

Tesis de Posgrado

Caracterización de un nuevo gen HLA

Wilner, Ariel G.

1991

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias
Biológicas 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:

Wilner, Ariel G.. (1991). Caracterización de un nuevo gen HLA. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2453_Wilner.pdf

Cita tipo Chicago:

Wilner, Ariel G.. "Caracterización de un nuevo gen HLA". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1991.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2453_Wilner.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Reg. N° 2453

CARACTERIZACION DE UN NUEVO GEN HLA

**TESIS PARA OPTAR AL TITULO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLOGICAS**

AUTOR: ARIEL G. WILNER

DIRECTOR : DR. OSCAR BURRONE

**LUGAR DE TRABAJO: INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOQUIMICAS
"FUNDACION CAMPOMAR"**

*Tesis.
2453
y 2.*

**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
1991**

*A Vivi
A Sebastián*

Al recuerdo de Zelik

AGRADECIMIENTOS:

Este trabajo fue dirigido pacientemente por el Dr. Oscar Burrone. Le quiero agradecer por los momentos en que me prestó atención y asistencia. He aprendido de él algo mucho más trascendente que la disciplina científica. Me refiero a la rigurosidad, honestidad y franqueza con las que rige su vida cotidiana.

A los Dres. Alberto Kornblihtt, Leonardo Satz y Daniel Sánchez por su valiosa y múltiple ayuda a lo largo de estos años de trabajo.

A las autoridades del Instituto de Investigaciones Bioquímicas por haberme permitido trabajar en este lugar.

Gracias especiales a la flamante Dra. Mariana Herrera.

A mis compañeros de laboratorio con quienes he compartido toda clase de momentos, especialmente divertidos: Marcela Ferraro, Silvia González, Susana Glanblagi, Facundo Batista, Gonzalo de Prat Gay.

Al increíble Edu Cafferata. A las chicas del 101. A todos los becarios coetáneos del IIB que son muchos.

A la Dra. Clara Krisman.

A todo el personal técnico del IIB, en especial a Hilda, Pancho, Pedro, Laura, Salvatore.

A Silvia Curuchet, Mery, Tilda, Belle, Monica, Georgina.

A Luis Sidicaro.

A mis amigos Javier, Moty, Nora, Paula, Darío, Los Lupos, Daniel, Gaby y Sergio

A mis padres Betty y David.

A mi suegro Armando.

A Ruffy, Jorge, Dany, Gaby, Myry, Hernán, Quique, Vale, Martín y Claudia.

A mi hijo Sebastián, quien sin darse cuenta me hace muy feliz.

A Vivi, mi esposa, quien me cuida y me llena de amor.

Quiero expresar mi más sincero repudio por todos aquellos que desde la noche de los bastones largos están empeñados en destruir a la ciencia argentina.

Si pudiera vivir nuevamente mi vida
en la próxima trataría de cometer más errores.
No intentaría ser tan perfecto, me relajaría más.
Sería más tonto de lo que he sido, de hecho
tomaría muy pocas cosas con seriedad.
Sería menos higiénico.
Correría más riesgos, haría más viajes, contemplaría
más atardeceres, subiría más montañas.
Nadaría más ríos.
Iría a lugares donde nunca he ido, comería más
helados y menos habas, tendría más problemas
reales y menos imaginarios.

Yo fui una de esas personas que vivió sensata
y prolíficamente cada momento de su vida; claro que
tuve momentos de alegría.
Pero si pudiera volver atrás trataría de tener
sólo buenos momentos.
Por si no lo saben, de eso está hecha la vida,
sólo de momentos; no te pierdas el ahora.
Yo era uno de esos que no iban a ninguna parte
sin un termómetro, una bolsa de agua caliente,
un paraguas y un paracaídas; si pudiera volver a vivir,
viajaría más liviano.

Si pudiera volver a vivir comenzaría a andar
descalzo a principios de la primavera y seguiría así
hasta concluir el otoño.
Daría más vueltas en calesita, contemplaría más
amaneceres y jugaría con más niños, si tuviera la vida por delante.
Pero ya ven, tengo 85 años y se que me estoy muriendo.

Jorge Luis Borges

INDICE

1-21 INTRODUCCION

- 1 EL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD
- 2 ESTRUCTURA DE LOS ANTIGENOS CLASE I
- 3 ESTRUCTURA DE LOS ANTIGENOS CLASE II
- 5 FUNCION DE LOS ANTIGENOS DE HISTOCOMPATIBILIDAD
- 7 ESTRUCTURA GENOMICA DEL HLA
- 8 ANTIGENOS HLA-CLASE I. ESTRUCTURA GENICA
- 9 REGULACION DE LA EXPRESION DE LOS GENES HLA CLASE I
- 10 POLIMORFISMO Y VARIABILIDAD HLA CLASE I
- 12 HOMOGENEIZACION y FUNCIONALIDAD DE GENES HLA CLASE I
- 12 DESEQUILIBRIO DE UNION, ENFERMEDAD Y HLA
- 13 OTROS GENES HLA CLASE I
- 17 CELULAS MOLT 4 e YHHH

20-21 OBJETIVOS Y SINTESIS DE ESTE TRABAJO

22-27 MATERIALES Y METODOS

- 22 Cultivo de células
- 22 Inmunofluorescencia de superficie de Molt 4 e YHHH
- 22 Preparación de RNA total
- 22 Preparación de cDNA
- 23 Southern blots
- 24 Preparación de DNA simple cadena
- 25 Sondas radioactivas
- 26 Amplificación mediada por polimerasa (PCR)
- 26 Oligonucleótidos de Amplificación
- 27 Oligonucleótidos de Selección

28-78 RESULTADOS

- 28 AISLAMIENTO DE UN CLON GENOMICO HLA CLASE I
- 28 MAPEO DE RESTRICCION
- 29 CARACTERIZACION ESTRUCTURAL DEL GEN Y2
- 30 DETERMINACION DE LA SECUENCIA NUCLEOTIDICA DEL GEN Y2
- 30 ESTRATEGIA DE SECUENCIACION
- 32 SECUENCIA NUCLEOTIDICA DEL GEN Y2
- 37 ANALISIS DE LA SECUENCIA: SECUENCIAS REGULATORIAS
- 39 CARACTERISTICAS ESTRUCTURALES DE LA SECUENCIA QUE CODIFICA A Y2
- 40 ANALISIS DE LAS SECUENCIAS DE "SPLICING"
- 41 COMPARACION CON OTROS GENES HLA
- 49 CARACTERIZACION DEL LOCUS HLA H
- 51 ANALISIS DE LA COMPOSICION AMINOACIDICA DE Y2
- 58 SUBGRUPOS DENTRO DEL LOCUS HLA H

- 59 EXPRESION DEL GEN Y2. RESULTADOS DE LOS ANALISIS DE TRANSFECCION
- 61 ANALISIS DE LA EXPRESION POR PROTECCION FRENTE A NUCLEASA S1
- 65 "PRIMER EXTENSION"
- 66 ANALISIS FUNCIONAL DEL GEN Y2 POR PCR
- 70 ANALISIS DE LA EXPRESION DEL GEN Y2 EN YHHH Y MOLT 4
- 74 ANALISIS DE LA EXPRESION DEL GEN Y2 EN TRANS

79-86 DISCUSION

- 79 SELECCION DEL GEN Y2
- 80 COMPARACION CON OTROS ALELOS DEL LOCUS HLA-H
- 82 ANALISIS DE LA SECUENCIA AMINOACIDICA
- 83 ANALISIS DE EXPRESION POR PROTECCION FRENTE A NUCLEASA S1
- 83 STARTPOINT DE LA TRANSCRIPCION
- 85 ANALISIS FUNCIONAL DEL GEN Y2 POR PCR

87 CONCLUSIONES

89 BIBLIOGRAFIA

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Sitios de restricción usados para subclonar y secuenciar a Y2.	31
Tabla 2: Secuencia nucleotídica del gen Y2	33
Tabla 3: Comparación de varias secuencias de polipurinas.	37
Tabla 4: Comparación de varias secuencias de enhancers A y B.	38
Tabla 5: Comparación de varias secuencias IFN sensibles.	38
Tabla 6: Análisis de las secuencias de "splicing" del gen Y2.	40
Tabla 7: Análisis de las diferencias nucleotídicas entre Y2 y H.	44
Tabla 8: Comparación de secuencias nucleotídicas entre exones del Locus HLA-H	45
Tabla 9: Entorno nucleotídico de la delección del exón 4	49
Tabla 10: Especificidad de nucleótidos del locus HLA-H.	50
Tabla 11: Marcos abiertos de lectura del gen Y2 y sus traducciones.	52
Tabla 12 : Comparación de secuencia de aa entre Y2 y H	55
Tabla 13 : Especificidad de aa del locus HLA-H	58
Tabla 14 : Subgrupos dentro del locus HLA-H	59
Tabla 15 : Transfecciones del gen Y2 y quimeras	61
Tabla 16 : Diseño del oligonucleótido Y2A	69
Tabla 17 : Patrón de nucleótidos específicos del locus HLA-H	82
Tabla 18 : Caracterización aminoacídica del locus HLA-H	83
Tabla 19a : Amplificaciones de cDNAs de YHHH y MOLT 4	85
Tabla 19b : Amplificaciones de cDNAs de NIH3T3	85

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de Ag HLA-clase I	3
Figura 2: Esquema de Ag HLA-clase II	4
Figura 3: Esquema de presentación en contexto HLA	6
Figura 4: Esquema de brazo corto del cromosoma 6	8
Figura 5: Esquema de gen tipo HLA-clase I	9
Figura 6: Southern mapeo de restricción clones pY1 y pY2	29
Figura 7: Mapa de restricción del gen Y2	30
Figura 8: Estrategia de secuenciación del gen Y2	32
Figura 9: Esquema de diferencias de nt y aa entre gen H y gen Y2	44
Figura 10: Protección esperada de sonda-peptido líder frente a S1	62
Figura 11: Inmunofluorescencia de células YHHH	63
Figura 12: Resultado del mapeo S1	64
Figura 13: Diseño de sonda antisentido	65
Figura 14: Diseño del experimento de "primer extension"	66
Figura 15: Resultado de "primer extension"	66
Figura 16: Determinación del punto de iniciación de la transcripción	67
Figura 17: Amplificaciones posibles de Y2 genómico y transcripto	68
Figura 18: Especificidad del oligonucleótido Y2A	70
Figura 19: Amplificación y Southern de cDNA de células YHHH y MOLT 4 revelado con sonda Y2A	72
Figura 20: Amplificación y Southern de cDNA de células YHHH y MOLT 4 revelado con sonda Pan HLA Clase I	73
Figura 21: Amplificación y Southern de cDNA de transfección en NIH3T3 revelado con sonda Y2A	76
Figura 22: Amplificación y Southern de cDNA de transfección en NIH3T3 revelado con sonda Pan HLA Clase I	77

Abreviaturas y Glosario.

3'ut	3' no traducido
β_2m	β_2 MICROGLOBULINA
aa	AMINOACIDO
Ag	ANTIGENO
ALELO H	GEN H. CLON DESCRIPTO POR CHORNEY 1990.
bp	pares de bases.
cDNA	ADN COPIA.
CAT	CLORANFENICOL ACETIL TRANSFERASA
cpm	cuentas por minuto
DNA	ACIDO DESOXIRIBONUCLEICO
EDTA	ACIDO ETILEN DIAMINO TERTAACETICO
GEN H	ALELO H. CLON DESCRIPTOPOR CHORNEY 1990.
ETBR	BROMURO DE ETIDIO
H-2	MHC MURINO
HLA	MHC HUMANO
IFN	INTERFERON
IRE	ELEMENTO QUE RESPONDE A INTERFERON
IRS	SECUENCIA QUE RESPONDE A INTERFERON.
kb	KILOBASE
Kd	KILODALTON
D	DALTON
DTT	DITIOTREITOL
LOCUS HLA-AR	LOCUS DESCRIPTO POR ZEMMOUR 1990. POSTERIORMENTE SE LO LLAMO LOCUS H
LOCUS HLA-H	LOCUS QUE REUNE A LOS ANTERIORES HLA-AR, GEN H, GEN Y2, HLA 12.4
LT	LINFOCITO T
MHC	COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD
pb	PAIRES DE BASES
POL	POLIMERASA.
PBS	SOLUCION SALINA DE FOSFATOS
rpm	REVOLUCIONES POR MINUTO
RNA	ACIDO RIBONUCLEICO
SDS	DODECIL SULFATO DE SODIO
SS	PUENTE DISULFURO
TBE	"BUFFER" TRIS/BORATO/EDTA
TE	"BUFFER" TRIS/EDTA
TCR	RECEPTOR DE CÉLULAS T
UPE's	UPSTREAM ELEMENTS
μ g	MICROGRAMOS

I N T R O D U C C I O N



EL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD

El Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC), codifica para glicoproteínas de la superficie celular cuya función principal es la presentación de antígenos foráneos a las células del sistema inmune.

Originalmente se describieron como los antígenos responsables de la aceptación o rechazo a los trasplantes de órganos, razón por la cual, se los llamó antígenos de histocompatibilidad (Dausset 1985).

El MHC se denomina "Human Leukocyte Antigens system" (HLA) en el hombre, mientras que el murino se denomina H-2. El HLA mapea en el brazo corto del cromosoma 6 en una región que abarca aproximadamente 3 centimorgans (Trowsdale 1988). El H-2 mapea en el cromosoma 17 murino.

Se reconocen 3 clases de proteínas codificadas en el MHC: los antígenos de clase I, clase II y algunas proteínas del sistema complemento. Estas últimas no participan en la presentación antigénica ni en la diferenciación de tejidos propios o ajenos.

Los antígenos clase I y clase II están codificados por dos familias multigénicas las cuales conforman el sistema multialélico más polimórfico que se ha descrito en el genoma humano. Sus alelos se identifican serológicamente, y también por tipificaciones derivadas de conocer su secuencia nucleotídica (Zemmour 1991).

Existen tres loci HLA clase I "clásicos": HLA-A, B y C. Cada uno de ellos codifica para una cadena a la cual se asocia no covalentemente en membrana a una molécula de β_2 -microglobulina para formar un antígeno de Histocompatibilidad clase I (Bell 1985). La expresión de estos antígenos es codominante. Cada individuo presenta en la membrana celular de casi todas las células nucleadas de su organismo, un juego completo de antígenos HLA clase I por haplotipo. Es decir que simultáneamente expresa dos alelos HLA-A, dos HLA-B y dos HLA-C.

Existen tres loci HLA clase II: DP, DQ, y DR (Trowsdale 1985). Los productos de los mismos se encuentran restringidos a las membranas de las células presentadoras de antígenos incluyendo a los linfocitos B macrófagos, monocitos y células dendríticas (Flavell 1986)(Schwartz 1985). También se las detecta en los linfocitos T humanos activados (Reith 1988). Estos antígenos están constituidos por un heterodímero formado por dos cadenas (α y β) unidas no covalentemente. Al igual que los productos de clase I exhiben un alto grado de polimorfismo alélico y su expresión también es codominante.

Estructura de antígenos clase I:

Se han detectado más de 70 genes y pseudogenes de clase I (Zemmour 1991), pero serológicamente sólo se han podido identificar los productos de 3 "subfamilias multialélicas": HLA-A, HLA-B y HLA-C.

Todas las moléculas HLA clase I tienen una estructura similar consistente en dos cadenas: α y β (Bell 1985).

- La primera (α) es polimórfica y se halla codificada dentro del MHC. La misma, posee alrededor de 340 aminoácidos y pesa entre 43 y 44 kd. Esta cadena presenta glicosilación y se encuentra conformada por tres dominios extracitoplasmáticos: α_1 , α_2 y α_3 , un dominio de anclaje a membrana y un dominio intracitoplasmático hacia el interior celular.

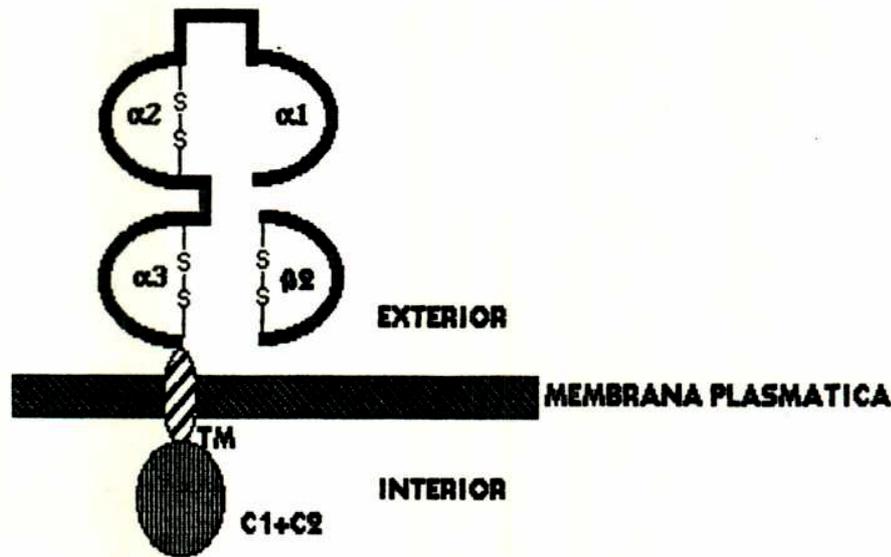
Los dominios α_1 , α_2 y α_3 presentan respectivamente 90, 92 y 92 aminoácidos cada uno respectivamente. En la posición 86 del dominio α_1 , existe un sitio de N glicosilación (Bluestone 1987). Los dominios α_2 , α_3 y el dominio intracitoplasmático contienen cada uno un puente disulfuro que se forma entre las cisteínas 101-164 y 203-259 (Orr 1979). El puente disulfuro entre las posiciones 203-259 es de suma importancia, dado que gracias a la estructura secundaria que se forma, esta cadena se puede asociar a la cadena β_2 -microglobulina. La región transmembrana tiene aproximadamente 24 aminoácidos y es altamente hidrofóbica. La región citoplasmática contiene 31 residuos y es de carácter hidrofílico.

En el extremo aminoterminal de la cadena α hay un péptido señal altamente hidrofóbico el cual se cliva dentro del retículo, antes de alcanzar la superficie celular. Este péptido direcciona a la cadena a recién sintetizada hacia la membrana externa. El gen que codifica para la cadena α en cada uno de los loci HLA A, B y C presenta un vasto polimorfismo el cual da origen a un gran número de variantes alélicas. Esta variabilidad se encuentra localizada fundamentalmente en los dominios α_1 y α_2 .

- La cadena β , asociada no covalentemente a la cadena α , se denomina β_2 -microglobulina (β_2). La misma no es polimórfica ni mapea dentro del MHC sino fuera de él, en el cromosoma 15 humano. Está conformada por 99 aminoácidos, y tiene un peso molecular de aproximadamente 12 kd. No está anclada a la membrana celular. Al igual que la cadena α presenta un puente disulfuro interno (Gates 1981).

La asociación entre las dos moléculas ocurre a nivel de retículo endoplasmático y migran juntas hacia la membrana plasmática.

A continuación se representa esquemáticamente una molécula HLA de clase I:



ESTRUCTURA ESQUEMATICA DE UN ANTIGENO HLA CLASE I
 $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ dominios extracelulares ; $\beta 2$: $\beta 2\mu$ globulina;
TM Dominio transmembrana; c1,c2 dominios
citoplasmáticos.

Figura 1: esquema de un antígeno de histocompatibilidad Clase I.

Estudios cristalográficos sobre dos alelos HLA-A2 y HLA-Aw68 permitieron determinar la estructura terciaria de estos antígenos (Björkman1987a,b).

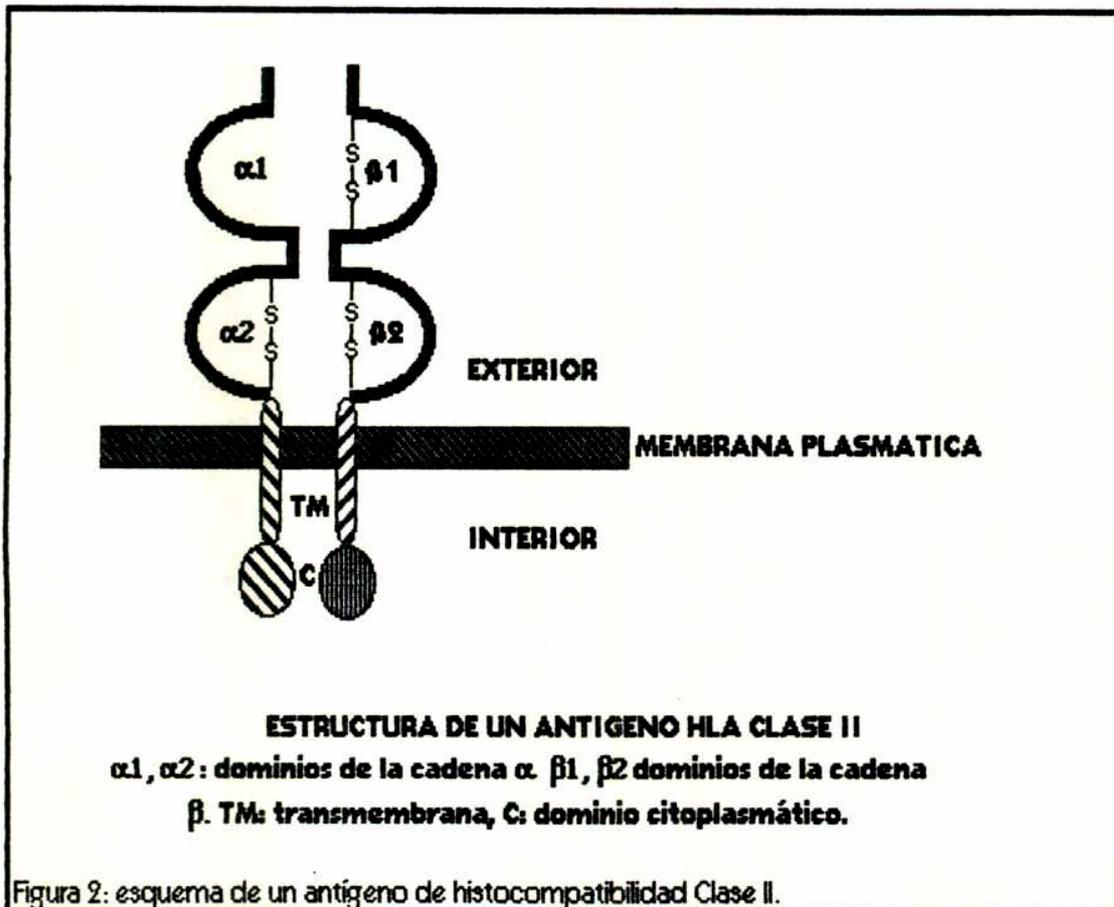
Los antígenos HLA-clase I forman entre sus dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ un foso de dimensiones acotadas: $25 \times 10 \times 11 \text{ \AA}$. Las paredes de esta fosa están formadas por dos estructuras en α hélice derivadas de la secuencia aminoacídica del dominio $\alpha 1$ entre los residuos 50 y 84 por un lado, y los residuos 138 a 180 del dominio $\alpha 2$, por el otro. La base del foso está formada por sendas estructuras de lámina β plegadas aportadas por los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$. En los dos análisis cristalográficos, se encontraron dentro de este bolsillo estructuras electrodensas que corresponden péptidos antigénicos procesados.

Estructura de antígenos clase II:

Son glicoproteínas, que están conformadas por un heterodímero α/β asociados no covalentemente y anclados en la membrana celular. La cadena α tiene 229 aminoácidos, y un peso

molecular entre 32 y 34 kd. La cadena β se forma de 237 aminoácidos y un peso molecular de 28-29 kd. Las dos cadenas (α y β) están codificadas dentro de MHC, y ambas presentan polimorfismo. Cada una de estas cadenas está conformada por 2 dominios globulares que mantienen su conformación gracias a un puente disulfuro entre cisteínas. Durante la síntesis y transporte celular, el dímero α/β está asociado a un polipéptido no codificado dentro del MHC, denominado "cadena invariante" que se cliva antes de llegar a membrana (Bell, 1985).

A continuación se representa esquemáticamente a una molécula de clase II:



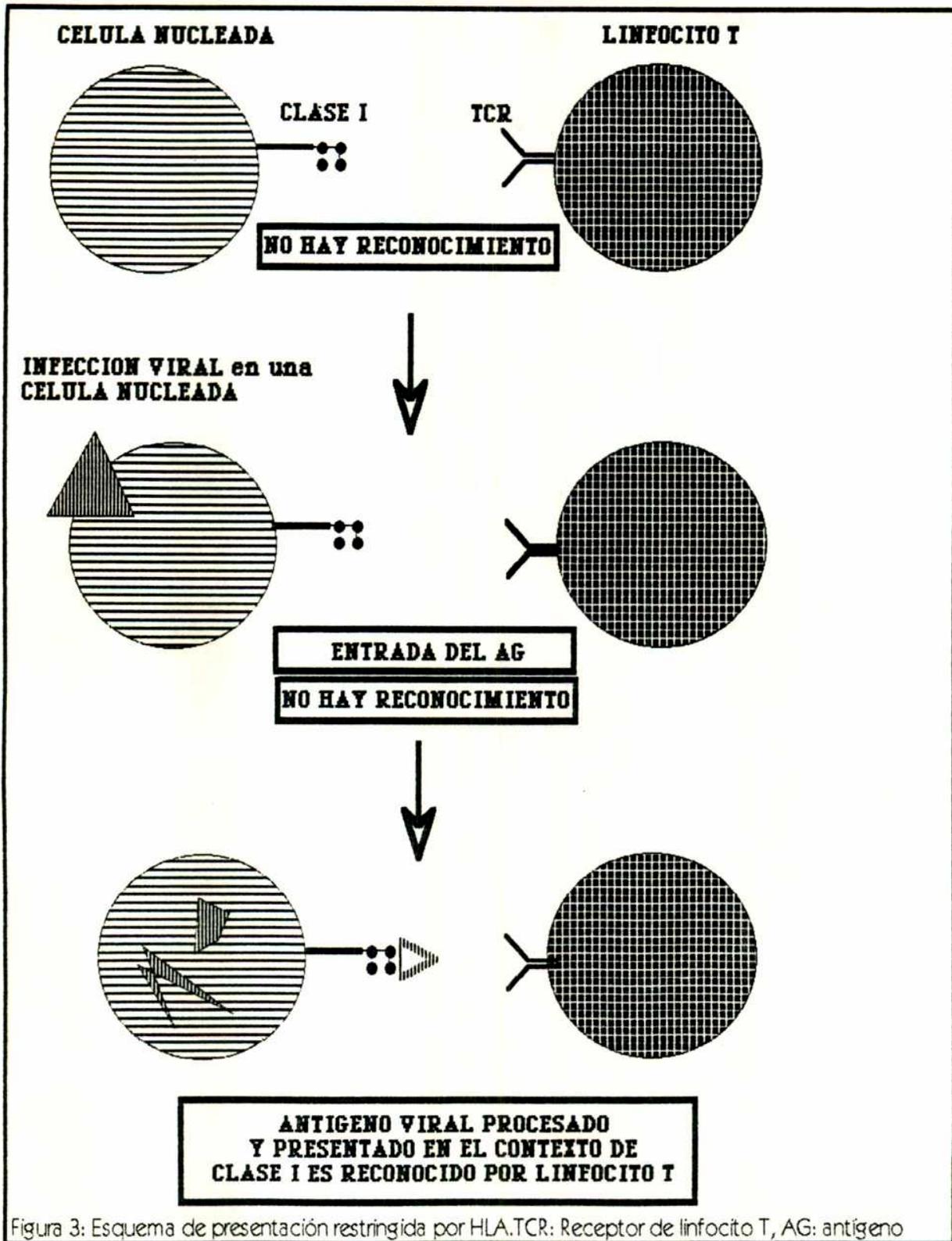
No se conoce aún la estructura cristalográfica de los antígenos de clase II pero la misma fue inferida a partir de las moléculas de clase I. En las moléculas de clase II, el bolsillo de unión al antígeno estaría conformado por los dominios α y β de ambas cadenas. En las paredes del mismo la conformación sería de α hélice y en el fondo del bolsillo una lámina β plegada.

FUNCION DE LOS ANTIGENOS DE HISTOCOMPATIBILIDAD

Los antígenos foráneos, no son reconocidos por sí mismos por las células del sistema inmunológico. Tampoco son reconocidos en su forma natural, sino que deben ser procesados antes de ser presentados. En una primera instancia son enfrentados al sistema inmunológico por las células presentadoras de antígenos (macrófagos, células dendríticas, monocitos, linfocitos B) en el contexto de los HLA de clase II.

Las células del sistema inmunológico, capaces de reconocerlas son los linfocitos T CD4+ "Helper" (Davis 1988) (Allen 1987).

Las moléculas HLA de clase I presentes en todas las células del organismo, son las responsables de presentar estos péptidos antigénicos al repertorio de los linfocitos TCD8+ "citotóxicos" o "supresores". En ambos contextos, de clase I y clase II, el antígeno proteico, "ingresa" a la célula vía endocitosis o infección, donde es degradado (procesado) a péptidos, algunos de los cuales conservan antigenicidad. En este estado, los péptidos se asocian a un antígeno de histocompatibilidad, junto con el cual alcanzan la membrana celular. De esta manera son presentados al linfocito T correspondiente (Townsend 1989).



