

**REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS  
MOLÉCULAS DE HISTOCOMPATIBILIDAD  
DE CLASE II**

Tesis

Entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al grado de

Doctor en Ciencias con mención en Biología

Facultad de Ciencias

por

**Rodrigo Antonio Naves Pichuante**

Abril, 1999

Director de Tesis: **Dra. María Rosa Bono M.**

FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION  
TESIS DE DOCTORADO

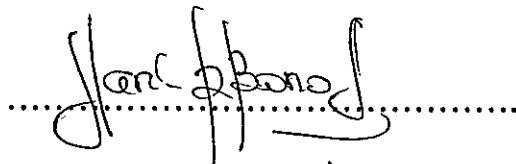
Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato:

**Rodrigo Antonio Naves Pichuante**

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología, en el exámen de Defensa de Tesis rendido el día 13 de Abril de 1999.

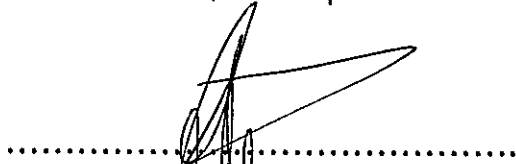
Director de Tesis:

Dra. María Rosa Bono M.

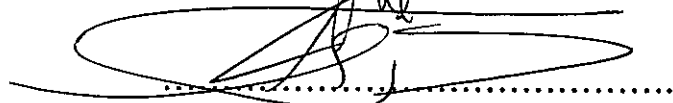


Comisión de Evaluación de la Tesis

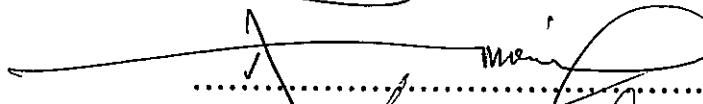
Dr. Alfredo de Ioannes



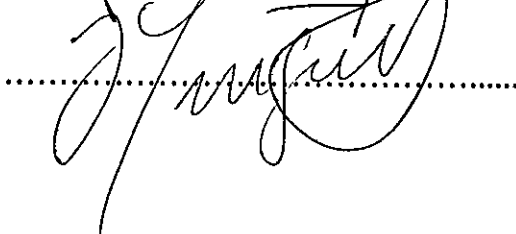
Dr. Arturo Ferreira



Dr. Ricardo Maccioni



Dr. José Minguel



Esta Tesis fue financiada por los siguientes Proyectos de investigación otorgados por FONDECYT:

Proyecto 1960876 asignado a la Dra. María Rosa Bono, Proyecto 1980208 asignado al Dr. Mario Rosemblatt y Proyectos 2950018 (Proyecto de Tesis de Doctorado) y 4980004 (Proyecto de término de tesis) asignados a Rodrigo Naves .

*A mis Padres, Elena y Víctor.*

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, deseo agradecer a la Dra. María Rosa Bono por recibirme en su laboratorio y haberme dado la oportunidad de trabajar en un tema tan interesante. Agradezco además, tu constante apoyo y preocupación por el desarrollo de mi tesis y de mi formación científica, tu amplia disposición para conversar, tu ayuda más allá de lo meramente profesional, y por sobretodo por haberme dado plena libertad para desarrollar mis propias ideas. La permanente dedicación que muestras por tu trabajo y por el de los demás y la forma crítica y rigurosa en que lo llevas a cabo, son un verdadero ejemplo de vocación que han influido en mi desarrollo personal y profesional.

Quiero agradecer especialmente al Dr. Mario Roseblatt por su gran ayuda, sus importantes aportes, valiosos consejos y por su buen humor. Gracias por haber corregido el manuscrito de mi tesis y estar siempre dispuesto a colaborar.

Deseo dar las gracias al Dr. Marc Fellous quien me permitió realizar una estadia en su laboratorio en el Instituto Pasteur en París. Gracias por su apoyo y todas sus gestiones.

Quiero expresar mi agradecimiento a la Dra. Catherine Alcaïde por compartir conmigo toda su experiencia y haberme ayudado en una importante parte de mi tesis.

Deseo agradecer a CONICYT por haberme privilegiado con una de sus becas de Doctorado. También doy las gracias a FONDECYT por haberme aprobado dos proyectos de investigación los que me permitieron desarrollar y terminar este trabajo de tesis.

Agradezco a los integrantes de mi comisión por la buena disposición que siempre han manifestado, por sus aportes al progreso de mi tesis y el gran interés que han mostrado por mi trabajo.

Quiero dar las gracias a todos mis amigos del laboratorio de Inmunología. Todos me han ayudado de una u otra forma y se los agradezco enormemente. Ha sido un placer trabajar y compartir tantos buenos y malos momentos con ustedes. Le doy las gracias a Valeska Simon por su confianza y por su ayuda en algunas técnicas de laboratorio, Alejandra Loyola, Lilian Reyes y Gisella Puga por su gran amistad y por ayudarme en la elaboración de alguna de las figuras de este y otros trabajos, a Rodrigo Mora por estar siempre dispuesto a conversar y discutir sobre mis resultados, y a Fedora Godoy, Leonardo Vargas y Luis Vidal por brindarme su amistad y estar siempre de buen humor.

Le doy mi agradecimiento a los grandes amigos que hice en la Unidad de Inmunogenética Humana del Instituto Pasteur. En especial quiero agradecer a Ana María Lennon por su asistencia en la realización de algunos experimentos y a Laura y Laurent por la gran ayuda y ánimo que recibí de Ustedes. También le doy las gracias por su amistad y apoyo a Guillaume, Manoel, Tammie, Sandrine, Rainer, Luis, Csilla, Marie-Louise, Betty, Catherine, Nicole, Vasco, Ken, Sandra, Mario, Claudine, Chris y Thomas.

Quiero agradecer en forma muy especial a Eduardo García y familia, y a Leda Gática por haberme recibido y ayudado durante mi estadía en Francia. Gracias por su amistad y cariño.

Agradezco en forma particular a toda mi familia y amigos. Gracias al cariño y ánimo que he recibido de mis hermanos, tías, primos (as), sobrinos (as) y cuñados (as) he podido llegar hasta este momento. Todos me han ayudado de distintas formas y se los agradeceré siempre. En especial quiero agradecer a Gloria Naves, Eduardo Sandoval y Lorena Naves por toda la ayuda que me brindaron en la realización de este trabajo.

Mi especial agradecimiento es para Carola Barraza. Quiero darte las gracias por la ayuda que me has dado durante el desarrollo de mi tesis, ya sea discutiendo conmigo los resultados de algún experimento, ayudándome con las figuras y las diapositivas, corrigiendo mi redacción o mediante asistencia computacional. Agradezco tu constante apoyo y por sobretodo tu enorme paciencia. Gracias por permitirme compartir contigo todos mis buenos y malos momentos y por estar a mi lado para darme ánimo y fuerza para seguir adelante. También quiero agradecer la ayuda que he recibido de toda tu familia.

Finalmente, quiero dar mi más profundo agradecimiento a mis Padres. Cualquier cosa que diga siempre será poco para agradecer todo el esfuerzo, cariño y dedicación que me han brindado. Les agradezco el apoyo que en todo momento he recibido de Ustedes, el ejemplo de vida que para mí representan y el hacerme sentir que siempre estarán conmigo.

# INDICE DE MATERIAS

<b>LISTA DE FIGURAS Y TABLAS</b>	v
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	viii
<b>RESUMEN</b>	xi
<b>SUMMARY</b>	xv
<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>1.0 El Complejo Principal de Histocompatibilidad</b>	3
<b>1.1 Organización Genómica del Complejo Principal             de Histocompatibilidad</b>	3
<b>2.2 Estructura de los Antígenos MHC</b>	4
<b>3.0 Expresión de los Antígenos MHC</b>	5
<b>4.0 Presentación de Antígeno</b>	6
<b>5.0 Mecanismos Moleculares de la Regulación de la Expresión de     Antígenos MHC-II</b>	8
<b>5.1 Elementos Reguladores en <i>CIS</i></b>	8
<b>5.2 Factores que se Unen al Promotor de los Genes             MHC-II</b>	10
<b>6.0 Síndrome de Linfocitos Desnudos (BLS)</b>	11
<b>6.1 Grupos de Complementación BLS</b>	13
<b>7.0 El Factor Transactivador CIITA</b>	17
<b>7.1 Función Transactivadora de CIITA</b>	20
<b>7.2 Regulación de la Expresión de CIITA</b>	22
<b>8.0 Interferón Gama y Transducción de Señales</b>	24
<b>9.0 Modelo de Regulación de la Expresión Inducible         de las Moléculas MHC-II por IFN-<math>\gamma</math></b>	26



<b>ANTECEDENTES QUE FUNDAMENTAN LA HIPÓTESIS</b> .....	<b>29</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>33</b>
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>33</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>33</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>35</b>
Cultivo Celular .....	35
Anticuerpos .....	36
Preparación de Híbridos Somáticos .....	36
Selección Magnética de Células .....	38
Clonamiento por Dilución Límite .....	39
Inmunofluorescencia Indirecta .....	40
Preparación de DNA .....	41
PCR .....	42
Preparación de RNA .....	44
RT-PCR .....	46
RT - PCR Extendido .....	48
Purificación de los Productos de RT-PCR .....	49
Secuenciación de DNA .....	50
RACE - PCR .....	51
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>53</b>
Análisis de Híbridos Celulares .....	53
Complementación de la Expresión de las Moléculas MHC-II en las Células L(tk-) por Líneas Celulares BLS .....	58
Correlación entre Complementación Génica y los Factores de Transcripción RFX-5, RFX-AP y CIITA en el Panel de Híbridos Somáticos.....	62
Expresión del mRNA de CIITA en las Células L(tk-) .....	63
Secuenciación de CIITA Murino .....	72
Localización de Intrones de CIITA .....	72

¿Ocurre un salto de Exón en el mRNA de CIITA de las Células L(tk-)? .....	74
¿Es el Inicio de la Transcripción del mRNA de CIITA en las Células L(tk-) Distinto del Descrito para Otras Células? .....	76
Análisis del Promotor IV de CIITA en las Células L(tk-) .....	81
Análisis de Expresión del mRNA del Factor IRF-1 .....	83
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>85</b>
1.0 Análisis de Híbridos Somáticos .....	85
2.0 CIITA en Células L(tk-): ¿Un Nuevo Mecanismo de Regulación? .....	88
2.1 Expresión del mRNA de CIITA en Células L(tk-) .....	88
2.2 CIITA como Dominante Negativo .....	90
2.3 Promotor IV de CIITA .....	96
2.4 Existencia de un Promotor Intragénico de CIITA .....	99
<b>PERSPECTIVAS</b> .....	<b>102</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>104</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>106</b>
<b>ANEXO</b> .....	<b>115</b>

## LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

- Figura 1.** Representación esquemática de las principales secuencias de unión de factores de transcripción en el promotor de las moléculas MHC-II ..... pág. 9
- Figura 2.** Mutaciones de CIITA en células del grupo de complementación génica BLS-A ..... pág. 16
- Figura 3.** Modelo de regulación de la expresión de moléculas MHC-II por IFN- $\gamma$  ..... pág. 27
- Figura 4.** Expresión de las moléculas MHC-I y MHC-II en células L(tk-) e híbridos somáticos ..... pág. 30
- Figura 5.** Análisis de Northern blot de las células L(tk-) e híbridos celulares L.GES 4.7 y L.GES 4.3 ..... pág. 31
- Figura 6.** Inducción por IFN- $\gamma$  de la expresión de las moléculas MHC-II murinas en un panel de híbridos somáticos producidos entre células L(tk-) y diferentes líneas celulares humanas ..... pág. 54
- Figura 7.** Selección magnética de células ..... pág. 56
- Figura 8.** Selección por dilución límite ..... pág. 57

<b>Figura 9.</b> Estrategia de selección de híbridos celulares obtenidos entre las células L(tk-) y BLS-2/Neo	.....	pág. 60
<b>Figura 10.</b> Expresión constitutiva e inducible por IFN- $\gamma$ de moléculas MHC-II murinas en híbridos celulares L.BLS-2	.....	pág. 61
<b>Figura 11.</b> Esquema del mRNA de CIITA murino, principales dominios de su proteína y la localización de partidores utilizados en estudios de RT-PCR	.....	pág. 65
<b>Figura 12.</b> Análisis mediante RT-PCR de la expresión del mRNA de CIITA	.....	págs. 66 y 67
<b>Figura 13.</b> Delimitación de la expresión del mRNA de CIITA en células L(tk-)	.....	pág. 69
<b>Figura 14.</b> Esquema de la expresión del mRNA de CIITA	.....	pág. 70
<b>Figura 15.</b> Expresión de la región 3' del mRNA de CIITA	.....	pág. 71
<b>Figura 16.</b> Determinación de un intrón cerca de la región transcrita del gen de CIITA en células L(tk-)	.....	pág. 74
<b>Figura 17.</b> Expresión de la región 5' del mRNA de CIITA comprendida entre los exones 1 y 4	.....	pág. 75
<b>Figura 18.</b> Procedimiento RACE-PCR	.....	pág. 77

<b>Figura 19.</b> Amplificación del extremo 5' del mRNA de CIITA .....	pág. 79
<b>Figura 20.</b> Secuencias de los productos de amplificación obtenidos mediante RACE-PCR .....	pág. 80
<b>Figura 21.</b> Secuencias de unión al factor transcripcional IRF-1 del promotor IV de CIITA .....	pág. 82
<b>Figura 22.</b> Expresión del mRNA de IRF-1 .....	pág. 83
<b>Figura 23.</b> Representación esquemática del defecto de las células L(tk-) que les impide expresar moléculas MHC-II .....	pág. 100
<b>Tabla 1.</b> Grupos de complementación génica BLS .....	pág. 14
<b>Tabla 2.</b> Correlación entre la inducción de las moléculas MHC-II murinas por IFN- $\gamma$ y la presencia de los genes humanos CIITA, RFX-5, RFX-AP, Protamina 1 (PRM.1) y adenosina fosforibosil transferasa (APRT) en híbridos celulares .....	pág. 63

## LISTA DE ABREVIATURAS

- ♦ APRT: adenosina fosforibosil transferasa
- ♦ APS: persulfato de amonio
- ♦ ATCC: American Type Culture Collection
- ♦ BLS: síndrome de linfocitos desnudos.
- ♦ BCR: receptor de las células B
- ♦ cDNA: DNA complementario
- ♦ CIITA: transactivador de MHC-II
- ♦ DNA: ácido desoxirribonucleico
- ♦ DEPC: di-etil piro carbonato
- ♦ DMEM: medio mínimo de Eagle modificado por Dulbecco.
- ♦ dNTP: desoxirribonucleótidos tri-fosfato
- ♦ DTT: ditioneitol
- ♦ EDTA: ácido etilén di-amino tetracético
- ♦ EMSA: ensayo de cambio de movilidad electroforética
- ♦ FITC: isotiocianato de fluoresceína
- ♦ GAS: secuencia de activación por IFN- $\gamma$ .
- ♦ HLA: antígenos de leucocitos humanos.
- ♦ IgG: inmunoglobulina G
- ♦ Ii: cadena invariante.

- ♦ IFN- $\alpha$ : interferón alfa.
- ♦ IFN- $\gamma$ : interferón gamma.
- ♦ JAK: quinasas Janus
- ♦ kb: kilo base
- ♦ kDa: kiló Dalton
- ♦ LPS: lipopolisacárido.
- ♦ mRNA: RNA mensajero
- ♦ MHC: complejo principal de histocompatibilidad.
- ♦ MHC-I: moléculas de histocompatibilidad de clase I.
- ♦ MHC-II: moléculas de histocompatibilidad de clase II.
- ♦ MOPS: ácido morfolino propano sulfónico
- ♦ OBF-1: factor de unión al octámero -1.
- ♦ OBS: sitio de unión octamérico
- ♦ pb: pares de bases.
- ♦ PBS: amortiguador fosfato salino
- ♦ PCR: reacción en cadena de la DNA polimerasa I
- ♦ PEG: polietilenglicol.
- ♦ PRM1: protamina 1
- ♦ PST: región rica en aminoácidos prolina, serina y treonina.
- ♦ RACE: amplificación rápida de los extremos de cDNA.
- ♦ RE: retículo endoplasmático.

- ♦ RNA: ácido ribonucleico
- ♦ RNasa: ribonucleasa
- ♦ RT-PCR transcripción inversa acoplada a la reacción en cadena de la DNA polimerasa.
- ♦ SFB: suero fetal de bovino.
- ♦ STAT: transductores de señal y activadores de la transcripción
- ♦ TBE: amortiguador Tris-Borato-EDTA
- ♦ TBP: proteína de unión a la caja TATA
- ♦ TCR: receptor de las células T.
- ♦ TdT: desoxinucleotidil terminal transferasa.
- ♦ TE: amortiguador Tris-EDTA
- ♦ TEA: amortiguador Tris-Acetato-EDTA
- ♦ tk: timidina quinasa
- ♦  $T_M$ : temperatura de desnaturación térmica



## RESUMEN

Las moléculas codificadas por el complejo principal de histocompatibilidad de clase II (MHC-II) son glicoproteínas heterodiméricas expresadas en la superficie celular que cumplen un papel fundamental en el proceso de presentación de antígeno durante la respuesta inmune.

La expresión de las moléculas MHC-II está controlada por un complejo mecanismo de regulación. La expresión constitutiva de las moléculas MHC-II está restringida a células profesionales presentadoras de antígenos. Sin embargo, en células endoteliales, epiteliales y fibroblastos, la expresión de estas moléculas puede ser inducida por interferón gamma (IFN- $\gamma$ ).

La utilización de células mutantes para la expresión de las moléculas MHC-II y de células provenientes de pacientes que sufren de una enfermedad de inmunodeficiencia primaria (síndrome de linfocitos desnudos o BLS) caracterizadas por la carencia de expresión de estas moléculas, ha contribuido a la identificación de varios factores involucrados en la regulación de la expresión de las moléculas MHC-II. Estudios de complementación génica realizados con las células mutantes ha demostrado la existencia de cinco grupos de complementación. Actualmente, se han identificado los factores mutados en tres de estos grupos, los que corresponden a los factores transcripcionales RFX-5, RFX-AP y CIITA. Numerosos antecedentes indican que CIITA, una molécula que también es regulada transcripcionalmente, es el principal regulador de la expresión de las moléculas MHC-II.

El interés principal de esta tesis es estudiar los mecanismos de regulación de la expresión de las moléculas MHC-II. Para esto, se utilizaron las células L(tk-) como modelo de estudio. Las células L(tk-) corresponden a un fibrosarcoma murino que presentan un defecto que las hace incapaces de expresar moléculas MHC-II después del tratamiento con IFN- $\gamma$ , a pesar de que expresan otras moléculas reguladas por esta citoquina.

A partir de un panel de híbridos somáticos, obtenidos mediante la fusión de las células L(tk-) con células humanas que expresan constitutivamente moléculas MHC-II, se estudió el defecto de las células L(tk-), analizándose la complementación de la expresión de las moléculas MHC-II murinas inducida por IFN- $\gamma$ . Los resultados mostraron que en algunos de éstos híbridos somáticos, el defecto de las células L(tk-) puede ser complementado en *trans* por las células humanas.

Estudios de complementación génica mostraron que las células BLS-2, mutadas en la región C-terminal de CIITA, restauran la expresión constitutiva e inducible por IFN- $\gamma$  de las moléculas MHC-II en las células L(tk-).

Sin embargo, el análisis por PCR del DNA obtenido del panel de híbridos somáticos, mostró una correlación positiva entre la complementación de las células L(tk-) y la presencia del gen para CIITA humano. Además, no se encontró relación con los factores RFX-5 y RFX-AP. Estos resultados sugerían que el defecto de las células L(tk-) podría corresponder a CIITA.

Con el fin de comprobar estas observaciones, se analizó la expresión del mRNA de CIITA en células L(tk-) mediante RT-PCR. Los resultados mostraron que en las

células L(tk-) tratadas con IFN- $\gamma$ , se expresa un mRNA de CIITA más pequeño que el mRNA encontrado en células que expresan normalmente moléculas MHC-II. Este mRNA carece de dos dominios de la región N-terminal de CIITA, esenciales para su función transactivadora. Estos resultados podrían explicar la complementación observada entre las células L(tk-) y BLS-2, mediante un evento de  $\alpha$ -complementación. Se descartó la posibilidad de que la expresión de este mRNA más pequeño de CIITA se deba a un salto de exón.

Experimentos de RACE-PCR demostraron que el inicio de la transcripción del mRNA de CIITA de las células L(tk-) no ocurre en el sitio previamente descrito para células que expresan normalmente moléculas MHC-II. El establecimiento de la ubicación aproximada de los intrones y exones del gen de CIITA, nos permitió determinar que el inicio de la transcripción del gen de CIITA en las células L(tk-) estaría localizado aproximadamente 18 kb río abajo del promotor que regula la expresión de CIITA inducible por IFN- $\gamma$  (promotor IV).

El análisis de la secuencia del promotor IV de CIITA en las células L(tk-), mostró una mutación puntual heterocígota en la secuencia de consenso que une al factor transcripcional IRF-1.

El conjunto de estos resultados muestra que las células L(tk-) expresan una forma diferente del mRNA de CIITA, el cual podría tener un efecto dominante negativo sobre la expresión de moléculas MHC-II, explicando así el defecto de las células L(tk-). Además, proponemos la existencia de un promotor intragénico que podría regular la expresión inducible por IFN- $\gamma$  de esta forma más corta del mRNA de CIITA. Todo esto

sugiere la posibilidad de un nuevo mecanismo de regulación de la expresión de las moléculas MHC-II basado en la expresión de una forma dominante negativa de CIITA.

