

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



**ANÁLISIS GENÉTICO Y BIOQUÍMICO DE LA
MOLÉCULA MR1 (MHC RELATED 1)**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Juan Francisco Parra Cuadrado

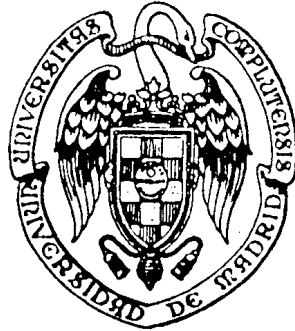
Bajo la dirección del Doctor:

Eduardo Martínez Naves

Madrid, 2003

ISBN: 84-669-2130-3

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



**ANÁLISIS GENÉTICO Y BIOQUÍMICO
DE LA MOLÉCULA
MR1 (MHC RELATED 1)**

TESIS DOCTORAL

JUAN FRANCISCO PARRA CUADRADO

Madrid, 2002

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA

ANÁLISIS GENÉTICO Y BIOQUÍMICO
DE LA MOLÉCULA MR1
(MHC RELATED 1)

JUAN FRANCISCO PARRA CUADRADO

TESIS DOCTORAL

MADRID 2002

Tesis Doctoral

ANÁLISIS GENÉTICO Y BIOQUÍMICO DE LA MOLÉCULA MR1 (MHC RELATED 1)

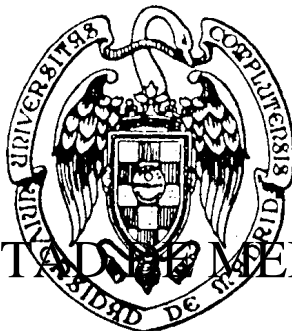
AUTOR: JUAN FRANCISCO PARRA CUADRADO

DIRECTOR: Dr. EDUARDO MARTÍNEZ NAVES

LUGAR DE REALIZACIÓN: Área de Inmunología
Facultad de Medicina
Universidad Complutense de Madrid
MADRID

Firma del interesado

VºBº Director de la tesis



FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
2002



*En memoria de
Don Graciliano Cuadrado Henández*

Me gustaría dejar manifiesto de mi más sincero y profundo agradecimiento a todas aquellas personas que en algún momento de su vida me apoyaron o se interesaron por el trabajo que he estado realizando durante estos años.

Mi especial agradecimiento a mi director de tesis: Dr. Eduardo Martínez Naves. Este no es un agradecimiento meramente formal, a Eduardo debo el hecho de que me admitiese en su grupo de investigación cuando todavía no había concluido mis estudios universitarios. También es justo agradecerle la confianza depositada en mi desde un primer momento así como sus consejos y sugerencias.

No quiero olvidarme del Profesor J. Alejandro Madrigal y del Dr Paul J. Travers que me acogieron durante una breve estancia en su laboratorio con gran amabilidad y detalle. Por extensión quisiera agradecer el cuidado que me prestó todo el staff del ANRI.

Esta página estaría huérfana si no expresara mi agradecimiento a todo el personal (docente, secretariado, limpieza e investigación) del área de Inmunología (Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid) con el cual tuve o tengo contacto.

El apoyo de mis amigos de facultad y laboratorio ha resultado esencial para que pueda estar escribiendo estas líneas.

Por último agradecer desde lo más profundo de mi corazón la infinidad de cosas que a lo largo de mi vida me aportan diariamente mi padre, mi madre y mi hermana. El mayor agradecimiento que les podría ofrecer sería dejarles una página en blanco porque no existen palabras en este mundo para expresar mi agradecimiento y cariño.

Índice

RESUMEN

<i>Resumen</i>	2
----------------	---

INTRODUCCIÓN

<i>1 El Complejo Principal de Histocompatibilidad</i>	4
<i>2 Las moléculas MHC de Clase I</i>	6
<i>3 Las moléculas MHC de Clase I no clásicas</i>	8
3.1 Moléculas HLA de clase Ib: HLA-E, HLA-F y HLA-G	9
3.2 Moléculas HLA de clase Ic: HFE y MIC	12
3.3 Moléculas HLA de clase Id: CD1, FcRn, ZAG, EPCR y ULBP	15
<i>4 MR1 (MHC Related 1 gene)</i>	23
Tabla resumen de las principales características de los componentes de la familia MHC-I	28

OBJETIVOS

<i>Objetivos</i>	30
------------------	----

MATERIAL Y MÉTODOS

<i>1 Análisis del polimorfismo del gen MR1 en humanos</i>	32
<i>2 Amplificación y secuenciación del cDNA de MR1</i>	34
<i>3 Identificación de una nueva secuencia relacionada con MR1 en humanos</i>	36
<i>4 Identificación de nuevas secuencias relacionadas con MR1 en primates superiores</i>	39
<i>5 Caracterización de la proteína MR1 en humanos</i>	41
<i>6 Análisis bioinformático de los datos</i>	48

RESULTADOS

<i>1 Análisis del polimorfismo del gen MR1 en humanos</i>	50
<i>2 Identificación de una nueva secuencia relacionada con MR1</i>	55
<i>3 Identificación de nuevas secuencias relacionadas con MR1 en primates superiores</i>	61
3.1 Amplificación del cDNA de MR1 en orangután	62
3.2 Amplificación del cDNA de MR1 en chimpancé común	65
3.3 Alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas de MR1	69
3.4 Caracterización de MR1P1 en primates superiores	74

4	<i>Caracterización de la proteína MR1 en humanos</i>	79
4.1	Expresión de la región extracelular de MR1 en un sistema procariota	79
4.2	Sueros para detectar MR1	80
4.3	Transfección de la línea LCL 721.221 con MR1	81
4.4	Análisis de la línea MR1.221	82
4.5	Análisis de la línea MR1(β_2m^{bright}).221	83
4.5.1	Ensayos de citometría de flujo con MR1(β_2m^{bright}).221	84
4.5.2	Inmunoprecipitación con marcaje metabólico	86
4.5.3	Ensayos de western-blot con MR1(β_2m^{bright}).221	88
4.5.4	Ensayos de inmunoprecipitación con MR1(β_2m^{bright}).221	89
DISCUSIÓN		
1	<i>Análisis del polimorfismo del gen MR1 en humanos</i>	92
2	<i>Identificación de una nueva secuencia relacionada con MR1</i>	94
3	<i>Identificación de nuevas secuencias relacionadas con MR1 en primates superiores</i>	97
4	<i>Alineamiento múltiple de las secuencias proteicas de MR1 de humano, chimpancé común, orangután, rata y ratón</i>	99
5	<i>Caracterización de la proteína MR1 en humanos</i>	102
CONCLUSIONES		
	<i>Conclusiones</i>	109
ANEXOS		
	<i>Anexo 1. Nuevas secuencias descritas en esta tesis</i>	112
	<i>Anexo 2. Secuencias nucleotídicas de MR1</i>	113
PUBLICACIONES		
	<i>Publicaciones</i>	115
BIBLIOGRAFÍA		
	<i>Bibliografía</i>	117

**A mis padres
y hermana**

Resumen

RESUMEN

El conjunto de todos los datos aportados y discutidos en esta tesis nos permiten decir de MR1 y de su posible función lo siguiente. MR1 es un gen no polimórfico en humanos, al menos en la región codificada por los exones 2 y 3 (dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$). MR1 había sido descrito en humano, rata y ratón, ahora también ha sido descrito en chimpancé común y orangután. En todas las especies en que se ha descrito, MR1 se expresa generando por *splicing* alternativo isoformas transcripcionales, cuya finalidad biológica se desconoce. Algunas de estas isoformas transcripcionales, como las aquí descritas, carecen del dominio $\alpha 3$ o simplemente son un péptido de 83 aminoácidos formado por el péptido líder y parte del dominio $\alpha 1$. En el genoma del hombre y del chimpancé común se ha detectado una secuencia (MR1P1) con alta homología al gen MR1 cuya función no se conoce. MR1P1 es un fragmento génico homólogo a la región comprendida entre el intrón 2 y el intrón 3 del gen MR1, por tanto contiene secuencias homólogas a los exones codificantes para los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de MR1.

El alineamiento de las proteínas de MR1 descritas hasta la fecha indican que MR1 se encuentra muy conservada evolutivamente, particularmente en los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$, parece ser que pudiera asociarse a β_2m (en ratón ya ha sido demostrada dicha asociación) pero que no parece claro que interaccionase con CD8 ni uniera péptido similares a los presentados por las moléculas MHC de clase I clásicas. Las moléculas de MR1 de roedores y primates presentan ciertas diferencias en las secuencias de la región homóloga al sitio de unión al péptido y en la región citoplasmática que podrían implicar diferencias entre ambos grupos de especies en lo que se refiere al ligando unido y a la transmisión de la señal al interior celular.

La generación de sueros frente a la región extracelular de la molécula MR1 y de líneas celulares transfectadas con el cDNA de MR1 ha permitido detectar por primera vez la molécula MR1 humana. La molécula MR1

humana tiene un tamaño de 42 KDa, está glicosilada y tiene una baja expresión basal al menos en la línea de estudio.

Introducción

1 EL COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD

El Complejo Principal de Histocompatibilidad (*Major Histocompatibility Complex*, MHC) se descubrió como una región multi-loci extendida constituida por genes altamente polimórficos, que determinaban el resultado de los trasplantes tisulares entre individuos. En la década de 1940 George Snell y colaboradores estudiaron el rechazo de tumores y otros tejidos transplantados entre cepas de ratones genéticamente idénticas (singénicas) y no genéticamente idénticas (alogénicas). Así demostraron que los trasplantes (injertos de piel) entre animales singénicos eran aceptados, mientras que entre animales alogénicos eran rechazados. Por consiguiente, un rasgo hereditario, unos genes eran los responsables de la aceptación o del rechazo de un tejido transplantado y por ello se denominaron genes de histocompatibilidad. Posteriormente el análisis del rechazo de injertos de piel entre cepas de ratones congénicos (ratones con todos los loci idénticos excepto el de estudio) determinó la región cromosómica responsable de la compatibilidad entre injertos y se la denominó locus principal de histocompatibilidad. Luego se demostró que esta región no contenía un locus sino varios estrechamente ligados y por eso se renombró como Complejo Principal de Histocompatibilidad. El Complejo Principal de Histocompatibilidad humano es conocido con las siglas HLA (*Human Leukocyte Antigens*).

Aparte de estos genes hay otros que contribuyen en menor medida al rechazo de injertos y reciben el nombre de genes del sistema menor de histocompatibilidad.

Existen dos tipos diferentes de productos de los genes del MHC: las moléculas de clase I y las moléculas de clase II (*Figura I1*).

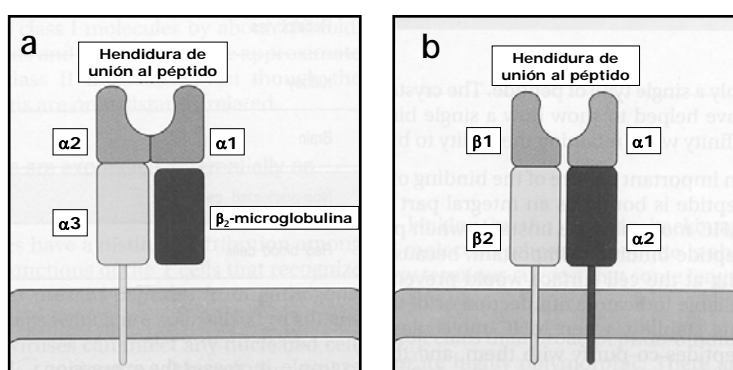


Figura I1. Estructura de las moléculas MHC de clase I (a) y clase II (b).

Características generales de los genes del complejo principal de histocompatibilidad:

- 1.- Los genes del MHC están en desequilibrio de ligamiento, es decir alelos de diferentes genes se hallan en el mismo cromosoma con una frecuencia superior a la esperada en una combinación al azar.
- 2.- Los genes del MHC son muy polimórficos, existen varios alelos para cada gen con una presencia importante en la población.
- 3.- Los genes del MHC se expresan de manera codominante en cada individuo.
- 4.- Los genes de clase I se expresan en todas las células nucleadas con diferente intensidad, mientras que los de clase II se expresan únicamente en células presentadoras profesionales (APC: células dendríticas, macrófagos, linfocitos B). Su expresión se potencia por estímulos inflamatorios e inmunitarios, sobre todo IFN- γ .

Características bioquímicas y estructurales de las moléculas MHC:

- 1.- Los genes de clase I y clase II del MHC codifican dos grupos de proteínas estructuralmente diferentes pero homólogas y análogas. Las moléculas de clase I son dímeros $\alpha\beta_2$ -microglobulina, las moléculas de clase II son dímeros $\alpha\beta$, y ambas unen de forma no covalente un péptido antigénico (*Figura 11*).
- 2.- Cada molécula del MHC consta de una hendidura o surco extracelular de unión al péptido seguida de un par de dominios de tipo inmunoglobulina, y está anclada a la célula mediante dominios transmembranales y citoplasmáticos (*Figura 11*).
- 3.- Los residuos polimórficos de las moléculas del MHC están localizados en la hendidura de unión al péptido y adyacentes a ella.
- 4.- Los dominios de tipo inmunoglobulina no polimórficos de las moléculas del MHC contienen sitios de unión a las moléculas correceptoras CD4 y CD8 de los linfocitos T.

Función de las moléculas del MHC:

Las moléculas del MHC son elementos básicos del sistema inmune.

Presentación antigénica. Las moléculas de clase I presentan péptidos antigénicos -de origen citoplasmático, de 8 a 11 residuos y generados por el proteasoma- a linfocitos T CD8⁺. Las moléculas de clase II presentan péptidos antigénicos -de origen extracelular, de 10 a 24 residuos y adquiridos por endocitosis- a linfocitos T CD4⁺ (Figura I2).

Inhibición de células NK. Las moléculas de clase I también actúan como ligandos para receptores inhibidores de la actividad citotóxica de las células

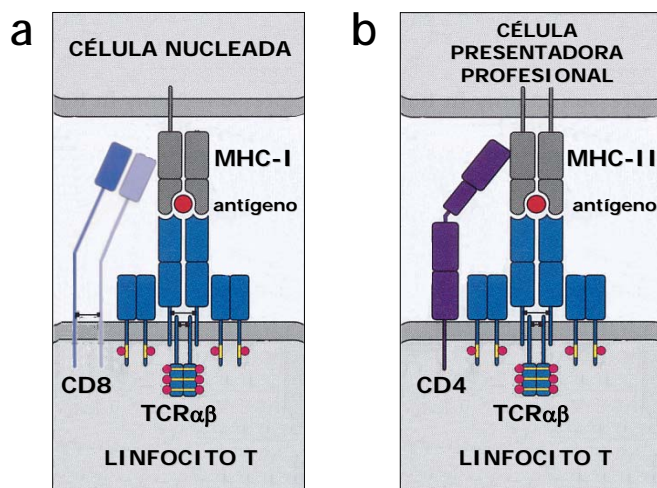


Figura I2. Representación esquemática de la función de presentación antigénica por moléculas MHC de clase I (a) y clase II (b).

NK.

2 LAS MOLÉCULAS MHC DE CLASE I

Las primeras moléculas MHC definidas por técnicas serológicas fueron las moléculas MHC de clase I humanas: HLA-A, HLA-B y HLA-C.

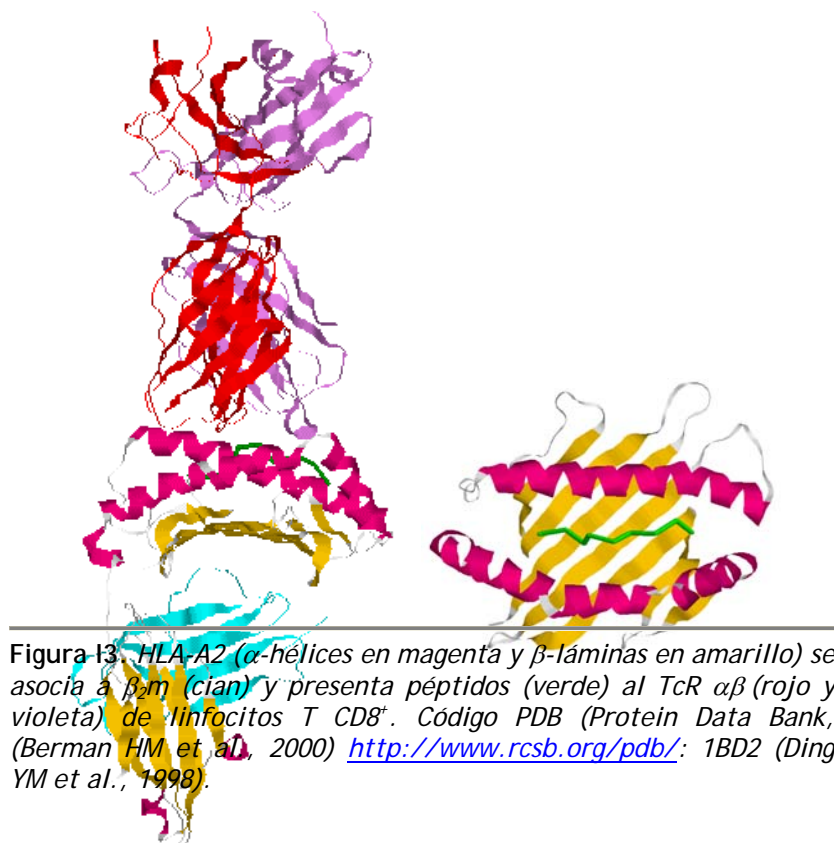
Las moléculas MHC de clase I son heterodímeros constituidos por dos cadenas polipeptídicas asociadas sin enlaces covalentes: una cadena α o cadena pesada de 44 a 47 KDa codificada por el MHC y una subunidad de 12

KDa no codificada dentro del MHC denominada β_2 -microglobulina (*Figura I3*).

La cadena α es una glicoproteína de tipo I constituida por tres dominios extracelulares (dominios α_1 , α_2 y α_3), una región transmembranal y otra citoplasmática (Bjorkman PJ y Parham P, 1990).

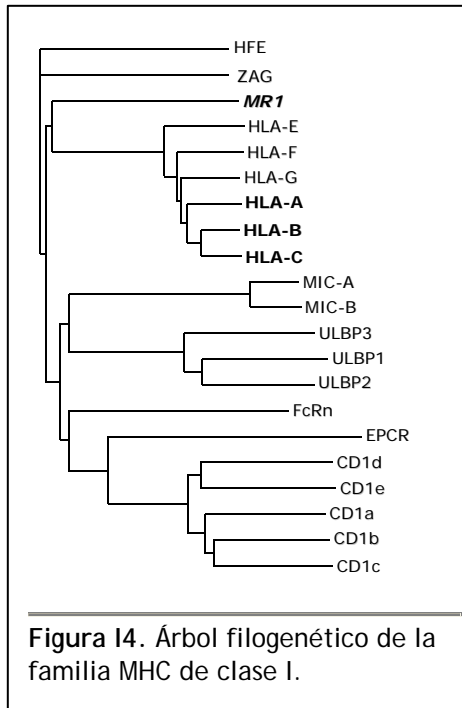
Los dominios α_1 y α_2 forman la región de unión al péptido consistente en una plataforma de ocho láminas β antiparalelas en la que se apoyan dos α -hélices paralelas (*Figura I3*). Esta estructura une péptidos de 8 a 11 aminoácidos en una conformación flexible y extendida. Péptidos de mayor tamaño no pueden alojarse debido a que los extremos de la hendidura se cierran (*Figura I3*). Estos antígenos proceden de proteínas de origen citoplasmático que han sido degradadas por un complejo proteolítico conocido como proteasoma.

Las moléculas de clase I se expresan de manera constitutiva en todas las células nucleadas. Esta expresión se aumenta por la acción de ciertas citoquinas producidas durante la respuesta inmune antiviral, sobre todo con los interferones (IFN- α , IFN- β e IFN- γ). Los interferones activan factores de transcripción que se unen a secuencias reguladoras de los promotores de los genes MHC. Por tanto incrementan la tasa de transcripción y en definitiva la expresión de los genes del MHC.



3 LAS MOLÉCULAS MHC DE CLASE I NO CLÁSICAS

En los últimos años se han descubierto genes relacionados con los genes HLA de clase I a los que se ha denominado en conjunto genes HLA de clase I "no clásicos" (Figura I4). Hasta el momento se han descrito 9 familias



"no clásicos" que contabilizan un total de 18 genes funcionales. En todas las familias, excepto en MR1, es conocida la función y la estructura tridimensional de al menos un componente de la familia. Aunque existen diferencias en la secuencia aminoacídica, las moléculas HLA de clase I no clásicas presentan una estructura tridimensional similar a las clásicas, en particular en los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$. Sorprendentemente, estas moléculas tan parecidas en la forma

desempeñan diversas funciones, no siempre relacionadas con el sistema inmune.

Recientemente se ha propuesto otra clasificación de esta familia multigénica (Hughes, AL et al. 1999). Según la cual los genes HLA de clase I "clásicos" (HLA-A, -B y -C) se agruparían como HLA de clase Ia. Los genes HLA de clase I "no clásicos" se dividirían en tres subfamilias: los que están dentro de la región cromosómica MHC y que muestran alta similitud con los clásicos (HLA-E, -F y -G) se agruparían como HLA de clase Ib; los que están dentro de la región cromosómica MHC y que muestran baja similitud con los clásicos (HFE y MIC) como HLA de clase Ic; y los situados fuera de la región

cromosómica MHC y en general de baja similitud con los clásicos (CD1, EPCR, FcRN, MR1, ULBP y ZAG) como HLA de clase Id.

3.1 Moléculas HLA de clase Ib: HLA-E, HLA-F y HLA-G

HLA-E, -F y -G fueron los primeros genes del tipo “clase I no clásicos” identificados. Son genes poco polimórficos, de expresión restringida -salvo HLA E- y cuyos productos proteicos se asocian a β_2 -microglobulina (β_2m). Estas moléculas no clásicas son las que tienen mayor semejanza a las de clase Ia (75%-80% de similitud aminoacídica) (Tabla I3).

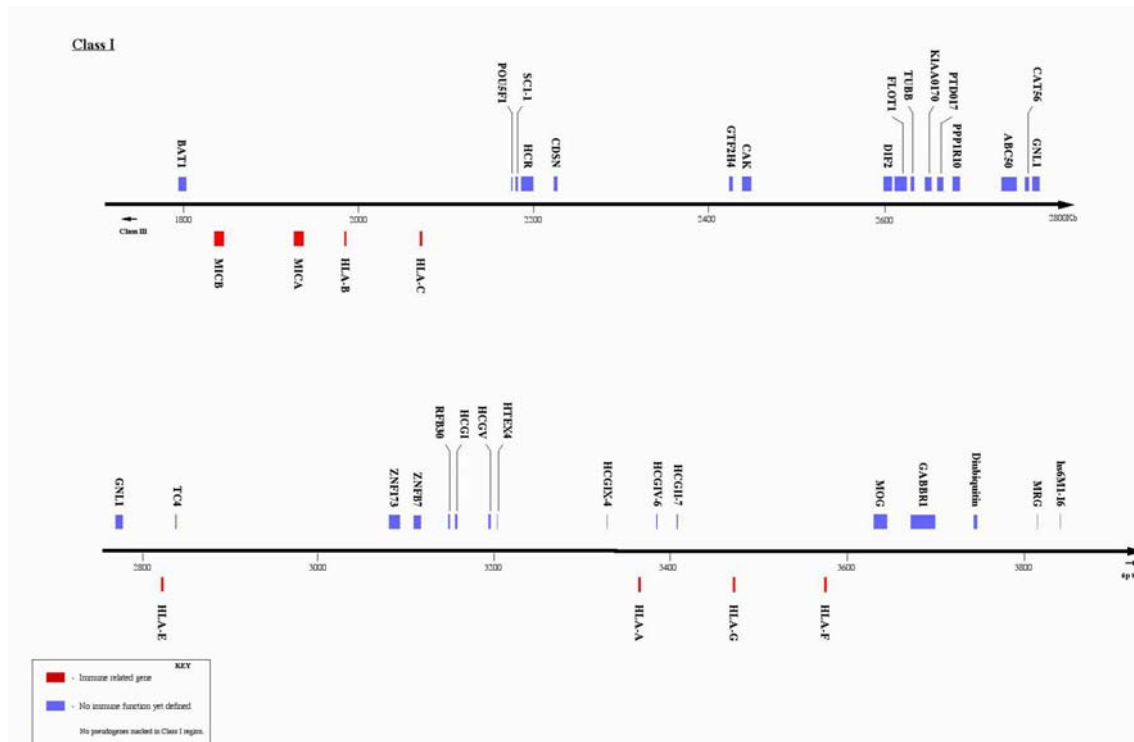


Figura I5. Mapa genético de la región de clase I del HLA.

HLA-E

HLA-E es una molécula poco polimórfica, ubicua, asociada a β_2m y con un bajo nivel de expresión en la superficie celular (Koller BH et al., 1988; Ulbrecht M et al., 1992). Al igual que su homólogo en ratón (Qa1), HLA-E es una molécula especializada en unir péptidos líder procedentes de moléculas

MHC clásicas mediante un mecanismo dependiente del transportador TAP (*Transporter associated with Antigen Processing*), pero es incapaz de unir su propio péptido líder (Aldrich CJ et al., 1994; Braud VM et al., 1998¹).

La estructura tridimensional de la molécula HLA-E (O'Callaghan CA et al., 1998) es casi idéntica a la de una molécula de clase Ia (*Figura I6*), conservando los sitios de interacción con β_2m y CD8. La región de unión al péptido tiene una naturaleza hidrofóbica en consonancia con su capacidad de unir un tipo de péptidos hidrofóbicos como son los péptidos líder.



Figura I6. HLA-E (α -hélices en magenta y β -láminas en amarillo) se asocia a β_2m (cian) y un péptido (verde). Código PDB: 1HME (O'Callaghan CA et al., 1998).

Experimentos realizados con tetrámeros de HLA-E han demostrado la interacción de HLA-E con CD94/NKG2A, que es un receptor inhibitor de los linfocitos NK (Braud VM et al., 1998²). Así HLA-E presenta péptidos líder de otras moléculas del MHC a CD94/NKG2A, lo cual conduce a una inhibición de la actividad citotóxica de las células NK. Este mecanismo permite que las células NK con un sólo receptor monitoricen la integridad de la vía de procesamiento antigénico de numerosas variantes alélicas HLA de clase I clásicas.

Recientemente se ha descrito que el péptido líder de la proteína UL40 del citomegalovirus humano (HCMV) se une a HLA-E. Así favorece la

expresión de HLA-E en superficie, la interacción con CD94/NKG2A y en definitiva la inhibición de la citotoxicidad de las células NK. De esta manera HCMV podría evadir la respuesta inmune antiviral de las células NK (Tomasec P et al., 2000).

HLA-F

El polimorfismo del gen HLA-F es limitado y se ha identificado un alelo nulo en Japón (Uchigiri C et al., 1997). Este gen de transcripción ubicua codifica una molécula muy similar en secuencia y estructura a las moléculas MHC de clase I clásicas (Geraghty DE et al., 1990). El patrón de expresión está restringido a amígdala, bazo y timo. El desarrollo de anticuerpos contra péptidos sintéticos de HLA-F (Wainwrighti SD et al., 2000) ha revelado que HLA-F es una proteína intracelular, asociada a β_2m , interacciona con el transportador TAP, y al parecer su región de unión al péptido está vacía. También se ha desarrollado un anticuerpo monoclonal contra una forma recombinante de HLA-F replegada "in vitro" junto con β_2m y sin necesidad aparente de péptido (Lepin EJ et al., 2000). La forma recombinante de HLA-F fue utilizada para construir tetrámeros, los cuales se unían a los receptores ILT2 (LIR1) e ILT4 (LIR2). ILT2 e ILT4 son receptores inhibidores que se expresan en células NK, linfocitos B, linfocitos T y monocitos/macrófagos. Estos resultados sugieren que HLA-F podría ser un ligando para estos receptores "in vivo", aunque queda por aclarar si HLA-F, como ocurre con HLA-E, es capaz de llegar a la superficie celular y si realmente une péptidos o no.

HLA-G

El gen de HLA-G, como HLA-E y HLA-F, es poco polimórfico y tiene la estructura típica de las moléculas HLA-Ia (Geraghty DE et al., 1987). La expresión de HLA-G está restringida al citotrofoblasto del tejido placentario (Ellis SA et al., 1990). Esta distribución tisular ha llevado a plantear la hipótesis de que HLA-G desempeña un importante papel en la tolerancia del feto por el sistema inmune materno. Aunque se han descrito familias con

alelos nulos de HLA-G en las que no existen aparentemente problemas reproductivos (Moreau P et al., 2002).

La molécula HLA-G une un repertorio de péptidos no tan amplio como las moléculas HLA de clase Ia pero tampoco tan restringido como HLA-E (Diehl M et al., 1996).

El papel fundamental de HLA-G no parece ser la presentación antigénica a linfocitos T sino la regulación de la actividad de las células NK y otros tipos celulares mediante la unión a sus receptores inhibidores: ILT2/LIR1 (Navarro F et al., 1999), ILT4/LIR2 (Colonna M et al., 1998), p49 (Cantoni C et al., 1998) y KIR2DL4 (Rajagopalan S y Long EO, 1999).

3.2 Moléculas HLA de clase Ic: HFE y MIC.

HFE

HFE es el gen implicado en la aparición de la hemocromatosis hereditaria (HH) (Feder JN et al., 1996). La HH es una enfermedad autosómica recesiva común en personas de origen norte-europeo. Se caracteriza por una excesiva acumulación de hierro en órganos y tejidos, que puede provocar graves disfunciones, especialmente en el hígado.

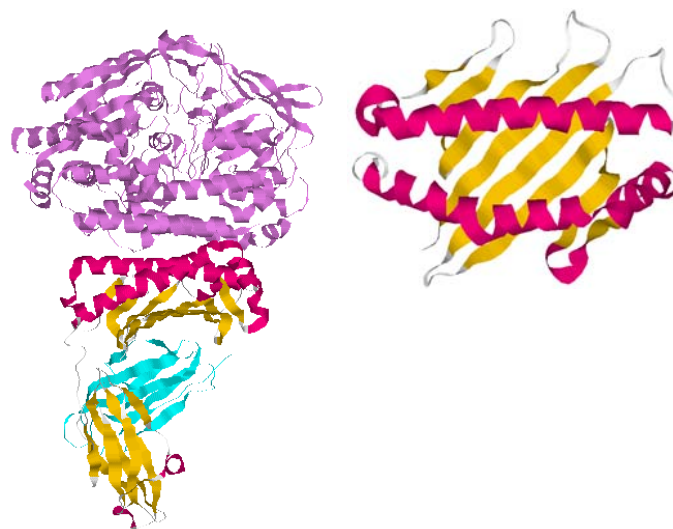
HFE inicialmente se nombró HLA-H por su relación con la HH pero se rechazó esta nomenclatura porque ya existía un pseudogen del HLA con ese nombre (Bodmer JG et al., 1997).

HFE es un gen HLA de clase I no clásico localizado en la región MHC pero con menor grado de homología con los clásicos que HLA-E, -F y -G. HFE no es polimórfico y se expresa con una localización subcelular variable (*Tabla I1*) en el sincitiotrofoblasto de la placenta –como HLA G- y en células epiteliales del tracto gastrointestinal. Destaca su expresión en la profundidad de las criptas del intestino delgado, cerca de los supuestos centros reguladores de la absorción del hierro.

Tabla I1. *Expresión subcelular de HFE en el tracto gastrointestinal y en la placenta.*

<i>TEJIDO</i>	<i>EXPRESIÓN SUBCELULAR</i>
Tracto gastrointestinal	
Esófago y linfocitos de la submucosa	En toda la superficie celular
Estómago y colon	En la superficie basolateral
Intestino delgado	Intracelular y perinuclear
Placenta	
Sincitiotrofoblasto	En la superficie apical

La proteína HFE se pliega adoptando una conformación muy parecida a la de las moléculas HLA de clase I clásicas (Lebron JA et al., 1998) y se asocia a β_2m en la superficie celular (*Figura I7*). La proximidad entre las α -



hélices de los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ impiden a la molécula HFE unir péptidos. La función de esta proteína no es la presentación antigénica sino la regulación de los niveles de hierro mediante la interacción con el receptor de la transferrina (TfR) (*Figura I7*) tanto en individuos adultos como en la interfase feto-materna (Feder JN et al., 1998).

El 80% de los pacientes con HH presentan en homocigosis una mutación puntual que resulta en un cambio de cisteína por tirosina (C282Y). Esta cisteína forma parte de un puente disulfuro intracatenario del dominio $\alpha 3$ de HFE, con lo cual su pérdida impide la asociación a β_2m y la expresión en superficie de la proteína (Bahram S et al., 1999).

MIC (MHC CLASS I CHAIN-RELATED)

MIC constituye una familia génica localizada en la región

Figura I7. HFE (α -hélices en magenta y β -láminas en amarillo) se asocia a β_2 microglobulina (cian) e interacciona con la transferrina (violeta). Código PDB: 1DE4 (Bennet M et al., 2000).

cromosómica MHC (Bahram S et al., 1994) formada por dos genes (MICA y MICB) y cinco pseudogenes no traducidos (MIC-C, -D, -E, -F y-G) (Shiina T et al., 1999).

A diferencia de la mayoría de los genes HLA de clase I no clásicos, los genes MIC son polimórficos. Como las moléculas HLA de clase I clásicas, el mayor grado de polimorfismo se detecta en los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ (Fodil N et al., 1999), aunque son pocos los residuos variables que coinciden con las posiciones polimórficas de las moléculas clásicas. Algunos alelos de los genes MIC están asociados a enfermedades como el alelo MICA009 con la



enfermedad de Behçet (Mizuki N et al., 1999) y el alelo MICA002 con la artritis psoriática (Wallace GR et al., 1999). En asociación con un haplotipo HLA-B*4801 se ha identificado un alelo nulo de MICB junto con una deleción genómica de 100Kb que incluye a MICA (Komatsu-Wakui M et al., 1999). Esta deficiencia de MICA y MICB no manifiesta ningún síntoma clínico aparente ni anomalías en las poblaciones B, T ó NK.

Las moléculas MIC se expresan en la superficie de fibroblastos y líneas celulares epiteliales sin asociarse a β_2m . La expresión de los MIC se induce en fibroblastos y células endoteliales por estrés oxidativo (Yamamoto K et al., 2001) y térmico (Groh V et al., 1998), en células dendríticas y epiteliales por infecciones de *Mycobacterium tuberculosis* (Das H et al., 2001) y *Escherichia coli* (Tieng V et al., 2002) y en fibroblastos “in vitro” por infección con citomegalovirus humano (Groh V et al., 2001).

La estructura tridimensional de MICA (Li P et al., 1999) es una

configuración alterada de tipo MHC de clase I, de tal manera que la posible región de unión al péptido es más estrecha que en las moléculas de clase Ia y la orientación de los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ respecto al dominio $\alpha 3$ es radicalmente diferente de la que aparece en las moléculas de clase Ia (*Figura 18*). Sin embargo la estructura de MIC-A cristalizado junto con su receptor NKG2D (Li P et al., 2001) no adopta esta conformación “extendida”, lo que demuestra la flexibilidad de la región que conecta el dominio $\alpha 3$ con el superdominio $\alpha 1$ - $\alpha 2$ (*Figura 19*).

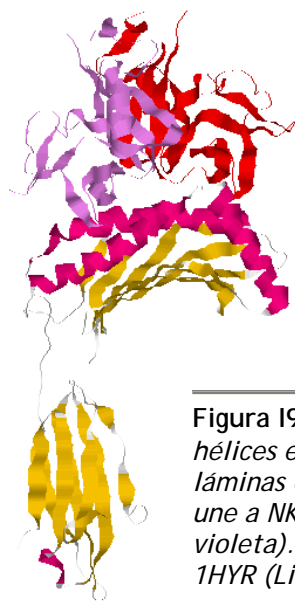


Figura 19. MICA (α -hélices en magenta y β -láminas en amarillo) se une a NKG2D (rojo y violeta). Código PDB: 1HYR (Li P et al., 2001).

El monómero MICA interacciona con el homodímero NKG2D (*Figura 19*) de forma análoga a como ocurre en los complejos MHC I-péptido-TcR pero independientemente del procesa-miento antigénico (Li P et al., 2001). La unión de MICA al receptor NKG2D de los linfocitos $T\gamma\delta$, $T\alpha\beta$ $CD8^+$ y NK activa las funciones efectoras de estas células (Bauer S et al., 1999). Así los linfocitos T $TcR\gamma\delta^+$

$V\delta 1$ del epitelio intestinal reconocen y lisan de forma específica células con MIC en la superficie (Groh V et al., 1998). Y la unión de MICA/B (inducidos por CMV) con el receptor NKG2D de linfocitos $T\alpha\beta$ $CD28$ - $CD8^+$ específicos de CMV genera una señal coestimuladora que aumenta la respuesta citolítica de estas células y la liberación de citoquinas dependientes de TcR (Groh V et al., 2001; Ugolini S et al., 2001).

Recientemente se ha descrito que ciertos tumores epiteliales producen MICA soluble. Tal que la asociación del MICA soluble con NKG2D conduce a la degradación de este receptor afectando negativamente a la capacidad antitumoral de las células NK (Groh V et al., 2002).

3.3 Moléculas HLA de clase Id: CD1, FcRn, ZAG, EPCR y ULBP

CD1

CD1 fue la primera molécula de clase I codificada fuera del MHC que se descubrió y además definió el primer *cluster* o grupo de diferenciación (CD) (Calabi F y Milstein C, 1986). La familia génica CD1 esta formada por cinco genes (CD1A, CD1B, CD1C, CD1D y CD1E) íntimamente ligados (Martin LH et al., 1987; Calabi F y Milstein C, 2000). Las moléculas CD1 son poco polimórficas (Oteo M et al., 1999; Han M et al., 1999) y presentan un patrón de expresión restringido.

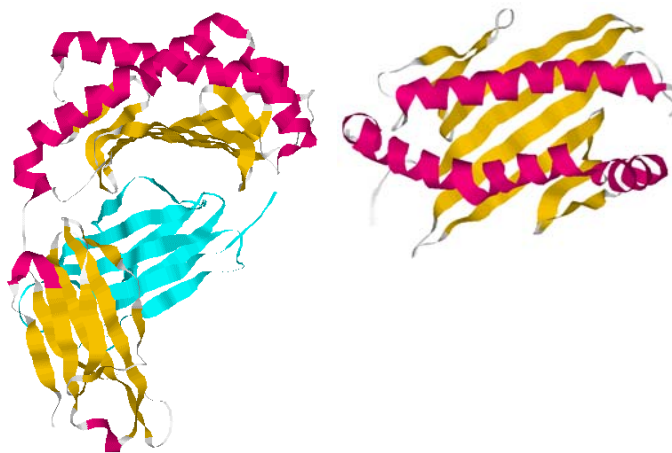


Figura I10. CD1b (α -hélices en magenta y β -láminas en amarillo) se asocia a β_2m (cian). Código PDB: 1GZQ (Gadola S et al., 2002).

CD1A, CD1B y CD1C se expresan constitutivamente en la mayoría de los timocitos corticales y en células dendríticas, y se pueden inducir en monocitos de sangre periférica (Porcelli S et al., 1992). CD1D se expresa en hepatocitos y células epiteliales. Todas las moléculas CD1 se expresan en la superficie celular asociado a β_2m , salvo CD1e (Angenieux C et al., 2000).