Dentro de la población de linfocitos T se reconocen varias subpoblaciones (Meuer 1984)(Allison, 1987). Cada una de ellas se relaciona con funciones específicas: linfocito T helper, linfocito T "supresor", "citotóxico" etc. Cada una de estas subpoblaciones, tiene marcadores de superficie que permiten su identificación. Estos marcadores de superficie se asocian con una determinada función. Tal es el caso de los antígenos CD4 y los CD8.

Una vez que las células nucleadas infectadas han procesado a los antígenos foráneos, y han llevado a su membrana externa el complejo "péptido foráneo-antígeno de histocompatibilidad", éste debe ser reconocido por un linfocito T, y reaccionar con él. La especificidad del reconocimiento viene dada en la célula presentadora por el HLA clase I (o clase II) junto al péptido, y en el linfocito T por el receptor T (TCR). Este fenómeno se llama "reconocimiento restringido por histocompatibilidad" (Zinkemagel 1974).

Para que la presentación de un antígeno a un linfocito T sea efectiva, hace falta que el receptor T reconozca al antígeno procesado que presenta la célula presentadora, en el contexto del HLA, y que además exista reconocimiento entre el antígeno de superficie CD4 o CD8 del linfocito T y el complejo presentador. Existen además otras moléculas de superficie en los linfocitos T que participan de esta unión: CD2y CD3. Ambas moléculas participan de la unión entre el linfocito T receptor y la célula presentadora, a la vez que cuando se genera la unión a CD3, transduce la señal al interior celular (Allison , 1987).

Los receptores T son heterodímeros de dos clase diferentes. Los hay α/β y γ/δ . Cada una de las cadenas que conforman al heterodímero, es variable. Al igual que las inmunoglobulinas, viene codificada por un DNA que ha sufrido rearrreglos antes de llegar a la maduración. Este reordenamiento entre regiones constantes y variables genera una heterogeneidad muy grande que da lugar a especificidades particulares que se expresan en diferentes clones. Cada uno de estos clones reconoce una determinada asociación de complejo "péptido foráneo-antígeno de histocompatibilidad" sobre la membrana de una célula presentadora (Toyonaga 1987).

ESTRUCTURA GENOMICA DEL HLA

El sistema del HLA está ubicado en el brazo corto del cromosoma 6, en las regiones: 6p21.31 hasta 6p21.33. Hacia el centrómero limitan los locus clase II DP y hacia el telómero limita el locus clase I-A . En total abarca una región de aproximadamente 4 centimorgans y 3 millones y medio de pares de bases. (Trowsdale 1988).

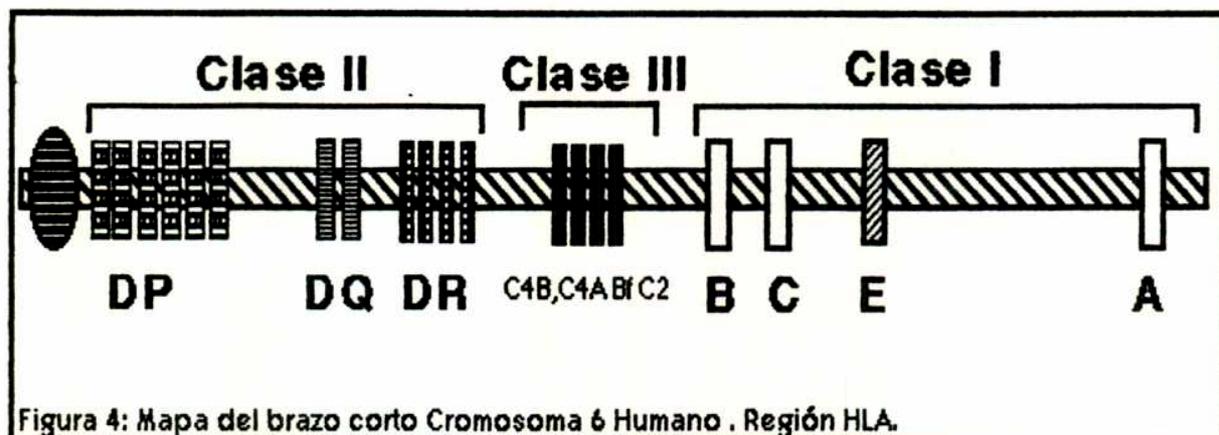


Figura 4: Mapa del brazo corto Cromosoma 6 Humano . Región HLA.

En este esquema sólo se grafican los elementos que interesa destacar. Sin embargo dentro la extensión cromosómica del HLA se han mapeado otros genes como el de la 21 hidroxilasa o genes codificantes de ciertas citoquinas regulatorias como el Tumor Necrosis Factor (Dunham 1987).

ANTIGENOS HLA-CLASE I

ESTRUCTURA GENICA:

Todas las cadenas α de los antígenos HLA clase I están codificados por genes que responden a un esquema estructural muy conservado (Zemmour, 1991). En todas ellos hay 8 exones con sus intrones intermedios. Codifican para :

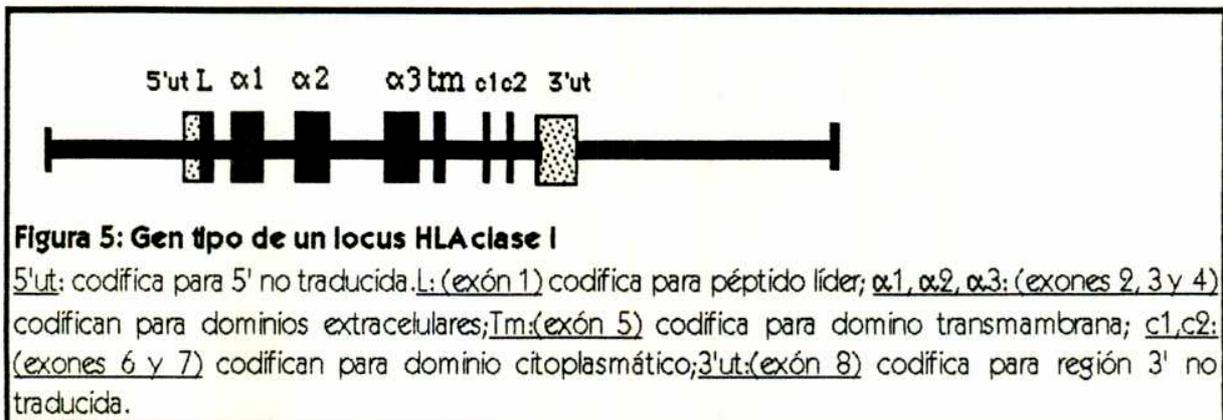
- Péptido señal, altamente hidrofóbico, que permite a la proteína madura alcanzar la superficie celular. Este exón se conforma de 73 pares de bases.

- Tres dominios extracitoplasmáticos : $\alpha 1$ (270 pb), $\alpha 2$ (276pb) y $\alpha 3$ (276pb). Entre los dominios $\alpha 2$ y $\alpha 3$, existe un intrón bastante más largo que el resto de los exones presentes en el consenso de los genes, que marca una división física destacable. Esta división física marca una diferencia de variabilidad entre exones de distintos alelos a ambos lados de este intrón (Lawlor 1990). Los exones ubicados hacia 5' acumulan variaciones, mientras que hacia 3' permanecen más conservados.

- Un dominio transmembrana
- Un dominio intracitoplasmático.

- Exón VIII que no en todos los casos se traduce a aminoácidos y presenta la única señal de poliadenilación. En algunos genes, la secuencia codificada por este exón aporta un aminoácido o dos a la proteína madura (HLA-Bw58 etc .)

En la siguiente figura se observa un esquema tipo:



REGULACION DE LA EXPRESION DE LOS GENES HLA CLASE I

La expresión de los genes HLA está regulada durante el desarrollo. Difícilmente se los puede detectar hasta la mitad del desarrollo embriológico, y se los encuentra expresados en membrana de casi todas las células de los adultos. Se expresan fuertemente en células linfocíticas (David-Walltine 1990). Tienen una fuerte regulación tejido-específica debido a la acción conjunta de varios elementos: se han descrito tanto secuencias regulatorias (Zakow 1989)(Chodosh 1988), como también factores de unión a estas secuencias (Singh 1988)(Fan 1990).

Los genes HLA clase I presentan los clásicos elementos de control de transcripción descriptos para todos los genes eucariotas. Estos elementos son los que direccionan la acción de la RNA polimerasa II: promotor y enhancers.

La región del **promotor** consiste en la "TATA box" y los UPE's ("upstream elements"), que pueden ser uno o más. La "TATA box", en general se ubica entre 20 y 25 pares de bases hacia 5' del sitio de iniciación del mRNA (Chodosh, 1988). Su función consiste en direccionar a la RNA polimerasa a su sitio correcto de iniciación. Entre los UPE's se encuentra la CAAT box, cuya función se relaciona con la cantidad de iniciaciones de la transcripción que la RNA polimerasa efectúa sobre el templado. Los **enhancers** son secuencias de DNA, que actúan en cis respecto del gen a transcribir. Son independientes de la polaridad ($5' \rightarrow 3'$ ó $3' \rightarrow 5'$) y de la ubicación ya que pueden estar "upstream" o "downstream" del templado en cuestión. Se han descrito dos enhancers en los genes HLA clase I. Son el enhancer A entre las posiciones -193 y -158 y el enhancer B entre las posiciones -120 y -61 (Israel 1989). El enhancer A se superpone con otra secuencia de función conocida y bastante estudiada, que confiere inducibilidad por interferón (IRS) al gen ubicado hacia 3'. La secuencia IRS actúa

independientemente de la polaridad (5' → 3' ó 3' → 5'). La secuencia consenso de los enhancers A y B se describe a continuación:

ENHANCER A
-199 5'TGGGGATTGCCA3'

ENHANCER B
-104 5'CACTAGGTGTC3'

Se han descrito varios factores que se unen al enhancer A con diferente afinidad : KBF1 (Israël 1987), KBF2 (Israël 1989) H2TF1 (Baldwin 1987) NF-kB (Baldwin 1988). Se ha probado en ensayos de delección de promotores, que la secuencia del enhancer A junto a la secuencia IRS regulan positivamente a los genes hacia 3' (Kato 1990).

La secuencia "Interferón sensible", se describió originalmente para los genes HLA-A3, HLA DR α , 12.4 y gen de la metalotioneína II (Friedmann 1985).

Secuencia Interferón Sensible
(-179) 3'AGTTTCACTTCTTC5'

Esta secuencia tiene un consenso claro, y se han descrito modificaciones funcionales generadas por reemplazo de algunas de estas posiciones entre los alelos HLA-A3 y HLAB7, que generan una mejor respuesta a la estimulación (Hakem 1990). Esta secuencia , para ser efectiva requiere de la presencia del enhancer A completo (Israël 1986). También se han descrito casos en los que el enhancer A confiere la propiedad de sensibilidad al interferón por sí solo (Korber 1987). Se han descrito dos factores proteicos cuya aparición correlaciona con la inducción por interferón, y que señalan los que se unen al IRS produciendo un aumento de la transcripción : KBF1y H2TF1 (Blonar, 1989.)

POLIMORFISMO Y VARIABILIDAD HLA CLASE I

El polimorfismo de las moléculas de clase I fue una de las características que más llevaron la atención hacia el MHC (Bodmer 1972). Un inusual número de alelos y junto a la ausencia de un tipo dominante "wild type", sugirió que se estaba en presencia de una nueva modalidad de alelismo, diferente de aquella exhibida por las proteínas conocidas, enzimas, y otros antígenos de superficie.

Con el advenimiento de las técnicas que permiten trabajar con ácidos nucleicos, se fueron conociendo las secuencias de los diferentes alelos pertenecientes a los distintos locus, y por

comparación se fueron conociendo mejor las variaciones y se comenzó a entender la naturaleza del polimorfismo.

Se observa que las variaciones entre alelos no son de un par de aminoácidos como en el caso de las hemoglobinas (Efstratiadis 1980).

Se han podido comparar las secuencias de muchos alelos pertenecientes a cada uno de los distintos loci de clase I, de lo cual se desprenden similitudes y diferencias en distintos niveles (Parham 1988):

1) Todos los genes HLA clase I:

- Presentan un mismo esquema de exones e intrones: 8 exones separados por 7 intrones que conservan una alta homología entre todos los genes.

- Todos ellos tienen muy conservadas las secuencias que codifican los exones IV a VIII. Las posiciones de alta conservación son las que mantienen la estructura terciaria del antígeno que sustenta su actividad biológica.

2) Entre los diferentes loci:

Se observa que dentro de los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ (exones 2 y 3), aproximadamente la mitad de las 182 posiciones aminoacídicas muestran variación en los productos en uno u otro locus. En estas posiciones aparece uno de dos o tres aminoácidos posibles para cada posición. Los patrones de sustitución en estas posiciones, son comunes entre los diferentes alelos de cada locus.

3) Dentro de cada locus:

Se han descrito alrededor de 20 posiciones aminoacídicas que presentan una alta variabilidad dentro de los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$, y 19 de esas 20 corresponden a las posiciones de los dominios que entran en contacto con el receptor T, y se involucran con la presentación de péptidos procesados. La variación de sustitución en esas posiciones, es la que determina la especificidad de alelo.

Existen fuertes evidencias de que la variabilidad está generada por fenómenos de recombinación no recíproca o conversión génica. Este mecanismo involucra la copia de tramos de información del DNA durante la replicación del mismo, a partir de genes homólogos. Los genes que interactúan pueden estar en el mismo cromosoma o en cromosomas distintos.

No caben acerca de la ventaja de tener un sistema codominante y tan polimórfico a la hora de presentar antígenos foráneos: cuanto mayor sea la variabilidad dentro de una población determinada, tanto mayor es la probabilidad de que un antígeno sea reconocido por los linfocitos T. Entonces, en poblaciones con alto polimorfismo MHC, es menor la probabilidad de que la población

sea "atacada" por un antígeno que no pueda ser presentado (Lawlor 1990). En estas circunstancias, un nuevo alelo, o bien una variación aminoacídica que optimice esta respuesta será seleccionado positivamente (Buus 1987) .

HOMOGENEIZACIÓN y FUNCIONALIDAD DE GENES HLA CLASE I

Se observa que mientras la variación interalélica en los genes HLA de clase I aumenta entre los exones I a III, se mantiene muy baja entre los exones IV a VIII. Este fenómeno, denominado homogeneización (Lawlor 1990), se correlaciona con la necesidad de conservar intactas las estructuras que dan soporte estructural a la actividad biológica y que son condición "sine quanon" para que los genes HLA clase I tengan la estructura terciaria que presentan.

El hecho de que esté favorecida la variabilidad en los primeros exones, y la homogeneización en los exones ubicados hacia 3' tiene una clara ventaja adaptativa: a mayor variabilidad en estos exones (codificantes del bolsillo de unión antigénica), mayor espectro de respuesta anti-antigénica. Esto estaría favoreciendo una selección positiva hacia esta variabilidad. Cuando un determinado locus o alelo, deja de tener actividad biológica, debido a los fenómenos de conversión génica y recombinación homóloga, comienza el camino de homogeneización en los exones I a III (Lawlor 1990).

DESEQUILIBRIO DE UNIÓN. ENFERMEDAD Y HLA

Los alelos HLA se expresan de manera codominante. de manera que cada individuo expresa un antígeno por cada gen activo en cada cromosoma. El grupo de alelos ubicados en un mismo cromosoma se llama haplotipo. Cada hijo hereda un haplotipo HLA proveniente de cada padre. Algunos loci que forman estos haplotipos, presentan el fenómeno de desequilibrio de unión. Esto significa que algunas combinaciones de alelos, aparecen en una frecuencia mayor que la esperada por segregación independiente. La asociación esperada entre HLA-A1 y HLA-B8 esperada por segregación independiente, es igual al producto de sus frecuencias en la población : 1.6%. Sin embargo esta asociación aparece en el 8.8% de los individuos de la población (Terasaki 1985).

También ocurre que ciertos antígenos aparecen caracterizando a ciertas poblaciones étnicas con frecuencias muy diferentes. Por ejemplo, el antígeno clase II DR2 se presenta en la Japonesa con un frecuencia de 34% (Juji 1984) , mientras que en la de judíos azkenazíes aparece con una frecuencia mucho menor : 12.6% (Oksenberg 1983).

Otra característica notable es la asociación entre HLA y enfermedad. Se observa que existe un gran número de enfermedades enfermedades, que se desencadenan preferentemente en individuos portadores de determinados alelos HLA. Muchas de estas patologías involucran la participación de

células del sistema inmune. Este es el caso de enfermedades como diabetes juvenil, esclerosis múltiple, enfermedad celíaca, espondilitis anquilosante (Terasaki 1985). El caso más drástico de asociación entre HLA y enfermedad, es el de una patología poco conocida, la narcolepsia, donde el 100% de los enfermos portan el alelo clase II HLA-DR2 (Wilner 1988).

OTROS GENES HLA CLASE I

Estudios de Southern Blots sobre el genoma humano y murino, mostraron que el número de genes HLA clase I que existen por cada genoma haploide, excede en número a los productos de clase I que se pueden reconocer serológicamente en membrana (Koller 1989).

La explicación de este fenómeno, es que existe un amplio número de elementos que no son genes activos y funcionales dentro del genoma. Estos son reconocidos positivamente en un Southern blot mediante la hibridación con una sonda HLA-clase I específica, gracias a la alta homología que comparten (Hood 1983).

Se han descrito:

- FRAGMENTOS DE GENES HLA CLASE I: Se han detectado numerosos fragmentos de genes HLA clase I que carecen de cabeza o cola. Posiblemente se hayan generado por duplicaciones o cruzamientos desiguales entre genes funcionales (Srivastava 1985).

- GENES NO PERTENECIENTES AL HLA: Se los denomina símil HLA o "class I like". Corresponden a genes cuyos productos se unen a la β_2 -microglobulina. El ejemplo más característico es el de la glicoproteína CD1, que se halla codificada en el cromosoma 1 (Calabi 1986). Otro caso reconocido, es la secuencia que incluye el genoma del citomegalovirus, que reproduce con fidelidad un mRNA de HLA clase I, y que en líneas celulares transformadas con este agente aparecen (Beck 1988).

- GENES HLA CLASE I NO CLASICOS: Codifican para proteínas que se unen también a la β_2 -microglobulina. No siempre quedan anclados a la membrana. Es el caso de las proteínas murinas Qa y Tla (Watts 1989).

En humanos se han descrito los locus **HLA-E, F y G**. Recientemente se ha descrito un gen bajo el nombre de gen H (Chomey 1990). Simultáneamente, se describió un nuevo locus al que se llamó HLA-AR (Zemmour 1990). El Comité de Nomenclatura del HLA llamó a este nuevo locus **HLA-H** (Bodmer 1991). A este locus pertenecen el gen H, los clones descritos bajo el nombre de locus HLA-AR, el HLA-12.4, que fue el primer gen HLA clase I secuenciado (Malissen 1982), el pseudogen JY8 (Duceman 1988) el gen Y2 que se describe en la presente tesis.

el LOCUS HLA-E: Este gen fue el primer gen "no clásico" en recibir la nomenclatura del comité de nomenclatura del HLA. Originalmente se lo describió como "HLA -6.2" (el tamaño del clon sobre el cual fue detectado en la genoteca genómica de clonado original).

Este gen mapea entre los loci HLA-C y el HLA-A, en el brazo corto del cromosoma 6.

Responde a la estructura general de organización de los HLA clase I clásicos, en cuanto a estructura de sus exones e intrones y regiones regulatorias. Las características que se detallan a continuación son las que lo distinguen (Koller 1988) :

1) Incluye tres repeticiones ALU a lo largo de su secuencia. La primera de ellas en la zona 5' flanqueante, ubicada desde -660 hasta -400 respecto del codón ATG iniciador.

La segunda de estas repeticiones ALU aparece en el intrón 5, que está muy conservado entre los HLA-clase I clásicos. Esta secuencia ALU está flanqueada a ambos lados por una secuencia muy conservada que se encuentra como única en los intrones 5 de los clásicos HLA.

La tercera repetición ALU aparece insertada en la región no traducida 3'. También aparece flanqueada por una misma secuencia a ambos lados. El final de esta inserción ALU, contribuye a formar una señal de poliadenilación adicional, ubicada hacia 5' de la clásica, que también está presente.

2) La secuencia ubicada hacia 5' desde la base -181 respecto del ATG iniciador, es notablemente diferente de las clásicas. Este punto coincide con la sexta base de la secuencia interferón sensible, de la cual, el core, está conservado.

3) Codifica para un péptido líder más corto y de diferente composición que el resto de los HLA clase I clásicos. Tiene sólo 21 aminoácidos, contra 24.

4) Posee una delección de 5 nucleótidos en el exón que codifica para el dominio citoplasmático 2, generando una terminación prematura de la proteína traducida, 4 aminoácidos antes que en los HLA clásicos.

5) Las señales CAAT y TATA están presentes en las posiciones características para los HLA clase I clásicos.

6) No presenta ninguna secuencia homóloga al enhancer A, descrito para los HLA-clase I, ya que esta secuencia viene superpuesta hacia la región 5' de la secuencia interferón sensible, que aquí aparece parcialmente desvirtuada. Presenta el enhancer B con un solo nucleótido de diferencia respecto del enhancer B del HLA A2.

7) Conserva la secuencia del exón 4 que codifica para el dominio $\alpha 3$ de unión a la β_2 -microglobulina.

8) Se detectaron por Northern blots, transcriptos con una sonda de HLA E en el mRNA de todas las líneas celulares estudiadas, derivadas de diferentes órganos (Koller 1988).

9) El gen HLA-E se transcribe, se traduce y se asocia a β_2 -microglobulina cuando se lo transfecta a la línea celular B-LCL (Koller 1988).

10) Transfecta a la línea celular B-LCL, no se pudo detectar su producto en membrana, aunque sí se lo pudo inmunoprecipitar con el anticuerpo w6/32, reconocedor de los HLA Clásicos (Koller 1988).

• **LOCUS HLA-F**: Fue el tercer gen HLA no-clásico detectado cuya secuencia codifica para una proteína íntegra similar a las clásicas HLA-clase I (Geraghty 1990). Se lo denominó originalmente como HLA-5.4 (Shimizu 1988).

Su estructura general es similar a la de un gen HLA clase I clásico, comparando las secuencias desde las regiones flanqueantes en 5' hasta el exón, 8, que contiene la región 3' no traducida.

Presenta varios elementos que lo diferencian de los clásicos clase I:

1) Conserva todos los sitios de splicing GT-AG, salvo en el límite 3' del intrón 6, hecho que excluye al exón 7 del transcrito maduro.

2) Luego del codón de terminación en el exón 8, la homología con los HLA Clase I clásicos continúa por 27 pares de bases, luego de las cuales, hacia 3', aparece una secuencia única, que no guarda homología con ningún gen secuenciado.

3) Esta secuencia de DNA incluye dos sitios de poliadenilación, generando un transcrito teórico de 1200 pares de bases contra uno clásico de 1600.

4) Esta misma secuencia de DNA, que es única, fue utilizada como sonda distintiva de una familia de genes, de transcripción "ubicultaria", sin relación probada con la familia HLA.

5) Las regiones regulatorias y promotoras de este gen, están parcialmente conservadas. Presenta homología alta, aunque no total, para el enhancer A, enhancer B, secuencia Interferón sensible, CAAT y TATA boxes.

6) La secuencia del exón 4 que codifica para el dominio $\alpha 3$ está conservada, permitiendo la unión a β_2 -microglobulina.

7) Se transfectó este gen a células LCL, donde se pudo detectar tanto mRNA como proteína, unida a β_2 -microglobulina, pero solo en citoplasma, nunca en la superficie celular.

8) En los tejidos donde normalmente se expresan los HLA clase I no se ha detectado expresión de este gen, por técnicas de protección frente a nucleasas. Solo se lo detectó en Linfocitos B y células de la piel, en muy baja proporción (Geraghty 1990).

9) Utilizando la región distintiva de este gen ubicada hacia 3' (ver punto **2**), se detectaron transcritos "abundantes" en todos los tejidos humanos estudiados. Estos transcritos pertenecerían a otra familia génica distinta, sin relación con la familia génica HLA (Geraghty 1990).

• **LOCUS HLA-G**: Se lo describió originalmente con el nombre del clon genómico dentro del cual fue detectado: HLA 6.0. Fue el primer gen no clásico descrito como tal, luego del HLA 12.4, que originalmente se describió como un pseudogen. Estructuralmente presenta el mismo esquema general

que los clásicos HLA clase I. Se enumeran a continuación las características del locus (Geraghty 1987):

1) Presenta la estructura génica típica de los HLA clase I clásicos. Se encuentran todos los exones e intrones. Presenta todas las señales de "splicing" en cada uno de los flancos de exones e intrones.

2) Presenta un codón de terminación prematuro en el segundo codón del exón que codifica para el dominio citoplasmático 1, de tal manera que el transcripto maduro de esta proteína carece de este dominio (C1), salvo por dos aminoácidos, y falta totalmente el dominio citoplasmático 2. En total faltan 19 aminoácidos.

3) Sus regiones regulatorias en 5' son conservadas sólo en parte: Aparece muy desvirtuado el enhancer A del cual sólo se conservan 5 de 12 bases. La secuencia Interferón sensible sólo presenta homología 4 bases entre 14. Tiene alta homología con el enhancer B, del cual sólo difieren 2 de 11 bases. Presenta correctamente las CAAT y TATA boxes.

4) No se ha publicado la distribución de su expresión en distintos tejidos.

5) La secuencia del exón 4, que codifica para el dominio α_3 está conservada, permitiendo la unión a β_2 -microglobulina.

6) Cuando fue transfectado a células LCL se detectó su expresión en membrana asociada a β_2 -microglobulina usando anticuerpos anti β_2 -microglobulina (Shimuzu 1988).

Locus HLA-H

Este locus fue descrito por primera vez bajo el nombre de HLA-AR (Zemmour 1990). Este nombre deriva de la similitud que encontró uno de los grupos que describió este locus con el locus HLA-A. Cuando se compara entre alelos de un mismo locus (HLA-B58/HLA-B27, por ejemplo), se evidencia una diferencia promedio de 20 bases entre un alelo y otro. Cuando se compara entre alelos de diferente locus (HLA-A2/HLA-Cw1), surge que la diferencia promedio de sustituciones es de 111. Cuando se comparan los HLA-H contra el consenso de los HLA-A y contra el consenso de los HLA B, el número de sustituciones que surge es: HLA-H/HLA-A: 92.3 sustituciones, HLA-H/HLA B: 104.3 sustituciones, HLA-H/HLA C: 116.6 sustituciones. Esta diferencia, sumada al hecho de que los clones fueron revelados en southern blot con una sonda HLA-A específica, justificaron el nombre de HLA-AR (HLA-"A" related) (Zemmour 1990).

Paralelamente en nuestro laboratorio se había aislado un clon genómico de un gen HLA clase I, llamado Y2 (Ferraro 1990).

El trabajo de la presente tesis doctoral, consiste fundamentalmente en la caracterización estructural y funcional del clon Y2.

Las características distintivas de este locus son:

1) El HLA 12.4, alelo de este locus, fue caracterizado por los autores que lo describieron (Malissen, M.; Malissen, B.; Jordan B. (1982) PNAS 79: 893.), como un pseudogen, por la predicción de

que la proteína madura, no podría adquirir la estructura terciaria correcta al poseer sustituida la cisteína de la posición 164, por una fenilalanina, impidiendo la formación del puente disulfuro del dominio $\alpha 2$. Esto traería como consecuencia, la incapacidad de unir a la β_2 -microglobulina. Todos los alelos descritos para este gen comparten dicha característica.

2) Todos los alelos descritos, salvo el HLA-12.4, poseen una mutación deletérea : deleción de un nucleótido en el codón 226-227, que saca a todos los alelos de su marco de lectura, llevándolos a una terminación temprana en el extremo carboxi-terminal de la proteína madura.

3) El locus para este gen se localiza en el brazo corto del cromosoma 6, entre los loci HLA-C y HLA-A (Chomey 1990).

4) Todos los alelos descritos, conservan todas las secuencias promotoras descritas : enhancers A y B, secuencia interferón sensible, TATA y CAAT boxes, etc.

5) Debido al bajo polimorfismo entre los distintos alelos de este gen ,se describe el fenómeno de homogeneización, ya tratado en "Polimorfismo y homogeneización"

CELULAS MOLT 4 e YHHH

El control de la expresión de los genes de HLA inducidos por IFN α se estudia utilizando la línea celular tipo T Molt4 y una mutante de alta expresión de HLA como respuesta al IFN α , derivada de Molt4, llamada YHHH (Minowada 1972) (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 IFN α (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 IFN α , 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 específicas correspondientes a antígenos HLA (por ejemplo p001, reconoce genes HLA-A, B, C, (Mc Michael, 1979). 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 IFN α 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 IFN α 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). (Martin, L.; Calabi, F.; Milstein, C.; PNAS 83 : 9154). La expresión de este antígeno no está ligada a la expresión de HLA y no aumenta por estimulación con IFN α . 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 IFN α (Burrone, 1982). Estos hechos indican que el aumento en expresión de HLA por efecto del IFN α 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.

