. 09. 11	F	V	R	Y
A*0202	F	L	R	Y
A*0205. 08	Y	L	R	Y
A*0206	Y	V	R	Y
A*0207	F	V	R	C
A*0210	Y	V	R	F
A*0204	F	V	M	Y

* Los cambios de aminoácidos en cada posición respecto del subtipo A*0201 se indican en negrilla.

zonas diferentes para los distintos antígenos. Sugerimos que, dependiendo de la particular especificidad de presentación de péptidos de un antígeno determinado, la presión selectiva favorecería la acumulación de las diferencias entre subtipos en ciertas regiones de la molécula, debido al efecto que el polimorfismo de dichas posiciones pueda tener en la presentación antigénica por parte de un antígeno HLA determinado.

La marcada diferencia en los patrones de distribución étnica de los distintos subtipos de HLA-A2 y la significativa frecuencia de algunos subtipos (como A*0204) en grupos étnicos particulares, puede estar determinada por factores estrictamente genéticos, pero también, como sugieren nuestros datos, por la distinta ventaja selectiva proporcionada por subtipos individuales como moléculas presentadoras de antígenos para la interacción con patógenos específicos en tales poblaciones.

Puesto que A*0211 y A*0204 fueron detectadas mediante IEF la acumulación de cambios de los subtipos en este área funcionalmente crítica no está predeterminada por los procedimientos de detección de los subtipos (habitualmente, variantes funcionales detectadas por su reactividad con CTLs). Por tanto, aunque no existen estudios de población relativos a A*0204 y A*0211, sus secuencias refuerzan el concepto de que la diversificación de HLA-A2 está dirigida por un proceso selectivo que tiende a modificar predominantemente una región particular del sitio de unión del antígeno. Esta región está formada por residuos en dos cadenas β que forman la interfase $\alpha 1$ - $\alpha 2$ y por residuos muy cercanos en la hélice α de $\alpha 1$. Probablemente, la principal fuerza selectiva es el efecto que las mutaciones en dicha región tienen en la especificidad de presentación de péptidos por parte de HLA-A2 y es ejercida fundamentalmente a través de la interacción con los patógenos del entorno en el que habitan las distintas poblaciones en un proceso de selección natural.

5.4 DISCUSION GENERAL: IMPLICACIONES FUNCIONALES Y EVOLUTIVAS DEL POLIMORFISMO DE HLA-A2. RECAPITULACION.

Los datos de caracterización estructural de tres nuevos subtipos aportados en la presente tesis permiten una evaluación mas extensa de los mecanismos evolutivos que operan en el proceso de diversificación del antígeno HLA-A2 (tabla IX). Dos son los mecanismos fundamentales que han generado el polimorfismo de subtipos:

- mutación puntual, operante, al menos, en: 1) el cambio del aminoácido 43 de Q-->R, derivado del cambio de la base 200 A-->G, presente en los alelos del subgrupo A2.2. puesto que

Tabla IX. Resumen de las diferencias entre los distintos subtipos de HLA-A2 respecto de A*0201.

<u>Denominación subtipo</u>			<u>Aminoácido</u>		<u>Nucleótido</u>		<u>Técnica</u>	<u>Ref</u>
<u>X.W.H.</u>	<u>Antigua</u>	<u>Célula</u>	<u>Posición</u>	<u>Cambio</u>	<u>Pos.</u>	<u>Cambio</u>		
A*0201	A2.1	JY					Sec. proteica	76
		LCL721					PCR	86
							clon genómico	113
A*0202	A2.2F	M7	43	Q-->R	200	A-->G	Mapeo peptídico	114
		DR1	95	V-->L	355	G-->C	Clon genómico	115
			156	L-->W	539	T-->G		
A*0203	A2.3	DK1	149	A-->T	517	G-->A	Mapeo peptídico	116
		DEW	152	V-->E	527	T-->A	Clon genómico	115
			156	L-->W	539	T-->G		
A*0204		RML	97	R-->M	362	G-->T	PCR	*
A*0205	A2.2Y	AM	9	F-->Y	98	T-->A	Clon genómico	117
		WT49	43	Q-->R	200	A-->C	Clon genómico	117
			95	V-->L	355	G-->C		
			156	L-->W	539	T-->G		
A*0206	A2.4a	CLA	9	F-->Y	98	T-->A	Mapeo peptídico	118
					102	A-->C	Clon genómico	119
		T7527					PCR	61
A*0207	A2.4b	KNE	99	Y-->C			Mapeo peptídico	120
A*0208	A2.4c	KLO	9	F-->Y			Mapeo peptídico	121
			43	Q-->R				
			66	K-->N				
			95	V-->L				
			156	L-->W				
A*0209	A2-OZB	OZB	236	A-->E			Mapeo peptídico	*
A*0210	A2-LEE	LEE	9	F-->Y	98	T-->A	Clon genómico	122
			99	Y-->F	102	A-->C		
			107	W-->G	368	A-->T		
					391	T-->G		
A*0211	A2.5	KIME	73	T-->I	290	C-->T	PCR	*
			74	H-->D	292	C-->G		

* Esta tesis

ni la G ni la Arg están presentes en esas posiciones en ningún otro alelo del locus A secuenciado, y, aunque está presente en todos los alelos B, la presencia de T en lugar de C en la posición 198 indica, con la máxima probabilidad, que ha aparecido en HLA-A2 mediante mutación puntual recurrente; 2) el cambio de la posición 99 Tyr-->Cys, en A*0207, que puede originarse por un único cambio en la base 368 de A-->G, sólo presente en el alelo Cw1, asociado a cambios en las posiciones 360 y 378; 3) el cambio silencioso de la base 402 de C-->G, presente en los alelos del subgrupo A2.2, que no se encuentra en ninguna otra secuencia; 4) el cambio detectado en A*0209 del aminoácido 236 de Ala-->Glu, derivado, presumiblemente, de un único cambio de nucleótido en la posición 779 de C-->A y que sólo se encuentra en este alelo.

- conversión génica, que habría operado en: 1) la generación del subtipo A2.3 mediante la donación de, al menos, el segmento de DNA que cubre las posiciones 517-539 y que se traduce en los cambios de aminoácidos de las posiciones 149, 152 y 156, probablemente por parte de los antígenos A25 o A26; 2) la generación del cambio de la posición 9 Phe-->Tyr, que se corresponde a nivel génico con 2 cambios (uno de ellos silencioso) en dos codones distintos, en las posiciones 98 y 102, y que habría ocurrido al menos 2 veces en el proceso de diversificación de HLA-A2 (conversión génica recurrente), existiendo múltiples alelos potencialmente donadores; 3) en la generación de los cambios en las posiciones 73 (Thr-->Ile) y 74 (Hys-->Asp) del subtipo A*0211 que presenta cambios de nucleótidos en las posiciones 290 (C-->T) y 292 (C-->A), pudiendo haber participado los alelos A31 o Aw33 como genes donadores de DNA. La conversión génica habría tenido lugar fundamentalmente entre alelos del mismo locus, como parece ser general entre los alelos HLA.

El resto de los cambios detectados (posiciones 66, 95, 97 y 156) podrían haberse generado por cualquiera de los dos mecanismos, bien involucrando conversiones génicas que afecten a segmentos muy pequeños de DNA (19 bases en el caso de la posición 95 a partir de Aw24, único antígeno con esa secuencia en dicha posición) lo que explicaría la repetición del mismo cambio en distintos procesos de diversificación (posición 156), o mutaciones puntuales recurrentes a cambios presentes en otros antígenos. Esta segunda posibilidad es especialmente probable en los casos de los cambios en las posiciones 95 y 97, puesto que la eventual conversión génica implicaría fragmentos de DNA muy limitados (unas 20 bases como máximo en el caso de la posición 95) y con el punto de ruptura muy cercano a la base cambiada (6 bases). Así mismo, el subtipo A*0210 podría haberse generado mediante dos mutaciones recurrentes en las posiciones 368 y 391, dos conversiones génicas adyacentes, lo cual parece muy improbable, o bien una única conversión

génica de un gen donador desconocido.

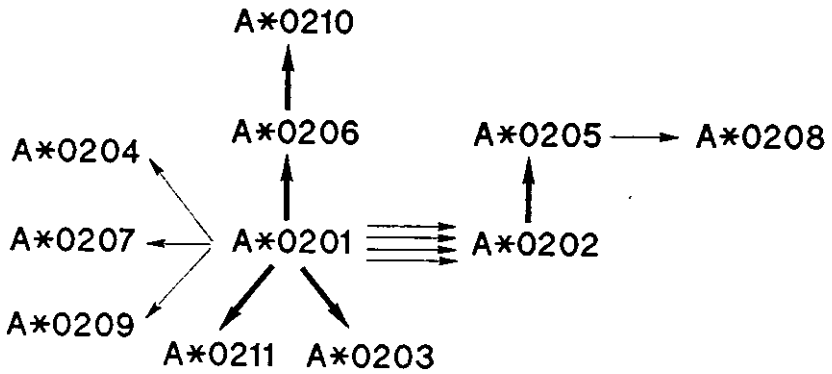
Un tercer mecanismo podría haber tenido lugar en la generación de este polimorfismo. Se trataría de una recombinación recíproca entre los subtipos A*0201 y A*0205 en la que se habrían generado los subtipos A*0206 y A*0202 (117). Análogamente, la recombinación entre estos dos subtipos generaría los dos primeros, si bien, dada la frecuencia del antígeno A*0201 y su distribución en todos los grupos étnicos analizados, es muy improbable que esta segunda posibilidad haya tenido lugar. En cualquier caso, este mecanismo no es necesario para explicar la diversificación de HLA-A2, puesto que A*0206 y A*0205 pueden haberse generado a partir de A*0201 y A*0202, respectivamente, mediante la introducción del cambio de la posición 9 Y→F, por conversión génica de un fragmento análogo de DNA donador.

Por tanto, los dos mecanismos fundamentales generadores del polimorfismo de los antígenos de clase I, la conversión génica y la mutación puntual, también parecen operar en el proceso de diversificación del antígeno HLA-A2, mientras que la participación de la recombinación genética es más controvertida. Dependiendo de la participación de este mecanismo o no, se pueden sugerir dos escenarios alternativos en la evolución de HLA-A2, según los esquemas de la figura 5.4, que minimizan el número de acontecimientos genéticos que darían lugar a la diversidad observada. En ambos casos, los subtipos A*0204, A*0207 y A*0209 por un lado, y A*0208 por otro, se habrían generado por mutación puntual a partir de A*0201 y A*0205 respectivamente. Por su parte, los subtipos A*0203, y A*0211 por una parte, y A*0210 por otra, se habrían generado por conversión génica a partir de A*0201 y A*0206, respectivamente. A su vez, en la primera alternativa, los subtipos A*0205 y A*0206 se habrían generado por conversión génica que involucra una misma región de DNA donador, a partir de A*0202 y A*0201, respectivamente.

A pesar de la gran diversidad observada, no parece que la frecuencia de fijación de nuevo polimorfismo sea muy elevada, puesto que el análisis de antígenos A2 presentes en distintos individuos, incluso de diferente origen étnico, no ha revelado diferencias dentro de los mismos subtipos, ni mutaciones silenciosas en la secuencia de DNA (117). La única mutación silenciosa detectada es la de la posición 402 (C→G) que está presente en todos los subtipos del grupo A2.2 (A*0202, A*0205 y A*0208) y que, por tanto, se conserva desde la aparición del primer alelo de este subtipo en tiempos muy remotos, así como la de la posición 102 que está asociada al cambio de aminoácido de la posición 9 (A*0206, A*0205, A*0208 y A*0210), derivada del DNA donador de la conversión génica que generó este cambio (117, 119).

La característica fundamental del polimorfismo observado y de la que deriva su importancia

A



B

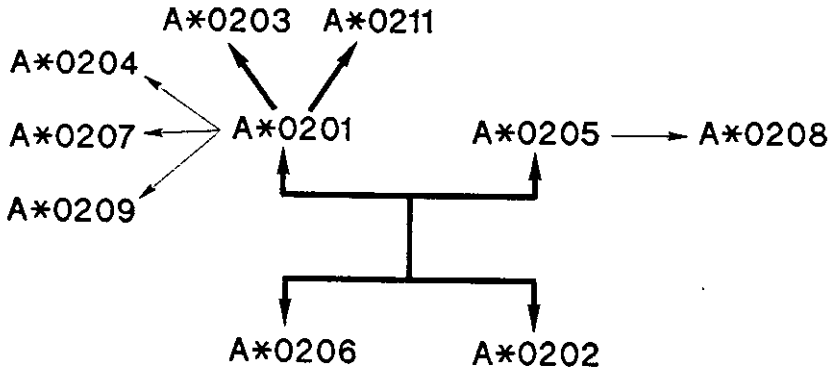


Figura 5.4. Esquema de posibles procesos de diversificación de los antígenos HLA-A2, según se considere la participación de la recombinación recíproca (B) o no (A). Las flechas sencillas indican procesos de mutación puntual y las gruesas conversión génica (y recombinación en B). Las líneas entre A*0201 y A*0202 indican mutaciones puntuales originadas en uno u otro antígeno o en un ancestro común.

funcional, es su localización mayoritaria en el sitio de unión del antígeno, como ya hemos descrito. Incluso el subtipo A*0210, definido serológicamente, y los subtipos A*0204 y A*0211 definidos por IEF, presentan sustituciones en el sitio de unión del antígeno no accesibles a anticuerpos, lo que confirma que la distribución del polimorfismo no es fruto del sistema de definición funcional de las variantes polimórficas, sino una característica intrínseca de la generación de diversidad como moduladora de la funcionalidad del antígeno A2. Mas aún, todas las posiciones polimórficas del sitio, excepto la 149, presentan sus cadenas laterales dirigidas hacia el interior, con capacidad de interaccionar con los péptidos endógenos presentados por HLA-A2. Por tanto, la variabilidad detectada afectaría la capacidad de unión de dichos péptidos, que serían presentados diferencialmente por los distintos subtipos, constituyendo la base de la presión selectiva que dirigiría el proceso de evolución del antígeno. La distinta capacidad de presentación de los patógenos operantes en el medio puede determinar la selección de distintos subtipos en las distintas poblaciones. Así existe una distribución preferencial de los diferentes subtipos en los distintos grupos étnicos: A2.1 es predominante en poblaciones caucásicas, A2.2 está preferencialmente representado en poblaciones negroides, A2.3 lo es en poblaciones orientales y A*0204 en poblaciones de indios americanos (112). El análisis de un mayor número de individuos y de los haplotipos en los que se encuentran los distintos alelos podría determinar si esta distribución es debida a factores estrictamente genéticos, o, como sugieren nuestros datos, a la selección de los distintos subtipos por su especificidad de presentación antigénica. El reciente análisis de los antígenos de clase I presentes en la tribu Warani de indios sudamericanos, formada por unos 600 individuos sin contacto con otras poblaciones, ha puesto de manifiesto que tan sólo presentan 10 alelos A y B (D. Watkins, comunicación personal). Su secuencia de DNA ha demostrado que todos ellos corresponden a nuevos subtipos, con 1 a 6 nucleótidos de diferencia respecto de los previamente conocidos, que implican cambios en el sitio de unión de péptido, generados por mutación puntual o conversión génica, y a nuevas moléculas originadas por recombinación entre distintos alelos del mismo locus. Paradójicamente, los dos únicos alelos A2 encontrados eran A*0204 y A*0211, siendo los otros dos alelos del locus A presentes, Aw24 y A31. A31, como ya hemos discutido, puede actuar como donador de DNA en conversiones génicas que generarían los dos subtipos descritos sobre el subtipo normal A*0201. Estos datos sugieren que la capacidad de generación de polimorfismo es muy amplia y confirmarían que su fijación en la población es debida a la selección de aquellos alelos cuya capacidad de presentación peptídica confiere una ventaja selectiva al interaccionar con los patógenos específicos del medio. La

comprobación de que cambios únicos en la molécula presentadora revierten la capacidad de presentación de péptidos mutados no reconocidos por CTLs específicos (218), refuerza la idea de la fijación no estocástica del polimorfismo generado y la adaptación de la estructura del antígeno a las variaciones específicas de los péptidos antigénicos presentados. En poblaciones más amplias con un mayor repertorio de antígenos de clase I, la ventaja evolutiva proporcionada por la aparición de nuevos subtipos ante un patógeno específico, se vería atenuada por la presencia de otros alelos capacitados para la presentación de dicho antígeno y la necesidad de interactuar con un mayor número de patógenos. La fijación de nuevas especificidades en estas poblaciones sería un proceso más lento y sólo se seleccionarían aquellas que presentan una gran ventaja evolutiva en el entorno específico. Por ello, no se ha detectado un mayor nivel de polimorfismo en el análisis de antígenos provenientes de individuos seleccionados al azar, de diferente origen étnico.

La diferente interacción con los péptidos endógenos afecta no sólo al reconocimiento restringido, sino también al alogénico, pues todos los subtipos son diferenciables por CTLs alorreactivos. En esta tesis hemos proporcionado una clara evidencia del papel de los péptidos endógenos en el reconocimiento alogénico, al demostrar que CTLs alogénicos pueden distinguir entre células de la misma estirpe provenientes de distintos individuos que presentan el mismo aloantígeno. Este reconocimiento alogénico diferencial de subtipos se daría a través del reconocimiento conjunto del complejo HLA-A2-péptido, de forma que la incapacidad de presentar determinados péptidos reconocidos por los TCR alogénicos, bien por su incapacidad de unir dichos péptidos o por la alteración en la conformación que adoptan, daría cuenta de las diferencias en el alorreconocimiento. La invocación de cambios conformacionales indirectos en los epítomos de la molécula de HLA-A2 reconocida por el TCR, no tiene soporte experimental, puesto que la determinación de la estructura terciaria de HLA-Aw68 demostró que los cambios de aminoácidos en el antígeno de clase I, apenas provocan alteraciones en las cadenas laterales de los residuos vecinos sino que modifica totalmente la cavidad del sitio de unión de péptido, conservándose la estructura global de la molécula (102). A la luz de estos datos, podría reevaluarse el papel del cambio detectado en A*0209 en el reconocimiento alogénico y sugerir que la falta de reconocimiento de OZB por tres clones alogénicos podría deberse a la participación de péptidos polimórficos ausentes en esta línea celular. En este caso, el cambio en la posición 236 no afectaría al reconocimiento por células T y sería una mutación neutra. Si bien esta posibilidad no es descartable, hay que considerar que los tres clones presentan un patrón de reactividad

diferente con los distintos subtipos y que todas las líneas A*0201 analizadas eran igualmente reconocidas, lo que sugiere que la diferente reactividad con OZB se debe al cambio en el aloantígeno y no a otros factores que influirían también en el reconocimiento de otras líneas celulares.

Finalmente, cabría evaluar el papel del polimorfismo de subtipos en el trasplante de aloinjertos. Su importancia ha sido puesta de manifiesto en los limitados estudios que se han realizado. En trasplantes de riñón, se ha observado una estricta correlación entre supervivencia del trasplante y la identidad de subtipos entre donantes y receptores (219), mientras que en el grupo de rechazo, la distribución de frecuencias de subtipos en los donantes es análoga a la de la población control. La comprobación fehaciente de la participación de este polimorfismo en el rechazo de trasplantes ha sido demostrada en el rechazo de médula ósea en una combinación donante-receptor HLA idénticos con distintos subtipos de HLA-B44, diferenciados únicamente en un cambio de Leu--> Asp en la posición 156 (220). El individuo trasplantado (B44.2') genera "in vivo" una población de CTLs aloespecíficos del subtipo B44.1, cuya reactividad puede ser analizada directamente en PBLs, durante el periodo de rechazo. La generación de respuestas alógenas específicas de subtipo puede explicar, en parte, el alto grado de respuestas injerto frente a huésped que ocurren en el 20-50% de los trasplantes de médula entre individuos HLA idénticos. Por tanto, la compatibilidad de subtipos de los antígenos HLA en procesos de trasplante se concibe como una premisa necesaria para la mejora del nivel de supervivencia el mismo.

6. CONCLUSIONES

6-CONCLUSIONES.

* El antígeno A*0209 presenta, respecto del subtipo A*0201, un único cambio en la posición 236 del dominio $\alpha 3$ de Ala a Glu. Este cambio requiere un único cambio de base a nivel de DNA, lo que sugiere su generación por un proceso de mutación puntual.

* El reconocimiento diferencial de A*0209 respecto de A*0201 por algunos clones de CTLs alogénicos indica que cambios fuera del sitio de unión del antígeno pueden influir en la especificidad del reconocimiento por CTLs.

* Los antígenos A2-SCHU y A2-ESST, no reconocidos por la línea alogénica CTL14, son bioquímicamente indistinguibles mediante mapeo peptídico comparativo, de los antígenos A*0206 y A2-ARC, respectivamente, que sí son reconocidos. A2-SCHU presenta la misma secuencia de DNA que A*0206 lo que indica que CTL14 reconoce diferencialmente antígenos HLA-A2 idénticos.

* La distinción por CTL14 entre antígenos HLA-A2 estructuralmente idénticos sugiere que estos CTLs reconocen un péptido polimórfico presentado por dicho antígeno. Por tanto, el reconocimiento alogénico es, al menos para una fracción de CTLs, un reconocimiento alorrestingido en el que se reconocen conjuntamente el aloantígeno y los péptidos endógenos presentes en el sitio de unión del antígeno.

* El antígeno A*0204 presenta un único cambio de base respecto de A*0201 en la posición 362 (G-->T) que implica un único cambio de aminoácido en la posición 97 (Arg-->Met). Este antígeno, puede, por tanto, haberse generado mediante un mecanismo de mutación puntual.

* El antígeno A*0211 presenta 2 cambios de base respecto de A*0201 en las posiciones 290 (C-->T) y 292 (C-->G) que implican dos cambios de aminoácidos en las posiciones 73 (Thr-->Ile) y 74 (His-->Asp). Esta misma secuencia se encuentra únicamente en los alelos HLA-A31 y HLA-Aw33, lo que sugiere su generación por medio de una conversión génica en la que estos u otros alelos desconocidos de igual secuencia en esta región, habrían actuado como genes donadores de DNA.

* Las secuencias de A*0204 y A*0211, junto con las de los demás subtipos de HLA-A2, revelan el agrupamiento del polimorfismo de subtipos de HLA-A2 en una región espacialmente limitada del sitio de unión del antígeno, con capacidad de interactuar con los péptidos endógenos unidos y, por tanto, de modular la especificidad de presentación antigénica de HLA-A2.

* La región que agrupa el polimorfismo en HLA-A2 es diferente de la de otros antígenos (HLA-B27), lo que sugiere que la distinta capacidad de presentación de péptidos de cada antígeno determina la región de la molécula donde se acumula el polimorfismo, mediante la presión selectiva a que se ve sometido el antígeno de clase I como molécula presentadora de antígenos.

* La diferente distribución étnica de cada subtipo sugiere que ésta puede estar determinada por la diferente ventaja selectiva que proporciona cada subtipo como molécula presentadora en relación a los patógenos presentes en cada población.

* Los tres subtipos definidos bioquímicamente A*0204, A*0209 y A*0211 presentan cambios que alteran la capacidad de reconocimiento por CTLs y definen el agrupamiento de las posiciones polimórficas en una región crítica para la funcionalidad, lo que sugiere que éstas son características intrínsecas al proceso de diversificación de HLA-A2 y no están predeterminadas por el método de detección del polimorfismo.

* Los cambios en los tres nuevos subtipos caracterizados sugieren la operatividad de los dos mecanismos fundamentales generadores del polimorfismo en antígenos de clase I, la mutación puntual y la conversión génica, en el proceso de diversificación de HLA-A2.