## SUMMARY

The molecules coded by the Class II Major Histocompatibility Complex (MHC-II) are heterodimeric glycoproteins expressed in the cell surface which play an essential role in the process of antigen presentation during the immune response.

The expression of MHC-II molecules is controlled by a complex regulatory mechanism. The constitutive expression of MHC-II molecules is restricted to professional antigen presenting cells. However, in endothelial, epithelial and fibroblastic cells, the expression of these molecules can be induced by interferon gamma (IFN- $\gamma$ ).

The use of cells mutant for the expression of MHC-II molecules as well as cells from patients that suffer from a primary immunodeficiency disease characterized by the lack of expression of these molecules, has contributed to the identification of several factors involved in the regulation of MHC-II expression. Genetic complementation studies carried out with these cells, demonstrated the existence of five groups of complementation. At present, mutated factors have been identified in three of these groups, corresponding to the transcriptional factors RFX-5, RFX-AP and CIITA. The evidence indicates that CIITA, a molecule which is also transcriptionally regulated, is the main regulator of MHC-II expression.

The main goal of this thesis is to study the mechanisms regulating the expression of MHC-II molecules. For this, we used L(tk-) cells as a model. L(tk-) cells correspond to a mouse fibrosarcoma cell line which have a defect which makes them unable to

express MHC-II molecules after treatment with IFN- $\gamma$ , although they express other molecules regulated by this cytokine.

To study the defect present in L(tk-) cells, we analyzed the complementation of the expression of murine MHC-II molecules induced by IFN- $\gamma$  in a panel of somatic hybrids obtained by the fusion of L(tk-) cells with human cells that express MHC-II molecules constitutively. The results show that in some of these somatic hybrids, the human cells complement in *trans* the defect of L(tk-) cells.

Genetic complementation studies showed that BLS-2 cells, which are mutated in the C-terminal region of CIITA, restore the constitutive and IFN- $\gamma$  inducible expression of MHC-II molecules of L(tk-) cells.

However, PCR analysis of the DNA obtained from the somatic cell hybrids, showed a positive correlation between the complementation of the L(tk-) cells and the presence of the human CIITA gen. Moreover, we found no relationship with factors RFX-5 and RFX-AP. These results suggest that the defect found on L(tk-) could correspond to CIITA.

In order to confirm these observations, we analyzed by RT-PCR the expression of CIITA mRNA in L(tk-) cells. The results showed that L(tk-) cells treated with IFN- $\gamma$  express a CIITA mRNA smaller than the wild type CIITA mRNA. This mRNA lacks the two N-terminal domains of CIITA, which are essential for its transactivator function. This result could explain the complementation observed between L(tk-) and BLS-2 cells through an  $\alpha$ -complementation event. The possibility that this smaller mRNA of CIITA could be generated through exon skipping was excluded.

RACE-PCR experiments demonstrated that the initiation of transcription of CIITA mRNA in L(tk-) cells did not occur normally. The approximate localization of the introns and exons of the CIITA gen, allowed us to situate the beginning of the transcription around 18 kb down stream of the promoter that regulates the inducible expression of CIITA (promoter IV).

Analysis of the sequence of promoter IV in L(tk-) cells, show a heterocytotic point mutation in the consensus sequence that binds the transcriptional factor IRF-1.

These results show L(tk-) cells express a different form of CIITA mRNA, which could act as a negative dominant factor on the expression of MHC-II molecules, thus explaining the inability of L(tk-) cells to express these molecules. Moreover, we propose the existence of a intragenic promoter which could regulate the IFN- $\gamma$  inducible expression of this shorter form of CIITA mRNA. This suggests the possibility of a new mechanism for the regulation of the expression of MHC-II molecules based on the expression of a negative dominant form of CIITA.

# INTRODUCCIÓN

Las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad o MHC (Mayor Histocompatibility Complex), son glicoproteínas heterodiméricas que se expresan en la superficie celular y que cumplen un papel fundamental en la respuesta inmune (Glimcher y Kara, 1992). El objetivo de esta tesis es el estudio de los mecanismos que regulan la expresión de las moléculas de histocompatibilidad de clase II (MHC-II).

El sistema inmune es el encargado de reconocer y eliminar cualquier elemento extraño al organismo. Las moléculas de histocompatibilidad participan en el reconocimiento tanto de elementos propios como extraños del organismo. En la respuesta inmune adaptable, el antígeno es reconocido por receptores del tipo de las inmunoglobulinas que se encuentran en la superficie de los linfocitos B (B Cell Receptor o BCR) o por un receptor específico para el antígeno presente en los linfocitos T (T Cell Receptor o TCR). Los linfocitos B activados secretan inmunoglobulinas, las cuales se unen, en el medio extracelular, a los agentes patógenos o a las toxinas producidas por ellos, neutralizándolos o eliminándolos mediante fagocitosis o destrucción directa por activación de la cascada del complemento. Por otro lado, los microorganismos que se reproducen en el interior de las células, son reconocidos por los linfocitos T a través del TCR, el cual reconoce productos del agente infeccioso expresados en la superficie de las células infectadas. Sin embargo, los linfocitos T reconocen péptidos derivados de proteínas provenientes del patógeno sólo si estos están unidos a moléculas de



histocompatibilidad. Este proceso se conoce como presentación antigénica. La unión del péptido a la molécula MHC forma parte esencial del mecanismo de expresión de las moléculas de histocompatibilidad, ya que la expresión estable de estas moléculas en la superficie celular necesita de la presencia de un péptido (Germain, 1994). Este proceso se conoce como procesamiento antigénico.

Existen dos tipos de moléculas de histocompatibilidad llamadas moléculas de histocompatibilidad de clase I (MHC-I) y moléculas de histocompatibilidad de clase II (MHC-II). Péptidos derivados de proteínas provenientes de patógenos como virus y bacterias, que crecen y proliferan en el citoplasma de las células, se unen a moléculas MHC-I y son reconocidos por linfocitos T citotóxicos (Germain, 1994). En cambio, péptidos generados proteolíticamente a partir de proteínas extracelulares provenientes de hongos, protozoos, parásitos y bacterias extracelulares, o péptidos provenientes de proteínas de microorganismos tales como micobacterias y parásitos que se replican en vesículas intracelulares, son presentados a los linfocitos T de ayuda en el contexto de las moléculas MHC-II (Pieters, 1997).

El objetivo de esta tesis es el estudio de la regulación de las moléculas MHC-II, por lo que se pondrá especial énfasis en este tipo de moléculas. Numerosos antecedentes indican que la expresión de las moléculas MHC-II está controlada por un complejo mecanismo de regulación (Boss, 1997; Ting y Baldwin, 1993). De hecho, cualquier anomalía que afecte a la expresión de las moléculas MHC-II trae como consecuencia alteraciones de la respuesta inmune. Así, una carencia en la expresión de éstas moléculas es causa de graves inmunodeficiencias, mientras que su sobreexpresión

patológica y ectópica ha sido relacionada con ciertas enfermedades autoinmunes (Glimcher y Kara, 1992; Mach y col., 1996).

En las secciones siguientes se presentará con mayor detalle el complejo principal de histocompatibilidad, el proceso de presentación de antígeno, la estructura, expresión y regulación de la expresión de las moléculas MHC-II.

## **1.0 EL COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD**

Los primeros estudios dedicados a estudiar el rechazo de trasplantes de tejidos mediante experimentos de genética clásica de cruzamiento de ratones singéneos (genéticamente idénticos) y alogéneos (genéticamente distintos), llevó a identificar un grupo de genes altamente polimórficos (múltiples alelos en cada locus) cuya expresión aparecía como responsable del reconocimiento de lo extraño. Este grupo de genes fue denominado Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) (Hansen y col., 1993). La principal característica del MHC, es la existencia de múltiples genes con un extenso grado de polimorfismo alélico.

### **1.1 ORGANIZACIÓN GENÓMICA DEL COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD**

El complejo principal de histocompatibilidad murino, se denominó complejo H-2 y corresponde a una región de aproximadamente 2.000 kb localizada en el cromosoma

17, mientras que en humanos, este complejo es llamado HLA (Human Leucocyte Antigens) y está localizado en el brazo corto del cromosoma 6 abarcando aproximadamente 3.500 kb. La organización cromosómica de los genes MHC es similar en ambas especies. En el complejo H-2 se han diferenciado cinco regiones denominadas K, A, E, D y L, ordenadas linealmente con respecto al centrómero. Las regiones K, D y L contienen los genes MHC-I y las regiones A y E corresponden a los genes MHC-II. En humanos, el MHC está ordenado linealmente con respecto al centrómero de la siguiente manera: DP, DQ, DR, B, A y C. Los genes MHC-I están contenidos en las regiones A, B y C, mientras que DP, DQ y DR corresponden a los genes MHC-II. En la región correspondiente a los genes MHC-II, también se encuentran otros genes relacionados con los procesos de procesamiento y presentación de antígeno (Janeway y Travers, 1994; Abbas y col., 1997).

## 2.0 ESTRUCTURA DE LAS MOLÉCULAS MHC

Las moléculas MHC-II están formadas por dos glicoproteínas de transmembrana ( $\alpha$  y  $\beta$ ) de pesos moleculares 34 y 29 kDa respectivamente, unidas no covalentemente y codificadas por genes localizados en el MHC. La porción extracelular de cada cadena posee dos dominios estructurales:  $\alpha$  1,  $\alpha$  2 y  $\beta$  1,  $\beta$  2. Los dominios  $\alpha$  2 y  $\beta$  2 cercanos a la membrana plasmática forman un dominio semejante al de las inmunoglobulinas,

mientras que la interacción de los dominios distales  $\alpha 1$  y  $\beta 1$  correspondientes a la región hipervariable de la molécula estructuran un sitio de unión al péptido.

### 3.0 EXPRESIÓN DE LAS MOLÉCULAS MHC

La expresión de las moléculas MHC es regulada en forma específica en diferentes células y tejidos, durante la diferenciación celular y en respuesta a estímulos inmunes extrínsecos. Las moléculas MHC-I son expresadas constitutivamente por todas las células nucleadas, mientras que la expresión constitutiva de las moléculas MHC-II está restringida a células profesionales presentadoras de antígenos tales como linfocitos B, macrófagos, fagocitos mononucleares, células dendríticas y células del epitelio tímico (Glimcher y Kara, 1992; Germain, 1994; Pieters, 1997). Sin embargo, otros tipos celulares pueden ser inducidos a expresar moléculas MHC por acción de ciertas citoquinas. La mayoría de estas citoquinas son secretadas por los mismos linfocitos T efectores, lo que representa un importante mecanismo de amplificación del proceso de presentación de antígenos. En la gran mayoría de las células, citoquinas tales como los interferones  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , Factor de Necrosis Tumoral y Linfotóxina pueden aumentar el nivel de expresión de las moléculas MHC-I. Sin embargo, en otros tipos celulares tales como células endoteliales, epiteliales, células del linaje macrófago-monocitos, fibroblastos y células musculares, la expresión de las moléculas MHC-II es inducida principalmente por el IFN- $\gamma$ , que es el inductor fisiológico más potente de la expresión

de estas moléculas (Glimcher y Kara, 1992; Mach y col., 1996). Otro punto importante de destacar es la expresión diferencial de las moléculas MHC-II durante la ontogenia de los linfocitos B, ya que estas células pasan por estadios sucesivos en los cuales estas moléculas se expresan, se extinguen o se reexpresan dependiendo del estado de diferenciación del linfocito B (Glimcher y Kara, 1992; Mach y col., 1996).