YHHH: Línea celular linfoidea tipo T derivada de Molt4 que presenta expresión aumentada de antígenos HLA (respecto de Molt4) como respuesta al tratamiento con IFN α . 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 IFN α , 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 población 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 YTH/76 inducidos por 2000 U/ml de IFN α . La línea YH fue estimulada por 48 hs. con dosis menores de IFN α , 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 IFN α 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 IFN α , 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 IFN α 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 IFN α .

Por análisis serotípico se observó que las mutantes YH presentan en su membrana HLA-A1, y al recibir estimulación con IFN α 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 Y^HH (Burrone, 1985) e Y^HH^H (Girdlestone, 1988). La expresión aumentada de antígenos HLA como respuesta al tratamiento con IFN α en células Y^HH^H se debe principalmente a un aumento de antígenos HLA-B, hecho que fue observado estudiando el mRNA de células Molt4 e Y^HH^H inducidas con IFN α con sondas específicas para genes HLA-A y HLA-B en ensayos de protección a nucleasa S1.

Las características observadas en las células Molt4 y mutantes Y^HH^H indican que existe en las mutantes alguna alteración en el control de la expresión de los genes de HLA inducidos por IFN α (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 IFN α .

OBJETIVOS Y SÍNTESIS DE ESTE TRABAJO

El objetivo amplio de este trabajo de tesis fue analizar la complejidad alélica de un nuevo locus del complejo mayor de histocompatibilidad humano (HLA), que codifica para una molécula clase I "no clásica" locus HLA H, a la vez que caracterizar un nuevo alelo del mismo locus.

Para ello, se clonó uno de los alelos del locus, descrito por primera vez en este trabajo, llamado Y2. Este alelo ha sido estudiado tanto a nivel de la complejidad de su secuencia nucleotídica como en distintos aspectos de su expresión.

Síntesis del trabajo

Se ha clonado un gen HLA clase I no-clásico perteneciente al locus recientemente descrito HLA-H.

Este gen fue clonado de una genoteca genómica parcial, hecha sobre el DNA de la línea celular linfocítica tipo T, llamada YHHH.

Esta línea es una mutante de expresión de HLA clase I inducido por interferón, deriva de la línea Molt 4. Dado que tanto en la línea parental como en YHHH los alelos más respondedores a la inducción por interferón son los HLA B, se ha buscado en la genoteca genómica con una sonda B específica.

Se seleccionó de la genoteca un clon de 6500 pares de bases que contiene a un gen HLA clase I completo, llamado Y2. Se han secuenciado 4008 pares de bases de este gen, que incluyen a todas las regiones codificantes y a sus intrones intermedios. Se han secuenciado las regiones flanqueantes: 458 pares de bases hacia 5' del ATG que incluyen las secuencias consenso de enhancers y señales de iniciación de la transcripción, y 270 pares de bases hacia 3' de la señal de poliadenilación.

El gen Y2 posee tres características diferenciales importantes. Son las que hacen del locus HLA-H un locus no-clásico:

- 1) El primer aminoácido del dominio $\alpha 1$ es una Arginina (nunca presente en otro HLA).
- 2) La posición aminoacídica 164 presenta Fenilalanina en lugar del consenso HLA Cisteína.
- 3) Presenta una deleción puntual de un nucleótido en el exón 4 que codifica para el dominio $\alpha 3$. Esta deleción saca al gen Y2 de su marco de lectura, y lo lleva a encontrar una terminación temprana antes de salir de este exón.

La proteína resultante, si existiera, sería de PM 34000 Dalton aproximadamente. No presentaría los dominios funcionales para comportarse como un HLA clase I clásico. Carecería de los dominios transmembrana y citoplasmáticos. Presentaría dificultades para unir a la $\beta 2$ -microglobulina, fundamental para el transporte a membrana de la proteína madura, porque la secuencia de unión en las proteínas normales está en el dominio $\alpha 3$, dominio que en Y2 estaría traducido en un marco de

lectura +1, a partir del sitio de la delección, respecto de los genes clásicos.

Los ensayos que apuntan a verificar la expresión del gen Y2 muestran resultados contradictorios en las células de origen YHHH. Por mapeo S1, se observa una protección específica de una sonda que cubre el péptido señal. Por amplificación de cDNA proveniente de RNA de YHHH no se detectan niveles de expresión de este gen en estas células, aún luego de tratamiento con interferón.

Los resultados observados al estudiar la expresión de este gen transfectado en células NIH 3T3 indicarían que Y2 no es factible de ser transcrito en las células en las cuales fue clonado, ni en células NIH3T3 de origen murino.

M
A **M**
T **Y** **É**
E **T**
R **O**
I **D**
A **O**
L **S**
E
S

CULTIVO DE CÉLULAS :

Se trabajó con células Molt 4 e YHHH. Los cultivos celulares de ambas líneas fueron realizados en medio de cultivo esencial modificado de Dulbecco (D-MEM) suplementado con 5% de suero fetal bovino, 4 mM de glutamina, 50 u/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomina. Se cultivaron en estufa a 37°C con una atmósfera de 5 % de CO₂. La estimulación de IFN se realizó durante 24 ó 48 hs con NK-2 IFN α .

INMUNOFLUORESCENCIA DE SUPERFICIE DE MOLT 4 E YHHH:

Se incubaron las células a 4°C con el anticuerpo monoclonal YTH76 durante 45'. Luego fueron lavadas con solución de PBS/ 5% de suero de camero neonato, e incubadas con un segundo anticuerpo conjugado con fluoresceína por otros 45' en las mismas condiciones. Las células fueron lavadas nuevamente y observadas en un microscopio de epifluorescencia.

PREPARACION DE RNA TOTAL:

Se partió de 10×10^7 células. Se centrifugaron a 1500 rpm. Se lavaron con una solución de PBS/5% de suero fetal. Las células fueron lisadas en una solución 1,2% de Nacidet-P40 en buffer 20mM tris-HCl pH 7,4, 140 mM NaCl, 3mM MgCl₂. Los núcleos fueron preparados por centrifugación a 10.000 rpm. El sobrenadante fue digerido con proteinasa K (0.1%SDS, 5mM EDTA pH8). Posteriormente fueron realizadas 2 extracciones fenólicas. El RNA fue precipitado con 2 volúmenes de Etanol y 300mM de sal. La muestra fue calentada a 70°C y resuspendida en 50 µl de TE.

PREPARACION DE CDNA:

Se incubaron 1µg de RNA total con 300ng de "primer" reverso a 95°C por 3' en un volumen de 10µl. La mezcla fue trasvasada a un baño de agua helada por 10 minutos, y luego fueron agregados 4µl de buffer de síntesis 5X : 250 mM Tris Hcl pH 8.3, 375 mM KCl, 50 mM DTT, 15 mM MgCl₂, 0,5 mM de cada dNTP. Se agregaron 200 U de *M-MuLV* Transcriptasa Reversa. Se incubó por 60' a 37°C.

Aislamiento y purificación de plásmidos:

Minipreparación de plásmidos: Se utilizó el método de Birnboim y Doly. 2 ml de cultivo bacteriana crecido durante toda la noche con el antibiotico apropiado fue centrifugado a 10.000 rpm por 2'. Las bacterias fueron resuspendidas en 100 µl de buffer lisis (25 mM Tris HCl pH 8, 2 mM EDTA, 0.9% glucosa) con 10 mg/ml de lisozima. Se dejaron a 4°C durante 45'. Se agregaron 200 µl de 0.2% NaOH, 1% SDS. Luego de 10' la mezcla fue neutralizada con 150 µl de AcONa ó AcOK 3M. Se incubó a 4°C durante 45'. Se centrifugó a 14.000 rpm durante 20'. Se tomó el sobrenadante, se realizó una extracción con cloroformo. El DNA plasmidico fue precipitado con el agregado de 2,5 volúmenes de etanol 100% y 0,3 M final de AcONa . Se resuspendió el DNA en 50 µl de Buffer TE.

DIGESTION CON ENDONUCLEASAS DE RESTRICCION: Para el análisis de plásmidos y fagos, se digirió el DNA en un volumen de 10 μ l con 1 μ l del buffer apropiado, a la temperatura indicada para cada enzima de restricción.

GELES DE AGAROSA : Los DNAs digeridos fueron corridos en geles de agarosa de distinto % (0,7-1,5) dependiendo de la necesidad. El buffer de corrida usado fue TBE 1X (90 mM Tris-HCL pH 8, 90 mM ácido Bórico, 20 mM EDTA). En cada gel fueron corridos indicadores de peso molecular. Los DNAs fueron visualizados luego de cada corrida por tinción de los geles con Bromuro de Etidio (5 μ l de una solución 12 mg/ml) y posteriormente fueron observados a través de un transiluminador de luz ultravioleta.

OBTENCION DE FRAGMENTOS DE GELES DE AGAROSA : Los fragmentos de interés fueron liberados de los vectores con las enzimas de restricción correspondientes, la mezcla de reacción fue corrida en geles de agarosa. Los fragmentos deseados fueron electroeluidos en bolsitas de diálisis de "cut-off" > que 12.000 Dalton . El buffer de solución usado fue TBE 0.5x. El DNA obtenido fue resuspendido en 10-20 μ l de buffer TE y el 10% de la muestra fue corrida en geles de agarosa con el fin de verificar la presencia del fragmento.

MARCACION DE FRAGMENTOS POR NICK TRANSLATION: Se incuban 50-200 ng de DNA y se marcaron radioactivamente según el método de Rigby con dCTP [α -³²P] (3000Ci/mmol). La sonda marcada fue separada del nucleótido libre con el uso de una columna de Sephadex G-50 equilibrada en buffer TE.

MARCACION DE FRAGMENTOS POR MULTIPRIMING: 50-200 ng de DNA fueron marcados radioactivamente con dCTP [α -³²P] (3000Ci/mmol), siguiendo las instrucciones del "kit" de "multipriming" de Amersham.

SOUTHERN BLOTS : Los fragmentos de DNA fueron corridos en geles de agarosa, y transferidos a membranas según el método de Southern modificado por Manniatis. Los geles fueron sometidos a los siguientes tratamientos previamente a la transferencia : 15' 0,25 N ClH, 40' 0,5 M NaOH-1,5 M NaCl, y finalmente 45' 0,5 M Tris Cl pH 8-2,5 M Na Cl. Se transfirieron luego a nitrocelulosa en 20x SSC (3M Cl Na-88,2 gr/l de Citrato de Na) durante 12-15 hs. Los filtros fueron lavados en 2xSSC y posteriormente homeados a 80°C durante 2 horas. Luego fueron guardados hasta ser usados.

PREPARACION DE BACTERIAS COMPETENTES : De una placa crecida en las condiciones de selección adecuadas, se creció una única colonia de bacterias E.coli cepas MC 1061- JM101-DH5 α en medio LB (Luria Bertani) hasta una D.O.₅₅₀= 0,48. Se centrifugaron 100ml de cultivo durante 5' a 4° a 3000rpm.

Se resuspendió el "pellet" en 40 ml de solución TPB1 (30 mM acetato de K, 100 mM KCl, 10 mM CaCl₂, 50 mM MnCl₂, 15% glicerol). Luego de dejar 5' a 4° se centrifugó y el "pellet" fue resuspendido en 4ml de Solución TPB2 (10mM pipes pH 6,5, 75mM CaCl₂ 10mM KCl, 15% glicerol). Se dejó por 15' a 4°C y la suspensión de bacterias fue alicuotada en tubos eppendorff (200µl cadatubo). Las bacterias fueron congeladas en N₂ líquido, y guardadas a -70° hasta 6 meses. Se obtuvieron células competentes con un rendimiento de transformación de 10⁶ colonias/µgr. de DNA superenrollado.

TRANSFORMACION DE BACTERIAS COMPETENTES CON PLASMIDOS : se incuban 50 µl de bacterias competentes con 5-10 ng de DNA a 4°C durante 30'. Se sometió la mezcla de incubación a un "shok" térmico de 42°C durante 90". La mezcla fue colocada nuevamente a 4°C por 2". Se agregaron 150µl de medio LB . Se incubó a 37°C por 45'. Las células fueron plaqueadas en presencia del antibiótico de selección.

TRANSFORMACION DE BACTERIAS COMPETENTES CON BACTERIOFAGO M13 : se incuban 50 µl de bacterias competentes con 5-10 ng de DNA a 4°C durante 30'. La incubación fue sometida a un "shok" térmico de 42°C durante 90". La mezcla de reacción fue colocada nuevamente a 4°C por 2". Las bacterias transformadas fueron transferidas a 3 ml de top agar (7,5gr/ml) a 50°C junto con 200 µl de un cultivo exponencial de bacterias F+ (JM 101 DH5a). Cuando fue necesario se indujo con IPTG y se agregó X-GAL. Se plaqueó sobre una placa de LB

SUBCLONADOS: Los vectores de subclonado utilizados fueron : M13 mp18 y M13 mp19, pUC18 y pUC19. Se digirieron en cada oportunidad entre 5-10ng de vector con las enzimas apropiadas. Luego de una extracción fenólica y precipitación del DNA, se pusieron a ligar cantidades equimoleculares de vector e inserto en un buffer comercial con 1 unidad de enzima T4 DNALigasa. Luego de incubar durante toda la noche a temperatura ambiente los subclonados fueron transformados en bacterias competentes

PREPARACION DE DNA SIMPLE CADENA: Se tomó una placa de lisis de M13 blanca con una punta de escarbadiante estéril y se infectaron 10µl de bacterias apropiadas en crecimiento exponencial en 2ml de medio LB. Se dejaron crecer por espacio de 5^h/2 a 6 hs con agitación a 37°C. Se trabajó con dos protocolos alternativos a partir de este punto:

MÉTODO 1 : Se transfirieron 1,5 ml de cultivo a un tubo eppendorff. Se centrifugó a 10.000 rpm durante 5'. Se tomó 1000 µl de sobrenadante y se los transfirió a un tubo limpio. (Se utilizó el "pellet" para hacer minipreparación de los plásmidos y verificar la presencia del fragmento en cuestión). Se agregaron 200 µl de 2,5 M NaCl, 20% PEG 6000. Se dejó a temperatura ambiente por 25'. Se centrifugó a 10.000 rpm durante 5'. Se descartó el sobrenadante. Se resuspendió el pellet en 100µl de buffer TE.

Se extrajo con Fenol Cloroformo (1:1) . Se precipitó por agregado de 2,5 volúmenes de Etanol y se llevó a una concentración final de 0,3 M de acetato de Na. Se centrifugó y resuspendió en 20µl de buffer TE. Se tomaron 7 para cada reacción de secuenciación o de elongación.

MÉTODO 2 : Se transfirieron 1,5 ml de cultivo a un tubo eppendorff. Se centrifugó a 10.000 rpm durante 15'. Se tomaron 1000 µl de sobrenadante y se transfirieron a un tubo limpio. (Se utilizó el pellet para hacer minipreparación de plásmidos y verificar la presencia del fragmento en cuestión). Se centrifugaron a 10.000 rpm durante 5'. Se tomaron 800 µl y se transfirieron a un tubo limpio con 10 µl de ácido acético glacial. Se precipitó durante 15' a temperatura ambiente. Se pasaron por un disco de papel de fibra de vidrio de un diámetro de 0,7mm . Se pasó luego por el mismo filtro 1ml de una solución de Perclorato de Na 4M . Luego se lavó el filtro con 2ml de Etanol 80%. Se secaron a temperatura ambiente. Se eluyó con 35 µl de TE. Se tomaron 7 para cada reacción de secuenciación o de elongación.

SECUENCIACION: Se utilizó el método de Sanger .Se utilizaron diferentes "kits" comerciales (Biolabs , Sequenasa). Se utilizó como nucleótido radioactivo dATPa³²P ó bien dATPa³⁵S, ambos provistos por NEN-DUPONT. Los geles de secuenciación y de mapeo S1 tuvieron una concentración de entre 6 y 8% de acrilamida, 7M urea . Como buffer de corrida fue utilizado 1x TBE, y todos los geles fueron coridos a 30 miliamperes.

Los análisis de secuencia fueron llevados a cabo en una computadora IBM con el programa DNASIS y en una computadora Macintosh con el programa DNA strider 1.0.

PREPARACION DE SONDAS RADIOACTIVAS DE DNA SIMPLE CADENA : Se realizó el "annealing" entre 300 ng de DNA simple cadena clonado en el bacteriófago λ13 y 20 ng de "primer" universal. Luego se elongó en presencia de buffer de secuenciación, 0,25 mM de nucleótidos : dCTP, dTTP, dGTP; 0,02mM dATP y 2µl de dATPa³²P (3000mCi/mMol) y una unidad de DNA polimerasa "Klenow fragment". La reacción fue realizada durante 15', luego de lo cual el DNA fue cortado con la enzima de restricción elegida convenientemente. Luego se corrió la reacción en un gel de poliacrilamida de porcentaje adecuado, se reveló por autorradiografía y se cortó del gel la banda correspondiente al fragmento deseado. El fragmento fue purificado de la banda de poliacrilamida.

Sondas utilizadas:

Sonda p001: Esta sonda es general para HLA Clase I sin especificidad de locus. Corresponde a un clon de cDNA del gen HLA B7. Tiene una longitud de 1400 pb. Contiene toda la región codificante del gen. (Sood, 1981).

Sonda pB3ut: Esta sonda es específica para locus B. Corresponde a 358 pb del extremo 3' no traducido de un cDNA gen HLA B8. Originalmente fue descrita como B específica. (Koller 1984).

ENSAYO DE "PRIMER EXTENSION": Para los ensayos de elongación se utilizaron como iniciadores ("primers") fragmentos de DNA simple cadena marcados radioactivamente según el protocolo arriba descrito. 2 pmoles de DNA simple cadena (2×10^6 cpm/pmol) se hibridizaron con 5µgr de RNA total, calentando durante 1' a 90°C, en presencia de 0,25mM EDTA y dejando llegar a temperatura ambiente por 20'. La mezcla fue llevada a 100mM Tris-HCl (pH8,2), 10mM MgCl₂, 140mM KCl, 10mM DTT y 250 µM de cada uno de los dNTPs. Se agregaron luego 30u de transcriptasa reversa y se incubó a 42°C por 90'. Los productos de elongación fueron comidos con marcadores de tamaño y analizados por autoradiografía.

MARCACION DE LOS OLIGONUCLEOTIDOS: Se incubaron 7 pmoles de oligonucleótido en presencia de una cantidad equimolar de ATPγ^{32P}, y de T4 polinucleótido kinasa durante 45' a 37°C. Luego de lo cual se midió porcentaje de incorporación. Sólo se utilizaron aquellos oligos con una incorporación mayor que el 50%.

AMPLIFICACION MEDIADA POR POLIMERASA (PCR):

10pmoles de templado fueron mezclados con 100ngr de "primers forward y reverse". Se agregaron 4mM de cada dNTP y 2,5µl de 20x buffer de reacción: 1M de Tris-ClH pH 9.0, 400mM Sulfato de amonio y 30mM de Cl₂mg. Se llevó a un volumen de 49 µl de agua, se agregó 1µl de enzima REPLINASA ® (NEN). Se completó con 100µl de aceite mineral, y se llevaron a cabo los ciclos de reacción deseados para la amplificación.

PLASMIDOS UTILIZADOS:

- 1) Plásmido que contiene un clon genómico de HLA-Bw36, gentilmente cedido por el Dr. Leonardo Satz.
- 2) Plásmido p001: cDNA del gen HLA-B7, que digerido con Eco RI libera un inserto de 1400pb (Sood, 1981).
- 3) Plásmido que contiene un clon genómico del gen Y2, que digerido por Eco RI libera al clon de 6,6 kb.

OLIGONUCLEOTIDOS DE AMPLIFICACION:

Se seleccionaron secuencias que cumplieran las siguientes características:

- 1) Debían poder amplificar a todos los HLA Clase I que se transcribieran en las células.

Para ello se han seleccionado secuencias muy conservadas.

2) Debían diferenciar a aquellos fragmentos amplificados provenientes del DNA de aquellos provenientes del RNA. Se seleccionaron oligonucleótidos que "primean" sobre exones, de tal manera que en el DNA amplificado incluya intrones, y en el RNA no.

3) Debían amplificar un fragmento que incluyera alguna secuencia que fuese específica de Y2 para permitir su diferenciación del resto de los HLAs amplificados con un oligonucleótido Y2 específico.

A) FORWARD:

5'GGGGCTCGACGGACTCAGAA3' (OLIGO 5'ut).

Comienza la superposición con el gen Y2 en la posición -28 respecto del ATG.

B) REVERSE

5'CAGGTCTCTGTTTCAGAGCGA3' (OLIGO 487).

Este oligonucleótido es antisentido respecto del mRNA de Y2. Comienza la superposición con el gen Y2 en la posición +806 respecto del ATG.

OLIGONUCLEÓTIDOS DE SELECCIÓN:

Se trabajó con dos oligonucleótidos de selección. Uno de ellos es general para los HLA Clase I ("Pan Clase I"), mientras que el otro es "Y2 específico".

C) Y2 específico antisentido :

5'TGCCTGGGCCTTGCAG3' (Y2A)

Esta secuencia complementa al mRNA de Y2 desde 5' hacia 3' a partir de la posición +392 hasta +408 respecto del ATG en el DNA genómico. Corresponde al exón 2 que codifica para el dominio proteico a1.

D) Oligo "Pan Clase I" a1 antisentido entre nt. 25 y 40.

5'CCGGGACATGGCGGTGTA3' (oligo481)

Esta secuencia complementa al mRNA de Y2 desde 5' hacia 3' a partir de la posición +678 respecto del ATG en el DNA genómico.

**R
E
S
U
L
T
A
D
O
S**



ASLAMIENTO DE UN CLON GENOMICO HLA CLASE I:

El gen Y2 fue clonado en el fago lambda a partir de una genoteca genómica parcial hecha sobre el DNA de las células YHHH utilizando los fragmentos entre 6.4 y 9.7 kb. (Ferraro 1990).

Se seleccionaron dos clones de esta genoteca genómica: Y1 e Y2. Ambos fueron reconocidos por dos sondas específicas de los genes HLA clase I, una de las cuales se describió como específica para locus B:

Sonda p001: Esta sonda es general para HLA clase I sin especificidad de locus. (Sood, 1981).

Sonda pB3ut: Esta sonda fue descrita como B específica (Koller 1984).

Estos dos clones fueron subclonados a pBR322. Los plásmidos que contienen a Y1 e Y2 fueron llamados pY1 y pY2 respectivamente. Este material fue el punto de partida para el trabajo que se describe en esta tesis.

MAPEO DE RESTRICCIÓN

Los clones pY2 y PY1 fueron sometidos a un análisis más detallado. Para ello se realizó un mapeo de restricción acompañado de Southern blot.

Se trabajó con 6 enzimas de restricción en cortes simples y combinados. Las enzimas utilizadas fueron seleccionadas porque revelan algunos sitios conservados a lo largo de los genes HLA clase I clonados y caracterizados (Jordan, 1985; Malissen, 1982; Wais, 1985):

Eco RI - Bgl II - Xba I - Pst I - Kpn I - y Pvu I.

Estos geles se transfirieron a nitrocelulosa, y fueron hibridizados con dos sondas que pudieran reconocer los extremos 5' y 3' de los genes HLA clase I, para verificar que los dos clones estuvieran completos. La sonda utilizada capaz de reconocer el extremo 3' fue la pB3ut, descrita líneas arriba.

Para reconocer el extremo 5' se utilizó un fragmento de 120 pares de bases del extremo 5' (exón 2) de la sonda p001, llamada p001-5'.

Los resultados obtenidos por este análisis (Figura 6) revelaron que el clon Y1 carecía de extremo 5' ya que no era reconocido por la sonda p001-5', razón por la cual no fue profundizada su caracterización.

Los resultados de este mapeo se ven en la figura 6.

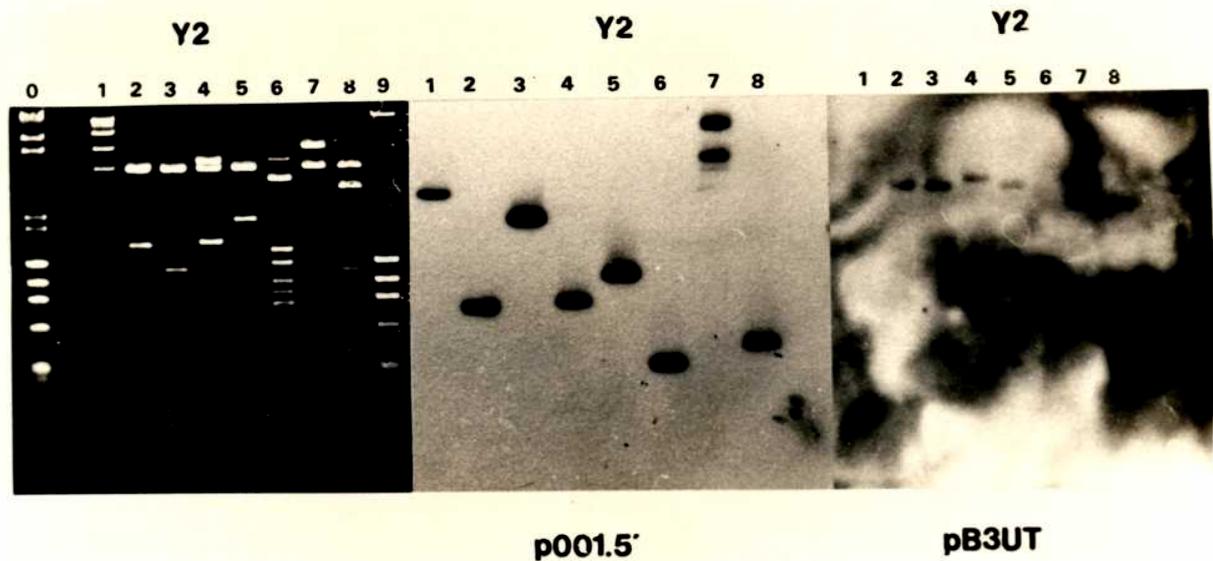


Figura 6 Mapeo de restricción de los clones Y1 e Y2 con las sondas p001-5' y pB3'ut.

CARACTERIZACION ESTRUCTURAL DEL GEN Y2.

Teniendo en cuenta que la estructura general de los genes HLA clase I está muy conservada, con la información generada en el análisis con enzimas de restricción, se construyó el siguiente mapa del gen Y2, que más tarde fue confirmado por secuencia :

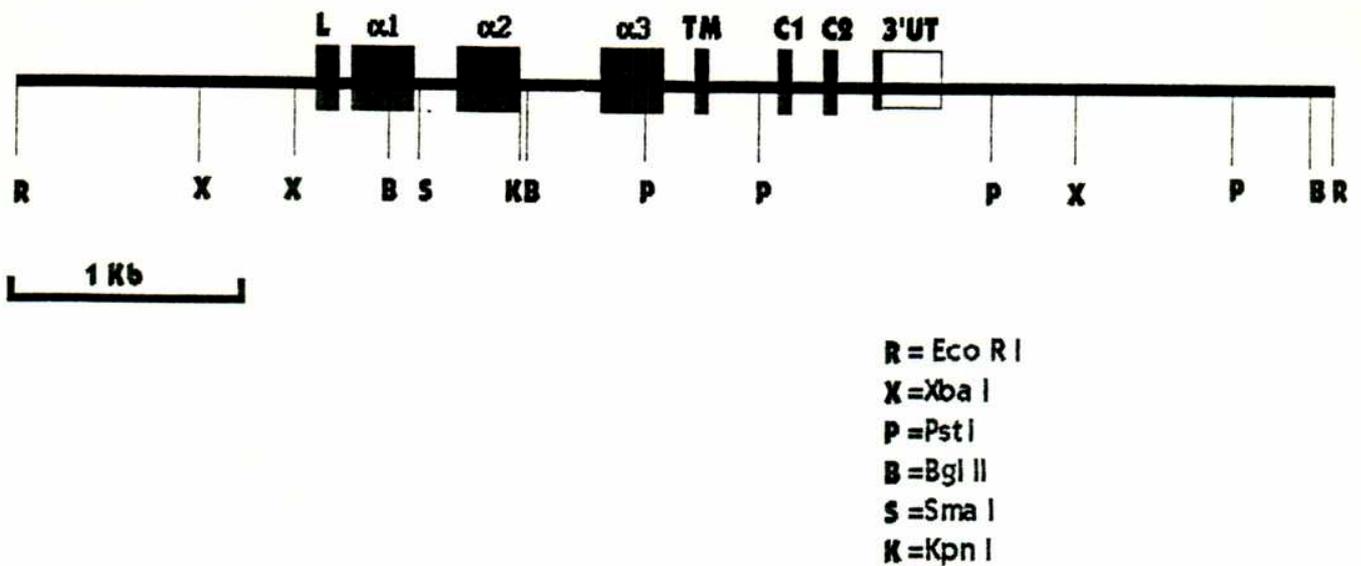


Figura 7 L: (exón 1) codifica para péptido líder; α1, α2, α3: (exones 2, 3 y 4) codifican para dominios extracelulares; TM: (exón 5) codifica para dominio transmembrana; c1, c2: (exones 6 y 7) codifican para dominio citoplasmático; 3'UT: (exón 8) codifica para región 3' no traducida.

