Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis de Posgrado

Expresión de genes de HLA clase I inducida por IFN alfa

Ferraro, Marcela Andrea

1990

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Ferraro, Marcela Andrea. (1990). Expresión de genes de HLA clase I inducida por IFN alfa. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2342_Ferraro.pdf

Cita tipo Chicago:
Ferraro, Marcela Andrea. "Expresión de genes de HLA clase I inducida por IFN alfa". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1990.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2342_Ferraro.pdf

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Tema de Tesis

Expresión de genes de HLA clase I inducida por IFNα

Autor

Marcela Andrea Ferraro

Director de Tesis

Dr. Oscar Roberto Burrone

Lugar de trabajo

Instituto de Investigaciones Bioquímicas, "Fundación Campomar"

Tesis presentada para optar al título de Doctor en Ciencias Químicas

Año 1990

2342
ej. 2

"En nuestro empeño de concebir la realidad. nos parecemos a alguien que trata de descubrir el mecanismo invisible de un reloj, del cual ve el movimiento de las agujas, oye el tic-tac, pero no le es posible abrir la caja que lo contiene. Si se trata de una persona ingeniosa e inteligente, podrá imaginar un mecanismo que sea capaz de producir todos los efectos observados; pero nunca estara ségura de si su imagen es la única que los puede explicar. Jamás podra compararla con el mecanismo real, y no puede concecebir, siquiera, el significado de una comparación que le está vedada. Como él, el hombre de ciencia creerá ciertamente que, al aumentar su conocimiento, su imagen de la realidad se hara mas simple y explicará mayor número de impresiones sensoriales. Puede creer en la existencia de un limite ideal del saber, al que se aproxima el entendimiento humano y llamar a este limite la verdad objetiva"

Albert Einstein
Leopold Infeld
1939

Agradecimientos

Al Dr. Oscar R. Burrone, por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo y por su aporte constante de ideas para la realización de esta tesis.

A las autoridades del Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundación Campomar" por permitirme realizar este trabajo en su Instituto.

A mis amigos Mariana Rasnicoff, Tony Coira, Mariana Stein y Silvia Curutchet por su cariño y apoyo, y por haber conseguido que todos estos años sean mucho más divertidos.

Al Dr. Leonardo Satz por su colaboración y por el aporte de algunas de las sondas y líneas celulares que fueron utilizadas durante el desarrollo de esta Tesis.

A la Dr. Estela E. Medrano por sus valiosos consejos sobre cultivo de células.

Al Lic. Ariel Wilner por su colaboración en el estudio del gen Y2.

A mis compañeros Silvia Gonzalez, Eduardo Cafferata, Facundo Batista y Susana Giambiagi (del 102), Angeles Zorreguieta, Cristina Bertineti, Viviana Lepek y Toni Utaro (del 207) por todos los "cafés" y buenos momentos compartidos. A Fernando Massironi por su buena voluntad en todo momento

Al Dr. Armando J. Parodi por su confianza y consejos.

A la Sra. Hilda Gasparoli, quien con sus cuidados y atenciones hizo que trabajar, tanto en el laboratorio como en cultivo, sea mucho más fácil.

Abreviaturas

β-gal:	β-galactosidasa
BSA:	seroalbúmina bovina
Cam:	cloramfenicol
CAT:	cloramfenicol acetiltransferasa
cDNA:	DNA copia
cpm:	cuentas por minuto
D.O.:	densidad óptica
dATP:	2'-desoxiadenosina-5'-trifosfato
dCTP:	2'-desoxicitidina-5'-trifosfato
DNA.	ácido desoxirribonucleico
DNAsa:	desoxirribonucleasa
dNTP:	desoxinucleótido trifosfato
DTT.	ditiotreitol
EDTA.	ácido etiléndiamino tetraacético
H2:	antigenos del MHC. clase I, de raton
HLA:	antigenos del MHC humano
Kb:	mil pares de bases
kDa:	mil Daltons
LB:	medio Luria-Bertani
μCi	micro Curie
MEM Dulbecco:	Modificación de Dulbeccco del medio minimo esencial de Eagle
μg:	microgramo
MHC:	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
μl:	microlitro
mRNA:	RNA mensajero
nm.	namometro
NP-40:	Nonidet P-40
NTP:	nucleótido trifosfato
pb:	pares de bases
PBS:	buffer fosfato salino
PM:	peso molecular
RNA:	ácido ribonucleico
RNAsa:	ribonucleasa

rpm:	revoluciones por minuto
SDS:	dodecil sulfato de sodio
Tris:	2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol

N.B.: En este trabajo se utilizan términos en idioma inglés que son de uso corriente en la literatura científica y cuya traducción es difícil.

INDICE

	Pág.
Introducción	1
Antigenos del Complejo Mayor de Histocompatibilidad	1
Función de los antigenos de Histocompatibilidad	2
Organización de los genes del Complejo Mayor de Histocompatibilidad	4
Proteinas codificadas por los genes de histocompatibilidad clase I	6
Estructura de los genes de HLA clase I	8
Polimorfismo de genes clase I	10
Desequilibrio de unión ("linkage desequilibriun")	11
Expresión de antigenos de histocompatibilidad clase I	12
1. Elementos con acción en cis	13
2. Elementos con acción en trans	17
3. Acción del IFN	25
Efectos biológicos del IFN	26
Inducción de antigenos del MHC	28
Células Molt4 y mutantes YHHH	29
Objetivos. Hipótesis de trabajo	32

Materiales y métodos 35

Cultivo de celulas 35
Inmunofluorescencia de superficie de celulas eucarióticas 35
Transfecciones de celulas eucarióticas 36
Preparación de extractos para medir actividad de CAT y βGAL 36
Ensayo de actividad de CAT 36
Ensayo de actividad de βGAL 36
Obtención de DNA genómico de celulas eucarióticas 37
Extracción de RNA total de celulas eucarióticas 37
Técnica de Southern 37
Técnica de Dot-blot de RNA celular 37
Preparación de DNA de plásmidos 37
Transformaciones bacterianas 38
Infección con fago λgtWES 38
Preparación de DNA de fago λgtWES 38
Hibridización in situ de colonias bacterianas y placas de fago λ 39
Analisis de DNA por electroforesis en geles de agarosa y poliacrilamida 39
Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de poliacrilamida o agarosa 39
Marcación de sondas con nucleótidos radioactivos 39
Medición de proteinas por el metodo de Bradford 39

Resultados 40

Estudio de los genes de HLA en células Molt4 y mutantes YHHH 40

Estudio por la técnica de Southern del DNA de celulas Molt4 y mutantes YHHH 40

Clonado de genes de HLA a partir de celulas YHHH 47

Análisis estructural del gen Y2 50

Análisis funcional del gen Y2 55

Estudios de expresion del gen Y2 completo 55

A) Transfección estable del gen Y2 en células Ltk$^-$ 55

B) Transfecciones de tipo transiente del gen Y2 57

Transfección del gen Y2 en células NIH3T3 57

Transfección del gen Y2 en células J26 59

Estudios de funcionalidad del promotor y regiones reguladoras del gen Y2 60

Estudios de funcionalidad del promotor completo del gen Y2 60

Estudios funcionales de la región reguladora "IFN-sensible" del gen Y2 63

Estudio de células Molt4 y mutantes YHHH por ensayos de transfección con promotores sensibles a IFNα 70

Transfecciones en células Molt4 y mutantes YHHH 70

Plásmidos utilizados 81

pH5RN6 81
pBB1 81
pB3UT 81
p001 81
H_2K^bCAT 81
RSVCAT 81
pKG5 82
p001.5' 82
TKYXd,TKYXi 82

pHFβG2Xd, pHFβG2Xi 83
RSV/Xd/CAT 84
pSBRNd, pSBRNi 86
pSVΔH2 88

Discusión 91

Estudio de los genes de HLA de células YHHH. Clonado del gen Y2 91

Caracteristicas funcionales del gen Y2 93

A)Transfecciones del gen Y2 completo: 94
B)Transfecciones del promotor completo del gen Y2 asociado al gen CAT 95
C)Transfecciones de la región "IFN-sensible" del gen Y2 asociada a promotores heterólogos 96

Estudios de tranfección transiente utilizando el plásmido H_2K^bCAT 100

Referencias 103

Introducción

Antigenos del Complejo Mayor de Histocompatibilidad

Los antígenos del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) fueron definidos originalmente como moléculas presentes en la superficie celular, responsables del rechazo de tejidos injertados (Snell, 1981). Estos antígenos están codificados en regiones genéticas similares en todas las especies de vertebrados examinados. En el hombre, los genes del MHC están ubicados en el brazo corto del cromosoma 6, y en el ratón en el cromosoma 17. Se pueden clasificar en 3 tipos diferentes (Guillemot, 1988): genes clase I, genes clase II y genes clase III.

Los genes de histocompatibilidad clase I codifican para la cadena α de un heterodímero α/β, donde la cadena β está constituida por β2-microglobulina, codificada en otro cromosoma. Una de las características sobresalientes de esta familia de genes es el alto grado de polimorfismo que presenta la cadena α. Estos son los llamados genes de HLA clase I (sigla proveniente de "human leucocite antigen"), siendo los genes clase I clásicos HLA-A, B, C en el hombre y H_2K, D, L en el ratón. Los nombres HLA-A, HLA-B y HLA-C corresponden a distintos loci, que codifican para moléculas de histocompatibilidad clase I de tipo A, B, C. Cada individuo posee 2 genes para HLA, 2 genes para HLA-B y 2 genes para HLA-C, y expresa en la membrana de sus células 2 antígenos de tipo A, 2 de tipo B y 2 de tipo C. Lo mismo ocurre con los genes H_2K, D, L en el ratón. Los antígenos de histocompatibilidad clase I se hallan presentes en la membrana de todas la células somáticas nucleadas del organismo. La función de las moléculas de HLA clase I está relacionada con la presentación de antígenos por parte de cualquier célula del organismo al sistema inmune, por ejemplo antígenos provenientes de una infección viral.

Los genes de histocompatibilidad clase II codifican también para un heterodímero α/β, pero en este caso ambas cadenas se hallan codificadas en el MHC y ambas cadenas presentan alto grado de polimorfismo. Son los llamados genes de HLA clase II, siendo los princiapales loci HLA-DR, DQ y DP en el hombre, I-A e I-E en el ratón. La expresión de estos antígenos se halla limitada a ciertas células del sistema inmune, como linfocitos B, macrófagos y células T activadas (Flavel, 1986). Con la ecepción de ciertos tejidos especializados como células de Kuppfer en el hígado y células de Langerhans en la piel, la mayoría de los tejidos son negativos para antígenos clase II (Reith, 1988). Su función está relacionada con la presentación de antígenos llevada a cabo por las celulas presentadoras de antígenos al sistema inmune.

Los genes de histocompatibilidad clase III codifican para los componentes del sistema de complemento. Estos genes se hallan ubicados entre los genes de histocompatibilidad clase I y clase II, pero la función de las proteinas codificadas no está relacionada con la presentación de antigenos al sistema inmune.

Función de los antigenos de histocompatibilidad

La funcion de moléculas presentadoras de antigenos para los productos de los genes de histocompatibilidad clase I y clase II se relaciona con el reconocimiento de antigenos por parte de los linfocitos T. Para ser activados, los linfocitos T deben reconocer antigenos presentados en la superficie de las células en asociación con los productos del MHC. El reconocimiento especifico del complejo antigeno de hitocompatibilidad-antigeno foraneo por el receptor de un linfocito T constituye la base molecular del llamado "reconocimiento restringido por histocompatibilidad" (Zinkernagel, 1974). Los linfocitos T reconocen antigenos a traves de su receptor principal (TCR), el cual esta constituido por 2 cadenas, α de 39 a 46 kDa y β de 40 a 44 kDa. Las dos cadenas del TCR, al igual que las inmunoglobulinas, presentan variabilidad clonal y poseen dominios constantes y variables. Dichos dominios estan codificados por familias de segmentos de genes llamados V (variable), D (diversidad), J (unión) y C (constante). (Toyonaga, 1987). Estos segmentos de genes se ensamblan en los linfocitos T durante su diferenciacion, y dan lugar a especificidades particulares que corresponden a diferentes clones. (Meuer, 1984, Allison, 1987). A diferencia del receptor del linfocito B (una inmunoglobulina) que puede reconocer antigenos en forma "solitaria" o soluble, el TCR reconoce antigenos solo si son procesados y presentados sobre la superficie celular en asociación con productos del MHC.

Los linfocitos T inductores (o "helpers", T_H) reconocen antigenos en la superficie de células presentadoras de antigenos en asociación con productos del MHC clase II. Las células que participan en este caso como presentadoras de antigenos son macrofagos, celulas de Langerhans de la piel, células de Kupfer del higado, células dendriticas del bazo, células endoteliales y linfocitos B (Grey, 1985). Luego de reconocer antigenos, los linfocitos T inductores se "activan" y cumplen roles regulatorios, por ejemplo "ayudan" a linfocitos B a producir anticuerpos y a clones de linfocitos T citotoxicos a expandirse. Los linfocitos T citotoxicos (o Tc) reconocen antigenos en asociacion con moleculas del MHC clase I, y en este caso puede participar cualquier célula del organismo, ya que todas las celulas nucleadas presentan expresión de

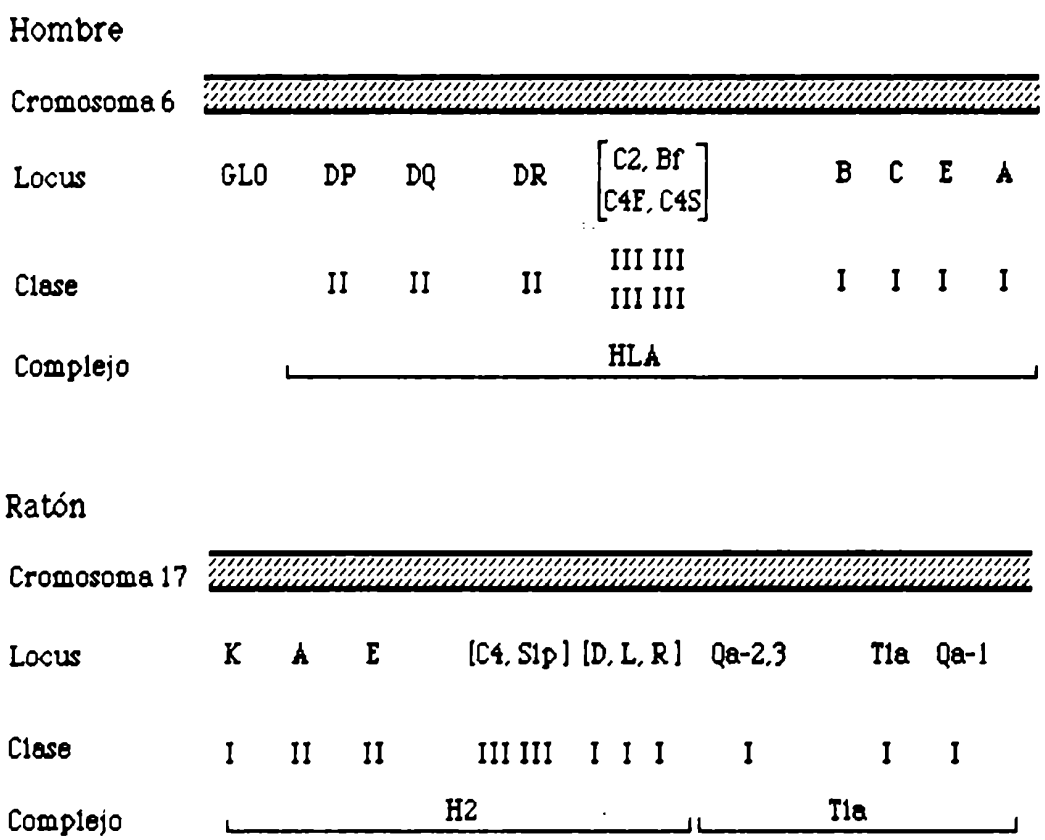
antígenos clase I. Las células T citotóxicas luego de reconocer antígenos se "activan" y lisan la célula en la cual se ha producido el reconocimiento.

En ambos casos (reconocimiento de antígenos por parte de linfocitos T_H en asociación con moléculas clase II o por parte de linfocitos Tc en asociación con moléculas clase I), el reconocimiento se produce a través de péptidos derivados de los antígenos correspondientes. Para ser reconocido por linfocitos T los antígenos deben ser procesados, degradados en péptidos y luego expresados en la membrana celular en asociación con los antígenos de MHC mencionados. La función de las moléculas del MHC es unirse a péptidos provenientes de antígenos para presentarlos al TCR (Tanaka, 1988). Existen además moléculas accesorias que participan en la unión del TCR al complejo formado por la molécula de MHC-péptido extraño. Estas son: Complejo CD3 (formado por 3 polipéptidos designados como γ, δ y ε), CD2 , CD4 y CD8 (Allison, 1987). El complejo CD3 se encuentra unido por un puente salino al TCR en la membrana del linfocito T y su presencia resulta importante para la unión TCR-molécula MHC+péptido. CD2 es una glicoproteina de 50 kDa que podría intervenir en el mismo fenómeno. CD4 es una glicoproteina de 55 kDa que expresan en su membrana como monómeros los linfocitos T inductores y que está involucrada en la formación del complejo TCR-molécula de MHC clase II+péptido. Se observó que CD4 interactúa con antígenos de MHC clase II y funciona como una molécula de adhsión entre células (Doyle, 1987). CD8 es una glicoproteina de 32 kDa que expresan como homodiméro (unidas por un puente disulfuro) los linfocitos T citotóxicos . Esta molécula interviene en la unión del linfocito Tc a su célula blanco, uniéndose al dominio $\alpha 3$ de la molécula de HLA clase I (Salter, 1990).

El reconocimiento restringido por antígenos de histocompatibilidad es por lo tanto un fenómeno que ocurre entre el receptor del linfocito T (TCR) y péptidos derivados de antígenos que son presentados en asociación con moléculas de MHC en la membrana de otras células. En esta unión participan además otras moléculas, en particular el complejo CD3 que acompaña al TCR y las moléculas CD4 y CD8, que correlacionan con el tipo de restricción presentado por los linfocitos T. Podríamos visualizar este fenómeno en los siguientes términos: la molécula de HLA sería el "receptor" de antígenos de la célula "blanco" (cualquier célula del organismo) y el TCR sería el "receptor" del complejo HLA+antígeno de la célula "efectora" (el linfocito T).

Organización de los genes del Complejo Mayor de Histocompatibilidad

Los genes del MHC están ubicados en el brazo corto del cromosoma 6 humano y en el cromosoma 17 del ratón La organización de estos genes varía en estas dos especies, siendo la estructura presente en el hombre la más comunmente encontrada en otras especies. La misma es del siguiente tipo a partir del centrómero se ubican los loci de los genes clase II, clase III y luego clase I. En el ratón existe una inversión del locus K, quedando a partir del centómero: locus K (clase I), loci clase II, loci clase III y loci clase I (D, L, R, Qa y Tl) (Guillemot, 1988).



Esquema 1
Organización de los genes del Complejo Mayor
de Histocompatibilidad

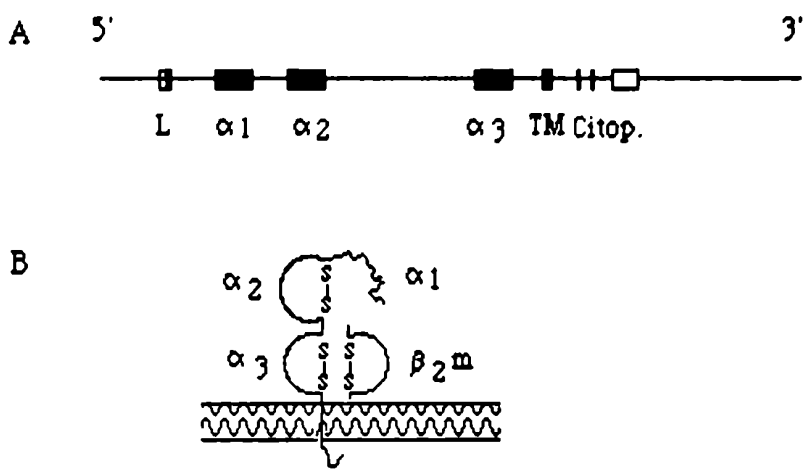
En ambas especies los genes clase I constituyen una familia multigénica. Se ha estimado en base a mapeo por enzimas de restricción y secuenciación de clones genómicos obtenidos a partir de la linea linfoblastoidea humana B-LCL-721, que la familia de genes de HLA clase I contiene 17 miembros (Koller, 1987). Esta familia está organizada en distintos loci: HLA-A, B y C, que codifican para los principales antígenos. Estos loci principales (HLA-A, B y C) son altamente polimórficos, esto significa que existen muchos alelos diferentes entre los individuos de una población. Se han descripto 25 alelos para HLA-A, 32 alelos para HLA-B y 11 alelos para HLA-C (Bodmer, 1989).

Recientemente se ha descripto el aislamiento de nuevos antígenos clase I, llamados HLA-E, HLA-F y HLA-G. HLA-E (o 6.2) produce en ensayos de transfección una proteina de 41 kDa asociada a β2-microglobulina que se expresa intracelularmente. HLA-F (o 5.4) produce en ensayos de transfección una proteina de 40 kDa asociada a β2-microglobulina que también se expresa intracelularmente. HLA-G (o 6.0) produce una proteina de 40 kDa asociada a β2-microglobulina que se expresa en la membrana de las células transfectadas (Shimizu, 1988). También se ha aislado a partir de la linea linfoblastoidea B 3.1.0 un cDNA correspondiente al gen RS5, cuya expresión puede detectarse en la membrana de células transfectadas. RS5 presenta similitudes al gen HLA-E (Srivasta, 1987). Otro gen que se ha descripto es P2B2, clonado a partir de DNA de un individuo sano, y que por transfección produce una proteina de 40 kDa asociada a β2-microglobulina; su secuencia es similar a HLA-A (Paul, 1987). Por el momento se desconoce si los nuevos miembros pertenecientes a la familia de MHC clase I están relacionados con los antigenos clase I "no clásicos" murinos Qa y Tl. Los datos enunciados implican que existe en el genoma de cada célula por lo menos 6 loci funcionales para genes de HLA clase I (HLA-A, B, C, E, F, G, Holmes, 1989).

El número de genes clase I detectados en el ratón BALB/C $H2^d$ por mapeo de restricción y técnica de Southern es de 36 (Steinmetz, 1982). Estos genes se ubican en 4 loci principales: H2K, H2D/H2L, Qa-2,3 y Tla, los cuales han sido definidos por análisis serológico de cepas endocriadas de ratones y han sido mapeados por la técnica llamada "polimorfismo de longitud del fragmento de restricción" (RFLP, Hood, 1982). Los genes de H2K, H2D y H2L son los genes de MHC clase I "clasicos", con alto grado de polimorfismo (para genes K y D existen más de 50 alelos en poblaciones de ratones salvajes y endocriados, Hood, 1983) y de expresión en todas las células nucleadas del organismo. Los genes pertenecientes a los loci Qa y Tl (de los cuales existen por lo menos 30 en cada célula, Winoto, 1983) son menos polimórficos y su expresión se limita a algunas células del organismo (algunas células linfoideas y estadios tempranos de células hematopoyéticas para Qa y timocitos para Tl, Paul, 1987).

Proteinas codificadas por los genes de histocompatibilidad clase I

Las proteinas codificadas por genes clase I son glicoproteinas integrales de membrana de 44 kDa, altamente polimórficas (Ploegh, 1981). Se piensa que esta característica de polimorfismo resulta ventajosa para la función de estas proteinas en su rol de presentadoras de antígenos a los linfocitos T La cadena α de 44 kDa se asocia en forma no covalente a β2-microglobulina, molècula no polimórfica, no glicosilada de 12 kDa codificada en el cromosoma 15 en el hombre y cromosoma 2 en el ratòn (Kindt, 1984). La asociacion con β2-microglobulina es un requisito para el transporte y la expresiòn de antigenos clase I en la membrana celular. En la membrana, las moleculas clase I se caracterizan por la presencia de 4 regiones extracelulares, 3 de ellas pertenecientes a la cadena α codificada en el MHC (dominios α1, α2 y α3), y una por β2-microglobulina. La cadena α contiene además una region hidrofóbica (que sirve para el anclado en la membrana) y una regiòn citoplasmática. En el esquema 2 se observa una representación de esta molecula



A: Gen clase I, B: molécula de antígeno clase I. L: péptido lider, α1 α2 α3: las 3 regiones extracelulares, TM: región transmembrana, Citop.: región citoplasmática, símbolo S-S: puente disulfuro, β2m: β2-microglobulina.

Esquema 2

Los dominios extracelulares α1, α2 y α3 poseen 90 aminoácidos cada uno En el doninio α1 (residuos 1 a 90) existe un sitio de N-glicosilación en posicion 86, tanto en HLA como en H_2. En HLA se ubica aqui la única cadena de carbohidratos, mientras que en H_2 hay una segunda cadena en posicion 176 (dominio α2). Las cadenas de carbohidratos son de tipo complex, estan unidas a Asn y las secuencias alrededor del sitio de glicosilacion corresponden a la secuencia consenso Asn-X-Thr/Ser (Ploegh, 1981). Las regiones α2, α3, C1 y C2 contienen cada una un puente disulfuro que da lugar a la formacion de un "loop" entre cisteinas 101-164 y 203-259. Esto ocurre también en la cadena de β2-microglobulina. Estos "loops" son de aproximadamente las mismas dimensiones que los presentes en las cadenas de inmunoglobulinas (Orr, 1979). La region de transmembrana es altamente hidrofóbica (no contiene residuos cargados ni polares), tiene una longitud de 24 aminoácidos y es similar a otras presentes en proteinas que atraviesan la membrana La región citoplasmática contiene 31 residuos en HLA (32 en H_2) y es de caracter hidrofilico, con un 50% de residuos polares. Se ha observado que esta region sufre fosforilación en residuos serina, tanto en HLA como en H_2. En los genes HLA-B7, A2, CW3 y pseudogen 12.4 el sitio primario de fosforilación es serina 335 y para los genes H_2K^b y H_2L^d es serina 333 (Guild, 1984). También existe en esta región una agrupacion de residuos basicos (a continuación de la region hidrofobica) que probablemente interactuan con los fosfolipidos cargados negativamente de la membrana celular y juegan un rol en el anclado de este antigeno (Ploegh, 1981).

En cuanto a la estructura tridimensional de los antigenos HLA, se conoce su estructura cristalográfica (HLA-A2, Bjorkman, 1987). La caracteristica más relevante de estos antigenos es que los dominios α1 y α2 se combinan para formar una estructura compatible con su funcion de union de ligandos, ya que la misma es tal que permite la formacion de un "bolsillo" o "hendidura" Las dimensiones de esta hendidura son de 25 x 10 Å, lo cual resulta suficiente para acomodar peptidos en estructura α hélice o conformaciones mas extendidas (se describen más detalles de esta región en la sección "Polimorfismo de genes clase I"). Se descubrió además en el análisis cristalográfico que existia en esa hendidura un material extraño que no provenia de la secuencia de la cadena α de HLA-A2 ni de β2-microglobulina. La naturaleza de este material no fue bien definida, sugiriendose que representaba una mezcla heterogenea de peptidos unidos.

Estructura de los genes de HLA clase I

Los genes clase I del Complejo Mayor de Histocompatibilidad constituyen una familia multigenica, con ciertas caracteristicas particulares. Existen en esta familia muchos genes y también pseudogenes que presentan homologia en ciertas regiones y difieren en otras. Los genes de HLA clase I se han estudiado por técnicas de DNA recombinante a partir de 1980, utilizando sondas de cDNA que sirvieron para hibridizar DNA genómico por la técnica de Southern y para aislar clones a partir de genotecas construidas en fago λ o cosmidos (Jordan, 1985, Parham, 1989). La estructura de estos genes se describio por secuenciacion del primer gen humano de clase I clonado (que resultó ser un pseudogen, Malissen, 1982) y coincidió con la estructura descripta para el primer gen clonado de clase I murino (que tambien resultó ser un pseudogen, Steinmetz, 1981). Asi se observó que cada dominio de la cadena α de una molécula clase I estaba codificado por un exon de un gen clase I (salvo en el caso del dominio citoplasmático). El exon 1 codifica para el péptido lider, los exones 2, 3 y 4 para los dominios extracelulares α1, α2 y α3 y el exon 5 para el dominio de transmembrana. El dominio citoplásmatico está codificado, en general, por los exones 6 y 7 en el hombre. Existen algunos genes donde el marco de lectura continúa en el exon 8 (HLA-A3 y HLA-CW3, Strachan, 1984). En estos casos el exon 8 codifica para un solo aminoácido, luego del cual se ubica el codón de terminación. A continuación se ubica una región no traducida de 400 pb (llamada 3UT), y luego se observa una señal de poliadenilación convencional (AATAAA). Observamos un esquema aproximado de la estructura en la figura 2.

Se han desarrollado tecnicas que permiten confirmar si un determinado gen de HLA clonado es funcional (esto es, que no corresponde a un pseudogen) y por otro lado, que permiten asignar serotipos a estos genes clonados. Esto puede realizarse mediante transfeccion de celulas eucarioticas, en general celulas Ltk$^-$ (fibroblastos de raton), (Hood, 1983, Jordan, 1985, Guillemot, 1988, Parham, 1989) En este sistema la cadena α de la molécula de HLA debe asociarse con β2-microglobulina de ratón, lo cual en muchos casos no presenta inconvenientes. Existen algunos genes de HLA para los cuales esta asociacion no resulta exitosa, y esto provoca que el gen en cuestion no se exprese en la membrana. Para solucionar este problema se idearon sistemas complementarios, como celulas L que expresan β2-microglobulina humana introducida por transfección (Rein, 1987), o lineas celulares humanas que han perdido su expresión de HLA-A, B, C (mutantes de linfocitos B, Parham, 1989). Mediante el uso de estos sistemas se ha comprobado la funcionalidad de genes de HLA clonados y se han podido asignar

serotipos por técnicas inmunológicas, analizando los productos de genes transfectados (Guillemot, 1988, Jordan, 1985, Parham, 1989).

La correspondencia entre estructura y función de genes clase I fue analizada utilizando las técnicas de "barajado de exones" (exon shuffling) y mutagénesis "in vitro", seguidas de transfecciones en células eucarióticas y diferentes técnicas para observar las características serológicas y funcionales de los genes en estudio. Así se observó que los primeros 3 exones de un gen HLA (que codifican para el péptido señal y dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$) son los que determinan su especificidad serológica, lo cual no es sorprendente ya que codifican para la parte más polimórfica de la molécula (Jordan, 1985). En los experimentos donde el intercambio involucra sólo uno de los dos primeros dominios (por ejemplo dominio $\alpha 1$ de HLA-A3 unido a dominios $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de HLA-B7) se pierde la reactividad para anticuerpos específicos contra los dos antígenos originales (HLA-A3 y HLA-B7). Esto sugiere que los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ interactúan de tal forma que la molécula adquiere su estructura tridimensional y expone los epitopos reconocidos por anticuerpos. Los mismos resultados fueron obtenidos en el sistema murino (Ozato, 1983). También se utilizó esta estrategia para estudiar cuales de los dominios de la molécula de HLA están involucradas en el reconocimiento por parte de los linfocitos T citotóxicos. Esto fue particularmente exitoso en el sistema murino, donde genes de H_2 se transfectaron en células L de ratón y pudo producirse reconocimiento específico por parte de linfocitos T citotóxicos. Así se comprobó que los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ son escenciales para este reconocimiento (Allen, 1984).

Al analizar por la técnica de Southern el DNA genómico de un individuo usando como sonda una región extensa de un gen o un cDNA clonado de HLA, se observa un patrón complejo (con la aparición de muchas bandas), ya que al existir homología entre varios genes de HLA presentes en el genoma, se observa hibridización positiva para gran parte de ellos (Kindt, 1984, Jordan, 1985, Biro, 1983, Parham, 1989). La complejidad de los patrones observados motivó la búsqueda de sondas específicas, que pudiesen reconocer solo una parte de los genes de HLA, particularmente sólo uno de los loci, ya sea HLA-A, B o C. Por análisis de secuencias de genes clonados se observó que el extremo 3' no codificante presentaba la característica de especificidad de locus, y por lo tanto se utilizó esta región de los genes de HLA para derivar sondas específicas (Jordan, 1985, Koller, 1984). El uso de estas sondas permitió simplificar, al menos en parte, la complejidad de los patrones observados al realizar un "Southern" de DNA genómico, ya que sólo se observan los genes correspondientes a un único locus. La disponibilidad de tales sondas permitió además, realizar estudios correlacionando alelos definidos

serológicamente con fragmentos específicos de DNA producidos por enzimas de restricción. Esta técnica, llamada "polimorfismo de longitud del fragmento de restricción" (RFLP) define los llamados "alogenotopos", o sea fragmentos que presentan polimorfismo y se producen en el DNA de ciertos individuos pero no en el de otros. Se establecieron de esta forma varias correlaciones entre alogenotopos y moléculas clase I definidas serológicamente (Cohen, 1983).

Polimorfismo de genes clase I

Una característica particular de los genes clase I es su alto grado de polimorfismo. Se ha estimado que existen entre 50 y 100 alelos de moléculas clase I en el hombre y también en el ratón (Guillemot, 1988). Como se mencionó anteriormente, existen 25 alelos definidos para HLA-A, 32 para HLA-B y 11 para HLA-C. Estos números, de todas maneras, subestiman el número total, ya que existen antígenos que pueden ser idénticos en su respuesta a antisueros pero distinguibles por otros criterios (Parham, 1989). La comparación de las secuencias de moléculas de HLA-A, B, C muestra un patrón complejo de variaciones de aminoácidos que es diferente del encontrado en otras familias de proteinas polimórficas (como por ejemplo las variantes de hemoglobinas). En estas familias las variantes difieren de la secuencia consenso solamente en 2 o 3 aminoácidos, y la secuencia consenso es claramente el ancestro común de las variantes. Por el contrario, no hay alelos predominates entre los loci de HLA-A, B, C y todas las secuencias tienen múltiples diferencias con la secuencia consenso (Parham, 1989).

Existen posiciones de polimorfismo a lo largo de toda la molécula de HLA expuesta en la superficie celular (dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$). Sin embargo, si se definen posiciones de alta variabilidad y de baja variabilidad, observamos que los sitios de alta variabilidad se encuentran en los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$, siendo el dominio $\alpha 3$ altamente conservado. Esta característica de la región $\alpha 3$ está relacionada al requerimiento de combinación de ese dominio con la molécula de $\beta 2$-microglobulina (Guillemot, 1988). En base al criterio de alta variabilidad pueden definirse 17 posiciones a lo largo de los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$. De estas posiciones de alta variabilidad, 15 se encuentran en la zona definida por análisis cristalográfico como la que potencialmente puede interactuar con péptidos antigénicos o con el TCR de los linfocitos T. Estos son los residuos 9, 62, 65, 66, 67, 70, 71, 77, 80 para el dominio $\alpha 1$ y residuos 95, 97, 114, 116, 156, 163 para el dominio $\alpha 2$, en el gen HLA-A2 (Bjokman, 1987 [2]). Esto implica que las posiciones de alta variabilidad están directamente involucradas en la interacción con péptidos

antigénicos y con TCR. Las variaciones que se observan serían consecuencia de la diversidad necesaria para modificar estas interacciones. En esencia, esto explicaría la funcionalidad y la ventaja selectiva del polimorfismo en los genes de HLA (Parham, 1989). Además de las 20 posiciones de alta variabilidad, existen 71 posiciones de baja variabilidad diseminadas a lo largo de toda la molécula de HLA. Estas sustituciones podrían influenciar las interacciones con péptidos y receptores de linfocitos T causando perturbaciones conformacionales indirectas.