7. BIBLIOGRAFIA

7. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Gorer, P.A. "The antigenic basis of tumour transplantation". *J. Pathol. Bacteriol.* **44**: 691-697 (1937).
- 2.- Snell, G.D. "Studies in histocompatibility". *Science* **213**:172-178 (1981).
- 3.- Loveland, B y Simpson, E. "The non-MHC transplantation antigens: neither weak nor minor". *Immunol. Today* **7**: 223-229 (1986).
- 4.- Danska, J. y McDevitt, H.O. " Evolution of histocompatibility systems". In *Evolution and Vertebrate Immunity* ed. G. Kelsø, D. H. Schulze, pp 265-298. Austin: university of Texas Press. (1987).
- 5.- Scofield, V.L., Schulumpberger, J.M., West, L.A. y Weissman, I.L. "Protochordate allorecognition is controlled by an MHC-like gene system". *Nature* **295**: 499-503 (1982).
- 6.- Francke, U. y Pellegrino, M.A. "Assignment of the major histocompatibility complex to a region of the short arm of human chromosome 6". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 1147-1151 (1977).
- 7.- Dunham, I., Sargent, C.A., Trowsdale, J. y Campbell, R.D. "Molecular mapping of the human major histocompatibility complex by pulsed-field gel electrophoresis". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 7237-7241 (1987).
- 8.- Cresswell, P.M., Turner, J., Strominger, J.L. "Papain-solubilized HLA-A antigens from cultured human lymphocytes contain two peptide fragments". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**: 1603-1607 (1973).
- 9.- Goodfellow, P.N., Jones, E.A., van Heynengen, V., Solomon, E., Bobrow, M., Miggiano, V. y Bodmer, W.F. "The B_{2m} gene is on chromosome 15 and not in the HLA region" *Nature* **254**: 267-268 (1975).
- 10.- David-Watine, B., Israël, A. y Kourilsky, P. "The regulation and expression of MHC class I genes". *Immunology Today* **11**: 286-292 (1990)
- 11.- Koller, B.H., Geraghty, D.E., DeMars, R., Duvick, L., Rich, S. y Orr, H.T. "Chromosomal organization of the human major histocompatibility complex class I gene family". *J. Exp. Med.* **169**: 469-480 (1989).
- 12.- Orr, H.T. "HLA class I gene family: characterization of genes encoding non-HLA-A,B,C proteins". En: Dupont, B. (ed) *Immunobiology of HLA* vol II. Immunogenetics and Histocompatibility. Springer-Verlag New York, pp 33-40 (1989)
- 13.- Trowsdale, J., Young, J.A.T., Kelly, A.P., Austin, P.J., Carson, S., Meunier, H.S.A., Ehrlich, H.A., Spielman, R.S., Bodmer, J. y Bodmer, W.F. "Structure, sequence and polymorphism in the HLA-D region" *Immunol. Rev.* **85**: 1-44 (1985).
- 14.- Korman, A.J., Boss, J.M., Spies, T., Sorrentino, R., Okada, K. y Strominger, J.L. "Genetic complexity and expression of human class II histocompatibility antigens". *Immunol. Rev.* **85**: 45-86 (1985).
- 15.- Milner, C.M. y Campbell, R.D. "Structure and expression of the three MHC-linked HSP70 genes". *Immunogenetics* **32**: 242-251 (1990).
- 16.- Carroll, M.C., Katzman, P., Alicot, E.M., Koller, B.H., Geraghty, D.E., Orr, H.T., Strominger, J.L. y Spies, T. "A linkage map of the human major histocompatibility complex including the

- tumor necrosis factor genes". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 8535-8539 (1987).
- 17.- Carrol, M.C., Campbell, R.D., Bentley, D.R., y Porter RR. "A molecular map of the human major histocompatibility complex class III region linking complement genes C4, C2 and factor B". *Nature* **307**: 237-241 (1984).
 - 18.- Spies, T., Bresnahan, M. y Strominger, J.L. "Human major histocompatibility complex contains a minimum of 19 genes between the complement cluster and HLA-B". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 8955-8958 (1989).
 - 19.- Klein, J. "Immunology: the science of self-nonself discrimination". John Wiley & sons. New York.
 - 20.- Meuer, C., Schlossman, F., Reinherz, E.L. "Clonal analysis of human cytotoxic T lymphocytes: T4⁺ and T8⁺ effector T cells recognize products of different major histocompatibility complex regions". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**: 4395-4399 (1982).
 - 21.- Aparicio, P., Jaraquemada, D., López de Castro, J.A. "Alloreactive cytolytic T cell clones with dual recognition of HLA-B27 and HLA-DR2 antigens. Selective involvement of CD8 in their class I-directed cytotoxicity". *J. Exp. Med.* **165**: 428-443 (1987).
 - 22.- Gay, D., Maddon, P., Sckaly, R., Talle, M.A., Godfrey, M., Long, E., Goldstein, G., Chess, L., Axel, R., Kappler, J. y Marrack, P. "Functional interaction between human T-cell protein CD4 and the major histocompatibility complex HLA-DR antigen". *Nature* **328**: 626-629 (1987).
 - 23.- Norment, A.M., Salter, R.D., Parham, P., Engelhard, V.H. y Littman, D.R. "Cell-cell adhesion mediated by CD8 and MHC class I molecules". *Nature* **336**: 79-81 (1988).
 - 24.- Salter, R.D., Norment, A.M., Chen, B.P., Clayberger, C., Krensky, A.M., Littman, D.R. y Parham, P. "Polymorphism in the $\alpha 3$ domain of HLA-A molecules affects binding to CD8". *Nature* **338**: 345-347 (1989).
 - 25.- Calvo, V., Rojo, S., Aparicio, P., Galocha, B., López de Castro, J.A.¹ "Avidity dictates the lytic capacity of human cytolytic T lymphocyte clones with similar fine specificity against murine cells expressing HLA-B27 antigen". *J. Immunol.* **141**: 3798-3803 (1988).
 - 26.- Mason, D.W. y Morris, P.J. "Effector mechanisms in allograft rejection". *Ann. Rev. Immunol.* **4**: 119-146 (1986).
 - 27.- Schwartz, R.H. "The role of gene products of the major histocompatibility complex in T cell activation an cellular interactions". En: "Fundamental Immunology" Raven Press, pp 379-438 (1984).
 - 28.- Weissman, I.L., Saito, Y. y Rinkevich, B. "Allorecognition histocompatibility in a protochordate species: is the relationship to MHC somatic or structural?". *Immunol. Rev.* **113**: 227-241 (1990).
 - 29.- Zinkernagel, R., Doherty, P.C. "MHC-restricted cytotoxic T cells: Studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigens determining T-Cell restriction-specificity, function and responsiveness". *Avd. Immunol.* **27**: 52-142 (1979).
 - 30.- Yagüe, J., White, J., Colechough, C., Kaapler, J., Palmer, E., y Marrack, P. "The T cell receptor: the α and β chains defined idiotipe, and antigen and MHC specificity". *Cell* **42**: 8.-87 (1985).
 - 31.- Neefjes, J.J., Stollorz, V., Peters, P.J., Geuze, H.J. y Ploegh, H.L. "The biosynthetic pathway

- of MHC class II but not class I molecules intersect the endocytic route". *Cell* **61**: 171-183 (1990).
- 32.- Teyton, L., O'Sullivan, D., Dickson, P.W., Lotteau, V., Sette, A., Fink, P. y Peterson, P.A. "Invariant chain distinguishes between the exogenous and endogenous antigen presentation pathways". *Nature* **348**: 39-44 (1990)
 - 33.- Lotteau, V., Teyton, L., Peleraux, A., Nilsson, T., Karlsson, L., Schmidt, S.L., Quaranta, V. y Peterson, P. "Intracellular transport of class II MHC molecules directed by invariant chain". *Nature* **348**: 600-605 (1990)
 - 34.- Poche, P.A. y Cresswell, P. "Invariant chain association with HLA-DR molecules inhibits immunogenic peptide binding". *Nature* **345**: 615-619 (1990).
 - 35.- Townsend, A. y Bodmer, H. "Antigen recognition by class I-restricted T lymphocytes". *Ann. Rev. Immunol.* **7**: 601-624 (1989).
 - 36.- Townsend, A.R., Gotch, F.M. y Davey, J. "Cytotoxic T cells recognize fragments of haemagglutinin influenza protein". *Cell* **42**: 457-467 (1985).
 - 37.- Moore, M.W., Carbone, F.R. y Bevan, M.J. "Introduction of soluble protein into the class I pathway of antigen processing and presentation". *Cell* **54**: 777-785 (1988).
 - 38.- Whitton, L. y Oldstone, M.B. "Class I MHC can present an endogenous peptide to cytotoxic lymphocytes". *J. Exp. Med.* **170**: 1033-1038 (1989).
 - 39.- Yewdell, J.W. y Bennink, J.R. "Brefeldin inhibits presentation of protein antigens to cytotoxic lymphocytes". *Science* **244**: 1072-1075 (1989).
 - 40.- Cox, J.H., Yendell, J.W., Eisenlohr, L.R., Johnson, P.R. y Bennink, J.R. "Antigen presentation requires transport of MHC class I molecules from the endoplasmic reticulum". *Science* **247**: 715-718 (1990).
 - 41.- Nuchtern, J.G., Bonifacino, J.S., Biddison, W.E. y Klausner, R.D. "Brefeldin A implicates egress from the endoplasmic reticulum in class I-restricted antigen presentation". *Nature* **339**: 223-226 (1990).
 - 42.- Townsend, A.R., Rothbard, M.J., Gotch, F.M., Bahadur, G., Wraith, D. y McMichael A.J. "The epitopes of influenza nucleoprotein recognized by cytotoxic T lymphocytes can be defined with short synthetic peptides". *Cell* **44**: 959-968 (1986).
 - 43.- Babbitt, B.P., Allen, P.M., Matsueda, G., Haber, E. y Unanue, E.R. "Binding of immunogenic peptides to Ia histocompatibility molecules". *Nature* **317**: 359-361 (1985).
 - 44.- Nuchtern, J.G., Biddison, W.E. y Klausner, R.D. "Class II molecules can use the endogenous pathway of antigen presentation". *Nature* **343**: 74-76 (1990).
 - 45.- Louis, A.M. "The molecular basis of T-cell specificity". *Ann. Rev. Imm.* **8**: 65-82 (1990).
 - 46.- Scott, B., Blüthmann, H., Teh, H.S. y von Boehmer, H. "The generation of mature T cells requires interaction of the $\alpha\beta$ T-cell receptor with major histocompatibility antigens". *Nature* **338**: 591-593 (1989).
 - 47.- Kisielow, P., Teh, H.S., Blüthmann, H. y von Boehmer, H. "Positive selection of antigen-specific T cells in thymus by restricting MHC molecules". *Nature* **335**: 730-733 (1988).
 - 48.- Sha, W.C., Nelson, C.A., Newberry, R.D., Kranz, D.M., Russell J.H. y Loh, D.Y. "Positive and

- negative selection of an antigen receptor on T cells in transgenic mice". *Nature* **336**: 73-76 (1988).
- 49.- Turco, M.C., de Felice, M., Corbo, L., Carandente, P., Yang, S.Y., Ferrone, S. y Venuta, S. "Enhancing effect of anti-HLA class I monoclonal antibodies on T cell proliferation induced via CD2 molecule". *J. Immunol.* **141**: 2275-2281 (1988).
 - 50.- Edidin, M. "MHC genes and non-immune functions". *Immunology Today*, **4**: 269-270 (1983).
 - 51.- Geppert, T.D., Wacholtz, M.C., Davis, L.S. y Lipski, P.E. "Activation of human T4 cells by cross-linking class I MHC molecules" *J. Immunol* **140**: 2155-2160 (1988).
 - 52.- Scheiber, A.B., Schlessinger, J., y Edidin, M. "Interaction between Major Histocompatibility complex Antigens and Epidermal Growth Factor Receptors on human cells". *J. Cell Biol.* **98**: 725-731 (1984).
 - 53.- Phillips, M.L., Moule, M.L., Delovitch, T.L y Vip, C.C. "Class I histocompatibility antigens and insulin receptors: Evidence for interactions". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 3474-3478 (1986).
 - 54.- Claas, F.H.J., Runa, R., van der Berge, W y van Rood, J.J. "Interaction of penicillin with HLA-A and -B antigens". *Hum. Immunol* **5**:83-88 (1982).
 - 55.- Claas, F.H.J., van der Poel, J.J., Castelli-Visser, R., Pool, J., Renbio, C., Keyu, X., van Rood, J.J. "Interaction between des-Tyr-Gamma-Endorphin and HLA class I molecules: Serological detection of an HLA-A2 subtype". *Immunogenetics* **22**: 309-314 (1985).
 - 56.- Dausset, J., Contu, L. "Is the MHC a general self-recognition system playing a major unifying role in an organism?". *Human Immunol.* **1**: 5-17 (1980).
 - 57.- Bodmer, J.G., Marsh, S.G.E. y Albert, E. "Nomenclature for factors of the HLA system, 1989". *Immunology Today* **11**: 3-10 (1990).
 - 58.- Bjorkman, P.J. y Parham, P. "Structure, function, and diversity of class I major histocompatibility complex molecules". *Ann. Rev. Biochem.* **59**: 253-288 (1990).
 - 59.- Bjorkman, P.J., Saper, M.A., Samraoui, B., Bennett, W.S., Strominger, J.L., Wiley, D.C. "The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens". *Nature* **329**: 512-518 (1987).
 - 60.- Hughes, A.L. y Nei, M. "Pattern of nucleotide substitution at major histocompatibility complex class I loci reveals overdominant selection". *Nature* **335**: 167-70 (1988).
 - 61.- Parham, P., Lawlor, D.A., Lomen, C.E. y Ennis, P.D. "Diversity and diversification of HLA-A,B,C alleles". *J. Immunol.* **142**: 3937-3950 (1989).
 - 62.- Parham, P., Lawlor, D.A., Salter, R.D., Lomen, C.E., Bjorkman, P.J., Ennis, P.D. "HLA-A,B,C: Patterns of polymorphism in peptide-binding proteins". In Dupont B, (ed): *Immunobiology of HLA Volume II. Immunogenetics and histocompatibility*. New York, Springer-Verlag pp. 10-33 (1989):
 - 63.- Lawlor, D.A., Zemmour, J., Ennis, P.D. y Parham, P. "Evolution of class-I MHC genes and proteins: from natural selection to thymic selection". *Annu. Rev. Immunol.* **8**: 23-63 (1990).
 - 64.- Klein, J. "Origin of major histocompatibility complex polymorphism: The trans-species hypothesis". *Human Immunol.* **19**: 155-162 (1987).

- 65.- Figueroa, F., Günther, E. y Klein, J. "MHC polymorphism pre-dating speciation". *Nature* **335**: 265-267 (1988).
- 66.- Lawlor, D.A., Ward, F.E., Ennis, P.D., Jackson, A.P. y Parham, P. "HLA-A,B, polymorphisms predate the divergence of humans and chimpanzees". *Nature* **335**: 268-271 (1988).
- 67.- Klein, H.L. y Petes, T.D. "Intrachromosomal gene conversion in yeast" *Nature* **289**: 144-148 (1981)
- 68.- Kato, K., Dupont, B. y Yang, S.Y. "Localization of nucleotide sequences which determine Mongoloid subtype of B13". *Immunogenetics* **22**: 117-120 (1989).
- 69.- Müller, C.A., Engler-Blum, G., Gekeler, V., Steier, I., Weiss, E. y Schmidt, H. "Genetic and serological heterogeneity of supertypic HLA-B locus specificities Bw4 and Bw6". *Immunogenetics* **30**: 200-207 (1989).
- 70.- Nathanson, S.G., Geliebter, J., Pfaffenbach, G.M. y Zeff, R.A. "Murine major histocompatibility complex class I mutants: molecular analysis and structure-function implications". *Annu. Rev. Immunol.* **4**: 471-502 (1986).
- 71.- Holmes, N. y Parham, P. "Exon shuffling in vivo can generate novel HLA class I molecules". *EMBO J.* **4**: 2849-2854 (1985).
- 73.- Dausset, J. "Iso-leuco-anticorps". *Acta Haemat.* **20**: 156-166 (1958).
- 74.- Ploegh, H.L., Orr, H.T. y Strominger, J.L. "Major histocompatibility antigens: the human (HLA-A,B,C) and murine (H-2K, H-2D) class I molecules". *Cell* **24**: 287-299 (1981).
- 75.- Tragard, L., Curman, B., Wiman, K., Rask, L. y Peterson, P.A. "Chemical, physical-chemical and immunological properties of papain solubilized human transplantation antigens". *Biochemistry* **18**: 2218-2225 (1979).
- 76.- López de Castro, J.A., Strominger, J.L., Strong, D.M. y Orr, H.T. "Structure of crossreactive human histocompatibility antigens HLA-A28 and HLA-A2: Possible implications for the generation of the HLA polymorphism". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**: 3813-3817 (1982).
- 77.- Nathanson, S. y Cullen, S.E. "Biochemical properties and immunochemical-genetic relationships of mouse H-2 alloantigens". *B.B.A.* **344**: 1-23 (1974).
- 78.- Shiroishi, T., Evans, G.A., Appella, E. y Ozato, K. "Role of disulfide bridge in the immune function of major histocompatibility class I antigen as studied by in vitro mutagenesis". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 7544-7548 (1984).
- 79.- Becker, J.W. y Reeke, G.N. "Three-dimensional structure of B2-microglobulin". *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82**: 4225-4229 (1985).
- 80.- Bjorkman, P.J., Saper, M.A., Samraoui, B., Bennett, W.S., Strominger, J.L. y Wiley, D.C. "Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2". *Nature* **239**: 506-512 (1987).
- 81.- Ferrier, P., Layet, C., Caillor, D.H., Jordan, B.R. y Lemonnier, F.A. "The association between murine B2-microglobulin and HLA class I heavy chains results in serologically detectable conformational changes of both chains". *J. Immunol.* **135**: 1281-1287 (1985).
- 82.- Guild, B.C., Strominger, J.L. "Human and murine class I MHC antigens share conserved serine 335, the site of HLA phosphorylation in vivo". *J. Biol. Chem.* **259**: 9235-9240 (1984).

- 83.- Vega, M.A. y Strominge, J.L. "Constitutive endocytosis of HLA class I antigens requires a specific portion of the intracytoplasmic tail that shares structural features with other endocytosed molecules". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 2688-2692 (1989).
- 84.- Strachan, T. "Molecular genetics and polymorphism of class I HLA antigens". *Bri. Med. Bull.* **43**: 1-14 (1987)
- 85.- Pontarotti, P., Chimini, G., Nguyen, C., Boretto, J., Jordan, B.R. "Organization of the class I region". In: Dupont B (ed) *Immunobiology of HLA vol II. Immunogenetics and histocompatibility*. Springer-Verlag New York, pp 79-82 (1989).
- 86.- Koller, B.H. y Orr, H.T. "Cloning and complete sequence of an HLA-A2 gene: analysis of two HLA-A alleles at the nucleotide level". *J. Immunol.* **134**: 2727-2733 (1985).
- 87.- Hakem, R., Le Bouteiller, P., Barad, M., Trujillo, M., Mercier, P., Wietsersbin, J. y Lemonnier, F.A. "IFN-mediated differential regulation of the expression of HLA-B7 and HLA-A3 class I genes". *J. Immunol.* **142**: 297-305 (1989)
- 88.- Krangel, M.S., Orr, H.T. y Strominger, J.L. "Assembly and maturation of HLA-A and HLA-B antigens in vivo". *Cell* **18**: 979-991 (1979)
- 89.- Krangel, M.S., Pious, D. y Strominger, J.L. "Human histocompatibility antigen mutants immunoselected in vitro. Biochemical analysis of a mutant which synthesizes an altered HLA-A2 heavy chain". *J. Biol. Chem.* **257**: 5296-5305 (1982).
- 90.- Seong, R.H., Clayberger, C.A., Krensky, A.M. y Parnes, J.R. "Rescue of Daudi cell HLA expression by transfection of the mouse beta 2-microglobulin gene". *J. Exp. Med.* **167**: 288-299 (1988).
- 91.- Salter, R.D. y Cresswell P. "Impaired assembly and transport of HLA-A and -B antigens in a mutant TxB cell hybrid" *EMBO J.* **5**: 943-949 (1986).
- 92.- Erlich, H., Lee, J.S., Petersen, J.W., Bugawan, T. y DeMars, R. "Molecular analysis of HLA class I and class II antigen loss mutants reveals a homozygous deletion of the DR, DQ and part of the DP region: implications for class II gene order". *Hum. Immunol.* **16**: 205-219 (1986).
- 93.- Townsend, A., Elliot, T., Cerundolo, V., Foster, L., Barber, B. y Tse, A. "Assembly of MHC Class I molecules analyzed in vitro". *Cell* **62**: 285-295 (1990).
- 94.- Cerundolo, V., Alexander, J., Anderson, K., Lamb, C., Cresswell, P., McMichael, A., Goth, F. y Townsend, A. "Presentation of viral antigen controlled by a gene in the major histocompatibility complex". *Nature* **345**: 449-452 (1990).
- 95.- Hosken, N.A. y Bevan, M.J. "Defective presentation of endogenous antigen by a cell line expressing class I molecules". *Science* **248**: 367-370 (1990).
- 96.- Spies, T., Bresnahan, M., Bahram, S., Arnold, D., Balnk, G., Mellins, E., Pious, D. y DeMars, R. "A gene in the human major histocompatibility complex class II region controlling the class I antigen presentation pathway" *Nature* **348**: 744-747 (1990).
- 97.- Monaco, J.J., Cho, S. y Attaya, M. "Transport protein genes in the murine MHC: possible implications for antigen processing". *Science* **250**: 1723-1726 (1990).
- 98.- Deverson, E.V., Gow, I.R., Coadwell, W.J., Monaco, J.J., Butcher, G.W. y Howard J.C. "MHC class II region encoding proteins related to the multidrug resistance family of transmembrane transporters". *Nature* **348**: 738-74 (1990).

- 99.- Trowsdale, J., Hanson, I., Mockridge, I., Beck, S., Townsend, A. y Kelly, A. "Sequences encoded in the class II region of the MHC related to the 'ABC' superfamily of transporters". *Nature* **348**: 741-744 (1990).
- 100.- Spies, T. y DeMars, R. "Restored expression of major histocompatibility class I molecules by gene transfer of a putative peptide transporter". *Nature* **351**: 323-324 (1991).
- 101.- Saper, M.A., Bjorkman, P.J. y Wiley, D.C. "Refined structure of the human histocompatibility antigen HLA-A2 at 2.6 Å resolution". *J. Mol. Biol.* **219**:277-319. (1991).
- 102.- Garrett, T.P.J., Saper, M.A., Bjorkman, P.J., Strominger, J.L. y Wiley, D.C. "Specificity pockets for the side chains of peptide antigens in HLA-Aw68". *Nature* **342**: 692-696 (1989).
- 103.- López de Castro, J.A. "HLA-B27 and HLA-A2 subtypes: Structure, evolution and function". *Immunology Today* **10**: 239-246 (1989).
- 104.- Biddison, W.E. y Shaw, S. "Differences in HLA antigen recognition by human influenza virus-immune cytotoxic T cells". *J. Immunol.* **122**: 1705-1709 (1979).
- 105.- Biddison, W.E., Ward, F.E., Shearer, G.M. y Shaw, S. "The self determinants recognized by human virus-immune T cells can be distinguished from the serologically defined HLA antigens". *J. Immunol.* **124**: 548-552 (1980).
- 106.- Biddison, W.E., Kostyu, D.D., Strominger, J.L. y Krangel, M.S. "Delineation of immunologically and biochemically distinct HLA-A2 antigens". *J. Immunol.* **122**: 730-734 (1982).
- 107.- van der Poel, J.J., Pools, J., Goulmy, E. y van Rood, J.J. "Differential recognition of the serologically defined HLA-A2 antigen by allogeneic cytotoxic T cells. II. Definition of three HLA-A2 subtypes by CTLs". *Immunogenetics* **17**: 599-608 (1983).
- 108.- Van der Poel, J.J., Mölders, H., Thompson, A. y Ploegh, H.L. "Definition of four HLA-A2 subtypes by CML typing and biochemical analysis". *Immunogenetics* **17**: 609-621 (1983).
- 109.- Van der Poel, J.J., Pool, J., Goulmy, E., Giphart, M.J. y van Rood, J.J. "Recognition of distinct epitopes on the HLA-A2 antigen by cytotoxic T lymphocytes". *Human Immunol* **16**: 247-258 (1986).
- 110.- Gotch, F.M., Kelly, C., Ellis, S.A., Wallace, L., Rickinson, A., Van der Poel, J.J., Crumpton, M.J. y McMichael, A.J. "Characterization of the HLA-A2.2 subtype: T cell evidence for heterogeneity". *Immunogenetics* **21**: 11-23 (1985).
- 111.- Kennedy, L.J., Wallace, L.E., Madrigal, J.A., Rickinson, A.B., Bodmer, J.G. "New HLA-A2 variations defined by monoclonal antibodies and cytotoxic T lymphocytes". *Immunogenetics* **26**: 155-160 (1987).
- 112.- Yang, S.Y. "Assignment of HLA-A and HLA-B antigens for the reference panel of B-lymphoblastoid cell lines determined by one-dimensional isoelectric focusing (ID-IEF) gel electrophoresis". En: Dupont, B. (ed) *Immunobiology of HLA vol I*. Immunogenetics and Histocompatibility. Springer-Verlag New York, pp 43-44 (1989)
- 113.- Ennis, P.D., Zemmour, J., Salter, R.D., and Farham, P.: "Rapid cloning of HLA-A,B cDNA by using the polymerase chain reaction: Frequency and nature of errors produced in amplification". *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 2833-2837 (1990).
- 114.- Krangel, M.S., Taketani, S., Biddison, W.E., Strong, D.M. y Strominger, J.L. "Comparative structural analysis of HLA-A2 antigens distinguishable by cytotoxic T lymphocytes: variants

- M7 and DR1". *Biochemistry* **21**: 6313-6321 (1982).
- 115.- Mattson, D.H., Handy, D.E., Bradley, D.A., Coligan, J.E., Cowan, E.P. y Biddison, W.E. "DNA sequences of the genes that encode of CTL defined HLA-A2 variantes M7 and DK1". *Immunogenetics* **26**: 190-192 (1987).
- 116.- Krangel, M.S., Biddison, W.E. y Strominger, J.L. "Comparative structural analysis of HLA-A2 antigens distinguishable by cytotoxic T lymphocytes II. Variant DK1: evidence for a discrete CTL recognition region". *J. Immunol.* **130**: 1856-1862 (1983).
- 117.- Holmes, N., Ennis, P., Wan, A.M., Denney, D.W. y Parham P. "Multiple genetic mechanisms have contributed to the generation of the HLA-A2/A28 family of class I MHC molecules". *J.Immunol.* **139**: 936-941 (1987).
- 118.- Ezquerria, A, Doménech, N., van der Poel, J.J., Strominger, J.L., Vega, M.A. y López de Castro, J.A. "Molecular analysis of an HLA-A2 functional variant CLA defined by cytolytic T lymphocytes". *J. Immunol.* **137**: 1642-1649 (1986).
- 119.- Mattson, D.H., Shimojo, N., Cowan, E.P., Baskin, J.J., Turner, R.V., Coligan, B.D., Maloy, W.L., Biddison, W.E. "Differential effects of amino acid substitution in the β - sheet floor and α 2 helix of HLA-A2 on recognition by alloreactive viral peptide-specific cytotoxic lymphocytes". *J. Immunol.* **143**: 1101-1107 (1989).
- 120.- Doménech, N., Ezquerria, A., Castaño, R., y López de Castro, J.A. "Structural analysis of a functional variant KNE defined by cytolytic T lymphocytes. Implications for the mapping of HLA-A2 specific T-cell epitopes". *Immunogenetics* **27**: 196-202 (1988).
- 121.- Doménech, N., R. Castaño, E. Goulmy, and J.A. López de Castro. "Molecular analysis of HLA-A2.4 functional KLO: close structural and evolutionary relatedness to the HLA-A2.2 subtype". *Immunogenetics* **28**: 143-152 (1988).
- 122.- Epstein, H., Kennedy, L.J. y Holmes, H. "An oriental HLA-A2 subtype is closely related to a subset of caucasoid HLA-A2 alleles". *Immunogenetics* **29**: 112-116 (1989).
- 123.- McMichael, A.J., Parham, P., Rust, N. y Brodsky, F. "A monoclonal antibody that recognizes an antigenic determinant shared by HLA-A2 and B17". *Human Immunol.* **1**: 121-129 (1980).
- 124.- Russo, C., Pellegrino, M.A. y Ferrone, S. "Analysis of the repertoire of anti-HLA antibodies with anti-idiotypes to a murine anti-HLA-A2,A28 monoclonal antibody". *Human Immunol.* **10**: 57-67 (1984).
- 125.- Parham, P. y Brodsky, F.M. "Partial purification and some properties of BB7.2. A cytotoxic monoclonal antibody with specificity for HLA-A2 and a variant of HLA-A28". *Human Immunol.* **3**: 277-299 (1981).
- 126.- Santos-Aguado, J., Barbosa, J.A., Biro, P.A. y Strominger, J.L. "Molecular characterization of serologic recognition sites in the human HLA-A2 molecule". *J. Immunol.* **141**: 2811-2818 (1988).
- 127.- Russo, C., Ng, A-K., Pellegrino, M.A. y Ferrone, S. "The monoclonal antibody CR11-351 discriminates HLA-A2 variants identified by T cells". *Immunogenetics* **18**: 23-35 (1983).
- 128.- Hogan, K.T., Clayberger, C., Bernhard, E.J., Walk, S.F., Ridge, J.P., Parham, P., Krensky, A.M. y Engelhard, V.H. "A panel of unique HLA-A2 mutant molecules define epitopes recognized by HLA-A2-specific antibodies and cytotoxic T lymphocytes". *J. Immunol.* **142**: 2097-2104 (1989).