DETERMINACION DE LA SECUENCIA NUCLEOTIDICA DEL GEN Y2

ESTRATEGIA DE SECUENCIACION:

A partir de los resultados obtenidos con el mapeo de restricción, se subclonaron fragmentos del gen Y2 en el bacteriófago M13 mp18 y 19 para su secuenciación.

Para encontrar el extremo 5', se verificó que los sitios conservados en los HLA clase I estuvieran presentes también en Y2 y se comenzó a secuenciar desde el sitio Xba I ubicado en la posición -480 respecto del ATG (Figura 7).

En ese fragmento se hallaron las señales características de los promotores HLA clase I, con lo cual, se había ubicado el extremo 5', y el límite de secuenciación en esa dirección.

Para ubicar el extremo 3' del clon, se hizo una digestión con PST I y los fragmentos resultantes se hibridaron con la sonda pB3'ut. De este modo se identificó al fragmento portador del extremo terminal.

Así quedó determinado el límite de secuenciación hacia 3'.

La metodología de trabajo consistió en secuenciar en direcciones opuestas hacia el interior de cada subclón buscando la superposición. En algunos casos se secuenció completamente en ambas direcciones. Cuando no fue posible superponer la secuencia desde ambas direcciones, se utilizaron sitios internos para subclonar fragmentos menores y así completar los "blancos" de secuencia.

Todos los sitios de reconocimiento para enzimas de restricción que se utilizaron, se indican en la tabla 1, así como las direcciones de secuenciación:

Dado que no fue posible determinar con certeza el sitio de iniciación de la transcripción, se tomó arbitrariamente a la posición +1 como a la "A" del primer ATG encontrado en el péptido líder.

SITIO	POSICION	DIRECCION
Xba I	-460	5' → 3'
Xba I	-88	ambas
Pst I	+87	ambas
Bgl II	+389	ambas
Xho I	+533	ambas
Pvu II	+898	ambas
Bgl II	+1020	ambas
Stu I	+1274	ambas
Sau 3A I	+1656	ambas
Pst I	+1723	ambas
Sac I	+2054	ambas
Pst I	+2389	ambas
Sac I	+2597	ambas
Pvu II	+2778	ambas
Pvu II	+2898	ambas
Pvu II	+3414	ambas

Tabla 1: sitios de reconocimiento de enzimas de restricción utilizados en la secuenciación del gen Y2.

Esta estrategia de secuenciación se esquematiza en la figura 8

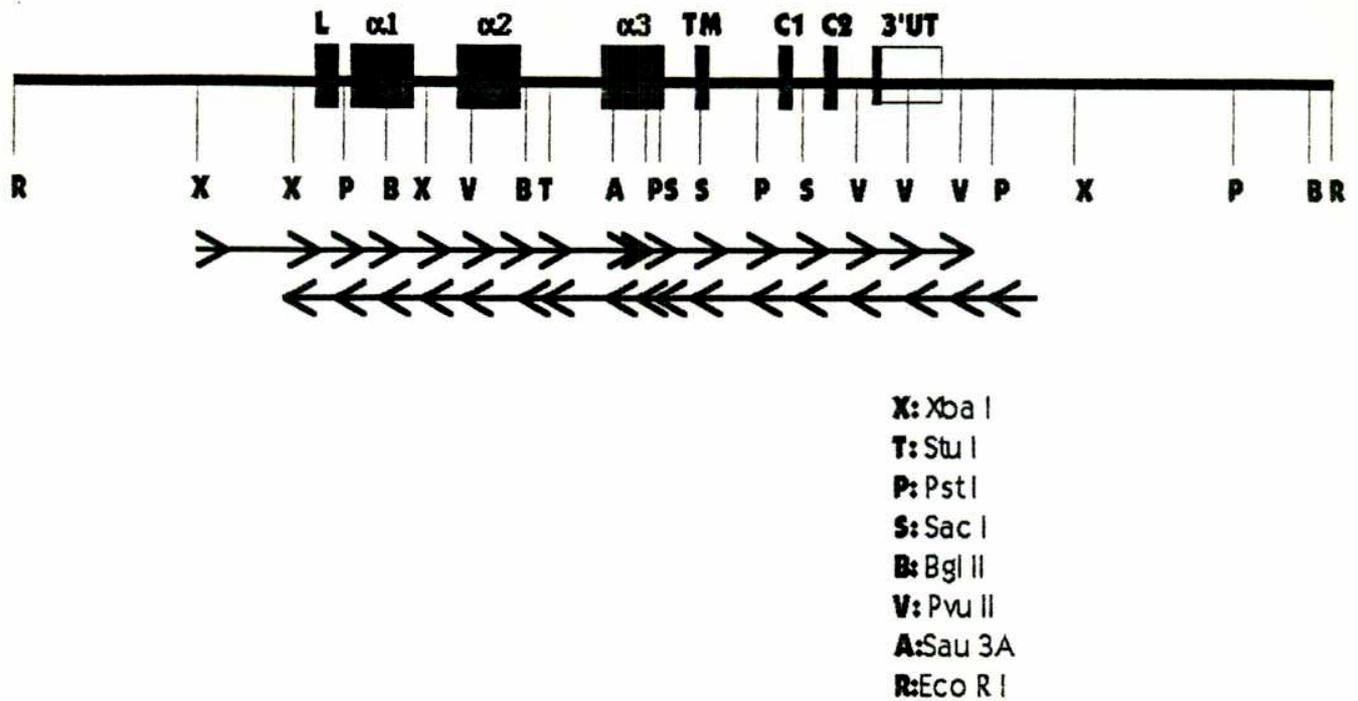


Figura 8: Estrategia de secuenciación del gen Y2.

SECUENCIA NUCLEOTIDICA DEL GEN Y2:

A continuación se muestra la secuencia completa del gen Y2 y sus adyacencias (tabla 2). Aquí se numera secuencialmente a las bases partiendo de la primera base desde el extremo 5'. Los exones están indicados por letras mayúsculas, mientras que los intrones se escriben en minúscula. **E** = exón.

1 t c t a g a a g a g t c c a g g t g g a c a g g g a g t c c a
 32 g t t c a g g g a c g g a g a t t c c t g g a t g a a a a g t
 63 g a a g g g a g a g g g a c a g g g c c c a t g c c g a g g g
 94 t t t c t t c c t g g t t t c t c a g a c a g c t c c t g g g
 125 c c a a g a c t c a g g g a a a c a c t g a g a c a g a g c g
 156 c t t g g c a c a g g a g g a g c g g g g t c a g g g c g a a
 187 g t c c c a g g g c c c c a g g c g t g g c t c t c a g g g t
 218 c t c a g g c c c c g a a g g c g g t g t a t g g a t t g g g
 249 g a g g c c c c g c c t t g g g g a t t c g c c a c c t c c g
 280 c a g t t t c t c t t c t t c t c a c a a c c t g c g a c g g
 311 g t c c t t t t t c c t g g a t a c t c a g g a a g c g g g c
 342 a c a g t t c t c a t t c c c a c t a g g t g t c g g g t t t
 373 c t a g a g a a g c c a a t c g g t g c c g c c g c g g t c c
 404 c g g t t c t a a a g t c c c c a c g c a c c c a c c g g g a
 E1 435 c t c a g a t t c t c c c c a g a c g c e g a g g A T G G T G
 E1 466 C T C A T G G C G C C C C G A A C C C T C C T C C T G C T G C
 E1 497 T C T C A G G G G C C C T G G C C C T G A C C C A G A C C T G
 528 G G C G C g t g a g t g c a g g g t c t g c a g g g a a a t g
 559 g t c g g g a g g a g c g a g g g g c c c g c c c g g c g g g
 590 g c g c a g g a c c c a g g g a g c c g c g c a g g g a g g a
 621 g g g t c g g g c g g g t c t c a g c t c c t c c t c g c t c
 E2 652 c c a g G C T C C C A C T C C A T G A G G T A T T T C T A C A
 E2 683 C C A C C A T G T C C C G G C C C G G C C G C G G G G A G C C
 E2 714 C C G C T T C A T C T C C G T C G G C T A C G T G G A C G A T
 E2 745 A C G C A G T T C G T G C G G T T C G A C A G C G A C G C C G
 E2 776 C G A G C C A G A G G A T G G A G C C G C G G G C G C C G T G
 E2 807 G A T G G A G C G G G A G G G C C G G A G T A T T G G G A C
 E2 838 C G G A A C A C A C A G A T C T G C A A G G C C C A G G C A C
 E2 869 A G A C T G A A C G A G A G A A C C T G C G G A T C G C G C T
 E2 900 C C T C T A C T A C A A C C A G A G C G A G G G C G g t g a g
 931 t g a c c c c g g c c c g g g a c g c a g g t c a c g a c c c
 962 c t c c c c a t c c c c c a c g g a g g g c c g g g t c g c c
 993 t c g a g t c t 1 0 0 0 → → → → → → → → → → → →

1001 c t g g g t c c g a g a t c c t c c c c g a a a c c g c g g g
 1032 a c c c c g a g a c c c t t g a c c t g g g a g a g g c c c a
 1063 g g c g c c t t t a c c c g t t t c a t t t t c a g t t t a g
 1094 g c c a a a a t c c c c g c g g g t t g g t c g g g g c a g g
 1125 g c g g g g c t c g g g g g a c c g g g c t g a c c g c g g g
 1156 g g c g g g c c a g 6 T T C T C A C A C C A T 6 C A 6 6 T 6 A
 1187 T 6 T A T 6 6 C T 6 C 6 A C 6 T 6 6 6 6 C C C 6 A C 6 6 6 C 6
 1218 C T T C C T C C 6 C 6 6 6 T A T 6 A A C A 6 C A C 6 C C T A C
 1249 G A C 6 6 C A A 6 6 A T T A C A T C 6 C T C T 6 A A C 6 A 6 6
 1280 A C C T 6 C 6 C T C C T 6 6 A C C 6 C 6 6 C 6 6 A C A T 6 6 C
 1311 A 6 C T C A 6 A T C A C C A A 6 C 6 C A A 6 T 6 6 6 A 6 6 C 6
 1342 6 C C C 6 T C 6 6 6 C 6 6 A 6 C A 6 C T 6 A 6 A 6 C C T A C C
 1373 T 6 6 A 6 6 6 C 6 A 6 T T C 6 T 6 6 A 6 T 6 6 C T C C 6 C A 6
 1404 A T A C C T 6 6 A 6 A A C 6 6 6 A A 6 6 A 6 A C 6 C T 6 C A 6
 1435 C 6 C 6 C 6 6 g t a c c a g g g g c c a c a g g g c g c c t c
 1466 c c g g a t c g c c t g t a g a t c t c c g g g g c t g g c c
 1497 t c c c a c a a g a a a g g g a g a c a a a t g g g a c c a a
 1528 c a c t a t a a t a t c g c c c t c c c t c t g g t c c t g a
 1559 g g g a g a a g a a t c c t c c t g g g t t t c c a g a g a g
 1590 t g a c t c t g a g g g t c c g c c g t g c t c t t t g a c a
 1621 c a a t t a a g g g a t g a a a t c t c t g a g g a a a t g a
 1652 a g g g a a g a c a a t c c c t g g a a t a c t g a t g a g t
 1683 g g t t c c c t t t g a c a c t g g c a g c a g c c t t g g g
 1714 c c c c g t g a c t t t t c c t c t c a g g c c t t g t t c t
 1745 c t g c t t c a c a c t c a a t g t g c c t g g g g g t c t g
 1776 a g t c c a g c t c t t c t g a g t c c c t c a g c c t c c a
 1807 c t c a g g t c a g g a c c a g a a g t c g c t g t t c c c t
 1838 c c t c a g g g a c t a g a a t t t t c c a c g g a a t a g g
 1869 a g a t t a t c c c a g g t g c c t g t g t c c a g g c t g t
 1900 t g t c t g g g t t c t g t g c t c c c t t c c c c a c c c c
 1931 a g g c g t c c t g t c c a t t c t c a a g a t g g c c a c a
 1962 t g c g t g c t g g t g g a g t g t c c c a t g a c a g a t g
 1993 c a a a a t g c 2 0 0 0

E4 2001 c t g a a t t t t c t g a c t c t t c c t g t c a g A C C C C
 E4 2032 C C C A A G A C A C A T A T G A C C C A C C A C C C C A T C T
 E4 2063 C T G A C C A T G A G G C C A C C C T G A G G T G C T G G G C
 E4 2094 C C T G G G C T T C T A C C C T G C G G A G A T C A C A C T G
 E4 2125 A C C T G G C A G C G G G A T G G G G A G G A C C A G A C C C
 E4 2156 A C A C A C G G A G C T C G T G G A G A C C A G G C C T G C A
 E4 2187 G G G G A T G G A A C C T T C C A G A A G T G G G C G G C T G
 E4 2218 T G G T G G T G C C T T C T G G A G A G G A G C A G A G A T A
 E4 2249 C A C C T G C C A T G T G C A G C A T G A G G G T C T G C C A
 E4 2280 G A G C C C C T C A C C C T G A G A T G G G g t a a g g a g g
 2311 g a g a t g g g g g t g t c a t g t c c c t t a g g g a a a g
 2342 c c g g a g c c t c t c t g g a g a g c t t t a g c a g g g t
 2373 c a g g g t c c c t c a c c t t c c c c t c t t t t c c c a g
 E5 2404 A G C C A T C T T C C C A G C C C A C C A T C C C C A T C G T
 E5 2435 G G G C A T C G T T G C T G G C C T G G T T C T A C T T G T A
 E5 2466 G C T G T G G T C A C T G G A G C T G T G G T C G C T G C T G
 2497 T A A T G T G G A G G A A G A A G A G C T C A G g t a a g g a
 2528 a g g g g t g a g g a g t g t g g t c t g a g a t t t c t t g
 2559 t c t c a c t g a g a g t t c c a a g c c c c a g g t a g a a
 2590 g t g c c c t g c c t g g t t a c t g g g a a g c a c c a t c
 2621 c a c a c t c a t g g g c c t a c c c a g c c t g g g c c c t
 2652 g t g t g c c a g c a c t t a c t c t t t t g t a a a g c a c
 2683 c t g t t a c a a t g a g g g a c a g a t t t a t c a c c t t
 2714 g a t g a c t g t g g t g a t g g g a c c t g a t c c c a g c
 2745 a g t c a c a a g t c a c a g g g g a a g g t c c c c g a g g
 2776 a c a g a c c t c a g a a g g g c g g t t g g t c c a g g a c
 2807 c c a c a t c t g c t t t c c t c a t g t t t c c t g a t c c
 2838 c g c c c t g g g t c t g c a g t t g c a c a t t t c t g g a
 2869 a a c t t c t c t g g g g t c c a a g a c t t g g a g g t t c
 2900 c t c t a g g a c c t t a t g g c c c t g g c t t c t t t c t
 2931 g g c a t c t c a c a g g a c a t t t t c t t c c c a c a g A
 E5 2962 T A G A A A A G G A G G G A G C T A C T C T C A G G C T G C A
 E5 2993 A g t a a g t a 3 0 0 0 → → → → → → → → → → → → → → →

3001 t g a a g g a g g c t g a t c c c t g a a a t c c t t t g g a
 3032 t a t t g t g t t t g g g a g c c c a t g g g g g a g c t c a
 3063 c c c a c c c c a c a a t t c t t c c t c t a g c c a c a t c
 3094 t a c t g t g g g a t c t g a c c a g g t c c t g t t t t a
 E7 3125 t t c t a c t c c a g G C G G C A A C A G T G C C C A G G G C
 E7 3156 T C T G A T G T G T C T C T C A C G G C G T G A A A G g t g a
 3187 g a c c t t g g g g g g c c t g a t g t g t g g g g g g t g t
 3218 t g g g g g g g a a c a g t g g a c a c a g c t g t g c t a t
 3249 g g g g t t c t t t g a a t t t g a t g t t t t g a g c a t g
 3280 c g a t g g g c t g c c a a a g t g t c a t c c a t t a c t g
 3311 g g a c a g a t a t g a a t t t g t t c a t g a a t a t t t t
 E8 3342 t t c t a t a g T G T G A G A C A G C T G C C T T G T G T G G
 E8 3373 G A C T G A G A G G C A A G A T T T G T T C A C A C C T T C C
 E8 3404 C T T T G T G A C T T G A A G A A C C C T G A C T T C T G C A
 E8 3435 A A G G C A C C T G A A T G T G T C T G T G T T C C T G T A G
 E8 3466 G C A T A A T G T G T G G A G G A G G G G A G A C C A A C C C
 E8 3497 A C C C T C A T G T C C A C C A T G A C C C T C T T C C C C A
 E8 3528 C G C T G A T C T G T G T T C C C T C C C C A A T C A T C T T
 E8 3559 T C C T G T T C C A G A G A G G C G G G G C T G A G A T G T C
 E8 3590 T C C A T C T T T T T C T C A A C T T T A T G T G C A C T G A
 E8 3621 G C T G T A A C T T C T T A C T T C C C T C T T A A A A T T A
 E8 3652 G A A T C T G A G T A A A C A T T T A C T T T T T C A A A T T
 E8 3683 C T T G C C A T G A G A G G T T G A T G A C T T A A T T A A A
 E8 3714 G G A G A A G A T T C C T A A A A T T T G A G A G A C A A A A
 E8 3745 T A A A t g g a a c a c a t g a g a a c c t t c c a g a g t c
 3776 c a t g t g t t t c t t g t g c t g a t t t g t t g c a g g g
 3807 g a g g a g a a t a g a t g g g c t g t g c c t a g t g g g t
 3838 g c t c a g g c c a g t a t g g a c t t t a t g t g g t c a c
 3869 t g c t c a g c t g g g t c a t c t t t g c c t c c t t c a t
 3900 t c t c c t t g g c c c t t c a g t a g a a c c t t g t c c c
 3931 a c c a c c a c c t g t g a t c a c a g g g a g t t g g a t g
 3962 t c a c c t a g g g t g g t c c c t g c a t a c a a a t c t c
 3993 a t t g t g g t a t c a a g a g 4 0 0 8 → → → → → → →

NOTA: de aquí en adelante, se hará referencia a la numeración del gen Y2, tomando como posición +1 al primer ATG del exón 1, dado que no se tiene certeza acerca del sitio de iniciación de la transcripción.

ANALISIS DE LA SECUENCIASECUENCIAS REGULATORIAS ENCONTRADAS HACIA 5' DEL GEN Y2

Hacia 5' aparecen los enhancers A, B (Israel 1989), el tracto de polipurinas, y la secuencia Interferón sensible (IRS) (Friedmann 1985). Esta secuencia se describió inicialmente en los genes HLA -A3, HLA-12.4, y en HLA -DR. También se la ha encontrado en el gen de la metalotioneína II (Friedmann 1985), en genes murinos : H2k^b (Israel 1986), H2L^d (Sugita 1987), H2D^d (Korber 1988), gen 6-16 (Porter 1988), y el gen de la 2'-5' oligo A sintetasa, (Cohen, 1988). Se comparan las secuencias regulatorias de Y2 con aquellas que aparecen en otros genes HLA clase I y en pseudogenes secuenciados y descriptos (Chertkoff 1991). Sólo se conocen las secuencias de 3 genes del locus H : gen H, gen Y2 y 12.4. Son esas dos secuencias las que se utilizan como comparación.

SECUENCIA DE POLIPURINAS EN -300

HLA-H/genY2	-303	tggcacaggaggagcggggtcaggg
HLA-H/gen	-303	-----
HLA-E		/////inserción de elemento alu/////
HLA-F	-314	a--aggg----g-ga---gg----
HLA-G	-289	acaag●●●--t-----
HLA-B27	-301	---tgt-----a--a---a-----a
HLA-B3502	-299	---tgt-----a--a---a-----a
HLA-A2	-309	aca●●●●-a--c--a-----
HLA-Cw2	-301	---tgt-----a--a---a-----a

(-=IDENTIDAD DE NT)(●=nt.inexistente)

Tabla 3: Comparación de secuencias de polipurinas en -300.

ENHANCER A

HLA-H/Y2	-203	TGGGGATTTCGCCA
HLA-H/AR	-203	-----
HLA-H/12.4	-203	-----
HLA-E	-203	--ATTGC-G-GA-
HLA-F	-210	--A-A---C---
HLA-G	-191	-----●●●●●
HLA-B27	-199	-----C---
HLA-B3502	-198	-----C---
HLA-A2	-209	-----C---
HLA-Cw2	-197	--A-----T---

ENHANCER B

HLA-H/Y2	-104	CACTAGGTGTC
HLA-H/AR	-104	-----
HLA-H/12.4	-104	-----
HLA-E	-105	--A-G-----
HLA-F	-113	--T-G--C---
HLA-G	-103	--T-----A-
HLA-B27	-103	--T-G-----
HLA-B3502	-103	--T-G-----
HLA-A2	-104	--T-G-----
HLA-Cw2	-103	--T-G-----

Tabla 4: Comparación de secuencias de los enhancers A y B.

SECUENCIA IFN SENSIBLE

HLA-H/Y2	-179	AGTTTCTCTTCTTC
HLA-H/AR	-179	-----
HLA-H/12.4	-179	-----
		G (inserción) ▼
HLA-E	-183	-----C---C---
HLA-F	-188	-----TC---
HLA-G	-178	(.....)--C---
HLA-B27	-178	-----A-----
HLA-B3502	-177	-----A-----
HLA-B7	-177	-----A-AA-AA-
HLA-A2	-189	-----T--TC--
HLA-A3	-189	-----T-----
HLA-Cw2	-176	-----A-----

Tabla 5: Comparación de secuencias IFN sensibles.

Respecto de la secuencia de polipurinas, se observa una coincidencia entre los alelos clásicos HLA-B27, HLA-B3502 y HLA-Cw2. Entre los HLAs no clásicos, no hay uniformidad que permita sacar conclusiones, en particular comparando con la secuencia de HLA-A2, que es un gen activo y que presenta 11 diferencias en 25 nt con la secuencia más consensuada.

En cuanto al enhancer A, se observa entre la secuencia de Y2, H y la de los genes activos, una diferencia en una posición (nº 10) que también presenta una sustitución en el gen Cw2, a pesar de lo

cual, el gen se transcribe. Este no es el caso del enhancer B donde la secuencia de los HLA-H se aparta en dos posiciones de la consensuada por los genes activos (3 y 5).

Cuando se comparan las secuencias IFN sensibles, con la secuencia disponibles del locus HLA-H, se observa que algunas posiciones están muy conservadas mientras que otras no lo están. Se puede observar que el gen Y2 no presenta en ninguna posición ninguna base que no aparezca en algún gen de los funcionales descriptos. Sin embargo, la combinación de bases en las posiciones en que las presenta Y2, es exclusiva de los genes pertenecientes al locus HLA-H. Recientemente se ha descrito que una sustitución de dos nucleótidos en la secuencia IRS del gen HLA-A3, por aquellas presentes en HLA- B7, producen un incremento en la respuesta al IFN (Hakem 1990).

El análisis funcional de estas secuencias regulatorias, incluidas en el fragmento Xba I de 375 pb entre las posiciones -480 a -105 (Figura 7) se discute más adelante.

Se han encontrado las señales características de los promotores eucariotas, la TATA box en la posición -52, la CAAT box en -78. Estas señales, en Y2, no presentan ninguna variación respecto de las secuencias consenso de los genes activos.

CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DE LA SECUENCIA QUE CODIFICA A Y2:

Exones :La secuencia del gen Y2 responde a la estructura de exones e intrones característica de los genes HLA clase I (Zemmour 1991) excepto por algunas particularidades específicas que se discuten en detalle, y que lo diferencian de los clásicos HLA clase I:

Péptido señal (EXON 1): Determinado por la secuencia de 73 pares de bases, es 100% homólogo al consenso de los HLA clase I, aunque acumula menos diferencias con el HLA-A (8.3%).

Dominio α 1 (EXON 2) : Codificado por 270 pares de bases, con las correctas señales de splicing en 3' y 5', y separado del péptido señal por un intrón que conserva la distancia entre estos exones en todos los clones publicados: 123 nt.

Dominio α 2 (EXON 3): Codificado por 276 pares de bases, con las correctas señales de splicing en 3' y 5', y separado del exón 2 por un intrón que conserva la distancia entre estos exones en todos los clones publicados: 240 nt.

Dominio α 3 (EXON 4) : Codificado por 275 pares de bases . Esto es, una base de menos que los clásicos HLA clase I. Esta característica, que se analiza y discute por separado, es de crucial importancia ya que distingue a un nuevo locus HLA clase I : HLA-H . Esta delección de un nucleótido, cambia la fase de traducción de esta secuencia y la lleva a otro marco de lectura que encuentra una terminación temprana antes de completarse la traducción de este exón. Posee las correctas señales de splicing en 3' y 5', y está separado del exón 3 por un intrón que conserva la distancia entre estos exones en todas las secuencias de los clones publicados hasta la fecha: 585 nt.

Dominio transmembrana (EXON 5): Comparte la secuencia consenso de 117 pares de bases descripta para este exón. Separado del exón 4 por 102 nt, y del exón 6 por 440 nt como el consenso.

Dominio citoplasmático (EXONES 6y7): Codificados por 33 y 47 pares de bases respectivamente, responden a la secuencia consenso para estos exones de todos los genes HLA clase I. Separados entre sí por un intrón de 142 nt como en todas las secuencias de los HLA clase I clásicas descriptas. El C2 está separado del exón 8 por un intrón de 167 nt.

Exón VIII :Este exón, que no se traduce a aminoácidos en la proteína madura (3'ut), está presente en el gen Y2 con una secuencia conservada, igual a la de los genes HLA clase I, con 399 pares de bases.

ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS DE SPLICING:

Una de las características fundamentales que deben conservar los genes eucarióticos, para que sean funcionales son las secuencias consenso para un correcto splicing. Por ello se han analizado en detalle estas secuencias en el gen Y2. Para su análisis, se comparan con la frecuencia con que aparece cada una de las bases presentes en Y2 en cada posición, con frecuencias publicadas (Breathnach 1987).

En cada posición **donora**, se toman en cuenta las últimas dos bases del exón comprometido (5'→3'), y las primeras dos bases (5'→3') del intrón comprometido.

Para las posiciones **ceptoras**, se toman en cuenta las 2 últimas bases del intrón comprometido (5'→3') y las dos primeras bases del exón que se involucra (5'→3').

Secuencias Donoras:

EXON	1º BASE	2º BASE	INTRON	1º BASE	2º BASE
EXON I	G (13,5%)	C (4,5%)	INTRON I	G (100%)	T (100%)
EXON II	C (14%)	G (75,5%)	INTRON II	G (100%)	T (100%)
EXON III	G (13,5%)	G (75,5%)	INTRON III	G (100%)	T (100%)
EXON IV	G (13,5%)	G (75,5%)	INTRON IV	G (100%)	T (100%)
EXON V	A (59%)	G (75,5%)	INTRON V	G (100%)	T (100%)
EXON VI	A (59%)	A (10%)	INTRON VI	G (100%)	T (100%)
EXON VII	A (59%)	G (75,5%)	INTRON VII	G (100%)	T (100%)

Secuencias Aceptoras:

INTRON	1º BASE	2º BASE	EXON	1º BASE	2º BASE
INTRON I	A (100%)	G (100%)	EXON II	G (47%)	C (18%)
INTRON II	A (100%)	G (100%)	EXON III	G (47%)	T (37%)
INTRON III	A (100%)	G (100%)	EXON IV	A (22%)	C (18%)
INTRON IV	A (100%)	G (100%)	EXON V	A (22%)	G (32%)
INTRON V	A (100%)	G (100%)	EXON VI	A (22%)	T (37%)
INTRON VI	A (100%)	G (100%)	EXON VII	G (47%)	C (18%)
INTRON VII	A (100%)	G (100%)	EXON VIII	T (11%)	G (32%)

Tabla 6: Análisis de la secuencias de splicing: Secuencias Donoras y Secuencia Aceptoras

Los números entre paréntesis, representan el porcentaje de veces en que cada base aparece en un pool de genes secuenciados (Breathnach 1987). El gen Y2 posee las secuencias consenso requeridas para un splicing correcto.

COMPARACION CON OTROS GENES HLA

Se comparó la secuencia de Y2 con otros genes de clase I no clásicos, alelos del locus H, descritos muy recientemente, durante el transcurso de la realización del presente trabajo de tesis.

Se tomó como prototipo al gen descrito por Chomey y colaboradores (Chomey 1989), llamado H, como un elemento de comparación importante, ya que la mayoría de las características que diferencian al gen Y2 de los clásicos HLA clase I son compartidos con el gen H. Por otro lado, junto con el HLA-12.4, son los únicos genes descritos de los que se han publicado secuencias de exones e intrones.

Chomey y colaboradores dieron al clon que describieron en su publicación, el nombre de gen H.

Más recientemente, Zemmour y colaboradores (1990) documentan la secuencia de 5 clones genómicos que comparten las mismas diferencias con los clásicos HLA clase I que el gen Y2. Consideran que forman parte de un nuevo locus, al que denominan HLA-AR. Aunque en esta publicación se desconoce al gen H, la similitud de uno de estos clones (JY8) con el H sugiere que se trata del mismo gen porque no se diferencian en ninguna posición, ya que sus exones son 100% homólogos.

El Comité de Nomenclatura cambió de nombre al nuevo locus HLA-AR, y lo denominó HLA-H (Bodmer 1991). El Comité de Nomenclatura no menciona al gen H descrito por Chomey y colaboradores.