#### 4.0 PRESENTACIÓN DE ANTÍGENO

El paso inicial en el proceso de presentación de antígeno por moléculas MHC-II es la internalización de proteínas extracelulares hacia endosomas. Esta internalización puede ser mediada por fagocitosis, pinocitosis o endocitosis mediada por vesículas cubiertas con clatrina. Luego, las proteínas internalizadas son procesadas hacia fragmentos peptídicos de 12 a 24 aminoácidos de largo (Rudensky y col., 1991; Hunt y col., 1992). Esta etapa puede ocurrir en endosomas o lisosomas, donde el ambiente ácido de estos compartimentos activa a las proteasas catépsinas B y D y leupeptina. Posteriormente, ocurre la convergencia y fusión de vesículas endosomales que contienen los péptidos generados por proteólisis con vesículas exocíticas que transportan moléculas MHC-II hacia la superficie celular. Las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de las moléculas MHC-II son sintetizadas de manera coordinada y asociadas en el RE. Estos heterodímeros se encuentran transitoriamente asociados con otras dos proteínas no codificadas en el MHC: calnexina y la cadena Invariante (Ii). La calnexina, funciona

como una proteína chaperona que asegura el correcto plegamiento y ensamblaje de la molécula MHC-II. La Ii corresponde a un homotrímero y cada subunidad es capaz de unir a un heterodímero  $\alpha/\beta$  de molécula MHC-II recién sintetizada. Una vez que Ii une a la molécula MHC-II, calnexina es liberada. Ii se une a la molécula MHC-II de tal forma que impide que péptidos o proteínas nacientes, presentes en el lumen del RE, puedan unirse a las moléculas MHC-II. En el RE, las moléculas MHC-II son glicosiladas, luego Ii dirige las moléculas MHC-II hacia el aparato de Golgi donde ocurren nuevos eventos de glicosilación. Posteriormente, las moléculas MHC-II maduras son dirigidas hacia la vía endocítica donde ocurre la fusión de las vesículas exocíticas con vesículas endosomales. En este compartimento, las mismas proteasas que degradaron las proteínas internalizadas actúan sobre Ii (Blum y Cresswell, 1988), dejando un pequeño péptido llamado CLIP (Class II-Associated Invariant Chain Peptide) en el interior de la cavidad de las moléculas MHC-II donde posteriormente se produce el intercambio de CLIP por un péptido propio o extraño. La remoción de CLIP y la posterior unión de los péptidos es catalizada por la proteína denominada H-2M en ratón (Miyazaki y col., 1996; Martin y col., 1996) y HLA-DM en humanos (Fling y col., 1994; Morris y col., 1994), de estructura similar a las moléculas MHC-II y cuyos genes se encuentran también localizados en el MHC. Finalmente, las vesículas exocíticas que contienen a las moléculas MHC-II unidas a un péptido, son transportadas hacia la superficie celular.

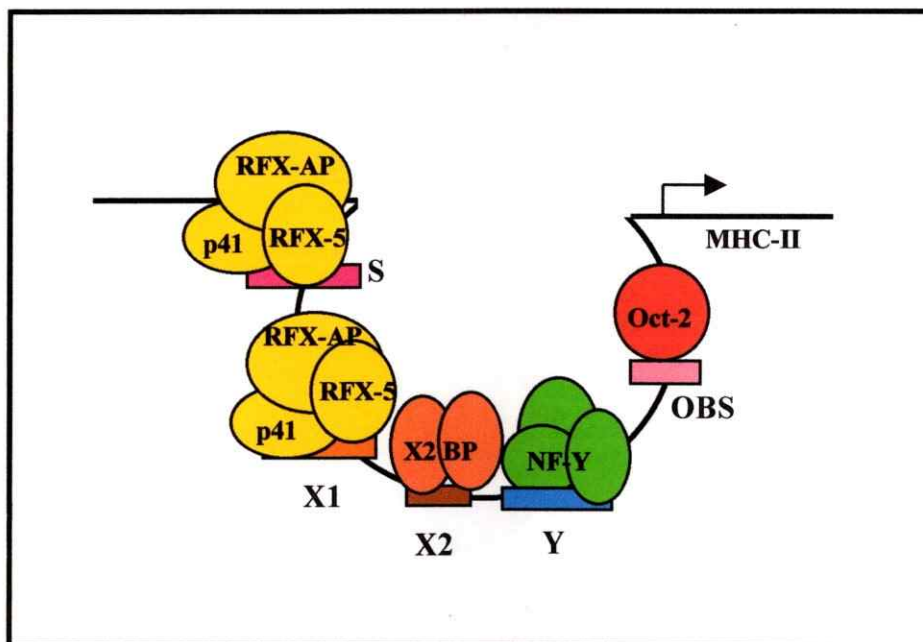
## 5.0 MECANISMOS MOLECULARES DE LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS MHC-II

### 5.1 ELEMENTOS REGULADORES EN *CIS*

Se ha descrito que el grado de expresión de las moléculas MHC-II en la superficie celular está relacionado con el grado de expresión de sus RNA mensajeros (Fertsch y col., 1987), de modo que la expresión de estas moléculas está modulada transcripcionalmente. El análisis de la secuencia de los genes MHC-II, de experimentos de mutagénesis *in vitro* y de estudios funcionales realizados mediante fusión de la región promotora de los genes MHC-II con genes reporteros, han permitido identificar varios elementos reguladores en *cis* presentes en las regiones promotoras de los genes MHC-II. Estos elementos están contenidos dentro de una región compacta de 150 pb, conservada en todas las especies analizadas. Se han distinguido cuatro secuencias conservadas de DNA denominadas cajas X1, X2 (agrupadas dentro de una única caja X), Y y S (contenida dentro de una caja mayor W/Z) (Glimcher y Kara, 1992; Boss, 1997) (Fig.1). Estos elementos están involucrados tanto en la expresión constitutiva como inducible por IFN- $\gamma$  de moléculas MHC-II y han sido además encontrados en los promotores de los genes de la cadena invariante y de las proteínas H2-M, lo que permitiría que el proceso de presentación de antígenos sea un evento coordinadamente regulado.

La caja Y corresponde a una secuencia de 10 pares de bases ubicada aproximadamente 60 pares de bases río arriba del sitio de iniciación de la transcripción

(-60 pb). Una corta secuencia no conservada de 18 ó 20 pares de bases separa la caja Y de la caja X2, la que incluye elementos de respuesta a cAMP (CREs) y al ester de forbol conocido como TPA (TREs). Sobreponiéndose a la caja X2, se encuentra la caja X1 compuesta de 14 pares de bases. Más arriba y separada por 15 a 17 pares de bases se encuentra la caja descrita como S en humanos y H en ratón, cuya secuencia consiste de 7 pares de bases (Glimcher y Kara, 1992). Se ha descrito que el espaciamento que existe entre las cajas Y y X es imprescindible para la correcta función del promotor del gen MHC-II humano DR $\alpha$ . La interrupción del espaciamento que existe entre las cajas S y X provoca un desmedro de la expresión constitutiva e inducible por IFN- $\gamma$  de las



**Figura 1.** Representación esquemática de las principales secuencias de unión de factores de transcripción en el promotor de las moléculas MHC-II. Los complejos proteicos RFX (RFX-5, RFX-AP y p41), X2BP y NF-Y se unen a las secuencias de consenso de DNA, conocidas como cajas S, X1, X2 e Y, localizadas en la región promotora del gen MHC-II. La unión del factor NF-Y induce la curvatura del DNA. Estos factores transcripcionales regulan la expresión de moléculas MHC-II tanto constitutiva como inducible por interferón gamma. En el caso del gen humano DR $\alpha$  se ha encontrado además, la presencia de la caja OBS que une al factor Oct-2.



moléculas MHC-II (Ting y Baldwin, 1993). Estos resultados sugieren la formación de una unidad transcripcional espacial y estructuralmente organizada. Otra caja importante descrita únicamente en la región promotora del gen MHC-II humano DR $\alpha$ , corresponde al sitio de unión a Octámero u OBS (Octamer Binding Site). Esta secuencia se encuentra localizada río abajo de la caja Y y fue inicialmente descrita en los genes de las inmunoglobulinas de las células B. La caja OBS une a los factores Oct-2 (de origen linfoide) y Oct-1 (ubiquo) que actúan como activadores transcripcionales mediante su interacción con otra proteína que no se une directamente al DNA, llamado Factor de Unión al Octámero 1 (OBF-1) o Bob-1 (Glimcher y Kara, 1992; Ting y Baldwin, 1993; Boss, 1997).

## **5.2 FACTORES QUE SE UNEN AL PROMOTOR DE LOS GENES MHC-II**

Un gran número de proteínas que se unen a secuencias de DNA específicas de los promotores de los genes MHC-II han sido identificadas mediante experimentos de EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) (Glimcher y Kara, 1992, Ting y Baldwin, 1993; Mach y col. 1996; Boss, 1997). De estas, RFX, X2BP y NF-Y son los complejos proteicos más relevantes que se unen al promotor de los genes MHC-II. El complejo denominado en humanos como RFX (y su homólogo murino NF-X), pertenece a una familia de proteínas nucleares que comparten un sitio homólogo de unión a DNA (Emery y col., 1996a y b). Este complejo, que se une a la caja X1, es expresado ubicuamente y

está compuesto por al menos tres proteínas: RFX-5 (75 kDa), RFX-AP (36 kDa) y p41 (41 kDa) (Durand y col., 1994). El complejo nuclear X2BP se une a la caja X2 y corresponde a un heterodímero cuyas subunidades aún no han sido identificadas. Estos dos complejos, RFX y X2BP, se unen cooperativamente a la caja X (X1 y X2) aumentando la estabilidad de la unión en 10 veces (Reith y col., 1994a). A su vez, RFX establece una interacción cooperativa con NF-Y (Reith y col., 1994b) permitiendo la formación de un complejo RFX-X2BP-NF-Y (Louis-Pence y col., 1997). La unión de NF-Y a la caja Y provoca una distorsión del DNA y la formación de un complejo estable que permite la iniciación de la transcripción. En este modelo RFX probablemente actúa como un "factor de accesibilidad" que promueve la ocupación estable del promotor reclutando a los factores X2BP y NF-Y a través de interacciones proteína-proteína cooperativas (Riley y col., 1995; Mach y col., 1996). Estos resultados indican que los distintos factores que se unen a la región promotora de los genes que codifican para las moléculas MHC-II actúan como una unidad funcional en la regulación de la expresión de estas moléculas (Boss, 1997) (Fig. 1).