- 129.- Doménech, N., Santos-Aguado, J. y López de Castro, J.A. "Antigenicity of HLA-A2 and HLA-B7. Loss and gain of serologic determinants induced by site-specific mutagenesis at residues 62 to 80". *Hum. Immunol.* **30**: 140-146 (1991).
- 130.- Krangel, M.S., Taketani, S., Pious, D. y Strominger, J.L. "HLA-A2 mutants immunoselected in vitro. Definition of residues contributing to an HLA-A2-specific serological determinant". *J. Exp. Med.* **157**: 324-336 (1983).
- 131.- Taketani, S., Krangel, M.S., Pious, D. y Strominger, J.L. "Structural analysis of HLA-A2 antigen from immunoselected mutant 8.6.1: Further definition of an HLA-A2-specific serological determinant". *J. Immunol.* **131**: 2935-2938 (1983).
- 132.- Darsley, M.J., Takahashi, H., Maocchi, M.J., Frelinger, J.A., Ozato, K. y Appella, E. "New family of exon-shuffled recombinant genes reveals extensive interdomain interactions in class I histocompatibility antigens and identifies residues involved". *J. Exp. Med.* **165**: 211-222 (1987).
- 133.- Ways, J.P., Rothbard, J.B. y Parham, P. "Amino-acid residues 56 to 69 of HLA-A2 specify an antigenic determinant shared by HLA-A2 and HLA-B17". *J. Immunol.* **137**: 217-222 (1986).
- 134.- Clayberger, C., Holmes, N., Wang, P.L., Koller, T.D., Parham, P. y Krensky, A.M. "Determinants recognized by human cytotoxic T cells on a natural hybrid class I HLA molecules". *J. Exp. Med.* **162**: 1709-1714 (1983).
- 135.- Wallace, L.E., Kennedy, L.J., Landon, C., Bodmer, J.G. and Rickinson, A.B. "Functional analysis of the HLA-A2/Aw68 recombinant molecules HLA-Aw69: Epstein-Barr virus specific cytotoxic T cells restricted through Aw69 can utilise restricting determinants on Aw68 but not on A2". *Tissue Antigens* **27**: 298-307 (1986).
- 136.- van der Poel, J.J., Goulmy, E., Giphart, M.J. y van Rood, J.J. "Variation in the epitopes on the HLA-A2 molecules as recognized by HLA-A2 restricted and alloimmune HLA-A2 specific cytotoxic lymphocytes". In Albert, E.D., Baur, M.P. y Mayr, W.R. (ed): *Histocompatibility Testing*. New York, Springer Verlag pp. 485-489 (1984).
- 137.- Robbins, P.A., Lettice, L.A., Rota, P., Santos-Aguado, J., Rothbard, J., McMichael, A.J. y Strominger, J.L. "Comparison between two peptide epitopes presented to cytotoxic T lymphocytes by HLA-A2. Evidence for discrete locations within HLA-A2". *J. Immunol.* **143**: 4098-4103 (1989).
- 138.- McMichael, A.J., Gotch, F.M., Santos-Aguado, J. y Strominger, J.L. "Effect of mutations and variations of HLA-A2 on recognition of a virus peptide epitope by cytotoxic T lymphocytes". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 9194-9198 (1988).
- 139.- Shimojo, N., Cowan, E.P., Engelhard, V.H., Maloy, M.L., Coligan, J.E. y Biddison, W.E. "A single amino acid substitution on HLA-A2 can alter the selection of the cytotoxic T lymphocyte repertoire that responds to influenza virus matrix peptide 55-73". *J. Immunol.* **143**: 558-564 (1989).
- 140.- Hogan, K.T., Clayberger, C., Bernhard, E.J., Walk, S.F., Ridge, J.P., Parham, P., Krensky, A.M. y Engelhard, V.H. "Identification by site-directed mutagenesis of amino acid residues contributing to serologic and CTL-defined epitope differences between HLA-A2.1 and HLA-A2.3". *J. Immunol.* **141**: 2519-2525 (1988).
- 141.- Hogan, K.T., Shimojo, N., Walk, S.F., Engelhard, V.H., Maloy, W.L., Coligan, J.E. y Biddison, W.E. "Mutations in the alpha 2 helix of HLA-A2 affect presentation but do not inhibit binding of influenza virus matrix peptide". *J. Exp. Med.* **168**: 725-736 (1988).

- 142.- Hogan, K.T., Clayberger, C., Le, A.T., Walk, S.F., Ridge, J.P., Parham, P., Krensky, A.M. y Engelhard, D.V. "Cytotoxic lymphocyte defined epitope differences between HLA-A2.1 and HLA-A2.2 map to two distinct regions of the molecule". *J. Immunol.* **141**: 4005-4011 (1988).
- 143.- Santos-Aguado, J., Crimmins, M.A.V., Mentzer, S.J., Burakoff, S.J. y Strominger, J.L. "Alloreactivity studied with mutants of HLA-A2". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 8936-8940 (1989).
- 144.- Matzinger, P. y Bevan, M.J. "Why do so many lymphocytes respond to major histocompatibility antigens?". *Cell. Immunol.* **29**: 1-5 (1977).
- 145.- Gaston, J.S.H., Rickinson, A.B. y Epstein, M.A. "Cross-reactivity of self-HLA-restricted Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T lymphocytes for allo-HLA determinants". *J. Exp. Med.* **158**: 1804-1821 (1983).
- 146.- Ashwell, J.D., Chen, C. y Schwartz, R.H. "High frequency and nonrandom distribution of alloreactivity in T cell clones selected for recognition of foreign antigen in association with self class II molecules". *J. Immunol.* **136**: 389-395 (1986).
- 147.- Shinohara, N., Bluestone, J.A., Sachs, D.H. "Cloned cytotoxic T lymphocytes that recognize an I-A region product in the context of a class I antigen". *J. Exp. Med.* **163**:972-980 (1986).
- 148.- Essaket, S., Fo Jelle, C. de Preval, and M Thomsen. "Corecognition of HLA-A1 and HLA-DPw3 by a human CD4⁺ alloreactive T lymphocyte clone". *J. Exp. Med.* **172**:387-390 (1990).
- 149.- Lombardi, G., Sidhu, S., Lamb, J.R., Batchelor, J.R. y Lechler, R.I. "Co-recognition of endogenous antigens with HLA-DR1 by alloreactive human T cell clones". *J. Immunol.* **142**: 753-759 (1989).
- 150.- Schendel, D. J. "On the peptide model of allorecognition: cytotoxic T lymphocytes recognize an alloantigen encoded by two HLA-linked genes". *Hum. Immunol.* **27**:229-239 (1990).
- 151.- Kievits, F. Ivanyi, P. "A subpopulation of mouse cytotoxic T lymphocytes recognizes allogeneic H-2 class I antigens in the context of other H-2 class I molecules". *J. Exp. Med.* **174**:15-19 (1991)
- 152.- Marrack, P., and J. Kappler. "T cells can distinguish between allogeneic major histocompatibility complex products on different cell types". *Nature* **332**:840-843 (1988).
- 153.- Molina, I. J., and B. T. Huber. "The expression of a tissue specific self-peptide is required for allorecognition". *J. Immunol.* **144**:2082-2088 (1990).
- 154.- Rojo, S., D. López, V. Calvo, and J. A. López de Castro. "Conservation and alteration of HLA-B27-specific T cell epitopes on mouse cells. Implications for peptide-mediated alloreactivity". *J. Immunol.* **146**:634-642 (1991).
- 155.- Heath, W. R., M. F. Hurd, F. R. Carbone, and L. Sherman. "Peptide-dependent recognition of H-2K^b by alloreactive cytotoxic T lymphocytes". *Nature* **344**:749-752 (1989).
- 156.- Chen, B. P., A. Madrigal, and P. Parham. "Cytotoxic T cell recognition of an endogenous class I HLA peptide presented by a class II HLA molecule". *J. Exp. Med.* **172**:779-788 (1990).
- 157.- Maryanski, J.L., Pale, P., Corradin, G., Jordan, B.R. y Cerrottini, J.C. "H-2 restricted cytolytic T cells specific for HLA recognize a synthetic HLA peptide". *Nature* **324**: 578-579 (1986).
- 158.- Orlén, C., Bastin, J., Ljunggren, H-G., Foster, L., Wolpert, E., Klein, G., Townsend, A.R.M. y Kärre, K. "Resistance to H-2 restricted but not to allo-H2-specific graft and cytotoxic T

- lymphocyte responses in lymphoma mutant". *J. Immunol.* **145**: 52-58 (1990).
- 159.- Bernhard, E.J., Le, A.X., Barbosa, J.A., Lacy, E. y Engelhard, V.H. "Cytotoxic T lymphocytes from HLA-A2 transgenic mice specific for HLA-A2 expressed on human cells" *J. Exp. Med.* **168**: 1147-1162 (1988).
 - 160.- Le, A.T., Bernhard, E.J., Holterman, M.J., Strub, S., Parham, P., Lacy, E. y Engelhard V.H. "Cytotoxic T cell responses in HLA-A2.1 transgenic mice. Recognition of HLA alloantigens and utilization of HLA-A2.1 as a restriction element". *J. Immunol.* **142**: 1366-1371 (1989).
 - 161.- Epstein, H., Hardy, R., May, J.S., Johnson, M.H. y Holmes, N. "Expression and function of HLA-A2.1 in transgenic mice". *Eur. J. Immunol.* **19**: 1575-1583 (1989).
 - 162.- Parham, P., Clayberger, C., Zorn, S.L., Ludwig, D.S., Schoolnik, G.K. y Krensky, A.M. "Inhibition of alloreactive cytotoxic T lymphocytes by peptides from the alpha₁ domain of HLA-A2". *Nature* **325**: 625-628 (1987).
 - 163.- Clayberger, C., Parham, P., Rothbard, J., Ludwig, D.S., Schoolnik, G.K. y Krensky, A.M. "HLA-A2 peptides can regulate cytotoxicity by human allogeneic T lymphocytes". *Nature* **330**: 763-765 (1987).
 - 164.- Elliot, T.J. y Eisen, H.N. "Cytotoxic T lymphocytes recognize a reconstituted class I histocompatibility antigen (HLA-A2) as an allogeneic target molecule". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 5213-5217 (1990).
 - 165.- Salter, R.D., Benjamin, R.J., Wesley, P.K., Buxton, S.E., Garrett, T.P.J., Clayberger, C., Krensky, A.M., Norment, A.M., Littman, D.R. y Parham, P. "A binding site for the T-cell co-receptor CD8 on the $\alpha 3$ domain of HLA-A2". *Nature* **345**: 41-46 (1990).
 - 166.- Bernabeu, C., Finlay, D., van de Rijn, M., Maziarz, R.T., Biro, P.A., Spits, H., de Vries, J. y Terhorst, C.P. "Expression of the major histocompatibility antigens HLA-A2 and HLA-B7 by DNA-mediated gene transfer". *J. Immunol.* **131**: 2032-2037 (1983).
 - 167.- Potter, T.A., Rajan, T.V., Dick, R.F. y Bluestone, J.A. "Substitution at residue 227 of H-2 class I molecules abrogates recognition by CD8- dependent, but not CD8-independent, cytotoxic T lymphocytes". *Nature* **337**: 73-75 (1989).
 - 168.- Holterman, M.J. y Engelhard, V.H. "HLA antigens expressed on murine cells are preferentially recognized by murine cytotoxic T cells in the context of the H-2 major histocompatibility complex". *Proc. Natl., Acad. Sci. USA* **83**: 9699-9703 (1986).
 - 169.- Engelhard, V.H., Lacy, E. y Ridge, J.P. "Influenza A-specific, HLA-A2.1-restricted cytotoxic T lymphocytes from HLA-A2.1 transgenic mice recognize fragments of the M1 protein". *J. Immunol.* **146**: 1226-1232 (1991).
 - 170.- Samberg, N.L., Scarlett, E.C. y Stauss, H.J. "The $\alpha 3$ domain of major histocompatibility complex class I molecules plays a critical role in cytotoxic T lymphocyte stimulation". *Eur. J. Immunol.* **19**: 2349-2354 (1989).
 - 171.- Irwin, M.J., Heath, W.R. y Sherman, L.A. "Species-restricted interactions between CD8 and the $\alpha 3$ domain of class I influence the magnitude of the xenogeneic response". *J. Exp. Med.* **170**: 1091-1101.
 - 172.- Larson, R.S. y Springer, T.A. "Structure and function of leukocyte integrins". *Immunol. Rev.* **114**: 181-217 (1990).
 - 173.- Gotch, F., Rothbard, J., Howland, K., Townsend, A. y McMichael, A. "Cytotoxic T

- lymphocytes recognize a fragment of influenza virus matrix protein in association with HLA-A2". *Nature* **326**: 881-882 (1987).
- 174.- Bastin, J., Rothbard, J., Davey, J., Jones, I. y Townsend, A. "Use of synthetic peptides of influenza nucleoprotein to define epitopes recognized by class I-restricted cytotoxic T lymphocytes". *J. Exp. Med.* **165**: 1508-1523 (1987).
 - 175.- Gotch, F., McMichael, A. y Rothbard, J. "Recognition of influenza A matrix protein by HLA-A2-restricted cytotoxic lymphocytes. Use of analogues to orientate the matrix peptide in the HLA-A2 binding site". *J. Exp. Med.* **186**: 2045-2057 (1988).
 - 176.- Shimojo, N., Maloy, W.L., Anderson, R.W., Biddison, W.E. y Coligan, J.E. "Specificity of peptide binding by the HLA-A2.1 molecule". *J. Immunol.* **143**: 2939-2947 (1989).
 - 177.- Carreño, B.M., Anderson, R.W., Coligan, J.E. y Biddison, W.E. "HLA-B37 and HLA-A2.1 molecules bind largely nonoverlapping sets of peptides". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 3240-3424 (1990).
 - 178.- Röttschke, O., Falk, K., Deres, K., Schlid, H., Norda, M., Metzger, J., Jung, G., y Rammensee, H.G. "Isolation and analysis of naturally processed viral peptides as recognized by cytotoxic T cells". *Nature* **348**: 252-254 (1990).
 - 179.- Chen, B.P. y Parham, P. "Direct binding of influenza peptides to class I HLA molecules". *Nature* **337**: 743-745 (1989).
 - 180.- Van Bleek, G.D. y Nathenson, S.G. "Isolation of an endogenously processed immunodominant viral peptide from the class I H-2K^b molecule". *Nature* **348**: 213-216 (1990).
 - 181.- Falk, K., Röttschke, O., Stevanovic, S., Jung, G. y Rammensee, H.G. "Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules". *Nature* **351**: 290-296 (1991).
 - 182.- McCune, J.M., Humphreys, R.E., Yocum, R.R. y Strominger, J.L. "Enhanced representation of HL-A antigens on human lymphocytes after mitogenesis induced by phytohemagglutinin or Epstein-Barr virus". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**: 3206-3209 (1975).
 - 183.- Kessler, S.W. "Rapid isolation of antigen from cells with a staphylococcal protein-A antibody adsorbent. Parameters of the interaction of antibody antigen complexes with protein A". *J. Immunol.* **115**: 1617-1624 (1975).
 - 184.- Parham, P. y Bodmer, W.F. "Monoclonal antibody to a human histocompatibility alloantigen, HLA-A2". *Nature* **276**: 397-398 (1978).
 - 185.- Coligan, J.E., Gates III, F.T., Kimball, E.S. y Maloy, W.L. "Radiochemical sequence analysis of biosynthetically labeled proteins". *Methods Enzymol.* **21**: 413-434 (1983).
 - 186.- Bordier, C. "Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution". *J. Biol. Chem.* **252**: 1604-1607 (1981).
 - 187.- Mitchell, W.M. y Harrington, W.F. "Clostripain". En: Boyer, P.D. (ed) *The enzymes*, vol III. Acad. Press. N.Y., pp 699-719 (1971).
 - 188.- Drapeau, G.R., Boily, Y. y Houmard, J. "Purification and properties of an extracellular protease of *Staphylococcus aureus*". *J. Biol. Chem.* **274**: 6720-6726 (1972).
 - 189.- Houmard, J. y Drapeau, G.R. "Staphylococcal protease: a proteolytic enzyme specific for glutamoyl bonds". *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **69**: 3506-3509 (1972).

- 190.- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. "Molecular cloning. A laboratory manual". 2º ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. (1989).
- 191.- Hanahan, D. "Studies on transformation of E. Coli with plasmids". *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580 (1983).
- 192.- Crouse, G.F., Frischauf, A., y Lehrach, H. "An integrated and simplified approach to cloning into plasmids and single-stranded phages". *Methods Enzymol.* **101**: 78-89 (1983).
- 193.- Southern, E.M. "Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis". *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517 (1975).
- 194.- Watkins, D.L., Chen, Z.W., Hughes, A.L., Evans, M.G., Tedder, T.F. y Lervin, N.L. "Evolution of the MHC class I genes of the New World primate from ancestral homologues of human non-classical genes". *Nature* **346**: 60-63 (1990).
- 195.- Saiki, R.K., Bugawan, T.L., Horn, G.T., Mullis, K.B., y Erlich, H.A. "Analysis of enzymatically amplified β -globin and HLA-DQ α DNA with allele-specific oligonucleotide probes". *Nature* **324**: 163-166 (1986).
- 196.- Grunstein, M. y Hogness, D.S. "Colony hybridization: a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**: 3961-3965 (1975).
- 197.- Sanger, F. y Coulson, A.R. "A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase". *J. Mol. Biol.* **94**: 441-449 (1975).
- 198.- Lehninger, A.L. "Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular". Ed. Omega. 1984.
- 199.- Seemann, G.H., Rein, A.R.S., Brown, S.C. y Ploegh, H.I. "Gene conversion-like mechanisms may generate polymorphism in human class I genes". *EMBO J.* **5**: 547-552 (1986).
- 200.- Choo, S.Y., John, T.S., Orr, H.T. y Hansen, J.A. "Molecular analysis of the variant alloantigen HLA-B27d (HLA-B*2703) identifies a unique single amino acid substitution". *Human Immunol.* **21**: 209-219 (1988).
- 201.- Yokoyama, K. y Nathenson, S. "Intramolecular organization of class I MHC antigens: localization of the alloantigenic determinants and the B2-microglobulin binding site to different regions of the H2-K^b glycoprotein". *J. Immunol.* **130**:1419-1425 (1983).
- 202.- Maziarz, R.T., Burakoff, S.J. y Bluestone, J.A. "The $\alpha 3$ domain of class I MHC proteins influences cytotoxic T lymphocyte recognition of antigenic determinants located within the $\alpha 1$ and $\alpha 2$ domains". *J. Immunol.* **140**: 4372-4377 (1988).
- 203.- Borst, J., de Vries, E., Spits, H., de Vries, J.E., Boylston, A.W. y Matthews, E.A. "Complexity of T cell receptor recognition sites for defined alloantigens". *J. Immunol.* **139**: 1952-1959 (1987).
- 204.- McMeluskey, J., Bluestone, J.A., Coligan, J.E., Maloy, W.L. y Margulies, D.H. "Serological and T cell recognition of truncated transplantation antigens encoded by in vitro deleted class I major histocompatibility genes". *J. Immunol.* **136**:1472-1481 (1986).
- 205.- Rammensee, H.G., Robinson P.J., Crisanti, A. y Bevan, M.J. "Restricted recognition of B2-microglobulin by cytotoxic T lymphocytes". *Nature*, **312**:502-504 (1986).
- 206.- Kurtz, M.E., Morgan, D.M. y Graff, R.J. "Recognition of the B2-microglobulin-B molecule by a CTL clone". *J. Immunol.* **138**:87-90 (1987).

- 207.- Pérarnau, B., Siegrist, C.A., Gillet, A., Vincent, C., Kimura, S. y Lemonnier F.A. "B2-microglobulin restriction of antigen presentation". *Nature*, 346:751-754 (1990).
- 208.- Potter, T.A., Bluestone, J.A. y Rajan, T.V. "A single amino acid substitution in the $\alpha 3$ domain of an H-2 class I molecule abrogates reactivity with CTL". *J. Exp. Med.* 166:956-966 (1987).
- 209.- Van Seventer, G.A., Hivis, B., Melief, C.J. y Ivanyi, P. "Fine specificity of human HLA-B7-specific cytotoxic T-lymphocyte clones. Identification of HLA-B7 subtypes and histotopes of the HLA-B7 cross-reacting group". *Human Immunol.* 16: 375-389 (1986).
- 210.- Castaño, A. R. "Análisis bioquímico de variantes del antígeno HLA-A7 distinguibles por linfocitos T citotóxicos". Tesina de licenciatura, Facultad Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid (1985).
- 211.- Santamaría, P., Boyce, M.T., Lindstrom, A.L., Rich, S.S., Faras, A.J. y Barbosa, J.J. "Alloreactive T cells can distinguish between the same human class II MHC products on different B cell lines". *J. Immunol.* 146:1822-1828 (1991).
- 212.- de Koster, H. S., D. C. Anderson, and A. Terojtelen. "T cells sensitized to synthetic HLA-DR3 peptide give evidence of continuous presentation of denatures HLA-DR3 molecules by HLA-DP". *J. Exp. Med.* 169:1191-1196 (1989).
- 213.- Kabelitz, D., W. R. Herzog, K. Heeg, H. Wagner, and J. Reimann. "Human cytotoxic T lymphocytes. III. Large numbers of peripheral blood T cells clonally develop into allorestricted anti-viral cytotoxic T cell populations in vitro". *J. Mol. Cell. Immunol.* 3:49- (1987).
- 214.- Vega, M.A., Ezquerro, A., Rojo, S., Bragado, R., Aparicio, P. y López de Castro, J.A. "Structural analysis of an HLA-B27 functional variant: identification of residues that contribute to the specificity of recognition by cytotoxic T lymphocytes". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 7394-7398 (1985).
- 215.- Marshall E. "Clovis counterrevolution". *Science* 249:738-741 (1990).
- 216.- Kato, K., Trapani, J.A., Allopenna, J., Dupont, B., and Yang, S.Y. "Molecular analysis of the serologically defined HLA-Aw19 antigens. A genetically distinct family of HLA-A antigens comprising A29, A31, A32 and Aw33, but probably not A30". *J. Immunol.* 143: 3371-3378 (1989).
- 217.- Baur, M.P., Neugebauer, M., Deppe, H., Sigmund, M., Luton, T., Mayr, W.R., Albert, E.D. "Population analysis on the basis of deduced haplotypes from random families". *Histocompatibility testing*. Springer-Verlag, Berlin, pp 333-341 (1984).
- 218.- Warren, A.P., Paschedag, I., Benoist, C., Peccoud, J., Mathis, D. y Thomas, d.B. "Defects in antigen presentation of mutant influenza haemagglutinins are reversed by mutations in the MHC class II molecule". *EMBO J.* 9:3849-3856 (1990).
- 219.- van der Poel, J.J., D'Amato, J., Goulmy, E., Pool, J., Persijn, G., Giphart, M., Paul, L.C., y van Rood, J. "Influence of HLA-A2 antigenic subtypes as defined by CML and biochemical analysis on the survival of renal allografts". Ph.D. Thesis, Leiden University, pp 83-93.
- 220.- Fleischhauer, K., Kernan, N.A., O'Reilly, R.J., Dupont, B. y Yang, S.Y. "Bone marrow-allograft rejection by T lymphocytes recognizing a single amino acid difference in HLA-B44". *New Engl. J. Med.* 323: 1818-1822 (1990).

8. APENDICE

La presente Tesis Doctoral ha dado lugar a las siguientes publicaciones:

- Castaño, A.R., Ezquerro, A. Doménech, N. y López de Castro, J.A. "An HLA-A2 population variant with structural polymorphism in the $\alpha 3$ region". *Immunogenetics* 27: 345-355 (1988).
- Castaño, A.R., Lauzurica, P., Doménech, N. y López de Castro. "Structural identity between HLA-A2 antigens differentially recognized by alloreactive cytotoxic T lymphocytes". *J. Immunol* 146: 2915-2920 (1991).
- Castaño, A.R. y López de Castro, J. A. "Structure of the HLA-A*0204 antigen, found in South American indians. Spatial clustering of HLA-A2 subtype polymorphism". *Immunogenetics* 34: 281-285 (1991).
- Castaño, A.R. y López de Castro, J.A. "Structure of the HLA-A*0211 subtype: further evidence for selection-driven diversification of HLA-A2 antigens". *Immunogenetics* 35: 344-346 (1992).