La estructura tridimensional de la molécula CD1d1 de ratón (Zeng ZH et al., 1997) y CD1b humano (Gadola S et al., 2002) revela un plegamiento muy similar al de las moléculas clásicas (Figura I10).

Las moléculas CD1 actúan como moléculas presentadoras de antígenos no peptídicos a linfocitos T (Tabla I2).

Tabla I2. Lípidos y ceramidas que se unen a las moléculas CD1.

Lípidos de la pared bacteriana

Ácidos micólicos de *Mycobacterium tuberculosis* (Beckman EM et al., 1994)

Glucosa monomicolato (GMM) (Sieling PA et al., 1995)

Derivados de lipoarabinomanano (LAM) (Sieling PA et al., 1995)

Fosfatidilinositolmanósidos (PIM) (Sieling PA et al., 1995)

Hexosa-1-isoprenoides de micobacterias (Moody DB et al., 2000)

Ceramidas

Gangliósidos de tejidos cerebrales (Shamshiev A et al., 1999)

α -Galactosilceramida (Kawano T et al., 1997)

La molécula CD1d une péptidos hidrofóbicos (Castano AR et al., 1995)

y α -galactosil-ceramida (α -GalCer). α -GalCer es un glicoesfingolípido aislado en esponjas marinas, no presente en los vertebrados y descubierto por su actividad antitumoral. α -GalCer presentada por CD1d puede ser reconocida por poblaciones de células NKT humanas restringidas por CD1d (Spada FM et al., 1998) mediante interacción con el TcR V α 14i (Kawano T et al., 1997). Las células NKT son células T que presentan algunos marcadores de células NK y se caracterizan por tener un TCR con una cadena α invariante, producen altos niveles de IL4 e interferón- γ tras activación (Davodeau F et al., 1997) y se les atribuyen importantes propiedades efectoras y reguladoras de la respuesta inmune (Elewaut D y Kronenberg M, 2000; Kronenberg M y Gapin L, 2002).

FcRn (FCGRT)

El FcRn es un receptor para la región Fc de IgG que fue aislado por primera vez en intestino neonatal de ratón (Jones EA y Waldman TA, 1972). Esta molécula se expresa en la superficie celular (Rodewald R y Kraehenbuhl JP, 1984; Simister NE y Rees AR, 1985) asociada a β 2m (Simister NE y Mostov KE, 1989). FcRn se ha detectado en placenta humana (Story CM et al., 1994), endotelios fetales, sincitiotrofoblasto y parte del estroma celular (Simister NE et al., 1996 y Leach JL et al., 1996). En el tejido adulto se ha detectado en endotelio vascular (Junghans RP, 1997), sinusoides hepáticos (Borvak J et al., 1998), células del túbulo renal proximal (Haymann JP et al., 2000), monocitos, macrófagos, células dendríticas (Zhu X et al., 2001) y líneas celulares de endotelio pulmonar y nódulo linfático (Ghetie V et al., 1996).

Aunque FcRn adopta la estructura típica de las moléculas MHC de clase I clásicas (*Figura I11*), la región de unión al péptido es estrecha y está ocluida por el extremo amino-terminal (West AP y Bjorkman PJ, 2000), lo que impide la unión de péptidos. FcRn se une de manera pH-dependiente (Raghavan M et al., 1995) al fragmento Fc de la inmunoglobulina IgG, en concreto a los dominios CH2 y CH3 (Medesan C et al., 1997).

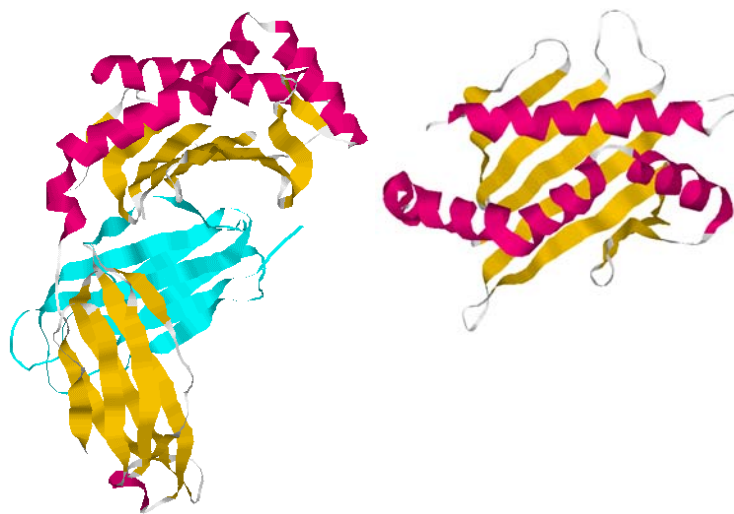


Figura I11. FcRn (α -hélices en magenta y β -láminas en amarillo) se asocia a β_2m (cian). Código PDB: 1EXU (West AP y Bjorkman PJ 2000).

En la etapa perinatal FcRn participa en el transporte de IgG de la madre al feto a través de la placenta (en humano) o saco vitelino (en ratón) y en el transporte de la IgG de la leche materna a través del intestino del neonato en ratones.

En el endotelio vascular adulto, FcRn protege a la IgG del catabolismo de las proteínas plasmáticas y por tanto regula los niveles séricos de IgG. También podría proteger a la IgG de la degradación en los hepatocitos (Telleman P y Junghans RP, 2000).

Los ratones deficientes en β_2m -por tanto incapaces de ensamblar FcRn- poseen alteraciones de estas funciones manifestándose ausencia de IgG materna en la etapa fetal y postnatal temprana (Israel EJ et al., 1995) y

una vida media menor de lo normal para la IgG sérica (Ghetie V et al., 1996).

Zinc α 2-glicoproteína (ZAG, AZGP1)

La proteína ZAG recibe este nombre por precipitar con sales de zinc y por su movilidad electroforética en la región de las α 2 globulinas (Tada T et al., 1991). Está presente en la mayoría de los fluidos corporales. A diferencia del resto de moléculas de clase I, ZAG es soluble, y no se asocia con β 2m (Sanchez LM et al., 1997; Fahnestock ML et al., 1992).

Aunque ZAG no une péptidos (Sanchez LM et al., 1997), no parece existir impedimentos estructurales para que pueda hacerlo (Sanchez LM et al., 1999) ya que la hendidura definida por los dominios α 1 y α 2 no es tan estrecha como en FcRn, HFE o MICA -moléculas HLA-I no clásicas que no unen péptidos- (*Figura I12*). Por otra parte se han aislado moléculas resistentes a proteasas unidas a ZAG por esa región. La naturaleza de estas moléculas se desconoce, aunque su densidad electrónica parece indicar que se trata de pequeñas moléculas hidrofóbicas y quizás con una carga neta negativa (Sanchez LM et al., 1999). Además son capaces de inducir glomerulonefritis en rata (Shibata S y Miura K, 1982).



La molécula ZAG induce lipólisis y reduce las reservas lipídicas "in vivo" (Todorov PT et al., 1998). La acción de ZAG sobre los adipocitos activa una adenilato ciclasa GTP-dependiente, por ello se propone que ZAG se une a un receptor acoplado a proteína G (Todorov PT et al., 1998). Por tanto ZAG parece estar implicada en el metabolismo lipídico y es poco probable que participe en la respuesta inmune.

Finalmente destacar la asociación de ZAG con ciertos tipos de cáncer. En un 40% de los carcinomas de mama se produce acumulación de ZAG (Bundred NJ et al., 1987; Freije JP et al., 1991) y en pacientes con cáncer

Figura I12. ZAG (α -hélices en magenta y β -láminas en amarillo).
Código PDB: 1GZQ (Sanchez LM et al., 1999).

prostático se detectan altos niveles séricos de ZAG (Hale LP et al., 2001).

EPCR (Endothelial Protein C Receptor)

El receptor endotelial de la proteína C (EPCR, PROCR) (Fukudome K y Esmon CT, 1994) se considera una molécula no clásica de clase I porque presenta dos dominios extracelulares homólogos a los dominios extracelulares $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de las moléculas no clásicas CD1. A diferencia de la mayoría de moléculas clase I, esta proteína transmembranal no posee el

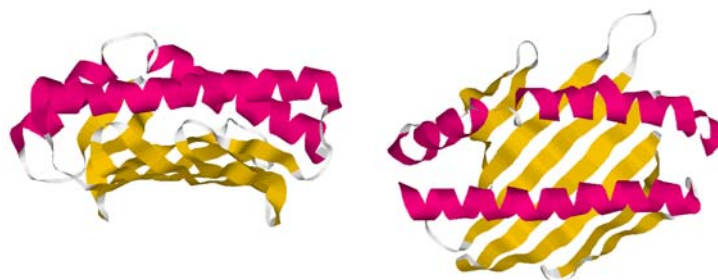


Figura I13. EPCR (α -hélices en magenta y β -láminas en amarillo).
Código PDB: 1LQV (Oganesyan V et al., 2002).

dominio extracelular $\alpha 3$ (*Figura I13*).

Como otras moléculas no clásicas, el patrón de expresión de la EPCR es muy restringido, se expresa en la cara luminal de células endoteliales de grandes vasos sanguíneos (arterias y venas) (Laszik Z et al., 1997) y en corazón y pulmón (Ye X et al., 1999).

La molécula EPCR desempeña una importante función dentro del mecanismo de inhibición de la coagulación. El producto final de la vía de activación de la coagulación, la trombina, se asocia a la trombomodulina (TM) en la cara luminal de las células endoteliales. El complejo trombina/TM se une a la proteína C y la activa. La proteína C activa (APC) es capaz de degradar factores necesarios para la generación de trombina, inhibiendo así el proceso de coagulación. En este contexto la EPCR actúa reclutando proteína C inactiva para que la interacción entre la proteína C y el complejo trombina/TM tenga lugar más fácilmente (Stearns-Kurosawa DJ et al., 1996). Así EPCR favorece la activación de la proteína C y potencia su capacidad anticoagulante. Tras la activación, la proteína C activa (APC) puede permanecer unida a la EPCR con la misma afinidad con que se une la forma inactiva (Fukudome K y Esmon CT, 1994) sin detrimento en su función e inactivación mediante $\alpha 1$ -antitripsina y proteína C inhibidora (Regan LM et al., 1996). La proteína C activa usa la EPCR como un correceptor para la proteólisis de PAR1 (*Protease-Activated Receptor 1*) de las células endoteliales (Riewald M et al., 2002).

Por otra parte en el plasma se ha detectado una forma soluble de EPCR. Esta forma soluble es generada por la acción de una metaloproteinasa sobre la forma transmembranal y también puede unir proteína C (Kurosawa S et al., 1997). Aunque el papel funcional de esta forma soluble no se conoce, en pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES) o sepsis se han detectado altos niveles de EPCR soluble (Kurosawa S et al., 1998).

La proteína EPCR también se une a la proteinasa 3, el autoantígeno en la granulomatosis de Wegener, por un sitio diferente al de la proteína C. El complejo EPCR/proteinasa 3 se une al receptor MAC-1 de los neutrófilos

activados y aparentemente inhibe la adhesión de los leucocitos al endotelio activado. (Kurosawa S et al., 2000).

ULBP (*UL-16 Binding Protein*)

La familia ULBP, formada por ULBP1, ULBP2 y ULBP3, son las últimas moléculas MHC de clase I descritas en humanos (Cosman D et al., 2001).

Las ULBPs se descubrieron al ser identificadas junto a MICB como posibles ligandos de la glicoproteína UL16 del citomegalovirus humano (HCMV) en células infectadas por HCMV. UL16 es capaz de interactuar con ULBP1, ULBP2 y MICB, pero no se une a ULBP3 ni a MICA. Las moléculas ULBP y los MIC podrían desempeñar funciones similares, aunque la secuencia de ULBP no es más similar a la de MIC que a la de otros no clásicos. Se ha detectado expresión constitutiva de ULBPs en varios tejidos linfoides y no linfoides, así como en tejidos fetales.

Desde el punto de vista estructural, estos particulares miembros de la familia de clase I se componen de los típicos dominios extracelulares $\alpha 1$ y $\alpha 2$. Carecen sin embargo de dominio $\alpha 3$ y por lo tanto no se asocian a β_2m (*Figura I14*). Tampoco son proteínas transmembranales al estilo de las moléculas clásicas, ya que no poseen un dominio transmembranal propiamente dicho y se expresan en la superficie celular ancladas a la bicapa lipídica a través de glicosil inositol fosfato.

Las moléculas ULBP carecen de varios de los residuos que en las moléculas clásicas son los responsables de la unión al péptido, por tanto probableme



Figura I14. ULBP3 (α -hélices en magenta y β -láminas en amarillo) interacciona con NKG2D (violeta y rojo). Código PDB: 1KCG (Radaev S et al., 2001).

Las moléculas ULBP interactúan con el complejo NKG2D/DAP10 de la superficie de las células NK y provoca la activación de los linfocitos NK: proliferación, citotoxicidad, producción de citoquinas ($\text{TNF}\alpha$, $\text{TNF}\beta$, $\text{IFN}\gamma$ y GM-CSF) y quimiocinas ($\text{MIP1}\alpha$, $\text{MIP1}\beta$ e I-309) e incremento de la expresión de proteínas de superficie (Kubin M et al., 2001). Estos efectos se producen por promover la movilización de calcio y activar las vías de transducción de señales PI3-K/Akt, MEK/ERK y JAK2/STAT5 (Sutherland CL et al., 2002).

Por último mencionar que la unión de UL16 a ULBP, bloquea la interacción de los ULBP con su ligando en la célula NK. Esta acción proporcionaría al citomegalovirus humano un mecanismo de evasión de la respuesta inmune.

4 MR1 (MHC Related 1 gene)

MR1 pertenece al grupo de genes MHC de clase I no clásicos localizados fuera de la región MHC (MHC-Id) y es el único miembro de clase I cuya función sigue siendo una incógnita.

En 1995 Hashimoto K et al., empleando cebadores homólogos a dos regiones altamente conservadas del dominio $\alpha 3$ de las moléculas de clase I, amplificaron por PCR un fragmento de un posible nuevo gen MHC de clase I. La secuencia de cDNA completa se pudo determinar al ser detectado en un *screening* de una genoteca de cDNA de timo humano, usando como sonda el producto amplificado anteriormente. A este nuevo gen relacionado con las moléculas de clase I se le denominó MR1 (*MHC related 1 gene*). Posteriormente se ha identificado MR1 en rata y ratón.

Tabla I3. Homología entre los miembros clásicos y no clásicos de la familia MHC-I. El grado de homología se expresa en porcentaje de identidad aminoacídica, considerando la secuencia aminoacídica completa. El análisis de las secuencias se realizó con el programa Clustal W (Thompson JD et al., 1994).

HLA-B 83	HLA-C 80	HLA-E 75	HLA-F 77	HLA-G 80	MIC-A 24	MIC-B 23	FcRN 25	HFE 35	ZAG 35	MR1 36	EPCR 12	CD1a 18	CD1b 15	CD1c 12	CD1d 13	CD1e 14	ULBP1 16	ULBP2 19	ULBP3 18	HLA-A 18
	86	76	78	78	26	23	22	35	35	36	15	14	15	14	17	15	14	19	18	HLA-B 18
		75	76	78	27	23	27	35	35	36	13	15	18	14	14	13	13	14	18	HLA-C 18
			71	75	25	24	25	34	32	36	13	18	15	20	14	15	15	19	20	HLA-E 20
				78	24	23	27	34	35	36	11	15	16	18	17	14	14	14	17	HLA-F 17
					25	24	26	35	35	36	8	18	19	18	13	18	15	15	17	HLA-G 17
						83	16	25	26	24	9	14	11	18	16	13	12	20	20	MIC-A 20
							16	25	26	24	5	14	18	19	12	12	15	20	21	MIC-B 21
								23	27	27	11	19	20	18	22	20	20	17	22	FcRN 22
									36	34	11	18	18	20	19	18	20	22	22	HFE 22
										33	12	21	22	21	22	20	17	18	18	ZAG 18
											15	21	19	21	18	17	18	19	24	MR1 24
											22	16	15	22	16	11	13	4		EPCR 4
												59	57	50	53	13	18	15		CD1a 15
													60	50	54	7	13	7		CD1b 7
														47	50	6	13	9		CD1c 9
															54	10	17	12		CD1d 12
																10	8	12		CD1e 12
																	59	54		ULBP1 54
																		54		ULBP2 54

Recientemente se ha propuesto sustituir el nombre de MR1 por HLA-LS (HLA-Like Sequence). Esta nueva nomenclatura no parece ser muy acertada porque podría confundirse con el nombre de un pseudogen de MHC de clase I (HLA-L) e incluso se podría pensar que entre HLA-L y HLA-LS existe algún tipo de estrecha relación que no ha sido demostrada hasta ahora. Por esas razones, en este trabajo se seguirá utilizando el nombre antiguo.

El gen MR1 humano se localiza en el cromosoma 1, en la posición 1q25.3 (Figura I15) como fue demostrado por análisis de hibridación “in situ” con fluorescencia –FISH- (Hashimoto et al., 1995). MR1 se encuentra en relativa proximidad a otra familia génica de clase I no clásica, CD1 (1q22-23) (Figura I15) y dentro de una región considerada paráloga a la región MHC (cromosoma 6). Esta zona del genoma, que acoge a varios genes relacionados con el funcionamiento del sistema inmune, probablemente se originó por una ancestral duplicación del MHC (Katsanis N et al., 1996; Kasahara M et al., 1996; Kasahara M, 1998). En ratones, el gen MR1 se localizó por FISH (*Fluorescence “In Situ” Hybridization*) en el cromosoma 1, en concreto en la región 1G1-2 (Riegert P et al., 1998¹), y en rata se localizó por análisis de cosegregación con el gen de la renina en el cromosoma 13 (Walter L y Günther E, 1998). En rata y ratón MR1 se encuentra en regiones cromosómicas sinténicas a la región que contiene MR1 en

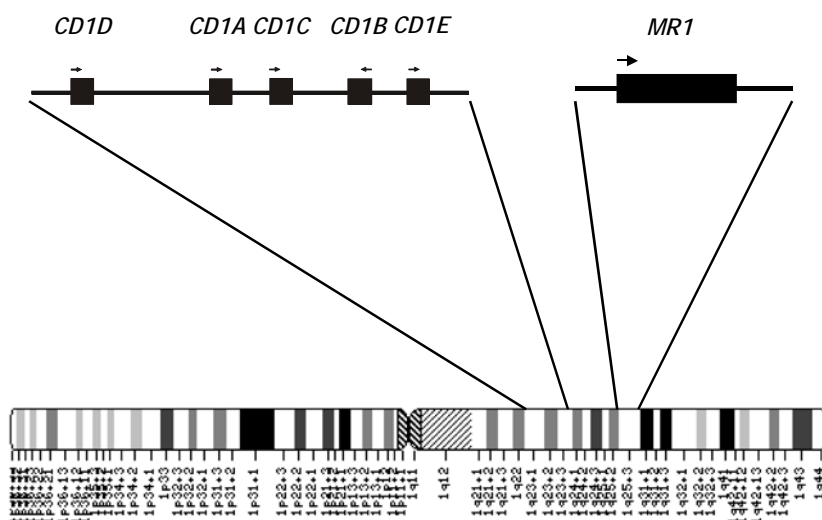


Figura I15. El gen MR1 se encuentra cercano a la familia génica CD1 en el cromosoma 1.

humanos, por tanto los genes MR1 humano, de ratón y rata son genes ortólogos.

El gen MR1 tiene una organización genómica expandida (*Figura I16*), de hecho su tamaño es superior a las 18Kb en humano y en ratón (Yamaguchi H et al., 1998, Riegert P et al., 1998¹), lo cual se debe al gran tamaño del primer intrón (en humanos aproximadamente 15Kb y en ratones 8'857Kb). Otros genes no clásicos como HFE (Riegert P et al., 1998²), FcRn (Kandil E et al., 1995), MICA (Bahram S et al., 1996¹), MICB (Bahram S et al., 1996²), ZAG (Freije JP et al., 1993; Ueyama H et al., 1993) también presentan una estructura genómica expandida (*Figura I16*). Esto contrasta con la estructura genómica compacta de los genes MHC de clase I clásicos, HLA-E, HLA-G y CD1 (*Figura I16*). Curiosamente aquellos genes con función presentadora de antígenos tienden a mantener estructura genómicas pequeñas, con tamaños inferiores a las 5 Kb.

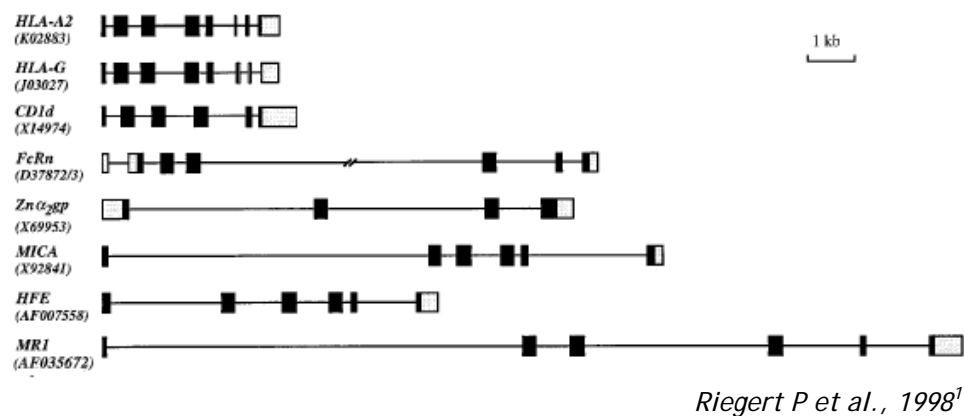
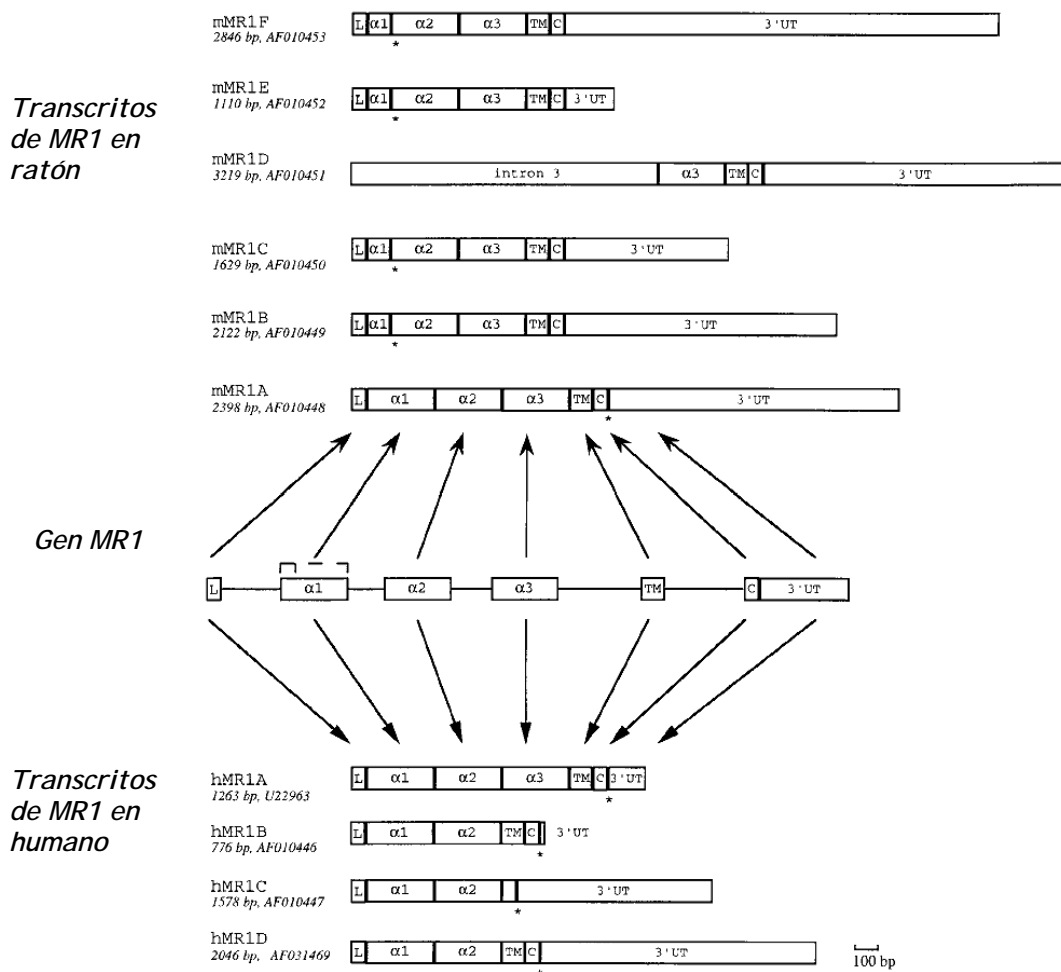


Figura I16. Representación esquemática de la estructura genómica de genes humanos MHC de clase I clásicos y no clásicos.

El gen MR1 de ratón y su ortólogo humano tienen una organización exón/intrón similar a la de los genes MHC de clase I, es decir cada uno de los seis exones codifica para un dominio diferente de la proteína. El gen MR1 presenta las canónicas señales de *splicing* GT/AG y como en otros genes

MHC-I y MHC-II se procesa por un *splicing* de tipo I, de tal manera que cada dominio comienza con un codón dónde el primer nucleótido pertenece al exón precedente (Yamaguchi H et al., 1998).

La expresión de MR1 es ubicua en humanos (Hashimoto K et al., 1995), rata (Walter L y Günther E, 1998) y ratón (Riegert P et al., 1998¹). MR1 se transcribe en tejidos y en líneas celulares específicas de tejidos, por tanto no se trata de un gen que se expresa en un tipo celular presente en todos los tejidos analizados sino más bien de un gen que se expresa en una gran variedad de células. En ratón, rata y hombre, MR1 se transcribe en múltiples isoformas transcripcionales generadas por *splicing* alternativo. Algunas de estas isoformas no presentan el dominio $\alpha 3$, otras tienen diferentes tamaños en la región 3' no traducida y otras presentan un codón stop prematuro en el dominio $\alpha 1$ (Figura I17).



Riegert P et al., 1998¹

Figura I17. Representación esquemática de las isoformas transcripcionales de MR1 en humano y ratón. 27

El producto proteico de MR1 es una glicoproteína transmembranal de tipo I constituida por un péptido líder, tres dominios extracelulares tipo inmunoglobulina $\alpha 1$, $\alpha 2$, y $\alpha 3$, una región transmembranal y una cola citoplasmática. La región transmembranal es más corta que en las moléculas MHC-I clásicas. También es corta la región citoplasmática, la cual es codificada por un exón y no por varios como ocurre en las moléculas MHC-I clásicas. En el presente año ha sido demostrada la asociación no covalente entre la proteína MR1 de ratón y β_2m (Yamaguchi H y Hashimoto K, 2002). En este trabajo también se ha demostrado que la molécula MR1 de ratón es una proteína (~42 KDa) glicosilada, lo cual concuerda con el hecho de que la secuencia aminoacídica de MR1 presenta, cómo las moléculas MHC-I clásicas, un sitio de N-glicosilación entre los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ (N₈₅XS).

MR1 presenta un alto grado de homología con las moléculas MHC de clase I clásicas, siendo sólo superado por HLA-E, HLA-F y HLA-G (Tabla I3). También cabe destacar que MR1 es una

Tabla I4. Identidad aminoacídica entre MR1 humano y de ratón por dominios.

Líder	$\alpha 1$	$\alpha 2$	$\alpha 3$	TM/CIT
40'9%	89'7%	89'1%	72'8%	40'7%

molécula con una alta similitud entre humanos y ratón, siendo los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ (Tabla I4) los más conservados de toda la molécula (Yamaguchi H et al., 1997).

Actualmente el principal desafío es determinar la función de MR1. La hipótesis más aceptada considera que MR1 une un ligando no lipídico conservado con el fin de actuar como molécula presentadora a linfocitos T o como ligando de receptores inhibidores y/o activadores del tipo LCR o KIR. Esta hipótesis está basada en la conservación evolutiva de los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$, el alto grado de homología entre las moléculas MHC-I clásicas y MR1 y la asociación de MR1 de ratón a β_2m . Sin embargo no hay que descartar que MR1, como otras moléculas MHC-I no clásicas, pudiera desempeñar una

función diferente a la de las moléculas MHC-I clásicas, e incluso sin relación con el funcionamiento del sistema inmune.

Nuestro principal interés ha sido y es avanzar, en la medida de nuestras posibilidades, en el conocimiento de esta molécula.

TABLA RESUMEN DE LAS PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DE LOS COMPONENTES DE LA FAMILIA MHC-I

Familia HLA	Locus	Comosoma	Alelos (julio'02)	Asociación a β_2m	Une péptidos	Función
Ia	HLA-A	6p21.3	248	Sí	Sí	*Presentación antigénica a T _{$\alpha\beta$} CD8 ⁺ *Inhibición de NK
	HLA-B		486			
	HLA-C		118			
Ib	HLA-E		6	Sí	Sí (péptidos líder de moléculas MHC)	*Inhibición de NK vía CD94/NKG2A
	HLA-F		1	Sí	¿?	*Ligando de receptores inhibidores ILT2 e ILT4
	HLA-G		15	Sí	Sí	*Ligando de receptores inhibidores ILT2, ILT4 y KIR2DL4
Ic	HFE		6	Sí	No	*Regulación de los niveles de hierro
	MIC		MICA 54	No	No	*Activación de células NK, T _{$\alpha\beta$} CD8 ⁺ y T _{$\gamma\delta$} vía NKG2D
			MICB 1			
Id	CD1		1q22-q23	CD1A 2	Sí	No (lípidos)
		CD1B 1				
		CD1C 2				
		CD1D 1				
		CD1E 5		No		
	FcRn	19q13.3	1	Sí	No	*Transporte de IgG a través de la placenta y del intestino postnatal *Regulación de los niveles séricos de IgG en el adulto
	ZAG	7q22.1	1	No	No (lípidos)	*Inducir la lipólisis
	EPCR	20q11.2	1	No	No (lípidos)	*Favorecer la inhibición de la coagulación
	ULBP	6q25	ULBP1 1	No	No	*Activación de NK vía NKG2D/DAP10
			ULBP2 1			
ULBP3 1						
MR1	1q25.3	2	Sí	¿?	¿?	

Objetivos

OBJETIVOS

El gen MR1 es un miembro de la familia de genes MHC de clase I, es uno de los denominados genes no clásicos localizados fuera del complejo MHC. Entre las características de la molécula codificada por MR1 cabe destacar:

a.- Su alto grado de conservación entre humanos y roedores, particularmente en los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$.

b.- Su gran similitud a las moléculas MHC-I clásicas, las cuales desempeñan funciones muy importantes en el contexto de la inmunidad innata y adaptativa ya que participan en la regulación de la actividad efectora de los linfocitos NK y en la presentación antigénica a linfocitos T CD8+.

En el momento de iniciar el trabajo presentado en esta tesis, todo el conocimiento acerca de MR1 procedía de un análisis exhaustivo de la información nucleotídica que se iba obteniendo (cDNA completo de MR1 en humano, rata y ratón, gen MR1 en humano y ratón, otras isoformas transcripcionales de MR1 en humano, rata y ratón). Pero no había información sobre la proteína codificada por el gen MR1.

Si consideramos las características destacadas anteriormente junto con la falta de información acerca de la proteína MR1, **conocer la función de MR1** se presentaba como un trabajo de investigación atractivo y por esas razones se constituyó en nuestro objetivo general. Para avanzar en el conocimiento de la función de la molécula MR1 se plantearon varios objetivos específicos que nos proporcionasen directa o indirectamente información acerca de la función. Los **objetivos específicos** que han sido la guía para desarrollar este trabajo se enumeran a continuación.

- 1.- *Estudiar si el gen MR1 es polimórfico.*
- 2.- *Identificar nuevas secuencias relacionadas con MR1 en humanos.*
- 3.- *Identificar secuencias relacionadas con MR1 en primates superiores.*

4.- Caracterizar la proteína MR1 en humanos.

Material y métodos

1 ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO DEL GEN MR1 EN HUMANOS

Para analizar el polimorfismo de MR1 se determinaron las secuencias de los exones 2 y 3 en varios individuos de diferente origen étnico.

1.1 Material genético: ADN genómico de 25 individuos de origen étnico africano (5 zulúes y 5 tanzanos), mongoloide (5 chinos) y caucasiano (5 europeos y 5 saharauis). Estas muestras fueron cedidas por el *Dr. Carlos López Larrea (Inmunología. Hospital Central de Asturias. Oviedo)*, el *Dr. Antonio Arnaíz Villena (Inmunología. Hospital Doce de Octubre. Madrid)* y el *Dr. Jaume Bertranpetit Busquets (Biología evolutiva. Universitat Pompeu Fabra. Barcelona)*, excepto las muestras de individuos europeos que fueron extraídas de linfocitos de sangre periférica del personal del laboratorio (*Inmunología. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid*).

1.2 Amplificación por PCR: Para amplificar por PCR el fragmento del gen MR1 que contiene los exones 2 y 3 se emplearon un cebador 5' que hibrida 30 pb *downstream* del inicio del exón 2 y un cebador 3' que hibrida 50 pb *upstream* del final del exón 3 (*Figura M1*).

		SECUENCIA 5'►3'	Longitud	T _m *
Cebador 5'	<u>mr15'ex</u> <u>2</u>	GGC GTT TCG GAT CCC ATC CAT	(21 mer)	61'5°C
Cebador 3'	<u>mr13'ex</u> <u>3</u>	GCA ATA CAT TCT TCT TCC AGC CAA TTC TT	(29 mer)	61'0°C

T_m: Temperatura de Melting calculada con el software CEBADOR v3.4 (Rychlik W y Rhoads RE, 1989).



Figura M1. Secuencia, longitud, temperatura de Melting y localización de los cebadores utilizados para amplificar la región genómica exón2-intrón2-exón3 de MR1.

Todos los cebadores que aparecen en este trabajo fueron sintetizados por Sigma-Genosys Ltd.

1.3 Reacción de PCR: En un volumen final de 50µl se mezclaron tampón de reacción (1x final), cebadores 5' y 3' (1µM final), dNTPs (200µM final, Boehringer Mannheim, Roche Diagnostics), Cl₂Mg (2mM final), 200ng de ADN y 2U de Taq-polimerasa (Biotools-B&M Biolabs y AMED-Biomaster). La amplificación se realizó en un termociclador LKB-Gene ATAQ Controller (Pharmacia) según el programa: 95°C 5 min de desnaturalización; HOT START; 35 ciclos de 95°C-1min, 60°C-1min de annealing y 72°C-1min de extensión; y 72°C-10min de extensión final. Los productos de PCR fueron separados por electroforesis de geles de agarosa 1% en TAE (40mM Tris-base pH:7,5, 20mM ácido acético, 1mM EDTA) con Bromuro de Etidio (Fluka) y visualizados con luz UV en un transiluminador Linus Unipower (Cultek).

1.4 Purificación de los productos de PCR: Los productos de PCR fueron separados en geles de agarosa al 1'5% en TAE con Bromuro de Etidio (1% final). La sección del gel que contenía el ADN a purificar se cortó y disolvió bien a 50°C en 2'5 volúmenes de NaI 5M. La solución obtenida se incubaba durante 5min a 4°C con 5µl de *glass milk* para que el ADN se adhiriera a estas microesferas de vidrio. Las microesferas de vidrio con el ADN adherido se centrifugaron a 20.000g 5seg., el sobrenadante fue eliminado y las microesferas lavadas con solución de lavado (100mM NaCl, 10 mM Tris, 1mM EDTA, 50% etanol). Tras varios lavados el ADN es separado de las microesferas con agua bidestilada a 50°C 3min Finalmente se centrifugo a 20.000g 5seg y se recuperó el sobrenadante, el cual contenía el ADN disuelto en agua bidestilada. Este procedimiento permitía obtener el ADN purificado sin enzimas, sales u otros ácidos nucleicos de diferente tamaño.

1.5 Secuenciación de los productos de PCR de 1056 pb. Los productos de PCR con un tamaño de 1056pb se purificaron para ser luego secuenciados automáticamente por el CAI (Centro de Apoyo a la Investigación) de

Secuenciación perteneciente a la Universidad Complutense de Madrid. Para ello fueron empleados los siguientes cebadores (*Figura M2*).

	SECUENCIA 5'►3'	Longitud	Tm
<u>mr15'ex2</u>	GGC GTT TCG GAT CCC ATC CAT	(21 mer)	61'5°C
<u>mr13'ex3</u>	GCA ATA CAT TCT TCT TCC AGC CAA TTC	(29 mer)	61'0°C
<u>MR1i2</u>	GAC AGT CCA GAA GAT GCA	(18 mer)	42'4°C
<u>MR1i4</u>	TCC CAG CAC TTG AGA G	(16 mer)	39'8°C

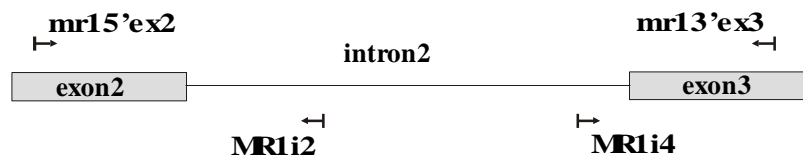


Figura M2. Secuencia, longitud, temperatura de Melting y localización de los cebadores utilizados secuenciación de los exones 2 y 3 de MR1.

2 AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL cDNA DE MR1

Para completar el análisis del polimorfismo de MR1 en humanos era necesario conocer la secuencia codificante de MR1 completa cuando se identificaban nuevos alelos.

2.1 ARN total. Linfocitos de sangre periférica (de 5 a 10 millones) fueron lisados con un volumen del reactivo ULTRASPEC™ RNA (Biotex Laboratories, Inc.) a 4°C 5min para permitir la disociación completa de los complejos de nucleoproteínas. A continuación la incubación a 4°C 5min con 0'2 volúmenes de cloroformo (triclorometano) separó en una fase orgánica a las proteínas y el ADN y en una fase acuosa al ARN. Tras centrifugación a 12.000g 15min 4°C la fase acuosa se recuperó y el ARN total de la célula se precipitó con un volumen de isopropanol a 4°C 10min. El ARN precipitado se lavó varias veces con un volumen de etanol 75% (en agua con 0'1% DEPC,

dietil-pirocarbonato) a 4°C. Tras la última centrifugación a 7.000g 5min 4°C el ARN se secó al vacío 10min y luego se resuspendió en 50µl de agua con DEPC 0'1%.

2.2 Síntesis de cDNA por RT-PCR. El cDNA fue sintetizado a partir de 1µg de ARN total utilizando el *1st Strand cDNA synthesis Kit for RT-PCR* (Boehringer Mannheim, Roche Diagnostics). Para obtener el cDNA se mezclaron en un volumen de 20µl: tampón de reacción 1x, 5mM MgCl₂, 1mM dNTPs, 50 unidades de inhibidor de RNAsa (Roche y Takara Shuzo Co.Ltd), 1'6µg cebador-p(dT)₁₅, 20 unidades de AMV *reverse transcriptase* y 1 µg de ARN total. La síntesis se llevó a cabo mediante incubaciones a distintas temperaturas: 25°C 10 min para que el cebador poli-T hibride con el ARNm, 42°C 1hora para la síntesis de cDNA, y 99°C 5min más 4°C 5min para inactivar la enzima y evitar posteriores interferencias. Así se sintetiza el cDNA correspondiente al ARNm total de la célula.