En cuanto a los mecanismos que han podido generar el polimorfismo de genes clase I en el hombre y en el ratón, se supone que puede tratarse de procesos tales como mutaciones puntuales, recombinación recíproca o recombinación no recíproca (conversión génica), (Guillemot, 1988).

Desequilibrio de unión ("linkage desequilibriun")

Además del polimorfismo, existe otra característica particular que presentan los antígenos de histocompatibilidad clase I y que es el llamado "desequilibrio de unión" ("linkage desequilibrium"). Este fenómeno consiste en la asociación de 2 alelos de distintos loci con una frecuencia mayor que la esperada para una población en equilibrio. Tal es el caso, por ejemplo, de los antígenos HLA-A1 y HLA-B8, donde la frecuencia esperada de este haplotipo (calculada en base a la frecuencia de aparición de cada antígeno en forma individual) es de 1,6% en la población, pero la frecuencia observada con que se presenta es de 8,8%. El origen de este fenómeno se desconoce, se han sugerido 2 posibilidades para explicarlo: que la aparición de una especificidad particular sea relativamente reciente y no haya habido tiempo suficiente para que los eventos de recombinación la distribuyan entre los cromosomas de la población, o que exista algún mecanismo que favorezca la asociación o selección de cierto par de genes (Roith, 1985, Sachs, 1984).

Se ha observado que existe asociación entre ciertas enfermedades y determinados haplotipos de HLA. Estas enfermedades generalmente contienen un componente autoinmune, y algunas de ellas son: espondilitis anquilosante, esclerosis múltiple, artritis reumatoidea, enfermedad celíaca y diabetes mellitus insulino-dependiente. En el caso de espondilitis anquilosante el 95% de los pacientes son serológicamente HLA-B27 (si bien solo el 2% de individuos HLA-B27+ desarrollan la enfermedad). Se piensa que el producto de este alelo prodría estar directamente involucrado con el desarrollo de la enfermedad (a través del desarrollo de una

enfermedad autoinmune que podría comenzar con una infección viral o bacteriana del tejido blanco). Otra explicación posible para la asociación de las enfermedades mencionadas y la expresión de determinados alelos de HLA sería que exista "desequilibrio de unión" entre el gen de HLA en cuestión y otros genes directamente responsables de las enfermedades. Se desconocen por el momento los mecanismos precisos de las asociaciones mencionadas (Benjamin. 1990, Guillemot, 1988).

Expresión de antígenos de histocompatibilidad clase I

Los antígenos de histocompatibilidad clase I se expresan en todas las células somáticas nucleadas del organismo, pero el nivel de su expresión puede variar entre distintos tejidos o distintos tipos celulares. Existen células somáticas que expresan bajos niveles de antígenos clase I, como por ejemplo fibroblastos y células musculares. Las células del sistema inmune tienen en cambio relativamente altos niveles de expresión de antígenos clase I (Guillemot, 1988). En el hombre todas las células del organismo expresan antígenos HLA clase I, menos los eritrocitos, espermatozoides y células del trofoblasto (frontera celular entre el feto y la circulación materna), (Bodmer, 1981). En el ratón la expresión de HLA clase I comienza durante el desarrollo embrionario, la transcripción de genes clase I comienza en el día 9 del desarrollo y se detectan antígenos en la superficie celular en baja cantidad a partir del día 10. Previamente al día 9 la expresión de antígenos clase I puede ser inducida por IFNγ. En el día del nacimiento la mayoría de las células del organismo expresan antígenos clase I en su superficie (Ozato, 1985).

Se ha observado alteración de la expresión de antígenos clase I en células tumorales, que puede ser de dos tipos: alteración cualitativa (generación de nuevos antígenos clase I) o alteración cuantitativa (supresión o pérdida de antígenos clase I), (Tanaka, 1988). En el caso de presentación de antígenos clase I alterados, se supone que esto puede ser debido a múltiples eventos de recombinación entre los genes clase I endógenos, lo cual ocurriría durante el proceso de la tumorigénesis. Esto implica que los mismos mecanismos que generan la diversidad de antígenos de MHC serían los responsables de crear diferentes especificidades en células tumorales. En el caso de pérdida de expresión, se supone que ciertos virus han desarrrollado estrategias para reducir la expresión de antígenos clase I en las células que infectan. La reducción de la expresión de estos antígenos en la célula infectada llevaría a un "escape" del reconocimiento por parte del sistema inmunológico (ya que un célula infectada que

exprese en su membrana antígenos virales asociados a antígenos de MHC clase I será lisada por linfocito Tc). Esta regulación negativa de antígenos clase I podría estar involucrada en el desarrollo de leucemias causadas por retrovirus bovinos. Se conoce además el caso de disminución de expresión de antígenos clase I producida por adenovirus. Se ha observado que Adenovirus 12 (Ad12) reduce el nivel de antígenos clase I y es de tipo oncogénico (tiene alta capacidad de inducir tumores). Las células transformadas por Ad12 tienen un nivel muy disminuido de mRNA proveniente de genes clase I, pero esta disminución puede ser revertida por tratamiento con IFN. Se supone que los mecanismos por los cuales Ad12 disminuye la expresión de antígenos clase I pueden involucrar cambios en el procesamiento post-traduccional de los mRNA, o tal vez alteraciones en su estabilidad. Por el contrario, Adenovirus 5 (Ad5) no reduce la expresión de antígenos clase I y no es un virus oncogénico en roedores. Los casos de disminución de expresión de antígenos clase I tienen serias implicaciones clínicas, ya que la supresión de la expresión de estos antígenos es directamente responsable de evitar que las células tumorales sean reconocidas por el sistema inmune (Tanaka, 1988).

Existen varios factores que intervienen en la regulación de la expresión de los antígenos de histocompatibilidad clase I:

1. Elementos con acción en cis

La regulación de los genes que codifican para los antígenos clase I está influenciada por varias secuencias regulatorias y factores asociados, lo cual hace que existan varios mecanismos responsables de la regulación (como ocurre con muchos genes eucarióticos, Brown, 1981). Existen 3 secuencias importantes para la iniciación de la transcripción y que en conjunto se definen como promotor: el sitio de iniciación de la transcripción (sitio "cap"), la llamada "TATA-box" y la llamada "CAAT-box". Estas secuencias se ubican siempre en la región 5' no traducida de los genes y sus posiciones relativas no presentan grandes variaciones (Breathnach, 1981, La Thangue, 1988, Hatzopoulos, 1988). Estas secuencias se hallan normalmente presentes en los genes clase I. En el ratón existen secuencias típicas del tipo "CAAT" y "TATAAA" ubicadas a 50 y 25 pb, 5' del sitio "cap" respectivamente (Kimura, 1986, Arnold, 1984). La mayoría de los genes clase I humanos contienen una secuencia "CAAT" típica y una variante de la secuencia "TATAAA", que es "TCTAAA" (Ways, 1985, Malissen, 1982, Guillemot, 1988). En el gen HLA-CW3 las secuencias "CAAT" y "TATAAA" han sido reemplazadas por "CGGT" y

"TCTGAA" (Sodoyer, 1984), lo cual se ha postulado como una posible explicación del bajo nivel de HLA-C en al superficie celular, comparado con el nivel de HLA-A y B (Guillemot, 1988).

Existen otras secuencias que constituyen señales que modifican la actividad de los promotores: son las llamadas secuencias "enharcers" o activadores, las cuales han sido definidas como secuencias que aumentan la eficiencia de transcripción en una forma relativamente independiente se su posición y orientación respecto de un gen determinado (Khoury, 1983, Müller, 1988, Maniatis, 1987).Estas secuencias generalmente actuan en forma tejido específica, como en el caso de expresión de genes de inmunoglobulinas (la misma se halla limitada a cierto estadio de diferenciación de linfocitos B). Otra característica que presentan algunos "enhancers" es proveer respuesta específica a ciertos estímulos, como shock de temperatura, metales pesados, factores de crecimiento y hormonas esteroideas (Maniatis, 1987).

Existen secuencias del tipo "enhancer" en los genes de HLA clase I y las mismas han sido estudiadas en varios genes. Para el promotor del gen H_2K^b se observa que existen 2 secuencias "enhancer" en posiciones -213 a -165 ("enhancer" A) y -120 a -61 ("enhancer" B) respecto del sitio cap. Estas secuencias tienen la capacidad de aumentar la actividad transcripcional del promotor de conalbúmina asociado al gen CAT en ensayos de transfección transiente en células 3T6 y Ltk^- (Kimura, 1986). Para el promotor del gen H_2L^d se ha definido una zona llamada "elemento regulatorio de clase I" (CRE), ubicada en posiciones -195 a -161 respecto del sitio cap. El elemento CRE tiene la capacidad de aumentar la actividad transcripcional del promotor de SV40 asociado al gen CAT, en ensayos de transfección transiente en células NIH3T3. Para el gen HLA-B7 se han descripto "enhancers" que pueden funcionar sobre el promotor de SV40 asociado al gen CAT en ensayos de transfección transiente en células Ltk^-. Los mismos se encuentran en posición -252 a -68 respecto del sitio cap y también en los intrones 3 y 5 (Ganguly, 1989).

Además de estos "enhancers", existe otro elemento que es la llamada secuencia "IFN-sensible", definida originalmente para los genes de HLA-A3, HLA-DRα, pseudogen HLA12.4 y gen de metalotioneina II (Friedman, 1985) y encontrada luego en otros genes cuya expresión es estimulada por IFN. En el promotor del gen de H_2K^b esta secuencia se ubica en posición -165 a -137 respecto del sitio cap, la misma tiene la capacidad de conferir la propiedad de ser inducible por IFNα/β al propio promotor y al promotor de

conalbúmina asociado al gen CAT en ensayos de tranfección transiente en células 3T6 (Israel, 1986). La secuencia consenso llamada "IFN-sensible" es la siguiente:

G C
TTCNCNACCTCNGCAGTTTCTCCTTTCTCT
"core"

Para el promotor del gen H_2L^d se ha observado también la presencia de esta secuencia en posiciones -167 a -139 respecto del sitio cap, con características funcionales similares, esto es, confiere la propiedad de ser inducible por IFNα/β al promotor de SV40 asociado al gen CAT en ensayos de transfección transiente en células NIH3T3 (el IFNγ también produce un aumento de la transcripción en este caso, pero de una manera independiente de la dosis, y se sugiere que tal vez el efecto en este caso sea de tipo postraduccional, Sugita, 1987). Para el gen H_2L^d se ha observado que secuencias ubicadas hacia 3' del sitio de iniciación de la transcripción tienen la propiedad de conferir inducción por IFNγ al promotor del virus de leucemia felina (FeLV) en ensayos de transfección en células L (asociando el gen completo sin su promotor al promotor viral y detectando el antígeno en la superficie de las células transfectadas por radioinmunoensayo, Korber, 1987).

Para el promotor del gen H_2D^d la secuencia "IFN-sensible" se ubica en posición -165 a -136 respecto del sitio cap y se observó que confiere la propiedad de ser inducible por IFNα/β e IFNγ a su promotor en células L (Korber, 1987).

Secuencias del tipo "IFN-sensible" se han descripto también para otros genes que presentan la característica de ser inducibles por IFN. En el caso del gen de 2',5'-oligoAsintetasa humana se ha definido una región entre posiciones -159 a -87 respecto del sitio cap llamada E-IRS. La misma es capaz de aumentar la actividad del gen CAT en ensayos de transfección en células HeLa al recibir estimulación con IFNα/β o IFNγ. Esta región puede ser dividida en 2 "enhancers", A (-159 a -109) y B (-109 a -87). Ambos son necesarios para que el promotor de este gen sea activo, y además, el elemento B es capaz de conferir inducibilidad por IFNβ al promotor de timidina kinasa (TK) en ensayos de transfección en células HeLa (Benech, 1987) y células COS (Rutherford, 1988). En el gen 6-16 (que codifica para una proteina de 12 kDa) se ha localizado una secuencia con homología a la secuencia "IFN-sensible" en posición -168 a -89 respecto del sitio cap. Esta secuencia puede conferir la propiedad de ser inducible por por IFNα al promotor

TK en ensayo de transfección en células Ltk$^-$ (Porter, 1988). Para el gen ISG-15 humano (que codifica para una proteina de 15 kDa), la región comprendida entre posiciones -115 a -96 respecto del sitio cap puede conferir al promotor TK la propiedad de ser inducible por IFNα en ensayos de transfección transiente en células HeLa (Reich, 1987). Para el gen 9-27 humano (que codifica para una proteina de 125 aminoácidos y pertenece a la familia de los genes llamados 1-8) existe una secuencia con homología a la secuencia "IFN-sensible" en posición -172 a -160 respecto del sitio cap. La misma es capaz de conferir la propiedad de ser inducible por IFNα e IFNγ al promotor TK en ensayos de transfección transiente en células HeLa (Reid, 1989). Para el gen de β2-microglobulina no se han observdo homologias muy significativas con los "enhancers" descriptos para el gen H_2K^b. Solamente se observa homología parcial en la región -115 a -146 respecto del sitio cap del gen de β2-microglobulina al compararlo en forma invertida con la región -141 a -171 respecto del sitio cap del gen H_2K^b (zona de "enhancer" A y secuencia IRS). La región mencionada del gen de β2-microglobulina tiene también características de "enhancer", ya que es capaz de aumentar la actividad del promotor de conalbúmina asociado al gen CAT en ensayos de transfección transiente en células 3T6 (Kimura, 1986).

En los genes del Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase II también se ha encontrado la secuencia "IFN-sensible", como se mencionó anteriormente. En el gen de HLA-DRα se localiza en posición -600 respecto del sitio cap, pero no se ha confirmado su participación en la inducción por IFNγ de este gen. Se han definido otras secuencias regulatorias como las llamadas X e Y (posición -95 a -108 y -63 a -74, respectivamente, para el gen HLA-DRα, Reith, 1988). Las secuencias X e Y se hallan muy conservadas entre los genes clase II humanos y murinos. Existe también otro tipo de secuencia llamada "octámero" (posición -45 a -52 en el gen HLA-DRα), que presentaría características similares al "octámero" presente en los promotores de genes de inmunoglobulinas, virus del sarcoma de Rous (SV40) e histona humana 2B. La región constituida por los elementos X, Y y octámero participa en la expresión del gen HLA-DRα, se observó que asociada al gen CAT produce su expresión en líneas de linfocitos B (Raji) pero no en líneas de linfocitos T (H9). Esto indicaría que estos elementos, además de estar involucrados en la expresión del gen HLA-DRα, participan en el fenómeno de especificidad de tejido de la expresión de los genes HLA clase II (Sherman, 1987). Posteriormente se demostró que la región ubicada entre -141 a -109 es necesaria para producir la respuesta a IFNγ (adosando distintos fragmentos del promotor al gen CAT y realizando transfecciones transientes en células de glioblastoma humano). La región

comprendida entre -141 a -109 contiene un septámero (posición -131 a -125) que se halla presente también en los genes $E\alpha^d$, $E\beta^d$, DQβ y $A\beta^b$, que se propone como elemento "IFN-sensible" de genes clase II y que es distinto del elemento descripto para genes clase I (Basta, 1988).

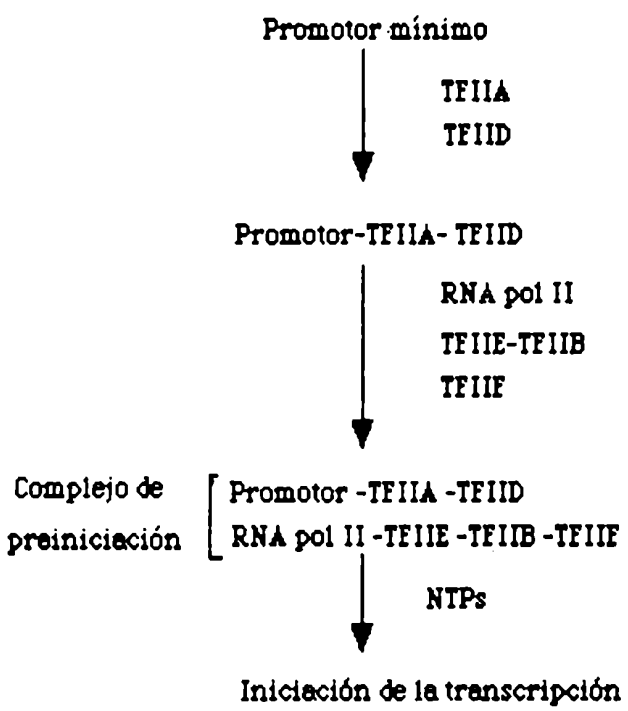
Para el gen HLA-DQβ se han definido zonas de regulación positiva y negativa de la transcripción, con la participación de 5 elementos: dos elementos que proveen una alta eficiencia de transcripción (posiciones -114 a -100 y -80 a -67), un elemento responsable de la inducción por IFNγ con homología parcial a la secuencia "IFN-sensible" de genes clase I (posición -159 hacia 3') y 2 elementos con influencia negativa sobre la trancripción (posición -128 hacia 5' y posición -128 a 107). Esto fue analizado por transfección estable de diferentes construcciones del promotor de este gen en la línea de fibroblastos M1XP (xeroderma pigmentosa), y detección de mRNA en ensayos de protección a RNAsa (Boss, 1986). Para el gen clase II murino $E\alpha^k$ se observó que la región llamada "enhancer Y" (posición -60 a -46 respecto del sitio cap) es necesaria para la inducción por IFNγ de este gen (análisis de mRNA por mapeo con nucleasa S1 en macrófagos peritoneales de ratones transgénicos para distintas construcciones del gen mencionado, Dorn, 1987). Estos son los elementos que aparecen involucrados en la regulación en cis de la expresión de genes HLA clase II, aunque su función precisa es todavía poco clara (Reith, 1988).

Podemos observar que existen varios elementos involucrados en la regulación en cis de los genes de HLA clase I y también clase II. Sobre estos elementos ejercen su influencia factores reguladores de acción en trans que describiremos en la sección siguiente.

2. Elementos de acción en trans

Además de los elementos en cis que participan en la regulación de la transcripción, ejercen influencia varios factores codificados en otros genes. Estos factores de acción en trans actúan uniendose en forma especifica a dichas secuencias reguladoras cis y producen activación del gen en cuestión. Se han descripto varios tipos de factores de acción en trans, algunos de ellos generales para la mayoría de los genes eucarióticos (como factores transcripcionales que permiten la acción de la RNA polimerasa II) y otros restringidos promotores y "enhancers" con características particulares (como especificidad de tejido, respuesta a hormonas, etc.).

Mencionaremos en primer término los factores transcripcionales fundamentales para la acción de la RNA polimerasa II. Esta enzima es la responsable de la transcripción de todos los genes que codifican para proteinas y está compuesta por varias subunidades (Lillie, 1989). La acción de la RNA polimerasa II depende de varios factores fundamentales, ya que la misma no puede iniciar la transcripción de templados "in vitro" a menos que sea suplementada con una serie de factores celulares que proveen reconocimiento especifico para las secuencias promotoras minimas (La Thangue, 1988). A partir de extractos celulares crudos han sido aislados 5 factores, TFIIA, IIB, IID, IIE, IIF. Se conoce en particular la acción de TFIID, que es el factor que reconoce y se une a la secuencia "TATA-box" y el gen que lo codifica ha sido recientemente clonado a partir de levaduras (codifica para una proteina de 27 kDa y tiene capacidad de unirse al promotor tardío principal de adenovirus, con afinidad por la "TATA-box, Horikoshi, 1989). Un modelo de ensamblado de todos estos factores se describe en el esquema 3 (La Thangue, 1988):



Esquema 3

Inicialmente, TFIIA influenciaría el DNA de alguna manera que facilitaría la unión de TFIID, permitiendo de esta manera el reconocimiento del promotor por la RNA polimerasa II. Luego se unirían los factores TFIIE, TFIIB y TFIIF generando un complejo de preiniciación que tiene la capacidad de responder rapidamente a la adición de nucleótidos trifosfato.

Además de estos factores que tendrían la característica de ser comunes al funcionamiento de los promotores sobre los que interacciona la RNA polimerasa II, existen otros específicos para determinadas secuencias presentes en ciertos promotores, "enhancers" y elementos que proveen respuesta a hormonas en el DNA. La interacción de dichos factores con el DNA lleva a la activación del gen en cuestión.

Se han descripto varios factores de unión específica a promotores, y "enhancers", mencionaremos algunos de ellos:

Factor Sp1: Presenta unión a las secuencias GGGCGG ("CG-box") del promotor de SV40. Fue aislado a partir de células HeLa, produce protección en ensayos de digestión por DNAsaI y activación del promotor de SV40 en ensayos de transcripción "in vitro" (McNight, 1986). Está constitido por 2 polipéptidos de 105 y 95 kDa y tiene capacidad de unirse a secuencias consenso presente en promotores de otros genes como metalotioneina IIA, dihidrofolato reductasa y promotor inmediato tardío de virus de Herpes simplex (La Thangue, 1988). Se ha clonado un cDNA de este factor a partir de células HeLa y su región de unión al DNA es del tipo "zinc-finger" (Kadonaga, 1987).

Factores de unión a "CAAT-box": Existe una familia de factores transcripcionales que se unen a la secuencia CCAAT, originalmente definidas para el promotor TK de virus de Herpes simplex. Se observó que la presencia del factor CTF activa la transcripción "in vitro" del promotor TK y tiene capacidad de unión a la secuencia CCAAT en ensayos de protección a DNAsa con extractos de células HeLa (Jones, 1985). El factor CTF reconoce la misma secuencia que el factor NF1, que estimula la iniciación de la replicación "in vitro" de adenovirus. La purificación de ambos factores CTF/NF1 por cromatografía de afinidad produce una familia de polipéptidos entre 52 y 66 kDa, con capacidad de estimular la transcripción "in vitro" del DNA (La Thangue, 1988). Existe otro factor de 20 kDa, llamado CBP, que se une a la secuencia CCAAT del promotor de SV40, virus de sarcoma murino y virus de polioma (purificado a partir de hígado de rata, Johnson, 1986). Los factores CTF/NF1 y CBP son capaces de interaccinar con secuencias CCAAT del mismo promotor, pero están codificados en genes diferentes y utilizan zonas de unión al

DNA de diferente tipo (Johnson, 1989). Además de estos factores, se ha descripto otro con capacidad de unión a secuencias de tipo CAAT en células de linfoma B, llamado factor NF-Y El factor NF-Y se une a la secuencia CCAAT de genes de histocompatibilidad clase II (ver más adelante). Se ha aislado otro factor a partir de hígado de rata que se une al promotor del gen de colágeno $\alpha 2(I)$. Este factor llamado CBF puede ser separado en 2 componentes (CBF-A de 39 kDa y CBF-B de 41 kDa, Hatamochi, 1988).

Factores de unión a la secuencia octámero: El octámero ATGCAAAT se halla presente en varios promotores y "enhancers" de genes de cadena liviana y cadena pesada de inmunoglobulinas, promotor TK, histona H2B, "enhancer" de SV40 y genes IE de herpesvirus. Inicialmente se demostró la unión de un factor al octámero presente en inmunoglobulinas por ensayos de retardo en geles con extractos de células de linfoma B y células HeLa (Singh, 1986). Posteriormente esta actividad fue subdividida en 2 fracciones, llamándose NF-A1 y NF-A2 (o también OCT1 y OCT2). El factor NF-A1 fue encontrado en varias líneas celulares y el factor NF-A2 está restringido a células linfoideas B (Staudt, 1986). Las propiedades de unión al DNA de ambos son indistinguibles y ambos funcionan como activadores de la transcripción en sistemas "in vitro" Mediante el clonado y secuenciación de los genes que los codifican se observó que presentan homologia, sobre todo en la zona de unión al DNA. Estos factores difieren en una región cercana al carboxilo terminal, que contiene una repetición de leucinas en el factor NF-A2 y no en NF-A1. Se supone que esto podría tener influencia en la especificidad de unión para NF-A2 (Johnson, 1989).

Factores de unión a secuencias "Heat Shock": La inducción de genes de "Heat Shock" es mediada por una secuencia regulatoria altamente conservada (HSE) ubicada en cis respecto de estos genes. A esta secuencia se une un factor transcripcional constituido por una proteina de 150 kDa (HSTF) definido originalmente en drosofila y encontrado luego en levaduras y extractos de células HeLa. La inducción de este factor es independiente de sintesis de proteinas (Johnson, 1989, La Thangue, 1988).

Factores FOS/JUN: Estos 2 factores constituyen proteinas nucleares codificadas por proto-oncogenes. JUN está relacionado a proteinas de unión al DNA llamadas AP1 y forma con FOS un complejo heterodimérico in vitro. AP1 se definió originalmente como un factor proveniente de células HeLa que interactúa con el "enhancer" del gen de metalotioneina IIA aumentando su transcripción "in vitro". También presentó sitios de unión especificos a los "enhancers" de SV40 y colagenasa en ensayos de protección a

DNAsa I (Lee, 1987). Luego se observó la similitud entre el sitio de unión de AP1 y el factor GCN4, proteina de levaduras que juega un rol central en la regulación de la síntesis de aminoácidos. AP1 es el producto del oncogen celular JUN, y forma parte de un conjunto de polipéptidos codificados por una familia de genes relacionados. La actividad de AP1 es modulada por factores de crecimiento y transductores de la señal (como esteres de forbol, Johnson, 1989). Fos es una proteina nuclear con actividad transformante que no tiene actividad de unión al DNA per se, pero interactúa para formar un complejo de unión con AP1 que estimula la transcripción de genes quiméricos con respuesta a AP1 (Chiu, 1988).

También se han descripto otros factores como aquellos que se unen al promotor principal tardío de adenovirus (MLTF), factores que se unen al elemento de respuesta al AMPc de ciertos genes, factor Ap2 (unión a "enhancers" de metalotioneina IIA, proencefalina, colagenasa), factor EBp20 (unión a "enhancer" de SV40, virus de polioma y virus de sarcoma murino), factores GTIIA, IIBα, IIBβ, IIC (unión a "enhancer de SV40), (La Thangue, 1988).

Otro grupo de factores de acción en trans está constituido por aquellos que presentan unión a "enhancers" de genes inducibles por hormonas esteroideas y glucocorticoides. En este caso el complejo formado por el receptor de hormonas y su ligando se unen a la secuencia reguladora presente en el gen inducible produciendo activación de la transcripción (Yamamoto, 1985).

Para algunos genes del MHC clase I se han definido factores específicos que interactúan con elementos regulatorios cis:

En el promotor del gen H_2K^b se ha descripto la unión de un factor llamado H2TF1, en posición -173 a -160 respecto del sitio cap (observado en ensayos de retardo en geles, mapeo por DNAsa I e interferencia de metilación, Baldwin, 1987). Este factor fue encontrado en extractos de células epiteliales (Hela), fibroblastos (Balb/c3T3) y eritroblastos (MEL). Este factor puede unirse a una secuencia similar (aunque no idéntica) presente en el "enhancer" de 72 pb de SV40. La secuencia responsable de la unión se superpone con la región "IFN-sensible del promotor del gen H_2K^b (posición -165 a -137), pero no se sabe con certeza si el factor H2TF1 está involucrado en la regulación de la expresión por IFNα de este gen (el factor H2TF1 no aumenta su actividad por tratamiento con IFNα de células Balb/c3T3) (Balwin, 1987, Israel, 1987). Se ha descripto que en la zona de unión del factor H2TF1 puede unirse también el factor

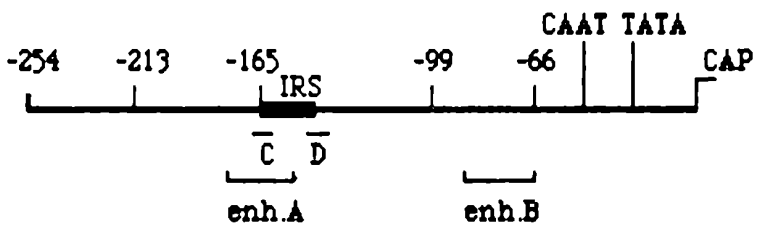
NF-κB (factor presente en células B que se une al "enhancer" de la cadena liviana κ de inmunoglobulinas) (Baldwin, 1988). La secuencia donde se produce la unión del factor H2TF1 se encuentra también en los promotores de otros genes clase I, H_2K^b (Kvist, 1983), HLA-A3 (Strachan, 1984), H_2L^d (Shirayoshi, 1987) y también en el gen Y2 que se describe en este trabajo. Se ha descripto la unión de un factor con características similaeres a H2TF en el gen de β2-microglobulina en la región -129 a -116 respecto del sitio cap (produce protección a DNAsa I en ensayos de "foot-print" con extractos de células HeLa, Israel, 1987). Utilizando la zona de unión de H2TF1 como sonda se ha clonado el cDNA correspondiente a una proteina (40 kDa) con propiedades de unión a dicha región regulatoria del gen H_2K^d. Se supone que sería el cDNA correspondiente al factor H2TF1 (Singht, 1988).

Para el gen H_2K^b también se ha definido el factor IBP1, que presenta unión entre las posiciones -156 a -135 respecto del sitio cap (observado en ensayos de retardo en geles e interferencia de metilación, Blanar, 1989). Esta región se superpone con la región "IFN-sensible" y se ha demostrado que el factor IBP1 es inducible por IFNγ en células HeLa. Esta inducción se correlaciona en el tiempo con la inducción de la transcripción de los genes del MHC clase I, ya que se observa 1 h luego del tratamiento con IFNγ. Se supone que la unión de este factor es necesaria para la inducción de la expresión del gen H_2K^b por IFNγ ya que mutaciones producidas en el sitio de unión anulan la inducción del promotor H_2K^b por IFNγ y la unión de este factor. Este factor no es inducible por IFNα en células HeLa. Secuencias similares con capacidad potencial para unir este factor se han encontrado en varios genes inducibles por IFNα/β o IFNγ: 2'-5' oligoA sintetasa, ISG-15, ISG-54, HLA-A2, HLA-A3, 6-16, H_2L^d, H_2D^d (Blanar, 1989) y gen Y2 descripto en este trabajo. En el gen H_2L^d se ha descripto que en la secuencia donde se uniría el factor IBP1 (posiciones -152 a -143 respecto del sitio cap para este gen) se unen 2 factores: B1 y B2(observados en ensayos de retardo en geles e interferencia de metilación). El factor B1 está presente en forma constitutiva y el factor B2 es inducible por IFNα/β en células LH8 (linfocitos T) y Ltk^-. Se ha sugerido que la unión del factor B2 es escencial para aumentar el nivel de transcripción de de genes de MHC clse I (Shirayoshi, 1988). Para el gen H_2L^d se han descripto también otras 2 zonas de unión de proteinas en posiciones -203 a -195 (región II) y posiciones -189 a -161 (región III), observadas en ensayos de retardo en geles e interferencia de metiulación (Shirayoshi, 1987).

Para el gen H_2D^d se han descripto unión de factores en 3 zonas del promotor, en posiciones -157 a -140 (que coincide con la secuencia "IFN-sensible" de este gen), -205 a

-188 y -108 a -90 (observados en ensayos de mapeo por DNAsa I). En estos 2 últimos sitios se observa también unión del factor Ap1 (Korber, 1988).

Para clarificar los datos correspondientes a secuencias regulatorias en cis y factores de unión a promotores y "enhancers" se observa un esquema del promotor del gen H_2K^b con sus elementos regulatorios:



IRS: secuencia "IFN-sensible"

C: unión de H2TF1

D: unión de IBP1

Esquema 4
Esquema del promotor y regiones regulatorias del gen H_2K^b

Para los genes de MHC clase II también se han descripto varios factores que se unen a los elementos regulatorios llamados secuencia X y secuencia Y. Las secuencias X e Y se ubican en posiciones -95 a -108 y -63 a -74, respectivamente, para el gen HLA-DRα (como se mencionó anteriormente). Para el gen clase II murino $E\alpha^k$ se ha observado, en ensayos de retardo en geles, que existe un factor proteico (proveniente de extractos nucleares de macrófagos peritoneales de ratones transgénicos) que se une a la secuencia Y. Esta secuencia contiene la llamada "CAAT-box", por lo que este factor (NF-Y) corresponderia al grupo de factores con unión a este tipo de secuencia (si bien se desconoce el rol de su unión en la expresión del gen $E\alpha^k$). También se ha observado unión de factores a la secuencia X de este gen en ensayos de retardo en geles (Dorn, 1987). Para el gen clase II murino IAβ se han observado factores de unión a la secuencia Y en ensayos de retardo en geles e inclusive se han purificado dos proteinas (34 kDa y

46 kDa) con propiedades de unión a partir de extractos de un linfoma B (Celada, 1989). Para el gen HLA-DQ2β se observó unión de factores a las secuencias X, Y y W (secuencia W en posición -142 a -127, también llamada Z) utilizando extractos nucleares de células Raji en ensayos de retardo en geles, ensayos de interferencia de metilación y mapeo por DNAsa I ("DNAsa footprinting"). Se sugirió en este caso que la secuencia W puede ser necesaria para la inducción por IFNγ ya que la misma contiene parte de la secuencia consenso "IFN-sensible" (Miwa, 1987).

Se ha descripto por estudios familiares que en el síndrome de inmunodeficiencia severa combinada (SCID), la falta de expresión de antígenos HLA-DR, DQ y DP es un defecto genético que no se segrega con los genes del MHC (de Préval, 1985). Recientemente se ha encontrado que el defecto genético reside en la falta de unión del factor RF-X a su secuencia regulatoria correspondiente (secuencia X), lo cual hace que no se expresen genes de MHC clase II. Esto fue observado usando el gen HLA-DRα y comparando extractos de líneas celulares B normales y provenientes de pacientes con SCID en ensayos de retardo en geles, interferencia de metilación y mapeo por DNAsa I (Reith, 1988). Se comprobó así la falta de unión del factor RF-X a su secuencia correspondiente en pacientes con SCID. También se ha clonado un cDNA para el factor RF-X a partir de linfocitos B normales. Con este cDNA se observó, sin embargo, que los pacientes con SCID presentan mRNA para el factor RF-X que coincide en cantidad y longitud con el presente en individuos normales (Reith, 1989). Esto indica que debe existir alguna mutación en el factor RF-X de pacientes con SCID que afecta la afinidad de dicho factor para unirse a la secuencia X

Se ha observado también unión de factores proteicos a secuencias regulatorias de otros genes cuya expresión aumenta por tratamiento con IFN, como 2'-5' oligoA sintetasa. Para este gen el IFNα induce en células COS un factor nuclear que se une en ensayos de retardo en geles, a un fragmento de 40 pb (-113 a -74) que contiene la región "IFN-sensible" (Rutherford, 1988).

Existe además otro nivel de regulación, constituido a nivel de la cromatina. Se ha descripto que existen en la cromatina sitios hipersensibles a DNAsa I, que generalmente se ubican en secuencias regulatorias como "TATA-box" y "enhancers" (Gross, 1988, Elgin, 1988). Los sitios hipersensibles a DNAsa I en general se localizan en regiones de la cromatina donde no existen nucleosomas, y es aceptado que en esos lugares se produce la interacción de factores proteicos con secuencias regulatorias. Se han detectado sitios de hipersensibilidad a DNAsa I en el promotor del gen H_2D^k, 5 en total

para células que normalmente expresan este gen, 2 de los cuales dejan de observarse al realizar ensayos en células que no lo expresan (Maschek, 1989, Maschek, 1989 [1]). Se ha reportado también que existe inducción de sitios hipersensibles a DNAsa I para el gen IP10 como efecto del tratamiento con IFNγ (Pine, 1989). Estos hechos sugieren que existiría también regulación de la expresión de los genes del MHC por efecto de la estructura de la cromatina en diferentes tipos celulares.

3. Acción del IFN:

Los interferones (IFNs) son una familia de proteinas secretadas por las células eucarióticas que se catacterizan por su habilidad para promover un estado de defensa contra la infección viral y por su carácter de inmunomoduladores. Los IFNs son sintetizados y secretados como respuesta a estímulos específicos y su acción biológica se inicia por unión a sus receptores, seguido de modulación de la expresión de varios mRNAs y proteinas (Faltynek, 1988).