Publicaciones.

- "Studies on evolutionary and selective properties of Hypercycles using a Monte-Carlo method". A. J. García Tejedor, A. R. Castaño, F. Morán, F. Montero. *J. Mol. Evol.* **26**: 294-300 (1987).
- "Structural analysis of an HLA-A2.4 functional variante KNE defined by cytolytic T lymphocytes. Implications for the mapping of HLA-A2-specific T-cell epitopes". N. Doménech, A. Ezquerro, A. R. Castaño, J.A. López de Castro. *Immunogenetics* **27**: 196-202 (1988).
- "An HLA-A2 population variant with structural polymorphism en the $\alpha 3$ region". A. R. Castaño, A. Ezquerro, N. Doménech, J. A. López de Castro. *Immunogenetics* **27**: 345-355 (1988).
- "Molecular analysis of HLA-A2.4 functional variant KLO: close structural and evolutionary relatedness to the HLA-A2.2 subtype". N. Doménech, A. R. Castaño, E. Goulmy, J. A. López de Castro. *Immunogenetics* **28**: 143-152 (1988).
- "Structural identity between HLA-A2 antigens differentially recognized by alloreactive cytotoxic T lymphocytes". A. R. Castaño, P. Lauzurica, N. Doménech, J. A. López de Castro. *J. Immunol.* **146**: 2915-2920 (1991).
- "Structure of the HLA-A*0204 antigen, found in South American Indians. Spatial clustering of HLA-A2 subtype polymorphism". A. R. Castaño, J. A. López de Castro. *Immunogenetics* **34**: 281-285 (1991).
- "Structure of the HLA-A*0211 subtype: further evidence for selection-driven diversification of HLA-A2 antigens" A. R. Castaño, J.A. López de Castro. *Immunogenetics* **35**: 344-346 (1992).
- "Selection-driven evolution of HLA-A2 antigens". A. R. Castaño, J.A. López de Castro. In "HLA 1991" (ed. Sasazuki et al.) Vol 2. Oxford University Press (en prensa).
- "HLA-A2 allorecognition and subtype diversification" A. R. Castaño, J.A. López de Castro. In "T lymphocytes: structure, functions, choices" (ed. F. Celada, B. Pernis) Plenum Publishing Corporation (en prensa).

An HLA-A2 population variant with structural polymorphism in the $\alpha 3$ region

Raúl Castaño, Angel Ezquerra, Nieves Doménech, and José A. López de Castro

Department of Immunology, Fundación Jiménez Díaz, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Avenida Reyes Católicos, 2, E-28040 Madrid, Spain

Abstract. The HLA-A2 antigen expressed by donor OZB can be distinguished from the main HLA-A2.1 subtype by isoelectric focusing — it is one charge unit more acidic — and by some alloreactive T-cell clones but not by cytolytic T lymphocyte lines. The structure of variant OZB was examined by comparative peptide mapping with A2.1 and radiochemical sequence analysis. The two molecules were found to differ in a single tryptic peptide from the $\alpha 3$ region, spanning residues 220-243. The amino acid sequence of this peptide from variant OZB revealed that there was only one amino acid change of Glu instead of Ala at position 236, a hitherto invariant residue in class I HLA antigens. All previously characterized HLA or H-2 natural variants have structural changes restricted to the $\alpha 1$ and/or $\alpha 2$ domains. Thus, variant OZB is unique in that (1) it has one amino acid change in $\alpha 3$ and (2) it has no changes in $\alpha 1$ and $\alpha 2$. The only detected substitution of this variant may be accounted for by a single base change at the DNA level, suggesting that it might have resulted from a point mutation in the *A2.1* gene. The structural features of variant OZB open a novel way to examine the influence of polymorphism in $\alpha 3$ on cytolytic T-cell recognition of naturally occurring class I antigens.

Introduction

Class I HLA antigens are highly polymorphic cell surface glycoproteins encoded in the *HLA-A*, *-B*, and *-C* loci of the human MHC. They are involved in the recognition of other antigens expressed on virus-infected or otherwise modified cells by CTL (McMichael et al. 1977, Dickmeiss et al. 1977). Polymorphism is achieved through a multiplicity of loci with a great number of codominantly ex-

pressed alleles at each locus. The *HLA-A*, *-B*, *-C* allelic series have been defined by conventional tissue typing serology (Bodmer et al. 1984). Structural analyses of several serologically defined alloantigens have revealed that they usually differ from each other in at least 5-10% of their amino acid sequence (Güssow et al. 1987). The great majority of the polymorphic positions are located in the two amino-terminal $\alpha 1$ and $\alpha 2$ domains, the polymorphism at the $\alpha 3$ region being much more limited. The finding that immunologically indistinguishable class I antigens from different mouse subspecies (Arden and Klein 1982) or different human ethnic groups (Holmes et al. 1987) are also structurally identical has led to the suggestion that much of the allelic repertoire of the species could have been essentially established before speciation.

Several well-defined serologic specificities have been shown to include a number of structurally different subtypes, which are readily distinguishable by CTL and/or IEF. The structure of several HLA-B7 (Taketani et al. 1984), -B27 (Vega et al. 1985a, b, 1986, Seeman et al. 1986, Rojo et al. 1987a, b), -A3 (van Schravendijk et al. 1985, Cowan et al. 1985), and -A2 (Krange et al. 1982, 1983, Ezquerra et al. 1986, Mattson et al. 1987, Holmes et al. 1987, Doménech et al. 1988) subtypes has been examined. The various subtypes from a given serologic specificity differ from each other by one or very few amino acid replacements, which are always located in $\alpha 1$ and/or $\alpha 2$. The nature of this variability has provided supportive evidence for the occurrence of point mutations and of several types of recombination mechanisms in the generation of MHC class I polymorphism. In some cases, particularly with HLA-B27, the structure of the subtypes can be correlated with their distribution among different ethnic populations. This correlation suggests that subtype-related polymorphism may be relatively recent, much of it having arisen after divergence of the major ethnic groups (Vega et al. 1986, Rojo et al. 1987a). Furthermore, class I subtypes are amenable to differential recognition by CTL. For this reason, in addition to their value

Address correspondence and offprint requests to: J. A. López de Castro
Abbreviations used in this paper: CTL, cytolytic T lymphocytes; HPLC, high performance liquid chromatography; IEF, isoelectric focusing; MHC, major histocompatibility complex

for evolution studies, they are uniquely suitable to analyze the influence of limited structural polymorphism in modulating the specificity of CTL recognition.

HLA-A2 is one of the most common class I serologic specificities (Baur and Danilovs 1980). Heterogeneity within this antigen has been detected with self-restricted (Biddison et al. 1980a, b, 1982, Pfeffer and Thorsby 1982, Gaston et al. 1983, Goulmy et al. 1982, 1984), allogeneic (Horai et al. 1982, van der Poel et al. 1983b, Ware et al. 1983, Brenner et al. 1985) and xenogeneic CTL (Engelhard and Benjamin 1983). Four subtypes, designated A2.1 to A2.4, were defined by using alloreactive CTL lines and IEF on a large panel of A2-positive individuals (van der Poel et al. 1983a). A2.1, A2.2, and A2.3 are distinguishable by IEF, A2.2 being one charge unit more basic and A2.3 one charge unit more acidic than A2.1. The A2.1 and A2.4 antigens have identical isoelectric points. Further heterogeneity within A2.2 and A2.4 has been detected with both alloimmune and self-restricted CTL (Gotch et al. 1985, van der Poel et al. 1984, 1986).

An A2 variant was found in donor OZB that did not fit into the four established subtypes (van der Poel et al. 1986). This variant was not distinguishable from A2.1 by the polyclonal CTL used in the definition of the subtypes, but was identical with A2.3 by IEF. Here, the structural analysis of the OZB A2 variant is described.

Materials and methods

Purification of radiochemically labeled HLA-A2 heavy chains. The lymphoblastoid cell lines JY (HLA-A2.1; B7) and OZB (HLA-A2.3; B16, 35) were used as the source of material. The radiochemical purification of HLA-A2 heavy chains was performed by immunoprecipitation with the A2/Aw69-specific monoclonal antibody PA2.1 (Parham and Bodmer 1978) and antidenatured HLA-A₁-B heavy chain antiserum (anti-H) as described (Esquerre et al. 1986).

Peptide mapping. The structural analysis of HLA-A2 from OZB by comparative peptide mapping with A2.1 was performed as described (Esquerre et al. 1986). Tryptic maps were obtained by HPLC in a gradient of ammonium acetate and acetonitrile as detailed elsewhere (Vega et al. 1985b). Further fractionation of some unresolved peptide mixtures was carried out in HPLC with a gradient of acetonitrile and trifluoroacetic acid following a described procedure (Rojo et al. 1987a). In some experiments, purified tryptic peptides were digested with *Staphylococcus aureus*, strain V8, protease (Miles Laboratories, United Kingdom). Samples were dissolved in 400 μ l of 50 mM ammonium acetate buffer, pH 4.0, containing 100 μ g of ovalbumin as carrier protein, at an enzyme-substrate ratio (over carrier protein) of 1:5 for 12 h at 37 °C. After this time, the same amount of enzyme was added again and the reaction was continued for another 12 h at 37 °C. These conditions allow selective cleavage at the carboxyl-terminal end of glutamic acid residues (Drapeau 1977). Occasionally, a third addition of the same amount of enzyme was made to promote cleavage at specially resistant glutamyl bonds, and incubation was continued for another 12 h at 37 °C. After digestion, 400 μ l of a tryptic digest of ovalbumin was added and dissolved in 400 μ l of the same buffer. Samples were lyophilized and

rechromatographed under the same conditions used for the separation of tryptic peptides.

Automated sequences analysis. Radiochemical sequence analysis of single amino acid-labeled peptides was performed in the presence of 10 nmol of apomyoglobin as carrier, in a Beckman liquid-phase sequencer as described (Esquerre et al. 1985). Alternatively, sequencing was carried out in a gas-phase sequencer (Applied Biosystems, 470A) in the absence of apomyoglobin carrier, using the O3CMAC program supplied by the manufacturers. Sequencer fractions were counted with 4 ml of Aquasol (New England Nuclear) in a Beckman LS-255 or LS 2800 liquid scintillation counter, using a double channel for ³H- and ¹⁴C-radioactivity. Radioactivity outputs were expressed, depending on the counter used, as cpm (LS-255) or dpm (LS 2800). Spill corrections were introduced from the values obtained with appropriate ³H and ¹⁴C standards.

Results

The HLA-A2 antigens from JY and OZB differ in a single tryptic peptide from the $\alpha 3$ region. The structural characterization of the OZB A2 variant was carried out through its comparison with the known structure of HLA-A2.1 antigen (Koller and Orr 1985), which is expressed on JY cells, by double-label comparative peptide mapping and radiochemical sequencing of the difference peptides.

Tyr-, His-, Lys-, Pro-, Leu-, and Ala-labeled tryptic peptide maps were initially obtained. These amino acids label overlapping sets of peptides that together encompass 100% of the extracellular portion of the molecule. The Tyr- and His-labeled maps were identical (not shown). The Lys-, Pro-, and Leu-labeled maps each showed one ³H-labeled (K5, P5, and L3, respectively) and one ¹⁴C-labeled (K6, P6, and L4, respectively) difference peaks eluting at equivalent positions in all three maps (Fig. 1). The Ala-labeled map contained a ¹⁴C-labeled difference peak, A5, eluting in the same position as those of previous maps, but lacked any ³H-labeled counterpart (Fig. 1). These results suggested that there was only one difference peptide between A2.1 and the OZB A2 variant, which was labeled in both proteins with Lys, Pro, and Leu, but not with Tyr or His. Furthermore, this peptide contained Ala in A2.1 but not in the OZB variant. Sequencing of the Leu-labeled difference peptides L3 and L4 indicated that they both contained radioactivity at cycle 11 (Fig. 1). The ¹⁴C-labeled L4 peptide showed, in addition, ³H- and ¹⁴C-radioactivity at cycle 2. This was due to the presence of a contaminant identical peptide, because no tryptic peptide from A2.1 has Leu at both positions 2 and 11. These results indicated that L4 was the A2.1 peptide spanning residues 220-243 (DGEDQTQDTLVETRPAGDGTQK) because this is the only tryptic peptide of the molecule with Leu at position 11. This peptide also contained Lys, Pro, and Ala. The sequence of L3 confirmed that this peptide was the OZB counterpart of L4.

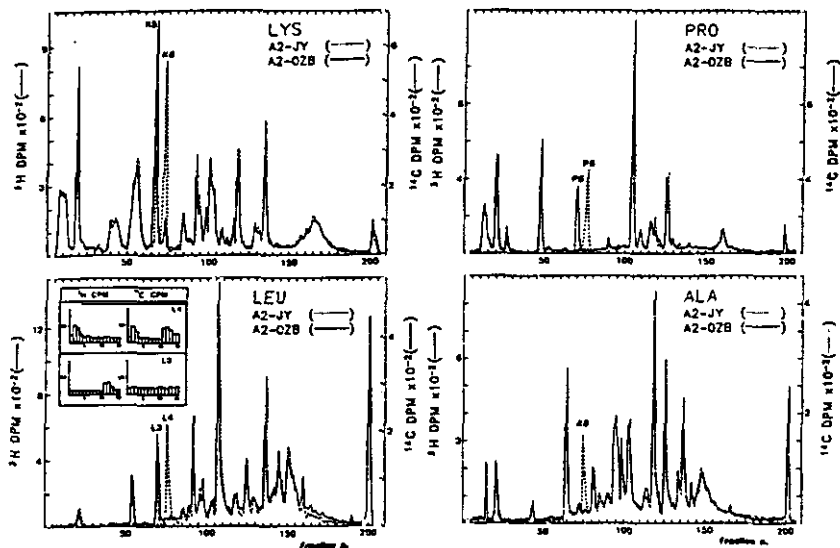


Fig. 1. Reverse-phase HPLC comparison of Lys-, Pro-, Leu-, and Ala-labeled tryptic peptides. Peaks are numbered according to their relative elution positions within each peptide map. Difference peaks are specified. The sequence analysis of the difference peptides L3 and L4 is included. For each peptide sequence, ^3H (OZB) and ^{14}C (JY) radioactivities (y-axis) are separately plotted versus cycle number (x-axis). The L3 difference peptide was purified from a contaminant identical peptide (not shown) prior to sequencing.

The HLA-A2 antigen from OZB has a single amino acid change with A2.1 at position 236. The absence of a ^3H -labeled counterpart to the A5 difference peptide, in the Ala-labeled map (Fig. 1), suggested that at least Ala₂₃₆ could be changed in the OZB variant. Thus, the structure of the OZB difference peptide spanning residues 220-243 was analyzed in detail. This was done by labeling the molecule with each of the amino acids of this peptide, in separate experiments, followed by isolation of the labeled tryptic peptide. The A2.1 peptide, but not that from variant OZB, could be cleaved at the Arg₂₃₄-Pro₂₃₅ bond with trypsin under very drastic conditions, or with clostripain (not shown). This was due to the presence of a hindering acidic residue at position 236 in the OZB variant and not to the absence of Arg₂₃₄ (see below). Thus, the 220-243 peptide, which is rich in Glu residues, was further digested with *S. aureus* V8 protease under conditions of selective cleavage at these residues, and the resulting peptides were isolated and sequenced. Figure 2A shows a comparison of the Thr-labeled tryptic maps from A2.1 and the OZB variant. As expected, the only difference peptides, T4 and T5, were those corresponding by their elution position to the 220-243 peptide from OZB and

A2.1, respectively. T4 and T5 were mixed together and jointly digested with V8 protease. Two identical peptides (TV1 and TV2), a ^3H -difference peptide (TV3), and a ^{14}C -difference peptide (TV4) were generated (Fig. 2B). The sequence analysis of these four peptides is shown in Figure 2C. TV1 and TV2 had Thr at positions 3 and 6, which indicated that both peptides started at position 223. Sequencing of TV3 and TV4 showed ^3H - and ^{14}C -label, respectively, at cycles 1 and 8, suggesting that they were the OZB and A2.1 peptides spanning residues 233-243 (TRPAGDGTFOK in A2.1). Similarly, a Val-labeled tryptic map was obtained to isolate the 220-243 difference peptides V4 and V5 (Fig. 3A). These two peptides were jointly digested with V8 protease, and two identical peptides, VV1 and VV2, were generated and sequenced (Fig. 3B). The presence of ^3H - and ^{14}C -radioactivity at cycle 2 of VV1 indicated that this was the peptide spanning residues 230-232 (LVE). Sequencing of VV2 showed radioactivity at cycle 9, indicating that it was a partial cleavage intermediate spanning residues 223-232 (DQTQDTLVE). Since VV2 eluted at the same position as TV2, this allowed the assignment of the TV1 and TV2 peptides (see above) as those spanning residues 233-229

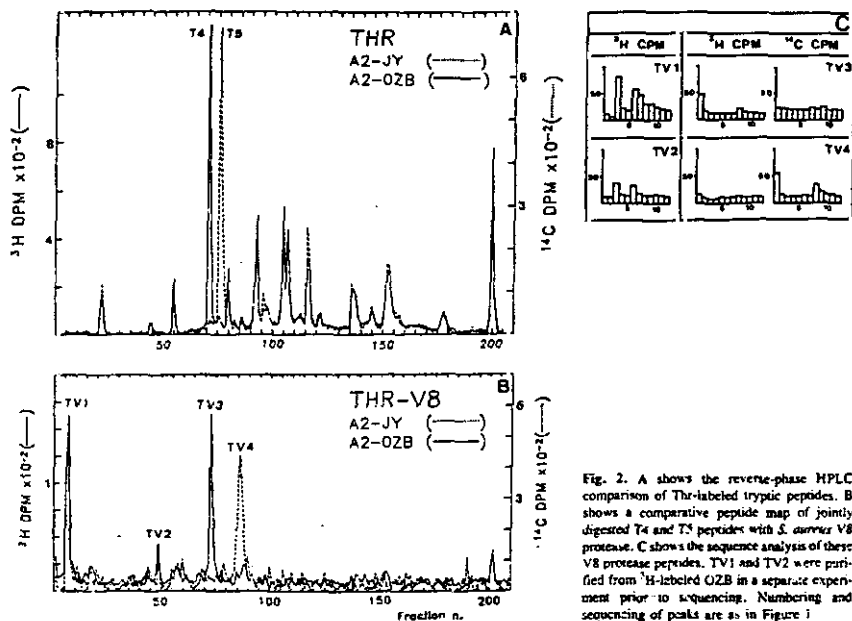


Fig. 2. A shows the reverse-phase HPLC comparison of Thr-labeled tryptic peptides. B shows a comparative peptide map of jointly digested T4 and T5 peptides with *S. aureus* V8 protease. C shows the sequence analysis of these V8 protease peptides. TV1 and TV2 were purified from ^3H -labeled O2B in a separate experiment prior to sequencing. Numbering and sequencing of peaks are as in Figure 1

and 223-232, respectively. Together, the Thr- and Val-labeled V8 protease peptides encompass the whole span of the 220-243 difference tryptic peptide, except the tripeptide 220-222 (DGE). The analysis of these V8 protease peptides indicate that the segment spanning residues 223-232 is identical in A2.1 and the O2B variant.

The Asp-labeled 220-243 tryptic difference peptides from A2.1 and the O2B variant were also obtained (not shown) and further digested with V8 protease. Four peptide peaks were obtained upon chromatographic fractionation of these digests (Fig. 4A). DV1 and DV2 were identical. DV3 and DV4 were O2B and A2.1 difference peptides, respectively. DV1 actually consisted of a mixture of several identical peptides, amenable to separation under different chromatographic conditions (not shown). Sequencing of two of these peptides, DV1.1 and DV1.3, showed radioactivity at cycle 1, and at cycles 1 and 5, respectively (Fig. 4A). This indicated that these two peptides were those spanning residues 220-222 (DGE) and 223-229 (DQTQDTE), respectively. DV2 also showed radioactivity at cycles 1 and 5. This peptide eluted in the same position as TV2 (Fig. 2B) and was therefore assigned as the partial cleavage intermediate spanning

residues 223-232. The O2B difference peptide DV3 eluted at the same position as TV3 (Fig. 2B) and showed radioactivity at cycle 6 (Fig. 4A). This indicated that it was the peptide starting at residue 233. DV4 was not sequenced, but its elution position was identical with that of TV4. Thus, it was assigned as the A2.1 peptide spanning residues 233-243.

Labeling with Gln together with Glu allowed incorporation of both radioactive amino acids. As in previous experiments, the single 220-243 tryptic difference peptide was isolated from ^3H -labeled O2B and ^{14}C -labeled A2.1 proteins (not shown). Joint digestion of both peptides with V8 protease was carried out and the resulting mixture was resolved in three identical peaks (QV1, QV2, and QV3), a ^3H -difference peak, QV4, and a ^{14}C -difference peak, QV5 (Fig. 4B). The QV1 peak was shown to consist of a mixture of identical peaks, including two main peptides, QV1.1 and QV1.2, amenable to separation under different chromatographic conditions (not shown). The sequence analyses of these peptides are shown in Figure 4B. QV1.1 was labeled at cycles 2, 4, and 7, indicating that this peptide was that spanning residues 223-229 (DQTQDTE). The significantly lower radioactivity at cycle 7 is consis-

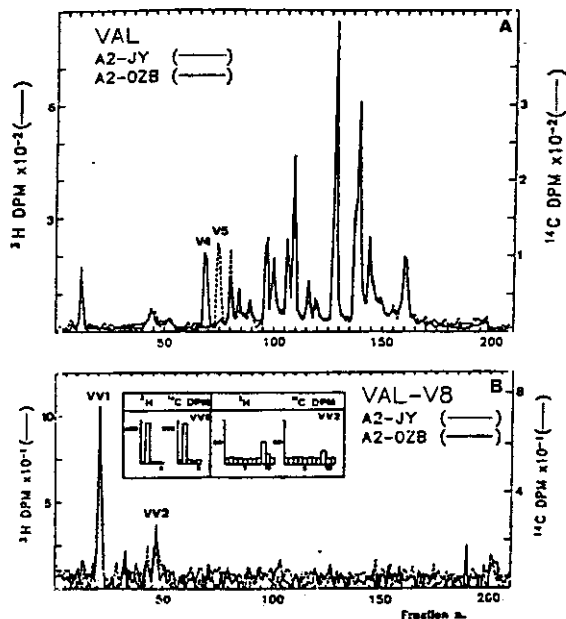


Fig. 3. A shows the reverse-phase HPLC comparison of Val-labeled tryptic peptides. B shows a co-operative peptide map of jointly digested V4 and V5 peptides with *S. aureus* V8 protease. The sequence analysis of the two resulting peptides VV1 and VV2 is included. Numbering and sequencing of peaks are as in Figure 1.

tent with the presence of Glu at the carboxyl-terminal position. QV1.2 was labeled at cycles 3, 5, and 7, the relatively lower level of radioactivity at cycle 3 being consistent with the presence of Glu instead of Gln (which is incorporated more efficiently upon metabolic labeling) at this position. Thus, this peptide was assigned as a partial cleavage intermediate spanning residues 220-229 (DGEDQTQDTE). QV2, which eluted in the same position as VV1 (Figs. 3B and 4B), showed radioactivity at cycle 3 upon sequencing (Fig. 4B). Thus, it was assigned as the 230-232 peptide (LVE). QV3 could not be sequenced. The difference peptides QV4 and QV5 eluted at the same positions as TV3 or DV3, and TV4 or DV4, respectively (Figs. 2 and 4), suggesting that they were the OZB and A2.1 peptides, respectively, starting at position 233 (see above). Sequencing of QV4 showed radioactivity at cycles 4 and 10. The presence of label at residue 10 indicated that this peptide spanned residues 233-243, on the basis of the sequence of A2.1 in this segment (TRPAGDGTQFK). The relative amounts of radioactivity recovered at cycles 4 and 10 indicated that residue 10 of this peptide was much more efficiently labeled. Otherwise the repetitive yield of the QV4 sequencing run would

have been 97%, a value which is never obtained with small peptides in our hands. Furthermore, the yield of radioactivity at cycle 10 upon sequencing was expected to be especially low because the peptide ends at cycle 11 with a Lys residue. Short peptides ending with Lys tend to be washed out during sequencing, negatively affecting the repetitive yield of the Edman reaction. Thus, Glu instead of Gln was assigned at cycle 4. This result indicated that the OZB A2 variant had Glu, instead of Ala, at position 236. QV5, which was the 233-243 counterpart from A2.1 on the basis of its elution position, was not sequenced.

To complete the sequence at the remaining positions of the 220-243 difference peptide from the OZB variant, the following experiments were carried out. First, Gly residues were labeled through metabolic conversion with uniformly labeled [14 C]-Ser. The 220-243 peptide from variant OZB, G1, was purified (Fig. 5A) and digested with V8 protease. Sequencing of the two peptides, GV1 and GV2, which were obtained showed radioactivity at cycle 2 and at cycles 5 and 7, respectively. These results indicated that GV1 was the 220-222 peptide (DGE) and GV2, which eluted as TV3, DV3, and QV4 (Figs. 2B and 4), was the difference peptide spanning residues 233-243.