2.3 Amplificación del cDNA de MR1. En un volumen final de 100µl se mezclaron tampón de reacción 1x, 1µM cebador-5', 1µM cebador-3', 200 µM dNTPs (Boehringer Mannheim-Roche), 2mM MgCl₂, 20 µl de cDNA y 4U de Taq-polimerasa (AMED-Biomaster). Los cebadores empleados hibridan con la región 5'UT y 3'UT de la secuencia de cDNA de MR1 publicada previamente (Hashimoto K et al., 1995) y se les adicionaron a sus extremos 5' dianas de enzimas de restricción: Sall en el cebador-5' y HindIII en el cebador-3'. La amplificación se realizó en los termocicladores Omn-E (Hybaid) y PTC-100 (MJ Research, Inc) con el programa: 95°C-5min de desnaturalización; HOT START; 40 ciclos de 95°C-1min 30seg, 65°C-1min 30seg y 72°C-2min; y 72°C-10min de extensión final. Los productos de PCR fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 1% en TAE con bromuro de etidio y visualizados con luz UV en un transiluminador Gel-Doc 2000 (BioRad).

SECUENCIA 5'►3'

Longitud Tm*

Cebador 5'	<u>MR1U</u>	ggg cg [▼] tcgac GG ACT ATG GGG GAA CTG	(33 mer)	73'9°C
	<u>P</u>	ATG		
Cebador 3'	<u>MR1L</u>	ccg caagct [▼] T AG AGG AAG GAG AAC TGG	(36 mer)	72'4°C
	<u>O</u>	AAA AGA GGG		

Figura M3. Secuencia, longitud y temperatura de Melting de los cebadores utilizados para amplificar el cDNA completo de MR1. El cebador MR1UP llevaba la diana para Sal I y el cebador MR1LO la diana para Hind III. Ambas dianas aparecen subrayadas y se marca la zona de corte con ▼.

2.4 Secuenciación. Los productos de RT-PCR obtenidos en la amplificación del cDNA humano de MR1 fueron clonados en M13 para secuenciar varios clones por el método manual.

3 IDENTIFICACIÓN DE UNA NUEVA SECUENCIA RELACIONADA CON MR1 EN HUMANOS

En el estudio del polimorfismo de MR1 se amplificó de forma consistente un fragmento esperado de 1056 pb y otro de tamaño superior (1315 pb) cuyo análisis se detalla a continuación. La amplificación y purificación del producto de PCR de 1315 pb se realizó como se ha descrito en los apartados 1.1-1.4.

3.1 Clonaje del producto de 1315 pb. Los productos de 1315 pb amplificados a partir de tres muestras de ADN genómico de individuos de origen caucásiano fueron clonados en el vector pCR[®]2.1 (Figura M4) del TA Cloning[®] Kit (Invitrogen), siguiendo instrucciones del fabricante. El vector pCR[®]2.1 es un vector abierto con colas poli-T en sus extremos 3' que permite

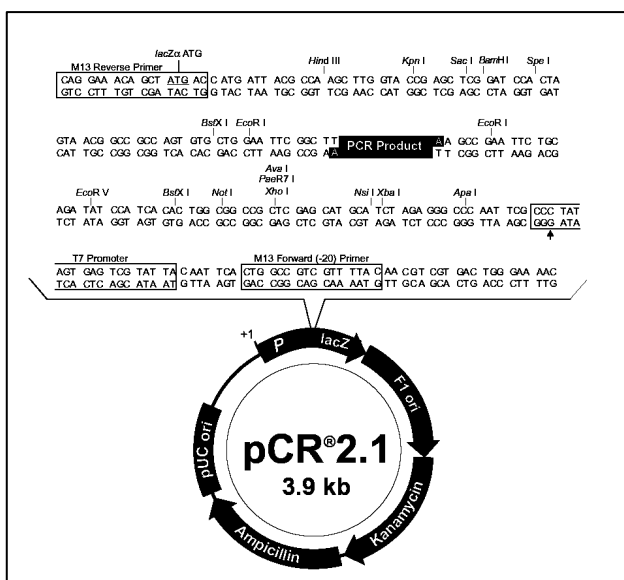


Figura M4. Mapa circular y mapa de restricción del sitio de clonaje del vector de clonaje pCR[®]2.1

clonar productos de PCR generados por ADN-polimerasas que adicionan colas de poli-A en los extremos 3', como la Taq, Tfl o Tth polimerasas.

3.2 Transformación química de bacterias competentes. Bacterias competentes *Escherichia coli* de la cepa XL1-Blue (genotipo *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZ.M15 Tn10 (Tetr)]*) fueron transformadas químicamente con la mitad de la mezcla de ligación. Las bacterias competentes se generaron utilizando RbCl y CaCl₂. Para ello un cultivo de bacterias en crecimiento exponencial o a una densidad de 5x10⁷ bacterias/ml (DO_{550nm}=0'5) se centrifugaron a 4.000 rpm 10min 4°C y se resuspendieron en 1ml de solución I (10mM MOPS, 10mM RbCl, pH:7). Tras otra centrifugación a 4.000rpm 10 min 4°C se resuspendieron en 1ml de la solución II (100mM MOPS, 10mM RbCl, 50mM CaCl₂ pH:6'5) durante 15 min a 4°C. De nuevo las bacterias se centrifugaron a 4.000rpm 10min 4°C y se resuspendieron en 200µl de la solución final (100mM MOPS, 10mM RbCl, 50mM CaCl₂, 15% glicerol, pH:6'5) durante 15min en hielo. Las bacterias competentes se pueden mantener guardadas a -80°C varios meses. En la transformación el ADN fue adherido a la pared bacteriana incubando en hielo durante 5-30min, 200µl de bacterias competentes con la mezcla de ligación. A continuación se provocó la entrada del ADN a la bacteria mediante shock térmico, consistente en calentar a 42°C 30seg y seguidamente enfriar bruscamente a 4°C 2min. Luego las bacterias se incubaron 1hora a 37°C en 1ml de medio SOC, LB o 2xYT antes de plaquear 50µl y 100µl de la transformación en placas de LB-1'4% agar con el antibiótico de selección adecuado.

Con el vector pCR[®]2.1, los antibióticos de selección son ampicilina (50µg/ml) y/o kanamicina (50µg/ml) y es necesario untar las placas con 40µl del sustrato cromogénico de la β-galactosidasa, X-Gal, (40µg/ml) y 40µl del inductor del operón lac, IPTG, (100mM) para diferenciar las colonias transformadas con el vector nativo religado (colonias azules) de las que llevaban el inserto (colonias blancas). Para descartar falsos positivos, la

presencia del inserto en colonias blancas se determinó por PCR empleando cebadores específicos del inserto y una 1µl de la dilución en 20µl de PBS (*phosphate buffered saline*) de la colonia a analizar.

3.3 Purificación de plásmidos (*miniprep*).

Los plásmidos se aislaron por el método de la lisis alcalina. Para ello las bacterias recombinantes se crecieron en medio 2xYT o LB líquido a 37°C 14-16 horas y 1'5ml de este cultivo se centrifugó a 20.000g 1min. Las bacterias se lavaron en TE (10mM Tris-HCl pH:8, 1mM NaEDTA) para eliminar restos de medio de cultivo. A continuación se procedió a romper la pared bacteriana y la membrana plasmática con la adición secuencial de las siguientes soluciones: 1°) 100µl de solución I (50mM glucosa, 10mM NaEDTA, 25mM Tris-HCl pH:8) durante 5min a temperatura ambiente, 2°) 200µl de solución II fresca (0'2N NaOH, 1% SDS) durante 5min a 4°C, y 3°) 150µl de solución III (3M acetato potásico, 11'5% ácido acético glacial). Después de centrifugar a 20.000g 5min se recuperaron 400µl de sobrenadante. Para purificar el ADN plasmídico que contiene este sobrenadante se añade un volumen de fenol:cloroformo:isoamialcohol 25:24:1, tal que tras centrifugar 20.000g 3min obteníamos una fase inferior orgánica con los lípidos, una fase intermedia con las proteínas y una fase superior acuosa con el ADN y ARN. La fase acuosa era recuperada a un nuevo tubo *ependorf*, entonces los ácidos nucleicos fueron precipitados con un volumen de etanol absoluto y lavados varias veces en etanol al 70%. Para eliminar completamente el etanol, el ADN se secaba al vacío. Luego se resuspendía en 50µl TE con RNAsa y se incubaba 30min a 37°C para degradar el ARN. Así se aislaba y purificaba el plásmido de una bacteria.

3.4 Secuenciación del fragmento de 1315 pb. El inserto de los plásmidos aislados de tres colonias recombinantes se secuenciaron manualmente por el método dideoxi con T7 *Sequenase version 2.0 DNA polymerase* (Amersham) según las instrucciones del fabricante. En las reacciones de secuencia se

emplearon los cebadores comerciales –40 y M13 *Reverse Séquense Primer* (Amersham) junto con los siguientes (*Figura M5*):

	SECUENCIA 5'►3'	Longitud	Tm
<u>MR1ex</u> ₂	GCA GCA GAT GTT CAA GG	(17 mer)	43°3°C
<u>MR1i1</u>	CAT CTT CTG GAC TGT CCC	(18 mer)	43°8°C
<u>MR1i2</u>	GAC AGT CCA GAA GAT GCA	(18 mer)	42°4°C
<u>MR1i3</u>	CAC TCG TTT GGC ATG G	(16 mer)	43°0°C
<u>MR1i4</u>	TCC CAG CAC TTG AGA G	(16 mer)	39°8°C
<u>MR1ex</u> ₃	CTG TGG TGC TTC C	(16 mer)	41°0°C

Figura M5. Secuencia, longitud, temperatura de Melting (Tm) y localización de los cebadores utilizados en la secuenciación de una nueva secuencia relacionada con MR1.

4 IDENTIFICACIÓN DE NUEVAS SECUENCIAS RELACIONADAS CON MR1 EN PRIMATES SUPERIORES

4.1 Líneas celulares:

PUTI (ATCC CRL 1850). Línea linfoblastoide de células B transformadas con el virus de Epstein-Barr perteneciente a la especie *Pongo pygmaeus* (orangután) (Lawlor DA et al., 1990).

ROK (ATCC CRL 1854). Línea linfoblastoide de células B transformadas con el virus de Epstein-Barr perteneciente a la especie *Gorilla gorilla* (gorila). (Lawlor DA et al., 1990).

CARL (ATCC CRL 1857). Línea linfoblastoide de células B transformadas con el virus de Epstein-Barr perteneciente a la especie *Pan troglodytes* (chimpancé común). (Lawlor DA et al., 1990).

Estas líneas se obtuvieron directamente de la ATCC (*American Type Culture Collection*, Manassas VA, USA) y se crecieron, bajo condiciones estándar de cultivo celular (37°C, 5%CO₂), en *Iscove's modified Dulbecco's medium* (*with L-glutamine, 25 mM Hepes*, Gibco) suplementado con 0'05

mM β_2 -mercaptoetanol (Sigma), 1x de anfotericina B (fungizona)-estreptomocina-penicilina (Gibco) y 20% suero de ternera fetal (FCS, Harlan Sera-Lab) descomplementado a 55°C-30min y bajo condiciones estándar de cultivo celular (37°C, 5%CO₂).

4.2 Amplificación del cDNA de MR1 en chimpancé común, gorila y orangután. Para amplificar el cDNA de MR1 en chimpancé común, gorila y orangután se llevo a cabo la estrategia de RT-PCR que permitía la amplificación del cDNA de MR1 en humanos (apartados 2.1-2.3). En este caso se emplearon de partida 10 millones de células de las líneas PUTI y CARL.

4.3 Amplificación de la región exón2-intrón2-exón3 del gen MR1 en chimpancé común y orangután

4.3.1 Purificación de ADN genómico: Cinco millones de células de las líneas CARL y PUTI fueron lisadas en WCLB (10mM Tris pH:7.5, 20mM EDTA, 50mM NaCl) con 1% de SDS y 50µg/ml de proteinasa K a 50°C 14-16h. Las proteínas se precipitaron con 1.5mM NaCl y se separaron por centrifugación a 4.000g 10 min. En el sobrenadante obtenido, el ADN genómico se precipitó con 2 volúmenes de etanol 100%, se lavó en un volumen de etanol 75% y se resuspendió en agua.

4.3.2 Amplificación parcial del gen MR1 por PCR: La región exón2-intron2-exón3 del gen MR1 fue amplificada por PCR como se ha descrito en el apartado 1.3 con las siguientes modificaciones: 500ng de ADN molde, 1ue de Taq-polimerasa (AMED-Biomaster), 55°C de annealing y termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc). Los cebadores empleados son aquellos que se diseñaron para amplificar esta región en humanos (apartado 1.2)

4.4 Clonaje y secuenciación.

Los productos obtenidos en la amplificación del cDNA de MR1 por RT-PCR y en la amplificación parcial del gen MR1 por PCR en chimpancé y orangután fueron purificados con microesferas de vidrio (apartado 1.4) y clonados en el vector pGEM[®]-T (Promega) siguiendo instrucciones del fabricante. El vector pGEM[®]-T (Figura M6), de manera similar al vector pCR[®]2.1 (apartado 3.1), permite clonar productos de PCR con colas de poliA en sus extremos 3'

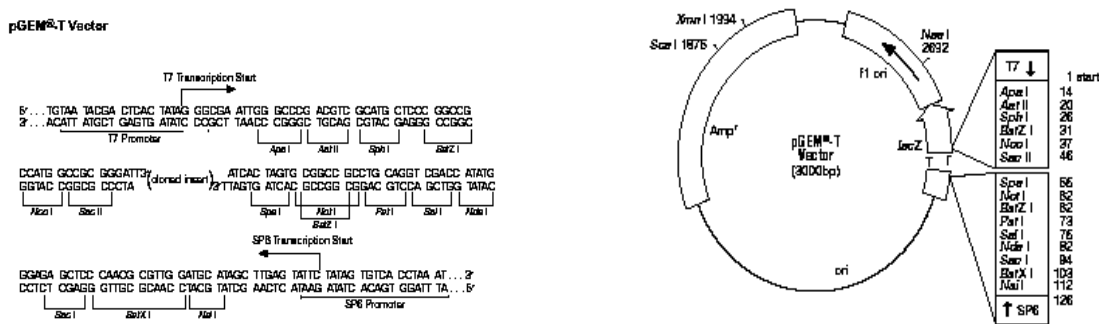


Figura M6. Mapa circular y mapa de restricción del sitio de clonaje del vector pGEM[®]-T.

porque es un vector abierto con colas poliT en sus extremos 3'.

Bacterias competentes *E. coli* cepa XL1-Blue fueron transformadas químicamente mediante shock térmico (apartado 3.2). Las bacterias transformadas se seleccionaban con 50µg/ml de ampicilina y en presencia de X-Gal e IPTG (apartado 3.2) las bacterias transformadas con el vector nativo formaban colonias blancas mientras que las bacterias transformadas con el vector portando el inserto formaban colonias azules.

En al menos tres colonias representativas de cada transformación se purificó el plásmido por el método de la lisis alcalina (apartado 3.3). Todos los plásmidos se secuenciaron automáticamente por el CAI (Centro de Apoyo a la Investigación) de Secuenciación perteneciente a la Universidad Complutense de Madrid. Para ello se emplearon los cebadores de secuenciación: *pUC/M13 forward sequencing primer* y *pUC/M13 reverse sequencing primer*.

5 CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA MR1 EN HUMANOS

5.1 Expresión de la región extracelular de MR1 en un sistema procariota.

En nuestro laboratorio hemos desarrollado un sistema procariota capaz de producir, tras inducción con IPTG (isopropil β-D-tiogalactopiranoóxido), elevadas cantidades de una proteína recombinante constituida por la región

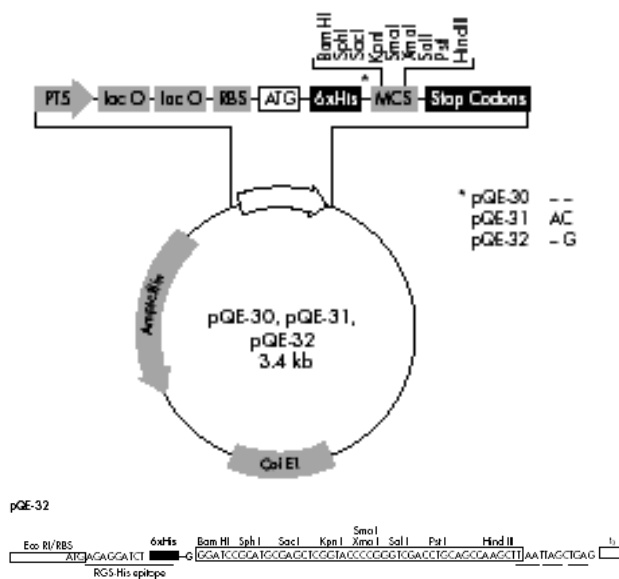


Figura M7. Mapa circular y mapa de restricción del sitio de clonaje del vector de expresión pQE-32.

extracelular (dominios α1, α2 y α3) de la molécula MR1 humana y a esta nueva proteína se le ha denominado MR1r. Para ello el fragmento de cDNA que contenía los exones 2, 3 y 4 de MR1 se amplificó por RT-PCR y se clonó en el vector de expresión pQE32 (QIAGEN). pQE32 (Figura M7) adiciona al extremo amino terminal de la proteína recombinante una cola de

histidinas (6 His). Estas histidinas favorecen la purificación de la proteína recombinante mediante cromatografía de afinidad al níquel.

Para producir la proteína recombinante, las bacterias *Escherichia coli* cepa M15 que la expresan se crecieron en medio 2xYT, 2% glucosa, 25 μg/ml kanamicina y 200 μg/ml ampicilina a 37°C. Al alcanzar la fase exponencial (DO_{550nm}= 0'4-0'6) se indujo la expresión de la proteína recombinante con 2mM IPTG (Boehringer Mannheim-Roche) durante 4h. Tras recolectar las bacterias por centrifugación a 20.000g 1min, se resuspendieron en 4ml de agua bidestilada y se sonicaron a 4°C con tres pulsos de 1 min. a una amplitud y potencia media. Para determinar si la proteína recombinante se

hallaba en la fracción soluble o en el precipitado del sonicado, muestras de ambas fracciones se separaron en una electroforesis en gel SDS-PAGE 12% y las proteínas fueron teñidas con azul de Coomassie 0'5%.

5.2 Sueros anti-MR1r para detectar MR1. Los sueros anti-MR1r se generaron por inmunización vía subcutánea de tres conejos con la proteína recombinante MR1r disuelta en urea 8M y en presencia del adyuvante completo de Freund (DIFCO Laboratories). Tres inmunizaciones fueron llevadas a cabo con intervalos de dos semanas.

5.3 Transfección de la línea LCL 721.221 con MR1.

5.3.1 Línea LCL 721.221. La línea LCL 721.221 (ATCC CRL 1855) es una línea de linfocitos B aislados de una mujer caucasiana sana e inmortalizados con el virus de Epstein-Barr. Esta línea linfoblastoide no expresa ni HLA-A, ni HLA-B, ni HLA-C debido a una delección parcial del complejo MHC inducida por irradiación con rayos γ . Esta línea expresa DPw2, DQw1, DR1 y niveles normales de β_2m (Shimizu Y et al., 1988 y Shimizu Y y DeMars R, 1989). Esta línea crece en RPMI 1640 (Gibco) suplementado con 10% de suero de ternera fetal (Harlam SeraLab) descomplementado a 55°C 30min y 1x de anfotericina B(fungizona)-estreptomocina-penicilina (Gibco) y bajo condiciones estándar de cultivo celular (37°C, 5%CO₂).

5.3.2 Clonaje del cDNA de MR1 en el vector de expresión pSR α Neo. El cDNA de MR1 fue amplificado por RT-PCR con cebadores específicos a partir de linfocitos de sangre periférica (apartado 2). El cDNA completo de MR1 se clonó en el vector de expresión pSR α Neo entre las dianas HindIII y XhoI. Bacterias competentes *E. coli* cepa XL1-Blue fueron transformadas con el vector pSR α Neo nativo y el vector pSR α Neo portando el cDNA de MR1 para obtener grandes cantidades de ambos plásmidos, los cuales una vez purificado por el sistema *QIAGEN Plasmid Midi o Maxi Kit* (QIAGEN) se utilizaran para transfectar células de la línea LCL 721.221.

5.3.2 Transfección de la línea LCL 721.221. La línea LCL 721.221 se transfectó con el vector pSR α Neo nativo y con el vector pSR α Neo portando el cDNA de MR1 humano. Tras varios lavados, diez millones de células se resuspendieron a 4°C en 800 μ l de tampón de electroporación (20mM HEPES, 5mM Dextrosa, 130mM NaCl, 5mM KCl, 0,7mM Na₂HPO₄

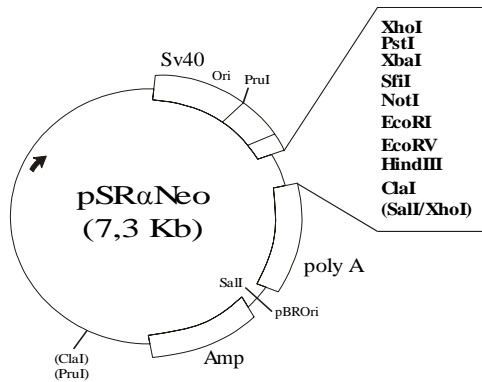


Figura M8. Mapa circular y mapa de restricción del sitio de clonaje del vector de expresión pSR α Neo

pH:7'2) y se le adicionaron 40 μ g del ADN plasmídico. La mezcla se colocó en una cubeta de electroporación de 0'4cm de ancho (Gene Pulser[®] Cuvette, BioRad) y se electroporó en un electroporador Gene Pulser[®] II (BioRad) con las siguientes condiciones: resistencia infinita, 250 voltios y 950 μ F de capacitancia. A continuación se realizaron varios lavados en RPMI o

PBS y un Ficoll para eliminar los restos de membranas y células muertas. Las células se crecieron inicialmente en el medio de cultivo sin antibiótico de selección durante una semana, posteriormente se adiciona el antibiótico, G418 o geneticina (Gibco) para pSR α Neo a concentraciones crecientes hasta 1'5mg/ml.

5.4 Selección celular con microesferas magnéticas. Las células con mayor nivel de expresión de una determinada proteína de superficie se seleccionaron con anticuerpos específicos para esa proteína y microesferas magnéticas. Para ello se emplearon 5 10⁶ de células, se lavaron en medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco) a 4°C y se ajustaron a 1 10⁶células/ml. A continuación se incubó con el anticuerpo de selección durante 1h, con agitación orbital y a 4°C. Tras varios lavados para eliminar el anticuerpo no unido a las células, se añadieron las microesferas magnéticas y se incubó 1hora a 4°C con agitación orbital. Aquellas células a las que estaba unido el anticuerpo+microesferas magnéticas (Figura M9) se retenían en los

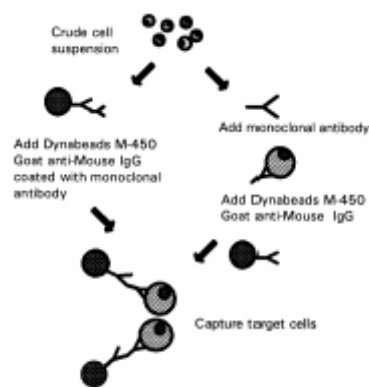


Figura M9. Selección celular con microesferas magnéticas.

siguientes lavados con el uso de un imán. Finalmente las células seleccionadas se distribuyeron en una placa de 24 pocillos.

5.5 Marcaje de citometría extracelular.

Las células, tras varios lavados en PBS+1%FCS, se incubaron con el anticuerpo primario a 4°C 30min. y en oscuridad. Posteriormente se realizan lavados en PBS+1%FCS para eliminar el anticuerpo no unido y luego se incubó con un anticuerpo secundario conjugado con un fluoróforo (ficoeritrina o fluoresceína) en las mismas condiciones. Finalmente las muestras se analizaron en un citómetro EPICs ELITE (Coulter). Las células se seleccionaron por criterios de tamaño/complejidad para eliminar las no viables.

Anticuerpo primario

Sueros de conejo anti-MR1r (Desarrollado en nuestro laboratorio)

Sobrenadante de hibridoma BBM.1 (anti-β₂microglobulina humana) (ATCC HB 28)

W6/32 (anti-HLA de clase I clásico) (ATCC HB 95)

Anticuerpo secundario

Goat F(ab')₂ anti-rabbit IgG (H+L)-PE (ficoeritrina/rojo) (Caltag Laboratories) Usar 1:40

Goat F(ab')₂ fragment mouse IgG (H+L)-PE (ficoeritrina/rojo) (Immunotech) Usar a 1:40

Goat F(ab')₂ fragment mouse IgG (H+L)-PE (ficoeritrina/rojo) (Immunotech) Usar a 1:40

5.6 Inmunoprecipitación con marcaje metabólico.

Las células, de 3 a 5 millones, se lavaron en PBS y tras centrifugar a 800g 5min se resuspendieron en 1ml de medio de cultivo sin metionina (RPMI 1640 sin metionina (Gibco) suplementado con 10% de suero de ternera fetal descomplementado y dializado, 1x glutamina (Gibco) y 1x estreptomycin-penicilina (Gibco)). Las células se incubaron en el medio sin metionina durante 45min a 37°C, 5%CO₂ para que consumieran su metionina libre. A continuación se le añadieron 50 μCi/5x10⁶ células de metionina marcada radiactivamente (L-[³⁵S]-Met (ICN)) y se incubaron durante 4h en las

condiciones anteriores. Posteriormente las células se lisaron en tampón de lisis (50mM Tris pH:7'5, 5mM EDTA, 0'5% NP40 y 1mM PMSF) durante 30 min a 4°C. Tras centrifugar a 20.000g 10min, el sobrenadante se aclaró en tres pasos: 1- preaclarado con 5µl de suero de conejo anti-ratón (ICN) durante 15h a 4°C con agitación orbital; 2- preaclarado con bacterias *Staphilococcus aureus* (Sigma) durante 1h a 4°C con agitación orbital; y 3- preaclarado con proteína A-sefarosa (Amersham) durante 1h a 4°C. Tras los aclarados se realizó la inmunoprecipitación con los sueros de conejo anti-MR1r (50µl de suero y 50µl de proteína A-sefarosa (Amersham)) durante 1h-4h a 4°C con agitación orbital. Luego se centrifugó a 20.000g 10min, el sobrenadante se guardó a -80°C para futuras inmunoprecipitaciones y el precipitado se lavó dos veces con solución de lavado 1 (20mM Tris-HCl pH:7'6, 10mM EDTA, 0'1mM NaCl, 0'5% NP40, 0'1% SDS, 0'5% deoxicolato sódico, 1% albúmina sérica bovina (BSA))y dos veces con solución de lavado 2 (2mM Tris-HCl pH:7'6, 1mM EDTA, 0'01mM NaCl, 0'05% NP40 y 0'5M NaCl). Finalmente el precipitado se lavó con 1ml de 20mM Tris-HCl pH:7'6, 10mM EDTA, 0'1mM NaCl y 0'5% NP40, y se resuspendió durante 30 min en tampón de carga para realizar una electroforesis en gel SDS-PAGE. El gel SDS-PAGE luego fue tratado con acético al 15% y con el reactivo comercial *Amplify* (Amersham) 30 min, se secó al vacío y se expuso a -80°C una radiografía en un casete con pantalla amplificadora antes de revelarla.

5.7 Western-blot. Las células (de 2'5 a 5 millones por marcaje) fueron lisadas en 20mM Tris-HCl pH:7'5, 5mMEDTA, 150mM NaCl, detergente (NP40 1%), inhibidores de proteasas (0'5mM PMSF, *Protease Inhibitor Cocktail Set III* (AEBSF, aprotinina, bestatina, E-64, leupeptina y pepstatinaA)-Calbiochem). La solución lisada fue centrifugada a 20.800g, 4°C durante 30min para eliminar restos celulares.

El sobrenadante de la lisis se separó en un gel de SDS-PAGE 10%-15% en condiciones reductoras (DTT y β-mercaptoetanol) en un cubeta Mini-PROTEAN II cell (BioRad) o Hoeffer, que admiten geles de 7'3x10,2cm y. Para ello el sobrenadante de lisis es diluido 1:1 en tampón de Laemmli 2x

(130mM Tris-HCl pH:6'8, 6% SDS, 0'02% azul de bromofenol, 20% glicerol, 100mm DTT y 5% de β -mercaptoetanol) y hervido a 90°C-3min. El marcador de peso molecular utilizado fue *Prestained precision protein standar, broad range 10-250kD* (BioRad). La electroforesis en SDS-PAGE se desarrolló a 100v hasta que la muestra penetra en la fase resolutive del gel y después a 200v hasta que el azul de bromofenol presente en el tampón de carga salga del gel.

Las proteínas del gel SDS-PAGE fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa de 0'2 μ m (BioRad). Para ello el gel y la membrana eran previamente equilibradas durante 15min en tampón de transferencia (25mM Tris-HCl, 185mM Glicina, 2'5mM SDS, 20% Metanol). La transferencia se realizó en semiseco con un Trans-Blot[®]SD (BioRad), en presencia de tampón de transferencia, durante 30min a 10 voltios para un gel de Mini-Protean y 45min a 15 voltios para un gel de Hoeffer.

Tras la transferencia, la membrana se lavó en Low-Tris- Buffer (LTB:150mM NaCl, 10mM Tris-HCl pH:7'5) y se bloqueó en reactivo de bloqueo (caseína al 10% en ácido maleíco (Roche)) al 2'5% diluido en LTB durante toda la noche a 37°C o un par de horas a 55°C.

El reactivo de bloqueo sobrante fue eliminado en varios lavados con LTB-Tween20 al 0'1%. A continuación la membrana fue incubada con el anticuerpo primario y el secundario conjugado con peroxidasa en incubaciones de 30min a 37°C, realizándose lavados con LTB-Tween20 al 0'1% detrás de cada incubación. Finalmente se reveló la membrana con el reactivo ECL (Solución A: 5ml Tris-HCl 100mM pH:8'5, 22 μ l ácido cumárico (148mg en 10ml DMSO (Sigma)) y 50 μ l luminol (250mM en DMSO (Fluka)); Solución B: 5ml Tris-HCl 100mM pH:8'5, 22 μ l H₂O₂ y 30% v/v (Sigma); mezclar y extender sobre la membrana) y se expuso a una radiografía durante 30seg, 1min y 5min.

Anticuerpo primario

Sueros de conejo anti-MR1r (Desarrollado en nuestro laboratorio

Sobrenadante de hibridoma BBM.1 (anti- β 2microglobulina humana) (ATCC HB 28)

Anticuerpo secundario

Anti-rabbit IgG(F(ab')₂)-POD (Sigma)
Usar a 1:50.000

Anti-mouse IgG(F(ab')₂)-POD (Amersham)
Usar a 1:10.000

5.8 Inmunoprecipitación. Las células fueron lavadas en DPBS (NaCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄, KCl, pH 7.2) y posteriormente lisadas en 500 µl por muestra del tampón de lisis frío (100mM Tris-HCl, 300mM NaCl, 2mM MgCl₂, 1% digitonina (Sigma y Calbiochem), 0.1mM EDTA, 1mM PMSF, 8mM Iodoacetamina, pH:7.6) durante 45 min a 4°C. Los restos celulares de mayor tamaño se eliminaron por centrifugación a 20.800g durante 10 min a 4°C. El sobrenadante se volvió a centrifugar (20.800g, 30min, 4°C) para eliminar restos celulares bajo peso. Este último sobrenadante fue preaclarado con 30 µl de sefarosa (Pharmacia) a 4°C durante toda la noche y en agitación. Al mismo tiempo el anticuerpo de inmunoprecipitación se conjugó con 10µl de proteína A-sefarosa (Pharmacia) y 30 µl de sefarosa en un volumen de 500µl de RPMI y durante toda la noche a 4°C y en agitación. Al día siguiente se realizó un segundo preaclarado sobre el sobrenadante del primer aclarado de 1h. Mientras tanto el anticuerpo conjugado con proteína A-sefarosa se lavó varias veces con DPBS pH 8, recuperándose al final el precipitado.

Los sobrenadantes procedentes del segundo aclarado fueron añadidos al precipitado del anticuerpo conjugado con proteína A-sefarosa. Así se procedió a la inmunoprecipitación durante 1h30min a 4°C en agitación. A continuación se realizó una centrifugación a 20.800g 5min 4°C, el sobrenadante puede guardarse a -80°C para futuras inmunoprecipitaciones. El precipitado se lavó a 4°C varias veces en 500µl de 100mM Tris-HCl, 300mM NaCl, 2mM MgCl₂, 1% digitonina (Sigma y Calbiochem). Finalmente las muestras se resuspendieron en tampón de Laemmli (25mM Tris-HCl pH:6.8, 1% SDS, 0.01% azul de bromofenol, 5% glicerol) con DTT y β-mercaptoetanol, se hirvieron 3min a 80°C y se centrifugaron a 20.800g 1min. El sobrenadante fue utilizado en una electroforesis en SDS-PAGE, en las condiciones explicadas anteriormente.

El experimento continua con la realización de un Western-Blot según ha sido detallado anteriormente.

Anticuerpo de

Anticuerpo primario de

Anticuerpo secundario de

inmunoprecipitación	western-blot	western-blot
Sueros de conejo anti-MR1r (Desarrollado en nuestro laboratorio)	Sueros de conejo anti-MR1r (Desarrollado en nuestro laboratorio)	Anti-rabbit IgG(F(ab') ₂)-POD (Sigma)
1:5	1:50	1:50.000

6 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LOS DATOS

A continuación se detallan los programas informáticos que se han utilizado para el análisis de los datos.

GCG v10.2 (Genetics Computer Group/Accelrys, <http://www.accelrys.com/>). Es un conjunto de programas informáticos no público de carácter científico. Nuestro laboratorio lo utiliza en conexión TELNET y con transferencia de archivos vía FTP mediante suscripción gestionada por el nodo español de la red europea EMBnet (*European Molecular Biology Network*, <http://www.es.embnet.org/>). Los programas que se han utilizado para realizar este trabajo son:

fasta: búsqueda en las bases de datos por homología.

blast: búsqueda en las bases de datos por homología.

gap: alineamiento de dos secuencias nucleotídicas o aminoácidas.

pileup: alineamiento múltiple de secuencias nucleotídicas o aminoácidas.

framealign: alinea una secuencia nucleotídica con una aminoácida.

reverse: genera la secuencia reversa y/o complementaria.

translate: traduce una secuencia de nucleótidos a aminoácidos.

map o mapsort: búsqueda de dianas de enzimas de restricción en una secuencia nucleotídica.

peptidemap o peptidesort: búsqueda de dianas de enzimas de restricción en una secuencia aminoácida.

frames: muestra los posible marcos abiertos de lectura de una secuencia.

reformat: dar formato gcg a las secuencias.

BLAST (NCBI, *National Center for Biotechnology Information*). Conjunto de programas desarrollados para realizar búsquedas en las bases de datos de secuencias aminoácidas y nucleotídicas. También permite buscar por homología, secuencias en el genoma de diversas especies, para lo cual han desarrollado la herramienta Blast Genome. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

CLUSTAL W (EBI, *European Bioinformatics Institute*, <http://www.ebi.ac.uk>). Alineamientos múltiples de secuencias aminoácidas y nucleotídicas.

SWISS-MODEL (*ExPASy-Expert Protein Analysis System- proteomics server*)

<http://www.expasy.org/>. Infiere la estructura tridimensional de una proteína en función de su homología con proteínas con estructura tridimensional resuelta por cristalografía.

RASMOL v2.7.1 (<http://www.bernstein-plus-sons.com>). Este programa permite visualizar la estructura cristalográfica de proteínas y los modelos generados por Swiss-Model.

Resultados

1 ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO DEL GEN MR1 EN HUMANOS MR1

Las moléculas MHC de clase I clásicas (HLA-A, -B y -C) son muy polimórficas, especialmente en la región de unión al péptido formada por los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$, gracias a lo cual pueden unir y presentar una gran variedad de antígenos peptídicos. Por el contrario las moléculas MHC de clase I no clásicas son poco o nada polimórficas. Con respecto a MR1 no se habían realizado estudios de polimorfismo.

El análisis del polimorfismo de MR1 en humanos consistió en la secuenciación de los exones 2 y 3 del gen MR1 de individuos de distinto origen étnico. Los exones 2 y 3 codifican para los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de MR1, cuyos homólogos en las moléculas MHC de clase I clásicas forman la polimórfica región de unión al péptido.



Figura R1. Para el análisis del polimorfismo se amplificó por PCR la región comprendida entre el exón 2 y el exón 3 del gen MR1 con cebadores específicos (mr15'ex2 y mr13'ex3).

Por consiguiente, el análisis del polimorfismo de MR1 en esta región puede contribuir a entender la función de MR1 en el sentido de que el grado de polimorfismo indicaría el grado de variabilidad del posible ligando –si hay alguno- que se uniera a esta región.

Las muestras analizadas fueron ADN genómico de 25 individuos sanos no emparentados con diferente origen étnico: africanos (5 zulúes y 5 tanzanos), asiáticos (5 chinos) y caucásicos (5 de Europa y 5 del oeste sahariano).

El fragmento exón2-intrón2-exón3 del gen humano MR1 se amplificó por PCR con cebadores específicos (*Figura R1*) y se secuenció por el sistema manual y automático.

En todas las muestras amplificamos de forma consistente dos productos de 1156 pb y 1315 pb (*Figura R2*). La secuencia del amplificado de menor tamaño (1156 pb) se conoció por secuenciación directa del producto de PCR mientras que el amplificado de mayor tamaño (1315 pb) se clonó en el vector pCR[®]2.1 (Invitrogen) y secuenciamos varios de estos clones. El producto de 1315 pb se analiza en el siguiente apartado titulado “2 Identificación en humanos de una nueva secuencia relacionada con MR1”.

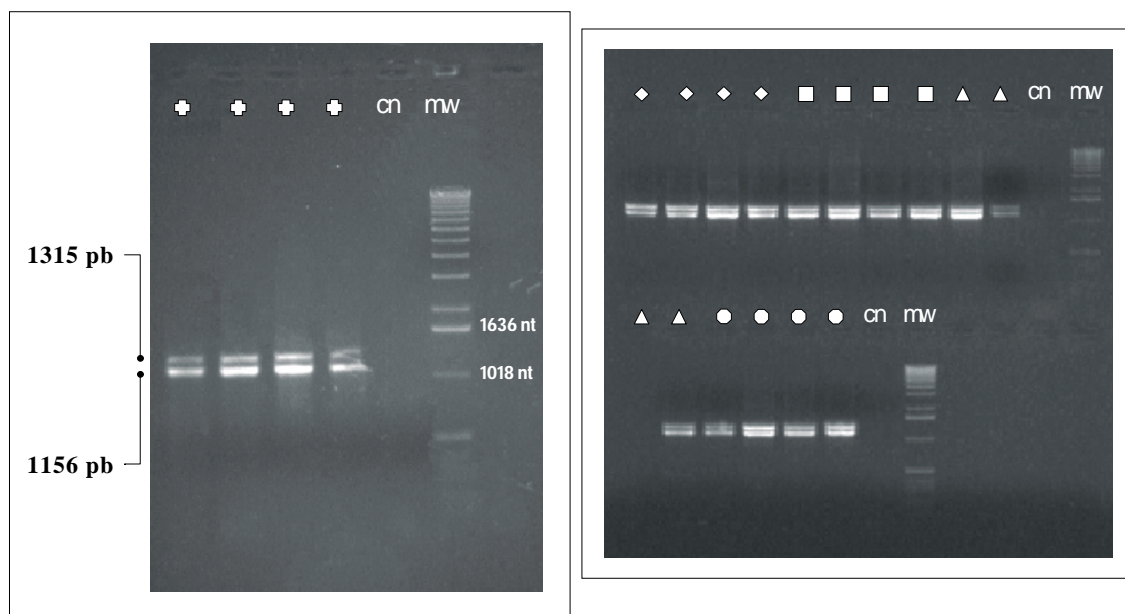


Figura R2. Amplificación por PCR del fragmento exón2-intrón2-exón3 del gen MR1 humano en individuos zulus (cruces), tanzanos (rombos), chinos (cuadrados), caucásicos del oeste sahariano (triángulos) y europeos (círculos). cn: control negativo; mw: marcador de peso molecular DNA Molecular Weight Marker X 0'07-12'2 Kbp (Roche Diagnostics GMBH).