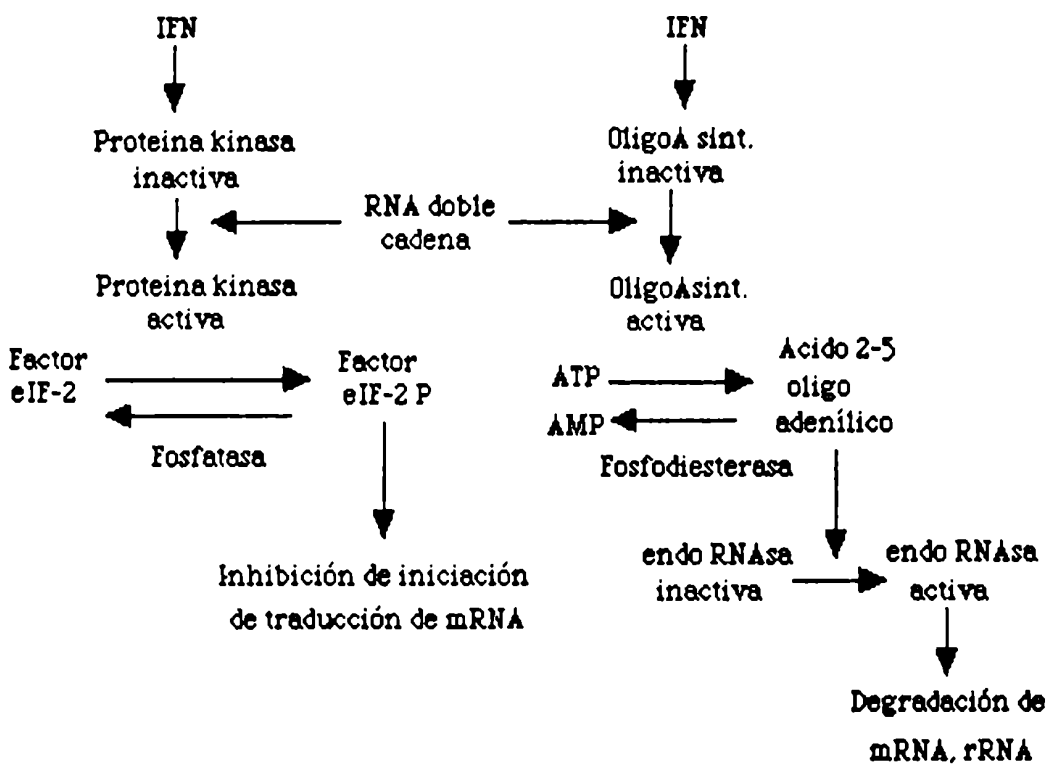
Existen 3 tipos de IFN: IFNα (leucocitario), IFNβ (fibroblástico) e IFNγ (inmune), los cuales se hallan presentes en todas las especies de mamíferos estudiadas (Pestka, 1987). El IFNα está constituido por una familia de proteinas de estructura muy relacionada, se cree que el número de especies puede ir de 10 a 16. Estas proteinas poseen de 165 a 166 aminoácidos y sus secuencias presentan un 70% de homologia entre las distintas especies. Se hallan codificados en 23 loci diferentes, y ninguna de las secuencias estudiadas presenta intrones. El IFNβ está constituido por una sola glicoproteina de 166 aminoácidos que se halla codificada el el cromosoma 9 humano. Su secuencia tampoco contiene intrones y presenta un 29% de homologia con el IFNα. El IFNγ está constituido por una sola glicoproteina de 146 aminoácidos, codificada en el cromosoma 12 humano. Contiene 3 intrones y no presenta homologia con IFNα o IFNβ.

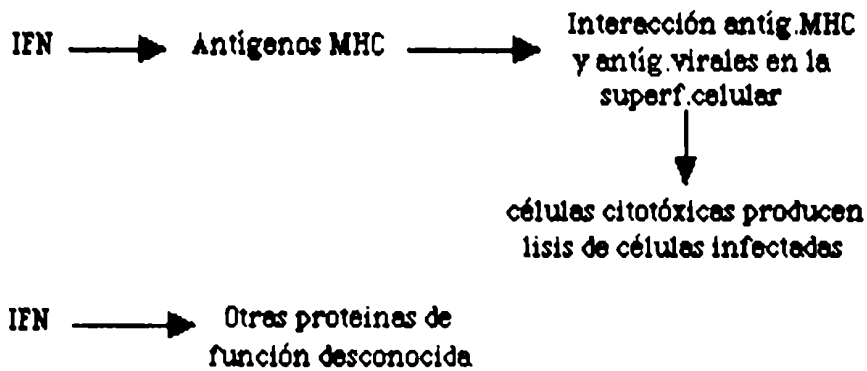
El IFNα y el IFNβ comparten el mismo receptor celular. Este receptor es una glicoproteina de peso molecular aproximado 130.000 Da, codificada en el cromosoma 21 humano. El IFNγ utiliza otro receptor, el cual se supone que es un heterodímero de peso molecular aproximado de 95 a 110 kDa. Aparentemente se hallaría codificado en los cromosomas 6 y 21 humanos. La característica de especificidad de especie de los 3 tipos de IFN reside en la interacción con sus receptores (Pestka, 1987, Langer, 1988).

Efectos biológicos del IFN:

La primera actividad que se descubrió para el IFN fue su efecto antiviral, de allí derivó su nombre (por producir interferencia con la replicación de varios virus, Isaacs, 1957). Esta actividad es la que se utiliza para definir la unidad de actividad del IFN (Pestka, 1981, Pestka, 1986). Además de este efecto, el IFN influye sobre el crecimiento y motilidad celular, estimula la actividad citotóxica de linfocitos y macrófagos, afecta la expresión de antígenos en la membrana celular, influye en la diferenciación celular y aumenta la expresión de algunos antígenos asociados a tumores.

Bioquímicamente, el IFN induce varias enzimas que juegan roles importantes en la síntesis y degradación de macromoléculas virales y celulares. Observamos un esquema de los mecanismos involucrados:





Esquema 5

Las enzimas 2'-5'oligoA sintetasa y proteina kinasa de eIF-2α son ambas inducidas por IFN, y requieren la presencia de RNA doble cadena para activarse. La enzima 2'-5'oligoA sintetasa cataliza la síntesis de oligonucleótidos de estructura $ppp(A2'p)_nA$. La inducción de esta enzima por IFN ocurre a nivel transcripcional, con una cinética similar a la observada para el aumento a nivel enzimático (Pestka, 1987). Los oligonucleótidos de estructura $ppp(A2'p)_nA$ activan una endorribonucleasa que está presente en las células en forma inactiva. Esta endorribonucleasa (llamada RNAsa L o RNAsa F) cataliza el clivaje de RNA viral y celular, y su nivel latente no varía significativamente por tratamiento de células con IFN. Paralelamente a la inducción y activación de 2'-5'oligoA sintetasa, se activa un sistema formado por una proteina kinasa/fosfoproteina fosfatasa que regula el nivel de fosforilación de P1 (proteina asociada a ribosomas) y eIF-2α (subunidad pequeña del factor iniciador de la síntesis de proteina eIF-2). La fosforilación de P1 y eIF-2α produce la inhibición de la traducción de los mRNAs virales y celulares. Esta proteina kinasa se halla asociada al factor P1, se piensa que el factor P1 poseería en si mismo la actividad kinasa dependiente de RNA doble cadena. La síntesis del factor P1 es inducida por IFN (Pestka, 1987). Estos 2 sistemas enzimáticos inducidos por el IFN y activados por RNA doble cadena producen de esta forma un estado de protección de la célula contra la proliferación viral.

Existe también inducción de otras proteinas celulares, como antígenos del MHC, metalotioneina II, timosina B4, proteina Mx, proteina de 54 kDa y proteina de 15kDa (estas 2 últimas de función desconocida).

Inducción de antígenos del MHC:

Entre la proteinas mejor caracterizadas inducidas por IFN, en forma independiente de RNA doble cadena, se encuentran los antígenos del MHC clase I (junto con β2-microglobulina) y clase II. El IFNα, IFNβ e IFNγ inducen la expresión de antígenos clase I humanos (HLA-A, B, C) y de ratón (H_2) en una gran variedad de tipos celulares diferentes (Burrone, 1982, Basham, 1982, Wallach, 1982, Fellous, 1982, Yoshie, 1982, Yoshie, 1984). La expresión de β2-microglobulina también se ve incrementada en correlación con el aumento de antígenos clase I (Pestka, 1987). Los antígenos clase II humanos HLA-DR, DP y DQ e Ia murinos son inducidos por IFNγ (Rosa, 1984, Revel, 1986, Pestka, 1987).La expresión aumentada de antígenos del MHC clase I contribuye a la acción antiviral del IFN, favoreciendo la muerte de las células infectadas con virus por acumulación de complejos antígeno viral-antígeno de MHC, que es reconocido por linfocitos T citotóxicos (Revel, 1986). Esto es, al aumentar la cantidad de antígenos clase I en la membrana celular existe mayor probabilidad de formación de complejos antígeno de MHC-antígeno viral, lo cual lleva a que la célula infectada sea más "visible" para los linfocitos T citotóxicos. En el caso de antígenos de MHC clase II, el hecho de aumentar su expresión en macrofagos, células de Langerhans y células endoteliales tiene efectos inmunorregulatorios, ya que las hace más "visibles" para los linfocitos T inductores y de esta manera cumplirian más eficazmente su función de presentadoras de antígenos (Trinchieri, 1985).

Se conoce también la cinética de inducción de mRNA para varios genes cuya expresión aumenta por efecto de IFN. La velocidad de transcripción llega a un máximo luego de 60' de inducción para la mayoría de los genes inducibles y comienza a caer a las 4 hs., llegando al nivel basal a las 8-12 hs. Los mRNA inducidos son estables y se acumulan linealmente durante 24 hs., luego de lo cual permanecen en altos niveles (Friedman, 1984)

En cuanto al mecanismo por el cual el IFN aumenta la transcripción de los genes del MHC, se ha discutido en secciones precedentes que los genes inducidos presentan una secuencia necesaria para la inducción llamada secuencia "IFN-sensible". Sobre esta secuencia y otras descriptas anteriormente se unen factores que serían inducidos o activados por IFN, produciendo activación de la transcripción. Poco se conoce respecto de los pasos intermedios que ocurren en la célula desde que el IFN se une a su receptor y sufre endocitosis hasta la unión de factores específicos a las secuencias descriptas. Se ha sugerido un rol de intermediario en la transmición de la señal para la proteina kinasa C (PKC) (Faltynek, 1988). Se ha demostrado que los ésteres de forbol (activadores

fisiológicos de la PKC) pueden inducir los mismos antígenos de diferenciación que el IFNα en células Daudi (Exley, 1987). Además se ha demostrado que el tratamiento con IFNγ de la línea humana U937 (premonocítica) causa una rápida translocación de PKC desde el citoplasma a la membrana plasmática, y que esta activación de PKC se requiere para aumentar la trancripción de algunos genes inducidos por IFN (Fan, 1988). Más aún, se ha descripto para la línea celular Molt4 y mutantes YHHH (de alta expresión de HLA como respuesta al tratamiento con IFNα, sistema que se estudia en esta Tesis), que el pretratamiento con ésteres de forbol de células Molt4 previo al tratamiento con IFNα reproduce el fenotipo de alta respuesta de células YHHH (Erusalimsky, 1989). Estos hechos sugieren un rol para la PKC en el mecanismo de acción del IFN, si bien no se conocen por ahora los detalles moleculares del proceso.

Células Molt4 y mutantes YHHH

El control de la expresión de los genes de HLA inducidos por IFNα se estudia utilizando la línea celular tipo T Molt4 (Minowada, 1972) y una mutante de alta expresión de HLA como respuesta al IFNα, derivada de Molt4, llamada YHHH (Burrone, 1985). Las características de estas 2 líneas celulares son las siguientes:

Molt4: Línea celular linfoidea tipo T, que aumenta la expresión de antígenos HLA en su membrana como respuesta al tratamiento con IFNα (Burrone, 1982). El aumento en la expresión de HLA puede ser visualizado con el anticuerpo monoclonal W6/32 (reconoce todos los alelos de los loci A, B y C, Barnstable, 1978), comienza a las 10 hs. de tratamiento con 2000 U/ml de IFNα, alcanza un nivel de 2 a 3 veces respecto del basal a las 48 hs. y llega a su nivel máximo a los 6 días con un aumento de 8 a 10 veces respecto del basal. Este aumento en la expresión de antígenos HLA se ve reflejado en un aumento de mRNA proveniente de genes de HLA, que puede detectarse por hibridización utilizando sondas correspondientes a antígenos HLA (por ejemplo p001, reconoce genes HLA-A, B, C, Mc Michael, 1979). El aumento en la expresión de HLA es además un fenómeno reversible, ya que luego de algunos días de suspendido el tratamiento con IFNα, el nivel de expresión de HLA vuelve a ser el basal. Serotípicamente, las células Molt4 presentan expresión de HLA-A1 y débilmente CW2, al recibir una estimulación de 2000 U/ml durante 48 hs. presentan HLA-A1, A10, B17 y B18 (Burrone, 1985, Girdlestone, 1988). Esto indica que el aumento en la expresión de HLA como respuesta a la estimulación con IFNα se debe, además del aumento de HLA-A, a la aparición de antígenos HLA-B en la

membrana celular. Cabe mencionar además que el tratamiento de las células Molt4 con dosis de IFNα de hasta 10.000 U/ml casi no tiene efecto sobre el crecimiento celular.

La línea Molt4 presenta además un fenotipo inusual, ya que junto a un bajo nivel basal de expresión de HLA, respecto de timocitos normales, presenta expresión del antígeno HTA-1 o CD1(definido por el anticuerpo monoclonal NA1-34, Mc Michael, 1979) que es característico de un estadio de diferenciación inmaduro para timocitos (Martin, 1986). La expresión de este antígeno no está ligada a la expresión de HLA y no aumenta por estimulación con IFNα. La línea Molt4 presenta también expresión del antígeno leucocitario reconocido por el anticuerpo monoclonal YD1/23 y dicha expresión tampoco se ve aumentada por el tratamiento con IFNα (Burrone, 1982). Estos hechos indican que el aumento en expresión de HLA por efecto del IFNα en células Molt4 no es un efecto general sobre antígenos de membrana, sino que se trata de un fenómeno específico para genes de HLA y aquellos que presenten inducción por IFN.

<u>YHHH</u>: Línea celular linfoidea tipo T derivada de Molt4 que presenta expresión aumentada de antígenos HLA (respecto de Molt4) como respuesta al tratamiento con IFNα. La línea celular YHHH fue derivada de Molt4 de la siguiente forma (Burrone, 1985): A partir de células Molt4 estimuladas por 24 hs. con 2.000 U/ml de IFNα, se separó utilizando el anticuerpo monoclonal YTH/76 (reconoce una subpoblación de antígenos HLA, muy probablemente HLA-B, Burrone, 1985) y un separador de células activado por fluorescencia ("fluorescence-activated cell sorter" o "FACS"), la polación de células de mayor expresión. Esta selección fue repetida varias veces y fue clonada la línea YH. Sobre ella se observó una respuesta incrementada 6 veces, respecto de Molt4, en expresión de antígenos reconocidos por YT/76 inducidos por 2000 U/ml de IFNα. La línea YH fue estimulada por 48 hs. con dosis menores de IFNα, esto es, 50 U/ml, y se volvió a separar la población de mayor expresión de HLA. Esta selección fue repetida varias veces y fue clonada la línea YHH. Sobre esta línea se repitió el procedimiento con dosis de IFNα de 10 U/ml. A partir de esta última selección se aisló nuevamente la población de mayor respuesta, la misma fue clonada y recibió el nombre de línea YHHH. Las células YHHH presentan una exquisita sensibilidad al IFNα, ya que una estimulación de 100 U/ml durante 48 hs. produce un aumento en expresión de HLA de 27 veces respecto del nivel basal (para visualizar en Molt4 un aumento de 2 a 3 veces debe usarse una dosis de 2.000 U/ml de IFNα durante 48 hs). Por análisis mediante la técnica de Southern del DNA de diferentes mutantes de alta expresión, usando una sonda que reconoce genes HLA-A, B, C (p001), no se encontró ninguna evidencia de amplificación genética de los genes de HLA (Burrone, 1985). Además, el nivel constitutivo de expresión

de antígenos HLA en mutantes YHHH no varía significativamente respecto de Molt4. Al igual que las células Molt4, las mutantes YHHH no presentan alteraciones en su crecimiento como consecuencia del tratamiento con IFNα.

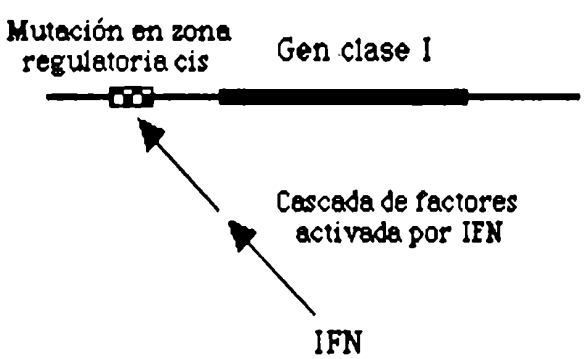
Por análisis serotípico se observó que las mutantes YH presentan en su membrana HLA-A1, y al recibir estimulación con IFNα presentan HLA-A1, A25 (una de las especificidades en que se divide A10), B17, B18 (HLA-B17 y B18 aún con mayor intensidad que células Molt4 estimuladas) y CW2. Este es el caso también para las mutantes YHH (Burrone, 1985) e YHHH (Girdlestone, 1988). La expresión aumentada de antígenos HLA como respuesta al tratamiento con IFNα en células YHHH se debe principalmente a un aumento de antígenos HLA-B, hecho que fue observado estudiando el mRNA de células Molt4 e YHHH inducidas con IFNα con sondas específicas para genes HLA-A y HLA-B en ensayos de protección a nucleasa S1 (el aumento de expresión de HLA se debe al aumento en HLA-A y HLA-B, pero el aumento de mRNA para HLA-B es mayor en ambos tipos celulares, Girdlestone, 1988).

Las características observadas en las células Molt4 y mutantes YHHH indican que existe en las mutantes alguna alteración en el control de la expresión de los genes de HLA inducidos por IFNα (o sea son mutantes de tipo regulatorio). Esta alteración es la responsable del fenotipo de alta respuesta en expresión de HLA frente a una estimulación con IFNα. En este trabajo se tratará de investigar cual es el mecanismo responsable de la alta respuesta al IFNα de las mutantes YHHH.

Objetivos. Hipótesis de trabajo

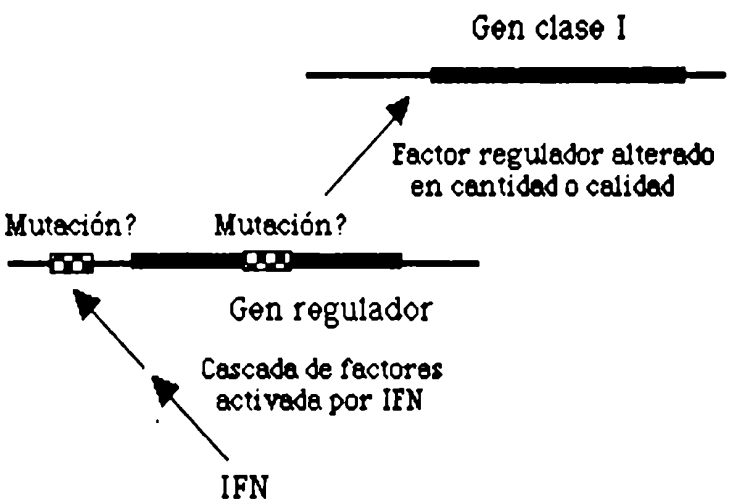
El objetivo del presente trabajo es caracterizar la mutación responsable del fenotipo de alta respuesta en la expresión de genes de HLA clase I en mutantes YHHH, respecto de las células parentales Molt4, frente a una estimulación con IFNα. Caracterizar dicha mutación permitirá conocer un poco más acerca de los mecanismos moleculares por los cuales el IFNα produce un aumento de expresión de los antígenos de HLA clase I en varias células del organismo. Las células YHHH presentan el fenotipo particular de expresar en su membrana niveles de HLA 30 veces superior al basal cuando reciben una estimulación de 200 U/ml de IFNα durante 48 hs. Para visualizar en células Molt4 un incremento de 2 a 3 veces en la expresión de HLA debe usarse una dosis de 2000 U/ml de IFNα durante 48 hs. (Burrone, 1985). Las células YHHH no presentan amplificación de los genes que codifican para HLA, lo cual indica que existe algún mecanismo regulatorio de la expresión de HLA inducida por IFNα que se encuentra alterado en las células YHHH. Para tratar de estudiar cual es el fenómeno responsable de las diferencias de expresión de HLA ante estimulación con IFNα se han planteado las siguientes hipótesis de trabajo:

1. La existencia en células YHHH de una mutación asociada directamente con el o los loci de genes de HLA clase I. Si esta mutación existiera en la zona de los promotores (o regiones próximas) de los genes de HLA sensibles a IFNα favorecería la acción de la RNA polimerasa II y aumentaría la transcripción de los mismos.



Según este esquema la mutación responsable del fenotipo de alta respuesta observado en mutantes YHHH frente a la estimulación con IFNα se localizaría en regiones regulatorias adyacentes a los genes de HLA cuya expresión se encuentra aumentada.

2. La existencia en células YHHH de una mutación asociada con algún gen regulador de la expresión de HLA clase I inducida por IFNα y que sea responsable del fenotipo de alta respuesta observado.



En este caso la mutación responsable del fenotipo de alta respuesta se encontraría en algún gen regulador de la expresión, ubicado en trans respecto de los genes cuya expresión se encuentra aumentada. Si este fuera el caso, al introducir genes exógenos provistos de promotores sensibles a IFNα en células Molt4 y mutantes YHHH, se podría diferenciar la expresión de este gen testigo entre ambos tipos celulares al recibir una estimulación con IFNα. Si en cambio la hipótesis 1 fuera correcta, las diferencias mencionadas no podrían observarse, pues la característica de alta expresión de mutantes YHHH sería una propiedad restringida a los promotores de genes de HLA cuya expresión se encuentra aumentada o a alguna región regulatoria general que actue en cis respecto de dichos genes.

Se ha encarado el estudio de ambas hipótesis, utilizando 2 tipos de estrategias diferentes:

A. En primer lugar se realizó un estudio de genes de HLA clase I de células YHHH, orientado a investigar la hipótesis 1. Este estudio incluyó: mapeo por la técnica de Southern del DNA genomico de células Molt4 y mutantes YHHH, clonado de genes HLA-B a partir de células YHHH y análisis estructural y funcional de un gen HLA clase I obtenido mediante dicho clonado (gen Y2). Parte de estos estos estudios se incluyen en la sección 2."Estudio de los genes de HLA clase I en células Molt4 y mutantes YHHH". Hubiera resultado de interés también obtener genes de HLA-B a partir de células Molt4, para realizar comparaciones con el gen clonado a partir de células YHHH, pero esto no se llevó a cabo en este trabajo. La estrategia abordada se orientó además a caracterizar con mayor presición el serotipo expresado por las células YHHH, ya sea a través de transfecciones del gen clonado en otras líneas celulares y detección de la proteina codificada con anticuerpos específicos o secuenciación de dicho gen. Los genes HLA-B expresados en células Molt4 y mutantes YHHH presentan además la característica particular de no expresarse en ausencia de estimulación con IFNα, lo cual agrega otro motivo de interes para su estudio. El hecho de obtener un gen de HLA clase I proveniente de células YHHH provee también un modelo homólogo para el estudio de la mutación responsable del fenotipo de alta respuesta en células YHHH a través de transfecciones con promotores sensibles a IFNα (ver item "B").

B. Estudio de actividad de promotores sensibles a IFNα introducidos por transfección en células Molt4 y mutantes YHHH, sin y con estimulación de IFNα. Este tipo de estrategia estuvo orientada a investigar la hipótesis 2, y a permitir la visualización de los efectos de algún factor regulador de acción en trans con actividad diferencial en células YHHH respecto de células Molt4. Estos estudios se incluyen en la sección 3."Estudio de células Molt4 y mutantes YHHH por ensayos de transfección con promotores sensibles a IFNα".

Materiales y métodos

Cultivo de celulas

Los cultivos celulares fueron realizados en medio escencial modificado de Dulbecco (D-MEM), suplementado con 5% de suero fetal bovino (células Molt4 e YHHH), 10% de suero fetal bovino (células Ltk⁻ y J26) o 10% de suero de carnero neonato (células NIH3T3). En todos los casos se suplementó ademas el medio con 4 mM glutamina, 50 U/ml de penicilina y 50 μg/ml de estreptomicina. Se utilizó una cámara a 37°C con ambiente de 5% de CO_2. Para estimular células con IFN se utilizó NK-2 IFNα en el caso de células Molt4 y mutantes YHHH (gentilmente cedido por el Dr. D. Secher) e IFNα/β murino (Sigma) en el caso de células Ltk⁻

Inmunofluorescencia de superficie de células eucarióticas:

Se realizó incubando las células con el anticuerpo correspondiente durante 45' a 4°C. Las mismas se lavan luego con buffer fosfato salino (PBS)/5% de suero de carnero neonato y se incuban con un 2º anticuerpo marcado con fluoresceína durante 45' a 4°C. Se lavan nuevamente las células y se observan en un microscopio de epifluorescencia. En el caso de mutantes YHHH estimuladas durante 24 hs. con 200 U/ml de IFNα y utilizando el anticuerpo monoclonal YTH/76, la imagen de inmunofluorescencia que se observa es:

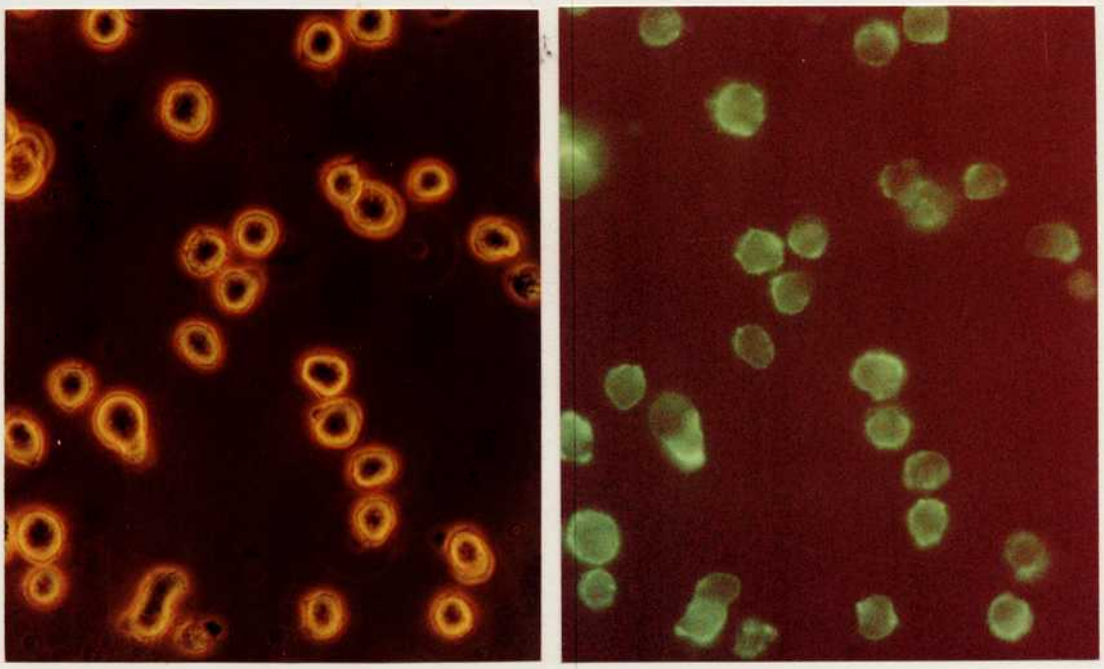


Figura I

Inmunofluorescencia de superficie de células YHHH estimuladas con 200 U/ml de IFNα durante 24hs. usando el anticuerpo YTH/76.

Transfecciones de celulas eucarioticas

1. Metodo de DEAE-dextrano Se disuelven 10µg de DNA del plásmido apropiado en 600 µl de una solucion de 300 µg/ml de DEAE-dextrano en buffer 25 mM Tris-Cl ph 7,4, 5 mM KCl, 0,7mM $CaCl_2$, 0,5 mM $MgCl_2$, 0,6 mM Na_2HPO_4 (TBS) Con esta solución se tratan 2.10^6 células durante 50' a temperatura ambiente Posteriormente se lavan 2 veces con buffer TBS y se resuspenden en un volumen adecuado de medio completo (Gorman, 1985). En el caso de plasmidos con baja actividad transcripcional (H_2K^bCAT) el protocolo fue modificado de la siguiente manera Se disuelven 100 µg del plásmido en el buffer anterior y se usa esta solucion para transfectar 20 10^6 células por ensayo.

2. Metodo de precipitacion del DNA con fosfato. Se disuelven 10 µg de DNA en 250 µl de una solucion 0,25 M $CaCl_2$ y se precipitan luego con 250 µl de buffer 50 mM Hepes ph 7,1, 280 mM NaCl 1 5 mM Na_2HPO_4 El precipitado formado se agrega gota a gota sobre el cultivo celular (P60) y luego de 24 hs se lava el mismo con buffer PBS El cultivo se incuba durante 24 hs mas en medio completo (Weber Benarous, 1987). En el caso de transfeccion estable comienza en este punto la selección con 1,2 mg/ml de G-418.

Preparación de extractos para medir actividad de CAT y βGAL:

Luego de 48 hs de transfectadas las células se lavan con buffer PBS y se resuspenden en 200 µl de buffer 0 25 M Tris-Cl ph 7.8, 5 mM EDTA. Se utiliza para lisarlas sonicacion con minitip, 3 pulsos de 10" a baja intensidad. Posteriormente se centrifugan durante 10' a 10 000 rpm El sobrenadante constituye el extracto para ensayar actividad de CAT y βgal. En el caso de células en monocapa luego de los lavados se cosechan con "rubber policeman" en buffer 40 mM Tris-Cl ph 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA y se resuspenden en 200 µl del buffer usado en el caso anterior (Weber Benarous, 1987). Como control de actividad enzimatica se utiliza un extracto crudo de E. coli (cepa MC 1061) transformadas con el plasmido pBR325 (confiere resistencia a cloramfenicol, Soberon, 1980) El extracto se prepara segun se describe en Shaw, 1975.

Ensayo de actividad de CAT

Se incuban 50 a 100 µl de extracto celular a 60°C durante 10' y posteriormente se inicia la reacción a 37°C por agregado de 15 µl de 5 mM acetil coenzima A y 2 5 µl ^{14}C-cloramfenicol (0 25 mCi) en buffer 0.25M Tris-Cl ph 7 8 (volumen final 160 µl). La reacción se deja transcurrir durante 2 hs con agregados periódicos de acetil coenzima A cada 45' y se detiene por agregado de 1 ml de acetato de etilo. Las distintas especies de ^{14}C-cloramfenicol (^{14}C-Cam, ^{14}C-1-Acet-Cam, ^{14}C-3-Acet.-Cam y ^{14}C-1,3diAcet.-Cam) se separan por cromatografia ascendente en capa delgada usando como solvente cloroformo-metanol 19 1. El resultado se revela por autorradiografia (Gorman, 1985). En algunos casos se mide radioactividad en contador de centelleo liquido y la actividad se expresa como porcentaje de ^{14}C-Cam acetilado (Isuma de todas las especies acetiladas/ ^{14}C-Cam total) 100) En todos los casos las reacciones se realizan utilizando cantidades equivalentes de proteinas en cada muestra (la medición se realiza por el método de Bradford).

Ensayo de actividad de βGAL

Se incuban 30 µl de extracto celular con 170 µl de buffer Z (0.06 M Na_2HPO_4, 0.4 M NaH_2PO_4, 0 01 M KCl 0.01 M $MgSO_4$ 0 05 M βME ph 7) conteniendo 0,9 mg/ml de O-nitrofenil-β-D-galactosido (ONPG) durante 18 hs Se detiene la reacción con 100 µl de 1 M Na_2CO_3 y se mide la D O a 420 nm (Kimura, 1986)

Obtencion de DNA genomico de celulas eucarioticas

Células lavadas con PBS (10^6) se lisan con 0.5 ml de buffer 10 mM Tris-Cl ph 8, 35 mg/ml acetato de Li 1 mM EDTA ph 8, 2% SDS Se realiza luego tratamiento con proteinasa K, extraccion fenólica y digestión con RNAsa libre de DNAsa. Finalmente se dializa la muestra contra 8 l de buffer 10 mM NaCl, 1 mM EDTA ph 8 a 4°C. Se determina la concentracion de DNA obtenido por medida de D O a 260 nm (se obtienen aprox. 200 µg de DNA)

Extraccion de RNA total de celulas eucarioticas.

Células lavadas con PBS (10^6) se lisan con 400 µl de una solución 1,2% Nonidet-P40 en buffer 20 mM Tris-Cl ph 7.4 140 mM NaCl, 3 mM MgCl. Se separan los nucleos por centrifugacion a 10 000 rpm durante 2' y el sobrenadante se digiere con proteinasa K, 0.1% SDS, 5 mM EDTA ph 8 durante 30' a 37°C. Posteriormente se realiza extracción fenolica y precipitacion con etanol. El RNA obtenido se resuspende en 50 µl de agua.

Tecnica de Southern.

Se digieren 10 a 15 µg de DNA genomico o 1 a 2 µg de DNA plasmidico con enzimas de restriccion durante 12 a 16 hs Los productos de digestión se separan por electroforesis en gel de agarosa 0,7% durante 12 a 18 hs. utilizando 2,5 V/cm en buffer TBESA (90 mM Tris-Cl ph 8 90 mM acido borico, 20 mM EDTA, 20 mM acetato de Na). El gel se trata luego por 20' con 0.25 N ClH, por 50' con 0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl y por 45' con 0,5 M Tris-Cl ph 8 2.5 M NaCl Posteriormente se transfiere el DNA a papel de nitrocelulosa usando 20X SSC (3 M NaCl, 88.2 g/l citrato de Na) como solución de transferencia. El filtro se trata luego con calor seco de 80°C durante 2 hs Las hibridizaciones se realizan en solucion 5 X SET (0,75 M NaCl, 0.15 M Tris-Cl ph 8, 10 mM EDTA), 0,25% de leche descremada en polvo y la sonda correspondiente marcada con ^{32}P, durante 12 a 18 hs. a 65°C Se realizan luego 3 lavados sucesivos del filtro durante 30' a 65°C con las siguientes soluciones a) 0.3 M NaCl 0,06 M Tris-Cl ph 8, 4 mM EDTA, 0,5% SDS b) 0,15 M NaCl 0.03 M Tris-Cl ph 8 2 mM EDTA 0 1% SDS. c) 0.03 M NaCl, 6 mM Tris-Cl ph 8, 0,4 Mm EDTA. El resultado se revela por autorradiografia

Tecnica de Dot-blot de RNA celular

Las muestras de RNA se incuban con una solución de 20% formaldehido, 1M NaCl y 26.4 g/l citrato de Na durante 15 a 60°C Luego se adsorven las mismas sobre filtro de nitrocelulosa con ayuda de bomba de vacio y posteriormente se trata el filtro con calor seco de 80°C durante 2 hs La hibridizacion con sondas radioactivas se realiza segun se describe para la tecnica de Southern y el resultado se revela por autorradiografia

Preparación de DNA de plasmidos.