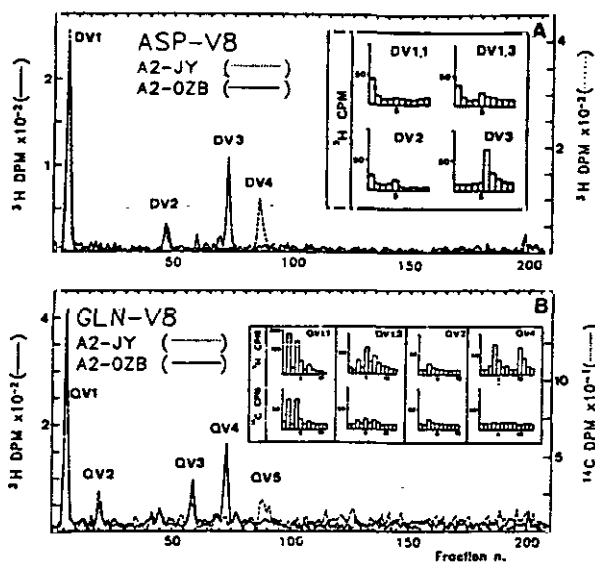


Fig. 4A and B. Reverse-phase HPLC comparison and sequence analysis of *S.aureus* V8 protease peptides obtained by digestion of A Asp-labeled or B Glu+Gln labeled 220-243 tryptic difference peptides (see text). The Asp-labeled peptide maps from ³H-labeled OZB and JY A2 molecules were separately obtained and were plotted together. The Glu+Gln-labeled map was obtained from jointly digested ³H-labeled OZB and ¹⁴C-labeled JY (A2.1) tryptic peptides. Numbering and sequencing of peaks are as in Figure 1

They further confirmed that Gly₂₃₇ and Gly₂₃₆ were unchanged in OZB. Second, the Arg-, Pro-, and Phe-labeled 233-243 peptides from the OZB variant were obtained and sequenced as in previous experiments (Fig. 6). The Arg-labeled peptide, RV, was labeled at cycle 2 (Fig. 6A), establishing the presence of the unchanged Arg₂₃₄ in this variant. The Pro-labeled peptide, PV1, showed radioactivity at cycle 3, confirming the presence of Pro at position 235. Sequencing of the A2.1 counterpart PV2 also showed radioactivity at position 3, confirming its identity with the 233-243 peptide of this antigen (TRPAGDGTFFQK). V8 protease digestion of the Phe-labeled 220-243 tryptic peptides from A2.1 and the OZB variant was performed with a higher amount of enzyme to promote cleavage at the Glu₂₃₆ of the variant, which was not observed in previous experiments. As shown in Figure 6C, two V8 protease difference peptides from OZB, FV1, and FV2 were obtained which showed radioactivity at cycles 5 and 9, respectively. This indicated that FV1 was the peptide spanning residues 237-243 (GDGTFFQK) and FV2 was the 233-243 peptide (TRPEGDGTFFQK). Thus, Phe₂₄₁ was unchanged in OZB. Furthermore, the partial V8 protease cleavage at position 236 confirmed the assignment of Glu at this position of the variant. As expected, only one A2.1 difference peptide, FV3, was obtained, which was that spanning residues 233-243 (TRPAGDGTFFQK)

on the basis of its elution position and of the presence of label at cycle 9.

A summary of the proposed assignments for the various peptides referred to above, showing the residues directly identified by sequencing, is presented in Figure 7. All residues within the difference tryptic peptide 220-243 were formally established except Lys₂₄₃. This residue was assigned on the basis of the presence of Lys in the corresponding tryptic peptide (Fig. 1) and the absence of this residue in other positions of that peptide. Thus, taken together these results demonstrate that the only change within the single difference tryptic peptide of the A2 variant in OZB is that of Glu, instead of Ala, at position 236.

Discussion

The immunological and structural heterogeneity of the HLA-A2 antigen family has been extensively analyzed. The four basic subtypes, A2.1 to A2.4, which were originally defined on the basis of their differential recognition by CTL (van der Poel et al. 1983a, 1986), have also distinct structural patterns. The A2.2 subtype differs from A2.1 by the presence of three scattered changes in both $\alpha 1$ and $\alpha 2$, at positions 43, 95, and 156. There are at least

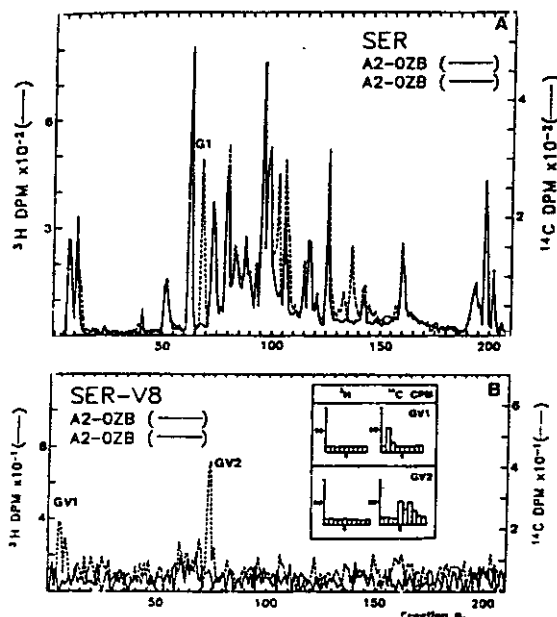


Fig. 5. A shows the reverse-phase HPLC comparison of ^3H -Ser-labeled and ^{14}C -Ser-labeled HLA-A2 from OZB. Those peptides labeled at Gly residues through metabolic conversion of uniformly labeled [^{14}C]-Ser appear as ^{14}C -difference peaks (see text). B shows the separation of the peptides generated after digestion of G1 with *S. aureus* V8 protease. The sequence analysis of these peptides is also included. Numbering and sequencing of peaks are as in Figure 1.

two variants, A2.2F and A2.2Y, within this subtype, the latter having one additional change at position 9 (Krangel et al. 1982, Holmes et al. 1987, Mattson et al. 1987). In contrast, A2.3 antigens differ from A2.1 by three clustered changes at positions 149, 152, and 156, in $\alpha 2$ (Krangel et al. 1983, Mattson et al. 1987). The two A2.4 variants which have been examined, CLA and KNE, each have a single amino acid change with A2.1, which is located either in $\alpha 1$ (CLA) (Ezquerria et al. 1986) or in $\alpha 2$ (KNE) (Doménech et al. 1988). The structural relationship of the A2 variant expressed on OZB cells to these subtypes was examined by comparative peptide mapping and radiochemical sequencing of the difference peptides. The reliability of this approach has been discussed elsewhere (Vega et al. 1986, Doménech et al. 1988). The single detected change of Glu instead of Ala at position 236, between the OZB variant and A2.1, accounts for the IEF difference between these two molecules and indicates that the reported charge identity of variant OZB with the A2.3 subtype (van der Poel et al. 1986) does not involve an underlying structural similarity. Actually, the structural pattern of variant OZB is more analogous to that of A2.4, since it presents a single amino acid change, but differs

from the A2.4 variants in that their changes do not involve any charge difference with A2.1. The fact that the detected amino acid change could have resulted from a single base change at the DNA level suggests that it could have been the result of a point mutation. The occurrence of point mutations as one of the mechanisms significantly contributing to the diversification of the HLA-A2 antigen family has been previously suggested (Ezquerria et al. 1986, Holmes et al. 1987, Doménech et al. 1988). This contrasts with the apparent absence of this mechanism in the generation of *H-2* mutants (Nathenson et al. 1986) and suggests that the mouse *bm* series illustrates only a fraction of the genetic events contributing to the generation of class I MHC polymorphism. HLA-B27 is the only other class I HLA antigen in which a relatively large number of subtypes has been examined in molecular detail. For this antigen, gene conversion or analogous genetic events are probably predominant in the generation of subtype polymorphism (Vega et al. 1985a, b, 1986, Seeman et al. 1986, Rojo et al. 1987a). Thus, it is conceivable that for different class I loci or alleles, the frequency with which the various possible diversification mechanisms occur might be different.

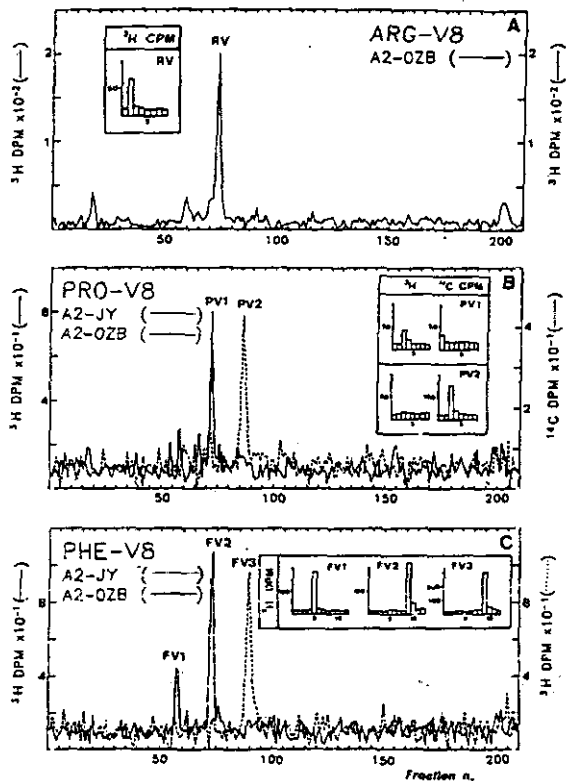


Fig. 6 A-C. Reverse-phase HPLC fractionation and sequence analysis of *S. aureus* V8 protease peptides obtained after digestion of the 120-243 tryptic peptide. In A the Arg-labeled tryptic peptide from variant OZB was digested alone. In B the Pro-labeled difference tryptic peptides from A2.1 and variant OZB (see Fig. 1) were jointly digested. In C, the Phe-labeled difference tryptic peptides were separately digested, with specially drastic conditions (see Materials and methods), and the corresponding chromatograms were plotted together. Numbering and sequencing of peaks are as in Figure 1

The A2 OZB variant is unique among previously characterized class I MHC variants, including those of A2, in that the only detected substitution with the major subtype, A2.1, is located in the $\alpha 3$ domain. All other HLA variants and *H-2* mutants that have been analyzed have changes in $\alpha 1$ and/or $\alpha 2$, but not in $\alpha 3$. As it is well known, most polymorphic positions of class I antigens are located in $\alpha 1$ and $\alpha 2$, the polymorphism in $\alpha 3$ being highly restricted. At the DNA level, base changes at the coding exon for this domain have a pronounced bias toward occurring at the third base of codons, whereas the frequency of changes at the three base positions in codons of those exons coding for $\alpha 1$ and $\alpha 2$ is roughly equivalent (Strachan 1987). This results in the generation of much more amino acid variability in $\alpha 1$ and $\alpha 2$ than in $\alpha 3$, at a com-

parable degree of DNA diversity. Such a variability pattern is believed to reflect the existence of selective pressures promoting polymorphism in $\alpha 1$ and $\alpha 2$ while favoring conservation in $\alpha 3$. The underlying functional basis for the differential distribution of polymorphism along the protein domains would be the primary involvement of $\alpha 1$ and $\alpha 2$ in specific CTL recognition (Lew et al. 1986), whereas $\alpha 3$ would have as its main role interacting with beta-2 microglobulin (B2m) (Yokoyama and Nathanson 1983) and perhaps also stabilizing the structure of $\alpha 1$ and $\alpha 2$. Because of this structural role, substitutions within $\alpha 3$ would be generally subjected to stringent constraints. Since $\alpha 3$ is folded with an Ig-like β -pleated sheet structure (Orr et al. 1979, Borjman et al. 1987a), it is likely that nonconservative changes in this domain, such

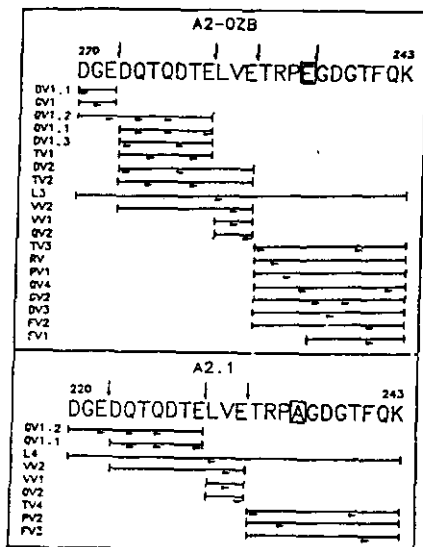


Fig. 7. Amino acid sequence of the single tryptic difference peptide between A2.1 and variant OZB. The assignment of each single-labeled peptide used for sequencing is shown. Vertical arrows denote the cleavage sites for *S. aureus* V8 protease. Horizontal arrows denote residues directly identified by radiochemical sequence analysis. The single amino acid residue which is different in both molecules is boxed. The standard one-letter code for amino acids is used.

as that observed at position 236 in variant OZB, would not be easily accommodated within β -strands. Indeed, X-ray diffraction studies have shown that position 236 of HLA-A2 is located at the end of a β -strand (Borjman et al. 1987a).

The characterization of a naturally occurring variant with changes restricted to $\alpha 3$ provides a novel opportunity to assess the putative participation of this domain in the specific CTL recognition of class I antigens. The role of $\alpha 1$ and $\alpha 2$ in determining the specificity of CTL recognition is well established from three lines of evidence. First, as noted above, most polymorphic positions are located in these two domains. Second, subtle amino acid changes in $\alpha 1$ or $\alpha 2$, such as those occurring in HLA variants and H-2 mutants, affect CTL recognition (López de Castro et al. 1985; Nathenson et al. 1986). Third, exon-shuffling studies have demonstrated that the specificity of CTL recognition of the hybrid molecules expressed on appropriate target cells correlates with the $\alpha 1$ and $\alpha 2$ domains. Previous analyses with exon-shuffled class I

hybrid molecules have failed to find any CTL recognizing polymorphism at $\alpha 3$ (reviewed in Lew et al. 1986). These data are consistent with those showing that the OZB variant is not distinguished from A2.1 by polyclonal A2.1-specific CTL (van der Poel et al. 1986). Nevertheless, some A2-specific alloreactive CTL clones do differentiate between A2.1 and the OZB variant (Borst et al. 1987), suggesting that the observed change in this variant does affect recognition by individual CTL clones. A previous study demonstrated that CTL raised against defective molecules lacking $\alpha 1$ and $\alpha 2$, synthesized from *in vitro* deleted class I genes, could detect polymorphism in the $\alpha 3$ region expressed by these molecules, although they would not recognize intact class I antigens (McCluskey et al. 1986). In addition, differential recognition of mouse B2m alleles by a CTL clone has been reported (Kurtz et al. 1987). These findings add to those concerning variant OZB to suggest that limited structural changes in the class I MHC molecule located outside $\alpha 1$ and $\alpha 2$ may also influence the specificity of CTL recognition. Those A2-specific clones whose reactivity is affected by the amino acid change at position 236 in OZB are also sensitive to changes in $\alpha 1$ and $\alpha 2$, as indicated by their lack of recognition of other A2 variants with changes in either of these two domains (Borst et al. 1987). This indicates either that these clones recognize conformational epitopes contributed for by residues from all three $\alpha 1$, $\alpha 2$, and $\alpha 3$ domains or that the change at position 236 has an indirect effect on epitopes located in the $\alpha 1$ and $\alpha 2$ domains. The latter possibility could be supported by crystallographic analyses showing that position 236 is close to residues involved in interdomain contacts of $\alpha 3$ with both $\alpha 1$ and B2m (Borjman et al. 1987a). But, in contrast to all other known HLA variants, this position is not a part of the antigen-binding site of class I antigens, where many residues form $\alpha 1$ and $\alpha 2$, known to be relevant for T-cell recognition, are located (Borjman et al. 1987a, b). In either case, a correlation of the structure of the OZB variant with the pattern of its differential recognition by some CTL clones indicates that polymorphism in $\alpha 3$ may also influence the specificity of CTL recognition in a non-chimerical, naturally occurring class I antigen. Knowledge of the structure of the OZB variant may now be used to raise CTL specifically recognizing a change in $\alpha 3$, and to test the contribution of polymorphism in this region to the restriction properties of the HLA-A2 molecule.

Acknowledgments. The authors thank Jack L. Strominger, David Andrews, and Bill Lane from the Department of Biochemistry and Molecular Biology, Harvard University, for their collaboration in protein sequencing. We also thank Jan van der Poel and Els Gooltjy for providing the OZB cell line, Hidde Ploegh for his gift of H-specific antibody, William Biddison, Jamie Borst, and Peter Parham for preprints, and José L. Peláez for technical help. This work was supported in part by grants from the U.S.-Spain Joint Committee for Scientific and Technological Cooperation (83/054), Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica (592/84), and Fondo de Investigaciones Sanitarias de la

Seguridad Social (83/1149 and 86/746). Automatic sequencing was partially defrayed by N.I.H. grant AI-10736 to I. L. Strominger, R. C. and N.D. are fellows of the F.I.S. and the Ministerio de Educación y Ciencia, respectively.

References

- Arden, B. and Klein, J.: Biochemical comparison of major histocompatibility complex molecules from different subtypes of *Mus musculus*: evidence for trans-specific evolution of alleles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79: 2342-2346, 1982.
- Baur, M. P. and Danilov, J. A.: Population analysis of HLA-A, B, C, DR, and other genetic markers. In P. I. Terasaki (ed.): *Histocompatibility Testing 1980*, pp. 953-993. UCLA Tissue Typing Laboratory, Los Angeles, California, 1980.
- Biddison, W. E., Krangel, M. S., Strominger, J. L., Ward, F. E., Shearer, G. M., and Shaw, S.: Virus-immune cytotoxic T cells recognize structural differences between serologically indistinguishable HLA-A2 molecules. *Nat. Immun.* 3: 225-232, 1982a.
- Biddison, W. E., Wari, F. E., Shearer, G. M., and Shaw, S.: The self-gestured from the serologically defined HLA antigens. *J. Immunol.* 129: 548-552, 1982b.
- Biddison, W. E., Kosny, D. D., Strominger, J. L., and Krangel, M. S.: A2 antigens. *J. Immunol.* 129: 730-734, 1982.
- Bodmer, W. F., Albert, E. D., Bodmer, J. Y., Dausset, J., Kistritzky-Nielsen, F., Mayr, W., Payne, R., van Rood, J. J., Truks, Z., and In E. D. Albert, M. P. Baur, and W. R. Mayr (eds.): *Histocompatibility Testing 1984*, pp. 4-8. Springer-Verlag, Heidelberg, 1984.
- Strominger, J. L., and Wiley, D. C.: Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 329: 506-512, 1987a.
- Strominger, J. L., Saper, M. A., Samraoui, B., Bennett, W. S., Reijman, P. J., Saper, M. A., Samraoui, B., Bennett, W. S., Strominger, J. L., and Wiley, D. C.: Structural identification of the foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature* 329: 512-518, 1987b.
- Bora, J., de Vries, E., Spijs, H., de Vries, J. E., Boytston, A. W., and for defined alloantigens. *J. Immunol.* 139: 1952-1959, 1987.
- Brenner, M. B., Melena, J., Yang, S. Y., van der Poel, J. J., Pious, D., and Strominger, J. L.: Clonal T lymphocyte recognition of the fine structure of the HLA-A2 molecule. *J. Immunol.* 133: 384-390, 1985.
- Cowan, E. P., Jordan, B. R., and Coligan, J. E.: Molecular cloning and DNA sequence analysis of genes encoding cytotoxic T lymphocyte defined HLA-A3 subtypes: the E1 subtype. *J. Immunol.* 135: 2835-2841, 1985.
- Dickmeiss, E., Soeborg, B., and Svegaard, A.: Human cell-mediated cytotoxicity against modified target cells is restricted by HLA. *Nature* 270: 526-528, 1977.
- Doménech, N., Ezquerro, A., Casado, R., and López de Castro, J. A.: Structural analysis of an HLA-A2.4 functional variant KNE defined by cytotoxic T lymphocytes. Implications for the mapping of HLA-A2-specific T-cell epitopes. *Immunogenetics* 27: 196-201, 1988.
- Draspe, G. R.: Cleavage at glutamic acid with naphthylsuccinyl protease. *Method. Enzymol.* 47: 189-191, 1977.
- Engelhard, V. H. and Benjamin, C.: Xenogeneic cytotoxic T-cell clones recognize alloantigenic determinants on HLA-A2. *Immunogenetics* 18: 461-473, 1983.
- Ezquerro, A., Bragado, R., Vega, M. A., Strominger, J. L., Woody, J. N., and López de Castro, J. A.: Primary structure of papain-solubilized human histocompatibility antigen HLA-B27. *Biochemistry* 24: 1733-1741, 1985.
- R. Castaño et al.: Structure of HLA-A2 variant O2B
- Ezquerro, A., Doménech, N., van der Poel, J. J., Strominger, J. L., Vega, M. A., and López de Castro, J. A.: Molecular analysis of an HLA-A2 functional variant CLA defined by cytotoxic T lymphocytes. *J. Immunol.* 137: 1642-1649, 1986.
- Gaston, J. S. H., Rickinson, A. B., and Epstein, M. A.: Epstein-Barr virus specific cytotoxic T lymphocytes as probes of HLA polymorphism: heterogeneity of T cell restricting determinants associated with the serologically defined HLA-A2 antigen. *J. Exp. Med.* 158: 280-293, 1983.
- Goeth, F. M., Kelly, C., Ellis, S. A., Wallace, L., Rickinson, A., van der Poel, J. J., Crompton, M. J., and McMichael, A. J.: Characterization of the HLA-A2.2 subtype: T cell evidence for heterogeneity. *Immunogenetics* 21: 11-23, 1985.
- Gouilly, E., van Leeuwen, A., Bloksted, E., van Rood, J. J., and Biddison, W. E.: MHC restricted H-Y specific antibodies and cytotoxic T lymphocytes can recognize different self determinants. *J. Exp. Med.* 155: 1567-1572, 1982.
- Gouilly, E., van der Poel, J. J., Giphart, M., and van Rood, J. J.: Analysis of the functional epitopes on different HLA-A2 molecules. *Immunogenetics* 20: 13-21, 1984.
- Gissov, D., Rein, R. S., Meijer, J., de Hoog, W., Seemann, G. H. A., Hochtchenbach, F. M., and Pflugh, H. L.: Isolation, expression, and aspects. *Immunogenetics* 25: 313-322, 1987.
- Holmes, N., Eemil, P., Waa, A. M., Deacony, D. W., and Parham, P.: Multiple genetic mechanisms have contributed to the generation of the HLA-A2/A28 family of class I MHC molecules. *J. Immunol.* 139: 956-961, 1987.
- Horn, S., van der Poel, J. J., and Gouilly, E.: Differential recognition of the serologically defined HLA-A2 antigens by allogeneic cytotoxic T cells. I. Population studies. *Immunogenetics* 16: 135-142, 1982.
- Koller, B. M. and Orr, H. T.: Cloning and complete sequence of an HLA-A2 gene: analysis of two HLA-A alleles at the nucleotide level. *J. Immunol.* 134: 2727-2733, 1985.
- Krangel, M. S., Takezaki, S., Biddison, W. E., Strong, D. M., and Strominger, J. L.: Comparative structural analysis of HLA-A2 antigens distinguishable by cytotoxic T lymphocytes: variants M7 and DR1. *Biochemistry* 21: 6313-6321, 1982.
- Krangel, M. S., Biddison, W. E., and Strominger, J. L.: Comparative structural analysis of HLA-A2 antigens distinguishable by cytotoxic T lymphocytes. II. Variant DR1: evidence for a discrete CTL recognition region. *J. Immunol.* 130: 1856-1862, 1983.
- Kurtz, M. E., Martin-Morgan, D., and Grass, R. J.: Recognition of the β -2 microglobulin-B molecule by a CTL clone. *J. Immunol.* 138: 87-90, 1987.
- Lew, A. M., Liliehoj, E. P., Cowen, E. P., Maloy, W. L., van Schravendijk, M. R., and Coligan, J. E.: Class I genes and molecules: an update. *Immunology* 57: 3-18, 1986.
- López de Castro, J. A., Barbosa, J. A., Krangel, M. S., Birn, P. A., and Strominger, J. L.: Structural analysis of the functional sites of class I HLA antigens. *Immunol. Rev.* 25: 149-168, 1985.
- Marton, D. H., Haady, D. E., Bradley, D. A., Coligan, J. E., Cowan, E. P., and Biddison, W. E.: DNA sequences of the genes that encode the CTL-defined HLA-A2 variants M7 and DR1. *Immunogenetics* 26: 180-192, 1987.
- McCluskey, J., Bluestone, J. A., Coligan, J. E., Maloy, W. L., and Margalit, D. H.: Serologic and T cell recognition of truncated histocompatibility genes: in vitro deleted class I minor histocompatibility genes. *J. Immunol.* 136: 1472-1481, 1986.
- McMichael, A. J., Ting, A., Zvevrick, H. J., and Anderson, G. A.: HLA restriction of cell-mediated lysis of influenza virus-infected human cells. *Nature* 270: 524-526, 1977.
- Nathanson, S. G., Gellibter, J., Pflugh, G. M., and Zeff, R. A.: Murine major histocompatibility complex class I mutants: molecular analysis and structure-function implications. *Annu. Rev. Immunol.* 4: 471-502, 1986.