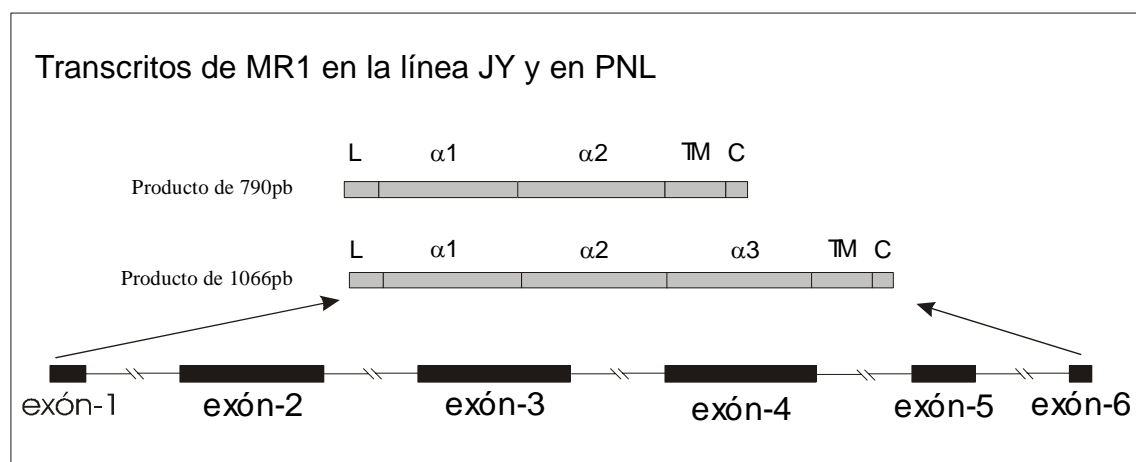
La secuencia del fragmento de 1156 pb correspondía a la región exón2-intrón2-exón3 del gen MR1 y solamente en uno de los veinticinco individuos analizados encontrábamos diferencias con respecto a la secuencia ya conocida (Hashimoto K et al., 1995; clave de acceso en la base de datos

GenBank: U22963). Este caso particular se trata de un individuo caucásico, al cual nos referiremos con las siglas PNL. En PNL, el exón 2 de MR1 (acceso GenBank: AJ249778) presenta una substitución puntual del tipo transición de G a A (*Figura R4*), que da lugar a una mutación sinónima en el codón 25 (TCG→TCA, Ser25).

Para determinar si en el individuo PNL, MR1 presentaba más diferencias con respecto a la secuencia previamente publicada (Hashimoto K et al., 1995, acceso GenBank: U22963), amplificamos el cDNA de MR1 mediante RT-PCR a partir de linfocitos de sangre periférica. La línea celular JY se utilizó como control, JY es una línea B-linfoblastoide transformada con el virus de Epstein-Barr. En ambas muestras obtuvimos dos productos de 790 pb y 1066 pb. Estos productos de RT-PCR se clonaron y al menos tres clones de cada tipo se secuenciaron manualmente.

El amplificado de mayor tamaño (1066 pb) contiene la secuencia de cDNA completa para MR1 (*Figura R3*).

El amplificado de menor tamaño (790 pb) es una isoforma transcripcional de MR1 generada por *splicing* alternativo, en la cual no está presente el exón 4 que codifica para el dominio $\alpha 3$ (*Figura R3*). Como no aparecen codones STOP prematuros en la secuencia traducida del amplificado de 790 pb, esta isoforma codificaría una putativa proteína



idéntica a MR1 pero sin su dominio $\alpha 3$.

En la secuencia de los amplificadores de la línea JY no encontramos variaciones con respecto a la secuencia conocida de MR1 (Hashimoto K et al., 1995). Sin embargo 6 de los 16 clones con los amplificadores de la muestra PNL presentaban dos mutaciones puntuales en los codones 25 y 292 (24 y 313 en Parra-Cuadrado JF et al., 2000). Por tanto el individuo PNL es heterocigoto para el gen MR1, tal que un alelo es el mayoritario en la población (Hashimoto K et al., 1995) y el otro alelo presenta las dos variaciones descritas (acceso GenBank: AJ249778). Curiosamente la mayoría de los clones con la isoforma transcripcional de 790 pb carente del

Figura R3. Isoformas transcripcionales del gen MR1 amplificadas por RT-PCR en la muestra PNL y en la línea linfoblástide JY. L: péptido líder; TM: dominio transmembranal; C: dominio citoplasmático.

dominio $\alpha 3$ eran portadores de estas mutaciones.

En el codón 25, localizado en el dominio $\alpha 1$, aparece una mutación sinónima producida por una transición de G a A que ya había sido detectada al secuenciar parcialmente el gen MR1 como se ha descrito anteriormente (Figura R4). Y en el codón 292, localizado en el dominio transmembranal, aparece una transición de T a C que tampoco produce cambio de aminoácido (ATT→ATC, Ile292) (Figura R4).

Ninguna de las diferencias detectadas en la secuencia nucleotídica produce variaciones en la secuencia aminoacídica, con lo cual en el nuevo alelo de MR1 se preserva la secuencia aminoacídica. Con estos datos podemos afirmar que MR1 es un gen no polimórfico y los escasos cambios que aparecen en las poblaciones humanas tienden a mantener la estructura primaria de la proteína.

A		1	↑ PÉPTIDO LÍDER				50
	<i>MR1-PNL</i>	-----					-----
	<i>MR1</i>	<u>GGACTATGGG</u>	<u>GGAAC TGATG</u>	GCGTTCCTGT	TACCTCTCAT	CATTGTGTTA	
		51	↑ DOMINIO α1				100
	<i>MR1-PNL</i>	-----					-----
	<i>MR1</i>	ATGGTGAAGC	ACAGCGATTC	CCGGACGCAC	TCTCTGAGAT	ATTTTCGCCT	
		101					150
	<i>MR1-PNL</i>	-----					----- A -----
	<i>MR1</i>	GGGCGTTTCG	GATCCCATCC	ATGGGGTCCC	TGAATTTATT	TCGGTTGGGT (Ser)	
		151					200
	<i>MR1-PNL</i>	-----					-----
	<i>MR1</i>	ACGTGGACTC	GCACCCTATC	ACCACATATG	ACAGTGTAC	TCGGCAGAAG	
		201					250
	<i>MR1-PNL</i>	-----					-----
	<i>MR1</i>	GAGCCACGGG	CCCCATGGAT	GGCAGAGAAC	CTCGCGCCTG	ATCACTGGGA	
		251					300
<i>MR1-PNL</i>	-----					-----	
<i>MR1</i>	GAGGTACACT	CAGCTGCTGA	GGGGCTGGCA	GCAGATGTTT	AAGGTGGAAC		
	301	327//		// TM		900	
<i>MR1-PNL</i>	-----					-----//-----	
<i>MR1</i>	TGAAGCGCCT	ACAGAGGCAC	TACAATC//	//ACTATCC			
	901					950	
<i>MR1-PNL</i>	-----					----- C -----	
<i>MR1</i>	CTCTTGATG	GAAAGCTGTC	TCTGGGTCCA	TTGTCCTTGT	CATTGTGCTG (Ile)		
	951					↑ CIT 1000	
<i>MR1-PNL</i>	-----					-----	
<i>MR1</i>	GCTGGAGTTG	GTGTTCTAGT	CTGGAGAAGA	AGGCCCCGAG	AGCAAAATGG		
	1001	STOP				1050	
<i>MR1-PNL</i>	-----					-----	
<i>MR1</i>	AGCCATCTAC	CTTCCAACAC	CAGATCGATG	ATTGCAGATC	<u>CCTCTTTTC</u>		
	1051	1066					
<i>MR1-PNL</i>	-----					-----	
<i>MR1</i>	<u>AGTCTCCTT</u>	<u>CCTCTA</u>					

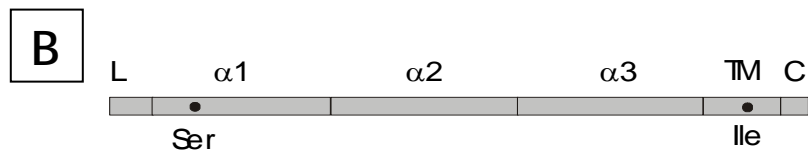


Figura R4. La secuencia de cDNA de MR1 en el individuo caucásico PNL (acceso GenBank: AJ249778) presenta dos mutaciones sinónimas con respecto a la secuencia de MR1 inicialmente descrita (acceso GenBank: U22963). Las mutaciones aparecen destacadas en negrita y la secuencia de los cebadores empleados en la reacción de RT-PCR aparece destacada en cursiva y subrayada (A). Estas mutaciones se localizan en el dominio $\alpha 1$ y en la región transmembranal (B).

2 IDENTIFICACIÓN EN HUMANOS DE UNA NUEVA SECUENCIA RELACIONADA CON MR1

Como se ha descrito en el apartado anterior, para analizar el polimorfismo de MR1 en humanos secuenciamos los exones 2 y 3 del gen MR1 en 25 individuos de diverso origen étnico. En este estudio la región del gen MR1 comprendida entre el exón 2 y el exón 3 se amplificó por PCR con cebadores específicos (*Figura R1*). De manera inesperada esta amplificación generó dos productos de PCR (*Figura R2*).

Como ya se ha mencionado, la secuencia del amplificado de menor tamaño (1156 pb) se conoció por secuenciación directa del producto de PCR mientras que el amplificado de mayor tamaño (1315 pb) se clonó en el vector pCR[®]2.1 (Invitrogen) y secuenciamos varios de estos clones.

La secuencia del amplificado de 1156 pb era idéntica a la secuencia de MR1 en la región exón2-intrón2-exón3, sin embargo el amplificado de 1315 pb no presentaba una similitud total con respecto a esa región. Por tanto el amplificado de 1315 pb es una nueva secuencia relacionada con MR1 que tiene un 92'39% de similitud con la región exón2-intrón2-exón3 de MR1. A esta nueva secuencia la denominamos MR1P1 (acceso GenBank: AJ132011) porque inicialmente fue identificada como parte de un pseudogen de MR1 hasta entonces no conocido (*MR1 Pseudogene 1*).

La secuencia de MR1P1 presenta con respecto a la del gen MR1 humano (acceso GenBank: AF073485) una substitución puntual consistente en una transición de G a A (TGG→TGA) en la región homóloga al exón 3 de MR1 (*Figura R5*). En el caso de que MR1P1 se transcribiese y tradujese, esta mutación daría lugar a la aparición de un codón STOP (Trp>STOP). Por esa razón catalogamos inicialmente MR1P1 como un pseudogen.

En general la secuencia de MR1P1 presenta con respecto a MR1 varias sustituciones puntuales (transiciones y transversiones) en las regiones homólogas a los exones 2 y 3 de MR1 y en la región homóloga al intrón 2 de MR1. Por otra parte deleciones e inserciones sólo se localizan en la región homóloga al intrón 2 de MR1 (*Tabla R1*). Mientras que el número

de mutaciones puntuales en las regiones homólogas a los exones 2 y 3 es igual (9), en la región homóloga al intrón 2 el número de mutaciones puntuales es siete veces superior aunque sólo sea 3'8 veces más grande que cada una de esas regiones homólogas a los exones. Estos datos nos sugieren que en MR1P1 podría estar actuando la presión selectiva con diferente intensidad en las regiones homólogas a los exones y en la región homóloga al intrón 2, encontrándose más relajada en esta última sección.

Tabla R1. La secuencia de MR1P1 (acceso GenBank: AJ132011) presenta a lo largo de las regiones homólogas a los exones 2 y 3 y al intrón 2 de MR1 (acceso GenBank: AF073485) una distribución no uniforme de mutaciones puntuales (transiciones y transversiones), inserciones y deleciones.

	Exón 2	Intrón 2	Exón 3
<i>Transiciones</i> A>G/G>A	6	22	4
T>C/C>T	2	16	3
<i>Transversiones</i> A>T/T>A	1	3	1
A>C/C>A	-	7	1
G>C/C>G	-	3	-
G>T/T>G	-	5	-
<i>Inserciones</i>	-	4	-
<i>Deleciones</i>	-	11	-

		EXÓN-2 (DOMINIO $\alpha 1$)	
A	MR1P1	1	GGCGTTTCGGATCCCATCCATGGGGTCCCTGAA 33
	MR1	767GGCGTTTCGGATCCCATCCATGGGGTCCCTGAA 800
	MR1P1	34	TTTATTTTCAGTTGGGTATGTGGACTCGCACCCCTATCACCACATATGACAG 83
	MR1	801	TTTATTTTCGGTTGGGTACGTGGACTCGCACCCCTATCACCACATATGACAG 850
	MR1P1	84	TGTCACTCAGCAGAAGGAGCCACGGGCCCATGGATGGCAGAGAACCTCG 133
	MR1	851	TGTCACTCAGCAGAAGGAGCCACGGGCCCATGGATGGCAGAGAACCTCG 900
	MR1P1	134	TGCCTGATCACTGGGAGAGGTACTCAGCTGCTGAAGGGCTGGCAGCAG 183
	MR1	901	CGCCTGATCACTGGGAGAGGTACTCAGCTGCTGAGGGGCTGGCAGCAG 950
	MR1P1	184	ATGTTCAAGGTGGAAGTGAAGCGCCAGCAGAGACACTACAATCACTCAG... 232
	MR1	951	ATGTTCAAGGTGGAAGTGAAGCGCCTACAGAGGCACTACAATCACTCAG... 999

B

INTRÓN-2

MR1P1G 233

MR1G 1000

```

MR1P1 234 TGTGCATGCAGCAGAGACAGACGCTTCCCTCACCCCA.....CAG 273
      |||
MR1 1001 TGTGCATGCGGCAGAGACAGACGCTTCCCCATCCCACCCCAACCCGCAG 1050
      |||
MR1P1 274 AGGCCCTGGGCTGACCTCCAATGAGC.AATGCTGACTTGCACCTGCTGT 322
      |||
MR1 1051 AGACCCCTGGGCTGGCTCCAATAAGCGGATGCTGAATTGCACCTGCTGT 1100
      |||
MR1P1 323 GGCTTTTGCCAAAACCTGGGAAATCTGGTTGGTGTAGTTTCAGAGCGTCCC 372
      |||
MR1 1101 AGC.TTTGGCAAAGCCTGAGGAATCAGGTTGGTGGAGTTTCAGGGCCTCCC 1149
      |||
MR1P1 373 ATCTGCCTGTGCATCTTCTGGACTGTCCCTCTCTCCCCCAGGAGCCCTTT 422
      |||
MR1 1150 ATCTGCCTGTGCATCTTCTGGACTGTCCCTCTCTCCCCCAGGAGCACTCT 1199
      |||
MR1P1 423 ATCTCTGCGCATCCCC.CTTCCC..... 446
      |||
MR1 1200 GTCATTTGCCCCACCCACTCTTCCCCTCTCTGTATCCGTATCTGCATCC 1249
      |||
MR1P1 447 .....CATATCCCATCTCCTTTCCCATTTCTAAATTTG 479
      |||
MR1 1250 CATTTCACCTCAGGCTTCTGATATGCATCTCCTTTCCATTCTAAATTTG 1299
      |||
MR1P1 480 CCCGTTCTGTGTCTCACTTCTTGGTAGCCAGGCTAGTGACCTGCTTGCT 529
      |||
MR1 1300 CCCATCTCTCGTCTCACTTCTTGGTAGTCAGGCTAGTGA....CTTGCT 1345
      |||
MR1P1 530 TATGCACAATGACATTAACCTTTCCAGGATATTTCTAGCTCCTGCATCT 579
      |||
MR1 1346 TATGAGTATCGACAGTAACTTTCCAGGGATATTTCTGGCTCCTGCATCT 1395
      |||
MR1P1 580 CTCTCCCTCCTCCACTGCACCTCA.AATAGCCACAGTTTATCAATCAATCA 628
      |||
MR1 1396 CTCTCCCTCCTCAACTGCAGTCAGAATAGCCACAAAGTTT..ATCAGTCA 1443
      |||
MR1P1 629 TTCCCATTACAGGATAACTCCCAAGAGGGGAATTATCACACTCCTTTGG 678
      |||
MR1 1444 TTCCCATTACAGGATAACTCCCAAGGCGGGGAATTAGCACACTCCTTTGA 1493
      |||
MR1P1 679 CATGCAGTAGG.ACTTCACAAATACCTGTTGTAGAGTGGTATAATGGACA 727
      |||
MR1 1494 CAGGCAGTAGGTACTTCACAGATA..... 1517
      |||
MR1P1 728 CTGGCGACTCAGGAAGGGGAAAGGTGGAAGGTGGGTGAGGTGAAAAAAC 777
      |||
MR1 .....
MR1P1 778 CACCTACTGAGTACAACATACACGATTTGGGTGACAGATACACCAAAGC 827
      |||
MR1 .....
MR1P1 828 CCAGAGTTCAACACTACACGGTTCATCCATGCAATCAAAACTACTTGTA 877
      |||
MR1 .....
MR1P1 878 TCCCTAAAGCTATATGAACCAAAAAAATTTAAAAACAACCTGCTGTC 927
      |||
MR1 1518 .....CCTGCTGAC 1526
      |||
MR1P1 928 AGGTGGGCTTCCA.AAGAGGGACCTCCTGGGGACTTAGCGATGCCACAGC 976
      |||
MR1 1527 AGGTGGGCTTCCATAAGGGGACCTCCTGGGGACTCAGCGATGCCATGGC 1576
      |||
MR1P1 977 AGGCCTGTGGGTGAC.....GTAGACCAAAGGATGCTTCCAGCCATGCC 1021
      |||
MR1 1577 AGGCCTGGGGGTGACATAATGTAGACCAAAGGATGCTTCCAGCCATGCC 1626
      |||
MR1P1 1022 CCTGCTCCAGCACTTGAGAGCCACCTCTGTCTCTGTGTGGA.CCCTCT 1070
      |||
MR1 1627 CCTGCTCCAGCACTTGAGAGCCACCTCTGTCTCTGTGTGGAACCCCTCT 1676
      |||
MR1P1 1071 GGGCT..TGCGTGTGTTCCAG..... 1089
      |||
MR1 1677 GGGCTTCTGTGTGTTCCAG..... 1697
      |||

```

		EXÓN-3 (DOMINIO $\alpha 2$)	
C	MR1P1	1090GGTCTCACACTTACCAGAGAATGATTGGC 1118
	MR1	1698GGTCTCACACTTACCAGAGAATGATTGGC 1726
	MR1P1	1119	TGTGAGCTGCTGGAGGATGGAAGCACTACAGGATTTCTGCAGTATGCATA 1168
	MR1	1727	TGTGAGCTGCTGGAGGATGGAAGCACCACAGGATTTCTGCAGTATGCATA 1776
	MR1P1	1169	TGATGGGCAGAAATTTCTGATCTTCAATAAAGACACCCTCTCCTGACTGG 1218
	MR1	1777	TGACGGGCAGGATTTCTGATCTTCAATAAAGACACCCTCTCCTGGCTGG 1826
	MR1P1	1219	CTGTAGATAATGTGGCTCACACCATCAAGAGGGCACGGGAGGCCAATCAG 1268
	MR1	1827	CTGTAGATAATGTGGCTCACACCATCAAGCAGGCATGGGAGGCCAATCAG 1876
	MR1P1	1269	CATGAGTTGCAATATCAAAAGAATTGGCTGGAAGAAGAATGTATTGC 1315
	MR1	1877	CATGAGTTGCTGTATCAAAAGAATTGGCTGGAAGAAGAATGTATTGC..... 1923

Figura R5. La secuencia de MR1P1 (acceso GenBank: AJ132011) es homóloga al exón 2 (A), intrón 2 (B) y exón 3 (C) del gen MR1 (acceso GenBank: AF073485). MR1P1 presenta una mutación sin sentido (G>A, W>STOP) en la región homóloga al exón 3 (C). En negrita se reseñan las diferencias entre MR1 y MR1P1. En cursiva y subrayado aparece la secuencia de los cebadores.

Entre las deleciones e inserciones cabe destacar una deleción de 10 pb, otra de 43 pb y una inserción de 217 pb (Figura R5), que explican la diferencia de tamaño entre los dos productos de PCR obtenidos (1156pb (MR1) y 1315 pb (MR1P1)).

Una de las características más llamativas de MR1P1 es esa inserción de 217 pb sita en la región homóloga al intrón 2 de MR1. En la base de datos de secuencias repetidas humanas (RepBase) realizamos una búsqueda de secuencias homólogas a esta inserción de 217 pb. Para ello utilizamos el programa informático CENSOR (Jurka J et al., 1996) desarrollado por el GIRI (*Genetic Information Research Institute*, California, USA, <http://www.girinst.org/>). El resultado fue una homología del 75% con el extremo 3' de la secuencia consenso del elemento LINE-1 (*Long Interspersed Nuclear Element*) subfamilia L1PB3 (Smit AF et al., 1995). Los elementos LINE son secuencias repetidas no virales cuya transposición es mediada por la transcriptasa inversa. Son los elementos transponibles más comunes en los mamíferos, siendo L1 (LINE-1) el más común en el genoma humano. Los

elementos L1 con un tamaño entre 6 y 8 Kb se componen de dos marcos abiertos de lectura, uno de los cuales codifica para la transcriptasa inversa. La inserción de 217 pb en MR1P1 no es homóloga a ninguno de los marcos abiertos de lectura sino a una región *downstream* del segundo marco abierto de lectura.

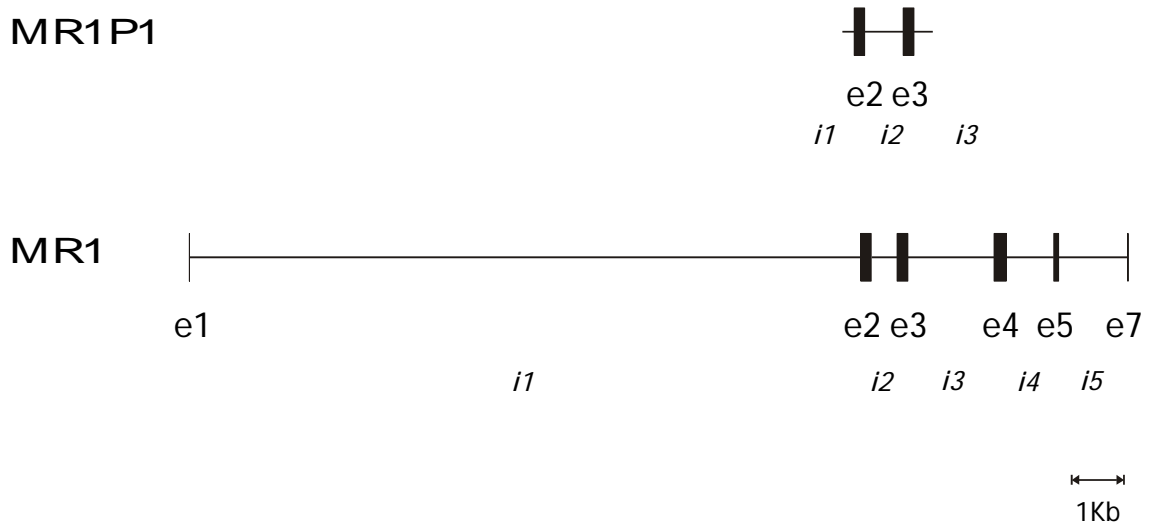
Mientras estábamos elaborando estos datos detectamos en la base de datos GenBank una secuencia (MR1B, acceso GenBank: AF073486) 99'7% similar a MR1P1. MR1B y MR1P1 son dos secuencias de la misma región genómica y las discrepancias entre ambas se localizan en la región homóloga al intrón 2 de MR1.

La reciente culminación del proyecto de secuenciación del genoma humano (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001) nos facilitó la búsqueda de nuevas secuencias con una alta homología a MR1 y MR1P1. Las secuencias del gen MR1 (acceso GenBank: AF073484, AF073485) y de MR1P1 (acceso GenBank: AJ132011) se compararon con la secuencia completa del genoma humano, para lo cual utilizamos la herramienta *blast genome* desarrollada por el NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, Bethesda MD, USA, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

El análisis de estas comparaciones nos corroboró que el gen MR1 está presente en copia única en el genoma humano como había sido detectado previamente por southern-blot y tiene un tamaño aproximado a 21530 pb.

Además la única secuencia relacionada con MR1 existente en el genoma humano es MR1P1. También averiguamos que MR1P1 no es un pseudogen sino un fragmento génico de MR1 que se encuentra en el cromosoma 1 próximo a MR1 (*Figura R6*). En realidad MR1P1 es 0'7kB más grande que la secuencia identificada anteriormente como MR1P1, se trata de un fragmento génico homólogo a una región del gen MR1 que se extiende desde el intrón 1 hasta el intrón 3 (*Figura R6*) en el cual la presión selectiva no está actuando de forma uniforme. A raíz de estos resultados se desestimó la posibilidad de analizar si MR1P1 formaba parte de un elemento que se transcribiese como ocurre con determinados pseudogenes.

A



B

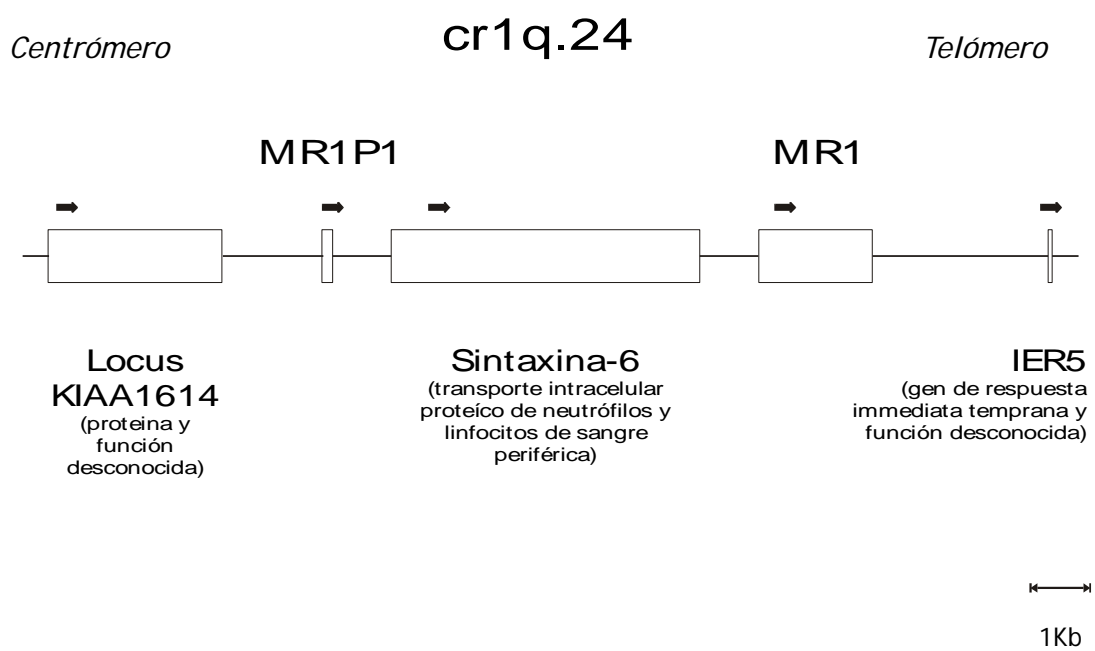


Figura R6. *MR1P1* es un fragmento génico homólogo a la región comprendida entre el extremo 3' del intrón 1 y el extremo 5' del intrón 3 del gen *MR1* humano (A) y se localiza en el brazo largo del cromosoma 1 próximo a *MR1* (B).

3 IDENTIFICACIÓN DE NUEVAS SECUENCIAS RELACIONADAS CON MR1 EN PRIMATES SUPERIORES

En 1999 la secuencia del ARNm de MR1 era conocida en tres especies: humano (*Homo sapiens*), ratón (*Mus musculus*) y rata (*Rattus norvegicus*). El análisis comparativo de estas secuencias reveló que la secuencia codificante de MR1 está muy conservada, excepto en la región citoplasmática. De tal manera que se podían establecer diferencias entre el hombre y el grupo de los roedores. Con el fin de determinar si estas similitudes y diferencias se mantienen en especies cercanas al hombre decidimos secuenciar MR1 en tres especies de primates superiores no humanos, chimpancé común (*Pan troglodytes*), gorila (*Gorilla gorilla*) y orangután (*Pongo pygmaeus*). Y así poder establecer diferencias entre el grupo de los primates superiores y el grupo de los roedores.

Para identificar MR1 en especies próximas a la humana procedimos a amplificar el cDNA de MR1 en chimpancé común, gorila y orangután. En este estudio empleamos las líneas linfoblastoides CARL de chimpancé común, ROK de gorila y PUTI de orangután obtenidas en la ATCC (*American Type Culture Collection*, Manassas VA, USA, <http://www.atcc.org/>). CARL, ROK y PUTI son líneas de linfocitos B transformados con el virus de Epstein-Barr. De ellas extrajimos el ARN total y amplificamos el cDNA homólogo al MR1 humano empleando los cebadores que amplifican el cDNA de MR1 en humanos.

En el caso del gorila no obtuvimos ningún amplificado (resultado no mostrado), a pesar de que realizamos varios intentos modificando parámetros de PCR como la concentración de magnesio o la temperatura de hibridación. Variaciones en las regiones de hibridación con los cebadores podrían explicar esta ausencia de amplificado.

En chimpancé común y orangután logramos amplificar una banda de 1066 pb y con menor intensidad una de 790 pb y otra de 710 pb (*Figura R7*). Todos los productos de RT-PCR, excepto la banda de 710 pb amplificada en

chimpancé, se consiguieron clonar y al menos tres clones de cada tipo fueron secuenciados automáticamente. En total secuenciamos 15 clones de chimpancé y 12 de orangután.

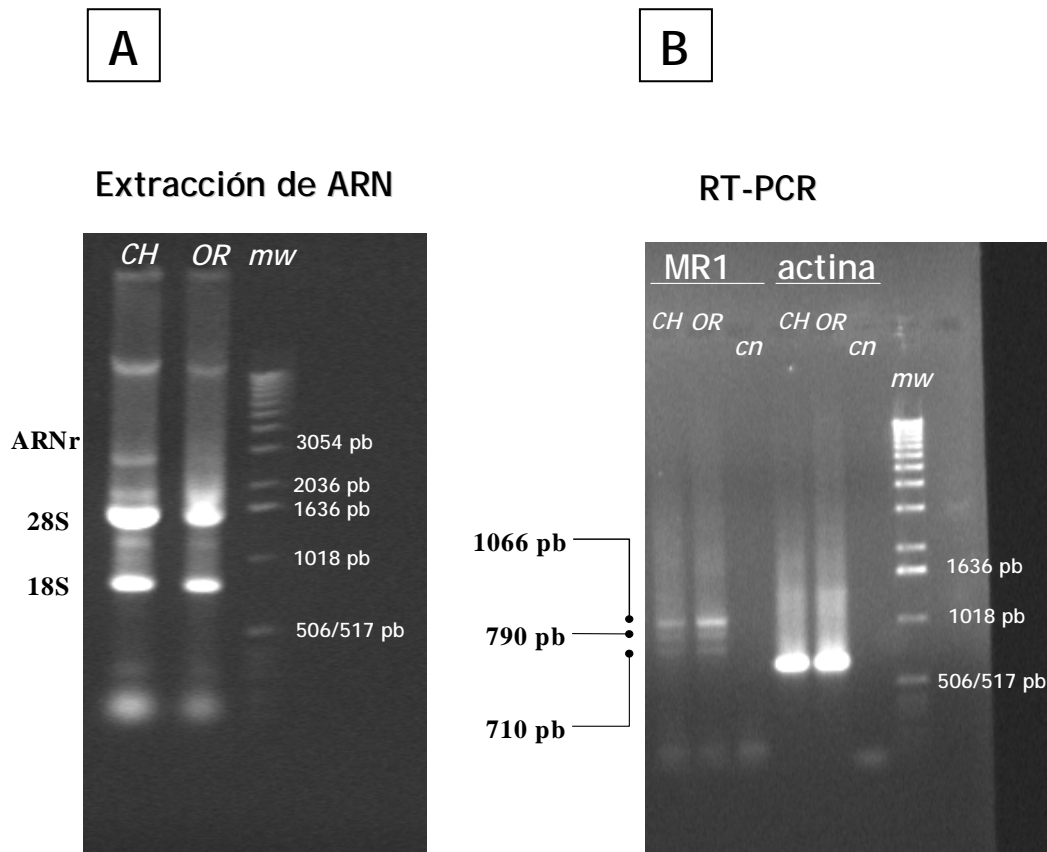


Figura R7. El ARN total de las líneas CARL (chimpancé común) y PUTI (orangután) fue extraído (A) para ser utilizado en la reacción de RT-PCR en la cual se amplificaron tres transcritos de MR1 de 1066pb, 790pb y 710pb (B). La amplificación por RT-PCR del cDNA de la actina (B) se utilizó como control de la reacción. cn: control negativo; mw: marcador de peso molecular DNA Molecular Weight Marker X 0'07-12'2 Kbp (Roche Diagnostics GMBH).

3.1 Amplificación del cDNA de MR1 en orangután

En orangután amplificamos, clonamos y secuenciamos tres transcritos de MR1. El transcrito de mayor tamaño (1066 pb, acceso GenBank: AJ271828) contiene la información necesaria para que se sintetice la proteína completa (péptido líder, dominios extracelulares $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$, región transmembranal y citoplasmática). Los amplificadores de 790 pb (acceso

GenBank: AJ271829) y 710 pb (acceso GenBank: AJ271830) son isoformas transcripcionales de MR1 generadas por *splicing* alternativo (*Figura R8*).

El transcrito de 790 pb se caracteriza por la falta del exón 4, tal que codifica para una putativa proteína con la misma secuencia aminoacídica que MR1 pero sin los residuos del dominio $\alpha 3$ (*Figura R9*).

El transcrito de 710 pb se caracteriza por la falta del exón 4 (dominio $\alpha 3$) y 79 pb en el extremo 3' del exón 2 (dominio $\alpha 1$) (*Figura R9*). La pérdida parcial del exón 2 es debida a la presencia de un sitio donador de *splicing* críptico a 80 pb del extremo 3' de dicho exón. Este sitio críptico donador interactúa con el sitio aceptor localizado en el extremo 5' del exón 3, con lo cual se elimina el intrón 2 junto con 80 pb del exón 2. Esta situación provoca la ruptura de la pauta de lectura y aparece un codón STOP prematuro en el extremo carboxilo del dominio $\alpha 1$. Por tanto el transcrito de 710 pb codifica para un putativo péptido de 83 aminoácidos formado por el péptido líder y parte del dominio $\alpha 1$.

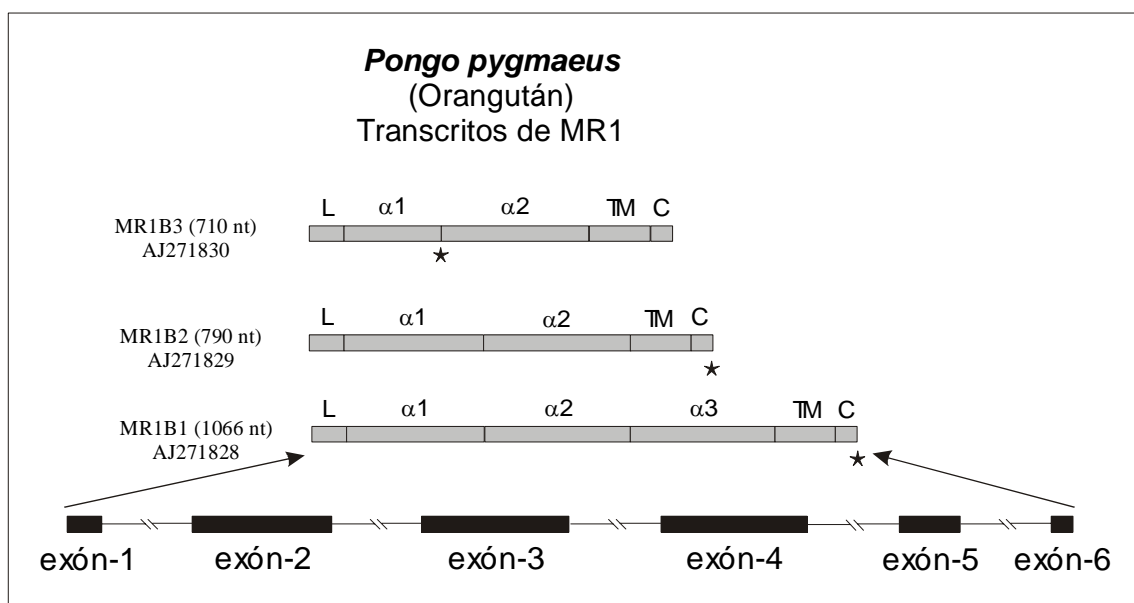


Figura R8. Isoformas transcripcionales del gen *MR1* amplificadas por RT-PCR en línea linfoblástoide PUTI (ATCC CRL 1850) de orangután (*Pongo pygmaeus*). El asterisco indica la posición del codón STOP en cada transcrito. L: péptido líder; TM: dominio transmembranal; C: dominio citoplasmático.