## 6.0 SÍNDROME DE LINFOCITOS DESNUDOS (BLS)

La enfermedad denominada por la Organización Mundial de la Salud como Deficiencia de Clase II, pero más conocida como Síndrome de Linfocitos Desnudos ó Bare Lymphocyte Syndrome en inglés (BLS) pertenece al grupo clínico de

inmunodeficiencias primarias combinadas severas. BLS es una enfermedad congénita, recesiva y autosomal que afecta la expresión de las moléculas MHC. Las células de pacientes BLS no expresan los mRNA y por lo tanto no sintetizan las proteínas de los genes MHC-II y son incapaces de llevar a cabo el proceso de presentación de antígeno (Kovats y col., 1995). En la mayoría de los casos el tratamiento con IFN- $\gamma$  no restaura la expresión de las moléculas MHC-II. Esto trae como consecuencias una extremada susceptibilidad a infecciones virales, bacterianas, hongos y protozoos. Los síntomas aparecen en los primeros años de vida e incluyen infecciones recurrentes gastrointestinales y pulmonares, diarreas y problemas de crecimiento. A pesar del tratamiento profiláctico y sintomático, no es posible prevenir la disfunción de algunos órganos y los pacientes mueren antes de los 18 años (Villard y col., 1997), a menos que pueda efectuarse un trasplante de médula ósea.

Varias evidencias condujeron a demostrar que BLS es una enfermedad de regulación génica involucrando a factores reguladores que actúan en *trans*. Estos argumentos se pueden resumir de la siguiente forma (Glimcher y Kara, 1992; Mach y col., 1996): i) no se han encontrado mutaciones en los genes estructurales MHC, ii) estudios de familias afectadas por la enfermedad mostraron que los genes MHC y el gen de la enfermedad segregaban independientemente, y iii) la expresión de las moléculas MHC-II de células B de pacientes BLS pudo ser restablecida por fusión con células B normales.

## 6.1 GRUPOS DE COMPLEMENTACIÓN BLS

Estudios de complementación génica realizados mediante la fusión entre líneas celulares obtenidas de pacientes BLS han sido muy útiles en el análisis de los mecanismos moleculares que controlan la transcripción de los genes MHC-II. Estos estudios de complementación consisten en fusionar dos líneas celulares defectuosas en la expresión de moléculas MHC-II y determinar en el híbrido resultante si se reestablece la expresión de estas moléculas. Si esto ocurre, significa que el defecto de cada célula parental es distinto y que éste ha sido complementado en *trans*. Luego, cada línea celular formaría parte de un grupo de complementación génica diferente. A estos trabajos se han sumado estudios realizados con otras líneas celulares deficientes en la expresión de MHC-II. Actualmente, se han descrito cinco grupos de complementación génica, denominados con las letras A, B, C, D y E (Tabla 1) (Bénichou y Strominger, 1991; Lennon y col., 1996)..

Análisis *in vivo* de Sitios Hipersensibles a DNasa I y de Patrón de Huellas (Footprinting) mostraron que las células de los grupos de complementación B, C y D presentan una ausencia de unión del complejo RFX al promotor de los genes MHC-II (Kara y Glimcher, 1991; Kara y Glimcher, 1993; Reith y col., 1988), impidiéndose a su vez, la interacción de los otros factores con sus respectivas cajas (Kara y Glimcher, 1991; Chin y col., 1994). Experimentos de purificación por cromatografía de afinidad del complejo RFX (Durand y col., 1994) y ensayos de complementación génica con una

**Tabla 1. Grupos de complementación génica BLS.**

<b>GRUPO BLS</b>	<b>LINEA CELULAR<sup>1</sup></b>	<b>DEFECTO MOLECULAR</b>	<b>CROMOSOMA</b>
<b>A</b>	<b>BLS-2 BCH RJ2.2.5</b>	<b>CIITA</b>	<b>16</b>
<b>B</b>	<b>BLS-1</b>	<b>(p41) ?</b>	<b>?</b>
<b>C</b>	<b>THF SJO</b>	<b>RFX-5 (p75)</b>	<b>1</b>
<b>D</b>	<b>6.1.6</b>	<b>RFX-AP (p36)</b>	<b>13</b>
<b>E</b>	<b>RAG</b>	<b>F-16</b>	<b>16</b>

**1 Se muestran algunas líneas celulares representativas (Mach y col., 1996; Boss, 1997)**

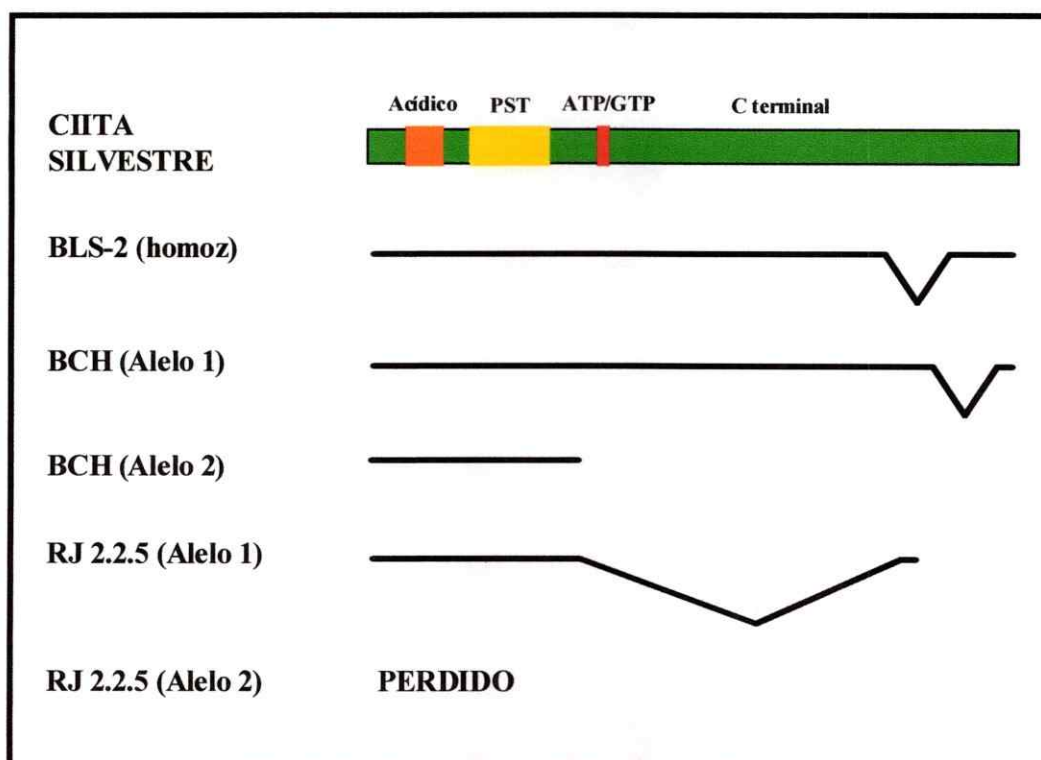
genoteca de expresión de cDNA permitió identificar el gen de la subunidad de 75 kDa, denominado RFX-5, como el factor defectuoso en el grupo BLS C (Steimle y col., 1995). El gen de RFX-5 ha sido localizado en el cromosoma 1 (1q) (Mach y col., 1996) habiéndose descrito en tres pacientes BLS la mutación que afecta al gen RFX-5. En un caso, una mutación puntual genera un codón de término prematuro, mientras que los otros dos pacientes presentaron mutaciones en el sitio de procesamiento alternativo produciendo un corrimiento en el marco de lectura y la aparición de un codón de término prematuro (Mach y col., 1996). La purificación de la otra subunidad de 36 kDa, denominada RFX-AP y el aislamiento de un clon de cDNA que codifica para esta proteína, permitió realizar experimentos de transfección génica en las células llamadas 6.1.6 del grupo BLS D. Los resultados de estos experimentos mostraron que el gen para

RFX-AP sería el factor defectuoso en este grupo, ya que su transfección complementó el defecto de éstas células (Durand y col., 1997). El gen de RFX-AP está localizado en el cromosoma 13 (13q) y el estudio de tres líneas celulares de pacientes BLS pertenecientes al grupo BLS D permitió establecer la existencia de mutaciones puntuales en este gen (Villard y col., 1997). En todos los casos las mutaciones conducirían a la síntesis de una proteína truncada. Se ha sugerido que el factor defectuoso en el grupo BLS B correspondería a alguna otra subunidad, posiblemente la de 41 kDa, del complejo RFX (Durand y col., 1994; Steimle y col., comunicación personal, 1998).

Estos resultados indican que la formación del complejo RFX es esencial para la expresión de moléculas MHC-II y que los defectos encontrados en los grupos BLS C y D llevan a la imposibilidad de ensamblaje de un complejo RFX normal (Moreno y col., 1997). Debido a que RFX actuaría como un elemento "reclutador" de los factores X2BP y NF-Y<sub>1</sub> (mencionado más arriba), éstos resultados explican por qué los otros factores de transcripción tampoco se unen al promotor de los genes MHC-II de células de los grupos BLS B, C y D.

A diferencia de los grupos BLS B, C y D, células del grupo BLS A mostraron una unión normal del complejo RFX y una ocupación normal del promotor. Estudios de complementación funcional, mediante la transfección de una genoteca de expresión de cDNA de mamíferos y la posterior selección de las células complementadas permitió la identificación del factor defectuoso de las células BLS A (Steimle y col., 1993). Este factor fue llamado Class II TransActivator (CIITA). El gen de CIITA humano y murino ha sido localizado en el cromosoma 16 (16p) y en todas las líneas celulares del grupo

BLS A se han encontrado mutaciones en este gen (Fig. 2). Los dos alelos de las células BLS-2 y el alelo 1 de las células BCH presentan una mutación en el sitio de procesamiento alternativo del mRNA de CIITA, provocando un salto de exón (exon skipping) y la pérdida de 23 aminoácidos en la región C-terminal de la proteína (Steimle y col., 1993; Bontron y col., 1997). El segundo alelo de las células BCH posee una mutación puntual que resulta en la generación de un codón de término prematuro (Bontron y col., 1997). El alelo 1 de las células RJ2.2.5 presenta una gran deleción



**Figura 2. Mutaciones de CIITA en células del grupo de complementación génica BLS-A.** CIITA posee cuatro importantes dominios: un dominio ácido, relacionado con la activación transcripcional; una región denominada PST, rica en aminoácidos prolina, serina y treonina; un dominio de unión a ATP/GTP y un dominio C-terminal que determina la especificidad de los genes que son regulados. Las células humanas BLS-2, BCH y RJ 2.2.5 tienen una mutación en el gen de CIITA, lo que les impide expresar las moléculas MHC-II. Todas las mutaciones descritas afectan a la región C-terminal de la proteína. A excepción de las células BLS-2, en todos los otros casos las mutaciones son heterocígotas.

genómica mientras que el segundo alelo está totalmente ausente (Brown y col., 1995; Bontron y col., 1997). Es necesario señalar que todas las mutaciones encontradas en las células del grupo BLS A afectan a la región C-terminal de la proteína de CIITA y que las mutaciones que afectan a cada alelo del gen de CIITA no siempre ocurren en el mismo sitio ni son del mismo tipo (Fig. 2).