- Orr, H. T., Lancet, D., Robb, R., López de Castro, J. A., and Strominger, J. L.: The heavy chain of a human histocompatibility antigen (HLA-B7) contains an immunoglobulin-like region. *Nature* 282: 266-270, 1979
- Parham, P., and Bodmer, W. F.: Monoclonal antibody to a human histocompatibility alloantigen, HLA-A2. *Nature* 276: 397-399, 1978
- Pfeffer, P. F. and Thorby, E.: HLA-restricted cytotoxicity against male-specific (H-Y) antigens after acute rejection of an HLA-identical sibling kidney. *Transplantation* 33: 52-56, 1982
- Rojo, S., Aparicio, P., Choo, S. Y., Hansen, J. A., and López de Castro, J. A.: Structural analysis of an HLA-B27 population variant, B27f. Multiple patterns of amino acid changes within a single polypeptide segment generate polymorphism in HLA-B27. *J. Immunol.* 139: 831-836, 1987a
- Rojo, S., Aparicio, P., Hansen, J. A., Choo, S. Y., and López de Castro, J. A.: Structural analysis of an HLA-B27 functional variant, B27d, detected in American Blacks. *J. Immunol.* 139: 3396-3401, 1987b
- Seeman, G. H. A., Rein, R. S., Brown, C. S., and Ploegh, H. L.: Gene conversion-like mechanisms may generate polymorphism in human class I genes. *EMBO J.* 5: 547-552, 1986
- Strachan, T.: Molecular genetics and polymorphism of class I HLA antigens. *Br. Med. Bull.* 43: 1-14, 1987
- Takezani, S., Krangel, M. S., Spijs, H., de Vries, J. E., and Strominger, J. L.: Structural analysis of HLA-B7 antigen variant detected by cytotoxic T lymphocytes. *J. Immunol.* 133: 816-821, 1984
- Van der Poel, J. J., Mölders, H., Thompson, A., and Ploegh, H. L.: Definition of four HLA-A2 subtypes by CML typing and biochemical analysis. *Immunogenetics* 17: 609-621, 1983a
- Van der Poel, J. J., Pool, J., Goulmy, E., and van Rood, J. J.: Differential recognition of the serologically defined HLA-A2 antigen by allo-genic cytotoxic T cells. II. Definition of three HLA-A2 subtypes by CTLs. *Immunogenetics* 17: 599-608, 1983b
- Van der Poel, J. J., Goulmy, E., Giphart, E., Giphart, M. J., and van Rood, J. J.: Variation in the epitopes on the HLA-A2 molecule as recognized by HLA-A2-restricted and alloimmune HLA-A2-specific cytotoxic T lymphocytes. In E. O. Albert, M. P. Baur, and W. E. Mayr (eds.): *Histocompatibility Testing 1984*, pp. 485-489, Springer-Verlag, Heidelberg, 1984
- Van der Poel, J. J., Pool, J., Goulmy, E., Giphart, M. J., and van Rood, J. J.: Recognition of distinct epitopes on the HLA-A2 antigen by cytotoxic T lymphocytes. *Hum. Immunol.* 16: 247-258, 1986
- Van Schravendijk, M. R., Biddison, W. E., Berger, A. E., and Coligan, J. E.: Comparative structural analysis of HLA-A3 antigens distinguishable by cytotoxic T lymphocytes: variant E1. *J. Immunol.* 134: 410-416, 1985
- Vega, M. A., Ezquerro, A., Rojo, S., Aparicio, P., Bragado, R., and López de Castro, J. A.: Structural analysis of an HLA-B27 functional variant: identification of residues that contribute to the specificity of recognition by cytolytic T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82: 7394-7398, 1985a
- Vega, M. A., Wallace, L., Rojo, S., Bragado, R., Aparicio, P., and López de Castro, J. A.: Delineation of functional sites in HLA-B27 antigens. Molecular analysis of HLA-B27 variant Wewak I defined by cytolytic T lymphocytes. *J. Immunol.* 135: 3323-3332, 1985b
- Vega, M. A., Bragado, R., Iványi, P., Felder, J. L., and López de Castro, J. A.: Molecular analysis of a functional subtype of HLA-B27. A possible evolutionary pathway for HLA-B27 polymorphism. *J. Immunol.* 137: 3557-3565, 1986
- Ware, C. F., Krangel, M. S., Pious, D., Burakoff, S. J., and Strominger, J. L.: Recognition of HLA-A2 mutant and variant target cells by an HLA-A2 specific human cytotoxic T lymphocyte line. *J. Immunol.* 131: 1312-1317, 1983
- Yokoyama, K., and Nathenson, S.: Intramolecular organization of class I MHC antigens: localization of the allelotypic determinants and the β_2 -microglobulin binding site to different regions of the H-2K^b glycoprotein. *J. Immunol.* 130: 1419-1425, 1983

Received October 26, 1987

STRUCTURAL IDENTITY BETWEEN HLA-A2 ANTIGENS DIFFERENTIALLY RECOGNIZED BY ALLOREACTIVE CYTOTOXIC T LYMPHOCYTES¹

A. RAÚL CASTAÑO, PILAR LAUZURICA, NIEVES DOMENECH, AND JOSÉ A. LÓPEZ DE CASTRO²

From the Department of Immunology, Fundación Jiménez Díaz, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Avenida Reyes Católicos, 2, 28040 Madrid, Spain

Alloreactive CTL raised against HLA-A2 Ag often display heterogeneous recognition of HLA-A2* target cells. This heterogeneity has been found to reflect structural polymorphism among the corresponding target Ag, thus defining HLA-A2 subtypes. A previous study (van der Poel et al. 1986, *Human Immunol.* 16:247) established the existence of a new HLA-A2.4 variant, A2-SCHU, that was distinguished from A*0206 (A2.4a) by HLA-A2-specific alloreactive CTL. The same CTL subdivided HLA-A2.1 Ag into two subgroups. In the present study, the molecular basis of this heterogeneity has been examined by double-label comparative peptide mapping analysis of differentially recognized A2.1 and A2.4 Ag. In addition, we have determined the complete sequence of polymerase chain reaction-amplified full length cDNA from A2-SCHU. The results show that: 1) A2-SCHU is indistinguishable from A*0206 by peptide mapping; 2) the cDNA sequence of A2-SCHU is identical to that of A*0206; and 3) two differentially recognized A2.1 Ag are both indistinguishable from A*0201 by comparative peptide mapping. These results indicate that differential recognition by alloreactive CTL can occur among structurally identical class I HLA Ag and suggest that allorecognition by such CTL may involve corecognition of endogenous peptides, presumably derived from polymorphic proteins.

HLA class I Ag are human cell surface glycoproteins that present peptides from endogenously synthesized proteins to CTL. Antigenic and peptide-binding specificity of class I molecules is modulated by their high degree of polymorphism, which is genetically encoded in the multiallelic HLA-A, -B, and -C loci. Discrimination among class I alleles has been traditionally carried out by classical tissue typing serology. Nevertheless, subtype polymorphism among well-established serologic specificities can be detected with mAb, IEF, or CTL. Subtypes usually differ from each other in one or very few amino acid residues (1). Many of these are located in the peptide

binding groove of the molecule, frequently at positions that do not appear to be fully accessible to antibodies or to direct interaction with TCR. Indeed, subtypes are often poorly amenable to serologic discrimination. However, both alloreactive and self-restricted CTL, the latter specifically recognizing antigenic peptides bound to class I proteins, are highly sensitive to detecting class I subtypes.

The structural bases of CTL allorecognition are not yet clarified, but two general options exist. First, as originally proposed by Matzinger and Bevan (2) and further developed by others (3), alloreactive T cells would recognize a complex between the alloantigen and an endogenous peptide bound to it. This idea is supported by recent findings that endogenous peptides bind to class I Ag in the endoplasmic reticulum (4, 5) and that they are required for stable assembly and cell surface expression (6-8). Their involvement in alloreactivity is also suggested by growing evidence showing corecognition of specific peptides and MHC Ag by allospecific T cells (9-15). Second, the specificity of alloreactive CTL would be determined solely by the alloantigen, irrespective of any bound peptide. Support from this alternative comes from suggestions that alloreactive T cells might recognize peptide-free class I molecules (16) and that self-restricted, but not alloreactive, CTL killing is abrogated in a mutant target cell with a defect in endogenous protein processing (17). These two options are not mutually exclusive, as different CTL could conceivably recognize either peptide-dependent or peptide-independent epitopes.

One of the most conspicuous examples of subtype polymorphism, and of its relevance in modulating the immunologic features of class I Ag, is found in HLA-A2. As many as 10 structurally different subtypes have been defined for this Ag (18), and their primary structure has been determined (1).³

In previous studies van der Poel et al. (19) reported that target cells from a number of HLA-A2* individuals, expressing HLA-A2 Ag indistinguishable by IEF from the main A2 subtype, A2.1,⁴ were not killed by anti-A2.1 CTL. They were designated as A2.4. Further heterogeneity was subsequently demonstrated with four polyclonal CTL raised against A2.4 Ag. Each of these effec-

Received for publication December 14, 1990.

Accepted for publication January 29, 1991.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked advertisement in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹This work was supported by Grant PB87/0347 from the Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología, R.C. and P.L. are fellows of the Ministerio de Educación y Ciencia, N.D. is a fellow from the Fundación Jiménez Díaz.

²Address correspondence and reprint requests to Dr. José A. López de Castro, Department of Immunology, Fundación Jiménez Díaz, Avenida Reyes Católicos, 2, 28040 Madrid, Spain.

³Castano, A. R., and J. A. López de Castro. Structure of the HLA-A*0204 antigen, found in South American Indians. Spatial clustering of HLA-A2 subtype polymorphism. Submitted for publication.

⁴The current HLA-A2 nomenclature (Ref. 18) has been used through this article only for those Ag expressed on cells that were used as source of material for sequencing, such as A*0201 from JY and A*0206 from CLA. For HLA-A2 Ag expressed on cells from which no structural analysis was available, the previous nomenclature (A2.1-A2.4, see Ref. 19) has been used.

tors revealed a unique reaction pattern when tested against A2.4* target cells, suggesting a subdivision of A2.4 into four subtypes (20). Heterogeneity among A2.4 Ag was also detected with minor H-specific, A2-restricted CTL (21). The structure of three of these putative A2.4 subtypes was subsequently analyzed in our laboratory by comparative peptide mapping and radiochemical sequencing (22-24). These studies confirmed that they were, indeed, structurally different subtypes, and they were designated as A*0206 (A2.4a), A*0207 (A2.4b), and A*0208 (A2.4c). The fourth putative subtype was distinguished from A*0206 by only one of the CTL used (CTL 14 in Ref. 20). This CTL could also subdivide A2.1 Ag into two groups, as it reacted strongly with only a fraction of the A2.1* cells and little or nothing with other cells bearing this Ag (20).

In this report we have determined the primary structure of the fourth CTL-defined A2.4 subtype and demonstrated that it is identical to A*0206. Furthermore, representative Ag from the two A2.1 subgroups defined by the same effector cells were compared by peptide mapping and both were identical to A*0201 by this criterion. The results demonstrate that alloreactive CTL are capable of distinguishing among structurally identical class I Ag and suggest that additional elements, such as endogenous peptides, may be responsible for the reaction pattern of these CTL.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines. The following EBV-transformed LCL³ were used as source of material: JY (A*0201); B7: DR4, w6, ELST (A2.1); B5; Cw2, w4; DR4, 7; ARC (A1, 2.1); B7, 6; Cw6; DR1, 4; CLA (A*0206, 3; B8, 35; DR2), and SCHU (A2.4, 31; B5, 12; Cw1, 5; DR5, w6). All cells except JY were kindly provided by Drs. Els Goulimy and Jo Pool from the Department of Immunohaematology and Bloodbank, University Hospital, Leiden, The Netherlands. The cells were cultured in RPMI 1640 medium containing 2 mM glutamine (GIBCO, Paisley, UK), 10% heat-inactivated FCS (Flow Laboratories Inc., Middlesex, UK), and no antibiotics, at 37°C and 5% CO₂.

Purification of radiochemically labeled HLA-A2 H chains. This was performed by immunoprecipitation with the A2/AvB9-specific mAb PA2.1 (25) and anti-detached HLA-A,B H chain serum (a kind gift of Dr. Hidde Ploegh, Amsterdam, The Netherlands), exactly as described (22).

Peptide mapping and radiochemical sequence analysis. Double-label comparative peptide mapping and partial radiochemical sequencing was carried out as described (22). Briefly, tryptic maps of the jointly digested HLA-A2 H chains to be compared, which were previously labeled with a same ³H- and ¹⁴C-amino acid, respectively, were obtained by HPLC in a gradient of ammonium acetate and acetonitrile, as detailed elsewhere (26). Further fractionation of some unresolved peptide mixtures was carried out by HPLC with a gradient of acetonitrile and trifluoroacetic acid as previously described (27).

PCR amplification and sequencing of HLA-A2 cDNA. Total cDNA from SCHU cells. Total cytoplasmic RNA from 3 to 5 × 10⁶ SCHU cells was isolated as previously described (28). 17 µg of this RNA was used to synthesize full length HLA class I cDNA by using 1 µM of the 3' UT-derived anti-sense oligonucleotide primer 5'-GGGAATT-CAGTCCCAACCAAGCCAGCTC-3' containing an EcoRI site and avian myeloblastoid virus reverse transcriptase (Boehringer Mannheim Biochemicals, Mannheim, FRG) under conditions described elsewhere (28).

After incubation, 6 µl of the reaction mixture were amplified in a solution containing 130 µM deoxy-nucleotide-triphosphates, 6 mM Tris-HCl, pH 8.3, 30 mM KCl, 0.006% gelatin, 1.6 mM MgCl₂, and 2.5 U of Taq polymerase (Cetus Corp., Emeryville, CA), with 1 µM each of the 3' UT and the 5' leader exon-derived primers (5'-GCAAGCTTATGACGGCTATGCGCTCCGACACC-3'), this one having an HindIII recognition site. These two primers were designed as to have the capacity to hybridize with any class I HLA Ag (29). Amplification was carried out for 30 cycles of 1:10 s at 92°C, 2:20 s at

35.5°C, and 10 min at 70°C, with a final extension cycle of 110 s at 92°C, 2:20 s at 35.5°C, and 15 min at 70°C, in a thermocycler (Hybaid Ltd., Middlesex, UK). An aliquot (usually 1/10) of the reaction mixture was loaded on a 1% agarose gel and run for 1 h at 90 V. A band of about 1.1 kb, corresponding in size to HLA class I amplified material, was visualized. To assure the presence of HLA-A2 cDNA in this band, alkaline Southern blot analysis was carried out as described elsewhere (28), using an HLA-A2-specific oligonucleotide matching nucleotides 142-168 from exon 3, designated as A2a2 (5'-TGGCACTTCAGACCAACCAAGCACAAGT-3').

The remaining PCR reaction mixture was loaded on a 1% low melting temperature agarose (FMC BioProducts, Rockland, ME) gel, and the 1.1-kb band was extracted with the GeneClean Kit (Bio 101 Inc., La Jolla, CA), as specified by manufacturer. Purified DNA was digested with 20 U of EcoRI and HindIII (Boehringer Mannheim Biochemicals) for 3 h at 37°C and ligated to EcoRI-HindIII-treated pUC 18 for at least 4 h at 14°C. Half of the ligation mixture was used to transform competent DH5 α F' cells. Transformant colonies were screened on LB plates with ampicillin, IPTG, and X-Gal. Nylon filters (Hybond-N, Amersham, UK) containing DNA from the white colonies, were screened for HLA-A2-containing clones with the [³²P]-labeled A2a2 specific probe as above, except that hybridization was carried out at 10°C below melting temperature.

HLA-A2 containing clones were grown in Tertic Broth medium and recombinant plasmids were isolated using a standard procedure: 2 µg of plasmid from any given colony were digested with EcoRI and HindIII. The 1.1-kb band was isolated as above and subcloned in M13mp18. The single stranded forms of M13 subclones were used for sequencing. This was done with Sequenase (U.S. Biochemical Corp., Cleveland, OH) as indicated by the manufacturer. Three additional oligonucleotides besides the M13 universal primer were used: the A2a1 primer, matching nucleotides 180-203 from HLA-A2 exon 2 (5'-GAGGGGACACACCGAAAGTGAAG-3'), A2a2, described above, and A2a3, matching nucleotides 138-154 of exon 4 (5'-GAGCTGTGGAGCACG-3'). All primers were purified by PAGE before use.

RESULTS

Comparative peptide mapping fails to reveal any structural differences among CTL-defined HLA-A2 variants CLA and SCHU. CTL 14 was an allospecific bulk CTL raised from HLA-A2* responder cells against A*0207 (20). This differs from the prototype A*0201 by a single amino acid change at position 99 (23). Besides killing the stimulator cells, CTL 14 lysed only a fraction of the A2.1 cells tested, as well as the A*0206-bearing cells from individual CLA, CTLs bearing A2.2, A2.3, and the A2.4 cells from KLO (A*0208) and SCHU were not lysed (20).

The structure of A2-SCHU was first analyzed by comparative peptide mapping of Lys- and Arg-labeled tryptic peptides with the A*0201 Ag from JY cells. These two amino acids together label all of the tryptic peptides but the carboxyl-terminal one. The Lys-labeled map was identical (Fig. 1A). The Arg-labeled map revealed two [³H]-labeled (R20 and R22) and a [¹⁴C]-labeled (R21) difference peaks (Fig. 1B). On the basis of a previous study (22), this pattern, as well as the elution positions of the difference peaks, suggested that the two molecules being compared could differ at the peptides spanning residues 7-14 and 7-17 (YFFTSVSRPGR in A*0201), resulting from partial tryptic cleavage at the Arg₁₄-Pro₁₅ bond. To confirm this, a Tyr-labeled map from these two molecules was obtained (Fig. 1C). As expected, it showed two [³H]-labeled (Y16 and Y18) and a [¹⁴C]-labeled (Y17) difference peaks, corresponding in their elution positions to those in the Arg-labeled map. Sequence analysis of Y16 and Y18 revealed Tyr at cycles 1 and 3 (Fig. 1C). Among all HLA-A2 Ag of known structure, the only tryptic peptides with Tyr at residues 1 and 3 are those spanning residues 7-14 and 7-17 (A*0205 (A2.2V), A*0206 (A2.4a), A*0208 (A2.4c), and A*0210 (A2-LEE). All other A2 Ag have Phe at position 9 and do not generate such tryptic

³ Abbreviations used in this paper: LCL, lymphoblastoid cell lines; PCR, polymerase chain reaction.

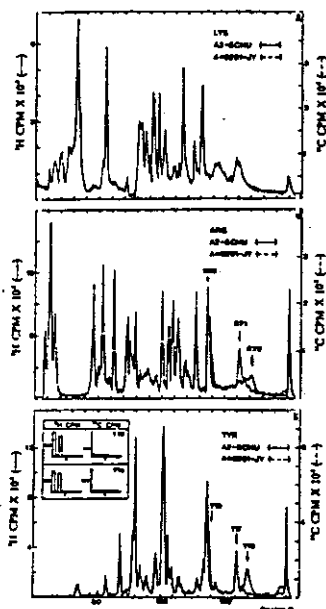


Figure 1. Reverse-phase HPLC comparison of Lys- (A), Arg- (B), and Tyr- (C) labeled tryptic peptides from A2-SCHU and A*0201 from JY. Peaks are numbered according to their relative elution positions within each peptide map. Difference peaks are specified. The radiochemical sequence analysis of Y16 and Y18 is indicated in C. For each peptide, ^3H and ^{14}C radioactivity (cpm y-axis) is separately plotted vs cycle number (x-axis). Y16 was purified to homogeneity (see Materials and Methods) before sequencing.

peptides. Thus, the result suggested that A2-SCHU differed from A*0201 by a Phe to Tyr change at position 9. The absence of any other difference peptides further suggested that A2-SCHU could be identical to A*0206, as this is the only subtype differing from A*0201 solely by a Phe to Tyr change at position 9 (1). Hence, A2-SCHU was examined vs the A*0206 Ag from CLA by comparative peptide mapping of Lys- and Arg-labeled tryptic peptides. As shown in Figure 2, both molecules were identical by this criterion.

The cDNA sequence of A2-SCHU is identical to A*0206. HLA-A2 full-length cDNA obtained from SCHU cells was amplified using class I-derived primers without locus specificity. Appropriate restriction sites were incorporated in the sequence of these primers to facilitate cloning of amplified material.

Five independent full-length cDNA HLA-A2 clones were subcloned in M13 for sequencing. Complete sequences (1098 bp) from three of these clones were determined. In addition, partial sequences were obtained for the two other clones, spanning nucleotides 1-305 and 1-214, respectively, and 515-1098 with both clones. The sequences obtained from all five clones were identical to each other (Fig. 3) and to the A*0206 sequence (30, 31).

Comparative peptide mapping fails to reveal amino

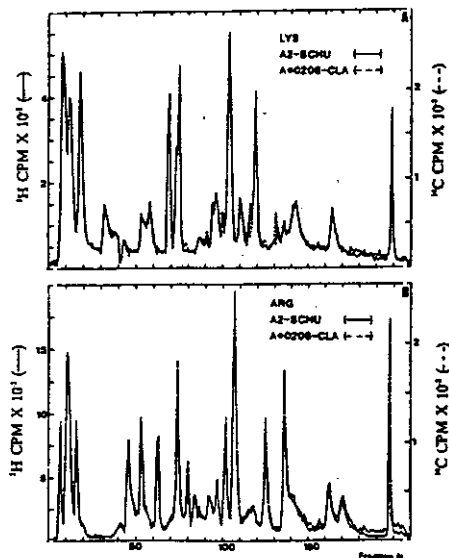


Figure 2. Reverse-phase HPLC comparison of Lys- (A) and Arg- (B) labeled tryptic peptides from A2-SCHU and A*0206 from CLA cells.

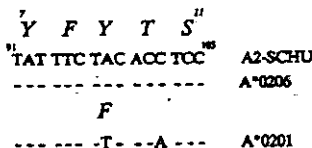


Figure 3. cDNA and deduced amino acid sequence of A2-SCHU between codons 7 and 11 from exon 2. The sequence is compared with those of A*0206 and A*0201 (30). Dashes indicate identity with A2-SCHU. The standard one-letter code for amino acids is used. All three sequences are identical outside the segment shown.

acid differences among CTL-defined A2.1 subtypes. The identity between the two A2.4 Ag distinguished by CTL 14 raised the possibility that this CTL could also be distinguishing among A2.1 Ag on the basis of factors other than differences in their primary structure. To test this possibility, HLA-A2 proteins from each of the two A2.1 subgroups distinguished by CTL 14 were comparatively analyzed with the A*0201 Ag from JY cells. The corresponding HLA-A2.1 Ag were isolated from LCL ARC and ESST, derived from lymphocytes susceptible, and resistant to lysis by CTL 14. Lys- and Arg-labeled comparative tryptic maps were obtained for each of these Ag with A*0201. The results (Fig. 4) show that both A2-ARC and A2-ESST are identical to A*0201 by this criterion.

DISCUSSION

In those instances in which serologically homogeneous class I Ag that were differentially recognized by alloreactive CTL have been examined at a molecular level, struc-

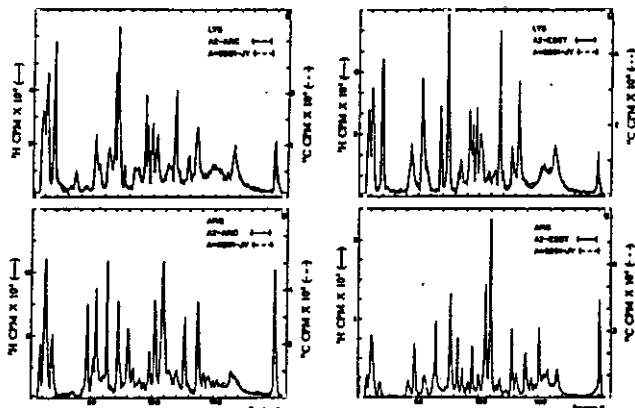


Figure 4. Reverse-phase HPLC comparison of Lys- and Arg-labeled tryptic peptides from A2-ARC (A and B, respectively) and A2-ESST (C and D) with A*0201 from JY cells. Height differences in the peaks eluting at positions 89 and 87 (D) are related to the glycopeptide. They are not due to sequence differences but, probably, to differences in the degree of sialic acid saturation (23).

tural changes in the alloantigen have been found. Frequently such changes are located in the α -helices of the peptide binding site, with their side chains pointing into the pocket (1). Sometimes, for example with A*0206 and A*0207, a single amino acid change located in the β -pleated sheet, at the bottom of the groove, is sufficient to induce differences in CTL allorecognition (20). This has been taken as a suggestion that the effect of subtype polymorphism on allorecognition is due to modulation on peptide binding rather than to a direct effect on the structure of the alloantigen (32). However, the latter possibility is difficult to rule out, as it might be argued that a given amino acid change could influence the orientation of neighbor side chains that are more accessible to the TCR in such a way as to alter specific recognition.

In the present study, we have examined the structure of HLA-A2 molecules that were differentially recognized by HLA-A2-specific bulk CTL, and have shown that such distinction was made among HLA-A2 Ag with identical amino acid sequences. Two techniques were used: 1) double-label comparative peptide mapping, and 2) DNA sequencing of PCR-amplified full length cDNA. The former approach has been extensively used in our laboratory for structural analysis of HLA-A2 and HLA-B27 subtypes (reviewed in Ref. 1). It does not allow formally ruling out highly conservative substitutions with no effect on the chromatographic profile of the corresponding peptides. Nevertheless, its high sensitivity has been demonstrated in multiple studies (31, 33, 34) in which the amino acid sequence determined with this technique was totally confirmed by subsequent DNA sequencing. With peptide mapping, we have provided evidence for structural identity of two A2.4 Ag, A2-SCHU and A*0206, distinguished by CTL 14. We have also shown that the A2.1 Ag expressed by one susceptible and one resistant target cells were undistinguishable from A*0201 by this technique, strongly suggesting that both were identical A*0201 molecules. Sequencing of multiple full length clones from specific PCR-amplified cDNA is a reliable and relatively fast approach to establish the amino acid sequence of class I HLA Ag (35). With this approach, we have demonstrated that A2-SCHU is identical to A*0206 expressed

on the susceptible target CLA. This identity holds at the DNA level, as A2-SCHU, like A*0206 from CLA (31), differs from A*0201, within the coding regions, by only a replacement substitution at codon 9 (T to A at nucleotide 98) and a silent one at codon 10 (A to C at nucleotide 102). In our analysis, the apparent error rate of the PCR reaction was much lower than previously reported (35), as no nucleotide differences or other artifacts were found between any of the sequenced clones and the A*0206 sequence.

There are two possible interpretations for these results. First CTL 14 would recognize A*0201 and A*0206 Ag, but susceptibility to lysis of the corresponding target cells would be dependent on differences in nonspecific factors influencing avidity, such as cell surface glycosylation patterns or density of adhesion molecules. This possibility is unlikely, as the reaction pattern of CTL 14 was established with normal peripheral blood lymphocytes from multiple individuals, and the same target cells were used with other CTL showing totally different killing patterns (20). A second alternative, which we favor, is that CTL 14 recognizes a peptide associated to HLA-A2. Such peptide would only be present in a fraction of the A2* individuals. CTL 14 reacted strongly with 14 of 33 A2.1* individuals tested, and much less or nothing with the remainder (20). One possible explanation for this is that the putative peptide comes from a polymorphic protein that is expressed only in nearly 50% of the individuals tested. This interpretation supports the concept that at least some alloreactive CTL may critically depend on corecognition of specific peptides bound to the MHC alloantigen, thus being allorestricted.