	↑ PÉPTIDO LÍDER	↑ DOMINIO α1	
OR1	<i>ggactatgggggaactgatg</i> GCATTCTGTACCTCTCATCATTGTGTTAATGGTGAAGCACAGCAATTC	CCGGACGCACTCTCTGAGATATTTTCGCTGGGTGTTTCAGATCCCATCCGTGGGGTCCCTGAATTTATTT	CGGTTGGAT 150
OR2	-----	-----	150
OR3	-----	-----	150
OR1	ATGTGGACTCGCACCCCTATCACCACATATGACAGTGTCACTCAGCAGAAGGAGCCACGGGCCCATGGATGGCAGAGAACCTCGCGCTGATCACTGGGAGAGGTACACTCAGCTGCTGAGGGGCTGGCAGCAGATGTTCAAGGTGGAAC		300
OR2	-----		300
OR3	-----		254
	↑ DOMINIO α2		
OR1	TGAAGCGCTGCAGAGGCACTACAATCACTCAGGGTCTCACACTTACCAGAGAATGATGGCTGTGAGCTGCTGGAGGATGGAAGCACCACAGGATTTCTGCAGTATGCATATGACGGGCAGGATTTCTTGATCTTCAATAAAGACACCC		450
OR2	-----		450
OR3	-----		370
OR1	TCTCCTGGCTGGCTGTAGATAATGTGGCTCACACCATCAAGCGGGCATGGGAGGCCAATCAGCATGAGTTGCAATATCAAAGAATGGCTGGAAGAAGAATGTATTGCCTGGCTAAAGAGATTCCTGGAATATGGGAAAGACACCCTAC		600
OR2	-----		600
OR3	-----		520
	↑ DOMINIO α3		
OR1	AAAGAACAGAGCCCCACTGGTCAGAGTAAATCGCAAAGAAACTTTTCAGGGGTTACAACCTCTTCTGCAAAGCTCATGGCTTTTACCCCCAGAAATTTACATGACATGGATGAAAAACGGGGAAGAAATTTGTCCAAGAAATGGATT		750
OR2	-----		610
OR3	-----		610
		↑ TM	
OR1	ATGGAGACATTCTTCCCAGTGGGGATGGAACCTATCAGACGTGGGCATCATTGAGCTTGATCCTCAGAGCAGCAACCTTTACTCCTGTCTATGTGGAGCACTGCGGTGTCCACATGGTTCTTCAGGTCCCCAGGAATCAGAAGCTATCC		900
OR2	-----		624
OR3	-----		544
		↑ COLA CITOPLASMÁTICA	STOP
OR1	CTCTTGTGATGAAAGCTGTCTCTGGGTCCATTGTCTTTGTCTATGTGCTGACTGGAGTTGGTGTCTAGTCTGGAGAAGAAGCCCCGAGAGCAAAATGGAGCCGTCTACCTTCCAACACCAGAT TGATGACTGCAGAT <i>ccctcttttc</i>		1050
OR2	-----		774
OR3	-----		694
OR1	<i>agttctcttctctcta</i> 1066		
OR2	----- 790		
OR3	----- 710		

Figura R9. Alineamiento de las secuencias nucleotídicas de las isoformas transcripcionales del gen MR1 de orangután (*Pongo pygmaeus*). Los guiones indican igualdad con respecto a la secuencia OR1 y los espacios en blanco ausencia de homología. Los cebadores aparecen en minúscula y en cursiva. El codón de inicio es subrayado y el de parada destacado en negrita. Tm: dominio transmembranal.

OR1: MR1B1 (1066 pb) Acceso GenBank: AJ271828.

OR2: MR1B2 (790 pb) Acceso GenBank: AJ271829.

OR3: MR1B3 (710 pb) Acceso GenBank: AJ271830.

3.2 Amplificación del cDNA de MR1 en chimpancé común

En chimpancé clonamos y secuenciamos un transcrito de 1066 pb (números de acceso AJ275982 y AJ275984) y otro de 790 pb (números de acceso AJ275983 y AJ275985). Como en el caso del orangután, el transcrito de mayor tamaño codifica para la proteína MR1 completa y el otro para una putativa isoforma proteica de MR1 sin el dominio $\alpha 3$ debido a la pérdida del exón 4 por *splicing* alternativo (*Figura R10 y R12*).

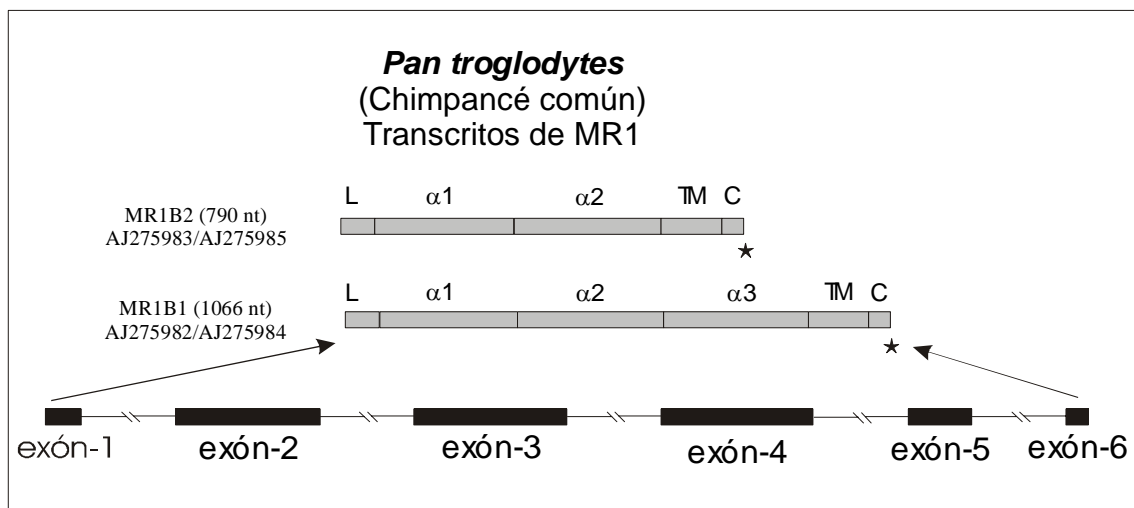


Figura R10. Isoformas transcripcionales del gen MR1 amplificadas por RT-PCR en la línea linfoblásticoe CARL (ATCC CRL 1857) de chimpancé común (*Pan troglodytes*). El asterisco indica la posición del codón STOP en cada transcrito. L: péptido líder; TM: dominio transmembranal; C: dominio citoplasmático.

	↑ PÉPTIDO LÍDER	↑ DOMINIO α1	
CH1	<i>ggactatgggggaactgatg</i> GCCTTCCTGTTACCTCTCATCATTGTGTAAATGGTGAAGCACAGCGATTCCCGGACGCACTCTCTGAGATATTTTCGCCTGGGCGTTTCGGATCCCATCCATGGGGTCCCTGAATTTATTTTCGGTTGGGT		150
CH2	-----		150
CH3	-----		150
CH4	-----		150
CH1	ACGTGGACTCGCACCCCTATCACCACATATGACAGTGTCACTCGGCAGAAGGAGCCACGGGCCCATGGATGGCAGAGAACCCTCGCGCCTGATCACTGGGAGAGGTACTACTCAGCTGCTGAGGGCTGGCAGCAGATGTTCAAGGTGGAAC		300
CH2	-----		300
CH3	-----		300
CH4	-----		300
	↑ DOMINIO α2		
CH1	TGAAGCGCTGCAGAGGCACTACAATCACTCAGGGTCTCACACTTACCAGAGAATGATTGGCTGTGAGCTGCTGGAGGATGGAAGCACCACAGGATTTCTGCAGTATGCATATGACGGGCAGGATTTCTGATCTTCAATAAAGACACC		450
CH2	-----		450
CH3	-----		450
CH4	-----		450
CH1	TTTCCTGGCTGGCTGTAGATAATGTGGCTCACACCATCAAGCAGGCATGGGAGGCCAATCAGCATGAGTTGCTGTATCAAAAAGAATTGGCTGGAAGAAGAATGTATTGCCTGGCTAAAGAGATTCCTGGAGTATGGGAAAGACACCCTAC		600
CH2	-----	T-----	600
CH2	-----	-----C-----	600
CH2	-----	-----T-----	600
	↑ DOMINIO α3		
CH1	AAAGAACAGAGCCCCACTGGTCAGAGTAAATCGCAAAGAACTTTTCAGGGGTTACAGCTCTCTTCTGCAAAGCTCATGGCTTTTACCCCCAGAAATTTACATGACATGGATGAAAAACGGGAAGAAATGTCCAAGAAATTGATT		750
CH2	-----		750
CH3	-----		610
CH4	-----		610
		↑ TM	
CH1	ATGGAGACATTCTTCCCAGTGGGATGGAACCTATCAGACGTGGGCATCAGTTGAGCTTGATCCTCAGAGCAGCAACCTTTACTCCTGTCATGTGGAGCACTGCGGTGTCCACATGGTTCTTTCAGGTCCCCAGGAATCAGAACTATCC		900
CH2	-----		900
CH3	-----	-----	624
CH4	-----	-----	624
		↑ COLA CITOPLASMÁTICA	
		STOP	
CH1	CTCTTGATGAAAGCTGTCTCTGGTCCATTGTCCTTGTGCATTGTGCTGGCTGGAGTTGGTGTCTTAGTCTGGAGAAGAAGGCCCGAGAGCAAAATGGAGCCATCTACCTTCCAACACCAGATCGATGATTGCAGATccctctttcc		1050
CH2	-----		1050
CH3	-----		774
CH4	-----		774
CH1	agttctccttcctcta	1066	
CH2	-----	1066	
CH3	-----	790	
CH4	-----	790	

Figura R11. Alineamiento de las secuencias nucleotídicas de las isoformas transcripcionales del gen MR1 de chimpancé común (*Pan troglodytes*). Los guiones indican igualdad con respecto a la secuencia CH1 y los espacios en blanco ausencia de homología. Los cebadores aparecen en minúscula y en cursiva. El codón de inicio es subrayado y el de parada destacado en negrita. TM: dominio transmembranal.

CH1: MR1B1 (1066 pb) Alelo C Acceso GenBank: AJ275982.

CH2: MR1B1 (1066 pb) Alelo T Acceso GenBank: AJ275984.

CH3: MR1B2 (790 pb) Alelo C Acceso GenBank: AJ275983.

CH4: MR1B2 (790 pb) Alelo T Acceso GenBank: AJ275985.

Las moléculas MR1 de orangután y chimpancé poseen un alto grado de homología con la molécula MR1 humana, siendo la similitud aminoacídica respecto a ella del 96'2% en orangután y del 99'7% en chimpancé.

En todos los clones analizados en orangután no encontramos diferencias en las secuencias de los distintos transcritos, a excepción de las particularidades ya comentadas. Sin embargo en chimpancé común, aproximadamente la mitad de los clones secuenciados (6 de 15) presentan una diferencia en el codón 176 (197 en Parra-Cuadrado et al 2001) localizado en el dominio $\alpha 2$

(Figura R12). Por tanto en algunos casos el codón 176 (ATC) codifica para isoleucina (accesos GenBank AJ275984 y AJ275985) mientras que en el resto codifica para treonina (ACC) (accesos GenBank AJ275982 y AJ275983) (Figura R11). Esto indica que

la línea CARL es heterocigota para el gen MR1. En orangután y humano está presente la treonina en la posición 176, por lo que Ile176

es una sustitución específica de chimpancé común que podría haber ocurrido durante el proceso evolutivo de especiación del chimpancé. La treonina es un aminoácido polar no cargado y la isoleucina es un aminoácido no polar, en consecuencia esta sustitución supone un cambio de polaridad. Como se aprecia en el modelado tridimensional de la molécula MR1 este cambio de polaridad se produce en uno de los extremos de una de las dos α -hélices que delimitan el posible surco de unión del péptido (Figura R12).

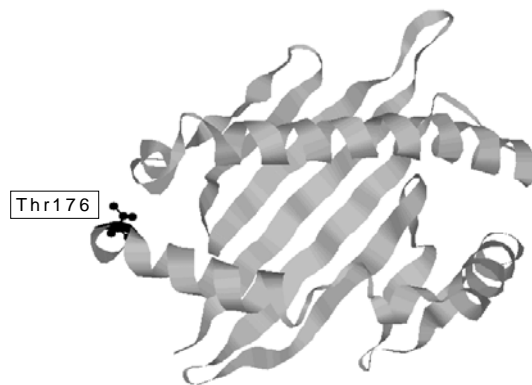


Figura R12. En chimpancé común se han identificado dos alelos de MR1 que varían en la posición 176 sita en el dominio $\alpha 2$.

El modelado tridimensional de MR1 se realizó en el servidor Swiss-Model. Este servidor es una herramienta muy útil para inferir la estructura tridimensional de proteínas no resueltas por cristalografía es el servidor Swiss-Model. Se puede acceder a él de forma pública a través del servidor de proteómica ExPASy (*Expert Protein Analysis System*, <http://us.expasy.org>) perteneciente al Instituto Suizo de Bioinformática (<http://www.isb-sib.ch>). En primer lugar Swiss-Model busca aquellas proteínas con estructura tridimensional resuelta por cristalografía que presentan un grado de homología significativo con la secuencia aminoacídica problema. Y posteriormente utiliza como moldes la estructura tridimensional de las proteínas con mayor grado de homología para inferir una posible estructura tridimensional a la proteína problema.

Al trabajar con la secuencia traducida del cDNA humano de MR1 se obtuvieron por homología los siguientes moldes:

- 1- Molécula MHC de clase I clásica humana: HLA-Cw4 (Códigos PDB: 1QQD (Fan QR y Willey DC, 1999) y 1IM9 (Fan QR et al., 2001)).
- 2- Molécula MHC de clase I clásica de rata (*Rattus norvegicus*): RT1-Aa (Código PDB: 1ED3 (Speir JA et al., 2001)).
- 3- Molécula MHC de clase I clásica de ratón (*Mus musculus*): H-2Dd (Código PDB: 1QO3 (Tormo J et al., 1999)).

En consecuencia Swiss-Model asignó por homología a la región extracelular de MR1 (dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$) la estructura típica de las moléculas MHC de clase I clásicas (*Figura R13*).

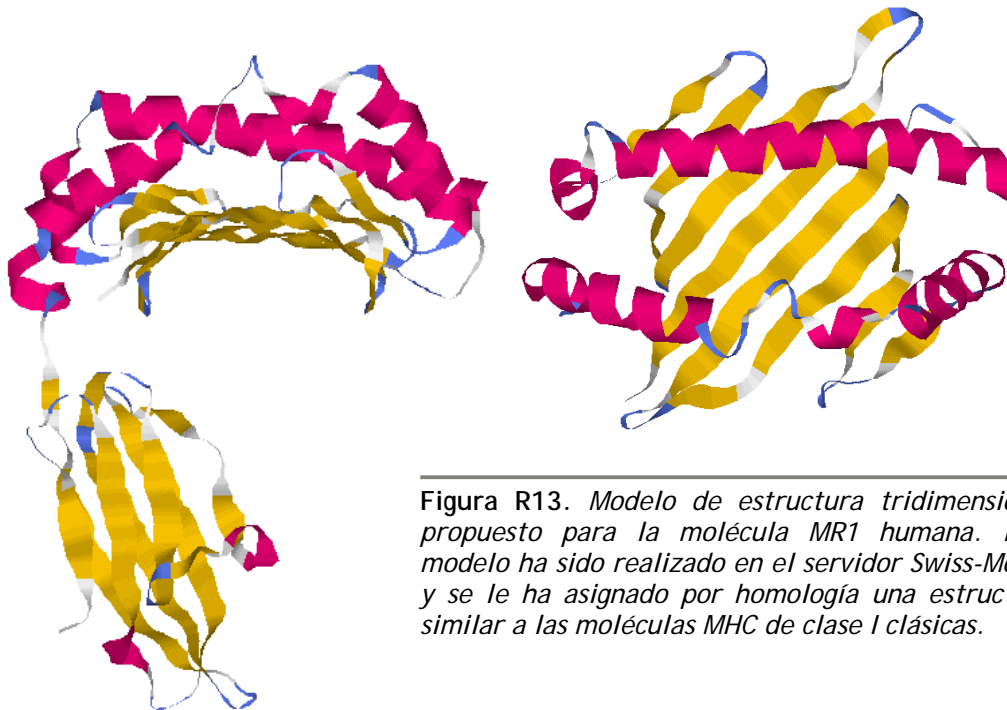


Figura R13. Modelo de estructura tridimensional propuesto para la molécula MR1 humana. Este modelo ha sido realizado en el servidor Swiss-Model y se le ha asignado por homología una estructura similar a las moléculas MHC de clase I clásicas.

3.3 Alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas de MR1

El cDNA de MR1 ha sido secuenciado en humano, chimpancé, orangután, rata y ratón (números de acceso U22963, AJ275984, AJ271828, Y13972, U944989 respectivamente). El alineamiento múltiple de sus secuencias aminoacídicas revela el alto grado de conservación de los dominios extracelulares $\alpha 1$ y $\alpha 2$ y la localización de las mayores diferencias entre roedores y primates en la región citoplasmática (*Figura R15*).

En general la molécula MR1 aparece muy conservada a lo largo de la evolución de los mamíferos. Además en MR1 están presentes la mayoría (34 de 40) de los residuos que se consideran conservados (Grossberger D y Parham P, 1992; Kaufman J et al., 1994) a lo largo de la evolución de las moléculas MHC de clase I clásicas (*Figura R15*). También se mantienen en MR1 las cisteínas descritas como relevantes para conseguir la estructura de las moléculas MHC de clase I clásicas y el sitio de N-glicosilación (N86XS) sito entre el dominio $\alpha 1$ y $\alpha 2$ (*Figura R15*).

Los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de MR1 constituyen la región más conservada de la molécula en contraposición con la alta variabilidad detectada en sus homólogos de las moléculas MHC de clase I clásicas. Por homología con las moléculas MHC-I clásicas, las diferencias entre roedores y primates en la putativa región de unión al péptido de MR1 se localizan en la zona de las α -hélices que interaccionaría con el extremo carboxilo del péptido (*Figura R14*). Si bien no es posible determinar si MR1 puede unir péptidos porque posee tan solo 3 (*Figura R15*) de los 8 residuos de las moléculas MHC-I clásicas involucrados en la unión del péptido (Madden DR, 1995).

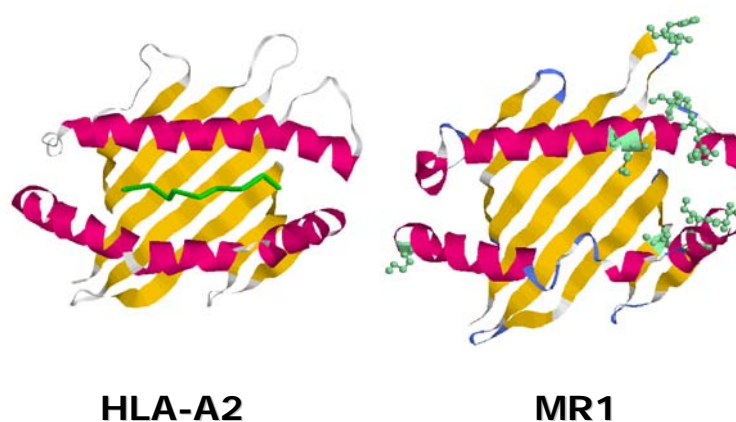


Figura R14. Las diferencias entre roedores y primates se localizan en una mitad de la putativa región de unión al ligando de MR1 que es homóloga a la región de interacción con el extremo carboxilo del péptido en HLA-A2.

En las moléculas MHC de clase I clásicas el dominio $\alpha 3$ interacciona con el correceptor CD8 y han sido determinados cuales son los residuos importantes en esa interacción (Saper MA et al., 1991). En la molécula MR1 de los nueve residuos necesarios para la unión a CD8, solamente tres están conservados pero cuatro más o bien son similares o pertenecen al mismo grupo (*Tabla R2*). Por tanto no queda claro si MR1 interacciona con CD8.

Tabla R2. Sitios de interacción con CD8 en las moléculas HLA-I clásicas y sus homólogos en MR1 (en todas las especies descritas) y en CD1 (molécula que no se une a CD8). La intensidad de color determina la similitud con respecto a HLA-A2.

	Posición	HLA-A2	MR1 Humano	MR1 Chimpancé	MR1 Orangután	MR1 Ratón	MR1 Rata	CD1A Humano
DOMINIO	222	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu

$\alpha 3$	223	Asp	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Gln
	224	Gln	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile	Glu
	225	Thr	Val	Val	Val	Ala	Val	Gln
	226	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln
	227	Asp	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly
	228	Thr	Ile	Ile	Met	Val	Val	Thr
	229	Glu	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Gln
	245	Ala	Ala	Ala	Ala	Leu	Val	Ala

En la región transmembranal la diferencia más notable es la presencia en primates de un aminoácido con carga positiva (lisina, Lys, K282) que es substituido en roedores por un residuo polar sin carga (Ser en ratón y Asn en rata) (*Figura R15*). Como es sabido el hecho de que un exón codifique para un dominio proteico no es una regla estricta sino que admite cierta flexibilidad. Por esa razón realizamos predicciones acerca de cual podría ser la región transmembranal de la molécula MR1. Estas predicciones se realizaron con los siguientes programas:

“DAS” <http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/> (Cserzo M et al., 1997).

“TMHMM” <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/> (Moller S et al., 2001).

“TopPred” <http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/toppred.html> (Von Heijne G, 1992; Claros MG y Von Heijne G, 1994).

“TMpred” http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html (Hofmann K y Stoffel W, 1992).

“PRED-TMR” <http://o2.db.uoa.gr/PRED-TMR/input.html>.

Para la molécula MR1 humana la región transmembranal propuesta siempre deja fuera el residuo K282, pero esto podía ser debido a un aspecto artefactual generado por el hecho de que la lisina es un aminoácido cargado positivamente y en consecuencia no adecuado para un ambiente hidrofóbico. Por tanto realizamos estas predicciones en las moléculas de MR1 en ratón y rata. La región transmembranal predicha en los roedores en ocasiones incluye la posición 282 y en otras no (*Tabla R3*). Lo que parece claro es que la región transmembranal no comienza en el aminoácido 272 como se podría predecir por la organización exón-intrón de MR1 sino que comienza entre la posición 281 y 287. En cualquier caso el residuo K282 no parece encontrarse

Tabla R3. Predicciones acerca de la posición de la región transmembranal en MR1 humano, ratón y rata

en una zona profunda de la hélice transmembranal más bien podría ocurrir que la carga positiva de este aminoácido es sacada fuera de la hidrofobicidad de la región transmembranal.

	MR1 Humano	MR1 Ratón	MR1 Rata
<i>DAS</i>	284-300	284-300	284-300
<i>TMHMM</i>	283-302	281-303	281-303
<i>TopPred</i>	283-302	282-302	283-303
<i>TMPred</i>	283-302	281-302	287-303
<i>PRED-TMR</i>	283-302	284-302	285-303

La región citoplasmática de MR1 en humanos y chimpancé tiene 13 aminoácidos, en orangután 12 y en rata y ratón 19. Pero no solamente existe una diferencia de tamaño entre la cola citoplasmática de MR1 en roedores y primates sino que la secuencia de ese dominio entre ambos grupos de especies es tan divergente que se puede determinar claramente un tipo de cola citoplasmática de MR1 en roedores y otro en primates. Los únicos aminoácidos preservados entre roedores y primates en la cola citoplasmática son Glu308, Tyr314, Pro316 y Thr317. El mayor tamaño de la región citoplasmática en roedores se debe a la secuencia NEGSSPS. Esta secuencia es similar a un motivo encontrado en las moléculas HLA de clase I clásicas (SD/EXSL) y CD1 de cerdo (CDPSS) (Chun T et al., 1999). En la moléculas

HLA de clase I este motivo es responsable de la endocitosis constitutiva (Vega MA y Strominger JL, 1989) mediante fosforilación de una serina (Guild BC y Strominger JL, 1984).

Las moléculas HLA de clase I clásicas se asocian a β_2m a través de unos conocidos residuos que se distribuyen a lo largo de los dominios extracelulares $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ (Saper MA et al., 1991). La mayoría de estos residuos (21 de 31) están conservados en MR1 (*Tabla R4*). Por tanto la molécula MR1 humana podría unir β_2m como recientemente ha sido demostrado en ratón (Yamaguchi H y Hashimoto K, 2002).

Tabla R4. Sitios de interacción con β_2m en las moléculas HLA-I clásicas y sus homólogos en MR1 (en todas las especies descritas). La intensidad de color determina la similitud con respecto a HLA-A2.

	Posición	HLA-A2	MR1 Humano	MR1 Chimpancé	MR1 Orangután	MR1 Ratón	MR1 Rata
DOMINIO $\alpha 1$	8	Phe	Phe	Phe	Phe	Phe	Phe
	9	Phe	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg
	10	Thr	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu
	12	Val	Val	Val	Val	Val	Ile
	23	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile
	25	Val	Val	Val	Val	Val	Val
	27	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr
	32	Gln	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro
	35	Arg	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr
	48	Arg	Arg	Arg	Arg	Lys	Arg
DOMINIO $\alpha 2$	94	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr
	96	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln
	115	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln
	116	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr
	117	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala
	119	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp
	120	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly
	121	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly
	122	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp
	192	His	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys
DOMINIO $\alpha 3$	202	Arg	Phe	Phe	Phe	Phe	Phe
	204	Trp	Lys	Lys	Lys	Arg	Arg
	231	Val	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly
	232	Glu	Asp	Asp	Asp	Glu	Glu
	234	Arg	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu
	235	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro
	236	Ala	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser
	237	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly
	238	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp
	242	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln
	244	Trp	Trp	Trp	Trp	Trp	Trp

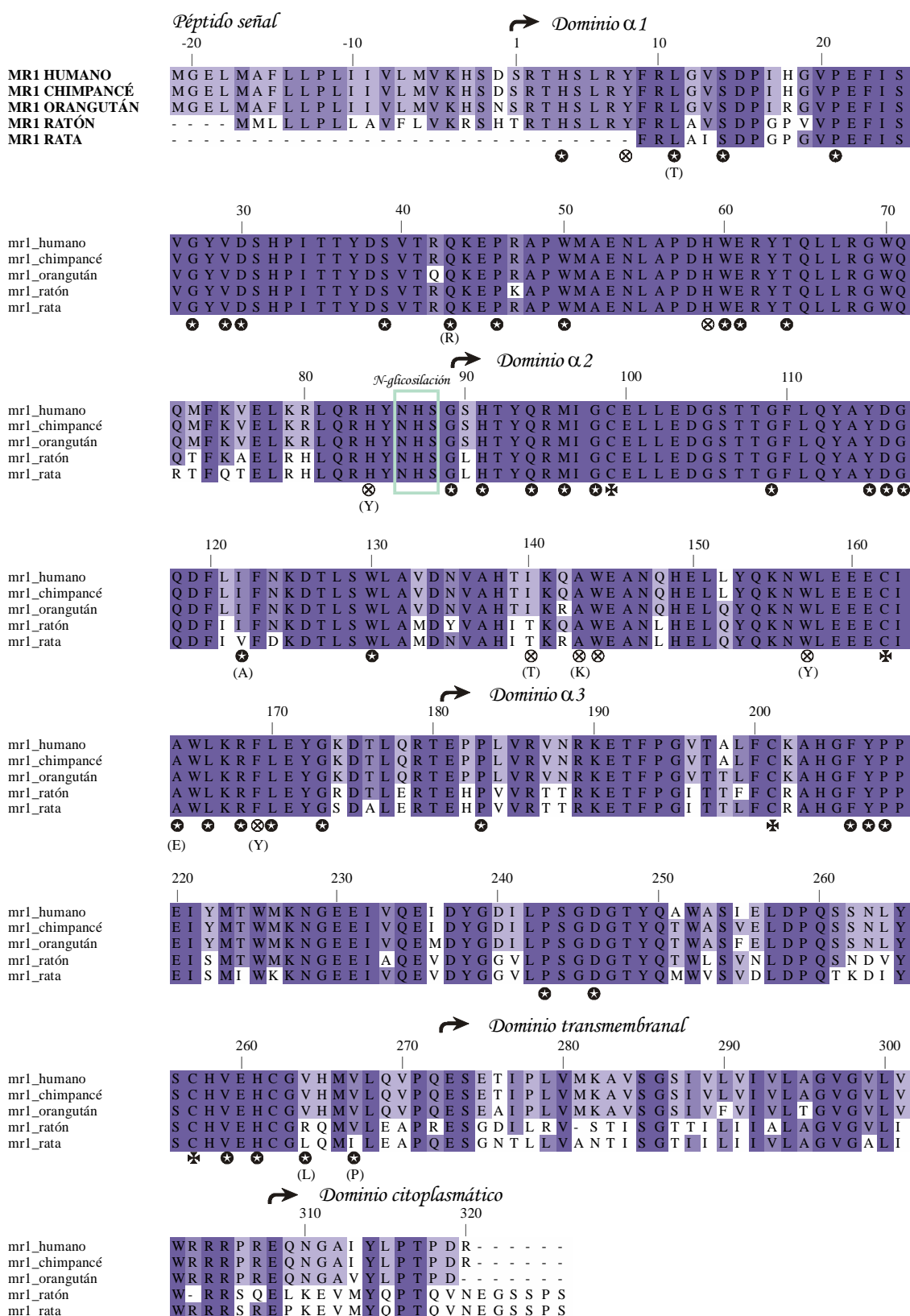


Figura R15. Alineamiento múltiple de las secuencias de cDNA de MR1 en humano (acceso GenBank: U22963), chimpancé (acceso GenBank: AJ275982), orangután (acceso GenBank: AJ271828), ratón (acceso GenBank: NM_008209) y rata (acceso GenBank: Y13972). La intensidad de color es proporcional al grado de similitud aminoacídica para cada posición. ⊕ indica las cisteínas conservadas en las moléculas HLA-Ia, ⊗ indica los residuos pan-MHC-I conservados y ⊙ indica los sitios de interacción de las moléculas HLA-Ia con el péptido (entre paréntesis aparece el aminoácido que lleva HLA-A2 para esa posición)

3.4 Caracterización de MR1P1 en primates superiores

En estudios anteriores hemos identificado y caracterizado una secuencia relacionada con el gen MR1 humano, a la cual denominamos MR1P1. MR1P1 inicialmente se clasificó como un pseudogen homólogo al gen MR1 humanos. La caracterización génica de MR1 en chimpancé común (*Pan troglodytes*) y orangután (*Pongo pygmaeus*) se complementó con el análisis de la presencia de MR1P1 en esas especies. Para ello realizamos una PCR sobre ADN genómico extraído de las líneas linfoblásticas CARL (chimpancé común) y PUTI (orangután). En esta reacción utilizamos los cebadores diseñados para analizar el polimorfismo de MR1 en humanos y los cuales amplificaban MR1P1 y la región comprendida entre el exón 2 y el exón 3 del gen MR1.

En chimpancé amplificamos un producto de PCR de 1156 pb y otro mayor de 1320 pb. Sin embargo en orangután solamente obtuvimos el amplificado de menor tamaño (1156 pb) (*Figura R16*).

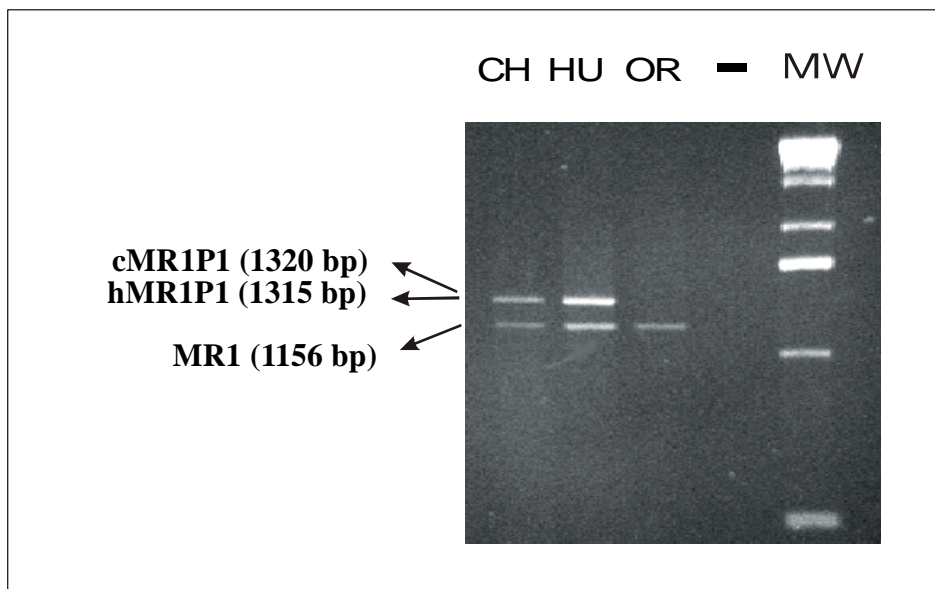


Figura R16. La región comprendida entre el exón 2 y el exón 3 de MR1 era amplificada en chimpancé común (CH), hombre (HU) y orangután (OR), mientras que el fragmento génico MR1P1 solamente era amplificado en chimpancé común (CH) y hombre (HU). cn: control negativo; mw: marcador de peso molecular DNA Molecular Weight Marker X 0'07-12'2 Kbp (Roche Diagnostics GMBH).

Estos productos de PCR fueron clonados en el vector pGEM®-T y al menos tres clones por cada amplificado fueron secuenciados automáticamente.

En chimpancé y orangután la secuencia del fragmento de 1156 pb (*Figura R17*) correspondía a la región exón2-intrón2-exón3 del gen MR1 (accesos GenBank: chimpancé común-AJ315655 y orangután-AJ315656). Con respecto a la secuencia de la región exón2-intrón2-exón3 del gen MR1 humano, la secuencia de chimpancé común era 98'88% homóloga y la secuencia de orangután era 97'32% homóloga.

EXÓN 2		
HU	GGCGTTTCGGATCCCATCCATGGGGTCCCTGAATTTATTTGGTTGGTACCGTGGACTCGCACCTATCACCACATATGACAGTGTCACTCGGCAGAAGGAGCCACGGGCCCATGGATGGCAGAGAACCTCGCGCCTGATCACTGGGAG	150
CH	-----	150
OR	-----A-T-----A-----	150
INTRÓN 2		
HU	AGGTACTACTCAGCTGCTGAGGGGCTGGCAGCAGATGTTCAAGGTGGAAGTGAAGCGCCTACAGAGGCACTACAATCACTCAGgtgtgcatgcccagagacagagcgttccccatccccccccaccccgagagaccctgggctggcc	300
CH	-----g-----t-----	300
OR	-----G-----g-----a-----g-----	300
HU	tccaataagcggatgctgaattgcacctgctgtagctttggcaaagcctgagggaatcaggttggaggagttcagggcctcccatctgctgtgcatctctctggactgtccctctctccccaggagcactctgtcatttgccccaccac	450
CH	-----a-----	450
OR	-----g-----t-----c-----t-----	450
HU	tcttccccatctctgtatcgtatctgcatccccattccactcaggcctctgatatgcatctcctttccattctaaatttgccattctgctctcacttctcctggtagtcaggcctagtgacttgcttatgagtatcgacagtaacttt	600
CH	-----c-----t-----c-----	600
OR	-----a-t-c-----t-----c-----t-----c-----	600
HU	cccagggtatcttctggctcctgcatctctctccctcctcaactgcagtcagaatagccacaaagtttcatcagtcattccattacaggataactccccaggcgggaattagcacactcctttgacaggcagtagtacttcacagata	750
CH	-----c-----a-----t-----	750
OR	-----c-----t-----	750
HU	cctgctgacaggtggcctccataaggggacctcctggggactcagcgatgccatggcaggcctgggggtgacataaatgtagaccaaggatgcttccagccatgcccctgctcccagcacttgagagcccacctctgtctctgtgtg	900
CH	-----c-----	900
OR	-----t-----a-----ca-----g-----c-----	900
EXÓN 3		
HU	gaccctctgggcttctgtgtgtgtccaggGTCACACTTACCAGAGAATGATTGGCTGTGAGCTGCTGGAGGATGGAAGCACCACAGGATTTCTGCAGTATGCATATGACGGGCAGGATTTCTGATCTTCAATAAAGACACCCTCT	1050
CH	-----g-----T-----	1050
OR	-----gc-----	1050
HU	CCTGGCTGGCTGTAGATAATGTGGCTCACACCATCAAGCAGGCATGGGAGGCCAATCAGCATGAGTTGCTGTATCAAAAAGAATTGGCTGGAAGAAGAATGTATTGC	1156
CH	-----	1156
OR	-----G-----GA-----	1156

Figura R17. Alineamiento de las secuencias nucleotídicas de la región comprendida entre el exón 2 y el exón 3 del gen MR1 de las especies humana (HU), chimpancé común (CH) y orangután (OR). Los guiones indican igualdad con respecto a la secuencia HU y las diferencias se destacan en negrita. Los cebadores aparecen en cursiva. HU: Acceso GenBank: AH006983. CH: Acceso GenBank: AJ315656. OR: Acceso GenBank: AJ315655.

La secuencia del fragmento de 1320 pb de chimpancé común era 98'63% similar a MR1P1 humano, por tanto había sido posible amplificar MR1P1 en chimpancé común. En orangután no se obtuvo ningún amplificado con gran similitud al MR1P1 humano pero no se puede descartar la existencia del homólogo a MR1P1 en orangután porque los cebadores empleados eran específicos de humanos. Es de destacar que a diferencia de lo que ocurre en humanos, la secuencia de MR1P1 de chimpancé común no posee ningún codón STOP en las regiones homólogas a los exones 2 y 3 de MR1.

	exón 2 (dominio $\alpha 1$)								
<i>cMR1P1</i>	<i>GGCGTTTCGG</i>	<i>ATCCCATCCA</i>	<i>TGGGGTCCCT</i>	<i>GAATTTATTT</i>	<i>CGGTTGGGTA</i>	<i>TGTGGACTCG</i>	<i>CACCCTATCA</i>	<i>CCACATATGA</i>	80
<i>hMR1P1</i>	-----	-A-----	-----	-----	-A-----	-----	-----	-----	
<i>cMR1P1</i>	<i>CAGTGTCACT</i>	<i>CCGCAGAAGG</i>	<i>AGCCACGGGC</i>	<i>CCCATGGATG</i>	<i>GCAGAGAACC</i>	<i>TCGCGCCTGA</i>	<i>TCACTGGGAG</i>	<i>AGGTACACTC</i>	160
<i>hMR1P1</i>	-----	-A-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
<i>cMR1P1</i>	<i>AGCTGCTGAA</i>	<i>GGGCTGGCAG</i>	<i>CAGATGTTCA</i>	<i>AGGTGGAAC</i>	<i>GAAGCGCCAG</i>	<i>AAGAGGCAC</i>	<i>ACAATCACTC</i>	<i>AGgtgtgcat</i>	240
<i>hMR1P1</i>	-----	-----	-----	G-----	-----	C---A---	-----	-----	
<i>cMR1P1</i>	<i>gcagcagaga</i>	<i>cagacgcttc</i>	<i>cctcacccca</i>	<i>cagagggccc</i>	<i>tgggctgacc</i>	<i>tccaatgagc</i>	<i>aatgctgact</i>	<i>tgcacctact</i>	320
<i>hMR1P1</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
<i>cMR1P1</i>	<i>gtggcttttg</i>	<i>gcaaaaacctg</i>	<i>ggaaatctgg</i>	<i>ttggtggagt</i>	<i>tcagagcatc</i>	<i>ccatctgctt</i>	<i>gtgcatcttc</i>	<i>tggactgtcc</i>	400
<i>hMR1P1</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
<i>cMR1P1</i>	<i>ctctctcccc</i>	<i>caggagccct</i>	<i>ttatcctctg</i>	<i>ccgcatcccc</i>	<i>cttccccata</i>	<i>tccccatctc</i>	<i>ctttcccatt</i>	<i>ctaaatttgc</i>	480
<i>hMR1P1</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
<i>cMR1P1</i>	<i>ccattctgtg</i>	<i>tctcacttct</i>	<i>tggtagccag</i>	<i>gcctagtgc</i>	<i>ctgcttgctt</i>	<i>atgcataatg</i>	<i>acattaactt</i>	<i>tcccagggat</i>	560
<i>hMR1P1</i>	-g-----	-----	-----	-----	-----	c-----	-----	-----	
<i>cMR1P1</i>	<i>atttctagct</i>	<i>cctgcatctc</i>	<i>tctccctcct</i>	<i>ccactgcact</i>	<i>caaatagcca</i>	<i>cagtttatca</i>	<i>atcaatcatt</i>	<i>cccattacag</i>	640
<i>hMR1P1</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
<i>cMR1P1</i>	<i>gataactccc</i>	<i>caagaaggga</i>	<i>attatcacac</i>	<i>tcctttggca</i>	<i>tgcaagtagga</i>	<i>tcttcacaaa</i>	<i>tacctgttgt</i>	<i>cagagtggta</i>	720
<i>hMR1P1</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
<i>cMR1P1</i>	<i>taatggacac</i>	<i>tggcgactca</i>	<i>ggaaggggaa</i>	<i>aggtggaag</i>	<i>tgggtgaggt</i>	<i>gaaaaaaacc</i>	<i>acctactgag</i>	<i>tacaacatac</i>	800
<i>hMR1P1</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
<i>cMR1P1</i>	<i>acgattcggg</i>	<i>tgacagatac</i>	<i>accaaaagcc</i>	<i>cagagttcac</i>	<i>cactacacga</i>	<i>ttcatccatg</i>	<i>caatcaaaaa</i>	<i>ctacttgat</i>	880
<i>hMR1P1</i>	-----	t-----	-----	-----	-----	g-----	-----	-----	
<i>cMR1P1</i>	<i>ccctaaagct</i>	<i>atatgaacca</i>	<i>caaaaaattt</i>	<i>aaaaaacaac</i>	<i>cctgctgtca</i>	<i>ggtgggcttc</i>	<i>caaagaggga</i>	<i>cctcctgggg</i>	960
<i>hMR1P1</i>	-----	-----	a-----	-----	-----	-----	-----	-----	
<i>cMR1P1</i>	<i>acttagcgat</i>	<i>gccacagcag</i>	<i>gcctgtgggg</i>	<i>tgacgtagac</i>	<i>caaaggatgc</i>	<i>ttccagccat</i>	<i>gccctgctc</i>	<i>ccagcacttg</i>	1040
<i>hMR1P1</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
<i>cMR1P1</i>	<i>agagcccacc</i>	<i>tctgtctctg</i>	<i>tgtggacccc</i>	<i>tctgggcttg</i>	<i>tggtgtgtgt</i>	<i>ccagGGTCTC</i>	<i>ACACTTACCA</i>	<i>GAGAATGATT</i>	1120
<i>hMR1P1</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-c-----	-----	-----	
<i>cMR1P1</i>	<i>GGCTGTGAGC</i>	<i>TGCTGGAGGA</i>	<i>TGGAAGCACT</i>	<i>ACAGGATTC</i>	<i>TGCAGTATGC</i>	<i>ATATGATGGG</i>	<i>CAGAATTTC</i>	<i>TGATTTTCAA</i>	1200
<i>hMR1P1</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	C-----	
<i>cMR1P1</i>	<i>TAAAGACACC</i>	<i>CTCTCCTGGC</i>	<i>TGGCTGTAGA</i>	<i>TAATGTGGCT</i>	<i>CACACCATCA</i>	<i>AGAGGGCACG</i>	<i>GGAGGCCAAT</i>	<i>CAGCATGAGT</i>	1280
<i>hMR1P1</i>	-----	-----	A-----	-----	-----	-----	-----	-----	
<i>cMR1P1</i>	<i>TGCAATATCA</i>	<i>TAAGAATTGG</i>	<i>CTGGAAGAAG</i>	<i>AATGTATTGC</i>	1320				
<i>hMR1P1</i>	-----	A-----	-----	-----					

Figura R18. El fragmento de 1320 pb amplificado en chimpancé común (*Pan troglodytes*) es el ortólogo a la secuencia MR1P1 humana.