Resultados de nuestro laboratorio han mostrado que la línea celular murina RAG conforma un nuevo grupo de complementación BLS (grupo E). RAG es deficiente en la expresión constitutiva e inducible por IFN- $\gamma$  de moléculas MHC-II, cadena invariante y los genes DM, aunque responde normalmente a IFN- $\gamma$  para la expresión de las moléculas MHC-I (Lennon y col., 1996). La fusión de las células RAG con varias otras células humanas normales restauró la expresión de las moléculas MHC-II murinos siempre y cuando en los híbridos somáticos estuviese presente el cromosoma 16 humano (Bono y col., 1991b), por lo que el factor defectuoso fue llamado F-16. Estudios de complementación génica mostraron que F-16 no corresponde a ninguno de los factores ya descritos en los otros grupos BLS (Lennon y col., 1996). F-16 no ha sido identificado aún.

## **7.0 EL FACTOR TRANSACTIVADOR CIITA**

En los últimos años se han realizado una gran cantidad de trabajos en relación a la estructura, expresión y función de CIITA. El conjunto de estos resultados han llevado



a la conclusión que CIITA es el factor regulador maestro de la expresión de moléculas MHC-II. En relación a esto, se ha mostrado que CIITA se detecta sólo en células y tejidos que expresan moléculas MHC-II (Steimle y col., 1993) y que su expresión *in vivo* e *in vitro* es inducida por IFN- $\gamma$  en un curso temporal que precede a la inducción de los genes MHC-II (Ramassar y col., 1996; Steimle y col., 1994). Además, se ha mostrado que en homogenizados celulares de riñón de ratones tratados con estímulos pro-inflamatorios (células alogénicas y LPS) que inducen la producción de IFN- $\gamma$ , se induce también la expresión de CIITA y de moléculas MHC-II (Ramassar y col., 1996). Por otro lado, se ha demostrado que existe una correlación cuantitativa entre los niveles de expresión de mRNA de CIITA y de las moléculas MHC-II, y que CIITA regula la actividad del promotor de los genes MHC-II (Otten y col., 1998). Otras evidencias provienen del estudio de líneas celulares deficientes en la expresión de moléculas MHC-II y de líneas celulares de pacientes del grupo BLS A, en las cuales la transfección del cDNA de CIITA restablece la expresión constitutiva de moléculas MHC-II (Steimle y col., 1994; Chin y col., 1994; Chang y col., 1994). Así mismo, ratones knock out para CIITA presentan una deficiencia generalizada en la expresión constitutiva de moléculas MHC-II en las células B, células dendríticas y macrófagos, con excepción del epitelio tímico (Chang y col., 1996). Además, se ha demostrado que CIITA no sólo regula la expresión de las moléculas MHC-II, sino que también regula la expresión de los genes de la cadena invariante y de H2-M implicados, al igual que las moléculas MHC-II, en el proceso de presentación de antígeno (Kern y col., 1995; Chang y Flavell, 1995a; Chang y col., 1996), sugiriendo que CIITA es la proteína responsable de la expresión coordinada

de los genes Ii, H-2M y MHC-II. Por otra parte, se sabe que células B plasmáticas inmaduras así como células B diferenciadas terminalmente como los plasmocitos, no expresan moléculas MHC-II (Glimcher y Kara, 1992). Trabajos recientes han demostrado que estas células B no expresan CIITA, pero que la transfección del cDNA de CIITA restituye la expresión de las moléculas MHC-II (Silacci y col., 1994; Sartoris y col., 1996). Estos resultados sugieren que la extinción de la expresión de las moléculas MHC-II, fenómeno que ocurre normalmente en células B plasmáticas es mediada por un mecanismo represor de la expresión de CIITA. Del mismo modo, el silenciamiento de la expresión constitutiva de las moléculas MHC-II en híbridos celulares obtenidos mediante la fusión de células epiteliales y células B es debido a una represión activa del promotor constitutivo de CIITA (Lennon y col., 1998). Finalmente, se ha relacionado la imposibilidad de los linfocitos T murinos activados para expresar moléculas MHC-II con la ausencia de CIITA en estas células (Chang y col., 1995b).

Recientemente, se ha publicado la secuencia completa del cDNA de CIITA murino y la secuencia de aminoácidos de la proteína ha sido deducida de estos resultados (Sims y col., 1997a). La secuencia corresponde a 5.178 pares de bases que contiene un marco de lectura abierto de 3.236 pares de bases, codificando para una proteína de 1.078 aminoácidos. La proteína CIITA no muestra sitios de unión a DNA. Estudios realizados con el cDNA de CIITA humano han mostrado la existencia de cuatro dominios importantes en la actividad de la proteína de CIITA (Fig. 2): un dominio N-terminal rico en aminoácidos ácidos que actúa como un fuerte dominio de activación transcripcional (Riley y col., 1995); un dominio estructural PST rico en los aminoácidos prolina, serina

y treonina que junto con un dominio de unión a ATP/GTP son necesarios para la actividad óptima de CIITA (Chin y col., 1997b); y un dominio C-terminal que determina la especificidad de activación de CIITA (Zhou y Glimcher, 1995; Chin y col., 1997a). Estos dominios están altamente conservados (80% de homología) entre las especies humanas y murinas (Sims y col., 1997a).

Se ha demostrado que la transfección de células que expresan constitutivamente MHC-II con un cDNA de CIITA carente del dominio ácido de activación N-terminal o del dominio PST reprime la expresión tanto constitutiva como inducible de las moléculas MHC-II indicando que esta forma de CIITA se comporta como un dominante negativo (Chin y col., 1997b; Zhou y col., 1997).

## 7.1 FUNCIÓN TRANSACTIVADORA DE CIITA

Todos los antecedentes señalados indican que CIITA sería el regulador clave de la expresión de las moléculas MHC-II. Sin embargo, CIITA no posee una secuencia de unión a DNA, de modo que surge la pregunta de cómo CIITA lleva a cabo su función reguladora. Estudios *in vitro* de doble híbrido y bioquímicos mostraron que CIITA interactúa directamente con la subunidad RFX-5 del complejo RFX (Scholl y col., 1997). Por otro lado, experimentos de unión *in vitro* mostraron una interacción directa entre CIITA y el Factor Bob 1 (Fontes y col., 1996). La proteína Bob 1 fue descrita inicialmente como coactivador en la activación de genes de inmunoglobulinas de células

B mediante su interacción con la proteína Oct 2, la cual se une a la caja Octámero. El promotor del gen MHC-II humano DR $\alpha$ , es el único promotor MHC-II en el cual se ha encontrado la presencia de la caja Octámero (Glimcher y Kara, 1992; Mach y col., 1996). Sin embargo, la interacción entre CIITA y Bob 1 sería independiente de la caja Octámero, puesto que también se observó un efecto sinérgico de activación entre estos factores al usar una construcción que contenía al promotor del gen MHC-II humano DQ (Fontes y col., 1996) (Fig.3).

También ha sido demostrado que el dominio N-terminal ácido de activación de CIITA interactúa con las subunidades TAF<sub>II</sub>32 (Fontes y col., 1997) y TAF<sub>II</sub>250 (Mahanta y col., 1997). Estas subunidades son parte de un complejo de proteínas conocido como TAF, que interactúa con la Proteína de Unión a la caja TATA (TBP) dentro de la maquinaria transcripcional asociada con la RNA polimerasa II (Fig. 3). Inicialmente, se pensó que el dominio PST de CIITA tendría una función estructural manteniendo una conformación óptima de la proteína (Sims y col., 1997). Sin embargo, este tipo de dominio ha sido encontrado en otros activadores transcripcionales, los cuales aumentan la expresión génica mediante interacciones proteína-proteína con factores de la maquinaria transcripcional que se unen a la caja TATA junto con la RNA polimerasa II (Chin y col., 1997b; Zhou y col., 1997). Estas observaciones han llevado a proponer que el dominio PST tendría una participación directa en la activación transcripcional, interactuando con otras proteínas de unión a DNA.

Por lo tanto, la pregunta inicial de cómo CIITA lleva a cabo su función reguladora, puede responderse postulando que CIITA actuaría como un transactivador de

la expresión de las moléculas MHC-II a través de interacciones con algunas de las proteínas del complejo que se une al promotor de los genes MHC-II y con algunas de las subunidades que forman la maquinaria transcripcional.

## 7.2 REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CIITA

Al igual que los genes MHC-II, la expresión constitutiva e inducible de CIITA es regulada positiva y negativamente por diversos estímulos (Steimle y col., 1994; Sims y col., 1997b; Lee y col., 1997; Rohn y col., 1999). Recientemente se han realizado numerosos trabajos con el interés de comprender los mecanismos moleculares por los cuales se regula la expresión de CIITA. Piskurich y colaboradores (1998) demostraron que una extensa región de DNA de 4 kb, localizada río arriba del inicio de la transcripción del gen de CIITA, contenía los elementos reguladores necesarios para la expresión constitutiva e inducible por IFN- $\gamma$  de CIITA. Lennon y colaboradores (1997) publicaron la secuencia de una región promotora de 1,8 kb responsable de la expresión constitutiva de CIITA. Además, en este mismo trabajo se demostró que macrófagos murinos y células L(tk-) provenientes de un fibrosarcoma murino, transfectadas con un cosmidio que contiene el gen para CIITA humano sin la región promotora de 1,8 kb, expresan CIITA en respuesta a IFN- $\gamma$ . Los autores propusieron la existencia de un promotor intragénico en CIITA inducible por IFN- $\gamma$ , localizado 10 kb río abajo de su región promotora. En otro trabajo se describió que la expresión de CIITA está bajo el

control de cuatro promotores diferentes localizados en una región genómica de 13 kb en humanos y 10 kb en ratón (Muhlethaler-Mottet y col., 1997). Dos de estos promotores (I y III) dirigen la expresión constitutiva de CIITA, mientras que la expresión inducible por IFN- $\gamma$  es regulada por el promotor IV. La única diferencia entre los diferentes transcritos obtenidos por la activación de los distintos promotores es el primer exón. Los autores demostraron que la expresión de CIITA en diferentes tejidos o tipos celulares es mediada a través del uso diferencial de estos promotores. De esta manera, el mRNA de CIITA expresado por acción del promotor I es expresado principalmente en células dendríticas, mientras que líneas celulares B linfoblastoide y homogenizados celulares obtenidos de bazo, amígdalas o timo expresan el mRNA de CIITA dirigido por el promotor III. Por otra parte, el mRNA de CIITA expresado por la acción del promotor IV está presente en mayor grado en líneas celulares inducibles por IFN- $\gamma$ , tales como melanomas, monocitos, células endoteliales y fibroblastos.