La secuencia genómica del gen H se publicó completa, con exones e intrones, mientras que las secuencias de los 5 clones de la publicación de Zemmour (1990), fue hecha con primers específicos que permitieron secuenciar sólo los exones. Por esta razón se han establecido varias comparaciones entre el gen Y2 y el gen H en particular, mientras que sólo algunas comparaciones incluyen a todos los alelos del locus.

A lo largo de las 4008 pares de bases secuenciadas del gen Y2, se han encontrado 20 diferencias con el gen H. Cada una de estas diferencias, fue analizada minuciosamente en los autoradiogramas e incluso se han subclonado en más de una oportunidad y se han repetido las reacciones de secuenciación para verificar, de tal modo de determinar con certeza que efectivamente se trataba de diferencias y no de un error de interpretación en un gel.

Estas 20 diferencias, se presentan de la siguiente manera :

- 14 corresponden a intrones.
- 5 corresponden a exones.
- 1 corresponde a l extremo 3' no transcrito.

La descripción de cada una de estas diferencias, encontradas entre las posiciones -460 y +3548 (respecto del primer ATG en el péptido líder) se resumen en la tabla 7:

Nº	posic.en Y2/secuencia	Ubicación	OBSERVACIONES
1	-126tcca-gttcY2 tccaGgttcH	Intrón	
2	126cggg-gcgcY2 cgggGgcgcH	intrón	
3	438ctccTctacY2 ctccGctacH	exón $\alpha 1$	Cambio de aac. L(Y2)xR(H)
4	069accc-gtttY2 acccGgtttH	intrón	
5	788cgacGgcaaY2 cgacAgcaaH	exón $\alpha 2$	G(Y2)xR(H)
6	883cgtcGggcgY2 cgtcAggcgH	exón $\alpha 2$	R(Y2)x Q(H)
7	1005ggatGgcctY2 ggatGgcctH	intrón	
8- 9	1246gcCttgggccccgtY2 gc-ttgggccc-gtH	intrón	
10	1407ggagAttatY2 ggagTttatH	intrón	
11 12 13	1420ggtGcCt-gtgtY2 ggtTc-tGtgtH	intrón	
14	1702gctcGtggaY2 gctcAtggaH	exón $\alpha 3$	Fase HLA H-AB . S(Y2) S(H) Fase HLA Classic U(Y2)xM(H)
15	1872taggGaaagY2 taggAaaagH	intrón	
16	1927ccccTctttY2 ccccCctttH	intrón	
17	2764cagtGgacaY2 cagt-gacaH	intrón	
18	2858tgaaTttgtY2 tgaaAttgtH	intrón	
19	2961gact-tctY2 gactTtctH	3'ut	Total de deleciones Y2 = 5
20	3427ttgcCtctY2 ttgc-tctH	3' de AATAAA	Total de deleciones H = 5

Tabla 7: Diferencias de secuencia entre el gen Y2 y el gen H.

Estas diferencias se esquematizan en el gráfico de la figura 9, que incluye también las diferencias aminoacídicas entre los dos genes.

Diferencias nucleotídicas y aminoacídicas entre las secuencias de los genes H e Y2 tomando como base a Y2 :

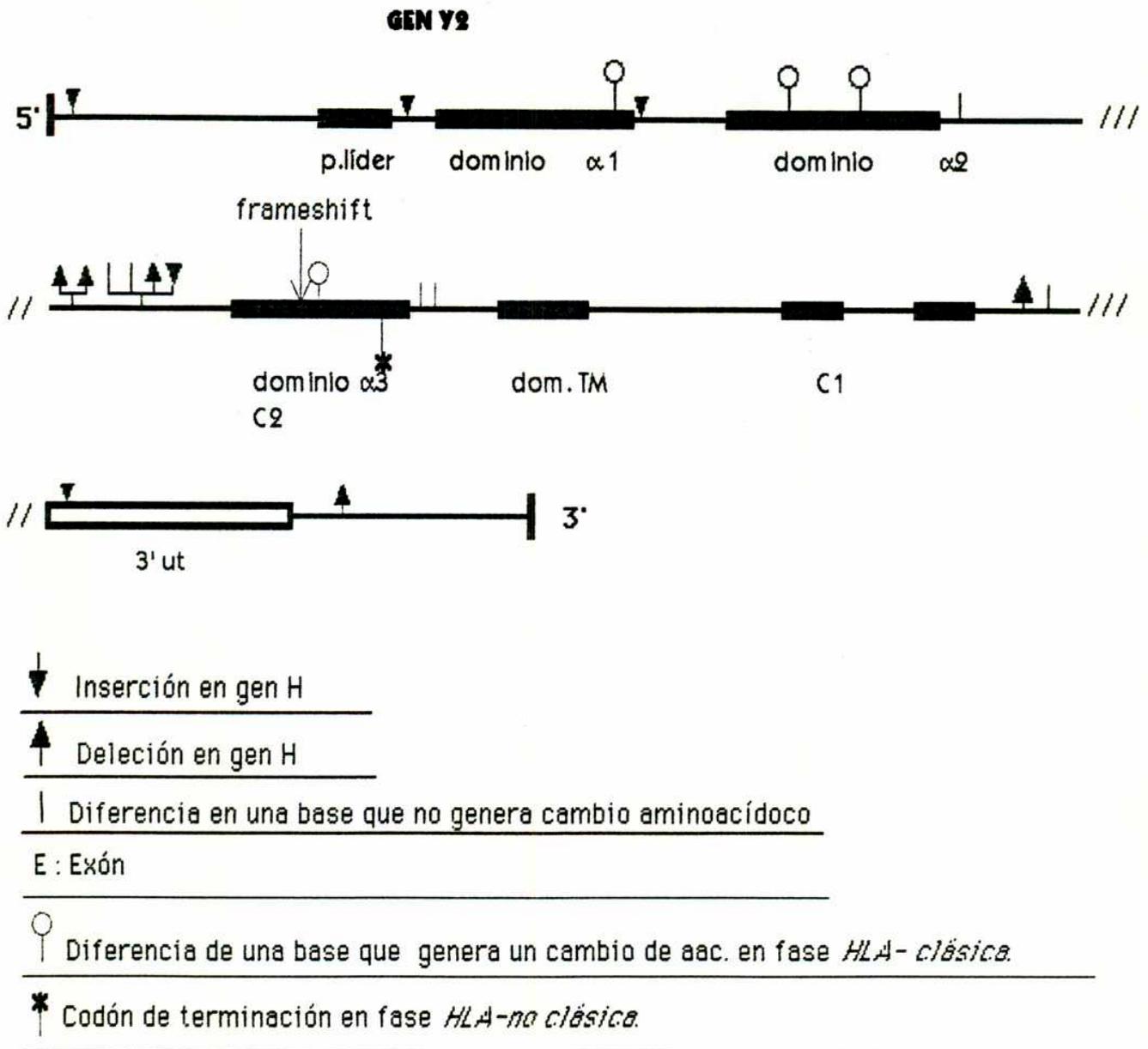


Figura 9 : Diferencias nucleotídicas y aminoacídicas entre los genes H e Y2 tomando como base a Y2.

Es interesante destacar el hecho de que no existen diferencias aminoacídicas entre los dos genes cuando se comparan las fases ubicadas desde la delección hacia 3'.

Cuando se amplía la comparación y se incluye al resto de los miembros del locus, se enriquece mucho más el análisis y permite obtener conclusiones partiendo de un mayor número de datos. Como punto de partida para estas comparaciones, se ha diagramado una tabla donde se analizan las diferencias y similitudes entre todos los exones de los alelos descritos para este locus, respecto del gen Y2.

Exón 1 Péptido Líder

	1	20	40	60	73
Y2	ATGGTGCTCATGGCGCCCCGACCCTCCTCCTGCTGCTCTCAGGGGCCCTGGCCCTGACCCAGACCTGGGCGC				
5.4LcL.1	-----				
JY8	-----				
5-4BB	-----				
HLA-12.4	-----				
5-4LBF	-----				
5.4 LcL2	-----				
GEN H	-----				

Exón 2 Dominio $\alpha 1$

	1	20	40	60	74
Y2	GCTCCCACTCCATGAGGTATTTCTACACCACCATGTCCCGGCCCGCCGCGGGGAGCCCGCTTCATCTCCGTCG				
5.4LcL.1	-----				
JY8	-----				
5-4BB	-----				
HLA-12.4	-T-----GC-----				
5-4LBF	-----				
5.4 LcL2	-----				
GEN H	-----				

	75	95	115	135	148
Y2	GCTACGTGGACGATACGCAGTTCGTGCGGTTTCGACAGCGACGCCGCGAGCCAGAGGATGGAGCCGCGGGCGCCG				
5.4LcL.1	-----				
JY8	-----				
5-4BB	-----				
HLA-12.4	-----A-----T-C-----AGA-----				
5-4LBF	-----A-----T-C-----AGA-----				
5.4 LcL2	-----A-----T-C-----AGA-----				
GEN H	-----				

	149	169	189	209	222
Y2	TGGATGGAGCGGGAGGGGCCGGGTATTGGGACCGGACACACAGATCTGCAGGCCAGGCACAGACTGACCG				
5.4LcL.1	-----				
JY8	-----				
5-4BB	-----				
HLA-12.4	-----AA-----				
5-4LBF	-----A-----G-----				
5.4 LcL2	-----A-----G-----				
GEN H	-----				

	223	244	264	270
Y2	AGAGAACCTGCCGATCGCGCTCCTCTACTACACCAGAGCGGGCG			
5.4LcL.1	-----G-----			
JY8	-----G-----			
5-4BB	-----G-----			
HLA-12.4	-----G-----			
5-4LBF	-----G-----			
5.4 LcL2	-----Δ-----ΔΔΔΔ-----G-----			
GEN H	-----G-----			

Exón 3 Dominio α2

	1	20	40	60	72
Y2	GTTCTCACCCATGCAGGTGATGTATGGCTGCGACGTGGGGCCGACGGGCGCTTCTCCGCGGGTATGAC				
5.4LcL.1	-----				
JY8	-----				
5-4BB	-----CG-C-----				
HLA-12.4	-----CT-----				
5-4LBF	-----I-----				
5.4 LcL2	-----I-----				
GEN H	-----				

	73	93	113	133	146
Y2	AGCACGCCTACGACGGCAGGATTACATCGCTCTGARACGAGGACCTGCGCTCCTGGACCGCGGGACATGGCA				
5.4LcL.1	-----A-----				
JY8	-----A-----				
5-4BB	-----I-----A-----C-----				
HLA-12.4	-----C-----				
5-4LBF	-----				
5.4 LcL2	-----				
GEN H	-----A-----				

	147	167	187	207	220
Y2	GCTCAGATCACCAGCGCAGTGGGAGGCGGCCCGTCGGGCGGAGCAGCTGAGAGCCTACCTGGAGGGCGAGTT				
5.4LcL.1	-----A-----				
JY8	-----A-----				
5-4BB	-----A-----				
HLA-12.4	-----G-----I-----T-----				
5-4LBF	-----G-----I-----				
5.4 LcL2	-----G-----I-----				
GEN H	-----A-----				

	221	241	261	276
Y2	CGTGGAGTGGCTCCGCAGATACCTGGAGAACGGGAGGAGACGCTGCAGCGCGCGG			
5.4LcL.1	-----			
JY8	-----			
5-4BB	-----			
HLA-12.4	-----T-----			
5-4LBF	-----			
5.4 LcL2	-----Δ-----T-----A-----			
GEN H	-----			

Exón 4 Dominio $\alpha 3$

	1	20	40	60	72
Y2	ACCCCCCAAGACACATATGACCCACCACCCATCTCTGACCATGAGGCCACCCTGAGGTGCTGGGCCCTGG				
5.4LcL.1	-----				
JY8	-----				
5-4BB	-G-----				
HLA-12.4	-----				
5-4LBF	-----				
5.4 LcL2	-----				
GEN H	-----				

	73	93	113	133	146
Y2	GCTTCTACCCTGCGGAGATCACACTGACCTGGCAGCGGGATGGGGAGGCCAGACCCAC Δ ACACGGAGCTCGTGG				
5.4LcL.1	----- Δ ----- Δ -----				
JY8	----- Δ ----- Δ -----				
5-4BB	----- Δ ----- Δ -----				
HLA-12.4	-----GG-----				
5-4LBF	----- Δ ----- Δ -----				
5.4 LcL2	----- Δ ----- Δ -----				
GEN H	----- Δ ----- Δ -----				

	147	167	187	207	220
Y2	AGACCAGGCCTGCAGGGGATGGACCTTCCAGAGTGGGCGGCTGTGGTGGTGCCTTCTGGAGAGGAGCAGAGA				
5.4LcL.1	-----				
JY8	-----				
5-4BB	-----				
HLA-12.4	-----				
5-4LBF	-----				
5.4 LcL2	-----				
GEN H	-----				

	221	241	261	•	275
Y2	TACACCTGCCATGTGCAGCATGAGGGTCTGCCAGAGCCCTCACCCCTGAGATGGG				
5.4LcL.1	-----•-----				
JY8	-----•-----				
5-4BB	-----•-----				
HLA-12.4	-----C-----				
5-4LBF	-----•-----				
5.4 LcL2	-----•-----				
GEN H	-----•-----				

Exón 5 Dominio Transmembrana

	1	20	40	60	72
Y2	AGCCATCTTCCCAGCCCACCATCCCCATCGTGGGCATCGTTGCTGGCCTGGTTCTACTTGTAGCTGTGGTCA				
5.4LcL.1	-----				
JY8	-----				
5-4BB	-----				
HLA-12.4	-----G-----T-----				
5-4LBF	-----				
5.4 LcL2	-----				
GEN H	-----				

	73	93	113	117
Y2	CTGGAGCTGTGGTCGCTGCTGTARTGTGGAGGAGAGAGCTCAG			
5.4LcL.1	-----			
JY8	-----			
5-4BB	-----			
HLA-12.4	-----			
5-4LBF	-----			
5.4 LcL2	-----			
GEN H	-----			

Exón 6 Dominio Citoplasmático 1

	1	20	33
Y2	ATAGAAAGGGAGGGAGCTACTCTCAGGCTGCA		
5.4LcL.1	-----		
JY8	-----		
5-4BB	-----		
HLA-12.4	-----		
5-4LBF	-----		
5.4 LcL2	-----		
GEN H	-----		

Exón 7 Dominio Citoplasmático 2

	1	20	40	47
Y2	GCGGCACACAGTGCCAGGGCTCTGATGTGTCTCTCACGGCGTGAAAG			
5.4LcL.1	-----			
JY8	-----			
5-4BB	-----			
HLA-12.4	-A-----T-----C			
5-4LBF	-----			
5.4 LcL2	-----C-----A-----Δ			
GEN H	-----			

SIMBOLOS:

A: nucleótido distinto, igual aac,

A: nucleótido distinto, distinto aac, frame HLA classic.

Δ: deleción.

•: Codón de terminación en fase HLA-H/AR.

Tabla 8: Diferencias y similitudes entre los exones de los diferentes alelos del locus HLA-H a nivel de su secuencia nucleotídica, tomando como base a Y2 (Zemmour 1990, Chomey 1990, Malissen 1982 y datos propios).

Surgen del análisis de este cuadro, varios puntos significativos:

+EXON I : Homología del 100% entre todos los alelos del locus.

+EXON II : Nucleótido específico de Y2 : T en posición 248.

+EXON IV : Característica distintiva del locus HLA-H : Deleción en la posición 132 del exón.

Sólo el HLA -12.4 presenta un nucleótido en esta posición.

Para estudiar el entorno de la deleción en el locus HLA-H, se ha confeccionado una tabla de comparación entre las posiciones nucleotídicas de todos los HLAs clase I secuenciados hasta el momento, y el consenso de los HLA-H. Se seleccionó una zona de 30 nucleótidos, de los cuales sólo 4 presentan variantes entre más de 40 alelos secuenciados, entre los cuales se incluye a la deleción (Parham 1988). Todas las secuencias disponibles del locus H en este entorno, muestran 2 cambios respecto del consenso de los HLA clase I clásicos. El primero de ellos es una deleción de un nucleótido. El segundo es un cambio de base: presenta una "C" por una "G"

Las secuencias analizadas se han alineado buscando la máxima homología. Para que se conserve la homología entre las secuencias flanqueantes de la deleción, el nucleótido ausente puede "faltar" en una de dos posiciones: Hipótesis 1 y 2.

Cuando se traducen estas dos secuencias hipotéticas, respetando el marco de lectura que surge de "adicionar una base", se obtiene la misma secuencia de aminoácidos en ambos casos.

Unicas posiciones variables en 40 alelos HLA Clase I secuenciados.																																	
		↓ ↓ ↓ ↓																															
		120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	
Consenso HLA-A		G	A	C	C	A	G	A	C	C	C	A	G	G	A	C	A	C	G	G	A	G	C	T	C	G	T	G	G	A	G	A	
Consenso HLA-B		G	A	C	C	A	A	A	C	T	C	A	G	G	A	C	A	C	T	G	A	G	C	T	T	G	T	G	G	A	G	A	
Consenso HLA-C		G	A	C	C	A	A	A	C	T	C	A	G	G	A	C	A	C	T	G	A	G	C	T	T	G	T	G	G	A	G	A	
Hipótesis 1		G	A	C	C	A	G	A	C	C	C	A	-	C	A	C	A	C	G	G	A	G	C	T	C	G	T	G	G	A	G	A	
Hipótesis 2		G	A	C	C	A	G	A	C	C	C	A	C	-	A	C	A	C	G	G	A	G	C	T	C	G	T	G	G	A	G	A	
Aminoácidos Y2 Hipótesis 1							T	=	H	T																							
							ACC			CAC																							
Aminoácidos Y2 Hipótesis 2							T	H	=	T																							
							ACC	CAC																									

Tabla 9: Análisis nucleotídico del entorno de la deleción.

CARACTERIZACION DEL LOCUS HLA-H

Cuando se trata de caracterizar al locus HLA-H, se busca encontrar elementos que le sean propios y que no aparezcan en otros locus. Es así que se estudiaron aquellas posiciones nucleotídicas que le son exclusivas y diferencian a este locus de los clásicos. Cuando se compara el consenso de posiciones nucleotídicas que surgen de esta tabla para el locus HLA-H, con el consenso descrito para los alelos clásicos HLA clase I, se pueden distinguir varias posiciones en las que el locus HLA-H presenta

nucleótidos que nunca están presentes en otro locus. Esto significa que estamos en presencia de nucleótidos específicos del locus HLA-H. En las posiciones que se mencionan, ningún gen secuenciado presenta la base que presentan todos los miembros del locus HLA-H. (Cuando hay excepciones se indican entre paréntesis).

Esta observación no fue tomada en cuenta por Zemmour y colaboradores (Zemmour 1990), dado que bautizan al locus con la denominación de "AR" que significa "A-related". Y es justamente este análisis el que nos permite concluir que este locus es no relacionado con el locus HLA-A.

Especificidad de nucleótidos del locus HLA-H

Exón	Posición	Locus A	Locus B	Locus C	Locus H
Exón I	7	G	G	G	C
Exón I	42	G	G	G	A
Exón II	30	T	T-G	G	A
Exón II	74	G	G	G	C
Exón II	89	C	C	C	T
Exón II	160	A	A	A(Cw3=G)	G
Exón II	221	A	A	A	C
Exón III	18	A-T	A-T	A	G
Exón III	71	G-C	C	C	A
Exón III	220	G	G	G	T
Exón IV	131 y 132	GG	GG	GG	FALTA 1 (12.4=GG)
Exón IV	254	C	G	G(Cw1.1=A)	A(12.4=C)
Exón V	56	C	C	C	A
Exón V	61	G	C	G	T
Exón V	95	C	C	G	A
Exón V	115	G	G	G	A
Exón VII	3	A	A	A	G
Exón VII	38	A	A	C	G(LCL2=A)

Tabla 10: Especificidad de nucleótidos del locus HLA-H.

Esta tabla se confeccionó sobre la secuencia de cada uno de los alelos que se han secuenciado en cada locus. Por eso, se indica en cada caso cuando algún alelo de algún locus en particular se aparta del consenso (Parham 1989)(Zemmour 1990)(Zemmour 1991).

ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN AMINOACIDICA DE Y2:

A continuación se transcribe una secuencia completa del gen Y2 con la traducción aminoácidos correspondiente (Tabla 11). La posición nucleotídica 132 del exón IV correspondiente a los genes HLA-clase I clásicos está ausente en este locus, razón por la cual, aquí se produce un corrimiento del marco de lectura respecto de un gen clásico. Hasta el punto de la deleción se traduce en el marco de lectura clásico para los genes HLA clase I. Desde la deleción hacia 3', se traducen 2 marcos de lectura que difieren en una posición : el marco verdadero, llamado marco HLA-H, aparece en *itálica*.

El marco de lectura hipotético, que surge de incluir una base en el punto de la deleción, se continúa hasta que alcanza su primer codón de terminación.

1 tctagaagagtccaggtggacagggagtcagttcagggacggagattcctggatgaaaagtgaaggg
69 agagggacagggcccatgccgaggggtttcttctcctggtttctcagacagctcctgggccaagactcagg
137 gaaacactgagacagagcgcttggcacaggaggagcggggtcagggcgaagtcccagggccccagggc
205 tggctctcagggctcagggccccgaaggcggtgatggattggggagggccccgcttggggattcgcc
273 acctccgcagtttctcttcttctcacaacctgcgacgggtccttttctcctggatactcaggaagcggg
341 cacagttctcattcccactaggtgtcgggtttctagagaagccatcggtgccgcgcgggtcccgggtt
409 ctaaagtecccacgcacccaccgggactcagattctccccagacgccgagg ATG GTG CTC ATG
M U L M
472 GCG CCC CGA ACC CTC CTC CTG CTG CTC TCA GGG GCC CTG GCC CTG ACC CAG
A P R T L L L L L S G A L A L T Q
523 ACC TGG GCG C gtgagtgacgggtctgcagggaaatggtcgggaggagcagaggggccccgccccggc
T W A
587 ggggcgcaggaccagggagccgcgcagggaggaggggtcgggcgggtctcagctcctcctcgctccca
655 g GC TCC CAC TCC ATG AGG TAT TTC TAC ACC ACC ATG TCC CGG CCC GGC CGC
R S H S M R Y F Y T T M S R P G A
706 GGG GAG CCC CGC TTC ATC TCC GTC GGC TAC GTG GAC GAT ACG CAG TTC GTG
G E P R F I S V G Y U D D T Q F U
757 CGG TTC GAC AGC GAC GCC GCG AGC CAG AGG ATG GAG CCG CGG GCG CCG TGG
R F D S D A A S Q R M E P R A P W
808 ATG GAG CGG GAG GGG CCG GAG TAT TGG GAC CGG AAC ACA CAG ATC TGC AAG
M E A E G P E Y W D R N T Q I C K
859 GCC CAG GCA CAG ACT GAA CGA GAG AAC CTG CGG ATC GCG CTC CTC TAC TAC
A Q A Q T E R E N L R I A L L Y Y
910 AAC CAG AGC GAG GGC G gtgagtgaccccgggcccgggacgcaggtcaegacccctccccatcc
N Q S E G
972 cccacggagggcgggtcgcctcgagtctctgggtcagagatcctccccgaaaccgcgggacccccgag
1040 accttgacctgggagagggccagggcctttaccctgtttcattttcagtttaggccaaaatccccgc
1108 ggggttggtcggggcagggcggggctcgggggaccgggctgaccgcgggggcccggccag GT TCT
G S
1171 CAC ACC ATG CAG GTG ATG TAT GGC TGC GAC GTG GGG CCC GAC GGG CGC TTC
H T M Q U M Y G C D U G P D G R F
1222 CTC CGC GGG TAT GAA CAG CAC GCC TAC GAC GGC AAG GAT TAC ATC GCT CTG
L A G Y E Q H A Y D G K D Y I A L
1273 AAC GAG GAC CTG CGC TCC TGG ACC GCG GCG GAC ATG GCA GCT CAG ATC ACC
N E D L R S W T A A D M A A Q I T
1324 AAG CGC AAG TGG GAG GCG GCC CGT CGG GCG GAG CAG CTG AGA GCC TAC CTG
K A K W E A A A A A E Q L R A Y L
1375 GAG GGC GAG TTC GTG GAG TGG CTC CGC AGA TAC CTG GAG AAC GGG AAG GAG
E G E F U E W L R R Y L E N G K E
1426 ACG CTG CAG CGC GCG G gtaccaggggcccacagggcgccctcccggatcgccctgtagatctccg
T L Q R A
1488 gggctggcctcccacaagaaagggagacaaatgggaccaaacctataatcgcctccctctggctcc
1556 tgagggagaagaatcctcctgggtttcagagagtgactctgaggggtccgccgtgctctttgacacaa

1624 ttaagggatgaaatctctgaggaatgaagggagacaatccctggaatctgatgagtggttccctt
 1692 tgacactggcagcagccttgggcccctgacttttctctcaggccttgttctctgcttcaactcaa
 1760 tgtgcctgggggtctgagtcagctcttctgagtcctcagcctccactcaggtcaggaccagaagtc
 1828 gctgttccctcctcagggactagaatttccacggaataggagattatcccaggtgcctgtgtccagg
 1896 ctgttgtctgggttctgtgctcccttccccccccagggctcctgtccattctcaagatggccacatg
 1964 cgtgctggtggagtgtcccatgacagatgcaaatgcctgaattttctgactcttctctgacag AC
 D
 2029 CCC CCC AAG ACA CAT ATG ACC CAC CAC CCC ATC TCT GAC CAT GAG GCC ACC
 P P K T H M T H H P I S D H E A T
 2080 CTG AGG TGC TGG GCC CTG GGC TTC TAC CCT GCG GAG ATC ACA CTG ACC TGG
 L R C W A L G F Y P A E I T L T W
 2131 CAG CGG GAT GGG GAG GAC CAG ACC *CA CAC ACG GAG CTC GTG GAG ACC AGG
 Q R D G E D Q T - H T E L U E T A
CAC ACA CGG AGC TCG TGG AGA CCA GGC
H T A S S W A P G
 2181 CCT GCA GGG GAT GGA ACC TTC CAG AAG TGG GCG GCT GTG GTG GTG CCT TCT
 P A G D G T F Q K W A A U U U P S
CTG CAG GGG ATG GAA CCT TCC AGA AGT GGG CGG CTG TGG TGG TGC CTT CTG
L Q G N E P S A S G A L W W C L L
 2232 GGA GAG GAG CAG AGA TAC ACC TGC CAT GTG CAG CAT GAG GGT CTG CCA GAG
 G E E Q R Y T C H U Q H E G L P E
GAG AGG AGC AGA GAT ACA CCT GCC ATG TGC AGC ATG AGG GTC TGC CAG AGC
E A S A D T P A N C S N A U C Q S
 2283 CCC CTC ACC CTG AGA TGG G gtaaggaggagatgggggtgtcatgtcccttagggaaagcc
 P L T L R W
CCC TCA CCC TGA GAT GGG
*P S P **
 2344 ggagcctctctggagagctttagcagggtcagggctccctcaccttcccctcttttccag AG CCA
 E P
 2409 TCT TCC CAG CCC ACC ATC CCC ATC GTG GGC ATC GTT GCT GGC CTG GTT CTA
 S S Q P T I P I U G I U A G L U L
 2460 CTT GTA GCT GTG GTC ACT GGA GCT GTG GTC GCT GCT GTA ATG TGG AGG AAG
 L U A U U T G A U U A A U M W A K
 2511 AAG AGC TCA G gtaaggaaggggtgaggagtgtggtctgagatttcttgtctcactgagagttcc
 K S S
 2575 aagccccaggtagaagtgcctgcctggttactgggaagccatccacactcatgggcctaccage
 2643 ctgggcccctgtgtgccageacttactcttttgtaaageacctgttacaatgagggacagatttatcac
 2711 cttgatgactgtggtgatgggacctgatcccageagtcaaaagtacaggggaaggtccccgaggaca
 2779 gacctcagaagggcggttggtecaggaccacatctgcttctctcatgttctctgatcccgcctggg
 2847 tctgcagttgcacatttctggaacttctctggggctcaagacttggaggttctctaggaccttatg

```

2915 | gccctggettettctggcatctcacaggacattttcttcccacag AT AGA AAA GGA GGG
                                           D R K G G
2975 | AGC TAC TCT CAG GCT GCA A gtaagtatgaaggaggetgatccctgaaatcctttggatatt
      S Y S Q A A
3036 | gtgtttgggagcccatgggggagctcaccaccccacaattcttctctagccacatctactgtggga
3104 | tctgaccaggctcctgtttttattctactccag GC GGC AAC AGT GCC CAG GGC TCT GAT
                                           S G N S A Q G S D
3162 | GTG TCT CTC ACG GCG TGA AAG gtgagacctggggggcctgatgtgtggggggtgttgggg
      U S L T A *
3223 | gggaacagtggacacagctgtgctatggggttctttgaatttgatgttttgagcatgcatgggctgc
3291 | caaagtgtcatccattactgggacagatatgaattgttcatgaatatttttctatag TGTGAGAC
3358 | AGCTGCCCTTGTGTGGGACTGAGAGGCCAAGATTTGTTCCACACCTTCCCTTTGTGACTTGAGAACCCCTG
3426 | ACTTCTGCAARAGGCACCTGAATGTGTCTGTGTTCCCTGTAGGCATAATGTGTGGAGGAGGGGAGACCAA
3494 | CCCACCCATCATGTCACCATGACCCCTCTTCCCCACGCTGATCTGTGTTCCCTCCCCAATCATCTTTCC
3562 | TGTTCCAGAGAGGGCGGGGCTGAGATGTCTCCATCTTTTTCTCACTTTATGTGCACTGAGCTGTAACCT
3630 | TCTTACTCCCTCTTAAATTAGARTCTGAGTAACATTTACTTTTTCAATTTCTTCCATGAGAGGT
3698 | TGATGACTTAAATRAAGGAGAGATTCTTAAATTTGAGAGACAAAATAAAAt ggaacacat gagaacc
3766 | ttccagagtccatgtgtttcttgtgctgatttgttgcaggggaggagaatagatgggctgtgctcagt
3834 | ggggtgctcaggccagtatggactttatgtggctcactgctcagctgggtcatctttgctccttcatc
3902 | tcttggcccttcagtagaaccttgtcccaccaccacctgtgatcacaggaggtggatgtcacctag
3970 | ggtggtccctgcatacaaatctcattgtggtatcaagag 4008

```

Tabla 11: Secuencia nucleotídica del gen Y2 con traducción de los marcos de lectura abiertos. A partir del punto de la deleción, se traducen los dos marcos de lectura posibles, hasta que cada uno de ellos encuentra una seña de terminación de la traducción.