Analizamos el número de sustituciones puntuales, deleciones e inserciones que aparecen al comparar la secuencia de MR1P1 de chimpancé común con su ortólogo humano y la secuencia exón2-intrón2-exón 3 del gen MR1 de chimpancé común con su ortólogo humano. En MR1 solamente se producen sustituciones y el número de las mismas es mayor en el intrón que en los exones (*Tabla R5*). En MR1P1 aparte de sustituciones también aparecen deleciones e inserciones en la región homóloga al intrón 2 de MR1 (*Tabla R5*). En general la secuencia MR1P1 acumula más cambios a lo largo de toda su secuencia que su homóloga en el gen MR1 indicando que la presión selectiva es menor en MR1P1.

Tabla R5. Sustituciones puntuales, deleciones e inserciones contabilizadas entre chimpancé común y humano para las secuencias MR1P1 y la región homóloga a ella de MR1.

		Exón 2	Intrón 2	Exón 3
MR1	<i>Sustituciones puntuales</i>	1	11	1
	<i>Deleciones/Inserciones</i>	-	-	-
MR1P1	<i>Sustituciones puntuales</i>	6	8	3
	<i>Deleciones/Inserciones</i>	-	5	-

Nuevamente utilizamos la herramienta *blast genome* desarrollada por el NCBI para encontrar secuencias similares a MR1 y MR1P1 en el genoma de ratón y rata. La secuenciación del genoma de ratón está muy avanzado y en rata está en desarrollo.

Por una parte en el genoma del ratón buscamos secuencias similares a MR1 de ratón, MR1P1 humano y MR1P1 de chimpancé común. De los resultados se infería que MR1 se encontraba en una copia y que no aparecían regiones con una elevada similitud con MR1P1.

Por otra parte en el genoma de la rata buscamos secuencias similares a MR1 de rata, MR1P1 humano y MR1P1 de chimpancé común. La presencia de MR1 en el genoma de rata fue posible detectarla y por el contrario no se detectaron regiones similares a MR1P1.

4 CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA MR1 EN HUMANOS

Desde el inicio de este trabajo, todos los esfuerzos realizados han ido encaminados a desvelar la función de la molécula MR1 humana. Por un lado hemos realizado estudios a nivel genético, cuyos resultados ya han sido expuestos, para obtener información que pudiera indirectamente proporcionarnos pistas acerca de la posible función de MR1. Por otro lado hemos llevado a cabo un abordaje más directo de la cuestión, consistente en el desarrollo de unas herramientas que nos permitiese detectar y caracterizar la proteína MR1 humana, como paso previo para descifrar su función.

En primer lugar nos propusimos obtener anticuerpos capaces de reconocer la proteína MR1 humana en experimentos de citometría de flujo, inmunoprecipitación y/o western-blot. Estas herramientas nos ayudarían en la caracterización bioquímica y funcional de la molécula MR1. Para obtener estos reactivos expresamos la región extracelular de la molécula MR1 en bacterias y con esta proteína inmunizamos conejos para obtener sueros frente a la región extracelular de MR1.

4.1 Expresión de la región extracelular de MR1 en un sistema procariota

La región extracelular de la molécula humana MR1 está constituida por los dominios tipo inmunoglobulina $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$, los cuales son codificados por los exones 2, 3 y 4 del gen MR1. En nuestro laboratorio, el fragmento de cDNA de MR1 constituido por los exones 2, 3 y 4 se clonó en el vector de expresión pQE-32 (QIAGEN). A esta proteína recombinante formada por la región extracelular de MR1 la denominamos MR1r para diferenciarla de la molécula MR1 completa. El vector adiciona un oligopéptido de seis histidinas (0'84 KDa) al extremo amino-terminal de la molécula MR1r. La afinidad de las histidinas por el níquel nos permite purificar la proteína recombinante por cromatografía de afinidad al níquel. La expresión de la

proteína recombinante es inducida con IPTG (isopropil β -D-tiogalactopiranoóxido) porque el inserto se encuentra bajo el control de un promotor con secuencias reguladoras del operón lac. Tras inducción con IPTG, bacterias *Escherichia coli* cepa M15 transformadas con esta construcción producen la proteína recombinante MR1r (hasta 75mg/litro de cultivo) (Figura R19). La proteína recombinante MR1r de 37 KDa y varios productos de síntesis y/o degradación eran separados de las proteínas bacterianas mediante cromatografía de afinidad al níquel (Figura R19). En un segundo paso de purificación los productos de síntesis y/o degradación eran eliminados mediante electroelución de MR1r (Figura R19). Al final de los procesos de producción y purificación obtenemos la proteína MR1r con un alto rendimiento y un alto grado de pureza.

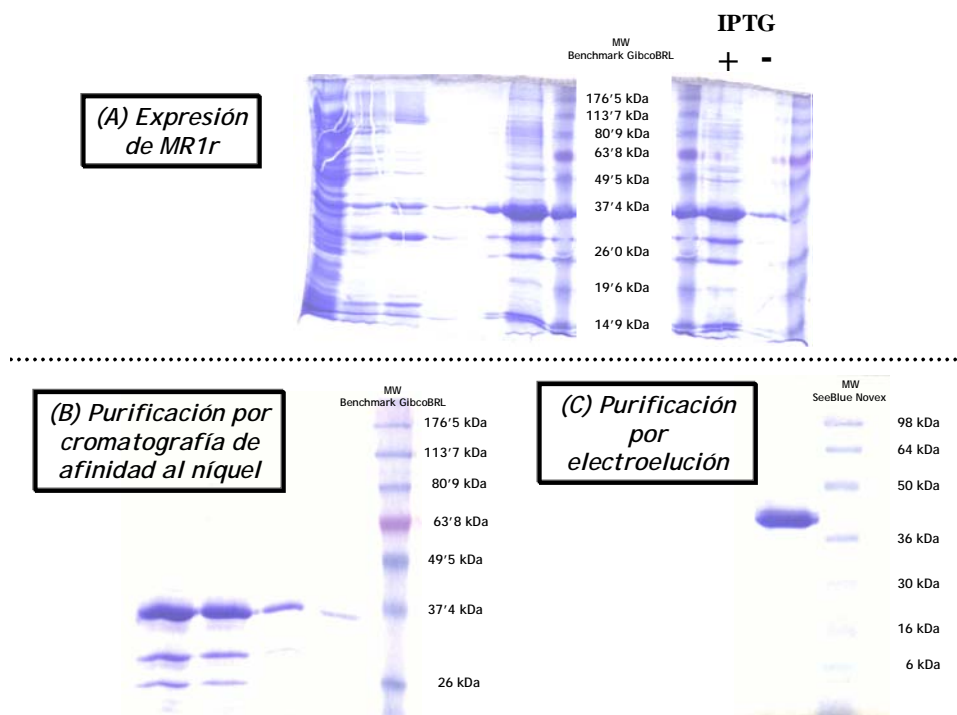
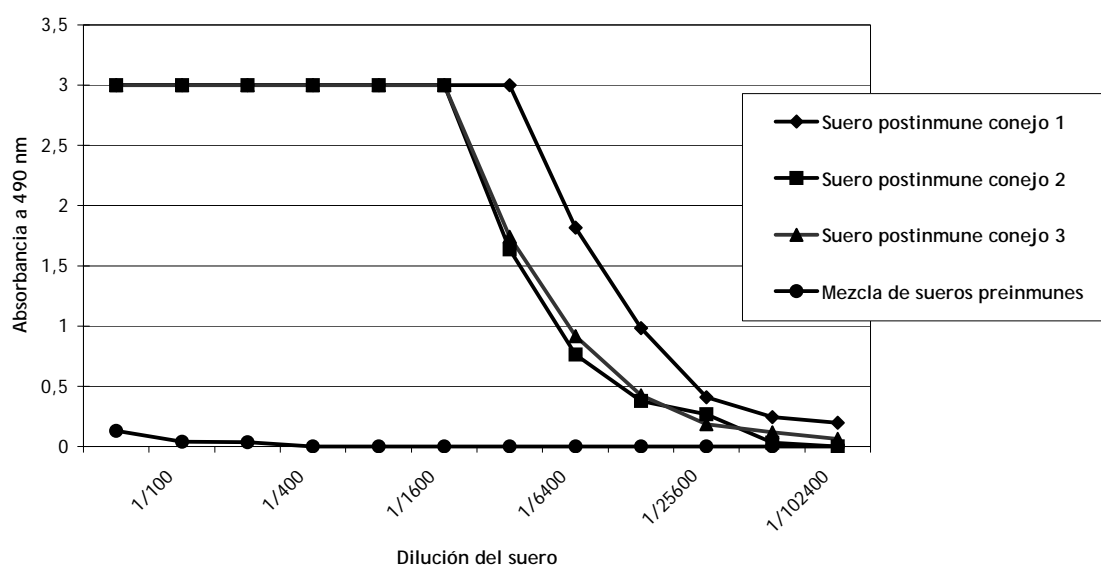


Figura R19. La proteína recombinante MR1r (37 KDa) constituida por la región extracelular de MR1 se produce bajo inducción con IPTG (A). En un primer paso MR1r y productos de síntesis y/o degradación son purificados por cromatografía de afinidad (B) y posteriormente por electroelución es purificada únicamente MR1r (C).

4.2 Sueros para detectar MR1.

Con la molécula recombinante MR1 purificada y solubilizada en urea 8M inmunizamos tres conejos. Estos animales se inmunizaron en presencia del adyuvante completo de Freund (DIFCO Laboratories) en tres ocasiones con intervalos de quince días. De esta manera obtuvimos unos sueros cuya reactividad frente a la proteína recombinante MR1r analizamos en ensayos



de ELISA con la proteína MR1r pegada al plástico. Como se observa en la *Figura R20* los tres sueros postinmunes son capaces de reconocer la proteína recombinante MR1r en un ensayo de ELISA.

4.3 Transfección de la línea LCL 721.221 con MR1

La capacidad de los sueros anti-MR1r de reconocer la molécula humana MR1 fue analizada en ensayos de citometría de flujo, inmunoprecipitación y western-blot con linfocitos de sangre periférica y líneas celulares. Los resultados obtenidos no fueron satisfactorios (datos no mostrados), lo cual nos llevó a plantearnos desarrollar un sistema que facilitase la detección de la proteína. Por tanto decidimos expresar la proteína MR1 en la línea linfoblásticoide LCL 721.221. La línea celular LCL 721.221 (ATCC CRL 1855) son linfocitos B inmortalizados con el virus de Epstein-Barr y se caracteriza por no expresar moléculas MHC de clase I

Figura R20. Los sueros generados por inmunización con MR1r reconocen la proteína MR1r pegada al plástico en ensayos de ELISA.

clásicas.

En el vector de expresión pSR α Neo clonamos el cDNA de MR1 y transfectamos la línea linfoblastoide LCL 721.221. A esta nueva línea celular la denominamos **MR1.221**.

Paralelamente transfectamos la línea LCL 721.221 con el vector pSR α Neo nativo, generándose la línea celular **mock.221**. Esta línea es el control de la línea transfectada con el cDNA de MR1 en los experimentos realizados para la detección de la molécula MR1 humana.

El vector de expresión pSR α Neo permite seleccionar las células transfectadas con el antibiótico geneticina (G418 sulfato, Gibco), por tanto ambas líneas crecen en RPMI 1640 (Gibco) suplementado con 10% suero de ternera fetal, 1% antibióticos (penicilina, fungizona y estreptomycin) y G418 (1'5mg/ml) bajo condiciones estándar de cultivo celular (37°C, 5%CO₂).

4.4 Análisis de la línea MR1.221

En primer lugar analizamos la expresión de la molécula MR1 humana en la superficie de células MR1.221 y mock.221 por citometría de flujo utilizando los sueros anti-MR1r. Contrario a lo esperado no se detecta un incremento apreciable de MR1 en la línea MR1.221 comparado con la expresión en la línea mock.221 (*Figura R21*). Esta situación podría explicarse por un deficiente reconocimiento de la proteína MR1 nativa por

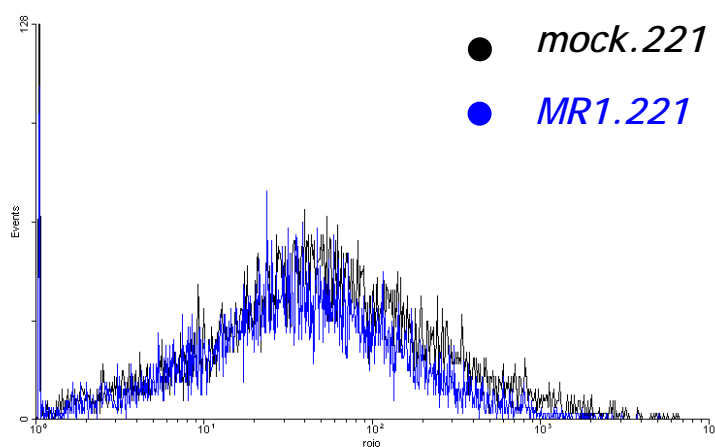


Figura R21. Ensayos de citometría de flujo con los sueros anti-MR1r en las líneas mock.221 y MR1.221.

parte de los sueros anti-MR1r.

Por las características estructurales de la molécula MR1 (*Tabla R4*) supusimos que MR1 se asocia a β_2 -microglobulina (β_2m), lo cual recientemente ha sido demostrado en ratón (Yamaguchi H y Hashimoto K, 2002). A partir de esta premisa el análisis de la expresión de β_2m en las líneas MR1.221 y mock.221 se puede considerar como un análisis indirecto de la expresión de MR1 en dichas líneas. La expresión de β_2m en la superficie de células MR1.221 y mock.221 se determinó por citometría de flujo. Como anticuerpo primario utilizamos sobrenadante del hibridoma BBM.1 (ATCC HB 28, isotipo IgG2b) y suero policlonal de conejo (M-8523, Sigma), ambos reconocen la molécula β_2m humana.

Según los resultados la línea MR1.221 de forma consistente expresa en superficie ligeramente más β_2m que la línea control mock.221, lo cual podría explicarse por el hecho de que la línea MR1.221 exprese en superficie más MR1 que la línea mock.221. En función de ese razonamiento, para seleccionar aquellos transfectantes que podrían expresar mayores niveles de MR1 optamos por realizar una selección de aquellas células que expresaban más β_2m . Así los transfectantes de la línea MR1.221 que expresaban mayores niveles de β_2m fueron seleccionados con bolas de poliestireno magnéticas (Dynabeads® M-450 goat anti-mouse IgG) en una proporción de 6 bolas por 2×10^6 células BBM.1+. La nueva línea generada la denominamos línea **MR1(β_2m^{bright}).221**

4.5 Análisis de la línea MR1(β_2m^{bright}).221

A partir de la línea LCL 721.221 transfectada con el cDNA de MR1 (línea MR1.221), como se ha descrito anteriormente, seleccionamos las células con mayor expresión en superficie de β_2m , generándose así la línea MR1(β_2m^{bright}).221. Se supone que la molécula MR1 humana se expresa en la superficie celular asociada a β_2m . Por lo tanto una mayor expresión de β_2m en la superficie de células deficientes en moléculas MHC de clase I clásicas nos podría indicar una mayor expresión en superficie de MR1.

Según los datos la línea MR1(β_2m^{bright}).221 expresa mayor β_2m que la línea transfectante MR1.221 y esta a su vez más que la línea control mock.221. Por tanto se puede suponer que la línea transfectante expresa más MR1 que la línea MR1.221 y la línea control mock.221. Partiendo de estas premisas analizamos si los sueros anti-MR1r desarrollados en nuestro laboratorio son capaces de reconocer la molécula MR1 humana, para lo cual se probamos estos sueros en ensayos de citometría de flujo, western-blot e inmunoprecipitación

4.5.1 Ensayos de citometría de flujo con MR1(β_2m^{bright}).221

La expresión en superficie de la molécula MR1 en las líneas MR1(β_2m^{bright}).221 y mock.221 se analizó por citometría de flujo utilizando como anticuerpo primario los sueros frente a la región extracelular de MR1 (MR1r) desarrollados en nuestro laboratorio. En los ensayos realizados (*Figura R22*) utilizando los sueros a una dilución 1:50 se detecta una pequeña pero consistente mayor tinción en los transfectantes MR1(β_2m^{bright}).221 con respecto a la línea control mock.221. Este incremento en la tinción no es debido a una mayor expresión de moléculas reconocidas por el anticuerpo monoclonal W6/32 como son moléculas MHC de clase I clásicas, porque el marcaje con W6/32 de células transfectantes MR1(β_2m^{bright}).221 y control mock.221 no mostraba diferencias entre ambos tipos celulares (*Figura R22*).

● *mock.221*

● *MR1(β_2m^{bright}).221*

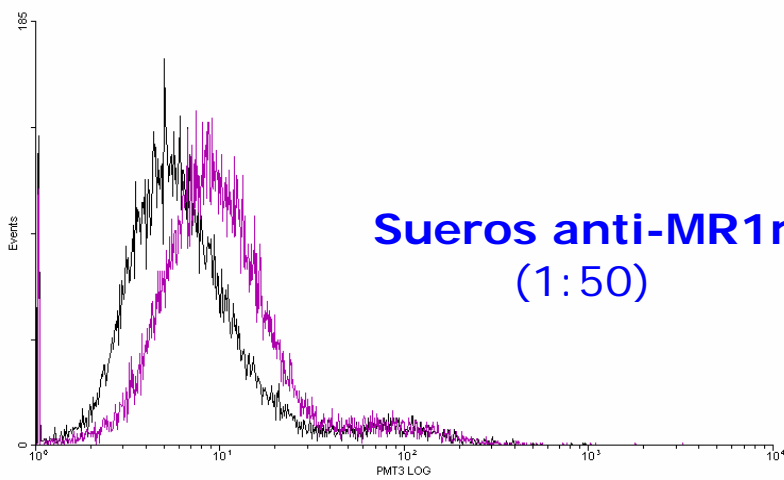
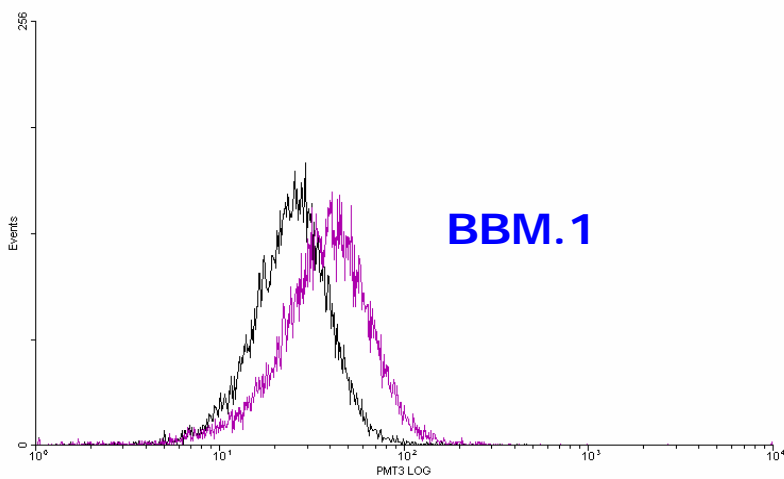
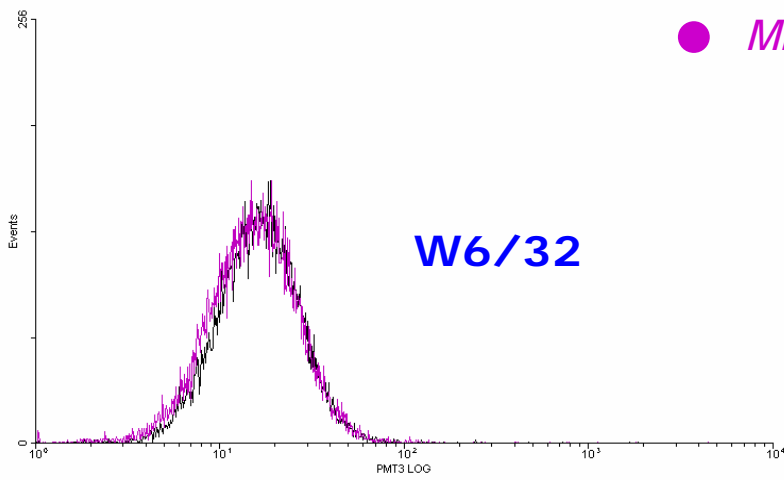


Figura R22. Ensayos de citometría de flujo con los anticuerpos monoclonales W6/32 y BBM.1 y los sueros anti-MR1r en las líneas *mock.221* y *MR1(β_2m^{bright}).221*

4.5.2 Inmunoprecipitación con marcaje metabólico

Determinar si los sueros anti-MR1r son capaces de reconocer la molécula humana MR1 en técnicas de inmunoprecipitación es muy interesante para conocer características bioquímicas y funcionales de la proteína MR1, como son su localización celular y subcelular, glicosilación y proteínas asociadas.

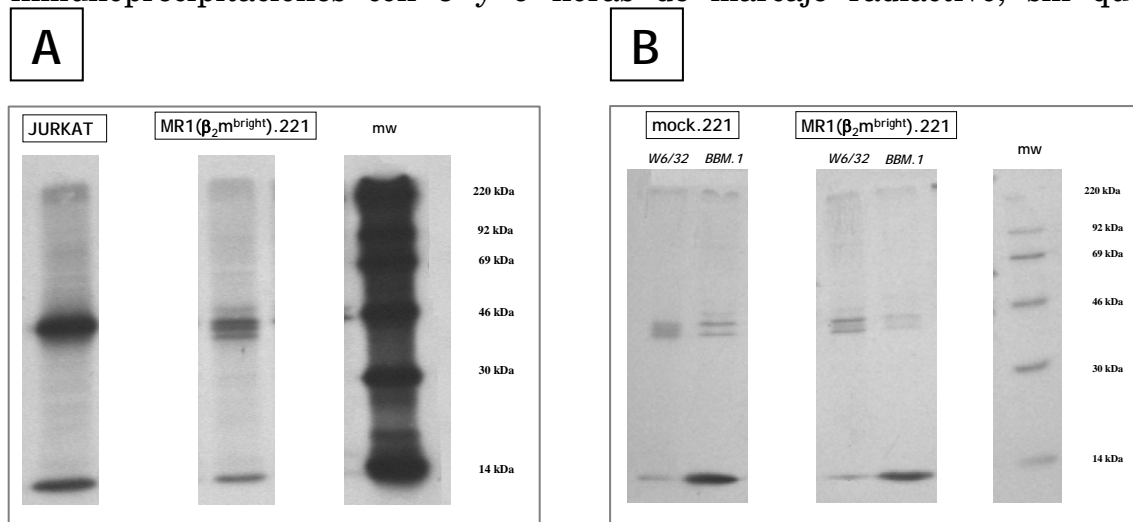
Las moléculas MHC de clase I clásicas pueden ser inmunoprecipitadas, con anticuerpos monoclonales específicos, a partir de un lisado celular marcado metabólicamente con ^{35}S . Utilizamos esta técnica para determinar la capacidad de los sueros anti-MR1r para inmunoprecipitar la proteína MR1 en un lisado de células MR1($\beta_2\text{m}^{\text{bright}}$).221 marcadas metabólicamente con el radioisótopo ^{35}S .

Células de las líneas mock.221 y MR1($\beta_2\text{m}^{\text{bright}}$).221 se crecieron en un medio sin metionina durante 45 min. y luego las proteínas de nueva síntesis se marcaron metabólicamente con L- ^{35}S -metionina durante 5 horas -como en la inmunoprecipitación de moléculas MHC de clase I clásicas- y durante 9 horas. Los anticuerpos utilizados para inmunoprecipitar fueron W6/32, BBM.1 y los sueros anti-MR1r.

El anticuerpo W6/32, el cual reconoce moléculas MHC de clase I clásicas y algunas no clásicas, se utilizó como control de la inmunoprecipitación. A pesar de que la línea LCL 721.221 no expresa moléculas MHC de clase I clásicas, sí expresa moléculas reconocidas por W6/32. Para comprobar si el patrón de bandas obtuvimos en la inmunoprecipitación con W6/32 sobre líneas derivadas de LCL 721.221 era válido se realizó una inmunoprecipitación paralela con W6/32 en la línea MR1($\beta_2\text{m}^{\text{bright}}$).221 como línea derivada de LCL 721.221 y en la línea Jurkat, que expresa moléculas MHC de clase I clásicas (*Figura R23-A*).

El anticuerpo BBM.1 reconoce $\beta_2\text{m}$ humana. Aunque la línea MR1($\beta_2\text{m}^{\text{bright}}$).221 fue seleccionada por su mayor expresión en superficie de $\beta_2\text{m}$, en esta línea no se precipitó más cantidad de $\beta_2\text{m}$ que en la línea mock.221 (*Figura R23*).

En la inmunoprecipitación con los sueros anti-MR1r apareció una banda inespecífica con el mismo tamaño esperado para MR1. Realizamos inmunoprecipitaciones con 5 y 9 horas de marcaje radiactivo, sin que



detectásemos diferencias entre el uso del suero preinmune y el suero postinmune, así mismo tampoco apreciamos diferencias entre la línea LCL 721.221 y la línea MR1(β_2m^{bright}).221 (Figura R23).

4.5.3 Ensayos de western-blot con MR1(β_2m^{bright}).221

Otra forma de analizar la capacidad de los sueros anti-MR1r para reconocer la molécula MR1 humana es mediante western-blot. Los

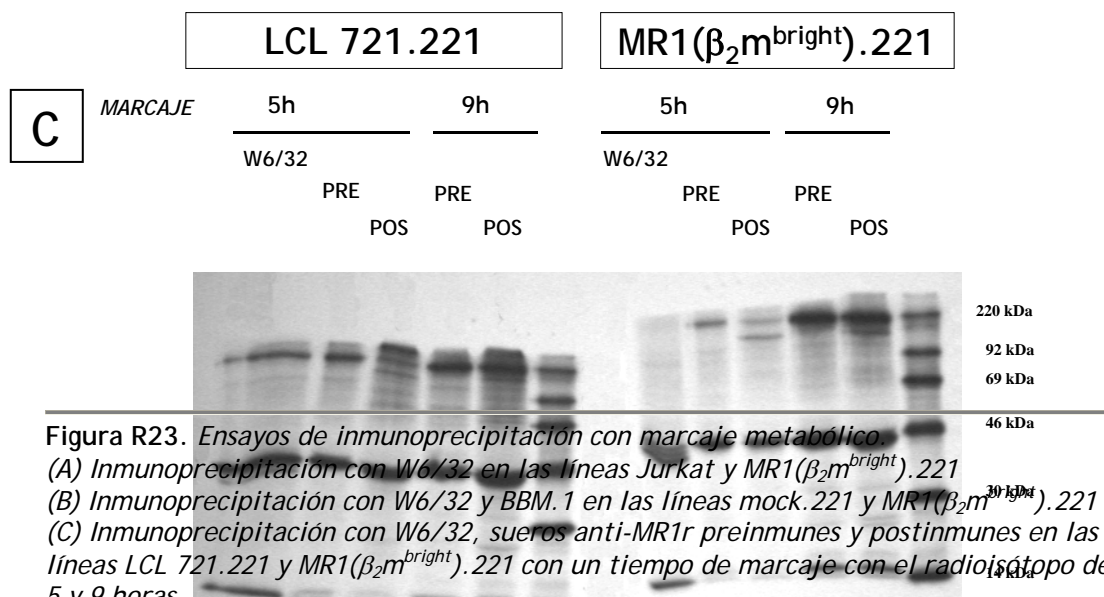


Figura R23. Ensayos de inmunoprecipitación con marcaje metabólico. (A) Inmunoprecipitación con W6/32 en las líneas Jurkat y MR1(β_2m^{bright}).221 (B) Inmunoprecipitación con W6/32 y BBM.1 en las líneas mock.221 y MR1(β_2m^{bright}).221 (C) Inmunoprecipitación con W6/32, sueros anti-MR1r preinmunes y postinmunes en las líneas LCL 721.221 y MR1(β_2m^{bright}).221 con un tiempo de marcaje con el radioisótopo de 5 y 9 horas.

experimentos de western-blot nos permiten detectar con anticuerpos específicos los niveles totales de una proteína independientemente de su localización celular y estructura tridimensional.

Para realizar los experimentos de western-blot partimos de 2.5×10^6 millones de células por marcaje. Estas células se lisaron en presencia del detergente NP40 e inhibidores de proteasas: PMSF y un *cocktail* comercial formado por inhibidores de serin-proteasas (AEBSF y Aprotinina), aminopeptidasas (Bestatina), cisteín-proteasas (E-64 y Leupeptina) y aspártico proteasas (Pepstatina A). Todo el lisado se separó por electroforesis SDS-PAGE en un sistema Miniprotean (BioRad) y Hoeffer. Las proteínas separadas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa en transferencias en semiseco. La membrana se bloqueó con reactivo de bloqueo (Roche) y luego se incubó con el anticuerpo primario (sueros anti-MR1r) y un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa, que permitía revelar la membrana con ECL.

De esta manera analizamos la capacidad de los sueros anti-MR1r para reconocer la proteína recombinante MR1r frente a la que fueron generados y para reconocer la molécula MR1 humana expresada en la línea MR1(β_2m^{bright}).221 independientemente de la localización celular y la estructura que presente MR1 en esta línea.

Los sueros anti-MR1r a una dilución 1:50 y 1:100 reconocen tanto la proteína recombinante MR1r con la que se generaron como los subproductos de síntesis y/o degradación obtenidos en la producción de MR1r (*Figura R24*).

En idénticas condiciones los sueros anti-MR1r reconocen la molécula humana MR1 en el lisado de la línea control y en el lisado de la línea MR1(β_2m^{bright}).221 (*Figura R24*). La proteína MR1 humana tiene un tamaño relativo de 42 KDa frente a los 39 KDa estimados en función de su secuencia aminoacídica. En el experimento partíamos de igual número de células MR1(β_2m^{bright}).221 y mock.221, por lo que la línea MR1(β_2m^{bright}).221 expresa MR1 en mayor nivel que la línea mock.221 como era esperable.

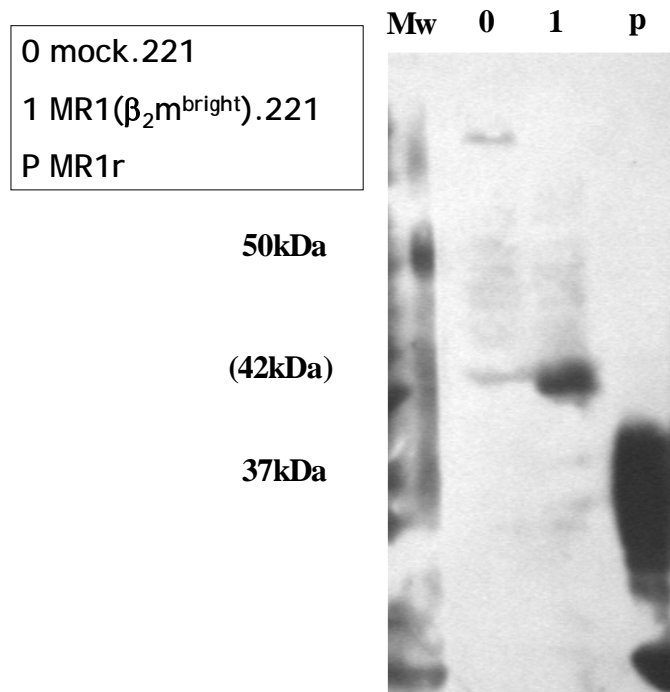


Figura R24. Los sueros generados por inmunización con MR1r reconocen la molécula MR1 humana en el lisado de células mock.221 y MR1(β_2m^{bright}).221, así como la propia molécula recombinante y sus productos de síntesis y/o degradación.

4.5.4 Ensayos de inmunoprecipitación con MR1(β_2m^{bright}).221

Después de conocer que los sueros anti-MR1r reconocen la proteína MR1 en ensayos de western-blot decidimos volver a analizar la capacidad de los sueros anti-MR1r para inmunoprecipitar la proteína MR1. En esta ocasión utilizamos un lisado de células MR1(β_2m^{bright}).221 no marcadas radiactivamente. Tras la inmunoprecipitación realizamos un western-blot en el cual el anticuerpo primario eran los sueros anti-MR1r. Para ello lisamos de 10 a 30 millones de células de la línea MR1(β_2m^{bright}).221 y la línea control mock.221 en presencia del detergente digitonina 1% (Calbiochem) y del inhibidor de proteasa PMSF. El suero anti-MR1 a una dilución 1:5 es acoplado a proteína G-sefarosa para utilizarlo en la inmunoprecipitación. El

conjunto de proteínas inmunoprecipitadas con estos sueros se separaron por SDS-PAGE y a continuación fueron se transfirieron en semiseco a una membrana de nitrocelulosa. Esta membrana se reveló utilizando como anticuerpo primario los sueros anti-MR1r a una dilución 1:50 y según se ha explicado en el capítulo anterior.

En la línea MR1(β_2m^{bright}).221 los sueros anti-MR1r a una dilución 1:5 inmunoprecipitan la suficiente cantidad de la molécula MR1 como para que luego sea detectada por western-blot (*Figura R25*).

En la línea control mock.221 la cantidad de MR1 inmunoprecipitada es muy pequeña y no siempre detectable por western-blot (*Figura R25*).

Estos ensayos, al igual que los experimentos de western-blot (*Figura R24*), demuestran que la línea MR1(β_2m^{bright}).221 expresa mayor cantidad de MR1 que la línea mock.221 (*Figura R25*).

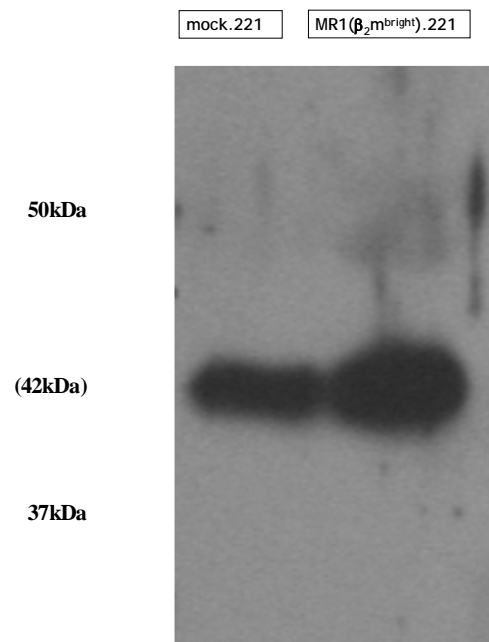


Figura R25. *Los sueros generados por inmunización con MR1r inmunoprecipitan la molécula MR1 humana en células mock.221 y MR1(β_2m^{bright}).221.*

Discusión

DISCUSIÓN

Cada día se hace más interesante descifrar la función de MR1 por diversas razones. En primer lugar por el interés intrínseco de conocer la función del producto proteico de un gen con expresión conocida. En segundo lugar por el alto grado de conservación de la putativa molécula MR1 entre roedores y humanos, lo cual hace suponer que MR1 pueda desempeñar una función importante. Y en tercer lugar por pertenecer a la familia de moléculas MHC de clase I. La mayoría de estas moléculas desempeñan funciones relevantes para el funcionamiento del sistema inmunológico, como son la regulación de la función efectora de las células NK y/o la presentación antigénica de péptidos o lípidos, o la regulación de los niveles séricos de IgG. Aunque algunas de estas moléculas realizan funciones fuera del contexto del sistema inmune como son la regulación de la homeostasis del hierro o de la coagulación o de la lipólisis. Éstas fueron las mismas razones que nos motivaron a determinar la función de MR1 mediante aproximaciones más o menos directas.

1. Análisis del polimorfismo del gen MR1 en humanos

Las moléculas MHC de clase I clásicas se caracterizan por la alta variabilidad de los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$, lo cual les permite unir y presentar una gran diversidad de péptidos. Por el contrario la característica general entre las moléculas MHC de clase I no clásicas es bajo o nulo polimorfismo, salvo los genes MIC que presentan algo de polimorfismo (Bahram S, 2000). El polimorfismo en MR1 no había sido estudiado con anterioridad.

La molécula MR1 tiene un alto grado de homología con las moléculas MHC de clase I clásicas por tanto la región en la que con mayor probabilidad podríamos detectar polimorfismo sería la formada por los dominios homólogos a los dominios extracelulares $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de las moléculas MHC de clase I clásicas. Dichos dominios son codificados por los exones 2 y 3 del gen MR1, por lo cual amplificamos y secuenciamos esos exones en veinticinco

individuos sanos no emparentados de origen étnico africano, caucásico y asiático.