El análisis de la secuencia de los cuatro promotores no mostró un significativo grado de homología entre ellos, pero sí hubo una gran conservación al comparar las secuencias humanas y murinas, en especial en ciertas regiones donde se han reconocido secuencias de consenso de unión a factores de transcripción. En particular, en el promotor IV se describió la conservación de las cajas de unión del factor IRF 1/2, la secuencia GAS de unión del complejo STAT1 $\alpha$  (factor de transcripción citoplasmático activado directamente por IFN- $\gamma$ ) y la caja E que une a USF-1 (factor transcripcional de la familia de factores de cierre de leucina básicos HLH) (Muhlethaler-Mottet y col., 1997). Análisis de mutagénesis *in vitro* y ensayos funcionales de EMSA demostraron la

unión cooperativa de los factores STAT1 $\alpha$  y USF-1 a las secuencias GAS y caja E del promotor IV de CIITA respectivamente (Muhlethaler-Mottet y col., 1998). La interacción de estos dos factores promueve la formación de un complejo altamente estable y la subsecuente activación del promotor. También, se encontró que la secuencia de unión del factor IRF-1 presente en el promotor IV de CIITA es funcionalmente importante en la activación por IFN- $\gamma$  (Muhlethaler-Mottet y col., 1997). Todo esto indica que la expresión de CIITA es regulada por IFN- $\gamma$  mediante la acción conjunta de varios factores de transcripción.

## 8.0 INTERFERÓN GAMA Y TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES

El interferón gamma es una proteína de secreción perteneciente a la familia de las citoquinas y capaz de inducir la expresión de las moléculas MHC-II (Trinchieri y Perussia, 1985). El receptor de IFN- $\gamma$  corresponde a un receptor de membrana plasmática denominado cadena  $\alpha$  y cuyo gen está localizado en el cromosoma 6 humano y en el 10 murino (Farrar y Schreiber, 1993). Estudios realizados con híbridos somáticos obtenidos entre células humanas y células murinas o de hámster determinaron que el receptor funcional del IFN- $\gamma$ , está compuesto además de un factor especie-específico. Este factor fue localizado en el cromosoma 21 humano (Jung y col., 1987; Bono y col., 1989) y codifica para la subunidad  $\beta$  del receptor, la cual es responsable de la

transducción de señales atribuidas al IFN- $\gamma$  (Hemmi y col., 1994; Soh y col., 1994; Bono y col., 1991a).

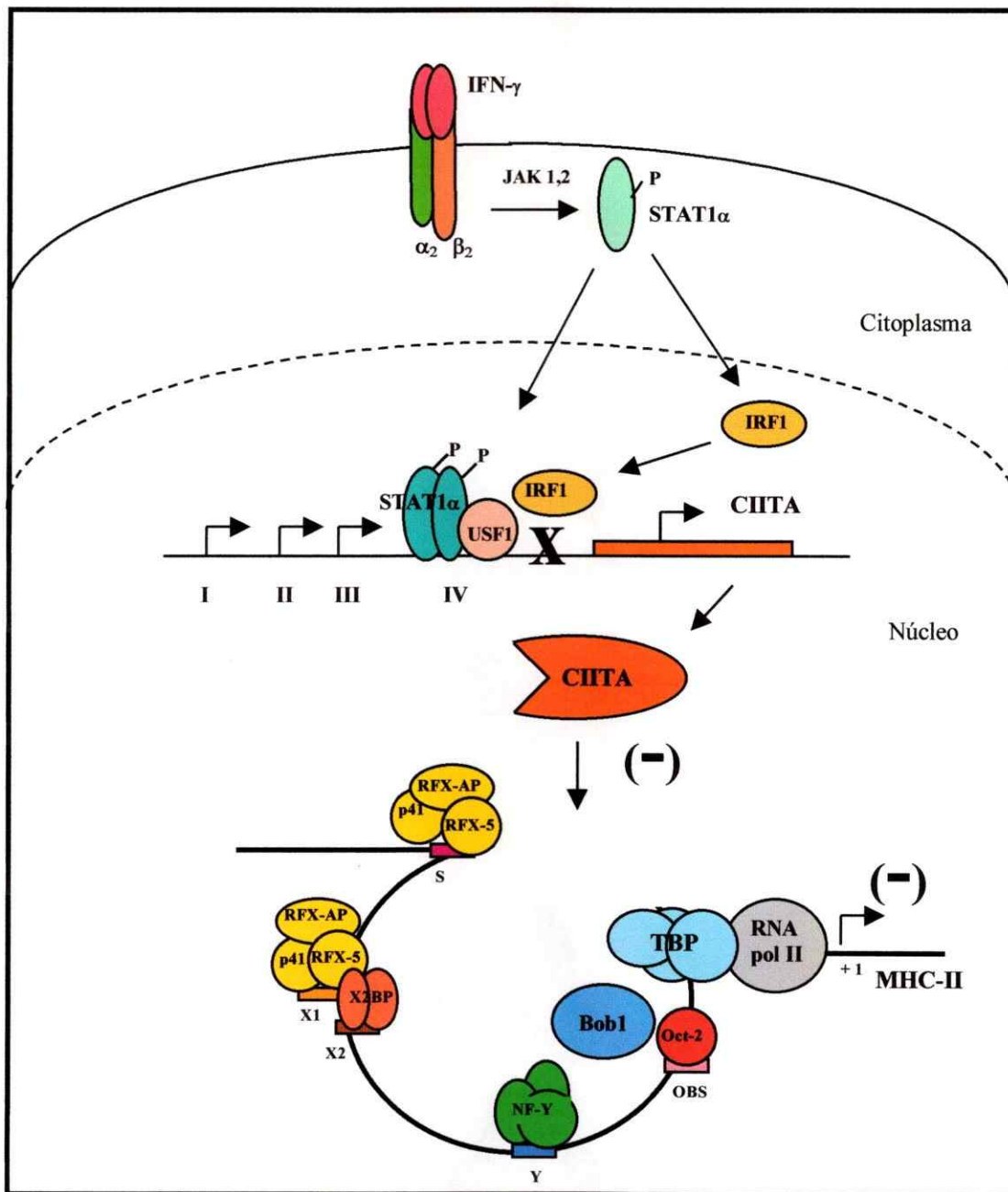
Una gran cantidad de trabajos realizados para comprender la activación transcripcional inducida por IFN- $\alpha$ , condujo al descubrimiento de una nueva vía de transducción de señales conocida como la vía JAK-STAT de activación de proteínas tirosinas quinasas (Darnell y col., 1994). Posteriormente, se describió que muchas otras citoquinas y ligandos mediaban sus efectos a través de esta misma vía (Larner y col., 1993; Sadowski y col., 1993; Ihle y col., 1994; Schindler, 1995). En el caso específico del IFN- $\gamma$ , la cadena  $\alpha$  del receptor se encuentra asociada a la proteína tirosina quinasa JAK-1, mientras que la cadena  $\beta$  está asociada a JAK-2 (Ziemiecki y col., 1994). El IFN- $\gamma$  actúa como un homodímero de 34 kD (Farrar y Schreiber, 1993) uniéndose con alta afinidad a la cadena  $\alpha$  de su receptor provocando la asociación con otra cadena  $\alpha$ . Este complejo interactuaría con dos cadenas  $\beta$ , lo cual conduce a la transfosforilación y activación recíproca de las proteínas tirosina quinasas JAK-1 y JAK-2 (Boehm y col., 1997). A su vez la activación de las JAKs induce la fosforilación del residuo tirosina 440 de la cadena  $\alpha$  del receptor, creando dos sitios de unión yuxtapuestos para los dominios SH2 del factor transcripcional citosólico STAT1 $\alpha$  (p91) (Greenlund y col., 1994). La subsecuente fosforilación de STAT1 $\alpha$  en el residuo tirosina 701 induce su rápida disociación del receptor y la homodimerización a través de sitios SH2 (Shuai, 1993; Shuai, 1994). El homodímero de STAT1 $\alpha$  migra al núcleo y se une a secuencias específicas de DNA denominadas GAS, presentes en el promotor de los



que son regulados por IFN- $\gamma$ , entre ellos IRF-1 y CIITA. En resumen, la unión de IFN- $\gamma$  a su receptor en la membrana plasmática inicia una cascada de eventos de transducción de señales hacia el interior de la célula que llevan a la activación de STAT1 $\alpha$ , y a su posterior migración hacia el núcleo, donde se une al promotor de los genes inducidos por IFN- $\gamma$  (Fig. 3).

## 9.0 MODELO DE REGULACIÓN DE LA EXPRESION INDUCIBLE DE LAS MOLÉCULAS MHC-II POR IFN- $\gamma$

Numerosos estudios de las secuencias promotoras de los genes MHC-II han establecido la ausencia de secuencias GAS en estos genes. Esto hizo difícil entender cómo IFN- $\gamma$  regula la expresión de las moléculas MHC-II. Sin embargo, el descubrimiento de las secuencias GAS en el promotor del gen de CIITA (Lennon y col., 1997) permitió deducir que IFN- $\gamma$  induce la expresión de los genes MHC-II a través de la inducción de CIITA. Actualmente, se ha propuesto que STAT1 $\alpha$  interactúa cooperativamente con el factor de transcripción USF-1 para unirse a la secuencia GAS del gen de CIITA. Además, STAT1 $\alpha$  se une a la secuencia GAS presente en el gen IRF-1 activando su transcripción. La unión de STAT1 $\alpha$  e IRF-1 daría inicio a una activación parcial del promotor de CIITA, pero sería la posterior unión de IRF-1 al promotor del gen para CIITA el que determinaría su expresión total. Una vez que CIITA es expresado, este factor establece una interacción directa con la subunidad RFX-5 del



**Figura 3. Modelo de regulación de la expresión de moléculas MHC-II por IFN- $\gamma$ .** La unión de IFN- $\gamma$  a su receptor inicia una cascada de señales que activa a las proteínas tirosinas quinasas JAK 1 y 2, las que fosforilan al complejo transcripcional STAT1 $\alpha$  que migra al núcleo. STAT1 $\alpha$  induce la expresión de IRF-1 y se une, en conjunto con los factores USF-1 e IRF-1, al promotor IV de CIITA induciendo su expresión. CIITA permite la formación de un complejo estable de unión al DNA entre los factores de transcripción RFX, X2BP y NF-Y. A su vez, CIITA interactúa con subunidades del complejo TBP que forman parte de la maquinaria transcripcional básica para la transcripción del gen MHC-II. En el caso del gen humano DR $\alpha$ , esto se vería reforzado por la participación del factor Bob 1 que se une a la secuencia Oct-2.