Se utiliza el metodo de Birboin y Doli, modificado según Maniatis (1982). Brevemente 400 ml de cultivo bacteriano saturado (crecimiento en medio L B con 100 µg/ml de ampicilina) se centrifugan 10' a 5 000 rpm y el pellet se resuspende en 9 ml de buffer de lisis (25 mM Tris-Cl ph 8 2 mM EDTA, 0.9% glucosa) con 10 mg/ml de lisozima. Se incuba durante 45 a 4°C y se agregan 10 ml de 0.2 N NaOH, 1% SDS. Luego de 5' a 4°C se agregan 5 ml de 3 M acetato de K ph 5.2 y se incuba durante 45' a 4°C. Se centrifuga durante 40' a 15 000 rpm y el sobrenadante se precipita con isopropanol. Se disuelve el DNA en 4 ml de agua y se agregan 4 g de CsCl y 0.2 ml de una solución 10 mg/ml de bromuro de etidio (la densidad obtenida debe ser 1 56-1.58 g/ml). Se centrifuga durante 18 hs a 45 000 rpm y se extrae la banda correspondiente a DNA plasmidico con una jeringa Se extrae el bromuro de etidio con una solucion de n-butanol saturado con agua

y se dializa la muestra contra 6 a 8 l de 10 mM Tris-Cl ph 8. 1 mM EDTA. El DNA obtenido se cuantifica por medida de D O a 260 nm En el caso de preparaciones de DNA de plasmidos usados para transfectar celulas por el metodo de DEAE-dextrano se realizan 2 gradientes de CsCl consecutivos

Las minipreparaciones de plasmidos de realizan usando escencialmente el mismo protocolo. variando simplemente los volúmenes de las soluciones empleadas: Se centrifugan 1.5 ml de cultivo bacteriano y se incuban en 100 µl de buffer de lisis. Luego se agregan 200 µl de solución de Na SDS y 150 µl de solución de acetato de K. El sobrenadante se extrae con fenol y Cl_3CH y se precipita con etanol

Transformaciones bacterianas

Se realizaron utilizando celulas competentes (cepas E. coli MC1061 y JM101) obtenidas segun el siguiente protocolo Se centrifugan 100 ml de cultivo bacteriano DO_{550}= 0.48 (medio de cultivo L B Maniatis. 1982) durante 5' a 4°C y 3 000 rpm Se resuspende el pellet en 40 ml de solucion TPb1 (30 mM acetato de K. 100 mM KCl. 10 mM $CaCl_2$. 50 mM $MnCl_2$. 15% glicerol ph 5.8). Luego de 5' a 4°C se centrifuga la suspencion 5' a 3 000 rpm y se resuspenden las celulas en 4 ml de solución TPb2 (10 mM Pipes ph 6.5. 75 mM $CaCl_2$ 10 mM KCl 15% glicerol) Luego de 5' a 4°C se toman alicuotas y se congelan en nitrógeno liquido La preparacion se mantiene a -70°C y puede utilizarse por un periodo de hasta 6 meses

Las transformaciones se realizan incubando 10 ng de DNA con 30-50 µl de celulas competentes durante 20' a 4°C Luego se realiza un shock de temperatura a 42 °C durante 1 y posteriomente se incuba 5 a 4°C Se dejan replicar las celulas durante 40' a 37°C con 200µl de medio L B y se plaquean en medio L B con 15 g/l de agar y 100 µg/ml de ampicilina En el caso de plasmidos derivados de pUC se agregan 10 µl de 100 mM IPTG (isopropil-tio-β-D galactósido) y 10 µl de 2% BCIG (5-Br. 4-Cl. 3-indolil-β-D galactósido) como colorantes bacterianos.

Infección con fago λgtWES

Se infectaron celulas E coli cepa Y1090 preparadas de la siguiente forma. 100 ml de cultivo saturado (medio L B con 0.2% de maltosa) se centrifugan durante 10' a 4 000 rpm y se resuspenden en 40 ml de 10 mM $MgSO_4$ Para la infeccion 100 µl de la preparacion anterior se incuban con 50-100 µl de preparación de fago durante 20' a 37°C La preparacion se plaquea usando 2.5 ml de medio L B. 10 mM $MgSO_4$. 0.7% agarosa. La placa se incuba 9-14 hs a 37°C (Maniatis. 1982)

Preparacion de DNA de fago λgtWES

Se utiliza el metodo de lisado de la placa (Maniatis. 1982). Brevemente Se infectan celulas E coli cepa Y1090 a saturacion y se plaquean segun se indicó anteriormente Se agregan 5 ml de solucion SM (5.8 g/l NaCl. 2 g/l $MgSO_4$ H_2O. 50 mM Tris-Cl ph 7.5) y se incuba a temperatura ambiente con agitacion durante 4 hs. Se centrifuga la solucion 10 a 8 000 rpm y se agrega al sobrenadante 1µg/ml de RNAsa A y 1 µg/ml de DNAsa I Se incuba 30 a 37°C y se precipita el DNA con 20% polietilenglicol. 2 M NaCl en solucion SM. Luego de 1 h a 4°C se centrifuga durante 40' a 10.000 rpm y se resuspenden las particulas de fago en 0.5 ml de solución SM. Se agrega SDS hasta 0.1% y EDTA hasta 5 mM y se incuba 15 a 65°C. Se realiza luego extracción fenólica y se precipita el DNA con etanol

Hibridizacion in situ de colonias bacterianas y placas de fago λ:

Se utiliza la tecnica de "Union de DNA liberado-Procedimiento I" (Maniatis, 1982) Brevemente Se adsorven las colonias bacterianas sobre filtro de nitrocelulosa y se tratan durante 3' con 10% SDS, luego por 5 con 0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl, y luego por 3' con 0,5 N Tris-Cl ph 8, 1,5 M NaCl Se repite el último tratamiento. Se tratan los filtros con calor seco de 80°C durante 2 hs y se hibridizan los filtros en las mismas condiciones que se describen para la tecnica de Southern. El mismo protocolo se utiliza para la hibridizacion in situ de placas de fago λ

Analisis de DNA por electroforesis en geles de agarosa y poliacrilamida.

Se analiza el DNA cortado por enzimas de restriccion en geles de agarosa (0,8% a 1,5% segun el caso) utilizando buffer TBE (90 mM Tris-Cl ph 8, 90 mM ácido borico, 20 mM EDTA) y cubas horizontales de 10 cm de largo El DNA se deja corer durante 45'-60' a 70 V y posteriormente se tiñe con 5 µl de una solucion 10 mg/ml de bromuro de etidio Las bandas de DNA se visualizan por iluminacion con luz U.V. En el caso de geles de poliacrilamida (5% a 8%) se utiliza el mismo buffer y cubas verticales de 20 cm El DNA se deja correr durante 1h a 40 mAmp Las bandas de DNA se visualizan por tincion con bromuro de etidio o en el caso de correr muestras radioactivas, el resultado se revela por autorradiografia

Purificacion de fragmentos de DNA a partir de geles de poliacrilamida o agarosa:

Se realiza por electroelusión (Maniatis, 1982), brevemente: La sección de gel conteniendo el fragmento de DNA de interes se coloca en bolsa de dialisis con buffer 0,5X TBE y se realiza electroforesis en cuba horizontal de 15 cm, durante 30' a 100 V. Se separa la solucion contenida en la bolsa de dialisis, se realiza extraccion fenolica y se precipita el DNA con etanol.

Marcacion de sondas con nucleótidos redioactivos

1 Tecnica de nick translation' Se incuban 50 a 100 ng de DNA con una mezcla de 0,1 mM dATP 0,1 mM dGTP, 0,1 mM dTTP 3 µl de α^{32}P-dCTP (3.000 Ci/mmol), 1 µl DNAsaI 0,1 µg/ml, 1 U DNA polimerasaI y 1 µl de buffer de "nick translation" comercial, durante 45' a 15°C La reacción se detiene por agregado de 40 µl de buffer TE (10 mM Tris-Cl ph 8, 1 mM EDTA) Los nucleotidos libres son separados en columnas de Sephadex G-50 usando TE como buffer de elusion (metodo de columna seca, Maniatis, 1982)

2 Tecnica de fill in' Se incuban 50 a 100 ng de DNA con una mezcla de nucleótidos (adecuados al sitio que se desee rellenar) en concentración 0,25 mM, 2 µl α^{32}P-dCTP (3.000 mCi/mmol), buffer de secuenciacion y 1 U de "DNA polimerasa-Klenow frgment , durante 15 a temperatura ambiente.

3 Marcado por elongación Se incuban 50 a 100 ng de DNA (clonado en el vector M13) con primer" universal, 0,25 mM dATP 0,25 mM dGTP, 0,25 mM dTTP, 2 µl α^{32}P-dATP (3.000 mCi/mmol) buffer de secuenciacion y 1 U de "DNA polimersa-Klenow fragment" El DNA se corta luego con una enzima de restricción adecuada y se purifica el fragmento marcado en gel de poliacrilamida 5%

Medicion de proteinas por el metodo de Bradford

Se incuban 2 a 10 µl de muestra con 1 ml de reactivo (100 mg/ml Coomasie Blue G-250 4,75% etanol 8,5% acido fosforico) durante 5 a temperatura ambiente Se mide D 0,595 y se determina la concentracion de proteinas por comparacion con una curva de 2 a 15 µg de albumina bovina

Resultados

Estudio de los genes de HLA clase I en células Molt4 y mutantes YHHH

Estudio por la técnica de Southern del DNA de células Molt4 y mutantes YHHH

El mapeo pór la técnica de Southern del DNA genómico de células Molt4 y mutantes YHHH se realizó con el objeto de clonar genes HLA clase I pertenecientes al locus B, por ser aquellos que presentan un aumento muy significativo en su expresión frente al tratamiento con IFNα. Esta afirmación se basa en 3 hechos que fueron discutidos previamente en la sección I. "Introducción" Brevemente, A) Se observa que las células Molt4 y mutantes YHHH no presentan expresión en su membrana de antigenos HLA-B hasta recibir una estimulación de IFNα. B) Las mutantes YHHH fueron seleccionadas utilizando el anticuerpo monoclonal YTH/76, el cual reconoce antigenos HLA-B (si bien no se descarta que pueda reconocer otros antigenos, aunque no reconoce HLA-A, Burrone, 1985). C) Se confirmo posteriormente, analizando el mRNA de células Molt4 y mutantes YHHH inducidas con IFNα con sondas específicas para genes HLA-A y HLA-B, que las células YHHH son mutantes de alta expresión de genes HLA-A y HLA-B frente a la estimulación con IFNα, pero el aumento en expresión de HLA-B es mayor que el aumento de HLA-A (Girdlestone,1988).

Por otro lado, el mapeo de los genes de HLA por la técnica de Southern tuvo como objetivo construir una genoteca genómica parcial, lo cual simplifica mucho los pasos correspondientes al clonado respecto del caso de construir una genoteca completa.

El mapeo se realizo principalmente usando DNA de células Molt4, ya que el patrón que presenta el DNA de células YHHH en este tipo de estudio es idéntico al de Molt4 (Burrone, 1985) También se realizaron comparaciones usando DNA de individuos previamente tipificados serológicamente como B17 y B18, que resulta el fenotipo expresado por células Molt4 y mutantes YHHH al recibir estimulación con IFNα. Las enzimas utilizadas para este estudio fueron Hind III, Bgl II, Kpn I y Eco RI, solas o en combinaciones de ellas. Las hibridizaciones fueron realizadas con diferentes sondas correspondientes a genes de HLA, algunas construidas en el laboratorio. La descripción detallada de dichas construcciones se encuentra en la seccion 4. "Plásmidos utilizados". Brevemente las sondas utilizadas fueron

p001: Corresponde a un clon de cDNA del gen HLA-B7 de 1400 pb que comprende toda la región codificante del mismo. (Sood, 1981). Presenta hibridización positiva con todos los genes HLA clase I (no discrimina especificidad HLA-A, B, C). Se utilizó para mapear genes de HLA sin discriminación de locus.

p001.5': Corresponde a un fragmento de 120 pb de la región 5' del dominio α1 del cDNA del gen HLA-B7 (se extiende desde un sitio Pst1 localizado al comienzo del dominio α1 hasta un sitio BglII que coincide con el aminoácido 64 del dominio α1). Se utilizó para mapear el extremo 5' de los genes de HLA.

pH5RN6: Corresponde a 1200 pb del extremo 5' no codificante del pseudogen HLA 12.4. Este clon se extiende desde un sitio EcoR1 (extremo 5') hasta un sitio Nar1 (extremo 3') que coincide con el ATG iniciador de la traducción (aproximadamente posiciones -1200 a +3, Malissen, 1982). Se desconoce si discrimina especificidad HLA-A,B,C. Se utilizó para mapear el extremo 5' de los genes de HLA.

pB3UT: Corresponde a 358 pb del extremo 3' no traducido del gen HLA-B8. La secuencia de esta sonda comienza a continuación del dominio citoplasmático del cDNA del cual fue aislada (Koller, 1984). Reconoce especificidad HLA-B. Se utilizó para mapear genes pertenecientes al locus B e identificar el extremo 3' de los mismos.

pBB1: Corresponde a una zona de 450 pb que codifica para el dominio α2 del pseudogen HLA 12.4 (posiciones +565 a +1024 respecto de ATG iniciador). No discrimina especificidad HLA-A,B,C. Se utilizó para mapear genes de HLA sin discriminación de locus.

Los resultados del mapeo por la técnica de Southern pueden observarse en las figuras 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7.

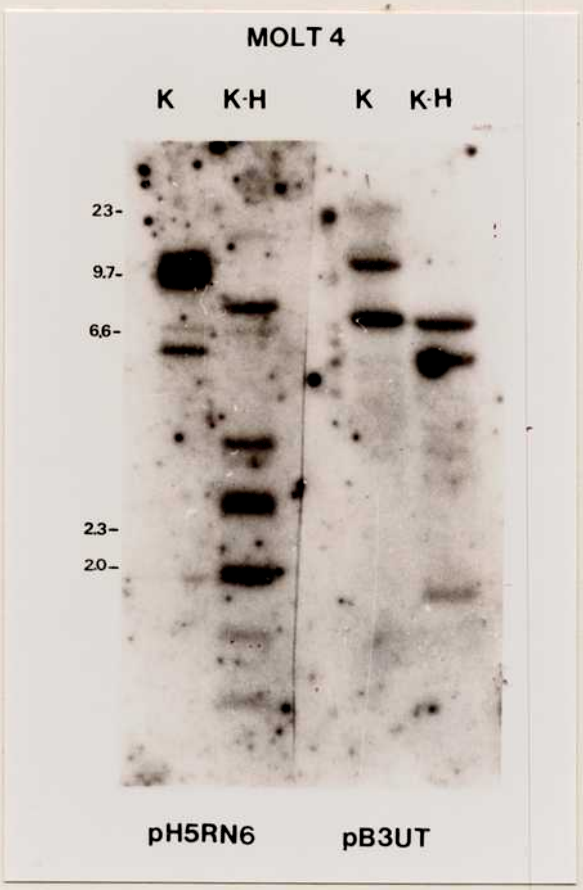
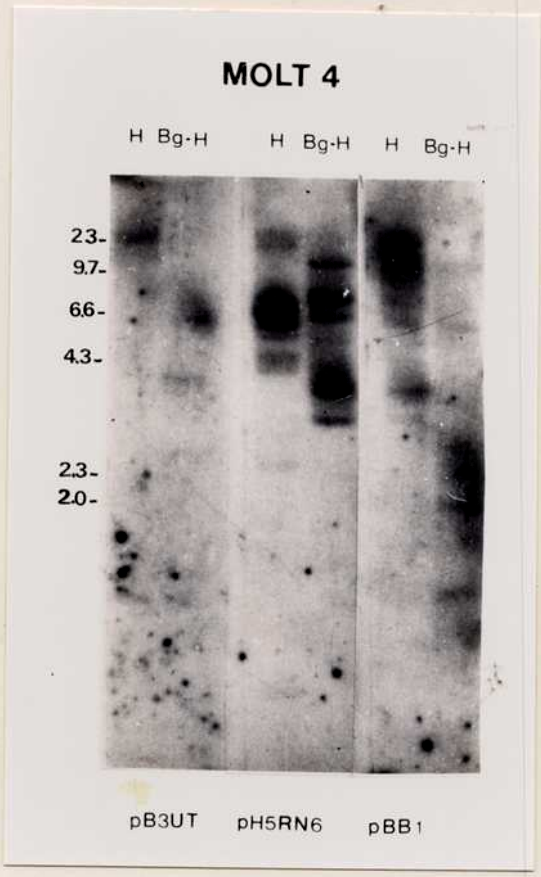


Figura 1

Figura 2

Figura 1 : "Southern" genómico usando DNA de células Molt4 (M4). K: Kpn1, K-H: Kpn1-HindIII. pH5RN6: sonda corresp. al extremo 5' de genes de HLA. pB3UT: sonda corresp. al extremo 3' de los genes de HLA. Los números indican Kb.

Figura 2: "Southern" genómico usando DNA de células Molt4 (M4). H: HindIII, Bg: BglII, Bg-H: BglII-HindIII. pH5RN6: sonda corresp. al extremo 5' de los genes de HLA. Los números indican Kb.



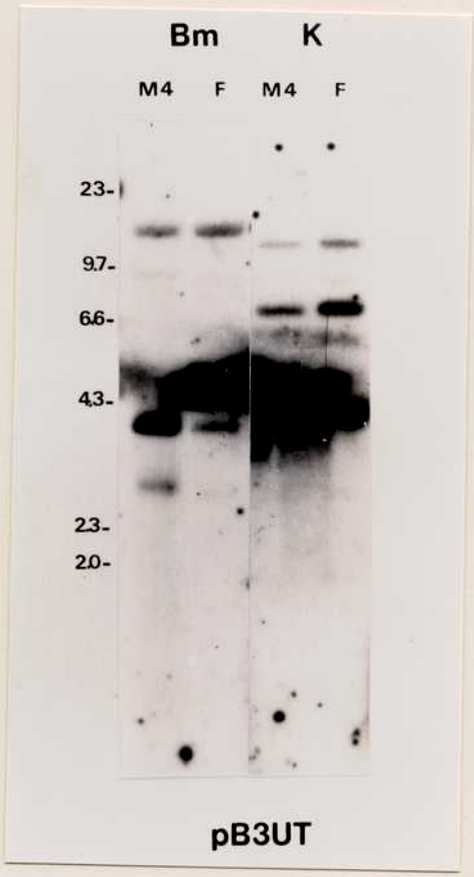


Figura 3

Figura 4

Figura 3: "Southern" genomico usando DNA de celulas Molt4 (M4). H: HindIII, Bg-H: BglII-HindIII. pH5RN6: sonda corresp. al extremo 5' de los genes de HLA. pB3UT: sonda corresp. al extremo 3' de los genes de HLA. pBB1: sonda corresp. al dominio α2 de los genes de HLA. Los numeros indican Kb.

Figura 4: "Southern" genómico usando DNA de celulas Molt4 (M4) y de individuo F (F). Bm: BamH1. K: Kpn1. pB3UT: sonda corresp. al extremo 3' de los genes de HLA. Los numeros indican Kb.

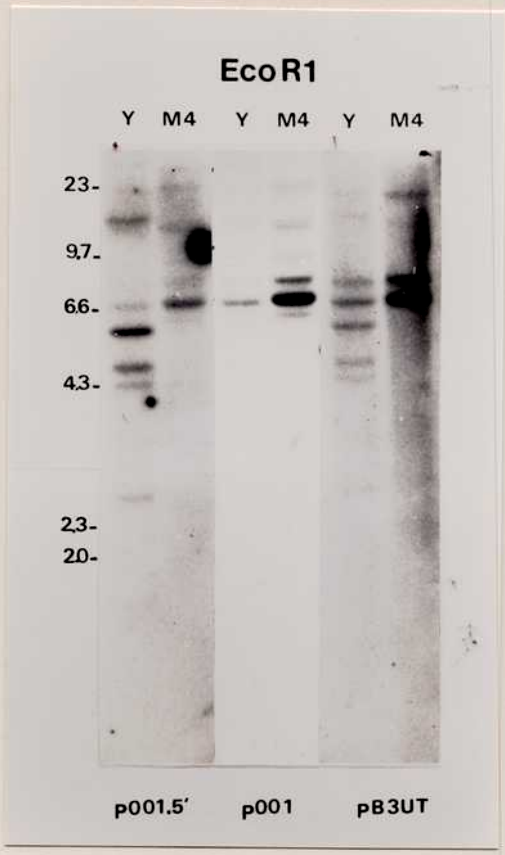


Figura 5

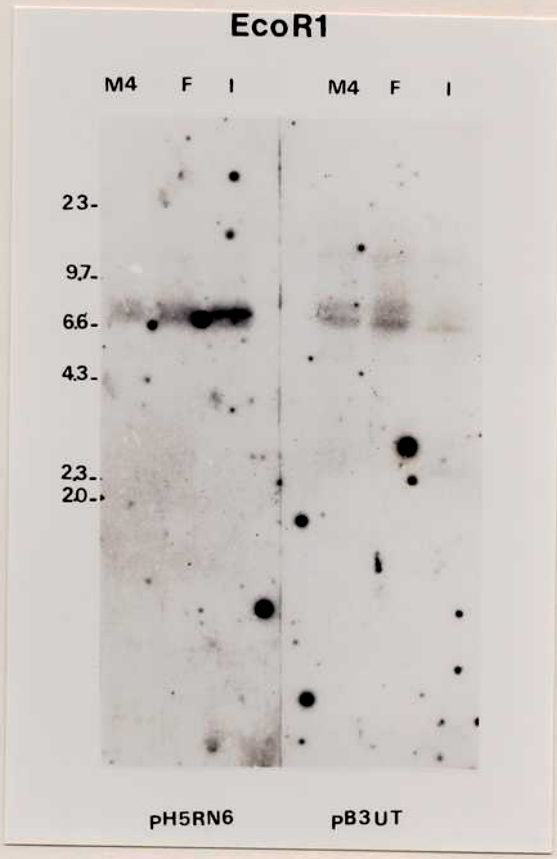


Figura 6

Figura 5: "Southern" genomico usando DNA de celulas Molt4 (M4) y mutantes YHHH (Y) con la enzima EcoR1. p001.5: sonda corresp. al extremo 5' de los genes de HLA. p001: sonda corresp. a un cDNA completo de HLA. pB3UT: sonda corresp. al extremo 3' de los genes de HLA. Los numeros indican Kb.

Figura 6: "Southern" genomico usando DNA de celulas Molt4 (M4), de individuo F (F) y de individuo I (I) con la enzima EcoR1. pH5RN6: sonda corresp. al extremo 5' de los genes de HLA. pB3UT: sonda corresp. al extremo 3' de los genes de HLA. Los numeros indican Kb.

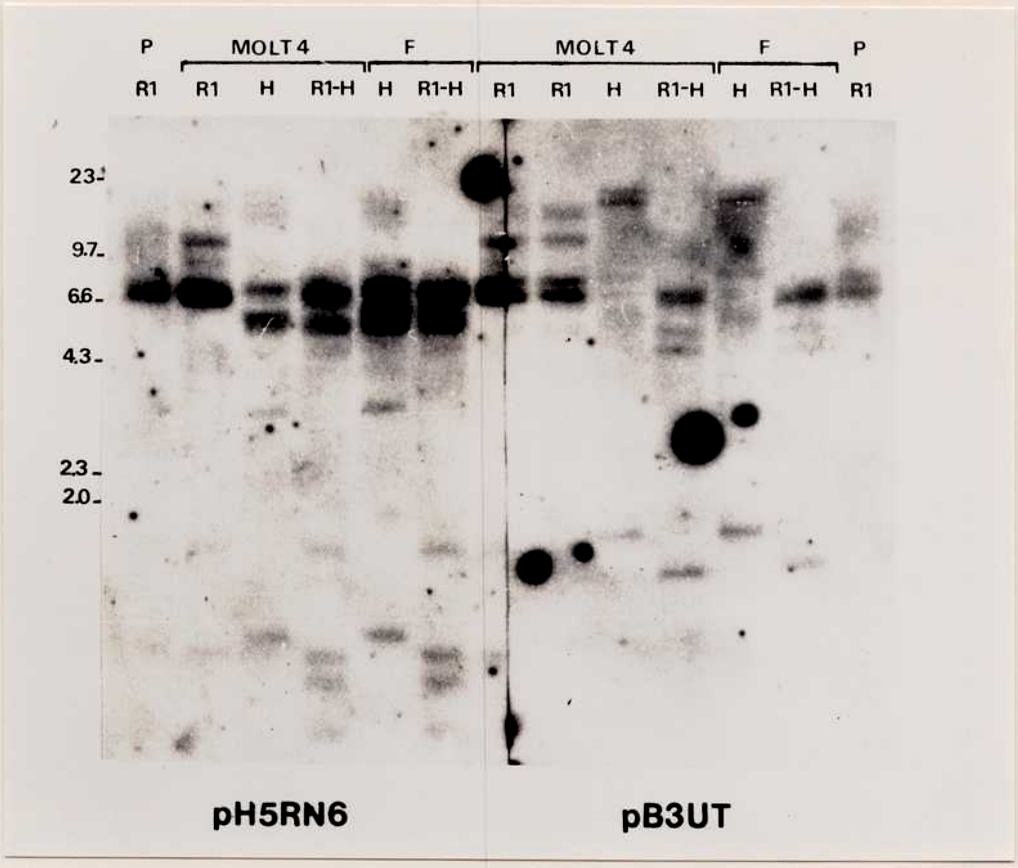


Figura 7

"Southern" genomico usando DNA de celulas Molt4 (M4), de individuo F (F) y de placenta (P). R1 EcoR1, H: HindIII, R1-H: EcoR1-HindIII pH5RN6 sonda corresp al extremo 5' de los genes de HLA. pB3UT sonda corresp al extremo 3' de los genes de HLA

El esquema seguido para la realización del análisis por la técnica de Southern fue ubicar los genes de HLA clase I en principio con las sondas disponibles en el laboratorio (H5RN6 y p001), y luego el análisis fue completado con las sondas pB3UT y p001.5', como criterio de reconocimiento de genes HLA-B (la sonda pB3UT es locus B especifica) y de mapeo de los extremos 3' y 5' de los genes de HLA.

Con las enzimas Hind III y Bgl II no pudieron observarse resultados convenientes para el objetivo buscado, ya que ninguna (o la combinación de ambas) produjo bandas que indicaran contener un gen completo de HLA de un tamaño adecuado para intentar un clonado (ver figuras 2, 3 y 7). La enzima Hind III produce fragmentos de 23 Kb (aproximadamente) que podrian contener genes de HLA completos (figuras 2, 3 y 7), pero se descarto su uso porque se consideró que 23 Kb es un tamaño poco apropiado para clonar y luego caracterizar fácilmente.

Con la enzima Kpn I se observó que el tamaño de los fragmentos obtenidos es aparentemente menor que con otras enzimas (figuras 1 y 3) y ademas dichos fragmentos no coinciden en tamaño al hibridizar con sondas correspondientes al extremo 5' (pH5RN6) y extremo 3' (pB3UT) (ver figura 1). Estas observaciones serían coincidentes con los datos publicados (Jordan, 1985), en el sentido de que existe generalmente un sitio interno muy conservado en los genes de HLA clase I para esta enzima (este sitio se ubica al comienzo del intrón que separa los exones correspondientes a los dominios α2 y α3).

Los resultados más importantes del mapeo por la técnica de Southern fueron obtenidos con la enzima Eco RI, se observa que produce fragmentos que se ubican entre 9,7 y 6,6 Kb. Dichos fragmentos hibridizan positivamente con la sonda pB3UT (figuras 5, 6 y 7) por lo que corresponderian a genes HLA-B. Por otro lado el DNA del individuo F, serologicamente HLA A1, A2, B38, BW57 (este último uno de los 2 alelos en que se subdivide la especificidad B17: BW57 y BW58) y el DNA del individuo I, serologicamente B17, producen el mismo tipo de bandas con Eco RI y la sonda pB3UT (figuras 6 y 7), lo cual indicaría que las bandas observadas entre 9.7 y 6,6 Kb corresponden a genes HLA-B. Sin embargo estas bandas se observan también al hibridizar DNA proveniente de placenta humana (figura 7), de manera que el analisis del DNA de los individuos F e I no aportó información muy relevante. Las mismas bandas hibridizan también con la sonda H5RN6 (que se utilizo como criterio para mapear el extremo 5' de los genes), lo cual indica que podrian contener genes completos. En esta última observación se hizo especial hincapie, para comprobar que las mismas bandas hibridizan con sondas correspondientes al extremo 5' (H5RN6) y al extremo 3' (pB3UT) de los genes de HLA. En la figura 7 se observa hibridización de la misma calle de DNA cortada longitudinalmente

(luego de la transferencia a papel de nitrocelulosa) con las sondas H5RN6 y pB3UT. Por otra parte el tamaño de los genes clonados de HLA es en general de aproximadamente 4 Kb, lo cual es un argumento más en favor de que las bandas observadas contuviesen genes completos de HLA.

Finalmente, el patrón de hibridización obtenido con DNA de mutantes YHHH es similar al obtenido con DNA de células Molt4, usando EcoR1 y las sondas p001.5', pB3UT y p001, segun se observa en la figura 5. Para el DNA de mutantes YHHH existen las mismas bandas que para el DNA de células Molt4, y además, se observan otras bandas de menor tamaño con las sondas p001.5' y pB3UT. Este "southern" ha sido realizado utilizando como sonda plásmido completo y no fragmentos aislados, por lo tanto es muy probable que las bandas de menor tamaño observadas para DNA de mutantes YHHH sean debidas a alguna contaminación, ya que solo se observan en el caso de plásmidos de tipo pUC (p001.5' y pB3UT) y no en el caso de pBR322 (p001). Ademas la sonda p001.5' se halla contenida en la sonda p001 (fue construida a partir de ésta última), por lo que las bandas de menor tamaño observadas corresponden sin duda a contaminación en el DNA de mutantes YHHH que hibridiza con alguna zona del vector pUC.

De acuerdo a los resultados obtenidos por el mapeo descripto, se decidió utilizar la enzima Eco RI para construir una genoteca en fagoλ y restringir el tamaño del DNA genómico a clonar a la zona comprendida entre 9,7 y 6,6 Kb. Este tipo de estrategia coincidió además con el descripto recientemente para el clonado de genes completos de HLA, donde se seleccionan fragmentos de DNA de 6 a 8 Kb producidos por Eco RI en gradientes de sacarosa y se construyen genotecas parciales en fagoλ (Parham, 1989).

Clonado de genes de HLA a partir de células YHHH

En base a las conclusiones obtenidas por mapeo del DNA genómico de células Molt4, se decidió clonar DNA de células YHHH digerido por Eco RI utilizando como vector fagoλgtWES. Se decidió realizar una genoteca restringida a fragmentos de DNA que se ubiquen entre 9,7 y 6,6 Kb, que es la zona donde aparecen las bandas identificadas como genes HLA-B. El hecho de construir una genoteca parcial y focalizada a una cierta region permitió que los pasos correspondientes al análisis de los clones recombinantes se realicen en forma relativamente sencilla, ya que el número de placas necesario para tener representados a los genes de interés se reduce al 10% de una genoteca completa.

Para construir la genoteca se digirió el DNA de células YHHH (100-150 μg aproximadamente) por Eco RI y el producto de la digestión se separó en gel de agarosa 7%. La región comprendida entre 9,7 y 6,6 Kb fue cortada del gel y el DNA purificado por electroelusión, tratamiento con proteinasa K y extracción fenólica. Con el material purificado de la manera descripta se realizó un clonado por sustitución usando brazos del fagoλgtWES cortados por Eco RI, ligando ambas preparaciones y usando extracto de empaquetamiento in vitro comercial Para el plaqueo de los fagos se usó E. coli cepa Y1090, con la cual se obtuvieron 30.000 placas Se realizó un análisis de las placas obtenidas por duplicado, usando el método de hibridización in situ del DNA, con 2 sondas que fueron utilizadas previamente para realizar el estudio por la técnica de Southern: p001 (hibridiza con todos los genes de HLA clase I) y pB3UT (presenta especificidad para genes HLA-B).

Se obtuvieron 3 clones positivos para la sonda p001 (clones Y1, Y2, Y7), 2 de los cuales resultaron positivos tambien para la sonda pB3UT (clones Y1 e Y2). Los estudios posteriores se realizaron exclusivamente con estos últimos 2 clones, que probablemente contendrían genes de HLA pertenecientes al locus B.

Como primer paso se realizó un estudio por la tecnica de Southern de los clones Y1 e Y2, comparandolos con DNA genomico de celulas YHHH para observar si la migracion relativa de dichos clones coincide con la de las bandas tomadas como objetivo de clonado al construir la genoteca Las enzimas utilizadas fueron Eco RI y Kpn I y la sonda fue pB3UT (extremo 3' no codificante del gen HLA-7). El resultado se observa en la figura 8.

Figura 8

"Southern" genómico usando DNA de mutantes YHHH y de los clones Y1 e Y2. R1: EcoR1. K: Kpn1. R1-K: EcoR1-Kpn1. pB3UT: sonda corresp. al extremo 3' de los genes de HLA. Los números indican Kb.

▸Banda principal en la calle correspondiente

Puede verse en la figura 8 que la migración de las bandas pertenecientes a los clones Y1 e Y2 digeridos con Eco RI coincide con la migración de las dos bandas observadas para el DNA genómico de células YHHH, con tamaños relativos aproximados de 6,5 Kb para el clon Y2 y 8 Kb para el clon Y1. Además de las bandas correctas aparecen otras de menor peso molecular, tanto en la digestión con EcoRI como en la combinada de EcoRI/KpnI. Esto fue atribuido al hecho de que este "southern" se realizó con DNA de fagoλgtWES como vector de los clones Y1 e Y2. La hibridización observada para las bandas principales producidas por Eco RI fue satisfactoria, ya que los clones Y1 e Y2 coinciden con las bandas observadas en el DNA genómico de células YHHH. Se procedio por lo tanto a realizar estudios sobre los clones obtenidos.

Para simplificar los pasos correspondientes a la obtención y purificación de DNA de los clones Y1 e Y2, los mismos fueron subclonados en pBR322 (digerido por Eco RI y desfosforilado). El subclonado se realizó ligando una digestión Eco RI de Y1 e Y2 (contenidos en λgtWES) con el vector mencionado. El análisis de las colonias obtenidas se realizó directamente a través de minipreparaciones, corte con Eco RI y posterior electroforesis en gel de agarosa 1% para observar los insertos de 8 y 6,5 Kb.

Análisis estructural del gen Y2

Luego de la obtención de los clones Y1 e Y2 a partir de la genoteca parcial construida con DNA de células YHHH, se procedió a analizar dichos clones mediante mapeo con enzimas de restricción y tecnica de Southern. Este análisis se realizó solamente con los clones Y1 e Y2 que son aquellos que podrían contener genes HLA-B (hibridizan positivamente con la sonda locus B especifica pB3UT). Las enzimas utilizadas para este estudio fueron Eco RI, Bgl II, Xba I, Pst I, Kpn I y Pvu I, que son algunas de las cuales presentan sitios conservados en diferentes posiciones de los genes de HLA clonados (Jordan,1985, Malissen, 1982, Wais,1985). Las sondas utilizadas fueron pB3UT (para mapear el extremo 3') y p001.5' (para mapear el extremo extremo 5'). Los resultados se observan en la figura 9.