Entre todos los individuos analizados, el individuo caucásico identificado como PNL era el único que portaba una secuencia diferente a la ya conocida (acceso GenBank: U22963, Hashimoto K et al., 1995). La secuencia codificante completa de este nuevo alelo de MR1 (acceso GenBank: AJ249778) se determinó mediante amplificación, clonaje y secuenciación del cDNA de MR1 a partir de linfocitos de sangre periférica del individuo PNL, como control se utilizó la línea B-linfoblastoide JY. El nuevo alelo de MR1 aislado en el individuo PNL presenta dos sustituciones puntuales que no producen cambio de aminoácido. Estas variaciones se encuentran en el dominio $\alpha 1$ (Ser 25) y en la región transmembranal (Ile 292). La secuenciación de 16 clones con el cDNA de MR1 del individuo PNL indica que en este individuo, MR1 se encuentra en heterocigosis, tal que un alelo es el mayoritario en la población y el otro es el nuevo alelo descrito en esta tesis.

En la amplificación del cDNA de MR1 en PNL y JY se detectan dos isoformas transcripcionales: la secuencia codificante completa de MR1 de 1066 pb de longitud y una isoforma carente del exón 4 de 790 pb. La isoforma transcripcional sin el exón 4 codificaría para una putativa proteína transmembranal homóloga a MR1 pero sin los residuos correspondientes al dominio $\alpha 3$. Este tipo de isoforma transcripcional del gen MR1 ya había sido identificada en humanos (hMR1B, número de acceso: AF010446, Riegert p et al., 1998¹). La existencia de isoformas transcripcionales generadas por *splicing* alternativo ha sido descrita en otros miembros de la familia MHC de clase I, tanto en genes clásicos (HLA-A y HLA-B, Krangel MS, 1986) como en genes no clásicos (HLA-G, Ishitani A y Geraghty DE, 1992; CD1, Woolfson A y Milstein C, 1994). En particular en HLA-G también se ha descrito un transcrito (HLA-G4) que se caracteriza por la ausencia del dominio $\alpha 3$. Actualmente existe controversia acerca de si esta isoforma de HLA-G con menor expresión que la isoforma completa alcanza o no la superficie celular (Bainbridge D et al., 2001). Por cristalografía de alta

resolución se ha determinado que moléculas HLA de clase I clásicas sin el dominio $\alpha 3$ podrían adoptar la estructura típica de las moléculas MHC de clase I clásicas (Collins EJ et al., 1995). Respecto a la isoforma carente del exón 4 de MR1 no es posible determinar si se traduce y si tiene alguna implicación funcional, a pesar de que su presencia ha sido detectada por western-blot, técnica menos sensible que la PCR.

Los resultados del análisis del polimorfismo se resumen en el hecho de que hemos analizado un total de cincuenta cromosomas de individuos pertenecientes a tres grupos étnicos claramente diferenciados y solamente encontramos una variante alélica de MR1. Además este nuevo alelo no presenta ninguna diferencia en la secuencia aminoacídica con respecto al alelo mayoritario en la población. Por lo tanto podemos afirmar que MR1 es un gen no polimórfico. Esto está de acuerdo con lo que se supone en ratón a raíz de la secuenciación de MR1 en un pequeño número de ratones de distintas cepas (Yamaguchi H et al., 1997; Riegert P et al., 1998¹; Yamaguchi H et al., 1998) y en rata a partir de los resultados del análisis de RFLPs (Walter L y Günther E, 1998). La ausencia de variabilidad en la molécula MR1 sugiere que MR1 pudiera unir y/o interactuar con un ligando invariable.

2. Identificación de una nueva secuencia relacionada con MR1

En el análisis del polimorfismo de MR1 amplificamos con cebadores específicos la región comprendida entre el exón 2 y el exón 3 del gen MR1 humano. En estas reacciones también se obtenía un producto de mayor tamaño cuya secuencia era un 92'39% similar a la región exón2-intrón2-exón3 de MR1. En el caso de que esta nueva secuencia relacionada con MR1 (acceso GenBank: AJ132011) fuese transcrita aparecería un codón STOP en la región homóloga al exón 2 del gen MR1. Por este motivo esta secuencia se consideró en principio que formaba parte de un pseudogen de MR1, al cual denominamos MR1P1 (*MR1 pseudogene 1*). Los pseudogenes de los vertebrados pueden ser de dos tipos: pseudogenes procesados y pseudogenes no procesados. Los pseudogenes procesados se diferencian porque no llevan

intrones ya que son originados por una retrotransposición de una secuencia de ARNm mediada por la transcriptasa inversa (Vanin EF, 1985). Los pseudogenes no procesados se originan por duplicación de un gen funcional y posterior pérdida de funcionalidad debido a la acumulación de mutaciones (Mighell AJ et al., 2000). En la secuencia de MR1P1 aparece una región homóloga al intrón 2 del gen MR1, por ello se podría considerar que MR1P1 podría formar parte de un pseudogen no procesado.

Las diferencias más importantes entre la secuencia MR1P1 y la región homóloga del gen MR1 se localizan en la región homóloga al intrón 2 de MR1. Mientras que en las regiones homólogas a los exones 2 y 3 de MR1 solamente aparecen mutaciones puntuales, en la región homóloga al intrón 2 aparecen mutaciones puntuales, deleciones e inserciones. Las deleciones e inserciones si se localizan en secuencias codificantes y no son múltiplo de tres bases provocan la ruptura del marco abierto de lectura. El hecho de que este tipo de mutaciones aparezcan solamente en la región homóloga al intrón 2 es llamativo, también es destacable el hecho de que en esta región aparecen siete veces más mutaciones que en las regiones homólogas a los exones de MR1. Estos datos nos están sugiriendo que en la secuencia MR1P1 la presión selectiva no está actuando de manera homogénea, encontrándose más relajada en la región homóloga al intrón 2 de MR1. Por lo tanto parece ser que en cierto modo se quiere mantener el marco abierto de lectura en las regiones homólogas a los exones de MR1.

Entre todas las diferencias detectadas entre MR1P1 y la región homóloga del gen MR1, es particularmente interesante una inserción de 217 pb en MR1P1, en concreto en la región homóloga al intrón 2 de MR1. Esta inserción es 75% similar a una región *downstream* al segundo marco abierto de lectura -codificante para la transcriptasa inversa- de la secuencia consenso del elemento transponible LINE-1 (*Long Interspersed Nuclear Element*) subfamilia L1PB3 (Smit AF et al., 1995). Los elementos LINE son secuencias repetidas no virales cuya transposición es mediada por la transcriptasa inversa. No hemos podido determinar si en el origen de

MR1P1 está implicada esta inserción similar a uno de los elementos transponibles más comunes en el genoma humano.

La búsqueda de secuencias con alta similitud a MR1P1 y al gen MR1 en el genoma humano nos aportó interesante información acerca de MR1 y MR1P1. En primer lugar corroboramos que el gen MR1 aparece en única copia en el genoma humano como se predecía a partir de resultados previos de southern-blot (Riegert P et al., 1998¹). Además como se dedujo a partir de análisis previos de clones de fagos (Yamaguchi H et al., 1998), el gen MR1 humano tiene un tamaño de aproximadamente 21'5 Kb, superior al tamaño de este gen en ratón (18'7 Kb). Esta organización genómica tan expandida es debida a la existencia de un larguísimo primer intrón, cuyo tamaño se estima en 15 Kb (Yamaguchi H et al., 1998). Respecto a MR1P1, la búsqueda en el genoma humano de secuencias altamente similares nos reveló que MR1P1 se localiza en el cromosoma 1 en proximidad a MR1 y es la única secuencia en todo el genoma con un elevado grado de homología al gen MR1. Lo más importante que se dedujo a partir de estas búsquedas es que MR1P1 no es un pseudogen completo sino un fragmento génico homóloga a la región comprendida entre el extremo 5' del intrón 2 y el extremo 5' del intrón 3 del gen MR1. Al determinar que MR1P1 no era un pseudogen completo no analizamos la transcripción de MR1P1. Además las regiones próximas a MR1P1 no presentan homología significativa con regiones de otros genes, por lo tanto no parece que se encuentre en el interior de un elemento sometido al control de un promotor.

El conjunto de estos datos nos permite concluir que lo más probable es que MR1P1 se originara por una duplicación parcial del gen MR1, afectando a los exones 2 y 3 codificantes para los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$. Y la transposición que generó la inserción de 217 pb en la secuencia de MR1P1 se produjo en algún momento posterior a esa duplicación.

Han sido identificados pseudogenes y fragmentos génicos de moléculas MHC de clase I clásicas (Geraghty DE et al., 1992^{1,2}) y no clásicas (como por ejemplo de MIC –nombrados MICC, MICD y MICE-(Bahram S et al., 2000), o de AZGP1 (Freije JP et al., 1993)). No se conocen las funciones

de estos pseudogenes o fragmentos génicos similares a los genes MHC de clase I. Se especula que una función podría ser que se tratan de secuencias de ADN que actúan como reserva de secuencias de codificación y podrían utilizarse para generar secuencias polimórficas en moléculas clásicas de clase I y II por el proceso de conversión génica. La conversión génica es un mecanismo más eficaz que la mutación puntual para la generación de variación génica porque permite introducir varios cambios al mismo tiempo. Como ya hemos mencionado MR1 es un gen no polimórfico por lo tanto no parece ser que MR1P1 se trate de una secuencia reserva como se ha postulado para otros pseudogenes de clase I.

3. Identificación de nuevas secuencias relacionadas con MR1 en primates superiores

El análisis comparativo de las secuencias codificantes de MR1 en humano, ratón y rata revela similitudes y diferencias que pueden ayudar a descifrar la posible función de MR1. Para corroborar si estas apreciaciones se mantenían en especies cercanas al hombre y poder establecer diferencias entre los primates y los roedores se caracterizó MR1 en varios primates superiores: gorila (*Gorilla gorilla*), chimpancé común (*Pan troglodytes*) y orangután (*Pongo pygmaeus*). La presencia de MR1 había sido detectada por southern-blot en algunos primates superiores (Riegert P et al., 1998¹), en concreto en gibón (*Hylobates lar*), gorila (*Gorilla gorilla*) y chimpancé bonobo (*Pan paniscus*).

Desgraciadamente no se pudo amplificar el cDNA de MR1 en gorila, lo cual podría ser como consecuencia de variaciones presentes en las regiones de hibridación de los cebadores humanos empleados.

En chimpancé común y en orangután la secuencia codificante de MR1 fue amplificada, clonada y secuenciada. En ambas especies además han sido

amplificadas varias isoformas transcripcionales de MR1 generadas por *splicing* alternativo.

En orangután caracterizamos la secuencia codificante completa de MR1 y dos isoformas transcripcionales. Una de estas isoformas transcripcionales de 790 pb de longitud se caracteriza por la ausencia del exón 4, por tanto codificaría para una putativa proteína transmembranal sin el dominio $\alpha 3$. La otra isoforma transcripcional de 710 pb no solamente le falta del exón 4 (dominio $\alpha 3$) sino que también carece de 79 pb del extremo 3' del exón 2 (dominio $\alpha 1$). La pérdida de 79 pb del exón 2 se produce por la existencia de un sitio donador de *splicing* crítico y origina el cambio del marco abierto de lectura con la consecuente aparición de codones STOP prematuros.

En chimpancé común (*Pan troglodytes*) caracterizamos la secuencia codificante completa y la isoforma transcripcional de 790 pb carente del exón 4 (dominio $\alpha 3$). Según los resultados de la amplificación, en chimpancé común podría formarse el transcrito de 710 pb, sin embargo no ha sido posible clonarlo y secuenciarlo.

Como ya hemos comentado isoformas transcripcionales de MR1 ya habían sido detectadas en humano, rata y ratón. En concreto, en humanos ya había sido caracterizada una isoforma transcripcional sin el exón 4 (hMR1B, número de acceso: AF010446, Riegert p et al., 1998¹) y en ratón se han descrito isoformas transcripcionales sin 79 pb del exón 2 (mMR1B-número de acceso: AF010449, mMR1C-número de acceso: AF010450, mMR1E-número de acceso: AF010452 y mMR1F-número de acceso: AF010453, Riegert p et al., 1998¹). Sin embargo nunca antes había sido detectada una isoforma transcripcional que llevara ambas características, como así ocurre en la isoforma transcripcional de 710 pb caracterizada en orangután.

En la secuenciación de los clones portando los amplificadores en chimpancé encontramos que MR1 en chimpancé común presenta dos alelos que difieren en un aminoácido localizado en el dominio $\alpha 2$. Tal que un alelo porta el aminoácido treonina en la posición 176 mientras que el otro alelo

porta el aminoácido isoleucina. La proteína MR1 no está cristalografiada pero con la ayuda del servidor Swiss-Model obtenemos un modelado tridimensional de la molécula MR1. Este modelo tridimensional se construye utilizando la estructura cristalográfica de las moléculas MHC de clase I clásicas de rata, ratón y humano. En el modelo tridimensional de MR1 apreciamos como la posición 176 se localiza en el extremo de una de las dos α -hélices que forman la región homóloga al sitio de unión de antígeno de las moléculas MHC de clase I clásicas. Además el cambio de treonina por isoleucina provoca un cambio de polaridad que no podemos determinar si afectaría a las interacciones de MR1 con su(s) ligando(s). En especies evolutivamente anteriores (ratón y orangután) y posteriores (hombre) al chimpancé, el residuo que aparece en dicha posición es treonina, por tanto esto nos sugiere que el cambio Thr176Ile tiene lugar en algún momento de la evolución del chimpancé. A este respecto sería interesante determinar qué residuo aparece en dicha posición en el chimpancé bonobo (*Pan paniscus*) ya que el chimpancé común y el bonobo evolucionaron a partir de un antecesor común.

Una cuestión interesante que surgía a partir del análisis de MR1P1 humano era si se trataba de una duplicación que estaba presente en otros organismos próximos al hombre y de ser así nos permitiría contrastar como ha sido la evolución de MR1P1 con respecto a la región homóloga del gen MR1. Por esa razón decidimos caracterizar MR1P1 en primates superiores, para lo cual seguimos la misma estrategia de amplificación por PCR que habíamos utilizado en el análisis del polimorfismo y que nos llevó a identificar MR1P1 humano. Con este diseño experimental logramos amplificar el fragmento exón2-intrón2-exón3 del gen MR1 en chimpancé común y orangután y MR1P1 únicamente en chimpancé común. La circunstancia de no detectar por PCR MR1P1 en el genoma de orangután se puede deber a variaciones en las regiones de hibridación de los cebadores humanos empleados o bien nos indica que la duplicación que generó MR1P1 se produjo en algún momento de la evolución posterior a la aparición del orangután. En apoyo de la segunda hipótesis está el hecho de que no nos ha

sido posible determinar la presencia de secuencias altamente homólogas al fragmento génico MR1P1 ni en el genoma de rata ni en el genoma de ratón, si bien actualmente se sigue trabajando en la secuenciación completa de estos genomas y en la ordenación de las secuencias existentes.

El número de sustituciones, inserciones y deleciones que se detectan entre MR1 de chimpancé común y humano es menor que el que se detectan entre MR1P1 de chimpancé común y humano. Por tanto en MR1P1 la presión selectiva es menor que en la región homóloga del gen MR1, aunque dentro de la secuencia del fragmento génico se deja notar mayor presión selectiva en las regiones homólogas a los exones de MR1 que en la región homóloga al intrón 2 de MR1, como habíamos comentado al analizar el fragmento génico MR1P1 en humanos.

4. Alineamiento múltiple de las secuencias proteicas de MR1 de humano, chimpancé común, orangután, rata y ratón

A raíz del alineamiento de las secuencias aminoacídicas de la molécula MR1 de humano, orangután, chimpancé, rata y ratón se pueden extraer importantes datos que pueden orientar acerca de la posible función de MR1.

A primera vista destaca el alto grado de conservación que presenta la molécula MR1 entre todas las especies analizadas. Más llamativo es el hecho de que el mayor grado de conservación detectado se localice en los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$, cuyos homólogos en las moléculas MHC de clase I son los más divergentes de toda la molécula, esta circunstancia nos está sugiriendo que el ligando de MR1 estaría conservado, al menos, a lo largo de la evolución de los mamíferos. Precisamente en la sección formada por los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ están claramente localizadas las diferencias entre el grupo de los roedores (rata y ratón) y de los primates (humano, chimpancé común y orangután), tal que dichas variaciones aparecen en una sección de la molécula cuyo homólogo en las moléculas MHC de clase I clásicas interaccionarían con el extremo carboxilo del péptido antigénico. En el caso de MR1 no podemos afirmar que esta región interaccione igualmente con el

extremo carboxilo de algún péptido por la simple razón de que aún no ha sido posible determinar si MR1 es capaz de unir péptidos. Según el modelado estructural, no parecen existir impedimentos estructurales en la molécula MR1 para que pueda unir péptidos. Sin embargo en contra de esta posibilidad está el hecho de que parte de la α -hélice de MR1 no aparezca resuelta en el modelado estructural y lo más interesante es que de los ocho residuos de las moléculas MHC de clase I clásicas que interactúan con el péptido (Madden DR, 1995) en la molécula MR1 solamente aparecen tres de ellos. Por lo tanto MR1 o bien no une péptidos o bien une péptidos con cualidades diferentes a los que presentan las moléculas MHC de clase I clásicas.

La molécula MR1 como es sabido posee un elevado grado de similitud con respecto a las moléculas MHC de clase I clásicas (Hashimoto K et al., 1995). Esta característica se ve reforzada por el hecho de que la mayoría de los residuos conservados evolutivamente en las moléculas MHC de clase I clásicas (Grossberger D y Parham P, 1992; Kaufman J et al., 1994) permanecen conservados en la evolución de la molécula MR1 a lo largo de los mamíferos. De igual manera se preservan también las cisteínas descritas como residuos claves para la estructura de las moléculas MHC de clase I clásicas y el sitio de N-glicosilación (N86XS) conservado en las moléculas clásicas.

A diferencia de como ocurre en las moléculas MHC de clase I clásicas, no está claro que MR1 interactúe con el correceptor CD8 ya que la mayoría de los residuos importantes para dicha interacción (Saper MA et al., 1991) no aparecen en la secuencia aminoacídica de MR1.

Las principales diferencias entre la proteína MR1 de roedores y de primates se localizan en la región transmembranal y citoplasmática. La diferencia más llamativa en la región transmembranal es la existencia en primates y no en roedores de un aminoácido cargado positivamente, lisina 282. Varias predicciones acerca de cual puede ser la región transmembranal de la molécula MR1 establecen tanto en roedores como en primates el inicio de la región transmembranal alrededor de esa posición. Estas predicciones

parecen indicar que la carga positiva de la lisina es sacada fuera del ambiente hidrófobo de la región transmembranal.

En cuanto a la cola citoplasmática, en roedores y primates es completamente diferente, tal que solamente cuatro residuos (Glu308, Tyr314, Pro316 y Thr317) son comunes en todas las especies. La conservación de Tyr314 y residuos adyacentes (Pro316 y Thr317) puede ser debido a que esta tirosina sea susceptible de fosforilación como ocurre en otros receptores para transmitir señales al interior celular. La diferencia más llamativa es la presencia de la secuencia NEGSSPS en la cola citoplasmática de MR1 de roedores, la cual no está presente en los primates y por tanto es la que hace que la cola de MR1 en roedores sea más larga. La importancia de esta secuencia radica en su similitud con el motivo SD/EXSL responsable de la endocitosis constitutiva de las moléculas HLA de clase I clásicas (Vega MA y Strominger JL, 1989) mediante fosforilación de la segunda serina (Guild BC y Strominger JL, 1984).

En la secuencia aminoacídica de MR1 se conservan la mayoría de los residuos reconocidos como relevantes para la asociación de las moléculas MHC de clase I clásicas a β_2m (Saper MA et al., 1991), por tanto la molécula MR1 humana es factible que se asocie a β_2m de manera similar a como lo hacen las moléculas HLA de clase I clásicas. Este argumento queda validado por el hecho de que recientemente ha sido demostrada la asociación de MR1 de ratón a β_2m (Yamaguchi H y Hashimoto K, 2002).

El conjunto de todos estos datos nos sugieren que MR1 es una molécula altamente conservada en la evolución de los mamíferos, especialmente en los dominios más variables en las moléculas MHC de clase I clásicas. Esta conservación sugiere que MR1 pueda unir un ligando conservado evolutivamente. Además MR1 presenta conservadas la mayoría de los residuos esenciales para que las moléculas MHC de clase I clásica mantengan su estructura típica, con lo cual es posible que MR1 adopte una estructura terciaria muy similar a la de las moléculas MHC de clase I clásicas. Sin embargo no queda claro que MR1 pueda interactuar con el receptor CD8 ni unir péptidos similares a los presentados por las moléculas

MHC de clase I clásicas. A parte de la reciente demostración experimental de la asociación de β_2m a la molécula MR1 de ratón, el análisis de las secuencias de MR1 conocidas revela que esta situación se puede dar en el resto de especies analizadas.

Las principales diferencias detectadas entre la molécula MR1 de roedores y la de los primates se centran en una sección de la región homóloga al sitio de unión del péptido de las moléculas MHC de clase I clásicas, en la región transmembranal y en la región citoplasmática. La diferencia más llamativa se encuentra en la región citoplasmática porque los roedores presenta un motivo –ausente en los primates- similar al motivo responsable de la endocitosis constitutiva de las moléculas MHC de clase I no clásicas. Esta circunstancia sugiere que la transmisión de la señal al interior celular podría ser diferente entre los dos grupos de especies analizados. Pero en estos mecanismos de transmisión de señal habría componentes comunes porque en todas las especies aparece conservada una tirosina susceptible de fosforilación y por tanto con posibles implicaciones funcionales.

5. Caracterización de la proteína MR1 en humanos

Uno de los principales obstáculos para determinar la función de MR1 es la ausencia de reactivos adecuados que nos permitan realizar estudios funcionales y bioquímicos. Por ese motivo nos propusimos desarrollar anticuerpos frente a MR1 como una aproximación más directa para conocer la función de MR1.

Como primer paso quisimos expresar en *Escherichia coli* la proteína humana MR1 al completo: péptido líder, dominios extracelulares, región transmembranal y cola citoplasmática. A pesar de varios intentos no logramos expresar dicha proteína, lo cual pudo deberse a la presencia de zonas altamente hidrofóbicas (péptido líder y dominio transmembranal) que por su hidrofobicidad resultaban ser tóxicas para las bacterias. Por ese motivo decidimos realizar una nueva construcción con la cual queríamos expresar únicamente la región extracelular de la proteína madura, la cual se

constituye por los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ y codificada por los exones 2, 3 y 4 del gen MR1. Con esta estrategia conseguimos expresar de manera eficiente una proteína recombinante formada por la región extracelular de MR1, a la cual denominamos MR1r. El sistema de expresión utilizado adiciona al extremo amino-terminal de la proteína recombinante un oligopéptido de seis histidinas. Como las histidinas tienen afinidad por el níquel, esta cola de histidinas permite purificar MR1r y sus productos de síntesis y/o degradación por cromatografía de afinidad. Los productos de síntesis y/o degradación de MR1r son eliminados mediante electroelución de MR1r. Tras estas purificaciones se obtuvo la proteína MR1r (37 KDa) con un alto grado de pureza y solubilizada en urea, en estas condiciones fue utilizada para inmunizar tres conejos en presencia del adyuvante completo de Freund, obteniéndose sueros de conejo anti-MR1r.

Los sueros anti-MR1r reconocen la proteína recombinante MR1r en ensayos de ELISA. Por el contrario no detectan la proteína humana MR1 ni en su conformación nativa ni desnaturalizada en linfocitos de sangre periférica. Aunque ha sido demostrado por northern-blot que los linfocitos de sangre periférica expresan el gen MR1 a nivel de ARN (Hashimoto K et al., 1995).

Esta ausencia de reconocimiento de la proteína MR1 en linfocitos de sangre periférica podría tener dos causas. O bien los sueros anti-MR1r no son capaces de reconocer la molécula MR1 humana o bien la expresión a nivel de proteína de MR1 en linfocitos de sangre periférica se produce a niveles muy bajos con lo cual es difícil detectarla. Para clarificar este punto nos propusimos generar una línea capaz de producir MR1 en gran cantidad, por tanto transfectamos el cDNA de MR1 en la línea celular B-linfoblastoide LCL 721.221. Esta línea celular es muy utilizada en la investigación del MHC porque no expresa moléculas MHC de clase I clásicas debido a una delección parcial de la región cromosómica MHC, sita en el brazo corto del cromosoma 6 (Shimizu Y et al., 1988 y Shimizu Y y DeMars R, 1989). Por tanto se generaron una línea transfectante de MR1 (**MR1.221**) y una línea control transfectada con el vector pSR α Neo nativo (**mock.221**). Los sueros

anti-MR1r no eran capaces de detectar diferencias en la expresión en superficie de la molécula MR1 entre las líneas MR1.221 y mock.221. Esta situación podía deberse o bien a un defectuoso reconocimiento de la molécula MR1 humana por parte de los sueros anti-MR1r o bien a que en la línea MR1.221 existirían células con baja, media y alta expresión de MR1 como ocurre en cualquier transformación.

Como se ha expuesto ya en esta discusión es factible que la molécula MR1 humana se exprese asociada a β_2m . Por tanto el análisis de la expresión en superficie de β_2m en la línea mock.221 y MR1.221 puede considerarse un análisis indirecto de la expresión en superficie de la molécula MR1 humana. De tal manera que la línea MR1.221 presenta de forma consistente una ligera mayor expresión en superficie de β_2m que la línea MR1.221. Estos datos nos sugieren que esa mayor expresión de β_2m se podría producir por una mayor expresión de la molécula MR1. En consecuencia para seleccionar las células MR1.221 que expresaran mayores niveles de MR1 utilizamos un anticuerpo monoclonal anti- β_2m humana conjugado con bolas magnéticas, así generamos la línea **MR1(β_2m^{bright}).221**.

La línea MR1(β_2m^{bright}).221 se analizó por citometría de flujo, inmunoprecipitación, western-blot e inmunoprecipitación seguida de western-blot con el objetivo de determinar si los sueros anti-MR1r eran capaces o no de reconocer la molécula MR1 humana, ya sea en su estado conformacional como en su estado nativo.

En ensayos de citometría de flujo observamos que los sueros anti-MR1r son capaces de reconocer una ligera pero constante diferencia en la expresión en superficie celular entre las líneas mock.221 y MR1(β_2m^{bright}).221. Estos datos sugieren que los sueros anti-MR1r serían capaces de detectar una ligera mayor expresión de MR1 en la superficie de células transfectadas con el cDNA de MR1. En la selección con un anticuerpo anti- β_2m podríamos haber seleccionado alguna molécula no clásica Ib que se exprese asociada a β_2m . Pero estas moléculas son reconocidas por el anticuerpo W6/32, y no detectamos diferencias entre células mock.221 y MR1(β_2m^{bright}).221 cuando utilizamos ese anticuerpo.

Estos datos sugieren que el reconocimiento detectado con los sueros anti-MR1r es específico.

En la línea MR1(β_2m^{bright}).221 se intentó inmunoprecipitar MR1 con los sueros anti-MR1r mediante inmunoprecipitación con marcaje metabólico radiactivo (^{35}S) a cinco y nueve horas. Pero lamentablemente aparecía una banda inespecífica del mismo tamaño que el esperado para la molécula MR1 humana.

En experimentos de western-blot, los sueros anti-MR1r reconocen claramente tanto la proteína recombinante frente a la que fueron generados como la molécula MR1 humana en las líneas MR1(β_2m^{bright}).221 y mock.221. Por primera vez es detectada la molécula MR1 humana. La molécula MR1 humana tiene un tamaño estimado de 42 KDa frente a los 39 KDa estimados a partir de su secuencia nucleotídica (Hashimoto K et al., 1995), esto indica que realmente la proteína Mr1 humana está glicosilada como se suponía al aparecer conservado en su secuencia el sitio típico de N-glicosilación de las moléculas MHC de clase I clásicas. A partir de estos experimentos se detecta como la línea MR1(β_2m^{bright}).221 expresa la proteína MR1 en grandes cantidades mientras que la expresión de la molécula MR1 humana en la línea mock.221 es muy baja. Esto indica que la expresión basal de MR1 al menos en la línea LCL 721.221 es baja y podría explicar el hecho de que no detectásemos la molécula MR1 humana en linfocitos de sangre periférica.

Un paso más en la caracterización de los sueros anti-MR1r fue realizar una inmunoprecipitación seguida de un western-blot. De tal manera que utilizando los sueros muy concentrados (1:5) eran capaces de inmunoprecipitar la proteína MR1 humana en la línea MR1(β_2m^{bright}).221 y no en la línea mock.221.

En el conjunto de estos datos observamos que se ha generado una línea celular (MR1(β_2m^{bright}).221) capaz de producir MR1 a alto nivel. También se han generado unos sueros frente a la región extracelular de la molécula MR1 humana que son capaces de reconocer la molécula MR1 humana, si bien parece ser que reconocen mejor la proteína en condiciones

desnaturalizadas que en condiciones nativas. Esto estaría de acuerdo con el hecho de que los sueros fueron generados mediante inmunización con una molécula desnaturalizada. Aunque cabe otra explicación a estos resultados, puede ocurrir que la expresión en superficie de MR1 esté supeditada a β_2m y un ligando que desconocemos. De tal manera que si este ligando no está presente en cultivos celulares o lo está en baja cantidad, esta circunstancia estaría bloqueando la expresión en superficie de la molécula MR1 y explicaría la pequeña diferencia de expresión en superficie de MR1 detectada entre las líneas MR1(β_2m^{bright}).221 y mock.221.

El conjunto de todos los datos aportados y discutidos en esta tesis nos permiten decir de MR1 y de su posible función lo siguiente. MR1 es un gen no polimórfico en humanos, al menos en la región codificada por los exones 2 y 3 (dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$). MR1 había sido descrito en humano, rata y ratón, ahora también ha sido descrito en chimpancé común y orangután. En todas las especies en que se ha descrito, MR1 se expresa generando por *splicing* alternativo isoformas transcripcionales, cuya finalidad biológica se desconoce. Algunas de estas isoformas transcripcionales, como las aquí descritas, carecen del dominio $\alpha 3$ o simplemente son un péptido de 83 aminoácidos formado por el péptido líder y parte del dominio $\alpha 1$. En el genoma del hombre y del chimpancé común se ha detectado una secuencia (MR1P1) con alta homología al gen MR1 cuya función no se conoce. MR1P1 es un fragmento génico homólogo a la región comprendida entre el intrón 2 y el intrón 3 del gen MR1, por tanto contiene secuencias homólogas a los exones codificantes para los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de MR1.

El alineamiento de las proteínas de MR1 descritas hasta la fecha indican que MR1 se encuentra muy conservada evolutivamente, particularmente en los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$, parece ser que pudiera asociarse a β_2m (en ratón ya ha sido demostrada dicha asociación) pero que no parece claro que interaccionase con CD8 ni uniera péptido similares a los presentados por las moléculas MHC de clase I clásicas. Las moléculas de MR1 de roedores y primates presentan ciertas diferencias en las secuencias de la región homóloga al sitio de unión al péptido y en la región

citoplasmática que podrían implicar diferencias entre ambos grupos de especies en lo que se refiere al ligando unido y a la transmisión de la señal al interior celular.

La generación de sueros frente a la región extracelular de la molécula MR1 y de líneas celulares transfectadas con el cDNA de MR1 ha permitido detectar por primera vez la molécula MR1 humana. La molécula MR1 humana tiene un tamaño de 42 KDa, está glicosilada y tiene una baja expresión basal al menos en la línea de estudio.

Por tanto MR1 parece ser una molécula no polimórfica y conservada evolutivamente que adopta una estructura muy similar a las moléculas MHC de clase I clásicas. Esto sugiere que el ligando(s) debería ser un tipo de molécula no variable y conservado evolutivamente entre los mamíferos.

(Nota: En un congreso celebrado recientemente (5-8, Noviembre, 2002) se ha propuesto cual podría ser la función de MR1 en ratón)

CD1 & NKT cell workshop 2002

2nd Workshop on CD1 antigen presentation & NKT cells

Mucosal associated invariant T (MAIT) cells: an evolutionary conserved T cell subpopulation recruited by MR1 on B cells in the gut and involved in the regulation of intestinal immunity

Olivier Lantz, Livine Duban¹, Florence Tilloy¹, Seiamak Bahram², Susan Gilfillan³, Emmanuel Treiner¹

Laboratoire d'Immunologie, and INSERM U520, Institut Curie, 26 rue d'Ulm, 75005 Paris, France

There are only two $\alpha\beta$ TCR T cell subsets with phylogenetically conserved specificity: NK-T cells expressing a $V\alpha 24/14$ - $J\alpha 18$ TCR α chain and restricted by CD1d and lymphocytes bearing an invariant $V\alpha 7.2/19$ - $J\alpha 33$ TCR α chain. Here, we show that $V\alpha 19$ - $J\alpha 33$ ⁺ T-T hybridoma are stimulated by transfectants expressing the MHC related molecule 1, MR1, notable for $\alpha 1$ and $\alpha 2$ domains are strikingly (90 %) conserved between mouse and man. $V\alpha 19$ - $J\alpha 33$ ⁺ T cells are also absent from MR1 KO mice. $V\alpha 19$ - $J\alpha 33$ ⁺ T cells are located primarily in the gut lamina propria (LP) of both humans and $V\alpha 19$ - $J\alpha 33$ transgenic and wt mice. Most importantly, in both species their selection/expansion requires B cells.

MAIT cells are absent in germ free mice indicating that together with the B cells, the commensal flora are required for their recruitment to the gut LP. As intestinal IgA secretion does not occur in germ-free mice, these results suggest

that V α 19-J α 33+ T cell are involved in the regulation of gut immunity: specifically, MR1 and/or its ligand might be directly or indirectly upregulated on IgA producing cells or precursors thereof by microbial products. If so, MAIT cells probably down-regulate intestinal IgA secretion as this process is essentially T cell-independent. In accordance with this hypothesis, the proportion of large cells expressing mIgA was increased in the gut LP of MR1 KO mice. That MR1 is an evolutionarily conserved ligand of an equally conserved T cell population portends a fundamental role for both in gut immunity.

Conclusiones

CONCLUSIONES

a. MR1 no es una molécula polimórfica, al menos en los exones 2 y 3 que codifican para los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$.

b. Un nuevo alelo de MR1 ha sido identificado en humanos. Este alelo posee dos mutaciones sinónimas en el exón 2 (dominio $\alpha 1$) y en el exón 5 (región transmembranal), por tanto su secuencia aminoacídica es idéntica a la del alelo ya conocido. Este alelo aparece en heterocigosis con el alelo ya descrito en un individuo caucásico.

c. Una nueva secuencia (MR1P1) relacionada con MR1 ha sido descrita en humanos y chimpancé común. MR1P1 es un fragmento génico homólogo a la región comprendida entre el extremo 3' del intrón 1 y el extremo 5' del intrón 3 del gen MR1 y localizado en el cromosoma 1 humano en cercanía al gen MR1. MR1P1 presenta más diferencias con respecto a MR1 en las región homóloga al intrón 2 de MR1 que en las regiones homólogas a los exones 2 y 3 de MR1, destacando una inserción de 217 pb similar al extremo 3' de la secuencia consenso del elemento transponible LINE-1 subfamilia L1PB3. En MR1P1 la presión selectiva no esta actuando de forma homogénea, pero en general acumula más mutaciones que el gen MR1.

d. La secuencia codificante de MR1 ha sido caracterizada en chimpancé común (*Pan troglodytes*) y orangután (*Pongo pygmaeus*) y presenta un alto grado homología con la molécula MR1 humana. En estas especies como en el hombre MR1 se expresa en varias isoformas transcripcionales, algunas sin el exón 4 (dominio $\alpha 3$) y otras sin parte del exón 2 (dominio $\alpha 1$) y sin el exón 4.

e. La molécula MR1 humana esta muy conservada evolutivamente en los mamíferos, particularmente en los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$. Las principales

diferencias entre los roedores y los primates se localizan en una sección de la putativa región de unión al péptido, en la región transmembranal y en la cola citoplasmática. La molécula MR1 conserva los residuos pan-MHC de clase I clásicas, las cisteínas estructurales de las moléculas MHC de clase I, el sitio de N-glicosilación de las moléculas MHC-I y la mayoría de los residuos implicados en la interacción de β_2m con las moléculas MHC de clase I clásicas. Por el contrario conserva pocos de los residuos implicados en la interacción de las moléculas MHC de clase I clásicas con el correceptor CD8 y el péptido antigénico.

f. La región extracelular de MR1 se ha logrado expresar en *Escherichia coli* y purificar en alto grado bajo la forma de una proteína recombinante denominada MR1r.

g. La inmunización de conejos con la proteína recombinante MR1r pura y disuelta en urea genera sueros de conejo anti-MR1r capaces de reconocer la proteína recombinante MR1r en ELISA y western-blot.

h. Los sueros anti-MR1r solamente son capaces de reconocer eficientemente la molécula MR1 humana (42 KDa) en células de la línea LCL 721.221 transfectadas con el cDNA de MR1. Este reconocimiento se produce mejor en western-blot que en citometría de flujo.

i. En nuestro laboratorio hemos generado dos nuevas líneas LCL 721.221 transfectadas con el cDNA de MR1 capaces de expresar la molécula MR1 humana en gran cantidad, contrastando con la baja expresión basal detectada en la línea LCL 721.221 transfectada con el vector nativo y en la línea salvaje. Estas nuevas líneas son MR1.221 y MR1(β_2m^{bright}).221. La línea MR1(β_2m^{bright}).221 se obtuvo seleccionando las células de la línea MR1.221 que presentaban mayor expresión en superficie de β_2m .

Anexos

ANEXO 1. NUEVAS SECUENCIAS DESCRITAS EN ESTA TESIS

	<i>Organismo</i>	<i>Clave de Acceso al GenBank</i>	<i>Descripción</i>
MR1	Hombre (<i>Homo sapiens</i>)	AJ249778	Secuencia codificante (cDNA) completa-Alelo PNL
	Chimpancé común (<i>Pan paniscus</i>)	AJ275982	Secuencia codificante (cDNA) completa-Alelo C
	Chimpancé común (<i>Pan paniscus</i>)	AJ275983	Isoforma transcripcional (cDNA)-Alelo C
	Chimpancé común (<i>Pan paniscus</i>)	AJ275984	Secuencia codificante (cDNA) completa-Alelo T
	Chimpancé común (<i>Pan paniscus</i>)	AJ275985	Isoforma transcripcional (cDNA)-Alelo T
	Chimpancé común (<i>Pan paniscus</i>)	AJ315656	Secuencia genómica parcial (exón2-intrón2-exón3)
	Orangután (<i>Pongo pygmaeus</i>)	AJ271828	Secuencia codificante (cDNA) completa
	Orangután (<i>Pongo pygmaeus</i>)	AJ271829	Isoforma transcripcional (cDNA)
	Orangután (<i>Pongo pygmaeus</i>)	AJ271830	Isoforma transcripcional (cDNA)
	Orangután (<i>Pongo pygmaeus</i>)	AJ315655	Secuencia genómica parcial (exón2-intrón2-exón3)
MR1P1	Hombre (<i>Homo sapiens</i>)	AJ132011	Secuencia genómica parcial
	Chimpancé común (<i>Pan paniscus</i>)	AJ315654	Secuencia genómica parcial

ANEXO 2 SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS DE MR1

<i>Organismo</i>	<i>Clave de Acceso al GenBank</i>	<i>Descripción</i>
Hombre <i>(Homo sapiens)</i>	AF223407	Secuencia codificante (cDNA) parcial
	NM_001531 (U22963)	Secuencia codificante (cDNA) completa
	AF010446 AF010447 AF031469	Isoformas transcripcionales (cDNA)
	AH006983 (AF073484+AF073485) AF039526	Secuencia génica completa
Ratón <i>(Mus musculus)</i>	U94989 NM_008209 (AF010448)	Secuencia codificante (cDNA) completa
	AF010449 AF010450 AF010451 AF010452 AF010453	Isoformas transcripcionales (cDNA)
	AF035672 AH007461 (AF068691+AF068692)	Secuencia génica completa
Rata <i>(Rattus norvegicus)</i>	Y13972	Secuencia codificante (cDNA) completa

Publicaciones

PUBLICACIONES

El trabajo presentado en esta tesis ha sido parcialmente divulgado en las siguientes publicaciones hasta la fecha:

1.- Parra-Cuadrado,J.F., Navarro,P., Mirones,I., Setien,F., Oteo,M., and Martinez-Naves,E. (2000). A study on the polymorphism of human MHC class I-related MR1 gene and identification of an MR1-like pseudogene. Tissue Antigens 56, 170-172.