The interpretation of the CTL 14 reaction pattern suggested by the present study implies that a sizeable fraction of the alloreactive CTL clones in this bulk population must recognize one peptide presented by HLA-A2. As, presumably, multiple endogenous peptides are bound to this alloantigen, an explanation for the apparent limitation of clonal specificities within the CTL 14 population is required. The stimulator Ag for CTL 14, A*0207 (see above), differs from the other subtypes recognized by CTL 14, A*0201 and A*0206, in one and two amino acids,

respectively (1). These changes are located in the β -pleated sheet floor of the peptide binding groove (32) and are known to alter HLA-A2-restricted peptide presentation (31, 36, 37). It is conceivable that only a few of the endogenous peptides presented by A*0207 can also be presented by both A*0201 and A*0208. Thus, only those clones capable of recognizing peptide(s) in association with these three subtypes would be responsible for the cross-reactive killing of CTL 14. Two features of the CTL 14 reactivity suggest that a majority of its T cell population carry this specificity. First, lytic efficiency toward susceptible targets bearing any of the three subtypes was very similar (20). Second, cold target competition studies showed strong inhibition of stimulator cell lysis by both A2.1* and A*0206* cold targets (38). These studies also argue against the possibility that two T cell subpopulations within CTL 14 were responsible for cross-reaction with either A2.1* or A*0206* cells. Thus, it would appear that, under the conditions in which CTL 14 was obtained, a particular peptide + HLA-A2 complex could have been an immunodominant structure, against which most of the alloreactive response was directed. A recent study suggests that it may be a limited number of major endogenous peptides bound to a given class I MHC Ag on the cell surface (39). This raises the possibility that the number of MHC + peptide complexes with high allostimulatory potential might be limited. In addition, the nature of immunodominant epitopes could be influenced by the particular responder/stimulator combination used.

An important question is to what extent constitutively bound endogenous peptides essentially affect the specificity of allorecognition. We have also analyzed three CTL-defined HLA-B7 variants (B*0702, B7.1, and B7.4) that were differentially recognized by a set of HLA-B7-specific CTL clones (40) by comparative peptide mapping and have shown that they all were undistinguishable from B*0702 by this criterion (unpublished observations). This suggests again that the CTL clones used to define such variants could be recognizing B*0702 in an allorestricted manner, in association with peptides differentially expressed in the population. Indeed, several examples of allorestricted CTL specific for endogenous peptides derived from polymorphic MHC proteins have been recently reported (12-15). However, it is likely that many endogenous peptides are not polymorphic within the species, so that alloreactive CTL recognizing these peptides in the context of a given alloantigen may not reveal their allorestricted character in panel analyses, especially if target cells belong in similar lineages. This is pointed out by evidence showing that recognition (41-44) or fine specificity pattern (45) of some alloreactive CTL depends on the target cell type. In addition, large numbers of CTL precursors that are capable of developing into allorestricted CTL can be detected, upon appropriate in vitro stimulation of unfractionated peripheral T lymphocytes, with virus-infected allogeneic cells (46). This indicates that peptide + alloantigen complexes can induce allorestricted responses.

In conclusion, we have provided evidence for the allorestricted character of an alloreactive CTL through the demonstration of structural identity of differentially recognized target Ag. As this adds to evidence in other experimental systems showing the involvement of peptides in allorecognition and the capability of undepleted

T cell populations to generate allorestricted CTL, we feel that corecognition of peptides and MHC Ag is a frequent feature among alloreactive T cells.

Acknowledgments. We thank Elis Goumy and Jos Pool, from the University Hospital, Leiden, for providing the cells on which this work is based. We also thank Jorge Martínez-Lasso from the Hospital 12 de Octubre, Madrid, for retyping the ESST, ARC, and SCHU cells, and our colleagues Dolores Jaraquemada, Rafael Bragado, and José A. Villadangos for their help.

REFERENCES

- López de Castro, J. A. 1989. HLA-B27 and HLA-A2 subtypes: structure, evolution and function. *Immunol. Today* 10:215.
- Matzinger, P., M. J. Bevan. 1977. Hypothesis: why do so many lymphocytes respond to major histocompatibility antigens? *Cell. Immunol.* 28:1.
- Kourilsky, P., and J. M. Chavrier. 1989. MHC restriction, alloreactivity, and thymic education: a common link? *Cell* 56:337.
- Nuchtern, J. G., J. S. Bonifazi, W. E. Hildeman, and R. D. Klausner. 1989. Brefeldin A implicates egress from the endoplasmic reticulum in class I-restricted antigen presentation. *Nature* 338:223.
- Yewdell, J. W., and J. R. Bennink. 1989. Brefeldin inhibits presentation of protein antigens to cytotoxic lymphocytes. *Science* 244:1072.
- Townsend, A., C. Otáñez, J. Barrio, E. G. Ljunggren, L. Foster, and E. Kärre. 1989. Association of class I major histocompatibility heavy and light chains induced by viral peptides. *Nature* 340:443.
- Cavanagh, V., J. Alexander, E. Anderson, C. Lamb, P. Crosswell, A. McMichael, F. Gotch, and A. Townsend. 1990. Presentation of viral antigens controlled by a gene in the major histocompatibility complex. *Nature* 345:449.
- Townsend, A., T. Elliot, V. Cavanagh, L. Foster, B. Barber, and A. Tse. 1990. Assembly of MHC class I molecules analyzed in vitro. *Cell* 62:283.
- Clayberger, C., P. Farham, J. Rothbard, D. S. Ludwig, G. E. Schoenle, and A. M. Krensky. 1987. HLA-A2 peptides can regulate cytotoxicity by human alloreactive T lymphocytes. *Nature* 330:763.
- Song, E. S., R. Link, C. A. Glass, M. McMichael, and R. S. Goodenow. 1985. Alloreactive cytotoxic T lymphocytes recognize an H-2 peptide in the context of a murine major histocompatibility complex class I molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:1927.
- Olsen, C. A., L. C. Williams, E. McLaughlin-Taylor, and M. McMichael. 1989. Creation of H-2 class I epitopes using synthetic peptides: recognition by alloreactive cytotoxic T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1031.
- de Koster, M. S., D. C. Anderson, and A. Terrijden. 1989. T cells sensitized to synthetic HLA-DR3 peptide give evidence of continuous presentation of denatured HLA-DR3 molecules by HLA-DP. *J. Exp. Med.* 169:1191.
- Essakert, S., J. Fabron, C. de Preval, and M. Thomson. 1990. Corecognition of HLA-A1 and HLA-DP β 3 by a human CD4⁺ alloreactive T lymphocyte clone. *J. Exp. Med.* 172:387.
- Schwend, D. J. 1990. On the peptide model of allorecognition: cytotoxic T lymphocytes recognize an alloantigen encoded by two HLA-linked genes. *Hum. Immunol.* 27:229.
- Chen, B. F., A. Médral, and P. Farham. 1990. Cytotoxic T cell recognition of an endogenous class I HLA peptide presented by a class II HLA molecule. *J. Exp. Med.* 172:779.
- Elliot, T. J., and H. P. Eisen. 1990. Cytotoxic T lymphocytes recognize a restricted class I histocompatibility antigen (HLA-A2) as an allelic target molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:5213.
- Otáñez, C., J. Barrio, H.-G. Ljunggren, L. Foster, E. Wolpert, G. Klein, A. R. M. Townsend, and E. Kärre. 1990. Resistance to H-2 restricted but not to allelic-specific graft and cytotoxic T lymphocyte responses in lymphoma mutant. *J. Immunol.* 145:52.
- The WHO Nomenclature Committee for factors of the HLA system. 1980. Nomenclature for factors of the HLA system. 1989. *Immunogenetics* 31:157.
- van der Poel, J. J., J. M. Mödders, A. Thompson, and H. L. Ploegh. 1983. Definition of four HLA-A2 subtypes by CML typing and biochemical analysis. *Immunogenetics* 17:609.
- van der Poel, J. J., J. Pool, E. Goumy, M. J. Giphart, and J. J. van Rood. 1986. Recognition of distinct epitopes on the HLA-A2 antigen by cytotoxic T lymphocytes. *Human Immunol.* 16:247.
- van der Poel, J. J., E. Goumy, M. J. Giphart, and J. J. van Rood. 1984. Variation in the epitopes on the HLA-A2 molecules as recognized by HLA-A2 restricted alloimmune HLA-A2 specific cytotoxic T lymphocytes. *Histocompatibility Testing* 1984:485.
- Esquerra, A., N. Doménech, J. L. van der Poel, J. L. Strominger, M. A. Vega, and J. A. López de Castro. 1986. Molecular analysis of

- an HLA-A2 functional variant CLA defined by cytolytic T lymphocytes. *J. Immunol.* 137:1642.
23. Doménech, N., A. Esquerre, R. Castaño, and J. A. López de Castro. 1988. Structural analysis of an HLA-A2.4 functional variant KNE defined by cytolytic T lymphocytes. Implications for the mapping of HLA-A2-specific T-cell epitopes. *Immunogenetics* 27:196.
 24. Doménech, N., R. Castaño, E. Goubmy, and J. A. López de Castro. 1988. Molecular analysis of HLA-A2.4 functional variant KLO: close structural and evolutionary relatedness to the HLA-A2.2 subtype. *Immunogenetics* 28:143.
 25. Parham, P., and W. F. Bodmer. 1978. Monoclonal antibody to a human histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 276:397.
 26. Vega, M. A., L. Wallace, S. Rojo, R. Bragado, P. Aparicio, and J. A. López de Castro. 1985. Delineation of functional sites in HLA-B27 antigens. Molecular analysis of HLA-B27 variant Wewak I defined by cytolytic T lymphocytes. *J. Immunol.* 135:3323.
 27. Rojo, S., P. Aparicio, S. Choo, J. A. Hansen, and J. A. López de Castro. Structural analysis of an HLA-B27 population variant B271. Multiple patterns of amino acid changes within a single polypeptide segment generate polymorphism in HLA-B27. *J. Immunol.* 139:631.
 28. Bragado, R., P. Lantierica, D. López, and J. A. López de Castro. 1990. T cell receptor V β gene usage in a human alloreactive response. Shared structural features among HLA-B27-specific T cell clones. *J. Exp. Med.* 171:1169.
 29. Watkins, D. L., Z. W. Chen, A. L. Hughes, M. G. Evans, T. F. Tedder, and M. L. Letvin. 1990. Evolution of the MHC class I genes of the New World primate from ancestral homologues of human non-classical genes. *Nature* 346:60.
 30. Parham, P., D. A. Lawlor, C. E. Lomen, and F. D. Ennis. 1989. Diversity and diversification of HLA-A, B, C alleles. *J. Immunol.* 142:3937.
 31. Mattson, D. H., N. Shimoto, E. P. Cowan, J. J. Beaklin, R. V. Turner, B. D. Coligan, W. L. Maloy, and W. E. Biddison. 1989. Differential effects of amino acid substitution in the β -sheet floor and α 2 helix of HLA-A2 on recognition by alloreactive viral peptide-specific cytotoxic T lymphocytes. *J. Immunol.* 143:1101.
 32. Björkman, P. J., M. A. Saper, B. Samrouni, W. S. Bennett, J. L. Strominger, and D. C. Wiley. 1987. The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature* 329:512.
 33. Seemann, G. H. A., R. S. Rehn, C. B. Brown, and K. L. Floege. 1986. Gene conversion-like mechanisms may generate polymorphism in human class I genes. *EMBO J.* 5:547.
 34. Choc, S. Y., T. E. John, H. T. Orr, and J. A. Hansen. 1988. Molecular analysis of the variant alloantigen HLA-B27d (HLA-B*2703) identifies a unique single amino acid substitution. *Hum. Immunol.* 21:209.
 35. Eonias, P. D., J. Zemmour, R. D. Saiter, and P. Farham. 1990. Rapid cloning of HLA-A, B cDNA by using the polymerase chain reaction: frequency and nature of errors produced in amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:2833.
 36. McMichael, A. J., F. M. Gotch, J. Santos-Aguado, and J. L. Strominger. 1988. Effects of mutations and variations of HLA-A2 on recognition of a virus peptide epitope by cytotoxic T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85:9194.
 37. Robbins, P. A., L. A. Lettice, P. Rota, J. Santos-Aguado, J. Rothbard, A. J. McMichael, and J. L. Strominger. 1989. Comparison between two peptide epitopes presented to cytotoxic T lymphocytes by HLA-A2. Evidence for discrete locations within HLA-A2. *J. Immunol.* 143:4066.
 38. van der Post, J. J. 1985. HLA antigens as immunomodulators: a model study using HLA-A2 subtypes. Ph. D. Thesis. Leiden University, 46 pp.
 39. Van Bloek, G. M., and S. G. Nathanson. 1990. Isolation of an endogenously processed immunodominant viral peptide from the class I H-2K^b molecule. *Nature* 348:213.
 40. Van Seventer, G. A., B. Hiss, C. J. Meisel, and P. Ivanyi. 1986. Fine specificity of human HLA-B7-specific cytotoxic T-lymphocyte clones. Identification of HLA-B7 subtypes and histotopes of the HLA-B7 cross-reacting group. *Human Immunol.* 16:373.
 41. Heath, W. R., M. F. Hurd, F. R. Carbone, and L. Sherman. 1989. Peptide-dependent recognition of H-2K^b by alloreactive cytotoxic T lymphocytes. *Nature* 344:749.
 42. Marrack, P., and J. Kappler. 1988. T cells can distinguish between allogeneic major histocompatibility complex products on different cell types. *Nature* 332:840.
 43. Lombardi, G., S. Bhdra, J. R. Lamb, J. R. Batchelor, and R. L. Lechler. 1989. Corecognition of endogenous antigens with HLA-DR1 by alloreactive human T cell clones. *J. Immunol.* 142:753.
 44. Molina, I. J., and B. T. Huber. 1990. The expression of a tissue specific self-peptide is required for allorecognition. *J. Immunol.* 144:2062.
 45. Rojo, S., D. Lopez, V. Calvo, and J. A. López de Castro. 1991. Conservation and alteration of HLA-B27-specific T cell epitopes on mouse cells. Implications for peptide-mediated alloreactivity. *J. Immunol.* 146:634.
 46. Kabelitz, D., W. R. Herzog, K. Heeg, H. Wagner, and J. Reimann. 1987. Human cytotoxic T lymphocytes. III. Large numbers of peripheral blood T cells clonally develop into alkali-resistant anti-viral cytotoxic T cell populations in vitro. *J. Mol. Cell. Immunol.* 3:49.

Original articles

Structure of the HLA-A*0204 antigen, found in South American Indians. Spatial clustering of HLA-A2 subtype polymorphism

A. Raul Castaño and José A. López de Castro

Department of Immunology, Fundación Jiménez Díaz, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Avenida Reyes Católicos, 2, E-28040 Madrid, Spain

Received April 8, 1991

Abstract. The primary structure of the HLA-A2 subtype A*0204 (isoelectric focusing variant A2.4) has been determined. cDNA encoding this subtype was amplified by the polymerase chain reaction. Four independent full-length cDNA clones encoding A*0204 were analyzed to obtain a consensus sequence for this subtype. A*0204 differs from A*0201 by a single nucleotide change of G to T through the coding regions, resulting in an Arg to Met change at position 97. This substitution accounts for the isoelectric focusing pattern of the subtype. The same change occurs in other HLA-A specificities in association with other changes in its vicinity. The absence of additional substitutions in A*0204 suggests that it could have arisen from A*0201 by point mutation, and that recurrent mutations may take place during HLA diversification. The spatial location of this change implies that A*0204 must be a functional variant. Comparison of its sequence with other HLA-A2 subtypes reveals that much of the HLA-A2 subtype polymorphism is generated by variations in four neighboring positions, including position 97, which are located in two adjacent β -strands on the floor of the peptide binding site of the molecule.

phocytes (CTL) or other means. Subtypes usually differ among each other in only one or very few amino acid residues, which tend to be located in areas of the molecule in which variability can alter the specificity of peptide and/or T-cell receptor (Tcr) binding (López de Castro 1989). Furthermore, subtypes frequently show restricted ethnic distribution. Thus, molecular analysis of their heterogeneity provides insight into the mechanisms of class I HLA diversification and into the influence of limited structural changes, as they occur in the population, on CTL recognition. These aspects are particularly well illustrated in the case of HLA-A2. This is the most common class I serologic specificity in the overall human population, as well as in most ethnic groups (Baur et al. 1984). Since the initial observation that influenza-virus-specific, HLA-A2 restricted CTL failed to kill some virus-infected A2 target cells (Biddison et al. 1980), numerous studies, using CTL, IEF, and monoclonal antibodies (mAb) have defined an extensive heterogeneity within this antigen. Nine structurally different HLA-A2 subtypes have been previously characterized by protein or DNA sequence analysis (López de Castro 1989). A population study, carried out during the Tenth International Histocompatibility Workshop revealed five different IEF patterns among HLA-A2 antigens from various ethnic groups, which were designated A2.1 to A2.5 (Yang 1989b). Known sequences only account for three such IEF patterns, A2.1 to A2.3, as the structure of many subtypes does not involve charge alterations. In this report we have determined the structure of IEF variant A2.4 (A*0204), a subtype that has only been found among South American Indians (Yang 1989a, b). Its structure, when compared with other subtypes, reveals a striking clustering of those positions which are polymorphic among HLA-A2 subtypes in a particular region of the molecule with great relevance for modulating peptide binding.

Introduction

Class I HLA antigens, as defined by classic tissue typing serology, can often be subdivided into a number of subtypes by isoelectric focusing (IEF), cytotoxic T lymphocytes

The nucleotide sequence data reported in this paper have been submitted to the EMBL nucleotide sequence database and have been assigned the accession number X57954.

Address correspondence and offprint requests to: J. A. López de Castro.

Materials and methods

Cell line. The Epstein-Barr virus (EBV) transformed lymphoblastoid cell line (LCL) RML (HLA-A2, B51, DRw16, Dw22, DQw7), which was typed as A2.4 (A*0204) by IEF in the Tenth International Histocompatibility Workshop (Yang 1989a), was used as source of material. This cell line derived from a South American Indian individual and was kindly provided by Dr. S. Marsh from The Imperial Cancer Research Fund, London, England. The cells were cultured in RPMI 1640 medium containing 2 mM Glutamine (GIBCO laboratories, Paisley, UK), 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS; Flow Laboratories, Middlesex, UK) and no antibiotics, at 37 °C and 5% CO₂.

PCR amplification and sequencing of HLA-A2 full-length cDNA from RML cells. Total cytoplasmic RNA from 2 × 10⁶ RML cells was isolated as previously described (Bragado et al. 1990). 1 µg of this RNA was used to synthesize full-length HLA class I cDNA using 1 µM of the 3' UT-derived anti-sense oligonucleotide primer 5'-GCCAATT-CAGTCCACACAAAGCCAGCTG-3' containing *Eco* RI site (underlined), and avian myeloblastoid virus reverse transcriptase (Boehringer Mannheim Biochemicals, Mannheim, FRG) under conditions described elsewhere (Bragado et al. 1990).

After incubation, 6 µl of the reaction mixture were amplified in a solution containing 130 µM dNTPs, 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 0.01% gelatin, 1 mM MgCl₂, and 1.25 units of *Taq* polymerase (Genex, Emeryville, CA), with 1 µM each of the 3' UT and the 5' leader exon-derived (5'-GCAAGCTTATGACGGTCTGGCTCCCGAACC-3') primers, the latter having a *Hind* III recognition site (underlined). The remaining sequence of this primer is identical to the 5' terminal leader sequence from HLA-A2 except at the first, third, and twelfth bases following the initiation ATG codon. These two primers were designed as to hybridize with any class I HLA antigens (Wattius et al. 1990). Amplification was carried out for 30 cycles of 110 s at 92 °C, 220 s at 35.5 °C, and 10 min at 70 °C, with a final extension cycle of 110 s at 92 °C, 220 s at 35.5 °C, and 15 min at 70 °C, in a thermocycler (Hybaid, Middlesex, UK). An aliquot (usually 1/10) of the reaction mixture was loaded on a 1% agarose gel and run for 1 h at 90 V. A band of about 1 kilobase (kb) corresponding in size to HLA class I amplified material, was visualized. To assure the presence of HLA-A2 cDNA in this band, alkaline Southern blot was carried out as described elsewhere (Bragado et al. 1990), using an HLA-A2-specific oligonucleotide matching nucleotides 142-168 from exon 3, designed as A2a2 (5'-TGGCACTCAGACCACCAAGCACAAGT-3'). The remaining of the PCR reaction mixture was loaded on a 1% low melting temperature agarose (FMC Bio Products, Rockland, ME) gel and the 1.1 kb band was extracted with the GeneClean kit (Bio 101, La Jolla, CA), as specified by the manufacturer. Purified DNA was digested with 10 units of *Eco* RI and *Hind* III (Boehringer Mannheim Biochemicals, Mannheim, FRG) for 3 h at 37 °C and ligated to *Eco* RI-*Hind* III treated pUC18 for at least 4 h at 14 °C. Half of the ligation mixture was used to transform competent DH5αF cells. Transformant colonies were screened on LB plates with ampicillin, IPTG, and X-Gal. Nylon filters (Hybond-N, Amersham, UK) containing DNA from the white colonies, were screened for HLA-A2 containing clones with the ³²P-labeled A2a2-specific probe as above, except that hybridization was carried out at 10 °C below T_m. HLA-A2 containing clones were grown in TB medium and recombinant plasmids were isolated using a standard procedure. 2 µg of plasmid from any given colony were digested with *Eco* RI and *Hind* III. The 1.1 kb band was isolated as above and subcloned in M13mp18. The single stranded forms of M13 subclones were used for sequencing. This was done with Sequenase (US Biochemicals, Cleveland, OH) as indicated by the manufacturer. Three additional oligonucleotides besides the M13 universal primer were used: the A2a1 primer, matching nucleotides 180-203 from HLA-A2 exon 2 (5'-GACGGGAGACCGAAAGTGAAG-3'), A2a2, described above, and A2a3, matching nucleotides 138-154 of exon 4 (5'-GAGCTCGT-

GAGACCAG-3'). All primers were purified by polyacrylamide gel electrophoresis before use.

Results

Total RNA from RML cells was used to prepare single-stranded cDNA. This was used for PCR amplification of full-length class I cDNA. Selectivity for this amplification was provided by the sequence of the primers used. As these were not allele-specific, A*0204 cDNA was selected after cloning the PCR-amplified material into pUC18, by hybridization with a HLA-A2-specific oligonucleotide.

Random errors can be introduced by the DNA polymerase during the PCR reaction. For this reason, sequencing of multiple clones from PCR-amplified material is necessary to distinguish between the real polymorphic changes in any class I HLA antigen, and the random mutations generated during amplification (Ennis et al. 1990). Thus, four independent pUC clones containing PCR-amplified full-length cDNA from HLA-A*0204 were separately subcloned in M13 and used for obtaining a consensus sequence for this subtype. These clones were designated as B8, D1, A1, and C15 (they are available to interested investigators upon request). The sequences of B8 and D1 were identical to each other, and both differed from A*0201 (Koller and Orr 1985) by a single base substitution of G to T at position 362. This corresponds to the second base of codon 97 and implies an amino acid replacement of Arg to Met. The sequences of both A1 and C15 clones revealed the presence of this same change. However, unique additional substitutions were observed in each of these two clones (Table 1). In all cases, these additional substitutions were found in only one of the four clones and they were always transitions, involving either purine or pyrimidine base changes. These random changes would either be silent in terms of inducing amino acid substitutions, or would imply amino acid replacement.

Table 1. Nucleotide changes of PCR amplified A*0204 cDNA clones.*

Clone	Nucleotide	Amino acid	Polyzomorphism at amino acid position
B8	G ₃₆₂ -T	R ₉₇ -M	Polymorphic
D1	G ₃₆₂ -T	R ₉₇ -M	Polymorphic
A1	G ₃₆₂ -T	R ₉₇ -M	Polymorphic
	T ₅₁₁ -C	L ₁₄₀ -P	Conserved
	G ₅₈₁ -A	R ₁₉₈ -K	Conserved
C15	T ₅₀₂ -C	P ₁₆₆ -SILENT	Conserved
	G ₃₆₂ -T	R ₉₇ -M	Polymorphic
	A ₃₆₈ -G	R ₁₂₄ -SILENT	Conserved
	T ₅₀₁ -C	S ₂₇₇ -SILENT	Conserved

* Changes are referred to the A*0201 sequence. Bold letters mark the single change found in all the clones.