De la secuencia aminoacídica del gen Y2, se destacan ciertos elementos que se hacen significativos:

- El aminoácido número 1 una vez delecionado el péptido seña es una arginina, en lugar de glicina ó cisteína. Este cambio es exclusivo de los HLA H, ya que ningún otro gen presenta este cambio.

- En la posición 164 aparece una fenilalanina, al igual que en el clon HLA-12.4. Esta fenilalanina reemplaza a una cisteína que en los HLA clase I y símil clase I (HLA-E, F y G) forma un puente disulfuro que sustenta la estructura secundaria de la proteína madura.

- Una deleción de un nucleótido en la posición aminoacídica 226/227 saca al gen Y2 de marco de lectura, y lo lleva a un marco completamente anómalo, que alcanza un codón de terminación prematuramente.

- Este nuevo marco de lectura, generaría una proteína de función biológica desconocida, o bien estaríamos en presencia de un pseudogen.

Si en un análisis teórico, se incluye una base en la posición delecionada, se corrige el marco de lectura, y se obtiene una proteína perfectamente funcional.

Se comparó al gen Y2 con el resto de los alelos descritos para el locus a nivel de los aminoácidos (tabla 12). Para ello, se hizo una alineación de todas las secuencias aminoacídicas de los alelos, debajo de la secuencia del alelo Y2. Se indica con un guión cuando existe identidad entre el aac de Y2 y el del alelo para cada posición. Cuando no coincide, se indica qué aac corresponde. Se incluye en la comparación, a las secuencias consenso de locus HLA-A, HLA-B y HLA-C.

Se comparan los dos marcos de lectura luego de la deleción hasta que cada uno de ellos encuentra un codón de terminación.

EXON 1 Peptido Líder

	-24		-1
Y2	MULMAPRTL	LLLLSGALALTQTWA	
5.4LcL.1	-----	-----	
JY8	-----	-----	
5-4BB	-----	-----	
HLA-12.4	-----	-----	
5-4LBF	-----	-----	
5.4 LcL2	-----	-----	
GEN H	-----	-----	
HLA A	-R-----U-	-----	
HLA B	-R-T----U---W--L---E--		
HLA C	-R-----I-----E--		

EXON 2 Dominio α 1:

	1		20		46
Y2	ASHSMRYFYTTMSRPGAGEPAF		SUGYUDDTQFVAFDSDRASQAME		
5.4LcL.1	-----		-----		
JY8	-----		-----		
5-4BB	-----		-----		
HLA-12.4	-----	-A-	-----	D--P-E-	
5-4LBF	-----	-----	-----	D--P-E-	
5.4 LcL2	-----	-----	-----	D--P-E-	
GEN H	-----	-----	-----	-----	
HLA A	G-----SU-----A-----				
HLA B	G-----AM-----T-----P-K-				
HLA C	C-----AV-----H-A-----P-G-				

	47		67		90
Y2	PAAPWMEREGPEYWDANTQ		CKAQAQTERENLA		ALLYYNQSEG
5.4LcL.1	-----		-----R-----		
JY8	-----		-----R-----		
5-4BB	-----		-----G--R-----		
HLA-12.4	-----	-K-	-----R-----		
5-4LBF	-----	-----R-----	-----R-----		
5.4 LcL2	-----	-----R-----X--XXR-----			
GEN H	-----	-----R-----			
HLA A	-----I-Q-----E-ANU--HS--D-VD-GTLRG-----A				
HLA B	-----I-Q-----E--S-TNT--Y-----NL-R-----A				
HLA C	-----V-Q-----E--KV-R-----D-US--NLR-----A				

EXON 3 Dominio α 2:

	91		140
Y2	GSHTMQUMYGC DUGPDGRFLRGYEQHAYDGKDYIALNEDLRSWTAADMAR		
5.4LcL.1	-----S-----		
JY8	-----S-----		
5-4BB	---ID-----V-S---T---		
HLA-12.4	-----		
5-4LBF	-----L-----		
5.4 LcL2	-----C-----		
GEN H	-----S-----		
HLA A	---L-R---S---H-V---K---		
HLA B	---L-R---L---HN-V---S---T---		
HLA C	---L-R---L---L---D-V---T---		

	141	164	182
Y2	QITKRWEARARRAEQLRAYLEGEFVFWLRLAYLENGKETLQRA		
5.4LcL.1	-----Q-----F-----		
JY8	-----Q-----F-----		
5-4BB	-----Q-----F-----		
HLA-12.4	-----R-U---F-----		
5-4LBF	-----R-U---F-----		
5.4 LcL2	-----R-U---F---X---K---		
GEN H	-----Q-----F-----		
HLA A	-T-----HV-----TG-----T		
HLA B	-Q-----V-----LG-----		
HLA C	-Q-----E---R---TG-----		

EXON 4 Dominio α 3

	183	226	232
Y2	DPPKTHMTHHPISDHEATLACWALGFYPAEITLTWQRDGEDQT■HTELVE		
5.4LcL.1	-----■-----M-		
JY8	-----■-----M-		
5-4BB	-A-----■-----		
HLA-12.4	-----QD-----		
5-4LBF	-----■-----		
5.4 LcL2	-----■-----		
GEN H	-----■-----M-		
HLA A	-A-----AV-----S-----QD-----		
HLA B	-----V-----QD-----		
HLA C	EH-----V---V-----QD-----		

	233	274
Y2	TAPAGDGTFOKWARVVUUPS GEEQRYTCHUQHEGLPEPLTLAW	
5.4LcL.1	-----	
JY8	-----	
5-4BB	-----	
HLA-12.4	-----	
5-4LBF	-----	
5.4 LcL2	-----	
GEN H	-----	
HLA A	-----Q-----K-----	
HLA B	-----R-----K-----	
HLA C	-----	

EXON 4 Dominio α 3		FASE HLA-H(verdadera)	
	209	225 226	272
Y2.	YPAEITLTWQRDGEDQT	HTRSSHAPGLQGMPEPSRSGRLWCLLERSRDT	PAMCSMRUCQSPSP*
5.4LcL.1.	-----	-----	-----
JY8.	-----	-----	-----
5-4BB.	-----	-----	-----
5-4LBF.	-----	-----	-----
5.4 LcL2.	-----	-----	-----
GEN H.	-----	-----	-----

EXON 5 Dominio Transmembrana.

	275	314
Y2	EPSSQPTIPIUGI VAGLULLVAUVTXGAUVAARUMWAKKSS	
5.4LcL.1	-----	X-----
JY8	-----	X-----
5-4BB	-----	X-----
HLA-12.4	-----U-----	X-----
5-4LBF	-----	X-----
5.4 LcL2	-----	X-----
GEN H	-----	X-----
HLA A	-----I-----F-----	X-----R-----
HLA B	-----S-U-----AV--U--IX-----	C-R-----
HLA C	-----	AV--ULAUL-----U--C-R-----

EXON 6 Dominio Citoplasmático.1

	315	325
Y2	DAKGGSYSQAA	
5.4LcL.1	-----	
JY8	-----	
5-4BB	-----	
HLA-12.4	-----	
5-4LBF	-----	
5.4 LcL2	-----	
GEN H	-----	
HLA A	-----	
HLA B	GG-----	
HLA C	GG----C----	

EXON 7 Dominio Citoplasmático.2

	326	340
Y2	SGNSAQGSDUSLTA*	
5.4LcL.1	-----	
JY8	-----	
5-4BB	-----	
HLA-12.4	-S-----	
5-4LBF	-----	
5.4 LcL2	----P-----	
GEN H	-----	
HLA A	-SD-----C	
HLA B	CSD-----	
HLA C	-S-----E--I-C	

Tabla 12: Comparación entre la secuencia aminoacídica del gen Y2 y la de los alelos del locus HLA-H. Se incluyen los consensos de los locus HLA-A, B y C. *:Codón de terminación. ■ Aminoácido indefinible por falta de un nucleótido. X : Aminoácido inexistente. Esta tabla se confeccionó según datos propios y de referencias (Zemmour 1990).

Existen características particulares que diferencian al gen Y2 de los clásicos HLA clase I. Muchos de estos elementos son compartidos por todos los genes descritos para este locus. Según estas coincidencias se puede caracterizar al locus HLA-H a nivel de aminoácidos según los siguientes elementos (la numeración corresponde a la proteína madura):

AMINOACIDO	HLA-A	HLA-B	HLA-C	HLA-H
2 Péptido Líder	A(gcc)	R (cgg) L(otg) Q(oag)	R(cgg)	V(gtg)
1	G(ggc)	G(ggc)	G(ggc) C(tgc)	R(cgc)
54	Q(cag)	Q(cag)	Q(cag)	R(cgg)
90	A(gcc) D(gac)	A(gcc)	A(gcc)	G(ggc)
164	C(tgc)	C(tgc)	C(tgc)	F(ttc)
226/227	QD(oag)(gao)	QD(oag)(gao)	QD(oag)(gao)	HT(oao)(soa) cambio de marco
311	R(agg) S(agc)	R(agg)	R(agg)	K(aag)

Tabla 13: Especificidad de aa del locus HLA-H.

Se han elegido aquellas posiciones en que todos los alelos del locus HLA-H presentan el mismo aminoácido, codificado por el mismo triplete y que además nunca esté presente en ningún otro alelo de otro locus.

El gen Y2, además presenta una LISINA en la posición 83 (ctc), se evidencia la presencia del alelo Y2, ya que todos los H presentan una ARGININA (cgc) en esta posición.

SUBGRUPOS DENTRO DEL LOCUS HLA-H

Dentro del locus HLA-H hay ciertas posiciones aminoacídicas que presentan uno de dos aminoácidos posibles. Estas dos alternativas siempre aparecen relacionadas entre sí en bloque, de tal manera que se diferencian dos subgrupos (tabla 14):

alelo	aa 40	aa.43	aa.45	aa.72	aa.120	aa.152	aa.156	aa.158
H	A	Q	M	Q	S	Q	L	A
5.4LCL.1	A	Q	M	Q	S	Q	L	A
JY8	A	Q	M	Q	S	Q	L	A
5.4BB	A	Q	M	Q	S	Q	L	A
Y2	A	Q	M	Q	G	R	L	A
12.4	D	P	E	Q	G	R	R	V
5.4LBF	D	P	E	R	G	R	R	V
5.4LCL.2	D	P	E	R	G	R	R	V

Consenso A	A	Q	M	Q	G	V	L	A
Consenso B	A	P	K	Q	G	V	L	A
Consenso C	A	P	G	Q	G	E	R	A

Tabla 14: Subgrupos dentro del locus HLA-H.

Se tomaron en cuenta aquellas posiciones aminoacídicas en que dos alelos como mínimo se diferenciaran del resto para una determinada posición.

En la posición 72, el alelo 12.4 presenta una arginina codificada por el triplete de bases cgg en lugar de la glutamina codificada por cag.

El alelo Y2 se aparta de lo esperado en las posiciones 120, donde codifica para una glicina ggc (igual aminoácido y codón que los A, B y C) en lugar de arginina agc; y 152 donde cgg codifica para arginina en lugar de la esperada glutamina cag (A y B=gtg; C=gag).

El primero de los grupos, tiene bastante similitud con el consenso del locus A donde 6 de las 8 posiciones son idénticas. Y2 es el que más se parece, con 7 similitudes. Posiblemente este haya sido un elemento importante tomado por Zemmour (1990) para relacionar a este locus con el locus A.

Es significativo el hecho de que haya dos genes, uno perteneciente a cada grupo (Y2 y 12.4) que pudieran explicar por un fenómeno de recombinación no recíproca la conversión de un grupo en otro.

EXPRESION DEL GEN Y2

RESULTADOS DE LOS ANALISIS DE TRANSFECCION (Ferraro 1990).

NOTA: Todos los experimentos de transfección se hicieron cuando aún no se sabía que el gen Y2 era un HLA-H portador de una delección puntual que lo saca de marco de lectura.

a) Transfecciones del gen Y2 completo:

⊗ No se ha podido detectar proteína del gen Y2 con el anticuerpo monoclonal YTH/76 en transfecciones estables a (Ltk-) fibroblastos de ratón con β guglobulina murina.

⊗ No se ha podido detectar proteína del gen Y2 con los anticuerpos YTH/76 y W6/32 en transfecciones transientes a células J26 (son células Ltk- que expresan constitutivamente β guglobulina humana. El resultado fue el mismo aún frente a la inducción con IFN clase I y II murino.

⊗ No se ha podido detectar proteína del gen Y2 por transfección transiente en células NIH3T3, aunque sí una débil señal al hibridar el RNA de éstas células con una sonda de Y2. Estos resultados se buscaron reconfirmar por amplificación por PCR.

b) Transfecciones del promotor completo del gen Y2 asociado al gen CAT:

⊗ No se ha podido detectar actividad CAT al transfectar construcciones con el promotor de Y2 en células YHHH ni en células J26, en ambos casos con y sin estimulación por interferón.

Los resultados de estos análisis se sintetizan en la tabla 15 (Ferraro 1990):

<u>Plásmido</u>	<u>Región Reguladora</u>	<u>Promotor</u>	<u>Tipo de Transfec.</u>	<u>Células</u>	<u>IFN</u>	<u>Ensayo</u>	<u>Resultado</u>
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 15: resumen de las transfecciones del gen Y2 (Ferraro 1990).

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN POR PROTECCIÓN FRENTE A NUCLEASA S1:

NOTA: Todos los experimentos de protección frente a nucleasa S1 se hicieron cuando aún no se sabía que el gen Y2 era un HLA-H portador de una deleción puntual que lo saca de marco de lectura.

La primera metodología usada para estudiar la expresión del gen Y2 fue la técnica de mapeo S1. Se subclonó a M13 un fragmento de DNA de Y2 que permitiera preparar una sonda antisentido respecto del mRNA del gen que fuera lo suficientemente diferente del consenso de los péptidos líderes de los consensos HLA-A, B y C, para poder diferenciarlos de Y2. En el siguiente esquema se muestra las

diferencias existentes en el exón que codifica para el péptido líder entre los consensos de los distintos alelos. La extensión de la sonda que se esperaba que se proteja de la acción de la nucleasa S1, aparece indicada con una flecha :

Exón 1 Péptido Líder

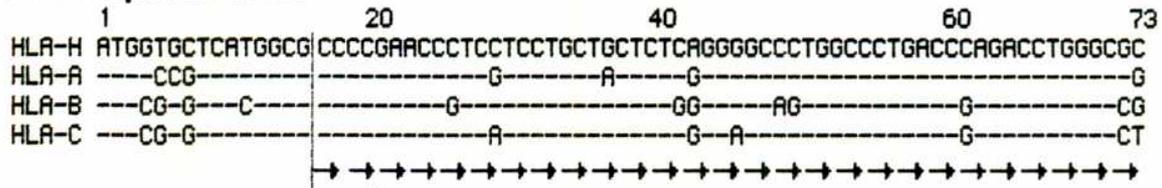


Figura 10: Protección esperada frente a la nucleasa S1.

La sonda comprende 109 pares de bases que desde 5' hacia 3' abarcan las últimas 58 pares de bases del exón 1 (péptido líder) del gen Y2 comenzando desde un sitio de restricción para la enzima Nar I (ggcgc). Continúa por el intrón 14 pares de bases hasta alcanzar el sitio Pst 1 para continuar luego con 37 pares de bases que corresponden al bacteriófago M13.

Se buscó probar dos situaciones independientemente.

- La primera de ellas era la expresión del gen Y2 en el mRNA de las células YHHH.
- La segunda era la inducibilidad del gen Y2 por interferón.

Se trabajó sobre el RNA total de las células YHHH tratadas por 24 hs con 200 u de IFN/ml. y sobre el RNA total de células YHHH sin tratar. Para controlar la efectividad de la inducción por interferón, se hicieron inmunofluorescencias de superficie con el anticuerpo monoclonal YTH/76 conjugado con fluoresceína sobre la población de células tratadas (Figura 11).

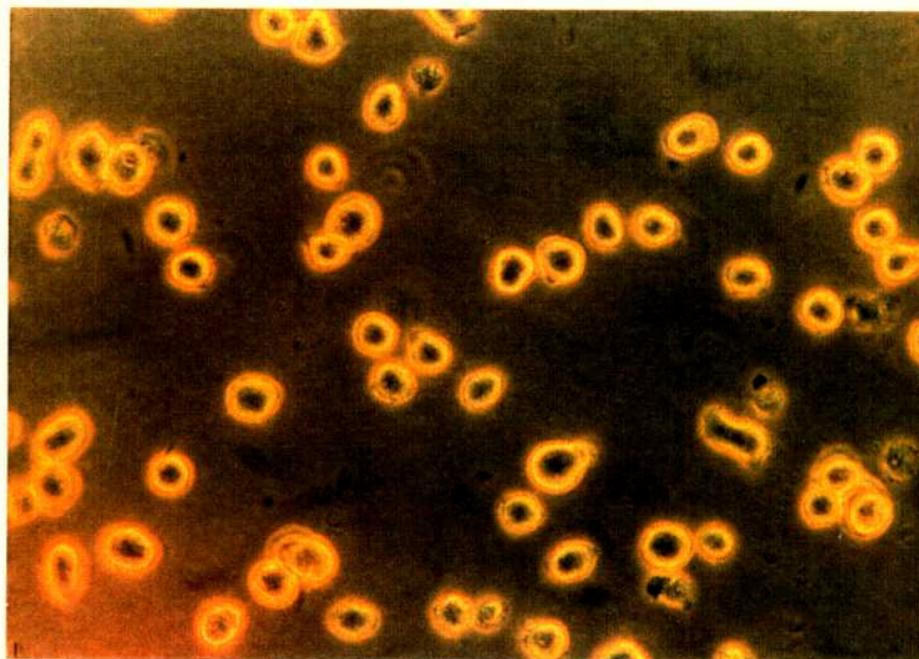
Se utilizó como marcador de tamaño a una secuencia de M13 que se corrió a ambos lados del experimento para evaluar con la precisión de un nucleótido las distancias recorridas en el gel por la sonda y la sonda digerida.

Se esperaba una protección de 58 pares de bases para una sonda que mide 109 pares de bases.

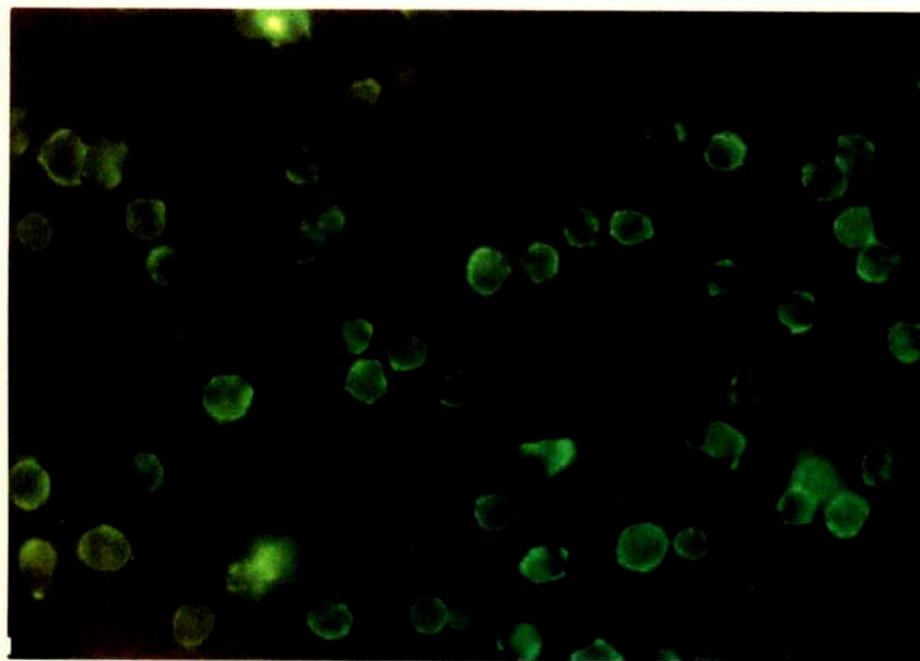
Los resultados, que se muestran en la figura 12 muestran que la sonda mide 109, y que la protección es de un fragmento de 58 nucleótidos de extensión. Este resultado es compatible con la transcripción de un péptido líder con la misma secuencia que la presentada por el fragmento utilizado como sonda proveniente de Y2.

Sería posible que a pesar de no transcribirse el gen Y2 en YHHH, la sonda se hubiera protegido completamente. En este caso, se estarían protegiendo transcritos de los péptidos líder de las especificidades expresadas por YHHH. Si las diferencias fueran de apenas un nucleótido, en las zonas de divergencia, existiría la posibilidad de que la enzima sólo las pudiera degradar en un margen muy

A



B



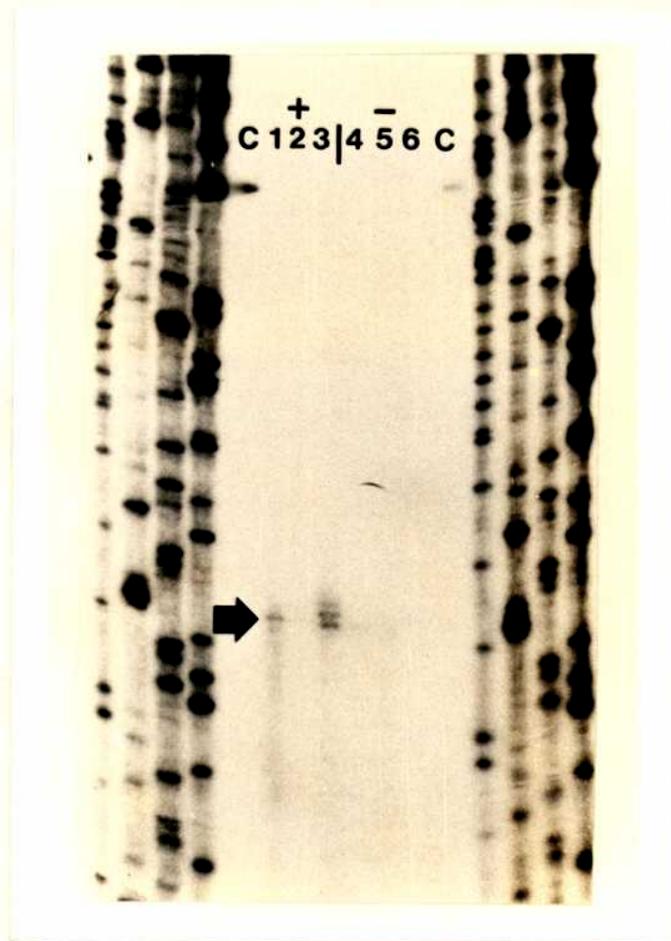
A: Células YHHH tratadas durante 24 hs. con IFN 200u/ml.

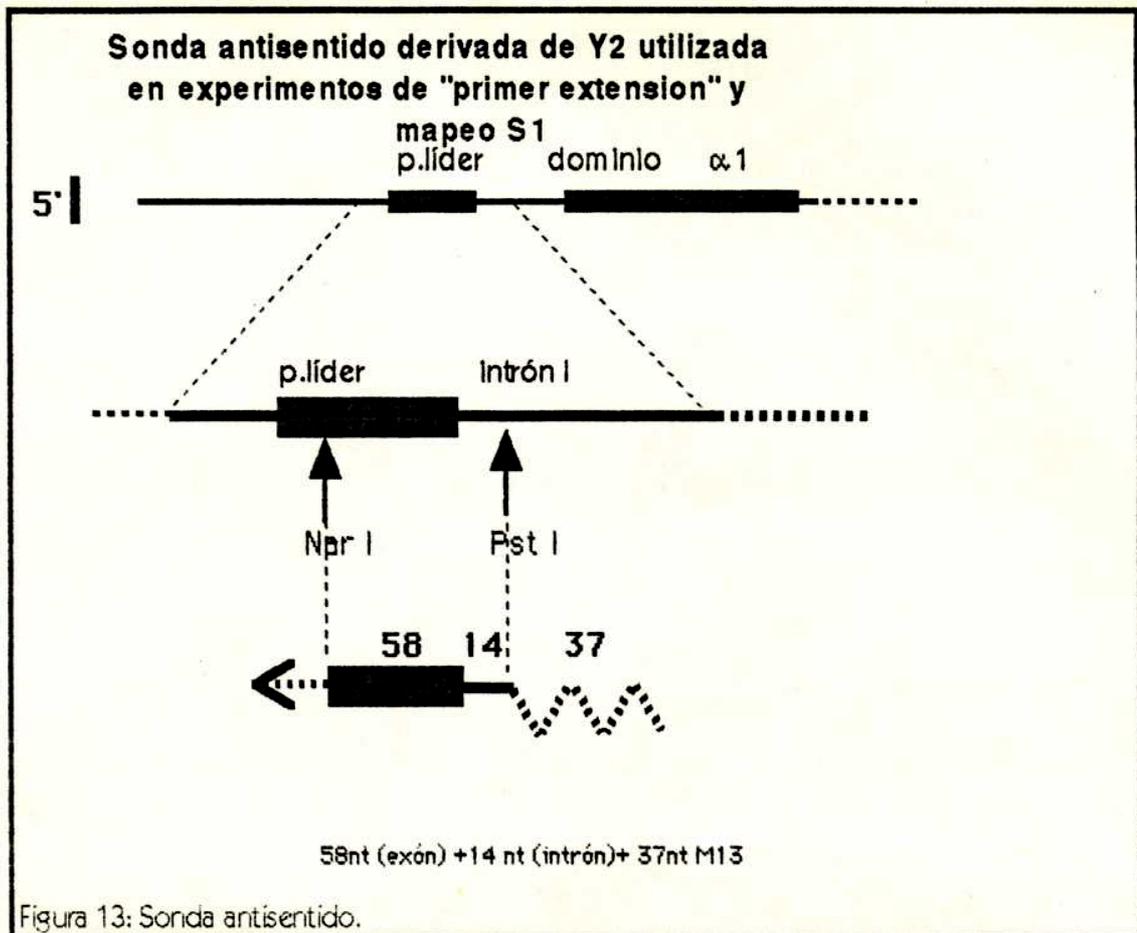
B: Inmunofluorescencia de superficie de antígenos HLA Clase I locus B usando el anticuerpo monoclonal YTH/76 en células YHHH tratadas durante 24 hs. con IFN 200u/ml.

pequeño de concentración, no detectado por nosotros, pasando de una protección total, a una degradación total de la sonda.

Figura 12

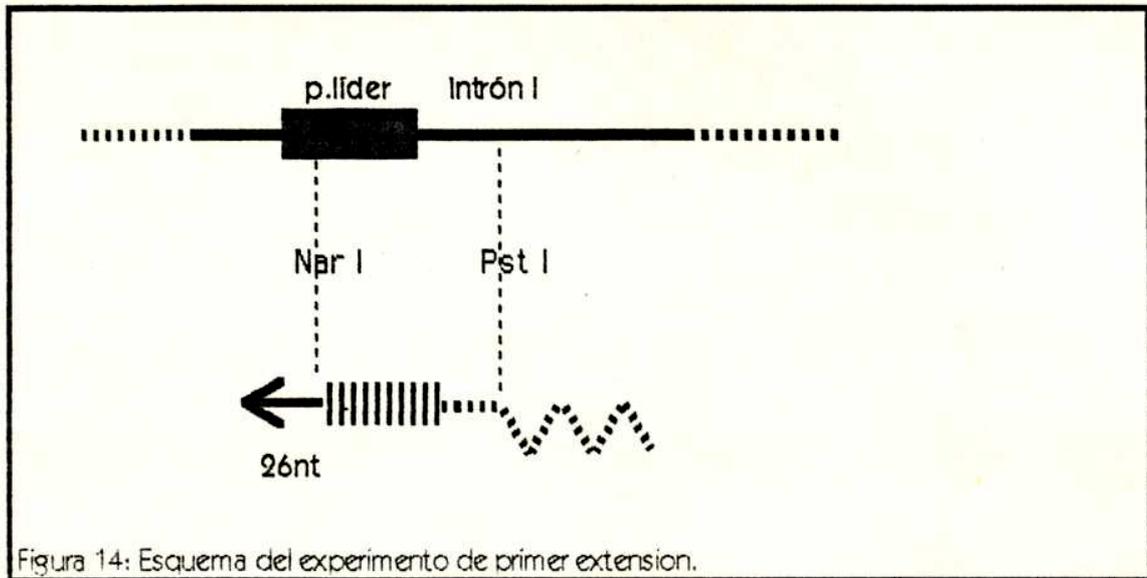
Mapeo S1: RNA de células YHHH inducidas con IFN (200u/ml) por 24 hs. fue tratado con cantidades decrecientes de exonucleasa S1 (•1)•2)•3). Igual cantidad de RNA proveniente de YHHH sin inducir se trató en iguales condiciones (•4)•5)•6). A ambos lados una muestra del RNA hibridado por 12 hs. antes de la digestión. A ambos costados se sembró como marcador de tamaño una secuencia de M13. La sonda de 109 bases baja hasta 58 nt.