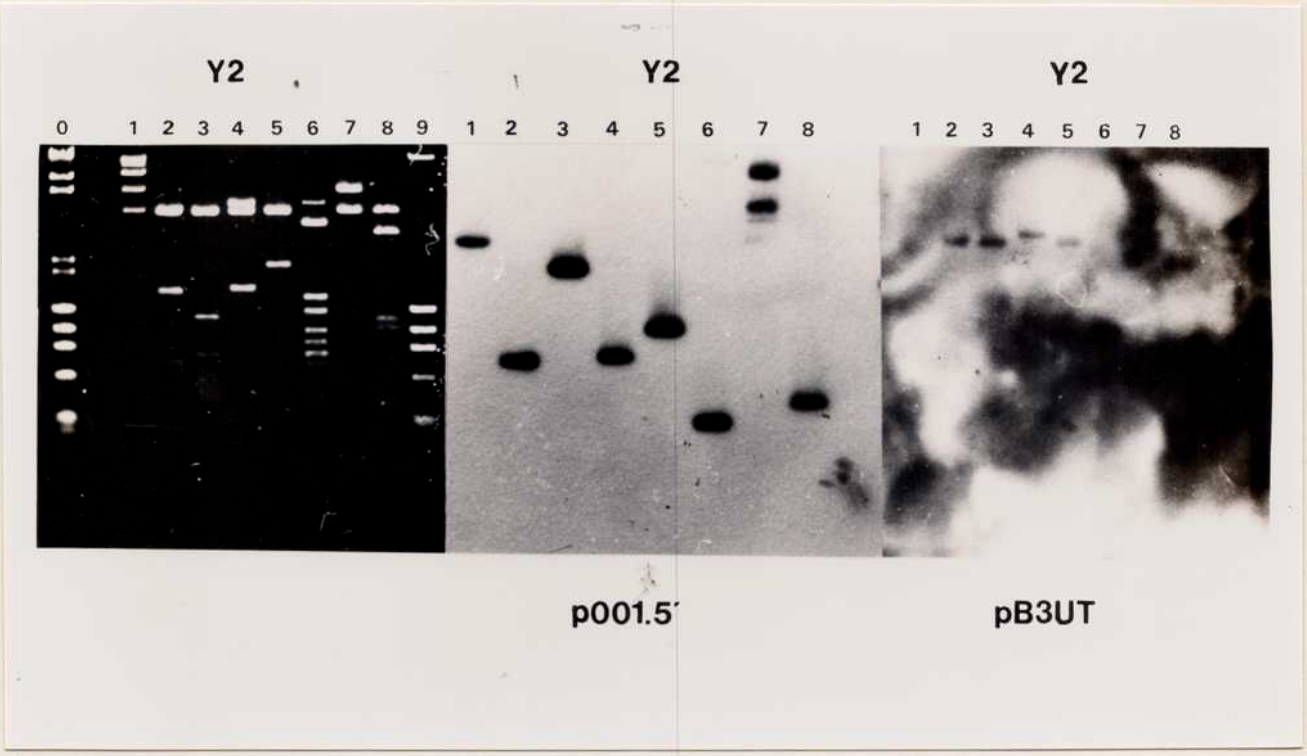


Figura 9

"Southern" usando DNA del clon Y2. p001.5': sonda corresp. al extremo 5' de los genes de HLA. pB3UT: sonda corresp. al extremo 3' de los genes de HLA.

0: λ HindIII-Φ X HaeIII
1: Eco R1
2: Eco R1/BglII
3: Eco R1/XbaI
4: Eco R1/SmaI
5: Eco R1/KpnI
6: Eco R1/PstI
7: Eco R1/PvuII
8: Eco R1/KpnI/XbaI
9: Φ X HaeIII

Para el clon Y1 no pudo obtenerse un mapa aproximado de restricción como conclusión del estudio realizado, ya que no presentó hibridización para la sonda p001.5'. Esto puede deberse a dos motivos: que tenga delecionado en forma casi completa el exon correspondiente al dominio α1 o que este exón no presente homologia con la sonda p001.5'. Además resulto no tener sitio de corte para las enzimas Xba I, Sma I y Pvu I. De todas maneras se pudo observar que existen varios sitios para Pst I, por lo menos 2 para Kpn I y por lo menos 1 para Bgl II. Las características observadas para el clon Y1 no coinciden con las descriptas para la generalidad de los genes de HLA clonados, en cuanto a la falta de sitios de restricción para las enzimas mencionadas (Jordan,1985, Malissen, 1982, Wais.1985) y la pósible falta de homologia de su exón correspondiente al dominio α1 (la primera parte del dominio α1 resulta bastante conservada entre los genes de HLA clase I, Parham, 1988). Por estos motivos los estudios siguientes se centraron en el clon Y2 (al que mencionaremos desde ahora como gen Y2) que si pareció responder en su organización estructural a las características generales de los genes de HLA clase I descriptos.

Con los datos obtenidos mediante el mapeo con enzimas de restricción y técnica de Southern y teniendo en cuenta la organizacion general de exones e intrones de los genes de clonados, se construyó un mapa de restricción aproximado para el gen Y2. Estos datos fueron completados ademas por análisis mediante secuenciación del gen Y2 que realizó el Lic. Ariel Wilner. La estructura del gen Y2 puede observarse en la figura 10.

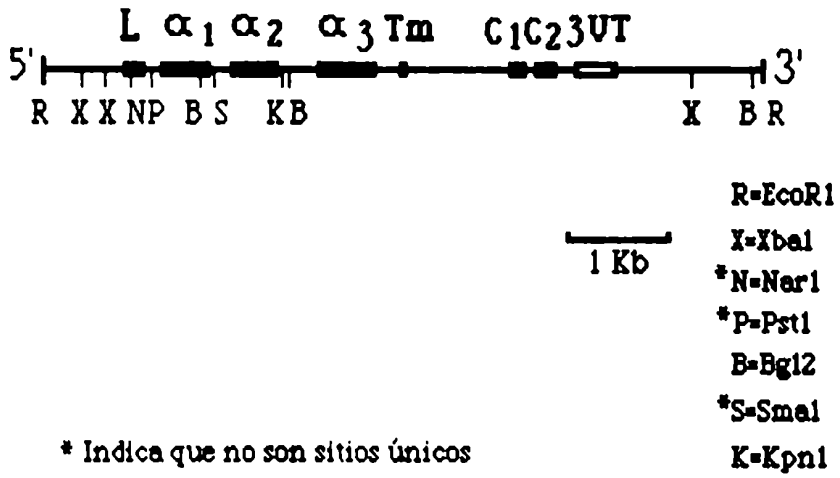


Figura 10

Esquema del gen Y2

El análisis de la secuencia del gen Y2 permitió además observar la presencia de los siguientes elementos: La posición +1 es ubicada en el codón ATG correspondiente a la metionina que inicia el péptido lider. En la posición -50 se ubica el "TATA-box" (del tipo TCTAAA como en la mayoria de los genes de HLA) y en la posición -76 el "CAAT-box". En la posición -190 se encuentra una secuencia denominada "IFN-sensible", la cual se encuentra en varios genes de HLA y H_2 y también en genes correspondientes a otras proteinas inducidas por IFNα en celulas eucarioticas. Esta secuencia fue inicialmente descripta para los genes de HLA (HLA-A3, 12.4, HLA-DR) y para el gen de metalotioneina II (Friedman, 1985) y posteriormente se ha demostrado que la misma participa en la respuesta al IFN de los genes H_2K^b (Israel, 1986), H_2L^d (Sugita, 1987), H_2D^d (Korber, 1988), gen 6-16 (Porter, 1988), gen ISG-15 (Reich, 1987) y gen de 2'-5' oligoA-sintetasa (Cohen, 1988). A continuación se presenta un esquema comparativo de secuencias "IFN-sensibles" (figura 11) donde puede verse la homologia que existe entre la secuencia correspondiente al gen Y2 y otras provenientes de genes de HLA, H_2, proteina 6-16 (humana) y 2'-5' oligoA sintetasa (humana y de ratón). En el caso de estos 3 últimos genes la homologia se observa con la secuencia invertida en forma 3'-5'.

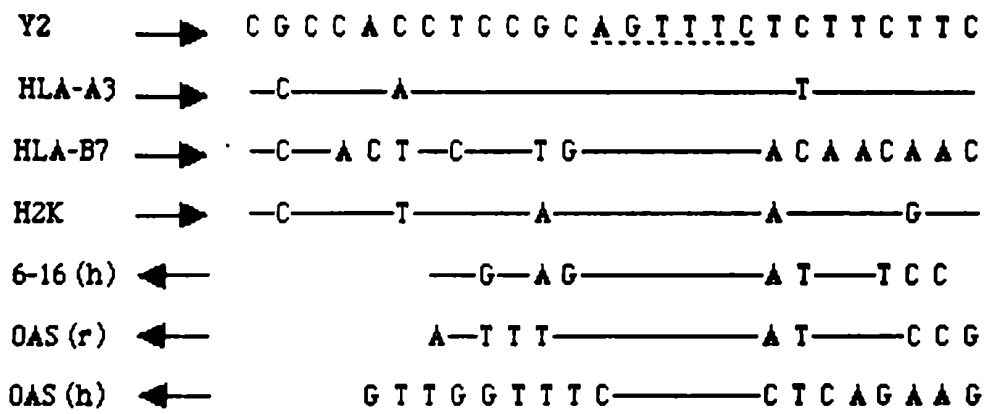


Figura 11

Comparación de secuencias "IFN-sensibles"

También se ha descripto que esta secuencia "IFN-sensible" coincide con 2 regiones de unión de proteinas para el gen H_2K^b. Estas secuencias unen los factores H_2TF1 (presente en los genes HLA-A2, HLA-A3, H_2L^d, H_2D^d, 6-16, 2'-5' oligoAsintetesa, ISG-15, ISG-54, Baldwin, 1987) e IBP1 (presente en los genes H_2K^b y "enhancer" de 72 pb de SV40, Blanar, 1989, H_2K^d, Kvist, 1983, HLA-A3, Strachan, 1984 y H_2L^d, Shirayoshi, 1987). Se observa para el gen Y2 que existen secuencias similares a las descriptas para estos 2 factores (figura 12).

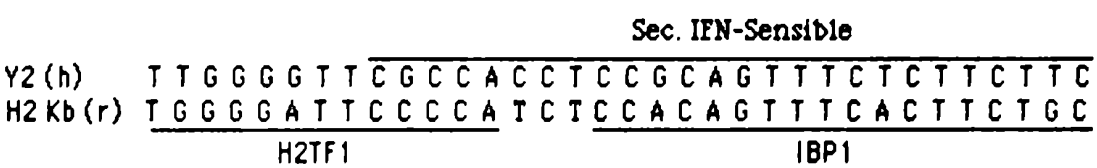


Figura 12

Comparación de regiones de unión de proteinas regulatorias

Con el fragmento ubicado entre los sitios Xba1- Xba1 de la región 5' no traducida del gen Y2 que contiene la region "IFN-sensible" (375 pb entre las posiciones -480 a -105) se han realizado ensayos funcionales observando su influencia sobre promotores heterólogos. Dichos ensayos se describen en la sección 2.4.2 "Estudios de funcionalidad del promotor y regiones reguladoras del gen Y2".

La secuencia nucleotídica del gen Y2 ha sido analizada en forma casi completa. Mediante dicho analisis no se ha podido determinar hasta el momento la especificidad del gen Y2, esto es, si corresponde a un gen HLA-A, B, o C (comparándolo con secuencias de genes de HLA clonados. Parham. 1988. Sodoyer, 1984, Lawlor, 1988, Mayer, 1988, Wais, 1988, Srivastava, 1987. Szots, 1986), a pesar de que el hecho de presentar hibridización positiva con la sonda pB3UT indicaria que se trata de un gen HLA-B.

Análisis funcional del gen Y2

Estudios de expresión del gen Y2 completo

El estudio de las características funcionales del gen Y2 se ha abordado a través de transfecciones en células eucarióticas. Este método ha sido el de uso general para identificar serológicamente los productos de genes tanto de H_2 como de HLA (Guillemot, 1988, Parham.1989. Jordan.1985). Este método permite asegurar las caracteristicas funcionales de un gen y asignar serotipos a los genes clonados mediante el uso de anticuerpos especificos. Se han utilizado para el estudio del gen Y2 dos tipos de técnicas: A) Transfecciones de tipo estable, con un marcador de selección y B) Transfecciones de tipo transiente, donde el producto del gen transfectado se analiza a las 48 hs. de realizada la transfección

A) Transfección estable del gen Y2 en células Ltk^-

Las células Ltk^- de ratón han sido las más ampliamente usadas para estudiar la expresión de genes clonados. En el caso de genes de HLA clase I, las proteinas codificadas por los genes transfectados se asocian en las células Ltk^- con β_2 microglobulina de ratón (lo que constituye un requisito esencial para el transporte y expresión en la membrana) y la mayoria de los anticuerpos monoclonales anti HLA

reconocen los epitopos conformacionales de la molécula híbrida formada (Guillemot, 1988. Parham,1989, Jordan,1985 Malissen, 1986). Por este motivo estas células fueron elegidas para realizar una transfección de tipo estable del gen Y2. Para esto fue realizada una cotransfección del gen Y2 (clonado en pBR322) con el plásmido pKG5 que contiene el gen de neomicina asociado al promotor de timidina kinasa (TK) del virus de Herpes Simplex y confiere resistencia al antibiótico G418 (Gorman, 1985). La cotransfección fue realizada utilizando una relación gen Y2: plásmido pKG5 de 20: 1 y el método de transfección fue el de precipitación con fosfato de calcio. La selección de los clones se realizó usando una dosis de G418 de 1,2 mg/ml.

Se obtuvieron 20 clones, llamados LY2.1.1, LY2.2.1, LY2.2.2, LY2.2.3, LY2.3.1, LY2.3.2, LY2.3.3, LY2.4.1, LY2.4.2, LY2.4.3, LY2.5.1, LY2.5.2, LY2.6.1, LY2.7, LY2.8.1, LY2.8.2, LY2.8.3, LY2.9.1, LY2.10 y LNEO (control transfectado sólo con el plásmido pKG5). Sobre estos clones se realizó inmunofluorescencia indirecta de superficie con el anticuerpo monoclonal YTH/76, para tratar de detectar el producto del gen Y2. En este experimento (y en todos los siguientes de transfección transiente) se utilizó como control de la técnica de inmunofluorescencia indirecta de superficie, mutantes YHHH sin y con estimulación de 200 U/ml de IFNα durante 24 hs. y el anticuerpo monoclonal YTH/76. La imagen de inmunofluorescencia que se observa para este control se muestra en la descripción de la técnica utilizada (figura I, sección Materiales y Métodos).

El resultado de la inmunofluorescencia con el anticuerpo YTH/76 fue negativo para los 20 clones de células Ltk^-. Esto pudo ser debido a varios motivos: Por un lado que el gen Y2 sea en realidad un pseudogen, por lo que la proteina codificada nunca podrá detectarse. Puede ocurrir también que el promotor del gen Y2 posea una actividad muy baja o nula. Por otro lado, el anticuerpo monoclonal YTH/76 tal vez no reconozca al producto del gen Y2 Otro motivo posible para el resultado negativo observado es que el gen Y2 solo se exprese al recibir las células una estimulación con IFNα; esto se basa en el hecho de que el gen Y2 fue clonado a partir de mutantes YHHH y estas células, así como las parentales Molt4, resultan negativas para la expresión de genes pertenecientes al locus B en ausencia de estimulación con IFNα (al momento de realizado este experimento no se disponía de IFNα murino en el laboratorio para permitir el análisis de esta hipótesis) Finalmente, se ha descripto que existen genes de HLA (en particular HLA-B27) que son incapaces de combinarse con β_2 microglobulina de ratón, lo cual hace que no puedan expresarse en la membrana de las células L (Guillemot. 1988, Parham,1989). Para tratar de averiguar cual de todas estas posibilidades fue la responsable del resultado negativo observado, se realizaron varias transfecciones

de tipo transiente en distintas líneas celulares; estos experimentos se describen a continuación.

B) Transfecciones de tipo transiente del gen Y2

Para realizar este tipo de ensayos se consideró la posibilidad de utilizar varias líneas celulares, que presentaban diferentes ventajas para realizar los experimentos planteados: Se intentó utilizar la línea celular NS0 (mieloma murino) que presenta la característica de ser negativa para el anticuerpo monoclonal YTH/76, pero resultó ser totalmente refractaria al método de tranfección indicado para células en suspención (DEAE-dextrano) También se trató de utilizar las líneas MCF-7 y T47-D (células epiteliales humanas) que presentaban la posibilidad de estimulación con IFNα humano, pero ambas presentaron reactividad positiva para los anticuerpos YTH/76 y W6/32 (este último reconoce un epitopo o determinante público en todos los alelos de HLA clase I humanos). Por lo tanto se descartó el uso de las líneas NS0, MCF-7 y T47-D como recipientes para realizar ensayos con el gen Y2. Se utilizaron finalmente 2 líneas celulares: NIH3T3 (fibroblastos de raton) y J26 (células Ltk$^-$ de ratón que expresan β2 microglobulina humana).

Transfeccion del gen Y2 en celulas NIH3T3

En primer lugar se transfectó el gen Y2 en células NIH3T3, que presentan la característica de poseer una eficiencia de tranfección muy alta por el método de precipitación con fosfato de calcio. Se realizó una tranfección transiente en la cual el gen Y2 completo (fragmento de 6.5 Kb clonado en pBR322) fue transfectado de 3 maneras diferentes. 1) En forma circular, o sea el plásmido intacto. 2) Cortado por EcoRI, que libera el gen completo (es la enzima utilizada para el clonado). 3) Cortado por Xba I, que deja al gen Y2 estructuralmente completo, con los elementos "CAAT-box" y "TATA-box" pero que deleciona la zona "IFN-sensible" ubicada en posición -190 (el fragmento que se produce va de posiciones -105 a +4.200 aproximadamente). Luego de 48 hs. de realizada la tranfección se preparó RNA total de las células y se detectó la presencia de mRNA del gen Y2 por la técnica de Dot-blot. Como sonda se utilizó un fragmento de 175 pb correspondiente a la región del promotor y del péptido lider del gen Y2 (-105 a +70). El resultado de la hibridización se observa en la figura 13.

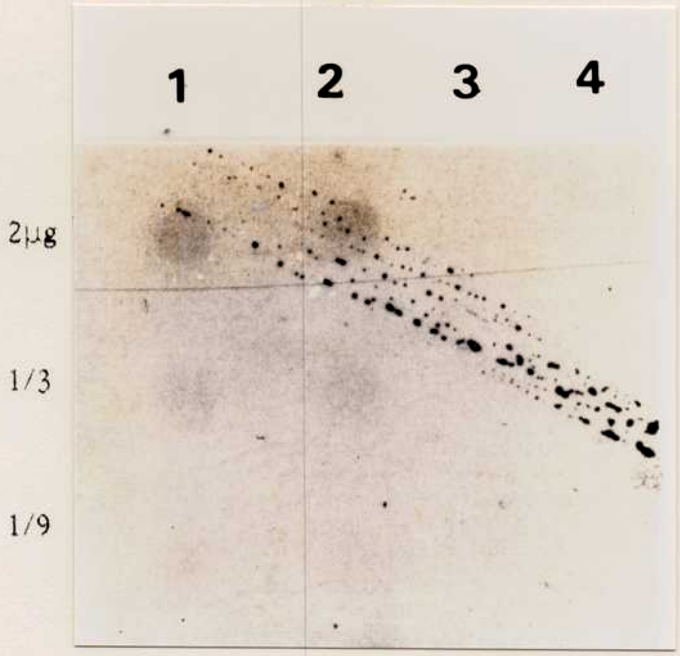


Figura 13

"Dot-Blot" de RNA de celulas 3T3 transfectadas con el gen Y2.
1- RNA 3T3 transfectadas gen Y2, plásmido circular
2- RNA 3T3 transfectadas gen Y2, cortado por EcoR1
3- RNA 3T3 transfectadas gen Y2, cortado por Xba1
4- RNA 3T3 no transfectadas
2μg: 2μg de RNA total, 1/3: dilución 1:3, 1/9 dilución 1:9

Puede observarse que existe expresión del gen Y2 a nivel de transcripción en el caso de transfectarse el mismo en forma circular o linealizado con Eco RI (líneas 1 y 2). La expresión del gen Y2 parece anularse en el caso de que se delecione la región regulatoria que contiene la zona "IFN-sensible" por corte con Xba I (línea 3). Esto indicaría que dicha region regulatoria posee elementos importantes para la transcripción del gen Y2 que funcionan aún en ausencia de estimulación con IFNα. Se observa además que la expresión del gen Y2 es muy baja en las condiciones del ensayo, lo cual se atribuyó en ese momento a la falta de estimulación con IFNα murino.

Para observar si la expresion del gen Y2 a nivel de transcripción (analizada a traves de la detección de mRNA) se correlacionaba con expresión a nivel de proteina, se

realizó un experimento similar en células NIH3T3 pero esta vez tratando de detectar el producto del gen Y2 en la membrana de las celulas transfectadas. Para esto, luego de 48 hs. de transfectadas las células con el gen Y2 por el método de precipitación con fosfato de calcio se realizó inmunofluorescencia indirecta de superficie con el anticuerpo monoclonal W6/32 (reconoce HLA-A, B, C) y también con el anticuerpo monoclonal YTH/76 (reconoce HLA-B). El resultado fue negativo en ambos casos. Nuevamente, la falta de expresión observada podría deberse a los motivos enunciados para el caso de la transfección estable en células Ltk$^-$, esto es, que el gen Y2 sea en realidad un pseudogen, que no se exprese en ausencia de estimulación con IFNα, o que no se exprese debido a la falta de β_2 microglobulina humana en células NIH3T3. Por lo tanto, la transfección transiente del gen Y2 en células NIH3T3 permitió observar que parece existir expresión del gen Y2 a nivel de mRNA, pero no fue posible la detección en la membrana celular de la proteina codificada, aún utilizando el anticuerpo monoclonal W6/32, que reconoce los productos de los distintos loci HLA-A, B, C.

Transfección del gen Y2 en células J26

Para descartar los problemas mencionados anteriormente relacionados con la falta de expresión de ciertos genes de HLA en ausencia de β_2 microglobulina humana y los relacionados con la posible falta de expresión del gen Y2 en ausencia de estimulación con IFNα se realizó el siguiente experimento: Se transfectaron en forma transiente células J26 (son células derivadas de Ltk$^-$ que han incorporado por transfección el gen de β_2 microglobulina humana) con el gen Y2, y luego de 16 hs. de realizada la transfección se estimularon con una dosis de 1000 U/ml de IFNα/β murino. Luego de 24 hs de estimulación se realizó inmunofluorescencia indirecta con los anticuerpos W6/32 e YTH/76. El resultado fue tambien negativo, aún en presencia de estimulación con IFNα/β. Este resultado parece indicar que la falta de expresión del gen Y2 en la membrana de las células transfectadas se debe a que el gen Y2 es en realidad un pseudogen, ya que a pesar de detectarse mRNA en células NIH3T3 transfectadas, no puede observarse la proteina codificada aun en presencia de estimulación con IFNα/β y de la posibilidad de combinación con β_2 microglobulina humana.

En los experimentos descriptos de análisis de funcionalidad del gen Y2 completo no se dispuso de un control positivo para incluir en los ensayos (no se disponia de un gen de HLA clase I clonado funcional y cuya expresión pueda detectarse en la membrana de las células transfectadas por los métodos descriptos). De todas maneras, lo que si podemos asegurar es que en todos los casos de transfección del gen Y2 completo

las transfecciones resultaron de una buena eficiencia, ya que siempre se realizaron controles de transfección paralelos con los plásmidos RSVCAT (contiene como promotor el LTR del virus del sarcoma de Rous, asociado al gen CAT) o pSV2CAT (contiene el promotor y "enharcer" del virus del sarcoma de mono, SV40, asociado al gen CAT). También fue controlada en todos los casos la técnica de inmunofluorescencia como se comentó anteriormente.

Estudios de funcionalidad del promotor y regiones reguladoras del gen Y2

Para estudiar la funcionalidad de promotores y regiones reguladoras de genes eucarióticos se han desarrollado sistemas que incluyen vectores de expresión a los que puede adosarse la región de DNA bajo estudio y sistemas de transfección de estos vectores en células en cultivo. Los vectores de expresión más comunmente usados contienen un gen que codifica para una actividad enzimática ausente en células eucarióticas y cuyo ensayo sea rápido y sensible. Tal es el caso de los genes que codifican para cloramfenicol-acetiltransferasa (CAT, Gorman, 1982) y para βgalactosidasa (βgal, Gorman, 1985). Esta fue la estrategia seguida para el estudio de funcionalidad del promotor y regiones reguladoras del gen Y2, esto es, unir las regiones bajo estudio a distintos vectores de expresión y realizar con ellos transfecciones de tipo transiente en varios tipos celulares.

Estudios de funcionalidad del promotor completo del gen Y2

Este tipo de estudios fue realizado incluyendo el promotor completo del gen Y2 en el plásmido pSB1. El mismo contiene sitios para realizar el clonado de promotores, el gen CAT que permite medir el funcionamiento de dichos promotores y una señal de poliadenilación proveniente de SV40 (virus de sarcoma de mono). A continuación se observa un esquema del promotor y regiones reguladoras del gen Y2 con sus principales elementos (figura 14).

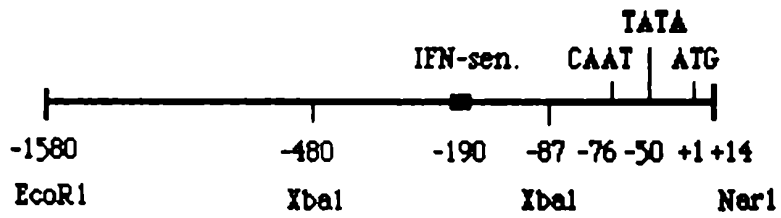


Figura 14

Promotor y regiones reguladoras del gen Y2

El promotor completo del gen Y2 fue clonado en el plásmido pSB1 utilizando el fragmento Eco RI/ NarI que se observa en la figura 14. Este fragmento incluye los 5 primeros aminoácidos del gen Y2, pero puede analizarse que esta secuencia queda en fase con el gen CAT de acuerdo al sitio de clonado que se utilizó en este vector (los detalles de construcción de este plásmido se describen en la sección 4. "Plásmidos utilizados"). El plásmido pSB1 es semejante a los plásmidos derivados de pSV2CAT (Gorman, 1982), pero presenta una deleción entre posiciones 1095 a 2485 de pBR322 (Yaniv, comunicación personal). Se ha descripto que la secuencia mencionada proveniente de pBR322 ejerce efectos negativos sobre la actividad de genes transfectados (Peterson, 1987), en particular sobre pSV2CAT que contiene parte de esta secuencia (posiciones 2066 a 2490 de pBR322). Con el plásmido construido (pSBRNd) se hicieron transfecciones de tipo transiente en mutantes YHHH por el método de DEAE-dextrano, sin y con estimulación de IFNα y utilizando el protocolo de transfección modificado que se describe en la sección 3."Estudio de células Molt4 y mutantes YHHH por ensayos de transfección con promotores sensibles a IFNα". Las condiciones que se utilizaron para realizar las transfecciones son aquellas que permiten observar actividad del promotor del gen H_2K^b en estas células. A pesar de esto no pudo observarse actividad del plásmido pSBRNd en mutantes YHHH, aún en presencia de estimulación con 2000 U/ml de IFNα durante 24 hs. Para comprobar si la falta de actividad del plásmido pSBRNd se debía a problemas inherentes a la baja eficiencia de transfección que se obtiene con el método de DEAE-dextrano, el plásmido pSBRNd fue transfectado en

células J26. Estas células son fibroblastos de ratón y puede utilizarse el método de precipitación con fosfato de calcio para transfectarlas (como se mencionó anteriormente las células J26 son células Ltk$^-$ de ratón que tienen incorporado el gen de β2microglobulina humana). Se realizaron transfecciónes de tipo transiente sin y con estimulación de 1000 U/ml de IFNα/β murino durante 24 hs., pero tampoco en este caso pudo observarse actividad del plásmido pSBRNd. En todos los experimentos fue utilizado el plásmido RSVCAT como control de transfección y su actividad pudo ser medida sin ningún tipo de inconvenientes.

Los resultados obtenidos con el plásmido pSBRNd indican que el promotor del gen Y2 funciona muy débilmente o no es funcional, ya que no pudo observarse actividad del mismo en mutantes YHHH ni células J26, aún en presencia de estimulación con IFNα humano o IFNα/β murino. Los resultados de los experimentos de transfección del promotor completo del gen Y2 son contradictorios con la observación anterior de mRNA proveniente del gen Y2 en la transfección del gen Y2 completo en células NIH3T3. Existe la posibilidad de que la contradicción observada sea debida a que el promotor del gen Y2 posea una actividad muy baja, y solo pueda ser visualizada por transfección en células NIH3T3 (las células NIH3T3 poseen una eficiencia de transfección muy elevada). De todas maneras es significativo el hecho de que no se haya podido observar ningún aumento de actividad del promotor del gen Y2 por estimulación de las células transfectadas con IFNα. Otra posibilidad para explicar la contradicción observada es que el plasmido utilizado como vector para el promotor del gen Y2 no resulte funcional, por algún defecto en su estructura que no pudo detectarse.

En cuanto a la expresión del gen Y2 en mutantes YHHH, el Lic. Ariel Wilner ha realizado ensayos mediante al técnica de nucleasa S1. Se han utilizado dos sondas, una correspondiente a 58 pb del final del péptido lider y 14 pb del primer intrón y otra correspondiente a 195 pb del dominio α1 (aminoácidos 1 a 65) y 111 pb del primer intrón. Con ambas sondas se obtuvo protección del tamaño esperado para mRNA de mutantes YHHH inducidas con 200 U/ml de IFNα durante 24 hs. (y no en mRNA de células sin inducir con IFNα). Esto indica que el gen Y2 se expresa en mutantes YHHH al recibir una estimulación con IFNα, si bien no se ha utilizado como sonda la región que presenta mayor polimorfismo entre los genes de HLA para realizar los ensayos (zona correspodiente a los aminoacidos 62 a 90 del dominio α1, donde se ubica parte del bolsillo de unión de peptidos provenientes de antígenos). Estos hechos son coincidentes con la detección de mRNA proveniente del gen Y2 en la transfección de células NIH3T3.

Estudios funcionales de la región reguladora "IFN-sensible" del gen Y2

Estos estudios fueron realizados utilizando vectores de expresión que contienen un gen cuyo producto permite medir actividad enzimática (CAT o βgal), la señal de poliadenilación de SV40 y promotores con sitios de clonado en su región 5' que permiten observar influencias de regiones reguladoras sobre la actividad de dichos promotores. La región reguladora del gen Y2 que fue objeto de estudio es aquella comprendida entre las posiciones -480 a -105, que contiene la región de 26 pb denominada "IFN-sensible" ubicada en posición -190 a -164 (ver figura 14). Este fragmento de 375 pb fue clonado en 3 tipos de vectores diferentes y con los plásmidos construidos se realizaron ensayos de transfección transiente en mutantes YHHH sin y con estimulación de IFNα. El objetivo de este tipo de experimentos es observar si el fragmento de 375 pb proveniente del gen Y2 es capaz de conferir a promotores heterólogos la propiedad de ser inducible por IFNα.

En primer lugar se utilizó el plásmido TKYCAT, que contiene el promotor del gen de timidina kinasa (TK) del virus de Herpes simplex asociado al gen CAT. El fragmento de 375 pb proveniente del gen Y2 fue clonado en posición 5' respecto del promotor TK y con el plásmido resultante (TKYXd) se realizaron ensayos de transfección transiente en células YHHH sin y con estimulación de 400 U/ml de IFNα durante 24 hs. Las condiciones de transfeccion que se utilizaron son aquellas que permiten visualizar actividad del promotor del gen H_2K^b en células YHHH. Como control de transfección se utiliza el plásmido RSVCAT (contiene el promotor del virus del sarcoma de Rous asociado al gen CAT). En todos los casos los ensayos se realizaron usando cantidades equivalentes de proteinas, salvo en el caso de RSVCAT, donde la cantidad empleada es 5 veces menor al resto de los ensayos. El resultado se observa en la figura 15.

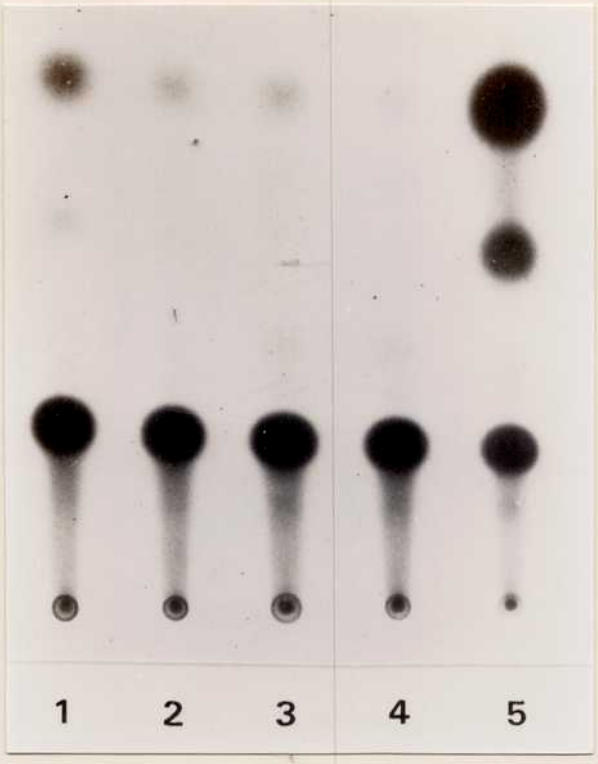


Figura 15

1- YHHH transfectadas TKYCAT
2- YHHH transfectadas TKYCAT + 400 U/ml IFN
3- YHHH transfectadas TKYXd
4- YHHH transfectadas TKYXd + 400 U/ml IFN
5- YHHH transfectadas RSVCAT

Como puede observarse, el fragmento de 375 pb proveniente del gen Y2 no es capaz de conferir al promotor TK en el plásmido TKYXd la propiedad de ser inducible por IFNα (líneas 3 y 4), y además parece disminuir la actividad del promotor TK (líneas 1 y 3). Se observa también una diferencia entre las líneas 1 y 2, 3 y 4, o sea los plásmidos TKYCAT y TKYXd sin y con tratamiento de IFNα. Esto puede deberse a que en ciertos casos el tratamiento con IFNα disminuye la eficiencia de transfección, fenómeno

observado en células YHHH al realizar tratamientos con IFNα previos a la transfección del plásmido H_2K^bCAT (sección 3."Estudio de células Molt4 y mutantes YHHH por ensayos de transfección con promotores sensibles a IFNα).

En segundo lugar, para confirmar el resultado observado con el plásmido TKYXd, se intentó realizar ensayos con el plásmido pHFβG2, que contiene el promotor TK asociado al gen de βgalactosidasa. Esto permitiría descartar que el resultado obtenido con el plásmido TKYXd se deba a problemas inherentes a la estructura del vector utilizado. Para esto el fragmento de 375 pb fue clonado en el vector pHFβG2 y con el plásmido resultante (pHFβG2Xd) se realizaron ensayos de transfección transiente en células YHHH sin y con estimulación de 2000 U/ml de IFNα durante 24 hs. Lamentablemente la sensibilidad del sistema de transfección transiente y medición de actividad del gen de βgalactosidasa en células YHHH resultó demasiado baja como para poder medir actividad del plásmido pHFβG2Xd. El sistema de visualización de actividad transcripcional por medición de actividad de βgalactosidasa solo resultó funcional en células NIH3T3, que presentan una eficiencia de transfección por el método de precipitación con fosfato muy superior a la observada en células Molt4 y mutantes YHHH por el método de DEAE-dextrano. A pesar de que pudo observarse actividad del plásmido pHFβG2Xd en células NIH3T3 no pudieron realizarse ensayos de inducción con IFN, ya que no se disponía de IFNα/β murino en ese momento en el laboratorio. Por este motivo el uso de este plásmido como vector de expresión fue descartado.