	Exon 2	
ATGACGTCATGGCTCCCGGAAAGCTCGTCTCTACTCTCGGGGCTCTGGGCTGACCCAGACTGGGGGGCTCTCACTCAGATATTTTCTC		9
		99
ITSVSRPCRCCEPRFIIVGCVVDDTQFVYRIDSDAAS		126
ACACTCGTCTTCGGCCGGGCGGGGAGCCGCCCTTCACGCACGCGTACGTGGAGCAGCAGCAGC1TCGTGGCTTCGATCAGCCGAGCCGAGC		198
		271
QNHREPRAPMISEDECPYVWDEETREYEAHNSDTRR		297
CAAGAGTGGAGTGGGCGCTGGATGGAGCAGAGTGGCGGATTTTGGACGGGAGGACGGGAAATGAAAGCCCTCTCAGAGTTCAGAG		369
	Exon 3	
YDLCTLRGPTNNSFAKSRITVGHRTYCDVYGSUR		108
GTGACCTGGGAACTCGCGAGTACTAAGCAGCCAGCCAGCCCTTCTCACACCTTCAGATGATATGGCTGGAGCTGGCTTCGCACTGGCC		396
		461
FLNRTNRYATQDCEETIALKEDLRSUTAAARRAD		495
TYEETCEGEGEYAGCCAGATACCGTTCGCGGCAATTCATCGEECTGAAGAGGAGCTGCGCTTTCGAFGGCGGGGAGATCGCATCGAC		567
		574
TIKHWKAAAVAVAFDLRAYLESTCEWVLRITLER		594
ADECAAGCAAGATGGAGCGGGCCCATTCGCGGAGATTCAGAGCCCTACCTGGAGGGAATCTEETGGATGGCTTCGGAGAATCTCGAGAAE		645
	Exon 4	
GKELTQRTDAPKTPHWAVSDPEATLECVLSE		707
CGEAGAGGAGTCTGGAGCCGAGCCGCAAAAGGATATCACTCCAGCCTCTCTCATGATGAAAGCCCTCGAGCTGGCTGGCTGGCTGGC		792
		792
FYPAEITLTMRDEEDDTDTLVELVETPAGDGI		249
FTCTCCCTGGGAGTCAACCTGACCTGGGACGGGATGGGAGAGACAGCCAGGACCGAGCTCGTGGACACAGCCCTCCAGCGGATCGAGCC		792
		375
FSWMAAVYVPCGCGSTTCHVNECELEPILTR		801
ITCGAAGTGGGCGCTTGTGGTGGCTTCTCAGAGGAGAGAGATACAGCTGGCTTCTCAGCATGAGGGTITGTCGAGGCCCTCACTCTGAG		871
	Exon 5	
YGGPSSDPTIPVLEIACLVLPFAVITCAVVAVY		496
TGGAGCGCTCTTCTGAGCCGACATCCGATCTGGGCACTACTTGGTGGCTTCTTGGAGCTGATCACTGAGCTGTGGTGGCTGGCTGG		606
	Exon 6	Exon 7
HWRERESRRECEGSDYDARERDASRCSYVLTDC		439
ATETGTCAGAGAGCTTCAGATGAAAGAGAGGCGTACTCTGAGCTGAAAGAGCTGACATGCTCCGAGCCCTTGGATGTCTCTCAGACCTTCT		1089
	Exon 8	
KV		441
AAATGTGA		1098

Fig. 1. Nucleotide and deduced amino acid sequence of HLA-A2 subtype A*0204. The sequence was derived from four independent full-length cDNA clones. The single change respect to A*0201 (Koller and Orr 1985) is underlined. The first 24 nucleotides correspond exactly to the sequence of the 5' end primer used for PCR amplification (see Materials and methods).

ments in conserved positions among class I HLA antigens. Thus, the results indicate that A*0204 differs from A*0201 by a single base change of A₃₃₂ to T₃₃₂, involving a single amino acid substitution of Arg₉₇ to Met₉₇. The consensus sequence for A*0204 is presented in Figure 1.

Discussion

The single Arg₉₇ to Met₉₇ amino acid replacement in A*0204 accounts for the IEF behaviour of this subtype. It implies the loss of a positive charge unit respect to A*0201. Thus, the nominal net charge of A*0204 (A2.4) is identical to that of A*0203 (A2.3). The small differences in isoelectric point between these two subtypes revealed by IEF (Yang 1989b) are attributable to the different nature of the changes involving charged residues in both subtypes - Val₁₅₂ to Glu₁₅₂ in A*0203 (Kraegel et al. 1983; Mattson et al. 1987; Holmes et al. 1987) - as well as to the different influence of these changes on the pK of closely located charged residues. An analogous effect of mutations involving no charge change on IEF patterns was observed between the HLA-B27 subtypes B*2704 and B*2705 (Vega et al. 1985).

There is a single base change between A*0204 and A*0201, which is the one leading to the amino acid replacement at position 97. This is compatible with an origin of A*0204 by one point mutation from A*0201. Methionine at position 97 is also present in some other

HLA-A molecules but, as far as it is known, these proteins present other changes with A*0201 at very close positions, such as positions 95 (in A68.1 and the antigens of the Aw19 group) or 99 (in A24; Bjorkman and Parham 1990). Thus, on the basis of available data, it appears unlikely that the change in A*0204 was introduced as a result of inter-allelic gene conversion. If this interpretation is correct, the introduction of Met₉₇ by point mutation would indicate that recurrent mutations can introduce the same change at the same position more than once during diversification of class I antigens. This was previously proposed as a mechanism for diversification of major histocompatibility complex (MHC) antigens (Ivanyi 1989). A*0204 has only been found among South American Indians. It was present in two of two apparently unrelated HLA-A2* individuals from this ethnic group, which might suggest that it exists at a high frequency in this population, although this should be substantiated by further population studies. Interestingly, it was absent among the North American and Mexican Indians examined at the Tenth Histocompatibility Workshop (Yang 1989a, b). Thus, it is possible that the subtype arose recently, perhaps after ethnic differentiation of American Indians.

Residue 97 is located in β -strand 1 from the $\alpha 2$ domain, spanning residues 92-104, on the β -pleated sheet floor of the peptide binding site, and has its side chain pointing into the groove (Bjorkman et al. 1987). This implies that the change in A*0204 can affect peptide binding

and, therefore, T-cell recognition. Thus, as all other HLA-A2 subtypes, A*0204 must be a functionally distinct allele.

It is rather surprising that some alloantisera from the Tenth Histocompatibility Workshop were able to distinguish between A*0201 and A*0204 (Yang 1989b), as direct access of antibodies to residue 97 should be hampered by constitutively HLA-A2-bound peptides. A possible explanation is that the Arg to Met substitution may alter contacts of residue 97 with other more accessible residues, influencing the orientation of their side chains in such way as to alter recognition by some antibodies. Another possibility is that recognition by those antisera might require peptides that are presented by A*0201 and not by A*0204.

An interesting aspect that emerges when the change in A*0204 is related to the spatial location of other residues which are polymorphic among HLA-A2 subtypes, is their clustering in a restricted area of the β -pleated sheet floor of the peptide binding groove. There are 11 positions that are polymorphic among subtypes (López de Castro 1989). Eight of them are located in the peptide binding groove (Fig. 2). Three of these, 95 (changed in A*0202, A*0205, and A*0208), 97 (changed in A*0204), and 99 (changed in A*0207 and A*0210) occupy alternate positions within the same β -strand (β -strand 1 from $\alpha 2$). A fourth one, position 9 (changed in A*0205, A*0206, and A*0208) is located in an adjacent β -strand, (β -strand 1 from $\alpha 1$) and is involved in contacts with all three residues at positions 95, 97, and 99 (Bjorkman et al. 1987). Changes at each of these four positions may occur separately in different subtypes, or in combination with another change from this group in a same subtype. Furthermore, three different residues can be found at position 99 among HLA-A2 subtypes (López de Castro 1989). Thus, as many as seven different combinations involving only these four spatially close positions are generated among the ten HLA-A2 subtypes of known sequence (Table 2). This equals the total number of combinations found among all other HLA-A specificities of known sequence. These four residues are pointing into the peptide binding site. Therefore, their variation can modulate the specificity of peptide binding and contribute much to the differential antigen presenting properties of the various subtypes. Indeed, the effect of changes at positions 9, 95, and 99 on T-cell recognition has been demonstrated (van der Poel et al. 1983, 1986; McMichael et al. 1988; Santos-Aguado et al. 1989; Mattson et al. 1989; Robbins et al. 1989). The remaining four polymorphic positions among subtypes in the peptide binding site are located in the α -helical region from $\alpha 1$ (residue 66, changed in A*0208) or $\alpha 2$ (residues 149, 152, and 156, changed together in A*0203 and only in the later position in A*0202, A*0205, and A*0208). A maximum of three different combinations are generated among

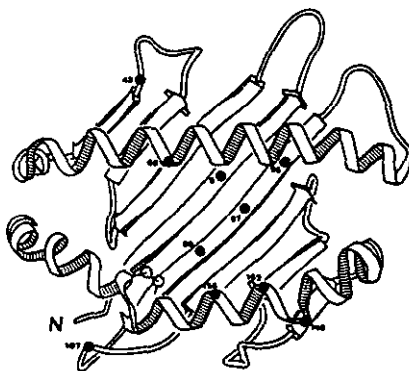


Fig. 2. Spatial location of the residues which are polymorphic among HLA-A2 subtypes. The figure is based on the three-dimensional structure of HLA-A2 (Bjorkman et al. 1987) and shows a top view of the $\alpha 1$ and $\alpha 2$ domains. Residue 236, in $\alpha 3$, which is changed in A*0209 is not shown.

Table 2. Patterns of polymorphism in β -pleated sheet residues among HLA-A2 subtypes.*

Subtype	Position			
	9	95	97	99
A*0201, 03, 09	F	V	R	Y
A*0202	P	L	R	Y
A*0205, 08	Y	L	R	Y
A*0206	Y	V	R	Y
A*0207	F	V	R	C
A*0210	Y	V	R	F
A*0204	F	V	M	Y

* Amino acid residues at each position are listed in single-letter code. Bold letters indicate changes from A*0201 sequence in each subtype.

HLA-A2 subtypes by polymorphism at the α -helices cluster spanning residues 149-156.

The situation in HLA-A2 is in strong contrast with the pattern of polymorphism observed among HLA-B27 subtypes, which constitutes another group of closely related class I alleles whose polymorphism has been analyzed in depth. The cluster of β -pleated sheet residues that generates much polymorphism among HLA-A2 subtype is conserved among the six known HLA-B27 subtypes. In contrast, they show as many as four different combinations of polymorphic residues in the short α -helical stretch spanning residues 74-81 (López de Castro 1989). This segment, of proven relevance for T-cell recognition (Aparicio et al. 1987; Calvo et al. 1990) is, in turn, con-

served among HLA-A2 subtypes. This suggests that subtype diversification among class I HLA antigens tends to occur preferentially on spatially localized areas with functional relevance within the peptide binding site, but such areas may be different for different antigens. It is conceivable that, depending on the particular peptide presenting specificity of a given class I antigen, selective pressures may favor accumulation of subtype differences in certain areas of the molecule, due to the effect that polymorphism at such locations may have on peptide presentation by that particular HLA antigen.

The marked differences among HLA-A2 subtypes in their patterns of ethnic distribution, and the apparently significant frequency of some subtypes, such as A*0204, in a particular ethnic group (Yang 1989b) may be determined by strictly genetic factors, but could also be influenced by the advantage of individual subtypes as antigen presenting molecules to deal with pathogens in such populations.

Acknowledgments. We specially thank Dr. Steven Marsh, Imperial Cancer Research Foundation, London, UK, for information regarding A*0204 and for providing the RML cells. We also thank our colleague Angel Ezquerro for critical review of the manuscript. This work was supported by grant PB87/0347 from the Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología. A. Raul Castaño is a fellow from the Ministerio de Educación y Ciencia.

References

- Aparicio, P., Rojo, S., Jaraquemada, D., and López de Castro, J. A.: Fine specificity of HLA-B27 cellular allorecognition. HLA-B27 is a functional variant distinguishable by cytotoxic T cell clones. *J Immunol* 139: 837-841, 1987
- Baur, M. P., Neugebauer, N., Deppe, H., Sigmund, M., Lunon, T., Mayr, W. R., and Albert, E. D.: Population analysis on the basis of deduced haplotypes from random families. In E. D. Albert, M. P. Baur, and W. R. Mayr (eds.): *Histocompatibility Testing 1984*. pp. 333-341, Springer, New York, 1984
- Biddison, W. E., Krangel, M. S., Strominger, J. L., Ward, F. E., Shearer, G. M., and Shaw, S.: Virus-immune cytotoxic T cells recognize structural differences between serologically indistinguishable HLA-A2 molecules. *Hum Immunol* 3: 225-232, 1980
- Bjorkman, P. J., and Parham, P.: Structure, function and diversity of class I major histocompatibility complex molecules. *Annu Rev Biochem* 59: 253-288, 1990
- Bjorkman, P. J., Saper, M. A., Samraoui, B., Bennett, W. S., Strominger, J. L., and Wiley, D. C.: Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 329: 506-512, 1987
- Bragado, R., Lauzurica, P., López, D., and López de Castro, J. A.: T cell receptor V β gene usage in a human alloreactive response. Shared structural features among HLA-B27-specific T cell clones. *J Exp Med* 171: 1189-1204, 1990
- Calvo, V., Rojo, S., López, D., Galocha, B., and López de Castro, J. A.: Structure and diversity of HLA-B27-specific T cell epitopes. Analysis with site-directed mutants mimicking HLA-B27 subtype polymorphism. *J Immunol* 144: 4038-4045, 1990
- Ennis, P. D., Zemmour, J., Salter, R. D., and Parham, P.: Rapid cloning of HLA-A, B cDNA by using the polymerase chain reaction: Frequency and nature of errors produced in amplification. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 2833-2837, 1990
- Holmes, N., Ennis, P., Wan, A. M., Denney, D. W., and Parham, P.: Multiple genetic mechanisms have contributed to the generation of the HLA-A2/A28 family of class I MHC molecules. *J Immunol* 139: 936-941, 1987
- Ivanyi, P.: Polymorphism du CMH et evolution. In J. Dausset et M. Pla (eds.): *HLA complex majeur d'histocompatibilité de l'homme*. pp. 233-253, Médecine-Science Flammarion, Paris, 1989
- Koller, B. M., and Orr, H. T.: Cloning and complete sequence of an HLA-A2 gene: analysis of two HLA-A2 alleles at the nucleotide level. *J Immunol* 134: 2727-2733, 1985
- Krangel, M. S., Biddison, W. E., and Strominger, J. L.: Comparative structural analysis of HLA-A2 antigens distinguishable by cytotoxic T lymphocytes. II. Variant DK1: evidence for a discrete CTL recognition region. *J Immunol* 130: 1856-1862, 1983
- López de Castro, J. A.: HLA-B27 and HLA-A2 subtypes: structure, evolution and function. *Immunol Today* 10: 239-246, 1989
- Mattson, D. H., Handy, D. E., Bradley, D. A., Coligan, J. E., Cowan, E. P., and Biddison, W. E.: DNA sequences of the genes that encode the CTL-defined HLA-A2 variants M7 and DK1. *Immunogenetics* 26: 190-192, 1987
- Mattson, D. H., Shimono, N., Cowan, E. P., Baskin, J. J., Turner, R. V., Shvetsky, B. D., Coligan, J. E., Maloy, W. L., and Biddison, W. E.: Differential effects of amino acid substitutions in the β -sheet floor and α -2 helix of HLA-A2 on recognition by alloreactive viral peptide-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* 143: 1101-1107, 1989
- McMichael, A. J., Gotch, F. M., Santos-Aguado, J., and Strominger, J. L.: Effect of mutations and variations of HLA-A2 on recognition of a virus peptide epitope by cytotoxic T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 9194-9198, 1988
- Robbins, P. A., Leticia, L. A., Rota, P., Santos-Aguado, J., Rothbard, J., McMichael, A. J., and Strominger, J. L.: Comparison between two peptide epitopes presented to cytotoxic T lymphocytes by HLA-A2. Evidence for discrete locations within HLA-A2. *J Immunol* 143: 4096-4103, 1989
- Santos-Aguado, J., Crivianis, M. A. V., Metzger, S. J., Buratoff, S. J., and Strominger, J. L.: Alloreactivity studied with mutants of HLA-A2. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 8936-8940, 1989
- Van der Poel, J. J., Mölders, H., Thompson, A., and Floegh, H. L.: Definition of four HLA-A2 subtypes by CML typing and biochemical analysis. *Immunogenetics* 17: 609-621, 1983
- Van der Poel, J. J., Pool, J., Goulimy, E., Giphart, M. J., and van Rood, J. J.: Recognition of distinct epitopes on the HLA-A2 antigen by cytotoxic T lymphocytes. *Hum Immunol* 16: 247-258, 1986
- Vega, M. A., Wallace, L., Rojo, S., Bragado, R., Aparicio, P., and López de Castro, J. A.: Delineation of functional sites in HLA-B27 antigens. Molecular analysis of HLA-B27 variant Wewak I defined by cytolytic T lymphocytes. *J Immunol* 135: 3323-3332, 1985
- Watkins, D. L., Chen, Z. W., Hughes, A. L., Evans, M. G., Tedder, T. F., and Lervin, N. L.: Evolution of the MHC class I genes of the New World primate from ancestral homologues of human non-classical genes. *Nature* 346: 60-63, 1990
- Yang, S. Y.: Assignment of HLA-A and HLA-B antigens for the reference panel of B-lymphoblastoid cell lines determined by one-dimensional isoelectric focusing (ID-IEF) gel electrophoresis. In B. Dupont (ed.): *Immunobiology of HLA. Vol 1*. pp. 43-44, Springer, New York, 1989a
- Yang, S. Y.: Population analysis of class I HLA antigens by one-dimensional isoelectric focusing gel electrophoresis: workshop summary report. In B. Dupont (ed.): *Immunobiology of HLA. Vol 1*. pp. 309-331, Springer, New York, 1989b

Structure of the *HLA-A*0211* (A2.5) subtype: further evidence for selection-driven diversification of HLA-A2 antigens

A. Raul Castaño and José A. López de Castro

Department of Immunology, Fundación Jiménez Díaz, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Avenida Reyes Católicos, 2., 28040 Madrid, Spain

Received July 11, 1991; revised version received August 8, 1991

HLA-A2 is the most common class I antigen in the human population (Baur et al. 1984) and the most indepth studied. Extensive structural heterogeneity within this antigen has been detected by both biochemical and immunological techniques, resulting in the description of at least eleven HLA-A2 subtypes. The structure of ten subtypes, *A*0201*-*A*0210*, has been previously determined (López de Castro 1989; Castaño and López de Castro 1991). This is the most extensive series of class I HLA variants analyzed and outstandingly illustrates the multiplicity of genetic mechanisms involved in HLA diversification (Holmes et al. 1987). A striking feature of HLA-A2, as well as other class I subtypes, is that those residues that are polymorphic among subtypes are very frequently located in areas of the molecule capable of influencing the specificity of peptide presentation and T-cell receptor binding. We have previously shown that much polymorphism among HLA-A2 subtypes is generated by variability at four spatially close positions located in adjacent β -strands, at the bottom of the peptide binding groove of the molecule, and have proposed that this spatial clustering of polymorphic positions in HLA-A2 subtypes is driven by selection (Castaño and López de Castro 1991). We have now determined the structure of the eleventh known HLA-A2 subtype, an isoelectric focusing (IEF) variant designated as A2.5 (*A*0211*), that was detected in a single individual, of Oriental origin, during a population study carried out in the Tenth Histocompatibility Workshop (Yang 1989).

The nucleotide sequence data reported in this paper have been submitted to the EMBL nucleotide sequence database and have been assigned the accession number X60764.

The name *A*0211* has been officially assigned by the WHO Nomenclature Committee in September 1991. This follows the agreed policy that, subject to the conditions stated in the most recent Nomenclature Report (WHO Nomenclature Committee for factors of the HLA system, 1991), names will be assigned to new sequences as they are identified. Lists of such new names will be published in the following WHO Nomenclature Report.

Address correspondence and reprint requests to: J. A. López de Castro.

The experimental strategy was based on amplification of full-length cDNA obtained after reverse transcription of 0.1 μ g of RNA from lymphoblastoid cell line KIME (HLA-A2.5, 32; Bw52, w61; Cw6), and sequencing of several clones of the amplified *HLA-A*0211* cDNA. Experimental details were exactly as described previously (Castaño and López de Castro 1991). Complete sequences of three full-length cDNA clones (designated as A4, B4, and D8) corresponding to *A*0211* were obtained. All three sequences were identical among each other, except for a C to T transition at nucleotide 53 in clone A4, which was attributed to a random mutation generated during amplification (Ennis et al. 1990). This change would imply an Ala to Val replacement at position -7 of the leader sequence. The consensus sequence of *A*0211* derived from these three clones is given in Figure 1. It differs from *A*0201* (Koller and Orr 1985) by only two nucleotide changes at positions 290 (C-T) and 292 (C-G). These changes correspond to the second position of codon 73 and the first position of codon 74 from exon 2 respectively, and imply the amino acid changes of Thr₇₃-Ile₇₃ and His₇₄-Asp₇₄ in the corresponding gene products. The later substitution accounts for the IEF pattern of A2.5, that differs by approximately 2 charge units from *A*0201* product (A2.1), and makes A2.5 the most acidic of all known HLA-A2 subtypes (Yang 1989).

Two interesting features of the A2.5 sequence are worth noting. First, the sequence Ile₇₃-Asp₇₄ is very unusual among class I HLA antigens, and has only been found in HLA-A31 and -Aw33 (Kato et al. 1989; Bjorkman and Parham 1990). The presence of this sequence in a HLA-A2 subtype is particularly striking. Residue 73 is Thr in all known HLA-A and -B antigens, except in A2.5, A31, and Aw33. Asp₇₄ is frequent among HLA-A, -B, and -C antigens but there is a His residue at this position in all hitherto known HLA-A2 subtypes and in no other class I antigen of known sequence (Bjorkman and Parham 1990). There are two possible explanations for the origin of *A*0211*. One would be by

	70	R	B	Q	T	R	V	D	77	281	303	
HLA-A2										CACTC	CACAGACTC	CCGAGTGCAC
HLA-A2.5										-----	-----T	-----
HLA-Aw33										-----	-----T	-----
HLA-A31										-----	-----T	-----
A-CONSENSUS										-----	-----T	-----

Fig. 2. Structural relationship of HLA-A*0211 to other HLA alleles and their products in the region in which A*0211 differs from HLA-A*0201. The sequence of all other HLA-A2 subtypes in this region is identical. The sequences of HLA-Aw33 (A*3301), -31 (A*3101), and HLA-A-consensus were obtained from Kato and co-workers (1989).

on the peptide presenting specificity of HLA-A2 and is exerted mainly by environmental pathogens.

Note added in proof. HLA-A*0211 has recently been found in an isolated population of South American Indians in which HLA-A31 was one of the four HLA-A alleles present (D. Watkins, personal communication). This lends further support to the putative origin of A*0211 from A*0201 by gene conversion. The finding of A*0211 in two distant and unrelated populations suggests the possibility that this subtype appeared in each population as a result of independent but similar, therefore "recurrent", gene conversion events.

Acknowledgments. The Kime cells were kindly provided by Dr. Soo Y. Yang, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, and Dr Steven Marsh, Imperial Cancer Research Fund Laboratories, London. We specially thank Dr. Marsh for information and help. This work was supported by grant PB87/0347 from the Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología.

References

- Baur, M. P., Neugebauer, M., Deppe, H., Sigmund, M., Lunon, T., Mayr, W. R., and Alberl, E. D.: Population analysis on the basis of deduced haplotypes from random families. In E. D. Alberl, M. P. Baur, and W. R. Mayr (eds.): *Histocompatibility Testing 1984*, pp. 333-341. Springer, New York, 1984.
- Bjorkman, P. J. and Parham, P.: Structure function and diversity of class I major histocompatibility complex molecules. *Annu Rev Biochem* 59: 253-288, 1990.
- Bjorkman, P. J., Saper, M. A., Samraoui, B., Bennett, W. S., Strominger, J. L., and Wiley, D. C.: Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 329, 506-512, 1987a.
- Bjorkman, P. J., Saper, M. A., Samraoui, B., Bennett, W. S., Strominger, J. L., and Wiley, D. C.: The foreign antigen binding site and T-cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature* 329: 512-518, 1987b.
- Castaño, A. R. and López de Castro, J. A.: Structure of the HLA-A*0204 antigen, found in South American Indians. Spatial clustering of HLA-A2 subtype polymorphism. *Immunogenetics* 34: 281-285, 1991.
- Ennis, P. D., Zemmour, J., Saiter, R. D., and Parham, P.: Rapid cloning of HLA-A,B cDNA by using the polymerase chain reaction: Frequency and nature of errors produced in amplification. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 2833-2837, 1990.
- Garret, T. P. J., Saper, M. A., Bjorkman, P. J., Strominger, J. L., and Wiley, D. C.: Specificity pockets for the side chain of peptide antigens in HLA-Aw68. *Nature* 342: 692-696, 1989.
- Holmes, N., Ennis, P., Wan, A. M., Demmay, D. W., and Parham, P.: Multiple genetic mechanisms have contributed to the generation of the HLA-A2/A28 family of class I MHC molecules. *J Immunol* 139: 936-941, 1987.
- Kato, K., Trapani, J. A., Alloprea, J., Dupont, B., and Yang, S. Y.: Molecular analysis of the serologically defined HLA-Aw19 antigens. A genetically distinct family of HLA-A antigens comprising A29, A31, A32, and Aw33, but probably not A30. *J Immunol* 143: 3371-3378, 1989.
- Koller, B. M. and Orr, H. T.: Cloning and complete sequence of an HLA-A2 gene: analysis of two HLA-A2 alleles at the nucleotide level. *J Immunol* 134: 2727-2733, 1985.
- Lawlor, D. A., Zemmour, J., Ennis, P. D., and Parham, P.: Evolution of class-I MHC genes and proteins: from natural selection to thymic selection. *Annu Rev Immunol* 8: 23-63, 1990.
- López de Castro, J. A.: HLA-B27 and HLA-A2 subtypes: structure, evolution and function. *Immunol Today* 10: 239-246, 1989.
- Mattson, D. H., Handy, D. E., Bradley, D. A., Coligan, J. E., Cowan, E. P., and Björkman, W. E.: DNA sequences of the genes that encode the CTL1-defined HLA-A2 variants M7 and DK1. *Immunogenetics* 26: 190-192, 1987.
- Parham, P., Lawlor, D. A., Lomen, C. E., and Ennis, P. D.: Diversity and diversification of HLA-A, B, C alleles. *J Immunol* 142: 3937-3950, 1989.
- WHG Nomenclature Committee for factors of the HLA system: Nomenclature for factors of the HLA system, 1990. *Immunogenetics* 33: 301-309, 1991.
- Yang, S. Y.: Population analysis of class I HLA antigens by one-dimensional isoelectric focusing gel electrophoresis: workshop summary report. In B. Dupont (ed.): *Immunobiology of HLA, Vol 1*, pp. 309-331, Springer, New York, 1989.
- Zemmour, J. and Parham, P.: HLA class I nucleotide sequences, 1991. *Immunogenetics* 33: 310-320, 1991.