PRIMER EXTENSION

La sonda que contiene al péptido señal que se usó para el mapeo S1, también se usó para determinar el punto de iniciación de la transcripción del gen Y2. Para ello, se trabajó con mRNA total de células YHHH inducidas por interferón. El experimento se esquematiza en la figura siguiente:

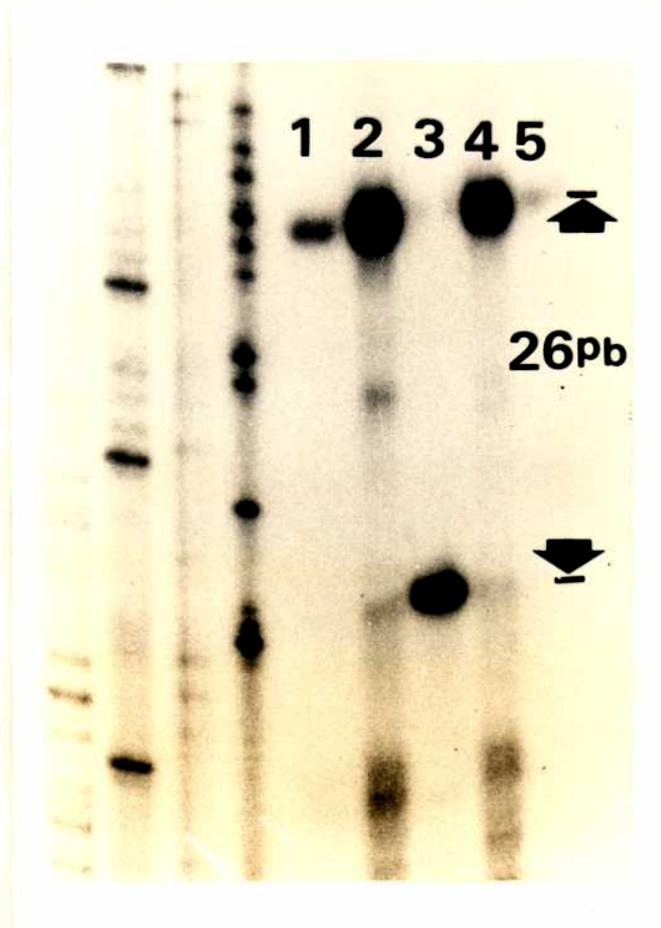


En este esquema se muestra la extensión de la sonda marcada con nucleótidos radioactivos (punteada) hacia el extremo 5' de iniciación de la transcripción.

El resultado que se obtuvo de este experimento, se observa en la figura 15. Esta sonda se "elonga" por 26 nucleótidos. Esto es 11 nucleótidos hacia 5' del ATG iniciador. En la figura 16 se indica con flechas la extensión que se alcanzó con la sonda.

Figura 15

"Primer extension": Se utilizaron dos cantidades iniciales de RNA total de células YHHH inducidas con IFN (200u/ml) por 24 hs.. En •1) y en •2) se elongó a partir de 1µgr de RNA. Se sembraron en •1) 100ngr. de la reacción y en •2) 900ngr de la misma reacción. En •4) y •5) se usaron 5µgr de RNA y se sembraron 4.5 µgr •4) y 500ngr •5). En ambos casos se usaron 150 cps de sonda. •3) Sonda sin RNA.



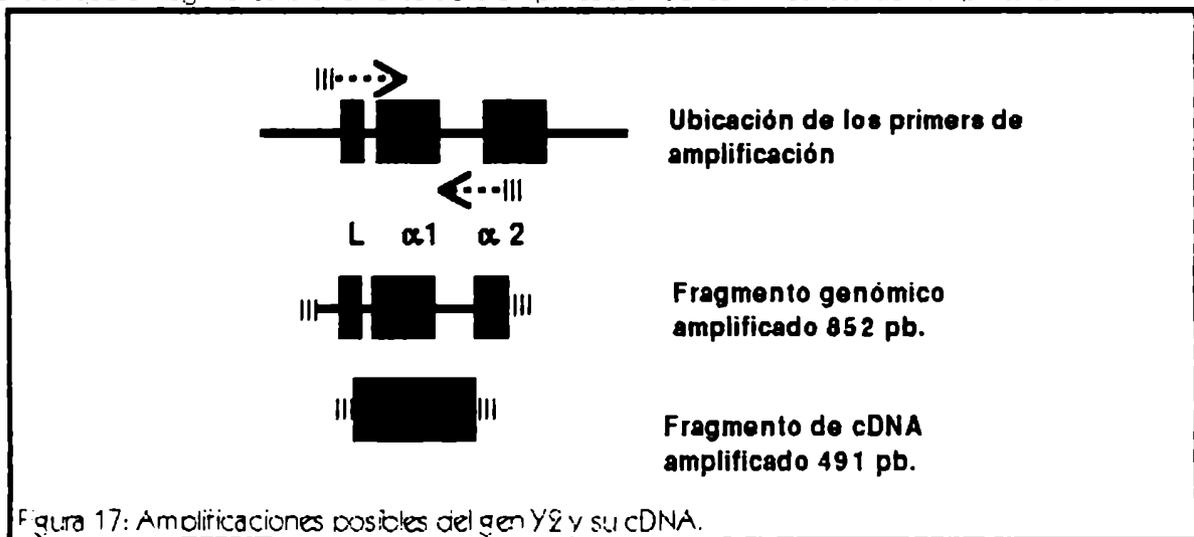
ANÁLISIS FUNCIONAL DEL GEN Y2 POR PCR.

Con esta técnica se buscó detectar la presencia de mRNA del gen Y2 de una manera mucho más sensible y confiable que por técnicas de protección frente a exonucleasas.

Para estudiar la presencia de mRNA de Y2 en cada caso se sintetizó cDNA, el cual fue amplificado con primers específicos que amplifican a todos los transcritos HLA clase I y similares. Dado que los primers se ubican hacia 5' de la delección del exón 4 en Y2, esperabamos una amplificación de su transcrito, si es que estaba presente. Los productos de amplificación se corrieron en geles, transfirieron a membranas e hibridizado con 2 sondas: una específica de Y2, y la otra general para los HLA clase I.

Para las amplificaciones se utilizaron siempre los oligos forward y reverse, descritos en la sección de materiales y métodos.

Los productos de amplificación que se obtienen con estos dos oligonucleótidos son de dos tamaños dependiendo del material de partida: DNA o cDNA, dado que puede amplificarse tanto el DNA genómico, como el cDNA proveniente de la transcripción reversa. Estos dos fragmentos se diferencian claramente: el genómico incluye 2 intrones y tiene una longitud de 852 pares de bases, mientras que el fragmento proveniente de la amplificación del cDNA consta de 491 pares de bases.



Para hibridar los southern provenientes de las amplificaciones se utilizaron dos sondas. Una sonda "de amplio reconocimiento" que es capaz de detectar a todos aquellos productos de genes HLA clase I, debido a que este oligonucleótido contiene una secuencia que está conservada en todas las secuencias de genes HLA clase I descritas. Este oligonucleótido denominado "Pan HLA clase I" se describe en materiales y métodos.

La segunda sonda, es un oligonucleótido específico para el gen Y2, denominado Y2A, diseñado de la siguiente manera:

Se buscaron todas las especificidades de HLA-clase I descritas para la línea celular YHHH (Burrone 1985), de tal manera que se pudieran diferenciar los fragmentos amplificados provenientes de cada uno de ellos, del proveniente de Y2.

Gen Y2	5' CTGCAAGGCCCAAGGCA 3'
HLA-A1	••G•AAGGCCCA••CA
HLA-A25	••G•AAGGCCCA••CA
HLA-B57	C•G•AAGGCC•••GCA
HLA-Bw58	C•G•AAGGCC•••GCA
HLA-B18	CT•CAAG•CC•A••CA
HLA-Cw2	•T•CAAG••CCAGGCA
• = nucleótido diferente	

Tabla 16: Especificidad del oligonucleótido Y2A.

Se ha probado la especificidad de los oligonucleótidos, Y2A, forward y reverse :

Se corrió un gel con los siguientes DNAs:

A) 3 plásmidos digeridos que contenían clones genómicos de 3 alelos HLA clase I diferentes:

- 1) Plásmido que contiene un clon genómico de HLA-Bw58.
- 2) Plásmido que contiene un cDNA del gen HLA-B7.
- 3) Plásmido que contiene un clon genómico del gen Y2.

B) Se amplificó al plásmido Y2 con los primers Forward y Reverse.

Con este gel se hizo un blotting que fue hibridizado con la sonda Y2A. El resultado, figura 18 muestra la discriminación que hace el oligonucleótido Y2A entre Bw58 e Y2, que difieren en 5 posiciones según se ve en la tabla 16.

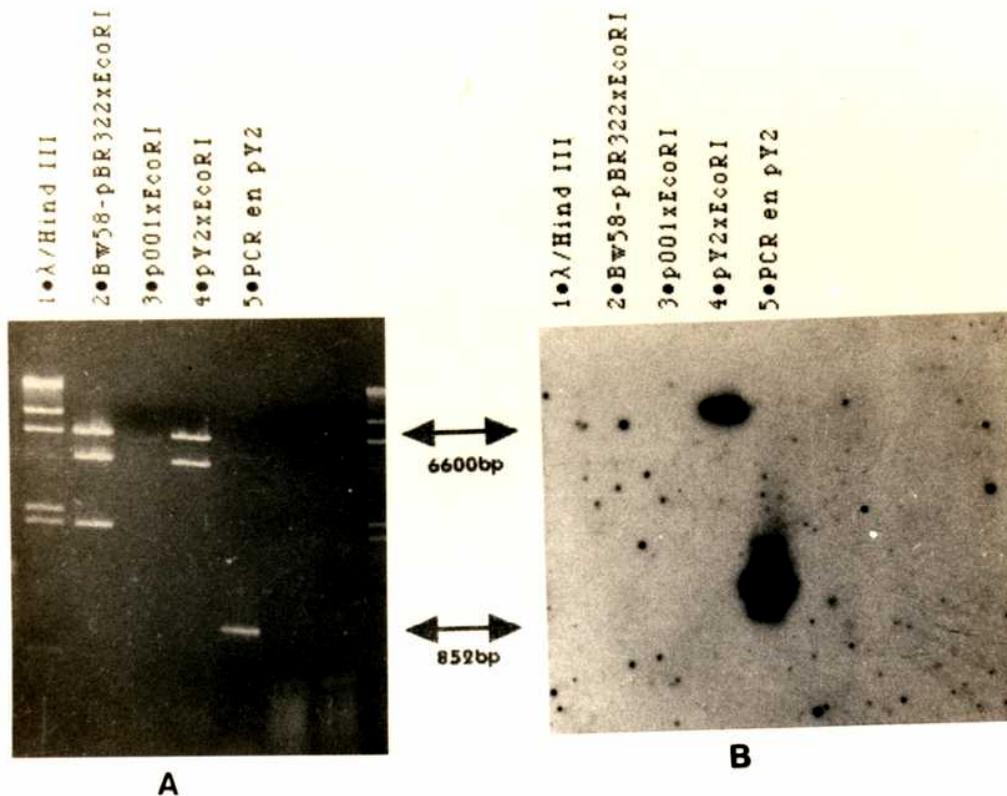


Figura 18. Especificidad del oligo Y2A. •1) λ /Hind III •2) Bw58 en pBR322 digerido por Eco RI •3) p001 •4) pY2 digerido por Eco RI. •5) pY2 amplificado con sus oligos específicos. Luego del transfer y la hibridización con el oligo Y2A marcado radiactivamente se revela hibridación con el fragmento correspondiente de pY2 digerido por Eco RI y con el fragmento amplificado.

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN Y2 EN YHHH Y MOLT 4

Una vez verificada la efectividad de los primers, se estudió la presencia del RNA del gen Y2 en el RNA total de células YHHH y Molt 4, cada una de ellas pretratadas y sin pretratar con Interferón.

Dado que la síntesis de mRNA de los HLA clase I se vé muy incrementada en YHHH frente al tratamiento con IFN (Burone 1982), se trató de buscar mRNA del gen Y2 en la mejor de las situaciones posibles, esto es, induciendo con Interferón α por 24 horas. También se buscó expresión de Y2 en MOLT 4 tratando de repetir la detección de mRNA del gen H en MOLT 4 descrita por Chomey y colaboradores (Chomey 1990).

Sobre RNA total de las siguientes poblaciones celulares se preparó cDNA:

YHHH inducidas por 24 horas con 200 unidades de Interferón α .

YHHH control sin inducir.

Molt 4 inducidas por 48 horas con 2000 unidades de Interferón α .

Molt 4 control sin inducir.

Como resultado de estas amplificaciones, se obtuvieron bandas de tamaño compatible con lo esperado por amplificación de mRNAs provenientes de genes HLA clase I.

Se incluyó una muestra de DNA genómico de YHHH digerido por Eco RI, como un elemento de control, se buscó amplificar la banda de aproximadamente 900 pares de bases, compatible con el tamaño esperado para genes HLA clase I.

Cantidades iguales de estos cDNAs y DNA genómico de YHHH digerido por Eco RI, fueron amplificadas por 40 ciclos (1.5'-94°C//1.5'-52°C//1.5'-72°C).

El producto de estas amplificaciones se corrió en un gel de agarosa junto al pY2 digerido por Eco RI y Bw56 digerido por Eco RI (como control de la especificidad de las sondas) y DNA genómico de YHHH digerido por Eco RI sin amplificar. Todas las muestras se corrieron por duplicado en el mismo gel.

Este gel fue transfendo a nitrocelulosa y cada membrana se hibridizó con las sondas Y2A (Figura 19) y Pan clase I (Figura 20).

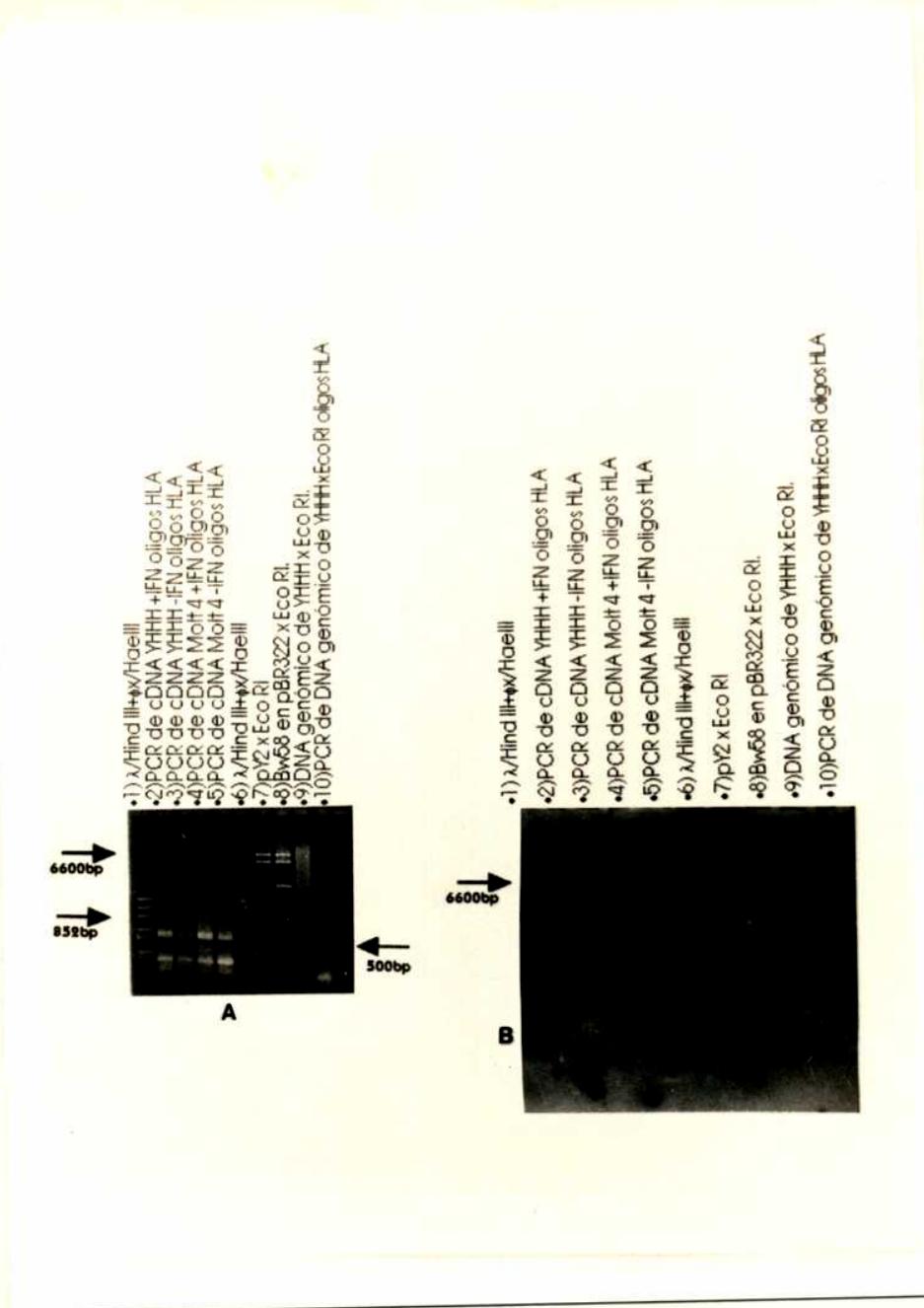


Figura 19.

Amplificación y Southern de cDNA y DNA **A**: •1) λ /Hind III+*fx*/HaeIII •2) Amplificación de cDNA de YHHH inducidas por IFN 24 hs(200u/ml)•3) Amplificación de cDNA de YHHH sin inducir. •4) Amplificación de cDNA de Molt 4 inducidas por IFN 24 hs(2000u/ml).•5) Amplificación de cDNA de Molt 4 sin inducir. •6) λ /Hind III+*fx*/HaeIII •7) pY2 digerido por Eco RI. •8) Bw58 en pBR322 digerido por Eco RI. •9) DNA genómico de YHHH digerido por Eco RI. •10) Amplificación del DNA genómico de YHHH digerido por Eco RI con oligos HLA específicos. **B** Hibridización del gel A con el oligo Y2A

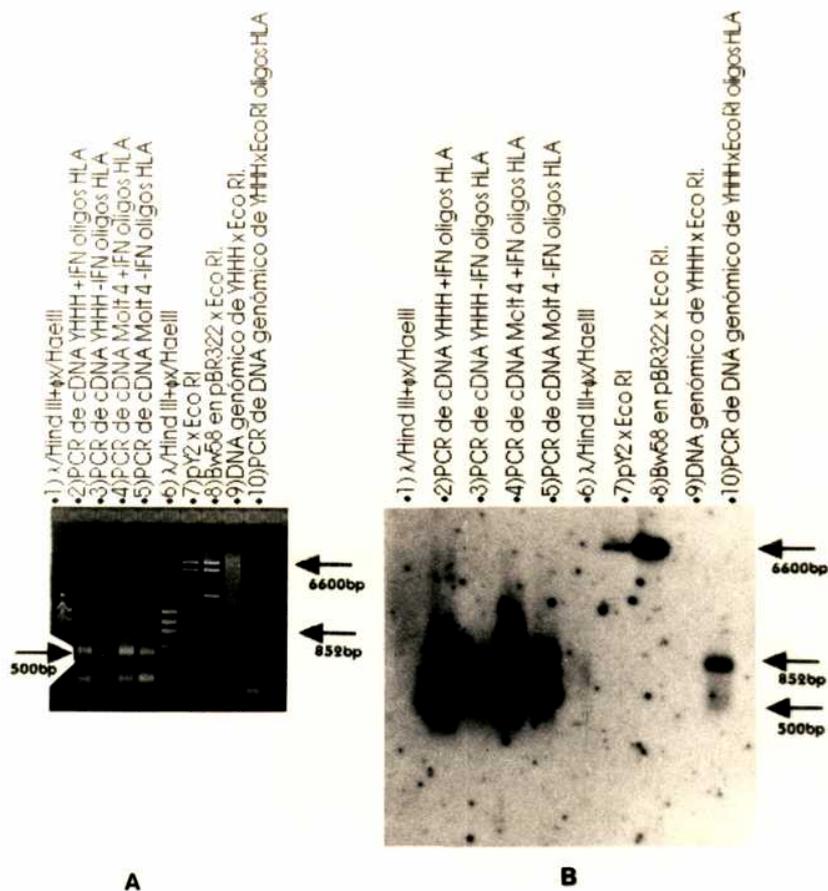


Figura 20.

Amplificación y Southern de cDNA y DNA. **A:** •1) λ /Hind III+ ϕ /HaeIII •2) Amplificación de cDNA de YHHH inducidas por IFN 24 hs(200u/ml)•3) Amplificación de cDNA de YHHH sin inducir. •4) Amplificación de cDNA de Molt 4 inducidas por IFN 24 hs(200u/ml).•5) Amplificación de cDNA de Molt 4 sin inducir. •6) λ /Hind III+ ϕ /HaeIII •7) pY2 digerido por Eco RI. •8) Bw58 en pBR322 digerido por Eco RI. •9) DNA genómico de YHHH digerido por Eco RI. •10) Amplificación del DNA genómico de YHHH digerido por Eco RI con oligos HLA específicos. **B** Hibridización del gel A con el oligo Pan HLA Clase I

Como resultado de la hibridización de esta membrana con la sonda Pan clase I, se revelan todas las bandas que contienen secuencias homólogas a los genes HLA clase I:

- Las bandas de 500 pb compatibles con productos de la amplificación de los mRNAs de genes HLA clase I que se encuentran en la célula. Se observa el incremento de mensajero debido al tratamiento con interferón.
- La banda de 852 pb compatible con todos los fragmentos HLA clase I genómicos que se obtienen por amplificación del DNA genómico de YHHH.
- La banda de 6600 pb proveniente de la digestión de los plásmidos que contienen a YHHH y a Bw58.

Cuando se hibridiza esta membrana con la sonda específica para Y2, se revela solamente la banda específica proveniente de la digestión de pY2. No fue posible detectar hibridización de esta sonda en ninguna otra calle de este experimento.

Los productos de amplificación que se obtuvieron, fueron reamplificados por otros 30 ciclos, transferidos a nitrocelulosa e hibridizados con el oligonucleótido Y2A. Tampoco en estas condiciones se consiguió detectar el producto de amplificación de la copia genómica de Y2.

Se ve que el grupo de transcritos que se está analizando, es sensible a la inducción por IFN, a pesar de lo cual, Y2 no se puede detectar.

Surge de estos resultados que el gen Y2 no es transcrito en las células MOLT 4 ni YHHH, ni es inducible su expresión por tratamiento con IFN.

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN Y2 EN TRANS:

Para determinar si el gen Y2 transfectado era capaz de ser transcrito en células distintas a las YHHH y Molt 4, se transfectaron células NIH3T3 con un plásmido que contiene al gen completo Y2 (pY2). Se buscó expresión del gen Y2 en los dos niveles posibles: proteína madura y mRNA.

A nivel de la membrana celular de las células transfectadas no fue posible encontrar señal por inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo monoclonal YTH.76, específico para HLA.

De las células transfectadas se preparó RNA total, que fue transferido a nitrocelulosa por dot blot e hibridizado con una sonda que comprende a la secuencia del gen Y2 desde -105 a +70. Como resultado de esta hibridización se obtuvo una señal muy débil luego de un largo tiempo de exposición del autoradiograma (Ferraro 1990).

A los efectos de confirmar este resultado, se han preparado distintos cDNAs a partir de RNAs provenientes de células expuestas a diferentes tratamientos y controles:

1) RNA de células NIH3T3 control transfectadas sin DNA (Control Mock).

2) RNA de células NIH3T3 transfectadas con el plásmido pY2 digerido por Xba I de tal modo que se separa parte de la secuencia regulatoria 5' (comprende 375pb hacia 5' desde -87 respecto del primer ATG).

3) RNA de células NIH3T3 transfectadas con el plásmido pY2.

4) RNA de células NIH3T3 transfectadas con el plásmido pY2 con el agregado de RNA de células YHHH inducidas por interferón .

Estos cDNAs junto al DNA de pY2 se fueron amplificadas por 40 ciclos (1.5'-94°C/1.5'-52°C/1.5'-72°C) utilizando los primers de amplificación específicos para HLA clase I forward y reverse descriptos más arriba. El resultado de estas reacciones se corrió en un gel de agarosa. Figuras 21 y 22.

Como producto de estas reacciones se obtuvieron las siguientes bandas:

- Banda de 852pb: Esta banda coincide con el producto de amplificación de pY2. Probablemente sea producto amplificado de los restos de plásmido con que fueron transfectadas las células NIH3T3.

- Banda de 500pb: Esta banda es compatible con la amplificación del producto maduro de transcripción de los genes HLA clase I con los oligos utilizados. En el gen Y2 se espera que este producto tenga 491pb. El mRNA agregado en la reacción de la línea 5, contiene productos de amplificación de transcritos HLA clase I según se probó en el experimento descrito en la figura 18.

- La banda de 6600 pb que corresponde a Bw58.

Este gel se corrió por duplicado y cada uno fue hibridizado con la sonda Y2A (Figura 21) y Pan clase I (Figura 22).

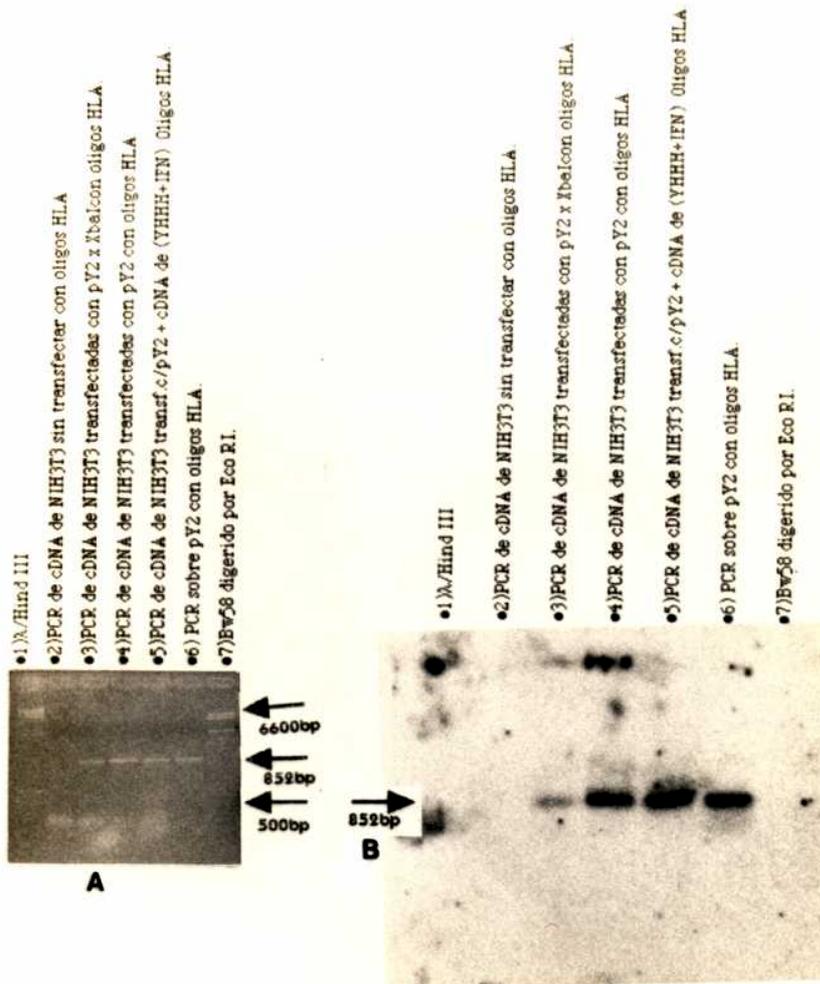


Figura 21.