En tercer lugar se utilizó como vector de expresión para el fragmento de 375 pb proveniente del gen Y2 el plásmido RSVCAT (contiene el LTR del virus del sarcoma de Rous asociado al gen CAT). Esto se realizó con el objeto de observar si el hecho de que el fragmento de 375 pb no confiera la propiedad de ser inducible por IFNα al promotor TK es debido a una característica particular del promotor TK o se debe a alguna falla en esta región reguladora proveniente del gen Y2. Para analizar la influencia del fragmento de 375 pb sobre el LTR del virus del sarcoma de Rous, se utilizó para el clonado un sitio MluI interno al LTR del plásmido RSVCAT (posicion -376 respecto del sitio HindIII donde une al gen CAT, se conserva la zona promotora del LTR ubicada en -70 respecto del mismo sitio). Con el plásmido resultante (RSV/Xd/CAT) se realizaron ensayos de transfección transiente en células YHHH con estimulación de diferentes dosis de IFNα durante 24 hs. El resultado se observa en la figura 16.

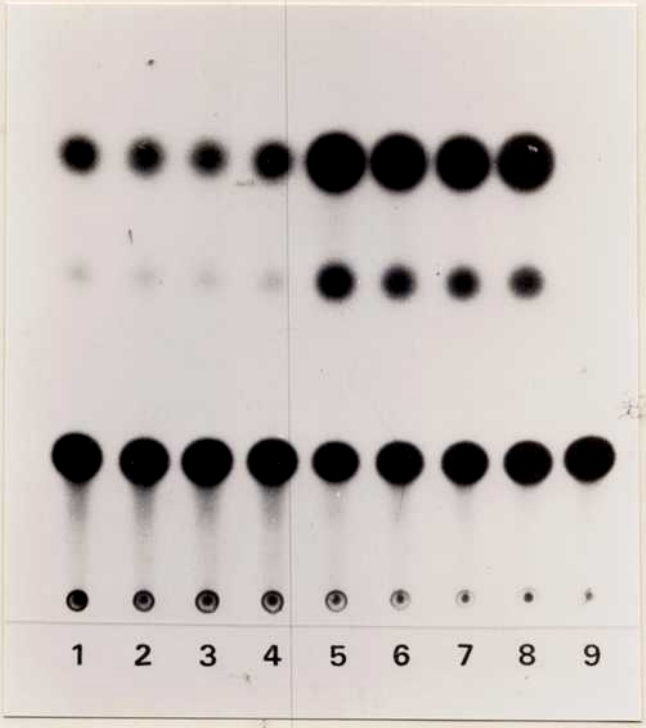


Figura 16

1- YHHH transfectadas RSV/Xd/CAT
2- YHHH transfectadas RSV/Xd/CAT + 200 U/ml IFN
3- YHHH transfectadas RSV/Xd/CAT + 400 U/ml IFN
4- YHHH transfectadas RSV/Xd/CAT + 800 U/ml IFN
5- YHHH transfectadas RSVCAT
6- YHHH transfectadas RSVCAT + 200 U/ml IFN
7- YHHH transfectadas RSVCAT + 400 U/ml IFN
8- YHHH transfectadas RSVCAT + 800 U/ml IFN
9- YHHH no transfectadas

Puede observarse en la figura (líneas 1 a 4) que la actividad del plásmido RSV/Xd/CAT no es incrementada por tratamiento de las células con IFNα. Esto implica que el fragmento de 375 pb no es capaz de conferir al promotor de RSV la propiedad de ser inducible por IFNα. Además se observa que la actividad del plásmido RSV/Xd/CAT es

menor que la actividad del plásmido RSVCAT en todos los casos. Esto puede ser debido a que el fragmento Xba1-Xba1 de 375 pb proveniente del gen Y2 contenga algún tipo de secuencia "silenciadora" de la transcripción o más probablemente a que el clonado de dicho fragmento en el sitio Mlu1 del LTR de RSV perturbe de alguna manera la alta eficiencia transcripcional de este promotor viral (este último hecho no fue investigado con mayor detalle).

Los resultados obtenidos en los experimentos de funcionalidad de la región "IFN-sensible" proveniente de la región 5' del gen Y2 indican que la misma no es capaz de conferir la propiedad de ser inducible por IFNα al promotor TK del virus de Herpes simplex ni al LTR del virus del sarcoma de Rous. Existe la posibilidad de que el fragmento utilizado de 375 pb (posiciones -480 a -105 del gen Y2) no resulte suficiente para conferir a un promotor la propiedad enunciada y se requieran otras zonas vecinas (hacia 5' o hacia 3') que no fueron incluidas en los ensayos. Sin embargo, este no parece ser el caso, ya que los resultados observados con el fragmento de 375 pb reproducen los resultados que se obtuvieron con el promotor completo del gen Y2, con el cual tampoco pudo detectarse ningún tipo de inducción con IFN.

A continuación observamos una tabla que resume los resultados obtenidos en experimentos de transfección en distintos tipos celulares del gen Y2 completo, su región promotora completa asociada al gen CAT y su región "IFN-sensible" asociada a otros promotores (tabla 1).

Plásmido	Región Reguladora	Promotor	Tipo de Transfec.	Células	IFN	Ensayo	Resultado
Gen Y2 (pBR322)	Y2	Y2	Estable	Ltk		Inmunof. YTH/76	
Gen Y2 (pBR322)	Y2	Y2	Trans.	NIH3T3	-	Detección mRNA	+ (1)
Gen Y2 (pBR322)	Y2	Y2	Trans.	J26	- y +	Inmunof. YTH/76 W6/32	
pSBRNd	Y2	Y2	Trans.	YHHH J26	- y + - y +	CAT CAT	
TKYXd	Y2	TK	Trans.	YHHH	- y +	CAT	+ (2)
RSV/Xd/CAT	Y2	LTR RSV	Trans.	YHHH	- y +	CAT	+ (3)

(1) Se detecta débilmente mRNA para el caso del promotor completo del gen Y2.

(2) Se detecta débilmente actividad de CAT en igual nivel sin y con tratamiento de IFN.

(3) Se detecta actividad de CAT en igual nivel sin y con tratamiento de IFN.

Tabla 1

Observamos en la tabla 1 que A) No pudo detectarse el producto a nivel de proteina del gen Y2, por transfección en células Ltk$^-$, NIH3T3 y J26, aún en presencia de estimulación con IFNα murino (células J26). Solamente pudo detectarse mRNA proveniente del gen Y2 por transfección en células NIH3T3. B) No pudo detectarse actividad del promotor completo del gen Y2 por transfección en células YHHH ni J26, aún en presencia de estimulación con IFNα. C) El fragmento XbaI-XbaI de 375 pb del

gen Y2 que contiene la región "IFN-sensible" no es capaz de conferir la propiedad de ser inducible por IFNα al promotor TK ni al LTR de RSV, por ensayo de transfección en células YHHH. Este fragmento se comporta además como un "silenciador", ya que disminuye la actividad transcripcional de los promotores ensayados.

Los resultados obtenidos indican que el gen Y2 no es funcional en su expresión a nivel de proteinas, ya que en ningun caso pudo detectarse su producto usando los anticuerpos YTH/76 y W6/32. Esto sugiere que posiblemente el gen Y2 sea en realidad un pseudogen. Respecto de la funcionalidad del promotor del gen Y2 existe una contradicción en los resultados obtenidos: Por una parte todos los experimentos que se han realizado asociádolo al gen CAT indican que no es funcional, aún en presencia de estimulación de las células transfectadas con IFNα. Por otro lado, fue posible detectar mRNA del gen Y2 por transfección en células NIH3T3, lo cual indicaría que el promotor si es funcional, y estaria de acuerdo con los resultados obtenidos en los experimentos de protección a nucleasa S1 con RNA de células YHHH. Existen varias posibilidades para explicar estos resultados: a)Puede ocurrir que la actividad del promotor del gen Y2 sea tan débil que solo pueda ser visualizada en células de muy alta eficiencia de transfección como NIH3T3. b) La construcción que se utilizó para asociar el promotor del gen Y2 al gen CAT tal vez no sea apropiada para detectar su expresión (por defectos en la estructura del plásmido, ya que el mismo no fue testeado con otro promotor). Respecto de la influencia de la región "IFN-sensible" del gen Y2 sobre otros promotores, la misma no es capaz de conferir la propiedad de ser inducible por IFNα al promotor TK ni al LTR de RSV, mas aún, su presencia resulta en una disminución de actividad de los promotores ensayados.

Estudio de células Molt4 y mutantes YHHH por ensayos de transfección con promotores sensibles a IFNα

Este tipo de estudios fue diseñado con el objeto de observar si las diferencias en expresión de HLA entre celulas Molt4 y mutantes YHHH frente a la estimulación con IFNα se deben a la existencia en células YHHH de algún factor regulador de la expresión de HLA de acción en trans que presente aumentada su actividad respecto de Molt4. Esto significaría que la mutación responsable del fenotipo de alta respuesta en células YHHH se encontraría en algun gen regulador de la expresión, distante del gen cuya expresión visualizamos aumentada (Hipótesis II, sección 1. "Objetivos. Hipótesis de trabajo"). Para examinar esta posibilidad, se utilizó como estrategia introducir en células Molt4 y mutantes YHHH genes exógenos provistos de promotores de genes de H_2 sensibles a IFNα. Si la hipótesis planteada es correcta, se observarían diferencias en la expresión de este nuevo gen entre ambos tipos celulares al recibir una estimulación con IFNα. Se realizaron transfecciones de tipo transiente en células Molt4 y mutantes YHHH utilizando como indicador de actividad del promotor ensayado el gen CAT (cloramfenicol-acetiltransferasa) y estimulando las células transfectadas con distintas dosis de IFNα.

Transfecciones en células Molt4 y mutantes YHHH

Las líneas celulares Molt4 e YHHH son células linfoideas tipo T, que presentan la característica de crecimiento en suspensión y no puede emplearse para ellas el método de transfección mas corriente que es el de precipitación del DNA con fosfato de calcio. El método indicado para transfectar células en suspención es el de DEAE-dextrano (Gorman, 1985), que presenta 2 desventajas respecto del caso de transfectar células de tipo fibrobasto por el método de precipitación con fosfato: la eficiencia de transfección obtenida es menor y ademas disminuye en forma significativa la viabilidad celular. Esto hizo que fuera necesario realizar muchos ensayos para ajustar las condiciones de transfección en células Molt4 e YHHH, ya que se presentaron varios problemas (que afortunadamente pudieron solucionarse).

En primer término se realizaron varios experimentos de transfección utilizando el plásmido RSVCAT (contiene el LTR del virus del sarcoma de Rous asociado el gen CAT) que presenta la característica de tener muy alta expresión en muchas líneas celulares.

Un ejemplo del tipo de experimentos realizados se observa en la figura 17 donde se ensayan diferentes tiempos de tratamiento con DEAE-dextrano, diferentes concentraciones de DEAE-dextrano, diferentes cantidades de DNA plasmídico, tratamiento con cloroquina posterior a la transfección y efecto de un shock eléctrico proveniente de una unidad piezoeléctrica. En todos los casos la cantidad de células transfectadas es 2. 10^6 y el DNA del plasmido es purificado a través de un gradiente de ClCs. Los ensayos enzimáticos se realizan con cantidades equivalentes de proteinas.

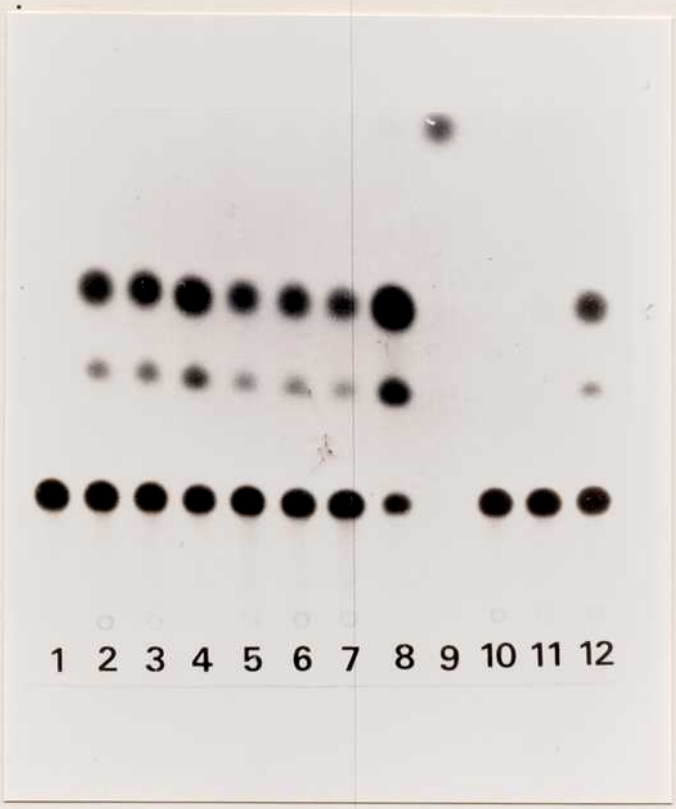


Figura 17

DEAE-dextrano µg/ml	Tiempo de incubación	DNA RSVCAT µg/ml	Cloroquina0,1mM tpo.
1. 300	30'	-	-
2. 300	30'	1	-
3. 300	45'	1	-

4. 300	60'	1	
5. 500	30'	1	-
6. 300	30'	1	1h.
7. 300	30'	1	5h.
8. 300	30'	10	-
9.Control bact.		-	
10.Shock eléct.10 pulsos	5'	1	
11.Shock eléct. 30 pulsos	5'	1	
12.Shock elect. 10 pulsos+50μg/ml DEAE-dextrano	5'	1	

Puede observarse que las condiciones más eficiente resultaron una concentración de DEAE-dextrano de 300μg/ml, con 10μg de DNA por ensayo y una incubación de 60' (lineas 4 y 8). El tratamiento con cloroquina (inhibidor de enzimas lisosomales) posterior a la transfección no mejora la actividad observada (lineas 6 y 7). El shock eléctrico resultó eficiente solo en presencia de 50 μg/ml de DEAE-dextrano (linea 12). De acuerdo a estos resultados, las condiciones de transfección que se eligieron fueron 300 μg/ml de DEAE-dextrano, con 10 μg de DNA durante 60' de incubación. Se realizaron también ensayos para optimizar las condiones del ensayo de actividad de CAT (ensayo enzimatico), se observó que puede usarse hasta 1/2 del volumen de reacción de extracto celular sin que se existan problemas de inhibición.

Usando las condiciones descriptas comenzaron a realizarse ensayos con el plásmido H_2K^bCAT. El mismo contiene el promotor completo del gen H_2K^b (-1900 a +10) asociado al gen CAT. El gen H_2K^b resulta el homólogo murino de HLA-A y su expresión aumenta por acción del IFNα (Israel, 1986). Se conoce además su secuencia y se ha estudiado su estructura y caracteristicas funcionales en detalle (Kimura, 1986). Observamos en la figura 18 un esquema del promotor y "enhancers" del gen H_2K^b.

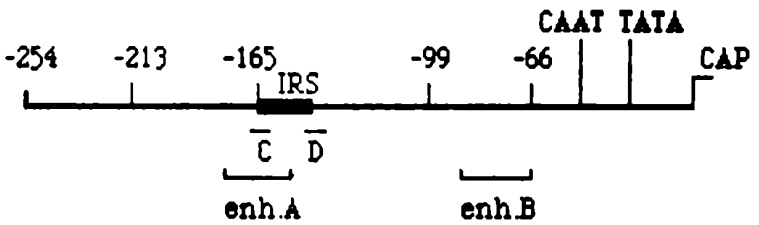


Figura 18

Esquema del promotor y regiones regulatorias del gen H_2K^b

La zona denominada IRS es la llamada secuencia "IFN-sensible", responsable del aumento de transcripcion del gen H_2K^b frente al estímulo con IFNα. Las zonas indicadas como "enh. A" y "enh. B" son dos "enhancers" que pueden producir aumento de la transcripcion sobre promotores heterólogos (promotor de conalbúmina, Kimura,1986). Se han descripto también zonas de unión de nucleasas que se superponen con la zona "IFN-sensible", la zona C (unión de H_2TF1, Baldwin, 1987) y la zona D (unión de IBP1, Blanar, 1989). Se ha demostrado además que este promotor es activo en líneas celulares humanas (Hela. Israel, 1986).

Con el plásmido H_2K^bCAT se realizaron treansfecciones en células Molt4 y mutantes YHHH en las condiciones que se describieron anteriomente y en este punto comenzaron a surgir inconvenientes: En primer lugar se observó que al realizar transfecciones con el plásmido H_2K^bCAT las células presentaban un daño muy severo, recuperándose muy pocas células viables (medidas por incorporación de azul tripán) al final del tratamiento con DEAE-dextrano. Se ensayaron distintas preparaciones del plásmido H_2K^bCAT, inclusive utilizando distintas sales (NaAc, KAc, NH_4Cl) para precipitar el DNA del plasmido en los pasos finales de la purificación, pero siempre se observaba el mismo fenomeno , el cual además nunca había sucedido con el plásmido RSVCAT. Para solucionar este problema debieron realizarse 2 gradientes de ClCs consecutivos para purificar el DNA del plásmido; se consiguió así tener una viabilidad adecuada (50%).

El segundo problema que surgio al transfectar el plásmido H_2K^bCAT fue que no podia observarse actividad del mismo, aun en presencia de estimulación con IFNα, a

pesar de que las células resistían perfectamente el tratamiento con DEAE-dextrano. Por este motivo se decidió comprobar la actividad del plásmido H_2K^bCAT en otras líneas celulares y descartar así problemas en su estructura. Se realizó una transfección de tipo transiente en células NIH3T3 (fibroblastos de ratón) y H_4II (hepatoma de ratón) por el método de precipitación con fosfato. El resultado se observa en la figura 19.

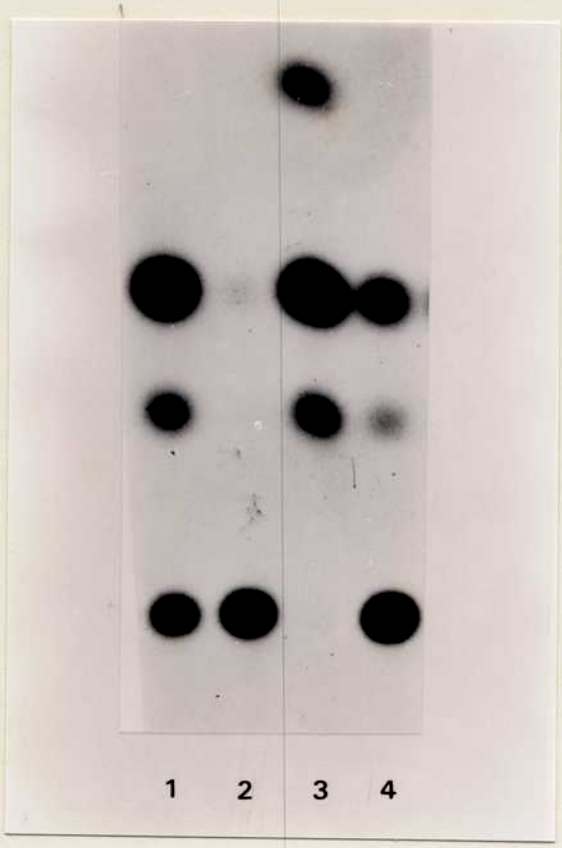


Figura 19

1- H4II transfectadas RSVCAT
2- H4II transfectadas H_2K^bCAT
3- NIH3T3 transfectadas RSVCAT
4- NIH3T3 transfectadas H_2K^bCAT

Como puede observarse en la figura 19, el plásmido H_2K^bCAT resultó activo tanto en células NIH3T3 como en células H_4II (líneas 2 y 4), si bien en este último caso la actividad es muy baja. Esto implica que la falta de actividad observada en células Molt4 y mutantes YHHH se debió a problemas en el método de transfección y no en la estructura del plásmido.

Se decidió entonces probar la actividad de este plásmido en células Molt4 y mutantes YHHH realizando un tratamiento con IFNα durante 48 hs. previas a la tranfección y 48 hs. posteriores a la misma. El tratamiento con IFNα previo a la transfección tuvo por objeto conseguir que los factores responsables del aumento de expresion de genes de HLA ya se encuentren inducidos en el momento de realizar la transfección. Este tipo de estrategia tampoco tuvo efecto, ya que no pudo observarse actividad del plásmido H_2K^bCAT. Además se observó para el plásmido RSVCAT que el tratamiento previo con IFNα disminuyó notablemente la eficiencia de transfeccion, por lo que se descartó la posibilidad de realizar pretratamientos con IFNα.

Finalmente, para poder observar actividad del plásmido H_2K^bCAT en células Molt4 y mutantes YHHH el protocolo de transfección debió ser modificado de la siguiente manera. En lugar de transfectar $2 \cdot 10^6$ celulas con 10 μg de DNA por ensayo, debieron transfectarse $20 \cdot 10^6$ células con 100 μg de DNA por ensayo. Solo en estas condiciones pudo observarse actividad del plásmido H_2K^bCAT en células Molt4 y mutantes YHHH y realizar el experimento de comparación de actividad del mismo en ambos tipos celulares en presencia de distintas dosis de IFNα. El resultado se observa en la figura 20. Los ensayos enzimaticos se realizaron con cantidades equivalentes de proteinas, salvo en el caso de las líneas 5 y 10, donde se emplea la cuarta parte de la cantidad utilizada en los otros casos.

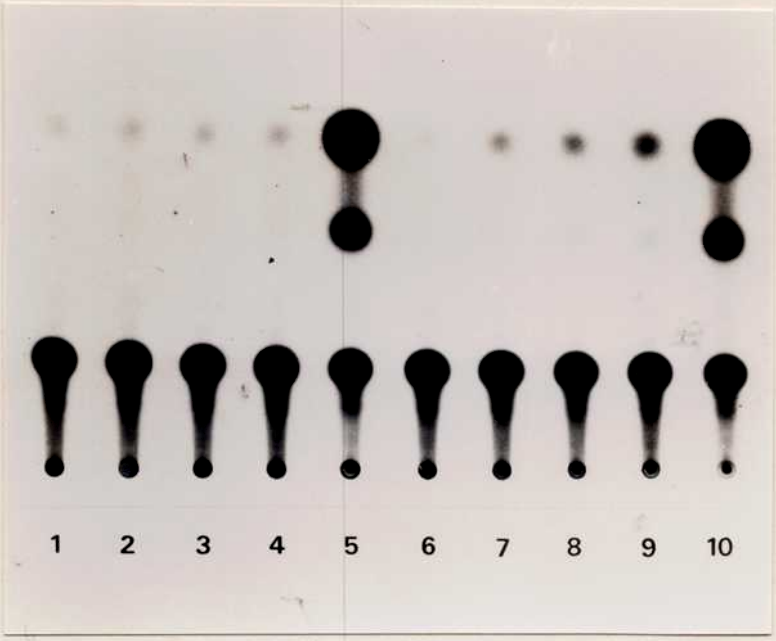


Figura 20

1- Molt 4 transfectadas H_2K^bCAT
2- Molt 4 transfectadas H_2K^bCAT + 200 U/ml IFN
3- Molt 4 transfectadas H_2K^bCAT + 500 U/ml IFN
4- Molt 4 transfectadas H_2K^bCAT + 2000 U/ml IFN
5- Molt 4 transfectadas RSVCAT
6- YHHH transfectadas H_2K^bCAT
7- YHHH transfectadas H_2K^bCAT + 200 U/ml IFN
8- YHHH transfectadas H_2K^bCAT + 500 U/ml IFN
9- YHHH transfectadas H_2K^bCAT + 2000 U/ml IFN
10- YHHH transfectadas RSVCAT

Puede verse que la actividad del plasmido H_2K^bCAT es similar en células Molt4 y mutantes YHHH cuando no existe estimulación de IFNα (líneas 1 y 6), pero al recibir

diferentes dosis de IFNα la actividad resulta siempre mayor en células YHHH (líneas 2, 3, 4 y líneas 6, 7, 8) La mayor diferencia de actividad entre células Molt4 y mutantes YHHH se observa para una dosis de 2000 U/ml de IFNα. La eficiencia de transfección es similar para ambas líneas celulares, según se observa para el plásmido RSVCAT (líneas 5 y 10). En el caso del plásmido RSVCAT las transfecciones se realizaron con 5. 10^6 células por ensayo.

El resultado obtenido en este experimento parece confirmar la hipótesis de que la mutación responsable del fenotipo de alta respuesta en células YHHH se encuentra en algún gen regulador de la expresión de HLA, cuya acción se ejerce en trans sobre la transcripcion de los genes de HLA. Esta característica de acción en trans hace que sea posible la visualización del efecto sobre la actividad de un gen introducido en forma exógena (H_2K^bCAT).

Este resultado implica un acercamiento a la caractetrización molecular de la mutación responsable del fenotipo de alta respuesta observado en células YHHH frente a la estimulación con IFNα.

El factor de acción en trans responsable del fenotipo observado podría presentarse en mayor cantidad en células YHHH (cambio cuantitativo) debido a alguna mutacion relacionada con la región reguladora de su expresión, o poseer mayor afinidad por la región reguladora de la expresión del gen H_2K^b por algún cambio en su estructura (cambio cualitativo).

Con el objeto de mapear la zona del promotor del gen H_2K^b sobre la cual actua el factor de acción en trans con actividad diferencial en células YHHH, se realizó un ensayo de transfeccion similar al anterior utilizando el plásmido H_2K^bCAT y el plasmido $pSV\Delta H_2$. Este último plasmido contiene solo la región promotora del virus SV40 asociada al gen CAT (repetición de 21 pb entre posiciones -198 a +1 de pSV2CAT, se ha delecionado la zona "enhancer" constituida por la repetición de 72 pb, Gorman, 1985). Como "enhancer" se ha insertado un fragmento de 127 pb del promotor del gen H_2K^b que contiene la region "IFN-sensible" (posiciones -216 a 189). Esta zona ha sido descripta como necesaria y suficiente para observar inducción por IFNα de la actividad del promotor de conalbumina (Israel, 1986) Se realizo una transfeccion de tipo transiente en celulas Molt4 y mutantes YHHH con los plásmidos mencionados, sin y con estimulación de una dosis de 2000 U/ml de IFNα.

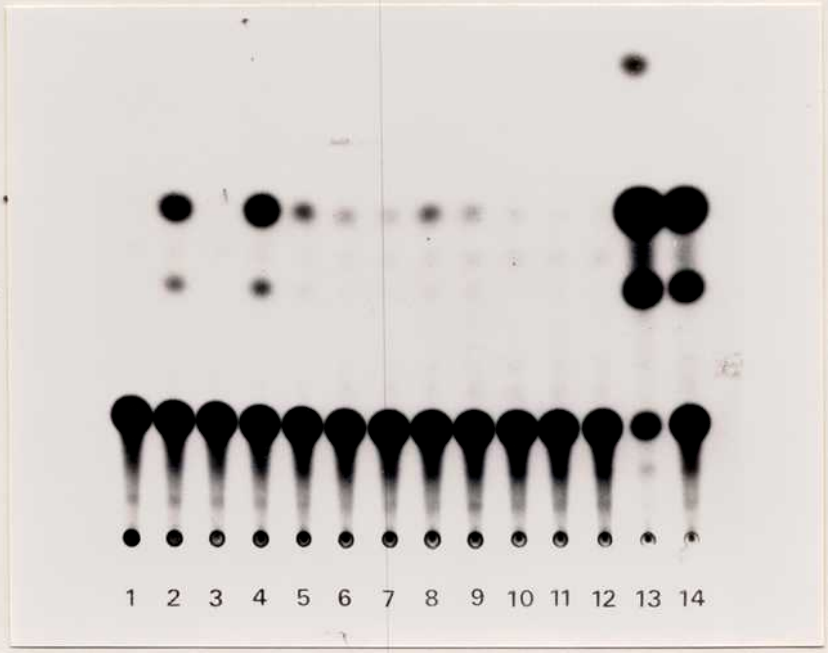


Figura 21

1- Molt4 transfectadas H_2K^bCAT
2- Molt4 transfectadas H_2K^bCAT + 2000 U/ml IFNα
3- YHHH transfectadas H_2K^bCAT
4- YHHH transfectadas H_2K^bCAT + 2000 U/ml IFNα
5- Molt4 transfectadas pSVΔH_2
6- Molt4 transfectadas pSVΔH_2 + 2000 U/ml IFNα
7- YHHH transfectadas pSVΔH_2
8- YHHH transfectadas pSVΔH_2 + 2000 U/ml IFNα
9- Molt4 transfectadas pSVΔ
10- Molt4 transfectadas pSVΔ + 2000 U/ml IFNα
11- YHHH transfectadas pSVΔ
12- YHHH transfectadas pSVΔ + 2000 U/ml IFNα
13- Molt4 transfectadas RSVCAT
14- YHHH transfectadas RSVCAT

Como puede observarse, para el promotor completo del gen H_2K^b (líneas 1, 2, 3 y 4) se confirma el resultado anterior esto es, la actividad del plásmido H_2K^bCAT es mayor en células YHHH al recibir una estimulación con IFNα En este experimento la eficiencia de transfeccion de las células Molt4 fue superior al de las mutantes YHHH (plásmido RSVCAT, líneas 13 y 14), esto implica que la diferencia de actividad observada en las líneas 2 y 4 es en términos reales aún mayor. Realizando un conteo de radioactividad de ^{14}C-cloramfenicol para las líneas 2, 4, 13 y 14 observamos que:

	^{14}C-cloram. no convert (cpm)	^{14}C-cloram. convert. (cpm)	Porcentaje de conversión	Valor corregido relativo
2- Molt4 H_2K^b +	139.329	2 846	2%	1
3- YHHH H_2K^b +	130 647	5 636	4%	6,4
13-Molt4 RSV	5.412	136.678	96%	
14-YHHH RSV	103.850	43.696	29%	

$$\text{Valor relativo corregido} = \frac{\%\ \text{Conv. X (H-2)}}{\%\ \text{Conv. X (H-2)}} \cdot \frac{\%\ \text{Conv. M4 (RSV)}}{\%\ \text{Conv. X (RSV)}}$$

Tabla 2

La eficiencia de transfección para células Molt4 fue superior a la de mutantes YHHH (para el plasmido RSVCAT el porcentaje de converción de ^{14}C-cloramfenicol a formas acetiladas fue de 96% en celulas Molt4 y 30% en mutantes YHHH), siendo la diferencia entre ambos tipos celulares de 3 veces a favor de células Molt4. Si consideramos este factor para el plasmido H_2K^bCAT, los valores de conversión de 2% para células Molt4 y 4% para mutantes YHHH se transforman en 2% y 12% respectivamente, lo cual implica un aumento de 6 veces en actividad del plásmido H_2K^bCAT en mutantes YHHH respecto de celulas Molt4.

Para el plásmido pSVΔH_2 no pudo observarse un resultado similar, esto es, la actividad en células Molt4 es semejante a la actividad en mutantes YHHH, sin y con estimulación de IFNα (líneas 5, 6, 7 y 8) Esto implica que no solo no puede observarse diferencia de actividad entre células Molt4 y mutantes YHHH sino que tampoco puede verse el fenomeno de inducción por IFNα para un mismo tipo celular. Esto resulta contradictorio con los resultados ya descriptos (Israel, 1986), en los cuales se observa que un fragmento similar obtenido del promotor del gen H_2K^b (posición -216 a -100) es capaz de conferir al promotor de conalbúmina la propiedad de ser inducible por IFNα por transfección en células Ltk$^-$ Lo que si parece observarse es un ligero efecto "enharcer" del fragmento de 127 pb al comparar el plásmido pSVΔH_2 (líneas 5, 6, 7 y 8) con el plásmido pSVΔ que no contiene dicho fragmento (líneas 9, 10, 11 y 12). La falta de inducción por efecto del IFNα observada para el plásmido pSVΔH_2 podría deberse a 2 motivos. Por un lado la propiedad de ser inducible por IFNα tal vez pueda ser conferida al promotor de conalbumina, pero no al promotor de SV40 (sin embargo un fragmento similar del gen H_2L^d, entre posiciones -210 a -121, puede conferir dicha propiedad a la secuencia repetitiva de de 21 pb de SV40 utilizada como promotor, por ensayos de transfección en células NIH3T3; Sugita, 1987). Por otro lado, la región utilizada como "enharcer" en los ensayos realizados (posicion -216 a -89) tal vez sea suficiente para conferir la propiedad de ser inducible por IFNα al ser transfectado en células de tipo fibroblastos murinos, pero no en células de tipo linfoideo humanas como Molt4 e YHHH.

Los resultados observados con el plásmido H_2K^bCAT implican que la mutación responsable del fenotipo de alta respuesta observado en mutantes YHHH se encuentra en algún factor de accion en trans sobre los genes de HLA clase I. Dicho factor con actividad diferencial en mutantes YHHH podría presentar un cambio cuantitativo (que las mutantes YHHH posean mayor cantidad de este factor respecto de células Molt4) o cualitativo (que el factor presente en las mutantes posea mayor afinidad por la región reguladora que el factor presente en las células parentales). Lamentablemente, los ensayos realizados con el plasmido pSVΔH_2 no permitieron precisar la region del promotor H_2K^b sobre la que actúa el factor con acción diferencial en células Molt4 y mutantes YHHH.

Plásmidos utilizados

Durante el desarrollo de la presente Tesis se utilizaron varios plásmidos, algunos cedidos por otros investigadores y otros cuya construcción fue parte del trabajo realizado. Se presenta aquí una descripcion de todos ellos:

pH5RN6: Contiene un fragmento de 1200 pb del extremo 5' no codificante del pseudogen HLA 12.4 (Malissen. 1982). subclonado en el vector M13mp18. Este clon se extiende desde un sitio EcoR1 (extremo 5') hasta un sitio Nar1 (extremo 3') que coincide con el ATG iniciador de la traducción (aproximadamente posiciones -1200 a +3). Se desconoce si discrimina especificidad HLA-A, B, C

pBB1 Comprende una zona de 450 pb que codifica para el dominio α2 del pseudogen HLA 12 4 (posiciones +565 a +1024 respecto de ATG iniciador, Malissen, 1979), subclonado en el vector M13mp8. No discrimina especificidad HLA-A, B, C.

pB3UT: Contiene un fragmento de 358 pb del extremo 3' no traducido del gen HLA-B8 La secuencia de esta sonda comienza a continuación del dominio citoplasmático del cDNA del cual fue aislada (Koller. 1984). Este fragmento fue subclonado en el vector pUC9. Reconoce especificidad HLA-B.

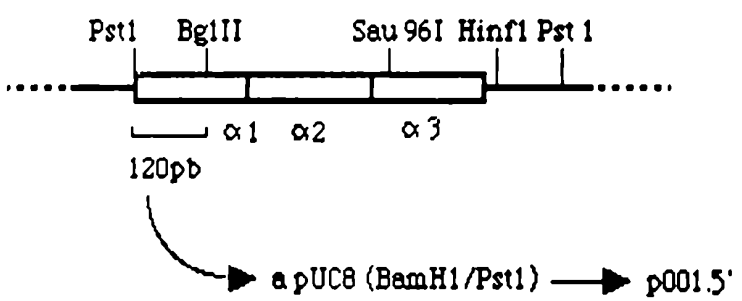
p001: Contiene un clon de cDNA del gen HLA-B7 de 1400 pb (Sood, 1981) que comprende toda la región codificante del mismo Presenta hibridización positiva con todos los genes de HLA clase I (no discrimina especificidad HLA-A, B, C) y se encuentra clonado en pBR322.