Abstract: Human MR1 is a recently discovered, ubiquitously transcribed gene very similar to the HLA class I loci and of unknown function. Mouse and rat MR1 sequences have also been described showing high similarity with the human gene. The goal of this work was to investigate if human MR1 was polymorphic. We have found that DNA sequences of MR1-specific polymerase chain reaction (PCR) products obtained from samples of diverse ethnic origin were invariant except in one case in which two silent mutations were detected. We also found an MR1-like sequence displaying significant differences with the previously described, the most remarkable of which is a STOP codon in the alpha2 domain indicating that is a pseudogenes.

2.- Parra-Cuadrado,J.F., del Moral,M.G., Garcia-Pavia,P., Setien,F., and Martinez-Naves,E. (2001). Characterization of the MHC class I-related MR1 locus in nonhuman primates. Immunogenetics 53, 643-648.

Abstract: We characterized the MHC-related 1 (MR1) locus in two nonhuman primates species, Pongo pygmaeus and Pan troglodytes. MR1 cDNA sequences encoding several isoforms generated through alternative splicing were observed in both species. Amino acid alignment between the five species in which MR1 has been characterized to date - human, chimpanzee, orangutan, mouse, and rat - reveals a very high degree of conservation specially in the alpha1 and alpha2 domains of the molecule. The main differences concentrate in the transmembrane and cytoplasmic domains. In the three primates species there is a lysine residue inside the putative transmembrane domain which is not present in rodents. Furthermore, the MR1 cytoplasmic region is longer in rodents, with a conserved serine-containing motif that could be involved in endocytosis; remarkably, this motif is absent in the three primate species. We also describe the presence in the chimpanzee of a sequence homologous to the MR1P1 pseudogene previously found in humans.

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

A

Aldrich,C.J., DeCloux,A., Woods,A.S., Cotter,R.J., Soloski,M.J., and Forman,J. (1994). Identification of a Tap-dependent leader peptide recognized by alloreactive T cells specific for a class Ib antigen. *Cell* 79, 649-658.

Angenieux,C., Salamero,J., Fricker,D., Cazenave,J.P., Goud,B., Hanau,D., and de La,S.H. (2000). Characterization of CD1e, a third type of CD1 molecule expressed in dendritic cells. *J. Biol. Chem.* 275, 37757-37764.

B

Bahram,S., Bresnahan,M., Geraghty,D.E., and Spies,T. (1994). A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 6259-6263.

Bahram,S., Mizuki,N., Inoko,H., and Spies,T. (1996). Nucleotide sequence of the human MHC class I MICA gene. *Immunogenetics* 44, 80-81 (1).

Bahram,S., Shiina,T., Oka,A., Tamiya,G., and Inoko,H. (1996). Genomic structure of the human MHC class I MICB gene. *Immunogenetics* 45, 161-162 (2).

Bahram,S., Gilfillan,S., Kuhn,L.C., Moret,R., Schulze,J.B., Lebeau,A., and Schumann,K. (1999). Experimental hemochromatosis due to MHC class I HFE deficiency: immune status and iron metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 13312-13317.

Bahram,S. (2000). MIC genes: from genetics to biology. *Adv. Immunol.* 76, 1-60.

Bauer,S., Groh,V., Wu,J., Steinle,A., Phillips,J.H., Lanier,L.L., and Spies,T. (1999). Activation of NK cells and T cells by

NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 285, 727-729.

Beckman,E.M., Porcelli,S.A., Morita,C.T., Behar,S.M., Furlong,S.T., and Brenner,M.B. (1994). Recognition of a lipid antigen by CD1-restricted alpha beta+ T cells. *Nature* 372, 691-694.

Bennett,M.J., Lebron,J.A., and Bjorkman,P.J. (2000). Crystal structure of the hereditary haemochromatosis protein HFE complexed with transferrin receptor. *Nature* 403, 46-53.

Berman,H.M., Westbrook,J., Feng,Z., Gilliland,G., Bhat,T.N., Weissig,H., Shindyalov,I.N., and Bourne,P.E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* 28, 235-242.

Bjorkman,P.J. and Parham,P. (1990). Structure, function, and diversity of class I major histocompatibility complex molecules. *Annu. Rev. Biochem.* 59, 253-288.

Bodmer,J.G., Parham,P., Albert,E.D., and Marsh,S.G. (1997). Putting a hold on "HLA-H". The WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System. *Nat. Genet.* 15, 234-235.

Borvak,J., Richardson,J., Medesan,C., Antohe,F., Radu,C., Simionescu,M., Ghetie,V., and Ward,E.S. (1998). Functional expression of the MHC class I-related receptor, FcRn, in endothelial cells of mice. *Int. Immunol.* 10, 1289-1298.

Braud,V.M., Allan,D.S., Wilson,D., and McMichael,A.J. (1998). TAP- and tapasin-dependent HLA-E surface expression correlates with the binding of an MHC class I leader peptide. *Curr. Biol.* 8, 1-10 (1).

Braud,V.M., Allan,D.S., O'Callaghan,C.A., Soderstrom,K., D'Andrea,A., Ogg,G.S.,

Lazetic,S., Young,N.T., Bell,J.I., Phillips,J.H., Lanier,L.L., and McMichael,A.J. (1998). HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* 391, 795-799 (2).

Bundred,N.J., Miller,W.R., and Walker,R.A. (1987). An immunohistochemical study of the tissue distribution of the breast cyst fluid protein, zinc alpha 2 glycoprotein. *Histopathology* 11, 603-610.

C

Calabi,F. and Milstein,C. (1986). A novel family of human major histocompatibility complex-related genes not mapping to chromosome 6. *Nature* 323, 540-543.

Calabi,F. and Milstein,C. (2000). The molecular biology of CD1. *Semin. Immunol.* 12, 503-509.

Cantoni,C., Verdiani,S., Falco,M., Pessino,A., Cilli,M., Conte,R., Pende,D., Ponte,M., Mikaelsson,M.S., Moretta,L., and Biassoni,R. (1998). p49, a putative HLA class I-specific inhibitory NK receptor belonging to the immunoglobulin superfamily. *Eur. J. Immunol.* 28, 1980-1990.

Castano,A.R., Tangri,S., Miller,J.E., Holcombe,H.R., Jackson,M.R., Huse,W.D., Kronenberg,M., and Peterson,P.A. (1995). Peptide binding and presentation by mouse CD1. *Science* 269, 223-226.

Chun,T., Wang,K., Zuckermann,F.A., and Gaskins,H.R. (1999). Molecular cloning and characterization of a novel CD1 gene from the pig. *J. Immunol.* 162, 6562-6571.

Claros,M.G. and von Heijne,G. (1994). TopPred II: an improved software for membrane protein structure predictions. *Comput. Appl. Biosci.* 10, 685-686.

Colonna,M., Samaridis,J., Cella,M., Angman,L., Allen,R.L., O'Callaghan,C.A., Dunbar,R., Ogg,G.S., Cerundolo,V., and Rolink,A. (1998). Human myelomonocytic

cells express an inhibitory receptor for classical and nonclassical MHC class I molecules. *J. Immunol.* 160, 3096-3100.

Cosman,D., Mullberg,J., Sutherland,C.L., Chin,W., Armitage,R., Fanslow,W., Kubin,M., and Chalupny,N.J. (2001). ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity.* 14, 123-133.

Cserzo,M., Wallin,E., Simon,I., von Heijne,G., and Elofsson,A. (1997). Prediction of transmembrane alpha-helices in prokaryotic membrane proteins: the dense alignment surface method. *Protein Eng* 10, 673-676.

D

Das,H., Groh,V., Kuijl,C., Sugita,M., Morita,C.T., Spies,T., and Bukowski,J.F. (2001). MICA engagement by human Vgamma2Vdelta2 T cells enhances their antigen-dependent effector function. *Immunity.* 15, 83-93.

Davodeau,F., Peyrat,M.A., Necker,A., Dominici,R., Blanchard,F., Leget,C., Gaschet,J., Costa,P., Jacques,Y., Godard,A., Vie,H., Poggi,A., Romagne,F., and Bonneville,M. (1997). Close phenotypic and functional similarities between human and murine alphabeta T cells expressing invariant TCR alpha-chains. *J. Immunol.* 158, 5603-5611.

Diehl,M., Munz,C., Keilholz,W., Stevanovic,S., Holmes,N., Loke,Y.W., and Rammensee,H.G. (1996). Nonclassical HLA-G molecules are classical peptide presenters. *Curr. Biol.* 6, 305-314.

Ding,Y.H., Smith,K.J., Garboczi,D.N., Utz,U., Biddison,W.E., and Wiley,D.C. (1998). Two human T cell receptors bind in a similar diagonal mode to the HLA-A2/Tax peptide complex using different TCR amino acids. *Immunity.* 8, 403-411.

E

Elewaut,D. and Kronenberg,M. (2000). Molecular biology of NK T cell specificity and development. *Semin. Immunol.* *12*, 561-568.

Ellis,S.A., Palmer,M.S., and McMichael,A.J. (1990). Human trophoblast and the choriocarcinoma cell line BeWo express a truncated HLA Class I molecule. *J. Immunol.* *144*, 731-735.

F

Fahnestock,M.L., Tamir,I., Narhi,L., and Bjorkman,P.J. (1992). Thermal stability comparison of purified empty and peptide-filled forms of a class I MHC molecule. *Science* *258*, 1658-1662.

Fan,Q.R. and Wiley,D.C. (1999). Structure of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-Cw4, a ligand for the KIR2D natural killer cell inhibitory receptor. *J. Exp. Med.* *190*, 113-123.

Fan,Q.R., Long,E.O., and Wiley,D.C. (2001). Crystal structure of the human natural killer cell inhibitory receptor KIR2DL1-HLA-Cw4 complex. *Nat. Immunol.* *2*, 452-460.

Feder,J.N., Gnirke,A., Thomas,W., Tsuchihashi,Z., Ruddy,D.A., Basava,A., Dormishian,F., Domingo,R., Jr., Ellis,M.C., Fullan,A., Hinton,L.M., Jones,N.L., Kimmel,B.E., Kronmal,G.S., Lauer,P., Lee,V.K., Loeb,D.B., Mapa,F.A., McClelland,E., Meyer,N.C., Mintier,G.A., Moeller,N., Moore,T., Morikang,E., Wolff,R.K., and . (1996). A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat. Genet.* *13*, 399-408.

Feder,J.N., Penny,D.M., Irrinki,A., Lee,V.K., Lebron,J.A., Watson,N., Tsuchihashi,Z., Sigal,E., Bjorkman,P.J., and Schatzman,R.C. (1998). The hemochromatosis gene product complexes with the transferrin receptor and lowers its affinity for ligand binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *95*, 1472-1477.

Fodil,N., Pellet,P., Laloux,L., Hauptmann,G., Theodorou,I., and Bahram,S. (1999). MICA haplotypic diversity. *Immunogenetics* *49*, 557-560.

Freije,J.P., Fueyo,A., Uria,J., and Lopez-Otin,C. (1991). Human Zn-alpha 2-glycoprotein cDNA cloning and expression analysis in benign and malignant breast tissues. *FEBS Lett.* *290*, 247-249.

Freije,J.P., Fueyo,A., Uria,J.A., Velasco,G., Sanchez,L.M., Lopez-Boado,Y.S., and Lopez-Otin,C. (1993). Human Zn-alpha 2-glycoprotein: complete genomic sequence, identification of a related pseudogene and relationship to class I major histocompatibility complex genes. *Genomics* *18*, 575-587.

Fukudome,K. and Esmon,C.T. (1994). Identification, cloning, and regulation of a novel endothelial cell protein C/activated protein C receptor. *J. Biol. Chem.* *269*, 26486-26491.

G

Gadola,S.D., Zaccari,N.R., Harlos,K., Shepherd,D., Castro-Palomino,J.C., Ritter,G., Schmidt,R.R., Jones,E.Y., and Cerundolo,V. (2002). Structure of human CD1b with bound ligands at 2.3 Å, a maze for alkyl chains. *Nat. Immunol.* *3*, 721-726.

Geraghty,D.E., Koller,B.H., Pei,J., and Hansen,J.A. (1992). Examination of four HLA class I pseudogenes. Common events in the evolution of HLA genes and pseudogenes. *J. Immunol.* *149*, 1947-1956¹.

Geraghty,D.E., Koller,B.H., Hansen,J.A., and Orr,H.T. (1992). The HLA class I gene family includes at least six genes and twelve pseudogenes and gene fragments. *J. Immunol.* *149*, 1934-1946².

Geraghty,D.E., Koller,B.H., and Orr,H.T. (1987). A human major histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *84*, 9145-9149.

Geraghty,D.E., Wei,X.H., Orr,H.T., and Koller,B.H. (1990). Human leukocyte antigen F (HLA-F). An expressed HLA gene composed of a class I coding sequence linked to a novel transcribed repetitive element. *J. Exp. Med.* *171*, 1-18.

Ghetie,V., Hubbard,J.G., Kim,J.K., Tsen,M.F., Lee,Y., and Ward,E.S. (1996). Abnormally short serum half-lives of IgG in beta 2-microglobulin-deficient mice. *Eur. J. Immunol.* *26*, 690-696.

Groh,V., Steinle,A., Bauer,S., and Spies,T. (1998). Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gammadelta T cells. *Science* *279*, 1737-1740.

Groh,V., Rhinehart,R., Randolph-Habecker,J., Topp,M.S., Riddell,S.R., and Spies,T. (2001). Costimulation of CD8alpha T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nat. Immunol.* *2*, 255-260.

Groh,V., Wu,J., Yee,C., and Spies,T. (2002). Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* *419*, 734-738.

Grossberger,D. and Parham,P. (1992). Reptilian class I major histocompatibility complex genes reveal conserved elements in class I structure. *Immunogenetics* *36*, 166-174.

Guild,B.C. and Strominger,J.L. (1984). HLA-A2 antigen phosphorylation in vitro by cyclic AMP-dependent protein kinase. Sites of phosphorylation and segmentation in class I major histocompatibility complex gene structure. *J. Biol. Chem.* *259*, 13504-13510.

H

Hale,L.P., Price,D.T., Sanchez,L.M., Demark-Wahnefried,W., and Madden,J.F. (2001). Zinc alpha-2-glycoprotein is expressed by malignant prostatic epithelium and may serve as a potential

serum marker for prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* *7*, 846-853.

Han,M., Hannick,L.I., DiBrino,M., and Robinson,M.A. (1999). Polymorphism of human CD1 genes. *Tissue Antigens* *54*, 122-127.

Hashimoto,K., Hirai,M., and Kurosawa,Y. (1995). A gene outside the human MHC related to classical HLA class I genes. *Science* *269*, 693-695.

Haymann,J.P., Levraud,J.P., Bouet,S., Kappes,V., Hagege,J., Nguyen,G., Xu,Y., Rondeau,E., and Sraer,J.D. (2000). Characterization and localization of the neonatal Fc receptor in adult human kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.* *11*, 632-639.

Hofmann,K. and Stoffel,W. (1992). PROFILEGRAPH: an interactive graphical tool for protein sequence analysis. *Comput. Appl. Biosci.* *8*, 331-337.

Holmes,M.A., Li,P., Petersdorf,E.W., and Strong,R.K. (2002). Structural Studies of Allelic Diversity of the MHC Class I Homolog MIC-B, a Stress-Inducible Ligand for the Activating Immunoreceptor NKG2D. *J. Immunol.* *169*, 1395-1400.

Hughes,A.L., Yeager,M., Ten Elshof,A.E., and Chorney,M.J. (1999). A new taxonomy of mammalian MHC class I molecules. *Immunol. Today* *20*, 22-26.

I

Israel,E.J., Patel,V.K., Taylor,S.F., Marshak-Rothstein,A., and Simister,N.E. (1995). Requirement for a beta 2-microglobulin-associated Fc receptor for acquisition of maternal IgG by fetal and neonatal mice. *J. Immunol.* *154*, 6246-6251.

J

Jones,E.A. and Waldmann,T.A. (1972). The mechanism of intestinal uptake and transcellular transport of IgG in the neonatal rat. *J. Clin. Invest* *51*, 2916-2927.

Junghans,R.P. (1997). Finally! The Brambell receptor (FcRB). Mediator of transmission of immunity and protection from catabolism for IgG. *Immunol. Res.* *16*, 29-57.

Jurka,J., Klonowski,P., Dagman,V., and Pelton,P. (1996). CENSOR--a program for identification and elimination of repetitive elements from DNA sequences. *Comput. Chem.* *20*, 119-121.

K

Kandil,E., Noguchi,M., Ishibashi,T., and Kasahara,M. (1995). Structural and phylogenetic analysis of the MHC class I-like Fc receptor gene. *J. Immunol.* *154*, 5907-5918.

Kasahara,M., Kandil,E., Salter-Cid,L., and Flajnik,M.F. (1996). Origin and evolution of the class I gene family: why are some of the mammalian class I genes encoded outside the major histocompatibility complex? *Res. Immunol.* *147*, 278-284.

Kasahara,M. (1998). What do the paralogous regions in the genome tell us about the origin of the adaptive immune system? *Immunol. Rev.* *166*, 159-175.

Katsanis,N., Fitzgibbon,J., and Fisher,E.M. (1996). Paralogy mapping: identification of a region in the human MHC triplicated onto human chromosomes 1 and 9 allows the prediction and isolation of novel PBX and NOTCH loci. *Genomics* *35*, 101-108.

Kaufman,J., Salomonsen,J., and Flajnik,M. (1994). Evolutionary conservation of MHC class I and class II molecules--different yet the same. *Semin. Immunol.* *6*, 411-424.

Kawano,T., Cui,J., Koezuka,Y., Toura,I., Kaneko,Y., Motoki,K., Ueno,H., Nakagawa,R., Sato,H., Kondo,E., Koseki,H., and Taniguchi,M. (1997). CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides. *Science* *278*, 1626-1629.

Koller,B.H., Geraghty,D.E., Shimizu,Y., DeMars,R., and Orr,H.T. (1988). HLA-E. A novel HLA class I gene expressed in resting T lymphocytes. *J. Immunol.* *141*, 897-904.

Komatsu-Wakui,M., Tokunaga,K., Ishikawa,Y., Kashiwase,K., Moriyama,S., Tsuchiya,N., Ando,H., Shiina,T., Geraghty,D.E., Inoko,H., and Juji,T. (1999). MIC-A polymorphism in Japanese and a MIC-A-MIC-B null haplotype. *Immunogenetics* *49*, 620-628.

Kronenberg,M. and Gapin,L. (2002). The unconventional lifestyle of NKT cells. *Nat. Rev. Immunol.* *2*, 557-568.

Kubin,M., Cassiano,L., Chalupny,J., Chin,W., Cosman,D., Fanslow,W., Mullberg,J., Rousseau,A.M., Ulrich,D., and Armitage,R. (2001). ULBP1, 2, 3: novel MHC class I-related molecules that bind to human cytomegalovirus glycoprotein UL16, activate NK cells. *Eur. J. Immunol.* *31*, 1428-1437.

Kurosawa,S., Stearns-Kurosawa,D.J., Hidari,N., and Esmon,C.T. (1997). Identification of functional endothelial protein C receptor in human plasma. *J. Clin. Invest* *100*, 411-418.

Kurosawa,S., Stearns-Kurosawa,D.J., Carson,C.W., D'Angelo,A., Della,V.P., and Esmon,C.T. (1998). Plasma levels of endothelial cell protein C receptor are elevated in patients with sepsis and systemic lupus erythematosus: lack of correlation with thrombomodulin suggests involvement of different pathological processes. *Blood* *91*, 725-727.

Kurosawa,S., Esmon,C.T., and Stearns-Kurosawa,D.J. (2000). The soluble endothelial protein C receptor binds to activated neutrophils: involvement of proteinase-3 and CD11b/CD18. *J. Immunol.* *165*, 4697-4703.

L

Laszik,Z., Mitro,A., Taylor,F.B., Jr., Ferrell,G., and Esmon,C.T. (1997). Human

protein C receptor is present primarily on endothelium of large blood vessels: implications for the control of the protein C pathway. *Circulation* *96*, 3633-3640.

Lawlor,D.A., Warren,E., Ward,F.E., and Parham,P. (1990). Comparison of class I MHC alleles in humans and apes. *Immunol. Rev.* *113*, 147-185.

Leach,J.L., Sedmak,D.D., Osborne,J.M., Rahill,B., Lairmore,M.D., and Anderson,C.L. (1996). Isolation from human placenta of the IgG transporter, FcRn, and localization to the syncytiotrophoblast: implications for maternal-fetal antibody transport. *J. Immunol.* *157*, 3317-3322.

Lebron,J.A., Bennett,M.J., Vaughn,D.E., Chirino,A.J., Snow,P.M., Mintier,G.A., Feder,J.N., and Bjorkman,P.J. (1998). Crystal structure of the hemochromatosis protein HFE and characterization of its interaction with transferrin receptor. *Cell* *93*, 111-123.

Lepin,E.J., Bastin,J.M., Allan,D.S., Roncador,G., Braud,V.M., Mason,D.Y., van der Merwe,P.A., McMichael,A.J., Bell,J.I., Powis,S.H., and O'Callaghan,C.A. (2000). Functional characterization of HLA-F and binding of HLA-F tetramers to ILT2 and ILT4 receptors. *Eur. J. Immunol.* *30*, 3552-3561.

Li,P., Willie,S.T., Bauer,S., Morris,D.L., Spies,T., and Strong,R.K. (1999). Crystal structure of the MHC class I homolog MIC-A, a gammadelta T cell ligand. *Immunity.* *10*, 577-584.

Li,P., Morris,D.L., Willcox,B.E., Steinle,A., Spies,T., and Strong,R.K. (2001). Complex structure of the activating immunoreceptor NKG2D and its MHC class I-like ligand MICA. *Nat. Immunol.* *2*, 443-451.

M

Madden,D.R. (1995). The three-dimensional structure of peptide-MHC complexes. *Annu. Rev. Immunol.* *13*, 587-622.

Martin,L.H., Calabi,F., Lefebvre,F.A., Bilsland,C.A., and Milstein,C. (1987). Structure and expression of the human thymocyte antigens CD1a, CD1b, and CD1c. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *84*, 9189-9193.

Medesan,C., Matesoi,D., Radu,C., Ghetie,V., and Ward,E.S. (1997). Delineation of the amino acid residues involved in transcytosis and catabolism of mouse IgG1. *J. Immunol.* *158*, 2211-2217.

Mizuki,N., Ota,M., Katsuyama,Y., Yabuki,K., Ando,H., Goto,K., Nakamura,S., Bahram,S., Ohno,S., and Inoko,H. (1999). Association analysis between the MIC-A and HLA-B alleles in Japanese patients with Behcet's disease. *Arthritis Rheum.* *42*, 1961-1966.

Moller,S., Croning,M.D., and Apweiler,R. (2001). Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions. *Bioinformatics.* *17*, 646-653.

Moody,D.B., Ulrichs,T., Muhlecker,W., Young,D.C., Gurcha,S.S., Grant,E., Rosat,J.P., Brenner,M.B., Costello,C.E., Besra,G.S., and Porcelli,S.A. (2000). CD1c-mediated T-cell recognition of isoprenoid glycolipids in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Nature* *404*, 884-888.

Moreau,P., Dausset,J., Carosella,E.D., and Rouas-Freiss,N. (2002). Viewpoint on the functionality of the human leukocyte antigen-g null allele at the fetal-maternal interface. *Biol. Reprod.* *67*, 1375-1378.

N

Navarro,F., Llano,M., Bellon,T., Colonna,M., Geraghty,D.E., and Lopez-Botet,M. (1999). The ILT2(LIR1) and CD94/NKG2A NK cell receptors respectively recognize HLA-G1 and HLA-E molecules co-expressed on target cells. *Eur. J. Immunol.* *29*, 277-283.

O

O'Callaghan,C.A., Tormo,J., Willcox,B.E., Braud,V.M., Jakobsen,B.K., Stuart,D.I., McMichael,A.J., Bell,J.I., and Jones,E.Y. (1998). Structural features impose tight peptide binding specificity in the nonclassical MHC molecule HLA-E. *Mol. Cell* 1, 531-541.

Oganesyan,V., Oganesyan,N., Terzyan,S., Qu,D., Dauter,Z., Esmon,N.L., and Esmon,C.T. (2002). The crystal structure of the endothelial protein C receptor and a bound phospholipid. *J. Biol. Chem.* 277, 24851-24854.

Oteo,M., Parra,J.F., Mirones,I., Gimenez,L.I., Setien,F., and Martinez-Naves,E. (1999). Single strand conformational polymorphism analysis of human CD1 genes in different ethnic groups. *Tissue Antigens* 53, 545-550.

P

Parra-Cuadrado,J.F., Navarro,P., Mirones,I., Setien,F., Oteo,M., and Martinez-Naves,E. (2000). A study on the polymorphism of human MHC class I-related MR1 gene and identification of an MR1-like pseudogene. *Tissue Antigens* 56, 170-172.

Parra-Cuadrado,J.F., del Moral,M.G., Garcia-Pavia,P., Setien,F., and Martinez-Naves,E. (2001). Characterization of the MHC class I-related MR1 locus in nonhuman primates. *Immunogenetics* 53, 643-648.

Porcelli,S., Morita,C.T., and Brenner,M.B. (1992). CD1b restricts the response of human CD4-8- T lymphocytes to a microbial antigen. *Nature* 360, 593-597.

R

Radaev,S., Rostro,B., Brooks,A.G., Colonna,M., and Sun,P.D. (2001). Conformational plasticity revealed by the cocrystal structure of NKG2D and its class I MHC-like ligand ULBP3. *Immunity*. 15, 1039-1049.

Raghavan,M., Bonagura,V.R., Morrison,S.L., and Bjorkman,P.J. (1995). Analysis of the pH dependence of the neonatal Fc receptor/immunoglobulin G interaction using antibody and receptor variants. *Biochemistry* 34, 14649-14657.

Rajagopalan,S. and Long,E.O. (1999). A human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G-specific receptor expressed on all natural killer cells. *J. Exp. Med.* 189, 1093-1100.

Regan,L.M., Stearns-Kurosawa,D.J., Kurosawa,S., Mollica,J., Fukudome,K., and Esmon,C.T. (1996). The endothelial cell protein C receptor. Inhibition of activated protein C anticoagulant function without modulation of reaction with proteinase inhibitors. *J. Biol. Chem.* 271, 17499-17503.

Riepert,P., Wanner,V., and Bahram,S. (1998). Genomics, isoforms, expression, and phylogeny of the MHC class I-related MR1 gene. *J. Immunol.* 161, 4066-4077 (1).

Riepert,P., Gilfillan,S., Nanda,I., Schmid,M., and Bahram,S. (1998). The mouse HFE gene. *Immunogenetics* 47, 174-177 (2).

Riewald,M., Petrovan,R.J., Donner,A., Mueller,B.M., and Ruf,W. (2002). Activation of endothelial cell protease activated receptor 1 by the protein C pathway. *Science* 296, 1880-1882.

Rodewald,R. and Kraehenbuhl,J.P. (1984). Receptor-mediated transport of IgG. *J. Cell Biol.* 99, 159s-164s.

Rychlik,W. and Rhoads,R.E. (1989). A computer program for choosing optimal oligonucleotides for filter hybridization, sequencing and in vitro amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 17, 8543-8551.

S

Sanchez,L.M., Lopez-Otin,C., and Bjorkman,P.J. (1997). Biochemical characterization and crystalization of human Zn-alpha2-glycoprotein, a soluble

class I major histocompatibility complex homolog. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *94*, 4626-4630.

Sanchez,L.M., Chirino,A.J., and Bjorkman,P. (1999). Crystal structure of human ZAG, a fat-depleting factor related to MHC molecules. *Science* *283*, 1914-1919.

Saper,M.A., Bjorkman,P.J., and Wiley,D.C. (1991). Refined structure of the human histocompatibility antigen HLA-A2 at 2.6 Å resolution. *J. Mol. Biol.* *219*, 277-319.

Shamshiev,A., Donda,A., Carena,I., Mori,L., Kappos,L., and De Libero,G. (1999). Self glycolipids as T-cell autoantigens. *Eur. J. Immunol.* *29*, 1667-1675.

Shibata,S. and Miura,K. (1982). Nephritogenic glycoprotein. IX. Plasma Zn-alpha2-glycoprotein as a second source of nephritogenic glycoprotein in urine. *Nephron* *31*, 170-176.

Shiina,T., Tamiya,G., Oka,A., Takishima,N., Yamagata,T., Kikkawa,E., Iwata,K., Tomizawa,M., Okuaki,N., Kuwano,Y., Watanabe,K., Fukuzumi,Y., Itakura,S., Sugawara,C., Ono,A., Yamazaki,M., Tashiro,H., Ando,A., Ikemura,T., Soeda,E., Kimura,M., Bahram,S., and Inoko,H. (1999). Molecular dynamics of MHC genesis unraveled by sequence analysis of the 1,796,938-bp HLA class I region. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *96*, 13282-13287.

Shimizu,Y., Geraghty,D.E., Koller,B.H., Orr,H.T., and DeMars,R. (1988). Transfer and expression of three cloned human non-HLA-A,B,C class I major histocompatibility complex genes in mutant lymphoblastoid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *85*, 227-231.

Shimizu,Y. and DeMars,R. (1989). Production of human cells expressing individual transferred HLA-A,-B,-C genes using an HLA-A,-B,-C null human cell line. *J. Immunol.* *142*, 3320-3328.

Sieling,P.A., Chatterjee,D., Porcelli,S.A., Prigozy,T.I., Mazzaccaro,R.J., Soriano,T., Bloom,B.R., Brenner,M.B., Kronenberg,M., Brennan,P.J., and . (1995). CD1-restricted T cell recognition of microbial lipoglycan antigens. *Science* *269*, 227-230.

Simister,N.E. and Rees,A.R. (1985). Isolation and characterization of an Fc receptor from neonatal rat small intestine. *Eur. J. Immunol.* *15*, 733-738.

Simister,N.E. and Mostov,K.E. (1989). An Fc receptor structurally related to MHC class I antigens. *Nature* *337*, 184-187.

Simister,N.E., Story,C.M., Chen,H.L., and Hunt,J.S. (1996). An IgG-transporting Fc receptor expressed in the syncytiotrophoblast of human placenta. *Eur. J. Immunol.* *26*, 1527-1531.

Smit,A.F., Toth,G., Riggs,A.D., and Jurka,J. (1995). Ancestral, mammalian-wide subfamilies of LINE-1 repetitive sequences. *J. Mol. Biol.* *246*, 401-417.

Spada,F.M., Koezuka,Y., and Porcelli,S.A. (1998). CD1d-restricted recognition of synthetic glycolipid antigens by human natural killer T cells. *J. Exp. Med.* *188*, 1529-1534.

Speir,J.A., Stevens,J., Joly,E., Butcher,G.W., and Wilson,I.A. (2001). Two different, highly exposed, bulged structures for an unusually long peptide bound to rat MHC class I RT1-Aa. *Immunity.* *14*, 81-92.

Stearns-Kurosawa,D.J., Kurosawa,S., Mollica,J.S., Ferrell,G.L., and Esmon,C.T. (1996). The endothelial cell protein C receptor augments protein C activation by the thrombin-thrombomodulin complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *93*, 10212-10216.

Story,C.M., Mikulska,J.E., and Simister,N.E. (1994). A major histocompatibility complex class I-like Fc receptor cloned from human placenta: possible role in transfer of immunoglobulin

G from mother to fetus. *J. Exp. Med.* *180*, 2377-2381.

Sutherland,C.L., Chalupny,N.J., Schooley,K., VandenBos,T., Kubin,M., and Cosman,D. (2002). UL16-binding proteins, novel MHC class I-related proteins, bind to NKG2D and activate multiple signaling pathways in primary NK cells. *J. Immunol.* *168*, 671-679.

T

Tada,T., Ohkubo,I., Niwa,M., Sasaki,M., Tateyama,H., and Eimoto,T. (1991). Immunohistochemical localization of Zn-alpha 2-glycoprotein in normal human tissues. *J. Histochem. Cytochem.* *39*, 1221-1226.

Telleman,P. and Junghans,R.P. (2000). The role of the Brambell receptor (FcRB) in liver: protection of endocytosed immunoglobulin G (IgG) from catabolism in hepatocytes rather than transport of IgG to bile. *Immunology* *100*, 245-251.

Thompson,J.D., Higgins,D.G., and Gibson,T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* *22*, 4673-4680.

Tieng,V., Le Bouguenec,C., du,M.L., Bertheau,P., Desreumaux,P., Janin,A., Charron,D., and Toubert,A. (2002). Binding of *Escherichia coli* adhesin AfaE to CD55 triggers cell-surface expression of the MHC class I-related molecule MICA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *99*, 2977-2982.

Tilloy,F., Treiner,E., Park,S.H., Garcia,C., Lemonnier,F., de La,S.H., Bendelac,A., Bonneville,M., and Lantz,O. (1999). An invariant T cell receptor alpha chain defines a novel TAP-independent major histocompatibility complex class Ib-restricted alpha/beta T cell subpopulation in mammals. *J. Exp. Med.* *189*, 1907-1921.

Todorov,P.T., McDevitt,T.M., Meyer,D.J., Ueyama,H., Ohkubo,I., and Tisdale,M.J. (1998). Purification and characterization of a tumor lipid-mobilizing factor. *Cancer Res.* *58*, 2353-2358.

Tomasec,P., Braud,V.M., Rickards,C., Powell,M.B., McSharry,B.P., Gadola,S., Cerundolo,V., Borysiewicz,L.K., McMichael,A.J., and Wilkinson,G.W. (2000). Surface expression of HLA-E, an inhibitor of natural killer cells, enhanced by human cytomegalovirus gpUL40. *Science* *287*, 1031.

Tormo,J., Natarajan,K., Margulies,D.H., and Mariuzza,R.A. (1999). Crystal structure of a lectin-like natural killer cell receptor bound to its MHC class I ligand. *Nature* *402*, 623-631.

U

Uchigiri,C., Mizuno,S., Wada,K., Tsutsumi,M., Kato,T., Kamiya,T., and Ozawa,K. (1997). An identification of the HLA-F null allele in Japanese. *Immunogenetics* *45*, 466-467.

Ueyama,H., Deng,H.X., and Ohkubo,I. (1993). Molecular cloning and chromosomal assignment of the gene for human Zn-alpha 2-glycoprotein. *Biochemistry* *32*, 12968-12976.

Ugolini,S. and Vivier,E. (2001). Multifaceted roles of MHC class I and MHC class I-like molecules in T cell activation. *Nat. Immunol.* *2*, 198-200.

Ulbrecht,M., Honka,T., Person,S., Johnson,J.P., and Weiss,E.H. (1992). The HLA-E gene encodes two differentially regulated transcripts and a cell surface protein. *J. Immunol.* *149*, 2945-2953.

V

Vanin,E.F. (1985). Processed pseudogenes: characteristics and evolution. *Annu. Rev. Genet.* *19*, 253-272.

Vega, M.A. and Strominger, J.L. (1989). Constitutive endocytosis of HLA class I antigens requires a specific portion of the intracytoplasmic tail that shares structural features with other endocytosed molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *86*, 2688-2692.

Von Heijne, G. (1992). Membrane protein structure prediction. Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule. *J. Mol. Biol.* *225*, 487-494.

W

Wainwright, S.D., Biro, P.A., and Holmes, C.H. (2000). HLA-F is a predominantly empty, intracellular, TAP-associated MHC class Ib protein with a restricted expression pattern. *J. Immunol.* *164*, 319-328.

Wallace, G.R., Verity, D.H., Delamaine, L.J., Ohno, S., Inoko, H., Ota, M., Mizuki, N., Yabuki, K., Kondiatis, E., Stephens, H.A., Madanat, W., Kanawati, C.A., Stanford, M.R., and Vaughan, R.W. (1999). MIC-A allele profiles and HLA class I associations in Behcet's disease. *Immunogenetics* *49*, 613-617.

Walter, L. and Gunther, E. (1998). Isolation and molecular characterization of the rat MR1 homologue, a non-MHC-linked class I-related gene. *Immunogenetics* *47*, 477-482.

West, A.P., Jr. and Bjorkman, P.J. (2000). Crystal structure and immunoglobulin G binding properties of the human major histocompatibility complex-related Fc receptor(γ). *Biochemistry* *39*, 9698-9708.

Y

Yamaguchi, H., Hirai, M., Kurosawa, Y., and Hashimoto, K. (1997). A highly conserved major histocompatibility complex class I-related gene in mammals. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *238*, 697-702.

Yamaguchi, H., Kurosawa, Y., and Hashimoto, K. (1998). Expanded genomic

organization of conserved mammalian MHC class I-related genes, human MR1 and its murine ortholog. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *250*, 558-564.

Yamaguchi, H. and Hashimoto, K. (2002). Association of MR1 protein, an MHC class I-related molecule, with beta(2)-microglobulin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *290*, 722-729.

Yamamoto, K., Fujiyama, Y., Andoh, A., Bamba, T., and Okabe, H. (2001). Oxidative stress increases MICA and MICB gene expression in the human colon carcinoma cell line (CaCo-2). *Biochim. Biophys. Acta* *1526*, 10-12.

Ye, X., Fukudome, K., Tsuneyoshi, N., Satoh, T., Tokunaga, O., Sugawara, K., Mizokami, H., and Kimoto, M. (1999). The endothelial cell protein C receptor (EPCR) functions as a primary receptor for protein C activation on endothelial cells in arteries, veins, and capillaries. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *259*, 671-677.

Z

Zeng, Z., Castano, A.R., Segelke, B.W., Stura, E.A., Peterson, P.A., and Wilson, I.A. (1997). Crystal structure of mouse CD1: An MHC-like fold with a large hydrophobic binding groove. *Science* *277*, 339-345.

Zhu, X., Meng, G., Dickinson, B.L., Li, X., Mizoguchi, E., Miao, L., Wang, Y., Robert, C., Wu, B., Smith, P.D., Lencer, W.I., and Blumberg, R.S. (2001). MHC class I-related neonatal Fc receptor for IgG is functionally expressed in monocytes, intestinal macrophages, and dendritic cells. *J. Immunol.* *166*, 3266-3276.