Amplificación y Southern de cDNA y DNA: **A**: •1) λ /Hind III •2) PCR sobre cDNA de células NIH3T3 sin transfectar. •3) PCR sobre cDNA de células NIH3T3 transfectadas con pY2 digerido por XbaI. •4) PCR sobre cDNA de células NIH3T3 transfectadas con pY2 sin digerir. •5) PCR sobre cDNA de células NIH3T3 transfectadas con pY2 sin digerir con el agregado de cDNA de YHHH inducidas con interferón por 24 hs (200u/ml). •6) PCR sobre pY2 con oligos HLA Clase I específicos. •7) Bw58 digerido por Eco RI. **B**: Hibridización del gel **A** con la sonda Y2A

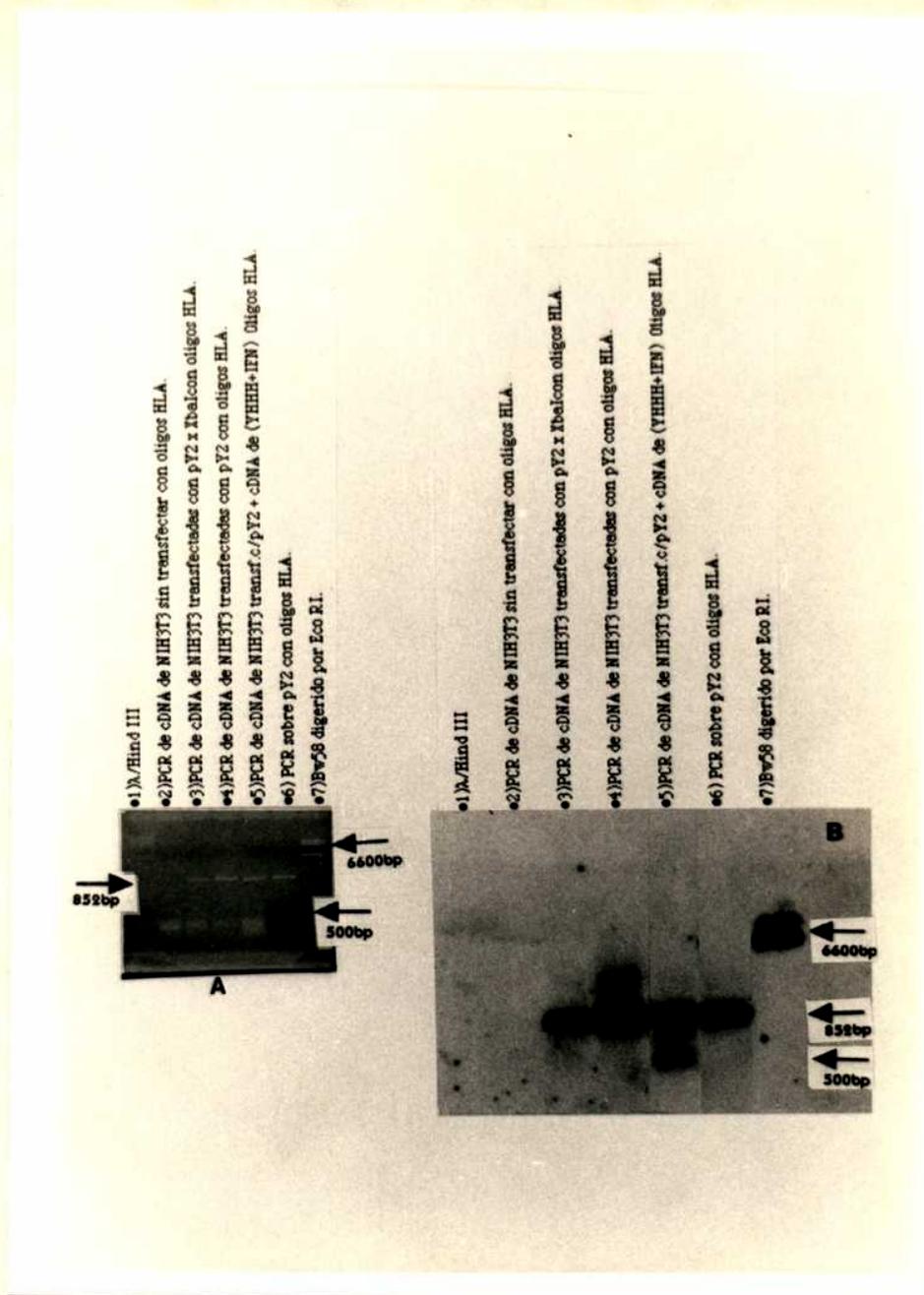


Figura 23.

Amplificación y Southern de cDNA y DNA: **A**: •1) λ /Hind III •2) PCR sobre cDNA de células NIH3T3 sin transfectar. •3) PCR sobre cDNA de células NIH3T3 transfectadas con pY2 digerido por XbaI. •4) PCR sobre cDNA de células NIH3T3 transfectadas con pY2 sin digerir. •5) PCR sobre cDNA de células NIH3T3 transfectadas con pY2 sin digerir con el agregado de cDNA de YHHH inducidas con interferón por 24 hs (200u/ml). •6) PCR sobre pY2 con oligos HLA Clase I específicos. •7) Bw58 digerido por Eco RI. **B**: Hibridización del gel **A** con la sonda Pan HLA Clase I.

La hibridización de la sonda Pan HLA clase I revela aquellas bandas que contienen productos HLA. La banda de 500 pb de la calle 5 es reconocida por esta sonda. Esta banda es compatible con la amplificación del producto maduro de transcripción de los genes HLA clase I con los oligos utilizados, presentes en el mRNA de las células YHHH inducidas con IFN.

La hibridización con la sonda Y2A, que detecta solamente al gen Y2, revela únicamente las bandas de 900pb, compatibles con amplificación de plásmido residual de la transfección. Esta sonda no alcanza a revelar a la banda de 500pb que se observa en la figura 21, probablemente porque esta banda no incluya a ningún producto del gen Y2.

Con esta metodología y en estas condiciones, no se pudo detectar ningún producto de transcripción del gen Y2 en las células NIH3T3, lo que contradice la experimento presentado por Ferraro.

Concluimos, con estos resultados, que que el Y2 no se transcribe en las células NIH3T3 cuando es transfectado.

**D
I
S
C
U
S
I
O
N**



SELECCION DEL GEN Y2

El objetivo de la presente tesis fué caracterizar un gen HLA clase I de los que se expresan en la línea celular YHHH. La característica distintiva de estos genes es que uno de ellos, el HLA B, incrementa notablemente su expresión en membrana luego de un tratamiento con IFN α .

Para ello se clonó en fago λ una genoteca genómica parcial del DNA de la células YHHH (Ferraro 1990).

De esta genoteca, se seleccionó un clon, llamado Y2. Fué reconocido por dos sondas que reconocen secuencias en sendos extremos de los genes HLA- clase I : p001 y p83ut.

Sobre estos dos clones se desarrolló un mapeo de restricción con hibridación posterior con sondas derivadas de genes HLA clase I específicas de los extremos 5' y 3'.

Sólo uno de estos clones, el Y2, reunió las características de un gen completo, al rendir los fragmentos esperados por digestión con las diferentes enzimas e hibridizar con las sondas de los dos extremos.

Se procedió a secuenciar a Y2. Se secuenciaron 4008 pb del clon Y2, que cubren completamente los exones e intrones y regiones flanqueantes. De éstas últimas, se secuenciaron 460 pares de bases hacia 5' del ATG iniciador y 260 pares de bases hacia 3' de la señal de poliadenilación AATAAA.

La estructura genómica que surge del análisis de la secuencia nucleotídica del gen Y2, es la característica de un gen HLA clase I:

- Tiene la secuencia responsable de la inducibilidad por interferón.
- La región promotora y regulatoria presenta los enhancers conocidos y las señales descriptas para una correcta iniciación de la transcripción: TATA y CAAT boxes.
- Presenta la estructura completa de exones descripta para estos genes.
- La extensión de los intrones es la esperada para cada uno de ellos según los consensos que derivan de las secuencias conocidas.
- Las señales de splicing están presentes en las posiciones correctas para permitir una correcta maduración del transcripto.
- Presenta la secuencia consenso necesaria para la poliadenilación en 3' (AATAAA) en la posición correcta.

Sin embargo el gen Y2 presenta una diferencia fundamental comparado con cualquier gen HLA clase I-A, B, o C típico: tiene una base menos que los clásicos genes HLA clase I.

Esta base de menos, está ubicada en el exón 4 que codifica para el dominio α 3. La consecuencia de esta delección de un nucleótido, es que si el gen Y2 fuera capaz de servir de templatado para la transcripción, se obtendría un transcripto del gen Y2 que saltaría de marco de lectura en ese punto y

encontraría un codón de terminación antes del final del exón 4. Este mRNA sería incompleto y fuera de fase comparado con un gen clásico a partir del punto de la delección. La traducción de este transcripto daría origen a un polipéptido de aproximadamente 34000 Daltons de PM, mientras que las proteínas clásicas tienen PM de alrededor de 45000. Este polipéptido, carecería de los elementos esenciales de los HLA clase I: el dominio de unión para la β -2microglobulina está modificado a partir de la delección, en la posición aminoacídica 226, y no posee los dominios transmembrana y citoplasmáticos, responsables del anclaje a la membrana celular. Podría ser una cadena secretada o quedar dentro de la célula.

De acuerdo a las secuencias nucleotídicas descritas para los genes HLA clase I, existen ciertas posiciones consenso dentro de cada locus que son diagnósticas de los distintos loci.

Se trató de caracterizar al gen Y2 utilizando las posiciones diagnósticas descritas para los genes HLA Clásicos, tanto a nivel de nucleótidos como de aminoácidos. Se evidenció en esta comparación, que estábamos en presencia de un gen HLA que no respondía a las secuencia consenso de ninguno de los locus descritos hasta ese momento.

Hacia el final del presente trabajo, se publicó la secuencia de un gen, llamado gen H, que coincidía con el gen Y2 en las diferencias con los HLA clase I clásicos descritos hasta ese momento (Chorney 1990). Unos meses más tarde se describió un nuevo locus, al que se denominó HLA-AR, en el que se incluyeron 6 clones, de los cuales se publica la secuencia, ninguno de los cuales era el descrito por Chorney y colaboradores.

Como resultado, se tiene un gen llamado gen H, y un locus nuevo, llamado HLA AR (Zemmour 1990). El nombre del locus HLA-AR fué cambiado a HLA-H por la comisión de nomenclatura del comité internacional de HLA (Bdmer 1991). Sin embargo, este comité desconocía la existencia del gen H, razón por la cual, el gen H descrito por Chorney y colaboradores, y el locus HLA H se denominan igual. Para evitar confusiones llamamos alelo H del locus HLA H o simplemente gen H al gen descrito por Chorney y colaboradores.

El gen H, es en realidad un miembro de este nuevo locus, al igual que el gen Y2. A este locus, pertenece el gen HLA-12.4 que fué el primer gen HLA clase I descrito a nivel de su secuencia nucleotídica (Malissen 1982).

COMPARACION CON OTROS ALELOS DEL LOCUS HLA-H

De todos los alelos del locus, se ha publicado la secuencia completa del gen H y del HLA 12.4. Se estableció una comparación base por base con el gen H.

De la comparación entre Y2 y el gen H se han detectado 20 diferencias. Cada una de estas diferencias fué especialmente verificada. La mayor parte se detectan en intrones, ubicados en secuencias que no tienen descrita ninguna función en particular. Observando detenidamente estas diferencias, se podría pensar que muchas de ellas se deben a errores de lectura en el autorradiograma. Por supuesto que

en el gen H y no en Y2, pues dado que primero se publicó la secuencia de H, se ha tenido la posibilidad de volver una y otra vez sobre cada diferencia hasta confirmar la secuencia de Y2.

Las diferencias encontradas en los intrones no implican ninguna diferencia en la proteína derivada de estos genes, ya que no mapean en las secuencias de splicing.

En cuanto a las diferencias que se encuentran en los exones, todas generan cambios de aminoácidos cuando el mRNA se traduce. Es interesante destacar el hecho de que desde la posición de la deleción hacia 3' sólo aparece una diferencia en nucleótidos que dá lugar a una variación de aminoácido en el marco de lectura clásico pero que no genera diferencias en el marco HLA-H. Cuando se comparan las secuencias de los exones de los alelos del locus HLA-H entre sí, surge la observación de que tienen muchos elementos similares. Existen ciertas posiciones de consenso entre todos ellos, que son diferentes de los consensos descritos para A, B y C. Esto es lo que da a estos alelos la uniformidad suficiente como para que su propio consenso (similitudes dentro del grupo) sea lo suficientemente importante como para diferenciarse de los consensos de otros locus HLA.

De esta manera, se define un patrón de nucleótidos específicos del locus HLA-AR. Este patrón se puede observar en la tabla 17. La característica que sobresale en todos los miembros de este locus, salvo el 12.4, es que todos carecen de un nucleótido en la posición 133 del exón IV, correspondiente al dominio $\alpha 3$. Hay varias posiciones que son específicas de este locus, ya que nunca aparece en esta posición este mismo nucleótido en ningún HLA clase I secuenciado :

Exón	Posición	Locus H
Exón I	7	C
Exón I	42	A
Exón II	30	A
Exón II	74	C
Exón II	89	T
Exón II	160	G
Exón II	221	C
Exón III	18	G
Exón III	71	A
Exón III	220	T
Exón IV	131 y 132	FALTA 1 (12.4=GG)
Exón IV	254	A(12.4=C)
Exón V	58	A
Exón V	81	T
Exón V	95	A
Exón V	115	A
Exón VII	3	G
Exón VII	38	G(LCL2=A)

Tabla 17. Patrón de nucleótidos específicos del locus HLA-AR.

ANÁLISIS DE LA SECUENCIA AMINOACÍDICA:

El gen Y2, presenta una secuencia aminoacídica que comparada con el consenso de los loci clásicos, coincide en la mayor parte de las posiciones (tabla 12) hasta que cambia de marco de lectura como producto de la delección de un nucleótido que corresponde a la posición aminoacídica 226 (o 227) del tercer dominio extracelular de la proteína madura.

Hay tres características significativa del locus HLA H:

- 1) Arginina en el aminoácido 1.
- 2) Fenilalanina por Cisteína en la posición 164.
- 3) Cambio de marco de lectura en la posición 226.

Sin embargo, hay otros elementos también importantes que permiten caracterizar a los miembros de este locus, y diferenciarlos de los clásicos HLA-clase I.

Estos elementos, fueron reunidos en la tabla 18:

se expresan en YHHH. Sin embargo, en el momento en que se hicieron estos experimentos, no se disponía de una mejor sonda.

También se vió que el gen Y2, o el transcripto protegido, responde a la inducción por interferón incrementando la cantidad de mRNA disponible para proteger a la sonda.

Recientemente se ha publicado (Chorney 1990) que con mRNA de la línea celular Molt 4, por protección frente a ribonucleasa H, se detecta transcripto del gen H.

En el experimento descrito en su publicación, se analizan los niveles constitutivos y basales de expresión de este gen. No se propone ni utiliza la capacidad de este gen de ser inducible por interferón. No se hace referencia a la secuencia interferón respondedora a pesar de tenerla presente y secuenciada. Como sonda se utiliza DNA del gen H que fuera clonado de la línea proveniente de una biblioteca genómica de placenta humana.

El transcripto detectado es bastante particular, en cuanto a que incluye una fracción de intrón. La protección que se describe para el gen H en la línea celular Molt 4, posiblemente se deba a una digestión incompleta del complejo entre esta sonda y los mRNAs de los HLAs clase I que se expresan en la célula.

Durante el presente trabajo no se ha podido detectar tal cosa.

Si en las células Molt 4 espontáneamente se transcribiera algún gen de este locus, probablemente se trate de Y2 más que de H, aunque cabría la posibilidad de que se expresen 2 alelos por genoma diploide, y que el segundo alelo fuera H. Este transcripto se podría detectar con la sonda Y2A ya que Y2 y H son homólogos en esa zona, a pesar de lo cual, no hemos podido detectar ninguna clase de transcripto por técnicas de PCR.

Se ha buscado el punto de iniciación de la transcripción del gen Y2 utilizando la misma sonda que para mapeo S1. Se observa una extensión de la sonda hacia 5', dando una señal de iniciación de la transcripción 11 nucleótidos hacia 5' del ATG que se encuentra ubicado hacia 5'. No caben dudas acerca de que se trata del primer ATG y no del segundo, porque la sonda comienza hacia 3' con una fracción de intrón, que es completamente digerida.

Se podría cuestionar este experimento, dado que no se detectan transcriptos de otros genes HLA clase I, en particular de aquellos mayoritarios de los que sí se tiene evidencia, aún serológica, de su expresión. Se podría atribuir el resultado de este experimento a la hibridación de esta sonda con algún transcripto HLA clase I de los mayoritarios en cuyo caso esta iniciación de la transcripción fuera evidencia de algún gen transcripto, muy similar a Y2 pero con una masa de mRNA mucho mayor que la de Y2.

Es notable, el hecho de que no se registran otras iniciaciones que pudieran corresponder a otros transcriptos HLA, que podrían haber hibridado con esta sonda.

Los resultados obtenidos por técnicas de mapeo S1 tendientes a estudiar la expresión del gen Y2,

fueron contrastados por estudios llevados a cabo por reacciones de amplificación con "Polymerase Chain Reaction" (PCR).

ANÁLISIS FUNCIONAL DEL GEN Y2 POR PCR

Se ha analizado la expresión del gen Y2 por la técnica de PCR. Se buscó con esto detectar niveles de expresión que fueran más sensibles que el mapeo S1.

Para ello, se han preparado en todos los casos cDNAs a partir de RNAs totales provenientes de células sometidas a distintos tratamientos:

En todos los casos se amplificó con primers específicos de HLA, y se hibridizó con 2 sondas:

- pan HLA clase I (oligo 481)
- sonda específica para Y2 (Y2A):

Los resultados de estos experimentos se resumen en la tabla 19A y 19B:

Se amplificaron e hibridizaron los siguientes cDNAs:	DETECCION CON	
	Y2	PAN HLA
YHHH inducidas por 24 horas con 200 unidades de Interferón α .	NO	SI
YHHH control sin inducir.	NO	SI
Molt 4 inducidas por 48 horas con 2000 unidades de Interferón α .	NO	SI
Molt 4 control sin inducir.	NO	SI

Tabla 19A: Expresión de Y2 en YHHH y Molt 4.

Se amplificaron e hibridizaron los siguientes cDNAs:	DETECCION CON	
	Y2	PAN HLA
Células 3T3 control mock de transfección.	NO	NO
Células 3T3 transfectadas con el plásmido pY2 cortado por Xba I de tal modo que se separa parte de la secuencia regulatoria 5' (Incluye secuencia IRE).	NO	NO
Células 3T3 transfectadas con el plásmido pY2.	NO	NO
Células 3T3 transfectadas con el plásmido pY2 con el agregado de RNA de células YHHH inducidas por interferón, como control de síntesis de cDNA	NO	SI

Tabla 19B: Expresión de Y2 en 3T3.

El resultado de estas experiencias, muestran que el gen Y2 no se expresa en sus células de origen, Molt 4 e YHHH, ni tampoco en células heterólogas como son las NIH-3T3.

No se ha podido detectar expresión del gen Y2 por PCR en las células YHHH ni Molt 4. Este resultado no coincide con los resultados obtenidos por mapeo S1, aunque lo más probable es que la detección hecha por S1 sea de productos distintos de HLA-H.

También llama la atención el hecho de que nuestro grupo no lo detecta ni en células YHHH sin inducir por interferón ni inducidas, mientras que Chorney lo puede detectar en células Molt4, aún sin tratamiento con interferón. Probablemente se trate de protección sobre transcritos de los HLAs clase I clásicos, que se estén expresando en la célula Molt 4, y que hayan sido incompletamente degradados por RNasa H. Posiblemente, tanto con la nucleasa S1 como con la RNasa H se trabaje con defecto en la concentración de enzima, aunque en la siguiente concentración se vea una degradación total de la sonda. Estos resultados, no serían más que artificios experimentales, producto de la falta de sensibilidad de la técnica, superada al utilizar PCR.

Estos resultados, coinciden con los resultados obtenidos en transfecciones del gen Y2 o quimeras utilizando fragmentos que contienen distintos componentes del gen Y2, donde sólo se detectan resultados negativos presentados en la tabla 15.

**C
O
N
C
L
U
S
I
O
N
E
S**



capacidad de expresarse en membrana por diferentes razones: las secuencias alu en HLA-E, y la pérdida de tejido especificidad en HLA-F. En el presente trabajo hemos demostrado que el promotor del HLA-H tiene un fuerte mecanismo de inhibición. O bien que sea no funcional a pesar de conservar todas las secuencias descritas como promotoras de la transcripción.

AM-

o stop

**B
I
B
L
I
O
G
R
A
F
I
A**

Allen, P.; (1987) Imm. Today **8** : 270.

Allison, J.; Lanier, R.(1987) Ann. Rev. Imm. **5** : 503.

Baldwin, A.S.; and Sharp, P.A.(1987) Mol. Cell. Biol. **7** : 305.

Baldwin, A.S.; and Sharp, P.A.(1988) Proc. Natnl. Acad. Sci. USA **85** : 723.

Barnstable, C.; Bodmer, W.; Brown, G.(1978) Cell **14** : 9.

Beck, S.; Barell, B.; (1988) Nature **331**: 269.

Bell, J.; Denny, D.; and McDevitt, H.(1985) Imm. Rev. **84**: 51.

Bjorkman, P.; Saper, M.; Samraoui, W.; et al(1987a) Nature **392** : 506.

Bjorkman, P.; Saper, M.; Samraoui, W.; et al(1987b) Nature **392** : 512.

Blonar, M.A.; Baldwin, A.S.; Flavell, R.A.; et al (1989)EMBO J. **8** :1139.

Bluestone, J.(1987) Imm.Res **6**: 67.

Bodmer, W.(1972) Nature **237** : 139.

Bodmer, J.; Marsh, S.; Albert, E.; et al(1991) Hum. Imm. **31**:186.

Burrone, O.; Kefford, R.; Giimore, D.; Milstein, C.(1985) EMBO J. **4**:2855.

Burrone, O.; Milstein, C.; (1982) EMBO J. **1** : 345.

Buus, S.; Sete, A.; Colon, S.; et a(1987) Science **235** :1353.

Calabi, F.; Milstein, C.(1986) Nature **323**: 540.

Chertkoff, L.; Herrera, M.; Fainboim, L.; Satz, M.(1991)Hum. Immunol.**31**: 153.

Chodosh, L.; Baldwin, A.; Cartew, R.; and Sharp, P. 1988) Cell **53** :11.

Chomey, M.; Ikuhisa, S.; Gilespe, G.; et al(1990) Mol Cell Biol.**10** :243.

Dausset, J.(1985) en : "HLA complex majeur d'histocompatibilite de l'omme". Eds. Daussetj. and Marka P.; Flamarion, Paris.

- David-Waltine , B.; Israël, A.; Kourilsky, P.(1990) Imm. Today **11**(8):286.
- Davis, M.; Bjorkman, P.(1988) Nature **334** : 395.
- Duceman, B.; Wang, A.(1988) Nucleic Acid Res. **16** :10391.
- Dunham, I.; Sargent, C.; Towsdale, R. et al(1987) Proc.Natnl.Acad.Sci.USA. **84**:7237.
- Efstratiadis et al, (1980) Cell **21** : 653.
- Fan, C., Manniatis, T.(1990) Genes Dev **4**:29.
- Ferraro, M.; Tesis Doctoral, (1990) UBA.
- Flavell, R.; Allen, H.; Burky, L. et al(1986) Science **233**:437.
- Friedmann, R.; Stark, G.; 1985) Nature **314** : 637.
- Gates III, F., Coligan, J., Kindt , T.(1981) Proc.Natnl.Acad.Sci.USA. **78**:554.
- Geraghty, D.; Koller, B.; and Orr, H.(1987) Proc.Natnl.Acad.Sci. USA. **84** :9145.
- Geraghty, D.; Wey, X.; Orr, H.; Koller, B.(1990) J. Exp. Med. **171** :1.
- Girdlestone, J.; Milstein, C.(1988) Eur. J. Immunol. **18** : 139.
- Hakem.R.; Le Boutellier, P.; Jezo Bremond, A.; et al(1990) 7th HLA/H-2 Workshop, Castle of Elmau, Bavaria, Germany.
- Hood, L.; Steinmetz, M.; Malissen, B.(1983). Ann.Rev. Immunol **1** : 529.
- Israël, A.; Le Bail, O.; Hatat, D.; et al(1989) EMBO J. **8** : 3793..
- Israël, A.; Yano, O.; Logeat, F.; et al(1989) Nucleic Ac. Res. **17**: 5245.
- Israël, A.; Kimura, A; Fournier, A.; et al(1986) Nature. **322** :743.
- Israël, A.; Kimura, A; Kieran, A. et al(1987) Proc.Natnl.Acad.Sci.USA. **84** :2653.
- Jordan, B.; Calillol, D.; Damote, M.; et al(1985) Immunol. Rev. **84**: 73.
- Juji, T.; Satake, M.; Honda, Y.; Doi, Y.(1984)Tissue Antigens **24**: 316.

- Katoh, S.; Ozawa, K.; Kondoh, S.I.; *et al* (1990) EMBO J. **9** : 127.
- Koller, B.; Geraghty, D.; Shimizu, Y.; *et al* (1988) J. of Immunol. **141**(3), 897.
- Koller, B.; Geraghty, D.; De mars, R. *et al* (1989) J. Exp. Med. **169**, 469.
- Koller, B.; Sidwell, B.; De mars, R. *et al* (1984) Proc. Natnl. Acad. Sci. USA **81** : 5175.
- Korber, B.; Hood, L.; Stroynowsky, I. (1987) Proc. Natnl. Acad. Sci. USA **84** : 3380.
- Kourilsky, P.; and Claverie, J. (1989) Adv. Immunol. **45**: 107.
- Lawlor, D.; Zemmour, J.; Ennis, P. *et al* (1990) Ann. Rev. Immunol. **8** : 23.
- Lawlor, D.; Ward, F.; Ennis, P. *et al* (1988) Nature **335** : 268.
- Lawlor, D.; Zemmour, J.; Ennis, P. *et al* (1990) Annu. Rev. Immunol. **8** : 23.
- Malissen, M.; Malissen, B.; Jordan B. (1982) Proc. Natnl. Acad. Sci. USA. **79** : 893.
- Martin, L.; Calabi, F.; Milstein, C. (1986) Proc. Natnl. Acad. Sci. USA. **83** : 9154.
- Meuer, S.; Acuto, O.; Hercend, T. *et al* (1984) Ann. Rev. Immunol. **2** : 23.
- Minowada, J.; Ohnuma, T.; Moore, G.; (1972) J. Natl. Cancer Inst. **49**: 891.
- Norment, A.; Salter, R.; Parham, P.; *et al* (1988) Nature **336** : 79.
- Oksenberg, J.; Amar, A.; Cohen, N.; Brautbar, C. (1983) Tissue Antigens **21** : 271.
- Orr, H.; Lancet, D.; Lopez de Castro, J.; *et al* (1979) Nature, **282**: 266.
- Parham, P.; Lomen, C.; Lawlor, D. *et al* (1988) Proc. Natnl. Acad. Sci. USA **85**: 4005.
- Parham, P., Zemmour, J. *et al* (1988) J. of Immunol. **14**: 3937
- Parnes, J. (1989) Adv. Immunol **44** : 265.
- Pease, L. in: "Evolution and Vertebrate Immunity (1987) Univ. of Texas Press. Eds. Kelsoe and Schultze.
- Reith, W.; Satola, S.; Herrero Sanchez, C. *et al* (1988) Cell **53**: 897.

- Schwartz, R.(1985) Ann. Rev Immunol. **3** :237.
- Shimizu, Y, ; Geraghty, B.; Koller, B. *et al* (1988) Proc. Natnl. Acad. Sci. USA **85**: 227.
- Singh, H., Le Bowitz, J., Baldwin, A.(1988) Cell **52**:415.
- Srivastava, R.; Duceaman, P.; Biro, A.; (1985) Immunol. Rev. **84** : 93.
- Sood, A.; Pereyra, D.; Weissman, S.(1981)Proc. Natnl. Acad. Sci. USA **78** : 616.
- Steinmetz, M and Hood, L.(1983) Science **222**: 727.
- Terasaki, P.(Ed.)^a HLA and Disease Associations^a. Springer Verlag, New York, 1985.
- Townsend, A.; Bodmer, H.(1989) Ann. Rev. Immunol. **7** : 601.
- Townsend, A.; Rothbard, J.; Gotch, F.; *et al*(1986) Cell **44**: 959.
- Toyonaga, B.; Marc, T.; (1987) Ann. Rev. Immunol. **5** : 585.
- Trowsdale, J. Young, J.; Kelly, A.; (1985) Immunol. Rev. **85** :5.
- Trowsdale, J. and Campbell D.(1988) Immunol. Today **9**(2) 34.
- Wais, J.; Coppin, H.; Parham, P.; (1985) J. Biol. Chem. **260** : 11924.
- Watts, S.; Davis , A.C.; Gaut, B.; *et al*(1989) EMBO J. **8**: 1749.
- Wilner, A.; Steinman , L.; Lavie, P.; *et al*(1988) Hum. Immunol. **21**(1) :15.
- Zakow , K, Orr, H.(1989) J. of Immunol. **143**: 3385.
- Zemmour, J.; Parham, P.; (1991) Hum. Immunol. **31**: 195.
- Zemmour, J.; Koller, B.; Ennis, P.; *et al*(1990) J. of Immunol. **144**: 3619.
- Zinkemagel, R.; Doherty, J.; (1974) Nature **248** : 701.