H_2K^bCAT. Contiene como promotor la region 5' del gen H_2K^b (posición -1900 a posición +10) asociado al gen CAT El gen H_2K^b resulta el homólogo murino de HLA-A y su expresion aumenta por accion del IFNα (Israel. 1986)

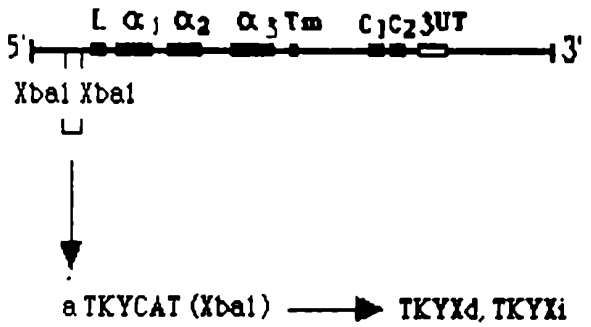
RSVCAT. Contiene como promotor la zona LTR del virus del sarcoma de Rous, asociado al gen de cloramfenicol acetiltransferasa (CAT) (Gorman. 1982).

pKG5. Contiene el gen de neomicina asociado al promotor de timidina kinasa (TK) del virus de Herpes simplex. Confiere resistencia al antibiótico G-418 (geneticin). (Gorman, 1985).

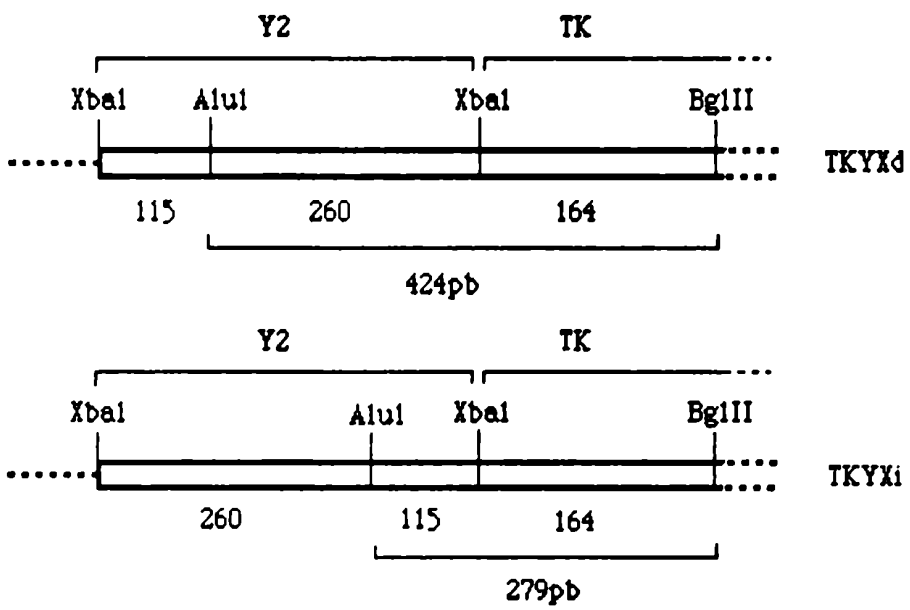
p001.5'. Contiene un fragmento de 120 pb de la región 5' no traducida del plásmido p001. El subclonado de este fragmento se realizó de la siguiente manera: Se mapeó el plásmido p001 por corte con Pst1, Hinf1 y Bgl II y se determinó por análisis en gel de agarosa 1.2% que existe un sitio Bgl II a 120 pb de extremo 5' del clon p001 (sitio Pst1). El sitio Pst1 se encontraría al comienzo del dominio α1 y el sitio BglII coincidiría con el aminoacido 64 del dominio α1. Se purificó el fragmento de 120 pb en gel de poliacrilamida 5% y se subclonó en el vector pUC8.



TKYXd, TKYXi. Estos plásmidos fueron construidos utilizando como base el plásmido TKYCAT, el cual contiene el promotor de timidina kinasa (TK) del virus de Herpes simplex (Mc Knight, 1982), asociado al gen de cloramfenicol acetiltransferasa (CAT). En la región 5' adyacente al promotor TK existen sitios de clonado donde se insertó el fragmento de 375 pb proveniente del gen Y2 que contiene la región "IFN-sensible". Para certificar la orientacion del fragmento de 375 pb (TKYXd: 5'-->3', TKYXi: 3'<--5'), se utilizo un sitio Alu1 interno a dicho fragmento y un sitio Bgl II interno al promotor TK (corte con Bgl II, "fill in" con dCTP-^{32}P y posterior corte con Alu1). Los fragmentos producidos se separaron en gel de poliacrilamida 5% y el resultado se reveló por autorradiografía.

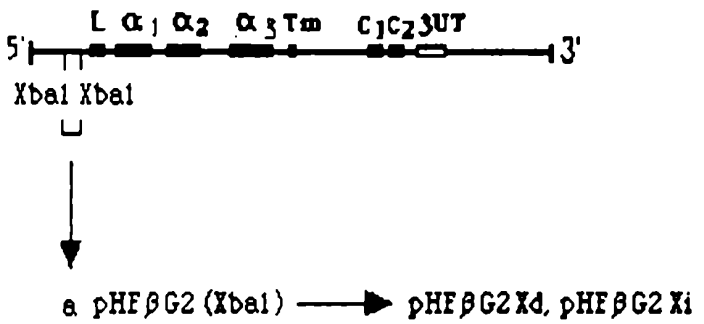


Análisis de orientación:

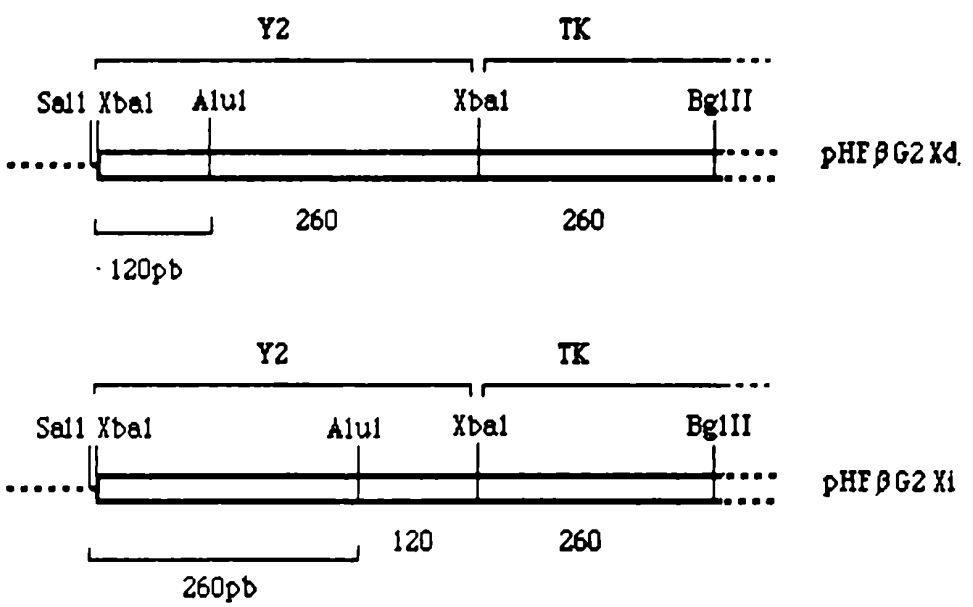


<u>pHFβG2Xd, pHFβG2Xi</u>. Estos plásmidos fueron construidos utilizando como base el plásmido pHFβG2, que contiene el promotor TK asociado al gen de βgalactosidasa (Masli,1984). En la región 5' adyacente al promotor TK existen sitios de clonado donde se insertó el fragmento de 375 pb proveniente del gen Y2 que contiene la región "IFN-sensible" Para certificar la orientacion del fragmento de 375 pb (pHFβG2Xd: 5'-->3', pHFβG2Xi: 3'<--5), se utilizó un sitio Alu1 interno a dicho fragmento y un sitio Sal1 correspondiente a la zona de clonado del plásmido pHFβG2 (corte con Sal1, "fill in" con

dCTP-^{32}P y corte con AluI). Los fragmentos producidos se separaron en gel de poliacrilamida 5% y el resultado se revelo por autorradiografía.

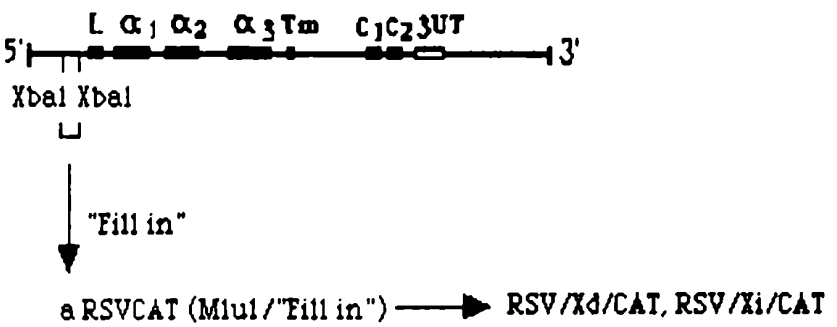


Análisis de orientación

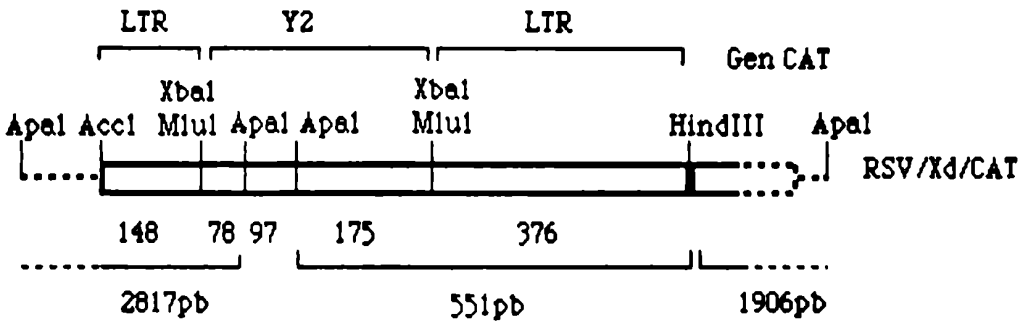


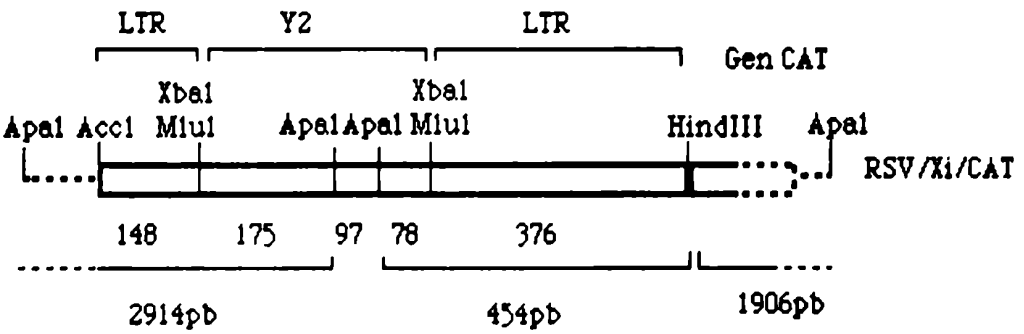
RSV/Xd/CAT: Este plásmido fue construido insertando el fragmento de 375 pb proveniente del gen Y2 que incluye la región "IFN-sensible" en la zona LTR del

plásmido RSVCAT. Para esto fue utilizado un sitio Mlu1 ubicado en posición -376 respecto del sitio HindIII donde se encuentra unido este LTR al gen CAT (se conserva la region promotora ubicada en -70 respecto del mismo sitio, Yamamoto, 1980). La orientación del fragmento de 375 pb se verificó por corte con HindIII y Apa1 y posterior análisis en gel de agarosa 1, 2%.

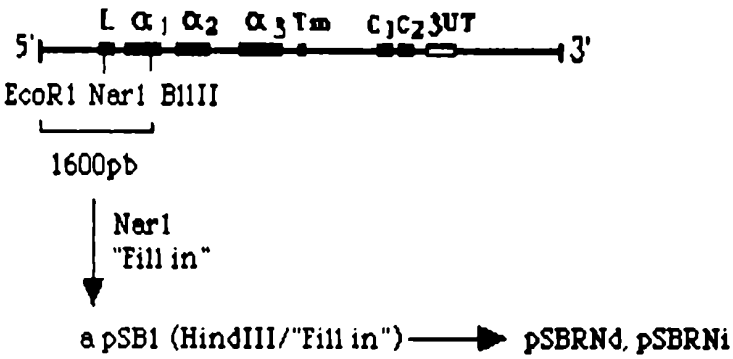


Análisis de orientacion.

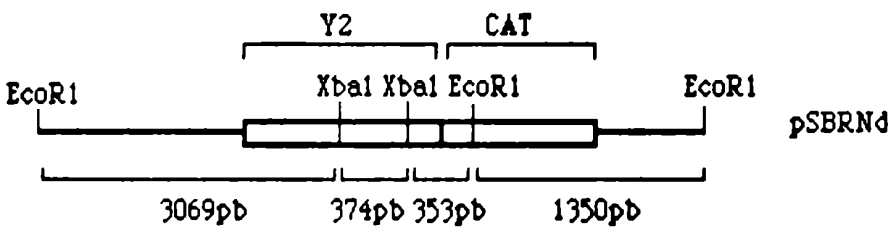


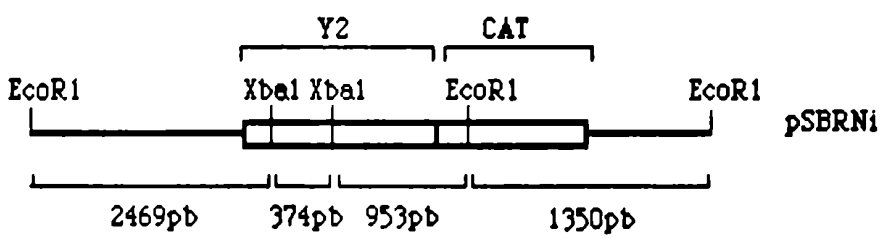


<u>pSBRNd, pSBRNi</u>: Contienen el promotor completo del gen Y2 (posición -1230 a posición +12) asociado al gen CAT Para construir este plásmido se digirió el gen Y2 con EcoR1 y BglII, se purificó el fragmento producido de 1600 pb en gel de agarosa 1%, se digirió luego con Nar1 y se realizó "fill in" del producto de la digestión. El producto obtenido fue clonado en el plasmido pSB1 (Yaniv M., comunicación personal) cortado por HindIII y completado por "fill in" El plásmido pSB1 contiene el gen CAT, la señal de poliadenilación de SV40 y presenta una deleción entre posiciones 1095 a 2485 (pBR322) donde podria existir una secuencia que hace disminuir la actividad transcripcional de plasmidos transfectados en celulas eucarioticas. La orientación del promotor (pSBRNd: 5'-->3', pSBRNi 3'<--5') fue verificada por corte con EcoR1 y Xba1 y posterior análisis en gel de agarosa 1%

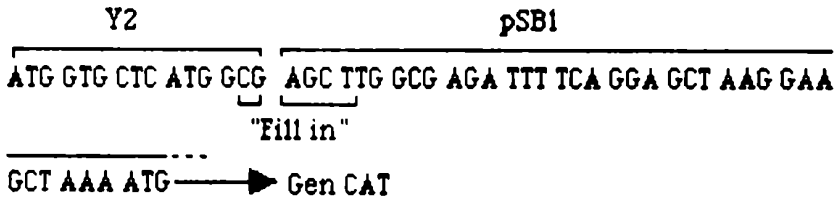


Análisis de orientación:

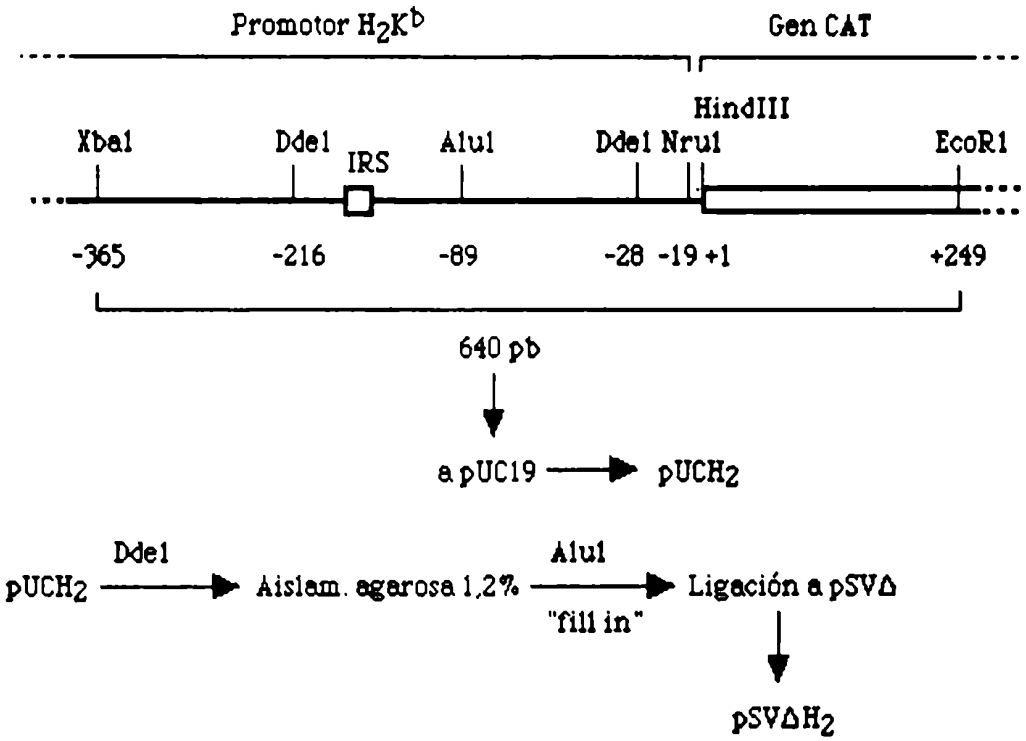


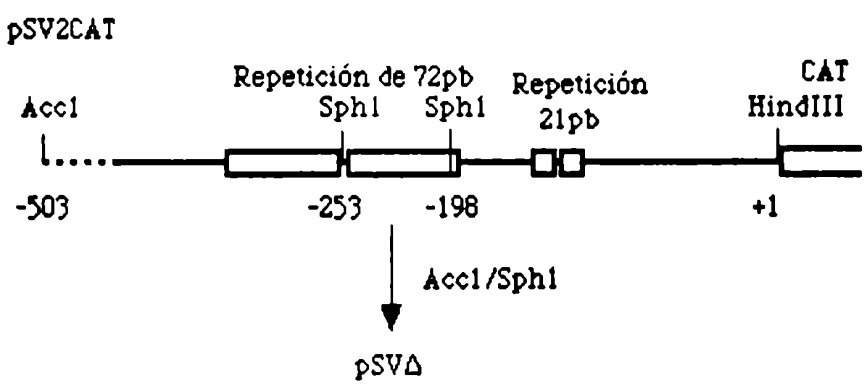


El fragmento EcoR1/Nar1 proveniente del gen Y2 contiene el promotor completo de dicho gen y además incluye los 5 primeros aminoácidos. El hecho de incluir estos aminoacidos no debiera interferir con la correcta expresión del gen CAT, ya que por la forma que se realiza el clonado (corte del gen Y2 con Nar1, corte de pSB1 con HindIII y "fill in" de fragmento y vector) la secuencia nucleotídica queda en fase, según se observa en el esquema:

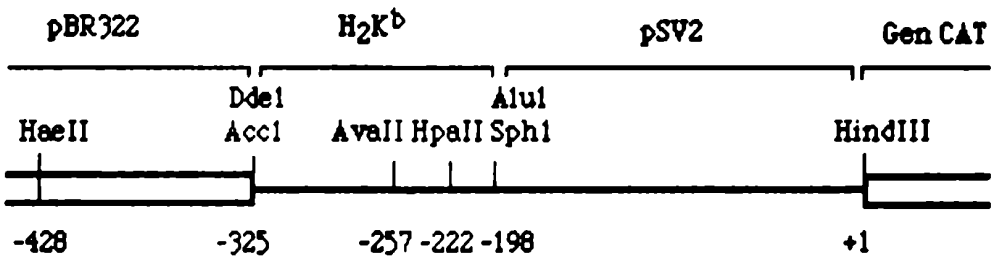


pSVΔH2: Contiene la región promotora del virus de SV40 asociada al gen CAT y como "enhancer" un fragmento de 127 pb que incluye la región "IFN-sensible" del promotor del gen H_2K^b Este plasmido fue construido de la siguiente forma: Un fragmento de 614 pb del plásmido H_2K^bCAT (sitio Xba I del promotor H_2K^b hasta sitio EcoR I del gen CAT) fue subclonado en el vector pUC19 El plasmido resultante ($pUCH_2$) fue digerido con Dde I y se aislaron todos los fragmentos producidos menores de 350 pb en gel de agarosa 1,2%. La mezcla de fragmentos obtenida fue digerida con Alu I y luego de realizado "fill-in" con dNTPs, fue ligada con el plásmido pSVΔ. El plásmido pSVΔ deriva del plásmido pSV2CAT, que fue digerido con Acc I y Sph I para eliminar la zona "enhancer" y conservar la zona promotora constituida por la secuencia repetitiva de 21 pb. El análisis de las placas obtenidas luego de transformada la ligación se realizó mediante hibridización "in situ" del DNA, utilizando como sonda un fragmento de 346 pb del promotor del gen H_2K^b (sitio Xba I hasta sitio Nru I, posiciones -365 a -19). El análisis de las colonias obtenidas fue confirmado por corte con Hinc II y técnica de Southern usando la misma sonda que para el analisis de las colonias bacterianas. Posteriormente se realizaron otros análisis de orientacion y confirmación de la estructura de los plásmidos obtenidos por corte con Hind III, "fill in" con ^{32}P-dNTPs, corte con Hpa II, Hinf I y Hae II (separadamente) y separación en gel de acrilamida 6% de los fragmentos obtenidos. También se ralizaron cortes con Ava II y separación en gel de agarosa 1%.


Promotor H_2K^b
Gen CAT
HindIII
Xba1
Dde1
IRS
Alu1
Dde1
Nru1
EcoR1
-365
-216
-89
-28
-19
+1
+249
640 pb
a pUC19
$pUCH_2$
Dde1
$pUCH_2$
Aislam. agarosa 1,2%
Alu1
"fill in"
Ligación a pSVΔ
$pSV\Delta H_2$


pSV2CAT
Repetición de 72pb
Repetición
21pb
CAT
Acc1
Sph1
Sph1
HindIII
-503
-253
-198
+1
Acc1/Sph1
pSVΔ

Esquema para el análisis de orientación:



Discusión

Durante el presente trabajo se han tratado de estudiar los mecanismos que producen una diferente expresion de los genes de HLA clase I como respuesta el tratamiento con IFNα entre células Molt4 y mutantes YHHH. Esto fue encarado a través de 2 estrategias diferentes, orientadas a contemplar 2 hipótesis que podrían explicar el fenómeno observado. En primer, lugar se realizaron estudios sobre los genes de HLA de células YHHH, para investigar si la caracteristica de alta expresión de antigenos HLA-B como respuesta al tratamiento con IFNα era debido a una particularidad del gen que presenta aumentada su expresión. Esta estrategia se orientó a realizar el clonado y estudio de genes de HLA-B a partir de células YHHH, los cuales resultan de interés particular por el hecho de no expresarse en células Molt4 y mutantes YHHH en ausencia de estimulación con IFNα y ser los que presentan un mayor aumento en su expresión como consecuencia del tratamiento. El estudio de los genes HLA-B hubiera permitido también, caracterizar con mayor presición el fenotipo expresado por las mutantes YHHH, ya sea por estudios de secuenciación del gen clonado o a través de transfecciones en otras lineas celulares y posterior detección con anticuerpos especificos. El hecho de obtener un gen HLA-B funcional mediante al primera estrategia mencionada hubiera permitido además, realizar los estudios de transfección de promotores sensibles a IFNα en células Molt4 y mutantes YHHH usando un modelo homólogo. En segundo lugar, se realizaron estudios de actividad de los promotores de los genes H_2K^b e Y2 en células Molt4 y mutantes YHHH sin y con estimulación de IFNα, para observar si el fenómeno de alta expresion involucra algún factor de acción en trans sobre los genes de HLA.

<u>Estudio de los genes de HLA clase I de células Molt4 y mutantes YHHH. Clonado del gen Y2 y caracteristicas estructurales del mismo.</u>

El análisis por la técnica de Southern del DNA genómico de células Molt4 y mutantes YHHH se orientó a elegir una enzima que permitiera realizar una genoteca parcial a partir del DNA de mutantes YHHH. Las condiciones buscadas fueron que dicha enzima no produjera cortes internos a los genes de HLA-B y que el tamaño de los fragmentos producidos fuese adecuado para clonar en fagoλ. La enzima elegida fue EcoR1 y el tamaño del DNA a clonar se restringió a la fracción comprendida entre 9,6 y 6,7 Kb, ya que en ella se ubicaron los genes de HLA-B por mapeo mediante la técnica de

Southern. Esta estrategia coincidió con la descripta recientemente para el clonado de genes completos de HLA clase I. donde se seleccionan en gradiente de sacarosa fragmentos de DNA entre 6 y 8 Kb producidos por EcoR1 para construir genotecas parciales en fagoλ (Parham, 1989) A partir de la genoteca contruida en fago λgtWES pudieron aislarse 3 clones de genes HLA positivos para la sonda p001 (clones Y1, Y2, Y7). Dos de estos clones resultaron positivos también para la sonda pB3UT (clones Y1 e Y2) y con ellos se realizaron los estudios posteriores, ya que probablemente contuvieran genes de HLA pertenecientes al locus B. Para el clon Y1 no pudo obtenerse un mapa aproximado de restricción como conclusión del estudio realizado, ya que no presentó hibridizacion para la sonda p001.5' y ademas resultó no tener sitio de corte para las enzimas Xba I, Sma I y Pvu I Las caracteristicas observadas para el clon Y1 no coincidieron con las descriptas para la generalidad de los genes de HLA clonados, en cuanto a la falta de sitios de restricción para las enzimas mencionadas (Jordan,1985, Malissen, 1982, Wais,1985) y la posible ausencia de su exón correspondiente al dominio α1 (o falta de homologia con otros genes de HLA clonados, aunque la primera parte del dominio α1 resulta bastante conservada entre los genes de HLA clase I, Parham, 1988). Por estos motivos los estudios siguientes se centraron en el clon (o gen) Y2.

El gen Y2 respondio en sus caracteristicas estructurales a las descriptas para la mayoría de los genes de HLA clase I clonados, en su organización de exones e intrones, su estructura primaria (analizada por el Lic. Ariel Wilner) y su localización de sitios de restricción conservados para genes de HLA clase I (EcoR1, Xba1, Kpn1, Nar1, BglII, Pst1 y Sma1). En su region 5' no traducida presentó los sigientes elementos: En posición -50 (respecto de ATG iniciador) se ubica el "TATA-box", de tipo TCTAAA como en la mayoría de los genes de HLA clase I (Guillemot, 1988) y en posición -76 se ubica el "CAAT-box". En posición -190 se encuentra la secuencia "IFN-sensible", que resultó homóloga a las secuencias de este tipo presentes en los genes de H_2K^b (Israel, 1986), H_2L^d (Sugita, 1987), H_2D^d (Korber, 1988), gen 6-16 (Porter, 1988), gen ISG-15 (Reich, 1987) y gen de 2'-5' oligoA-sintetasa (Cohen, 1988) La región "IFN-sensible" del gen Y2 se halla superpuesta ademas con 2 regiones descriptas para la unión de las proteinas H_2TF1 (presente en los genes HLA-A2, HLA-A3, H_2L^d, H_2D^d, 6-16, 2'-5' oligoAsintetesa, ISG-15, ISG-54, Baldwin, 1987) e IBP1 (presente en los genes H_2K^b y "enharcer" de 72 pb de SV40, Blanar, 1989, H_2K^d, Kvist, 1983, HLA-A3, Strachan, 1984 y H_2L^d, Shirayoshi, 1987).

Las caracteristicas mencionadas indicaron que el gen Y2 podría ser un gen funcional, que podria codificar para una especificidad hasta ahora no clonada ni secuenciada. Sin embargo, mediante el análisis de su secuencia no pudo determinarse si la misma correspondia a un gen HLA-A, B, o C (por comparación con secuencias de

genes de HLA clase I clonados). De todas maneras, el gen Y2 presentó hibridización positiva con la sonda pB3UT. lo cual indicaría que se trata de un gen HLA-B.

Características funcionales del gen Y2

Este análisis fue realizado a través de transfecciones en diferentes líneas de células eucarióticas A) Transfecciones del gen Y2 completo, B) Transfecciones del promotor completo del gen Y2 asociado al gen CAT. C) Transfecciones de plásmidos con distintitos promotores a los que se les asoció el fragmento Xba1-Xba1 de 375 pb proveniente de la región 5' no traducida del gen Y2 (que contiene la región "IFN-sensible").

A continuacion se observa nuevamente la tabla 1, que resume los experimentos de transfeccion realizados con el gen Y2

Plásmido	Región Reguladora	Promotor	Tipo de Transfec.	Células	IFN	Ensayo	Resultado
Gen Y2 (pBR322)	Y2	Y2	Estable	Ltk		Inmunof. YTH/76	
Gen Y2 (pBR322)	Y2	Y2	Trans.	NIH3T3		Detección mRNA	+ (1)
Gen Y2 (pBR322)	Y2	Y2	Trans.	J26	- y +	Inmunof. YTH/76 W6/32	
pSBRNd	Y2	Y2	Trans.	YHHH J26	- y + - y +	CAT CAT	
TKYXd	Y2	TK	Trans.	YHHH	- y +	CAT	+ (2)
RSV/Xd/CAT	Y2	LTR RSV	Trans.	YHHH	- y +	CAT	+ (3)

(1) Se detecta débilmente mRNA para el caso del promotor completo del gen Y2.

(2) Se detecta débilmente actividad de CAT en igual nivel sin y con tratamiento de IFN.

(3) Se detecta actividad de CAT en igual nivel sin y con tratamiento de IFN.

Tabla I

A)Transfecciones del gen Y2 completo

Se realizaron transfecciones del gen Y2 completo en varios tipos celulares y utilizando 2 tipos de técnicas: transfecciones de tipo estable y transfecciones de tipo transiente. El objetivo de este estudio fue asegurar la funcionalidad del gen Y2 a través de la detección de su producto en la membrana de las células transfectadas. Por otra

parte, esta metodología hubiera permitido tipificar serologicamente el producto del gen Y2, mediante el uso de anticuerpos específicos.

Se realizó una transfeccion de tipo estable en células Ltk⁻ (fibroblastos de ratón), y se trató de detectar el producto del gen Y2 en la membrana de los clones obtenidos por inmunofluorescencia con el anticuerpo monoclonal YTH/76, pero el resultado fue negativo. Debido a esto se realizaron varias tranfecciones de tipo transiente en otras lineas celulares, para analizar si la falta de expresión del gen Y2 en células Ltk⁻ era debida a problemas inherentes a la estructura del gen Y2, falta de reconocimiento del producto del gen Y2 por el anticuerpo YTH/76, falta de expresión del gen Y2 en ausencia de estimulación de las células transfectadas con IFNα murino o incapacidad del gen Y2 para combinarse con β2-microglobulina de ratón. Se obtuvieron varias respuestas al utilizar la linea celular J26, que son células Ltk⁻ que han incorporado por transfección el gen de β2-microglobulina humana. Se realizó con ellas una transfeccion de tipo transiente del gen Y2, estimulando las células transfectadas con una dosis de 1000 U/ml de IFNα/β murino durante 24 hs. Luego se realizó inmunofluorescencia indirecta de superficie con los anticuerpos monoclonales YTH/76 y W6/32. El resultado observado fue tambien negativo, aún en presencia de estimulación con IFNα/β murino y de la posibilidad de combinación del gen Y2 con β2-microglobulina humana. Esto hizo descartar las posibilidades de falta de reconocimiento del gen Y2 por el anticuerpo YTH/76, falta de expresión en ausencia de estimulación con IFN e incapacidad de Y2 para combinarse con β2-microglobulina de ratón, por lo que el resultado observado se debio muy probablemente a problemas en el estructura del gen Y2.

Unicamente pudo obtenerse un resultado positivo al realizar una transfección de tipo transiente en células NIH3T3, detectando el mRNA del gen Y2 en las células transfectadas por la tecnica de "Dot-blot" (si bien la señal obtenida fue muy débil).

Los ensayos de transfección realizados con el gen Y2 completo indicaron que su producto no es detectable en la membrana de las células transfectadas, sean éstas Ltk⁻, NIH3T3 o J26, únicamente pudo detectarse mRNA proveniente de gen Y2 en células NIH3T3. Esto indicaría que el gen Y2 podría ser un pseudogen, ya que su producto fue detectable a nivel de mRNA, pero no de proteina.

B)Transfecciones del promotor completo del gen Y2 asociado al gen CAT

Para estudiar la funcionalidad del promotor completo del gen Y2, el mismo fue asociado al gen CAT utilizando el vector de expresión PSB1. En este vector fue clonado el promotor completo del gen Y2 y con la construcción resultante (plásmido pSBRNd) se

realizaron transfecciones de tipo transiente en mutantes YHHH sin y con estimulación de IFNα y en células J26 sin y con estimulación de IFNα/β murino. En ningún caso pudo observarse actividad del plásmido pSBRNd, ni siquiera en presencia de estimulación con IFN. Estos resultados son contradictorios con los resultados obtenidos anteriormente en cuanto a la detección de mRNA proveniente del gen Y2. El hecho de haber realizado una detección de mRNA indicaría que el promotor del gen Y2 es funcional, pero esto no pudo ser confirmado por asociación de dicho promotor al gen CAT. Existen 2 posibilidades que podrían explicar la contradicción observada: que la actividad del promotor del gen Y2 solo pueda ser visualizada en celulas de muy alta eficiencia de transfección como NIH3T3, o que el plasmido construido para asociar el promotor del gen Y2 al gen CAT posea defectos que no fueron detectados, aunque la estructura de la región de unión del promotor al gen CAT fue confirmada por secuenciación (la forma de construcción de este plásmido sería adecuada para que resulte funcional, según se observa en la sección 4. "Plasmidos utilizados").

C) Transfecciones de plasmidos con distintitos promotores a los que fue asociado el fragmento Xba1-Xba1 de la región 5 no traducida del gen Y2 que contiene la región "IFN-sensible"

Estos experimentos fueron realizados con el objeto de observar si la región "IFN-sensible" del gen Y2 (que presenta las características normalmente descriptas para genes inducibles por IFN), era capaz de conferir la propiedad de ser inducible por IFN a otros promotores. Para esto el fragmento Xba1-Xba1 de 375 pb proveniente de la región 5' no traducida del gen Y2 (que contiene una secuencia homológa a la region "IFN-sensible") fue clonado en 3 tipos de vectores: TKYCAT, pHFβG2 y RSVCAT. Los plásmidos TKYCAT y pHFβG2 contienen el promotor TK de virus de Herpes simplex asociado al gen CAT y βgal respectivamente, y el plasmido RSVCAT contiene como promotor el LTR del virus del sarcoma de Rous (RSV) asociado al gen CAT Con los plásmidos construidos se realizaron ensayos de transfeccion transiente en mutantes YHHH, sin y con estimulación de IFNα. Pudo observarse actividad de los plásmidos TKTXd y RSV/Xd/CAT, pero la misma no fue incrementada por tratamiento con IFNα de las células transfectadas Para el plásmido pHFβG2Xd no pudo observarse actividad, ya que el sistema de transfección y medición de βgalactosidasa resultó muy poco eficiente como para ser utilizado en células linfoideas Por este motivo fue descartado.

Los resultados obtenidos indican que el fragmento Xba1-Xba1 de 375 pb proveniente del gen Y2 que contiene la región "IFN-sensible" no fue capaz de conferir la propiedad de ser inducible por IFNα al promotor TK ni al LTR del RSV. Se observó

además que la presencia de este fragmento disminuía la actividad de los promotores ensayados. lo cual haría suponer la existencia en esta región de alguna secuencia "silenciadora", que funcionaría tanto en presencia como en ausencia de IFN. Otra explicación para la disminución de actividad de los promotores TK y LTR podría ser que la introducción de un fragmento de DNA en una región muy cercana al promotor disminuya la eficiencia de transcripcion en forma inespecífica. simplemente por efectos de tipo conformacional. Con los ensayos realizados no podemos discriminar cual de estas posibilidades es la correcta. si bien resulta significativo que el efecto de disminuir la actividad transcripcional se haya observado con dos promotores de estructura tan diferente como TK y LTR de RSV

El comportamiento funcional de la región "IFN-sensible" del gen Y2 no cumple las características descriptas para este tipo de secuencia presente en otros genes, donde la misma es capaz de conferir inducibilidad por IFN en los genes H_2K^b (Israel, 1986), H_2L^d (Sugita, 1987). H_2D^d (Korber, 1988). gen 6-16 (Porter, 1988), gen ISG-15 (Reich, 1987) y gen de 2'-5' oligoA-sintetasa (Cohen, 1988). Más aún, fragmentos similares conteniendo la región IFN-sensible" funcionan como "enhancers" sobre promotores heterologos en ausencia de estimulacion con IFN, en el caso de los genes H_2K^b (Kimura, 1896) y HLA-B7 (Ganguly 1989). y no tienen efecto como "silenciadores" como se observó para la region estudiada del gen Y2. Estos hechos indican que la región regulatoria 5' del gen Y2 no se comporta de la manera descripta para varios genes inducibles por IFN

Podemos concluir del analisis funcional del gen Y2 por el metodo de transfeccion en células eucarióticas que

A) No pudo detectarse el producto del gen Y2 a nivel de proteinas.

B) No pudo detectarse actividad transcripcional del promotor del gen Y2

C)La región "IFN-sensible" del gen Y2 no es capaz de conferir la propiedad de ser inducible por IFN a promotores heterólogos (TK y LTR de RSV).

El único caso en que pudo observarse algún tipo de actividad del promotor del gen Y2 fue al detectar mRNA del mismo luego de transfección de tipo transiente en células NIH3T3 Este sería el único indicio que apunta en el sentido de funcionalidad de dicho promotor, ya que el resto de los ensayos han indicado que el promotor del gen Y2 tiene una actividad muy baja o no es funcional. Todos estos hechos llevan a pensar que

el gen Y2 es probablemente un pseudogen, donde las regiones promotoras y/o regulatorias habrian perdido su actividad.

En cuanto a la expresión del gen Y2 en mutantes YHHH, el Lic. Ariel Wilner ha realizado ensayos mediante al técnica de nucleasa S1. Se han utilizado dos sondas, una correspondiente a los aminoacidos 6 a 29 del péptido lider y otra correspondiente a los aminoacidos 1 a 65 del dominio α1. Con ambas sondas se obtuvo protección del tamaño esperado para mRNA de mutantes YHHH inducidas con 200 U/ml de IFNα durante 24 hs. (y no en mRNA de celulas sin inducir con IFNα). Esto podria indicar que el gen Y2 se expresa en mutantes YHHH al recibir una estimulación con IFNα,, si bien no se ha utilizado como sonda para realizar los ensayos la region que presenta mayor polimorfismo entre los genes de HLA (zona correspodiente a los aminoácidos 62 a 90 del dominio α1 y aminoacidos 95 a 116 del dominio α2, donde se ubica el "bolsillo" de unión de peptidos provenientes de antigenos) Los resultados obtenidos por la técnica de mapeo S1 son coincidentes con la detección de mRNA proveniente del gen Y2 en la transfección de celulas NIH3T3

Durante la finalización de la redaccion de este trabajo se obtuvieron datos sobre la secuencia del gen Y2 que indican que existe una mutación en la secuencia correspondiente al aminoacido Nº 44 del dominio α3 (deleción de la tercera base del codon correspondiente), lo cual produce un cambio de fase en el marco de lectura del gen Y2. Dicha mutacion hace que la secuencia de aminoácidos predicha para el dominio α3 no coincida con el consenso y que se observe un codón de terminación en el aminoacido Nº 90 del dominio α3, por lo que la proteina codificada carece de dominios transmembrana y citoplasmáticos Esta puede ser una de las causas de la falta de expresión del producto del gen Y2 en la membrana celular, y explicaria el resultado negativo observado en las transfecciones del gen Y2 completo y la posterior detección de su producto en la membrana de las celulas transfectadas por inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales Aun en el caso de que la proteina codificada por el gen Y2 se exprese en la membrana celular (por ejemplo a través de un puente de fosfatidil-inositol), la modificación del dominio α3 a partir del aminoácido Nº 44 deriva sin duda en una modificacion de la estructura de la proteina codificada por el gen Y2, respecto de genes de HLA clase I "clásicos" Las consecuencias de esta modificación son muy probablemente una falta de combinación con β2-microglobulina y una falta de reconocimiento de esta molecula por parte de los anticuerpos monoclonales anti HLA "clásicos" utilizados Existe la posibilidad ademas, de que la proteina codificada por el gen Y2 sea secretada al medio extracelular, lo cual podria ser otra explicación de la falta de detección en la membrana de las células transfectadas.

Recientemente se ha descripto el aislamiento y secuenciación de un gen correspondiente al locus H (HLA-H Chorney. 1990). y el mismo presenta un 99.9% de homologia con el gen Y2 El gen HLA-H presenta también la mutación en el aminoácido Nº 44 del dominio α3 que produce el cambio de fase en la lectura y un codón de terminación prematuro en el aminoacido Nº 90. Se ha sugerido que HLA-H puede tratarse de un gen de HLA "no clasico" del tipo Qa descripto en el sistema murino. Estos genes se caracterizan por presentar codones de terminación en el marco de lectura de sus regiones citoplasmaticas que dan lugar a proteinas de menor tamaño que los genes de HLA clase I "clasicos Este es el caso del gen HLA-G, que presenta una region citoplasmatica mas corta de lo normal (contiene solo 6 aminoácidos. Geraghty. 1987) y debido a esto ha sido postulado como un gen de HLA clase I "no clásico" Además, se ha observado que este tipo de genes pueden presentarse unidos a la membrana celular a traves de un puente de fosfatidil- inositol. Este puente se establece en el gen $Q7^b$ a traves del grupo carboxilo de un residuo de acido aspartico ubicado en posicion 295 (region de transmembrana). (Waneck. 1988). En el gen HLA-H y también en el gen Y2, al producirse el corrimiento del marco de lectura a partir del aminoácido Nº 44 del dominio α3, el resto de la secuencia contiene un residuo de ácido aspártico y dos de ácido glutamico Cualquiera de estos residuos podria proveer un grupo carboxilo para la formacion del puente de fosfatidil-inositol.

En cuanto a la expresión del gen HLA-H, se ha observado detección de mRNA del mismo en la linea celular 3 1.0 (linfoblastoma humano) y luego de ser transfectado en la línea celular J27 (celulas L de raton que expresan β2-microglobulina humana). La expresion de este gen es muy baja, ya que se observa solo en un 5% respecto del nivel del gen HLA-B27, en los mismos sistemas. Este bajo nivel de expresión del gen HLA-H, detectado a traves de la presencia de mRNA, se asemeja a los resultados obtenidos para el gen Y2 por transfeccion en celulas NIH3T3 La expresion del gen HLA-H aumenta hasta el mismo nivel del gen HLA-B27 al realizar experimentos de "barajeo de exones" y posterior transfeccion Estos experimentos se realizaron utilizando la región 5' de HLA-H hasta el sitio Kpn1 (posición -1195 respecto de ATG iniciador hasta el final del dominio α2), y a continuacion la región 3' de HLA-B27 a partir del sitio Kpn1 (intrón Nº 3 y dominios α3, transmembrana, citoplasmaticos y señal de poliadenilación) Utilizando este gen "hibrido", la expresion aumentó hasta el nivel del gen HLA-B27 completo. Estos hechos indican que las regiones ubicadas hacia 3' del sitio Kpn1 pueden ser las responsables del bajo nivel de expresion del gen HLA-H. Es posible que para una completa expresion del gen HLA-H se requiera algún "enhancer" localizado en el intrón

Nº 3 (o regiones hacia 3' de dicho intron) y que este "enhancer" se encuentre ausente o alterado en el gen HLA-H y no en el gen HLA-B27

La secuencia del gen Y2 difiere de la del gen HLA-H en 10 mutaciones puntuales, comparando ambas secuencias desde las posiciones -480 a +3042. Estas mutaciones producen 4 cambios, ubicados en los aminoácidos 83 (dominio α1), 120, 152 (dominio α2) y 231 (dominio α3, comparando la secuencia aminoacidica sin considerar la deleción presente en este dominio) El resto de las mutaciones se halla en zonas no codificantes. Los datos descriptos para el gen HLA-H y el gen Y2 en cuanto a sus secuencias indican que ambos pueden tratarse de genes alelos. La expresión de los genes HLA-H e Y2 ha sido estudiada mediante estrategias diferentes, sin embargo, se observó que ambos se expresarían en un nivel muy bajo

Los hechos mencionados indican que los genes HLA-H e Y2 podrían clasificarse como. A) pseudogenes pertenecientes a la familia de HLA clase I "clásicos", o B) genes pertenecientes a la familia de HLA clase I no clásicos" (tipo Qa murino), de función desconocida hasta el momento Los estudios realizados con ambos genes no permitieron todavía discriminar cual de estas posibilidades es la correcta.

Estudios de tranfeccion transiente en celulas Molt4 y mutantes YHHH utilizando el plásmido H_2K_bCAT

Se realizaron transfecciones de tipo transiente en células Molt4 y mutantes YHHH con el plasmido H_2K^bCAT (que contiene el promotor completo del gen H_2K^b), sin y con estimulacion de diferentes dosis de IFNα. Esto permitió observar que la actividad del promotor del gen H_2K^b es mayor en células YHHH que en células Molt4 al recibir ambas estimulación con IFNα. Este resultado implica que la mutación responsable del fenotipo de alta respuesta observado en celulas YHHH se halla en algún gen regulador de la expresion de los genes de HLA, de accion en trans sobre los mismos. El factor de accion en trans con actividad diferencial en mutantes YHHH podría presentarse en mayor cantidad en dichas células (cambio cuantitativo), o poseer mayor afinidad por su elemento blanco dentro de la cascada de factores activada por IFN que aquel presente en celulas Molt4 (cambio cualitativo)

Posteriormente se realizaron ensayos para tratar de acotar la zona del promotor del gen H_2K^b sobre la que actúa el factor de acción en trans mencionado. Para esto, un fragmento de 127 pb que contiene la region "IFN-sensible" del gen H_2K^b fue asociado al promotor de SV40, seguido del gen CAT Con el plásmido construido se realizo una transfección de tipo transiente en celulas Molt4 y mutantes YHHH, sin y con estimulación de 2000 U/ml de IFNα. Lamentablemente no pudo reproducirse el resultado

obtenido con el promotor completo del gen H_2K^b, ya que la actividad del plasmido pSVΔH_2 fue similar en células Molt4 y mutantes YHHH, aun en presencia de estimulacion con IFNα. Esto implica que no solo no pudo observarse el efecto del factor con actividad diferencial en células YHHH sino que tampoco pudo verse el fenómeno de inducción por IFNα. Solamente pudo observarse un ligero efecto "enhancer" del fragmento proveniente del promotor H_2K^b Esto resulta distinto a los resultados descriptos anteriormente, en los cuales se observa que un fragmento similar del promotor del gen H_2K^b es capaz de conferir la propiedad de ser inducible por IFNα al promotor de conalbumina en ensayos de transfección en células Ltk^- (Israel, 1986). La falta de induccion por efecto de IFNα observada para el plásmido pSVΔH_2 podría deberse a 2 motivos Por un lado la propiedad de ser inducible por IFNα tal vez pueda ser conferida al promotor de conalbumina, pero no al promotor de SV40 (aunque un fragmento similar del gen H_2L^d puede conferir dicha propiedad al promotor de SV40 en ensayos de transfección en células NIH3T3, Sugita, 1987). Por otro lado, la región utilizada como "enharcer" en los ensayos tal vez sea suficiente para conferir la propiedad de ser inducible por IFNα a otros promotores al ser transfectados en células de tipo fibroblastos murinos, pero no en células de tipo linfoideo y del estadio de diferenciacion de timocitos inmaduros de Molt4 e YHHH.

Respecto del mecanismo propuesto como responsable del fenotipo de alta respuesta en células YHHH, se ha descripto que la expresión de los genes de HLA clase I, clase II y otros genes sensibles a IFN depende de elementos regulatorios ubicados en regiones cercanas a los promotores de dichos genes (secuencias regulatorias que actuarian en cis) y tambien de factores nucleares que actuarian sobre esos elementos regulatorios (factores de acción en trans) Se ha descripto además que en el sindrome de inmunodeficiencia severa combinada (SCID), la falta de expresión de antigenos HLA-DR, DQ y DP es un defecto genetico que no se segrega con los genes del MHC y que no puede ser revertido por acción de IFNγ (de Preval, 1985). Recientemente se ha encontrado que el defecto genetico reside en la falta de union del factor RF-X a su secuencia regulatoria correspondiente (secuencia X), lo cual hace que no se expresen genes de MHC clase II (Reith,1988) Tambien se ha clonado un cDNA para el factor RF-X a partir de linfocitos B normales. Con este cDNA se observó, sin embargo, que los pacientes con SCID presentan mRNA para el factor RF-X, que coincide en cantidad y longitud con el presente en individuos normales Esto indica que debe existir alguna mutacion que afecta la afinidad del factor RF-X para unirse a la secuencia X en los pacientes con SCID (Reith, 1989). Estos hechos indican que probablemente el mecanismo que produce el fenómeno de alta

respuesta en celulas YHHH involucra una mutación en algún factor de accion en trans sobre los genes de HLA. Mas aún, los resultados obtenidos con el plásmido H_2K^bCAT en células Molt4 y mutantes YHHH apuntan en el mismo sentido que resultados descriptos recientemente para estas lineas celulares (Erusalinsky,1989): Se ha observado que el pretratamiento de células Molt4 con ésteres de forbol (forbol-12,13-dibutirato) reproduce el fenotipo observado en celulas YHHH al ser estimuladas con IFNα. Se propone un modelo en el que existiria un factor inducible por ésteres de forbol en células Molt4, responsable del aumento de expresion de los genes de HLA, factor que se encontraria presente en forma constitutiva en células YHHH. Se sugiere por lo tanto la existencia de un factor de accion en trans sobre los genes de HLA inducidos por IFNα como responsable del fenotipo observado en células YHHH, que además tendria la caracteristica de ser inducido por esteres de forbol en células Molt4.

Finalmente podemos afirmar con respecto a las estrategias abordadas para el estudio del fenomeno de alta expresion en mutantes YHHH, que la primera de ellas (Estudio de los genes de HLA-B de celulas YHHH) no resultó exitosa, ya que el gen que pudo clonarse no resultó funcional Esto impidió que pudieran realizarse ensayos de expresion de su region promotora y reguladora en células Molt4 y mutantes YHHH, lo cual hubiera permitido confirmar y reforzar los resultados obtenidos con el promotor del gen H_2K^b Por el contrario, la segunda estrategia utilizada (Estudios de transfección transiente utilizando el promotor del gen H_2K^b), permitió obtener una respuesta acerca de la naturaleza del fenómeno observado en células YHHH. Esta fue la visualización de la existencia de un factor de acción en trans sobre los genes de HLA, inducible por IFNα, con actividad incrementada en las mutantes YHHH.

Referencias

Allen, H., Wraith, D., Pala, P., Askonas, B., Flavell, R. (1984), Nature, 309: 279-281.

Allison, J., Lanier, L., (1987), Ann Rev Immunol., 2: 503-540.

Arnold, B., Burgert, H., Archibald, A., Kvist, G., (1984), Nucleid Acids Res., 12: 9473-9487.

Baldwin, A., Sharp, P., (1987), Mol and Cell Biol., 7: 305-313.

Baldwin, A., Sharp, P., (1988), Proc Natl Acad. Sci. USA, 85: 723-727.

Barneji, J., Olson, L., Schaffner, W., (1983), Cell, 33: 729-740.

Barnstable, C., Bodmer, W., Brown, G. Galfré, G., Milstein, C., Williams, A., Ziegler, A., (1978), Cell, 14: 9-12.

Basham, T., Bourgeade, M., Creasey, A., Merigan, T., (1982), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79: 3265-3269.

Basta, P., Sherman, P., Ting, J., (1988) Proc. Natl Acad. Sci. USA, 85: 8618- 8622.

Benech, P., Vigneron, M., Pertz, D., Revel, M. Chebath, J., (1987), Mol. and Cell. Biol., 7: 4498- 4504.

Benjamin, R., Parham, P., (1990), Immunol. Today, 11: 137-142.

Birboin, H., Doli, J., (1979), Nucleid Acids Res., 7: 1513-1521.

Biro, A., Parham, P., Sood, A., Kole, R. Weissman, S., (1983), Cold Spring Harbor, Symp. Quant. Biol., 47: 1082-1086.

Bjorkman, P., Safer, M., Samraoui, B., Bennett, W., Strominger, J., Wiley, D., (1987), Nature, 329: 506-512.

Bjorkman, P., Saper, M., Samraoui, B., Bennet, W., Strominger, J., Wiley, D., (1987[2]), Nature, 329: 512-518

Blanar, M., Baldwin, A., Flavell, R., Sharp, P., (1989), Embo J., 8: 1139-1144.

Blanar, M., Boettger, E., Flavell, R., (1988), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 4672-4676.

Bodmer, J., Marsh, S., Albert, E., (1988) Immunol. Today, 11: 3-10.

Bodmer, W., (1981), Tissue Antigens, 17: 9-12

Boss, J., Strominger, J., (1986), Proc. Natl. Acad. Sci USA, 83: 9139-9143.

Breathnach, R., Chambon, P., (1981), An Rev Biochem., 50: 349-383.

Brenner M., McLean, J., Dialynas, D. Stominger, J., Smith, J., Owen, F., Seidman, A., Ip, S., Rosen, F., Krangel, M., (1986), Nature, 322: 145-149.

Brown. D.. (1981). Science. 221: 667-674

Burrone. O . Calabi. F . Kefford. R . Milstein. C . (1983). EMBO J., 2: 1591-1595.

Burrone. O.. Kefford. R.. Gilmore. D. Milstein. C.. (1985). EMBO J., 4: 2855- 2860.

Burrone. O., Milstein. C., (1982). EMBO J 1. 345-349.

Carroll. M., Katzman. P . Alicot. E. Koller. B . Geraghty. D., Orr. H., Strominger. J., Spies. T., (1987). Proc. Natl. Acad. Sci USA. 84. 8535-8539.

Celada, A., Maki. R., (1989). Mol. and Cell. Biol , 9: 3097-3100.

Chiu. R , Boyle. W., Meek. J , Smeal. T . Hunter. T., Karin. M., (1988). Cell, 54: 541-552.

Chorney. M . Sawada. I., Gillespie. G . Srivastava. R., Pan. J., Weissman. S., (1990). Mol. and Cell Biol., 10: 243-253.

Clerc. R . Corcoran. L., LeBowitz. J . Baltimore. D., Sharp. P., (1988). Genes Dev., 2: 1570-1581.

Cohen. B., Peretz. D . Vaiman. D., Benech. P., Chebath. J , (1988). Embo J., 7:1411-1419.

Cohen. D., Paul. P , Font. M. Cohen. O Sayagh. B . Marcadet. A., Busson. M Mahorey. G., Cann. H . Dausset. J (1983). Proc Natl Acad. Sci. USA. 80: 6289-6292.

Coppin. H . Denny. D . Weissman. S Mc Devitt. H., (1985). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82: 8614-8616.

Daniel-Vedele. F Morello. D Benicourt. C . Transy. C., Le Bail. O., Plata. F., Kourilsky. P., (1984). EMBO J., 3 597-601

Davidson. W . Kress. M.. Khoury. G . Jay G. (1985). J. Biol. Chem., 260: 13414-13423.

de Preval. C., Liwoska-Grospiere. B . Loche. M., Griscelli. C., Mach. B., (1985). Nature. 318: 291-293

Dorn. A., Bollekeus. J., Staub. A., Benoist. C.. Mathis. D., (1987,1). Cell. 50: 863-872.

Dorn. A , Durand. B Marfing. C . Le Meur. M . Benoist. C . Mathis. D., (1987,2). Proc. Natl. Acad Sci. USA. 84: 6249-6253

Doyle. C., Strominger. J.. (1987). Nature. 330: 256-259.

Dynan. W., Cell. 58: 1-4.

Elgin. S . (1988). J Biol. Chem., 263 19259-19262

Erusalimsky. J.. Gilmore. D.. Milstein. C . (1987). Eur. J. Immunol., 17: 623- 628.

Erusalimsky. J Kefford. R Gilmore D Milstein. C., (1989). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86: 1973-1976.

Exley. R . Gordon. J., Clemens. M., (1987). Proc Natl. Acad. Sci. USA. 84: 6467-6470.

Faltynek. C.. Kung. H . (1988). Bio Factors. 1: 227-235.

Fan. X.. Goldberg. M.. Bloom. B.. (1988). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85: 5122-5125.

Fellous. M.. Nir. U Wallach. D.. Merlin G.. Rubinstein. M.. Revel, M., (1982), Proc. Natl. Acad Sci USA. 79 3082-3086

Flavel. R., Allen. H., Burkly. L., Sherman. D.. Waneck. G Widera, G., (1986), Science, 233: 437-443.

Friedman. R . Manly. S . Mc Mahon. M . Kerr. I . Stark. G., (1984), Cell, 38: 745-755.

Friedman. R., Stark. G.. (1985). Nature. 314 637-639.

Ganguly. S.. Vasavada. H.. Weissman. S.. (1989). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86: 5247-5251.

Garcia Blanco. M.. Lengyel. P.. Morrison E . Brownlee. C.. Stiles. C.. Rutherford. M.. Hannigan. G Williams. B . (1989). Mol and Cell. Biol., 9: 1060-1068.

Geraghty. D . Koller. B . Orr. H., (1987). Proc. Natl. Acad Sci. USA. 84: 9145-9149.

Girdlestone. J . Milstein. C . (1988). Eur J Immunol., 18: 139-143.

Gorman. C . (1985). en DNA Cloning. Vol II. D M Glover edit., Clod Spring Harbor Laboratory. pag. 143-190.

Gorman. C.. Merlino. G . Willingham M Pastan. I.. Howard. B.. (1982). Proc. Natl. Acad. Sci USA. 79 6777-6781

Gorman. C . Moffat. L . Howard. B., (1982). Mol and Cell. Biol., 2: 1044-1045.

Grey. H . Chesnut. R.; (1985). Immunol. Today. 6: 101-106.

Gross. D . Garrad. W . (1988). Ann Rev Biochem., 57. 159-197.

Guild. B.. Stominger. J.. (1984). Proc. Natl Acad Sci. USA. 259: 13504-13510.

Guillemot. F.. Auffray. C.. Orr. H.. Strominger. J.. Molecular Immunology. ed. Hames. B.. Glover. D IRL Press Limited. 1988. pag 81-143.

Hatamochi. A . Golumbek. P.. VanSchaftingen. E.. Crombrugghe. B.. (1988). J. Biol. Chem.. 263. 5940-5947

Hatzopoulos. A . Schlokat. V . Gruss. A . (1988) en Transcription and Splicing. Hanor. B.. Glover. D . IRL Press. 43-78

Holmes. N.. (1989). Immunol Today. 10 52-53

Hood. L Steinmetz M . Goodenow R Eakle. K . Fisher. D . Kobori. J.. Malissen. B.. Malissen M . McMillan. M . McNicholas. J.. Orn. A.. Pecht. M.. Sher. B.. Smith.L.. Stroynowski. I . Sun. H Winoto A Zuniga. M.. (1982). Cold Spring Harbor Symposia on Quant Biol.. 47 1051-1065

Hood. L . Steinmetz. M . Malissen. B (1983). Ann Rev Immunol.. 1: 529-568

Horikoshi. M Wang. C Fujii. H. Cromlish J Weil. A.. Roeder. R.. (1989). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86: 4843- 4847

Horikoshi. M Wang. K.. Cromlish. J. Weil. P. Roeder. R.. (1989). Nature. 341: 279-280.

Isaacs. A.. Lindenmann. J. (1957). Proc R Soc. London Sec. B.. 147: 258- 267.

Israel. A. Kimura. A. Fournier. A. Fellous. M.. Kourilsky. P.. (1986). Nature. 322: 743-746

Israel. A.. Kimura. A.. Kieran. M.. Yano O.. Kanellopoulos. J.. Le Bail. O.. Kourilsky. P.. (1987). Proc Natl Acad Sci USA. 84: 2653-2657

Johnson. P. Landschulz. W. Graves B. McKnight. S.. (1986). Genes Dev.. 1: 133-146.

Johnson. P. MsKnight. S (1989). Ann Rev Biochem.. 58: 799-839.

Jones. K.. Yamamoto. K.. Tjian. R.. (1985). Cell. 42: 559-572.

Jordan. B. Caillol D. Damotte. M.. Delovitch. T. Ferrier. T. Kahn-Perles. B.. Kourilsky. F.. Layet C Le Boutelier P.. Lemonier F Malissen M.. N'Guyen. C.. Sire. J.. Sodoyer. R.. Strachan. T. Trucy. J. (1985). Immun. Rev.. 84: 73-92.

Kadonaga. J.. Carner. K.. Masiarz. F. Tjian. R.. (1987). Cell. 51: 1079-1090.

Khoury. G.. Gruss. P.. (1983). Cell. 33 313-314.

Kimura. A. Israel. A. Le Bail. O.. Kourilsky. P. (1986) Cell. 44: 261-272

Kindt. T. Robinson. M. en Fundamental Immunology. ed. Paul. W.. Raven Press. N. Y.. 1984. pag. 303-346.

Klein. J. Figueroa. F. Nagy Z.. (1983) An Rev Immunol.. 1: 119-142.

Koller. B. Geraghty. D.. Orr. H.. Shimizu. Y DeMars. R.. (1987). Immunol. Res.. 6: 1.

Koller. B. Sidwell. B. De Mars. R.. Orr H (1984). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81: 5175-5178.

Korber B.. Hood. L. Stroynosky. I (1987). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84: 3380-3384.

Korber. B. Mermod. N. Hood. L. Stroynoski. I (1988). Science. 239: 1302-1306.

Kvist. S.. Roberts. L.. Dobberstein. B (1983). Embo J. 2: 245- 254.

La Thangue. N. Rigby. P. (1988) en Transcription and Splicing. Hanor. B.. Glover. D.. IRL Press. 1-32

Lawlor. D.. Ward. F Ennis. P.. Jackson A. Parham. P.. (1988). Nature. 335: 268-271.

Lee. W.. Mitchell. A. Tjian. R. (1987). Cell. 49 741-752

Lengyel. P.. (1982). Ann Rev Biochem. 51 251-282.

Lillie, J., Green, M., (1989). Nature 341 279-280

Luckow, B., Schutz, G., (1987), N. A. R., 15 5490.

Malissen, B., (1986). Immunol. Today, 7: 106-112.

Malissen, M., Malissen, B., Jordan, B. (1982), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79: 893-897

Maniatis, T., Frisch, E., Sambrook, J., (1982), Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory

Maniatis, T., Goodbourn, S., Fisher, J., (1987), Science, 236: 1237-1245.

Martin, L., Calabi, F., Milstein, C., Proc Natl Acad. Sci. USA, 83: 9154-9158.

Maschek, U., Plum, W., Segal, S., Hammerling, G., (1989, [1]), Mol. and Cell. Biol., 9: 3136-3142.

Maschek, U., Pulm, W., Hammerling, G. (1989), Embo J., 8. 2297-2304.

Masli, J., (1984). Gene, 32: 481-485.

Mayer, W., Jonker, M., Klein, D., Ivanyi, P., van Seventer, G., Klein J., (1988), Embo J., 7: 2765-2774.

Mc Knight, S., Kingsbury, R., (1982). Science, 217: 316-324.

McNight, S., Tjian, R., (1986), Cell, 46: 795- 805

Meuer, S., Acuto, O., Hercend, T., Schlossman, S., Reinherz, E., (1984) Ann. Rev. Immunol., 2. 23-50

Minowada, J., Ohnuma, T., Moore, G., (1972), J. Natl. Cancer Inst., 49: 891-895.

Miwa, K., Doyle, C., Strominger, J., (1987), Proc Natl. Acad. Sci. USA, 84: 4939-4943.

Muller, M., Gerster, T., Shaffner, W., (1988). Eur. J. Biochem., 176: 485-495.

Orr, H., De Mars, R., (1983). Nature, 302: 534-536.

Orr, H., Lancet, D., Robb, R., Lopez de Castro, J., Strominger, J., (1979), Nature, 282: 266-270.

Ozato, K., Evans, G., Shykind, B., MArgulies, D., Seidman, J., (1983), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80: 2040-2043

Ozato, K., Wan, Y., Orrison, B., (1985). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 2427- 2431.

Parham, P., Lawlor, D., Salter R., Lomen, C., Bjorkman, J., Ennis, P., Immunobiology of HLA, vol II, Springer-Verlag, N Y., 1988, pag. 10-33.

Parham, P., Lomen, C., Lawlor, D., Ways, J., Holmes, N., Coppin, H., Salter, R., Wan, A., Ennis P (1988). Proc Natl. Acad Sci USA, 85: 4005-4009.

Paul, P., Fauchet, R., Boscher, M., Sayagh, B. Masset, M., Medrignac, G., Dausset, J., (1987), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 2872-2876.

Pestka, S., (1986), Methods Enzimol., 119: 14-23.

Pestka, S., Baron, S., (1981), Methods Enzimol., 78: 3-14.

Pestka, S., Langer, J., (1987), Ann. Rev. Biochem., 56: 727-777.

Peterson, D., Beifuss, K., Morley, K., (1987), Mol. and Cell. Biol., 7: 1563-1567.

Pine, R., Darnell, J., (1989), Mol. and Cell. Biol., 9: 3533-3537.

Ploegh, H., Orr, H., Strominger, J., (1981), Cell, 24: 287-299.

Porter, A., Chernajovsky, Y., Dale, T., Gilbert, C., Stark, G., Kerr, I., (1988), Embo J., 7: 85-92

Reich, N., Darnell, J. (1989), N. A. R. 17: 3415-3424.

Reich, N., Evans, B. Levy, D. Fahey, D., Knight E., Darnell, J., (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 6394-6398.

Reid, L., Brasnett, A., Gilbert, C., Porter, A., Gewet, D., Stark, G., Kerr, I., (1989), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 840-844

Rein, R. Seeman, G., Neefjes, J., Hochstenbach, F., Stam, N., Ploegh, H., (1987), J. Immunol., 138, 1178-1182

Reith, W., Satola, S., Herrero Sanchez, C., Amaldi, I., Liwoska-Grospiere, B., Griscelli, C., Hadam, M., Mach, B., (1988), Cell, 53: 897-906

Revel, M., Chebath, J., (1986), Trends Biochem. Sci., 11: 166-170.

Roith, I., Brostff, j., Male, D., (1985) Immunology, Grover Medical Publishing Ltd. pag. 45

Rosa, F., Fellous, M., (1984), Immunol. Today, 5: 261-262.

Rutherford, M., Hannigan, G., Williams, B., (1988), Embo J., 7: 751-759.

Sachs, D., (1984), Fundamental Immunology, ed. Paul, W., Raven Press, N. Y., pag. 303-346

Salter, R., Benjamin, R., Wesley, P. Buxton, S. Garrett, T., Clayberger, C., Krensky, A., Norment, A., Littman, D., Parham, P., (1990), Nature, 345: 41-46.

Schibler, V., Hagembuchle, O., Wellauer, P., Pittet, A., (1983), Cell, 33: 501-507.

Shaw, W., (1975), Methods in enzimol., 43: 737-755

Sherman, P., Basta, P., Ting, Y., (1987), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 4254-4258.

Shimizu, Y., Geraghty, D., Koller, B., Orr, H., DeMars, R., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:

227-231

Shirayoshi. Y., Burke. P., Appella. E. Ozato, K., (1988). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85: 5884-5888

Shirayoshi, Y., Miyasaki. J., Burke. P Hamada, K., Appella, E., Ozato, K., (1987), Mol. and Cell. Biol., 7. 4542-4548.

Singh. H., Lebowitz. J., Baldwin. A. Sharp, P. (1988). Cell. 52: 415-423.

Singh. H., Sen. R., Baltimore. D., Sharp. P., (1986). Nature. 319: 154-158.

Snell, D. (1981). Science. 213 172-178

Soberon. Y., Covarrubias. L., Bolivar. F., (1980). Gene. 287-305.

Sodoyer. R., Damotte. M. Delovitch. T Trucy, J., Jordan. B., Strachan, T., (1984), Embo J., 3: 879-885

Sood. A. Pereira. D., Weissman, S., (1981). Proc Natl. Acad. Sci. USA, 78: 616-620.

Southern, E. (1979). J. Mol Biol., 503-509

Srivastava, R. Chorney, M. Lawrance. S. Pan, J., Smith, Z. Weissman, S., (1987), Proc. Natl. Acad. Sci USA. 84 4224-1228.

Staudt, L. Singh. H. Sen. R Wirth. T Sharp. P Baltimore. D., (1986), Nature, 323: 640-643

Steinmetz, M. Moore. K. Frelinger, J. Taylorsher, B. Shen, F., Boyse, E., Hood, L., (1981), Cell. 25 683-629

Steinmetz. M. Winoto. A., Mimard. K., Hood. L., (1982). Cell, 33: 489-498.

Strachan. T., Sodoyer, R., Damote, M., Jordan. B. (1984). Embo J., 3: 887-894.

Sturm. R Das. G. Herr, W (1988). Genes Dev. 2 1582-1599.

Sugita. K., Miyazaki. J., Appella. E., Ozato, K., (1987). Mol. and Cell. Biol., 7: 2625-2630.

Sullivan. K., Peterlin. M., (1987). Mol and Cell Biol. 7: 3315-3319.

Szots. W., Riethmuller, G Weis. E., Meo. T., (1986). Proc Natl. Acad. Sci. USA, 83: 1428-1432

Tanaka. K., Yoshioka, T., Bieberich. C., Jay, G. (1988). Ann. Rev. Immunol., 6: 359-380.

Toyonaga, B Mak, T. (1987). Ann Rev Immunol., 5 585-620

Trinchieri, G., Perussia, B., (1985). Immunol Today, 6 131-136.

Vogel, J. Kress, M. Khoury, G. Jay, G., (1986). Mol. and Cell. Biol., 6: 3550-3554.

Wais, J., Coppin, H. Parham, P. (1985). J. Biol Chem. 260 11924-11933.

Walker, M., Edlund, T., Boulet, A., Rutter, W., (1983), Nature, 306: 557-561.

Wallach, D., Fellous, M., Revel, M., (1982), Nature, 299: 833-836.

Waneck, G., Stein, M., Flavell, R., (1988), Science, 241: 679-699.

Weber Benarous, A., Daegelen, D., Marie, J., Introducción de genes clonados en células eucarioticas en cultivo Curso de bilogia molecular. Bs. As. 16-28 de noviembre de 1987

Winoto, A., Steinmetz, M., Hood, L., (1983), Proc Natl. Acad. Sci. USA, 80: 3425-3429.

Yamamoto, K., (1985), Ann Rev Gene., 19: 209-252.

Yamamoto, T., de Crombrugghe, B., B., Pastan, I., (1980), Cell, 22: 787-797.

Yoshie, O., Schimidt, H., Reddy, E., Weissman, S., Lengyel, P., (1982), J. Biol. Chem., 257: 13169-13172

Yoshie, O., Schmidt, H., Lengyel, P., Reddy, E., Morgan, W Weissman, S., (1984), Proc. Natl. Acad. Sci USA, 81 649-653

Zinkernagel, R., Doherty, P., (1974), Nature, 248 701-702