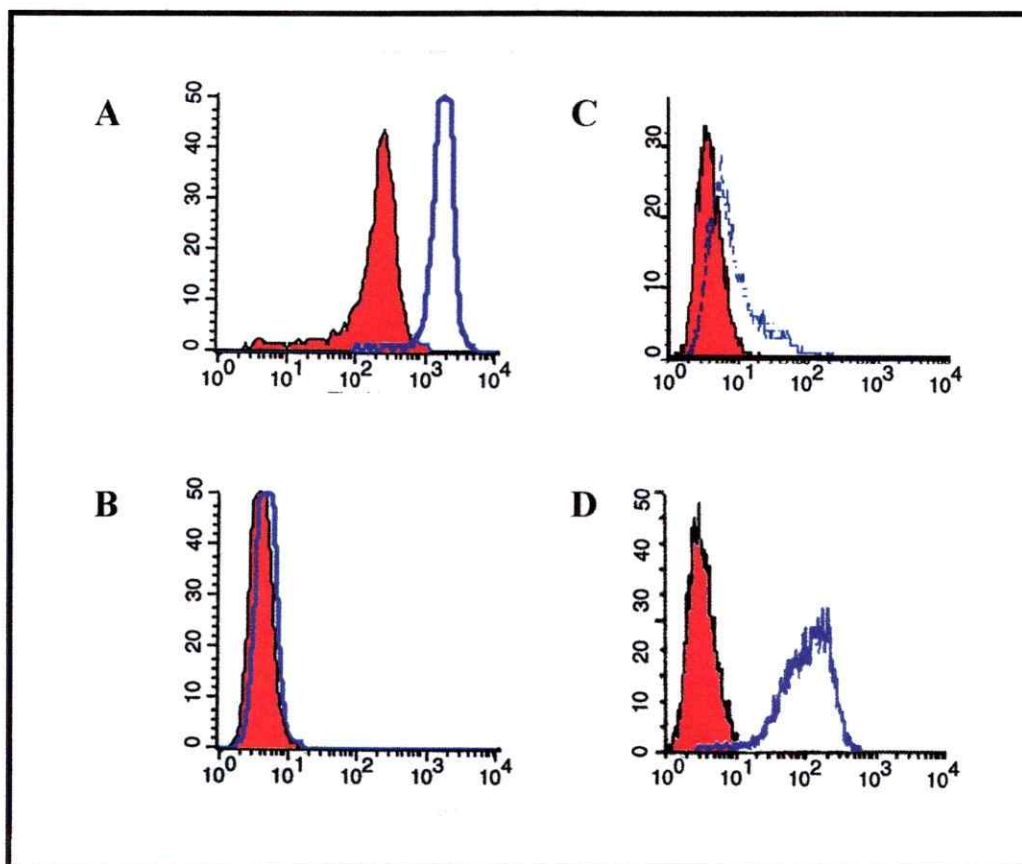
complejo RFX. Consecutivamente, RFX interactúa con las proteínas X2BP y NF-Y conformando una unidad estructural estable que se une a las cajas X1, X2 e Y del promotor de los genes MHC-II. La torsión del DNA producida por la unión del factor NF-Y, permitiría la interacción de CIITA con los factores unidos a la caja S (posiblemente RFX). En el caso del gen DR $\alpha$ , CIITA se uniría además con el factor transcripcional Bob1. Así, a través de Bob 1 o bien a través de la unión directa de su dominio ácido con subunidades de los complejos TAFs, CIITA establecería comunicación con la maquinaria transcripcional unida al promotor de los genes MHC-II (Fig. 3).

## ANTECEDENTES QUE FUNDAMENTAN LA HIPÓTESIS

El interés de esta tesis es estudiar los mecanismos que regulan la expresión de las moléculas MHC-II. Los antecedentes descritos anteriormente demuestran que la expresión de estas moléculas es regulada por un mecanismo altamente complejo.

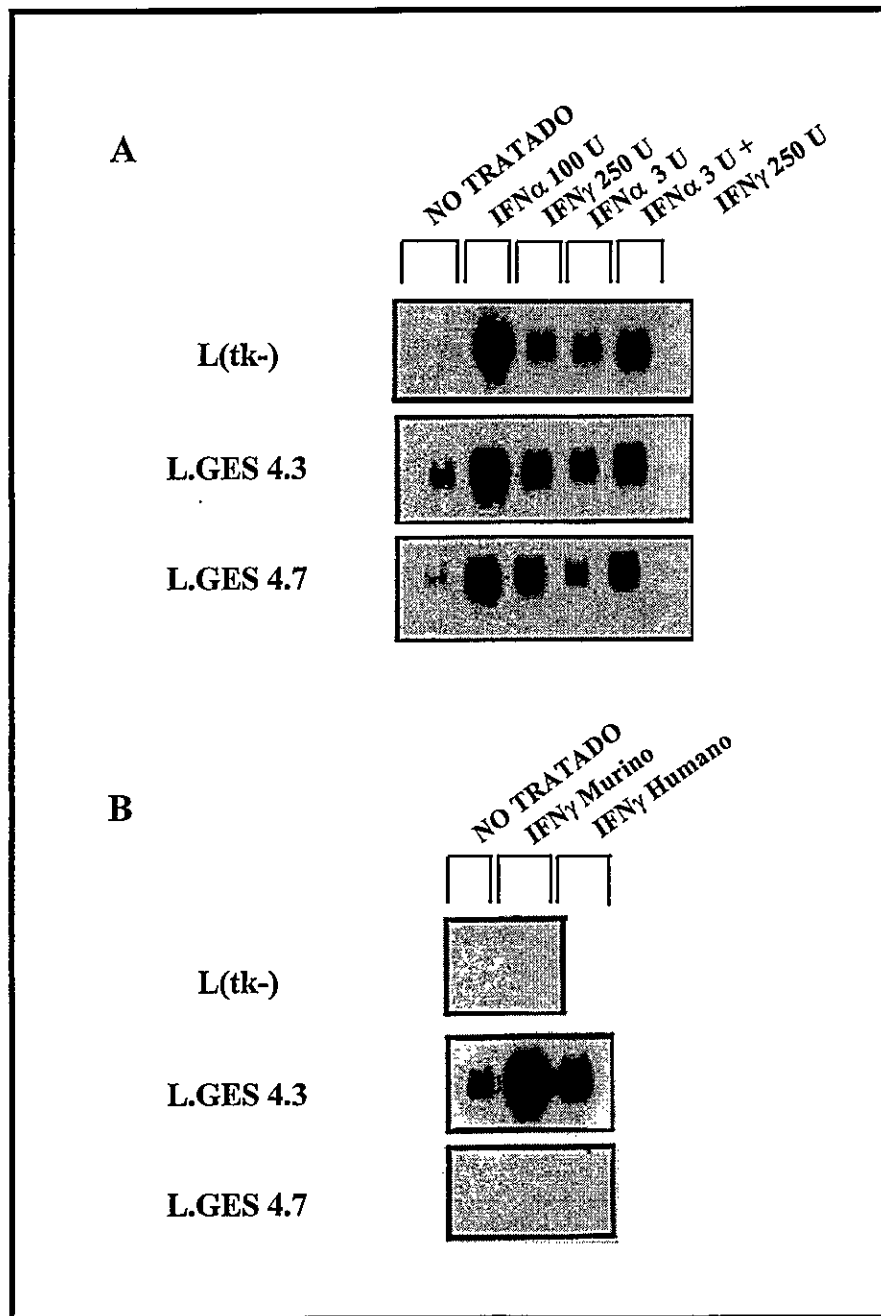
Se ha señalado también la contribución importante al estudio de la regulación de las moléculas MHC-II de líneas celulares mutantes incapaces de expresar moléculas MHC-II y de líneas celulares obtenidas de pacientes que sufren de una enfermedad de inmunodeficiencia (BLS). Del mismo modo, estudios realizados con híbridos celulares inter e intraespecies han permitido establecer la participación de factores reguladores positivos y negativos de la expresión de las moléculas MHC-II (Stuart y col., 1989; Bono y col., 1991b; Lennon y col., 1998).

Trabajos previos de nuestro laboratorio indicaban que la línea celular L(tk-) representaría un buen modelo para el estudio de la regulación de las moléculas MHC-II. A continuación se discuten estos antecedentes. La línea celular L(tk-), corresponde a un fibrosarcoma murino capaz de inducir la expresión de las moléculas MHC-I en respuesta a IFN- $\gamma$  (Bono y col., 1991a y Fig. 4A), pero incapaz de expresar moléculas MHC-II (Fig. 4B) en respuesta a esta misma citoquina. Así mismo, resultados preliminares de Northern blot demostraron que las células L(tk-) expresan el mRNA del gen 2-5-A-oligosintetasa en forma inducible por IFN- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (Fig. 5A), pero no expresan el mRNA para moléculas MHC-II (Fig. 5B). Estos resultados demostraron que las células



**Figura 4. Expresión de las moléculas MHC-I y MHC-II en las células L(tk-) e híbridos somáticos.** Las células L(tk-) (A y B), L.GES 4.3 (C) y R.GES 2.1 (D) se cultivaron en ausencia (curva roja) o en presencia (curva blanca) de 100 U/ml de IFN- $\gamma$  murino durante 72 horas. Las células se marcaron con los anticuerpos 11.4.1, dirigido contra las moléculas MHC-I murinas (A) y H 39.64.5, dirigido contra las moléculas MHC-II murinas (B, C y D). En los histogramas se representa intensidad de fluorescencia media (eje de las abscisas) versus número relativo de células (eje de las ordenadas).

L(tk-) poseen un defecto que les impide expresar moléculas MHC-II, aunque sí expresan otros genes regulados por IFN- $\gamma$ . Sin embargo, la fusión de células L(tk-) con las células B humanas GES (híbrido L.GES 4.3) o con las células B murinas A-20 de diferente haplotipo MHC que las células L(tk-) (Lennon y col.,1998) restauró la expresión inducible por IFN- $\gamma$  tanto del mRNA (Fig. 5B) como de las proteínas MHC-II murinas en la superficie de estas células (Fig. 4C). De esto, se deduce que las células L(tk-)



**Figura 5.** Análisis de Northern blot de las células L(tk-) e híbridos celulares L.GES 4.3 y L.GES 4.7. (A) Las células se cultivaron durante 8 horas en medio solo (no tratado) o en medio que contenía IFN- $\alpha$  murino, IFN- $\gamma$  murino, o una mezcla de ambos, en las concentraciones descritas en las figuras. Se preparó RNA total y se realizó el Northern blot con una sonda que hibrida con el mRNA del gen (2'-5') oligoadenilato sintetasa. (B) Las células se cultivaron durante 16 horas en medio solo (no tratado), en medio con 100 U/ml de IFN- $\gamma$  murino o en medio que contenía 250 U/ml de IFN- $\gamma$  humano. El Northern blot se realizó utilizando una sonda que hibrida con el mRNA de la cadena  $\alpha$  del gen MHC-II murino I-A<sup>d</sup>.

poseen un receptor funcional para IFN- $\gamma$ , puesto que unen y responden a IFN- $\gamma$  expresando moléculas MHC-I y otros genes regulados por esta citoquina. Además, éstos resultados demuestran que los genes estructurales de las moléculas MHC-II se encuentran funcionales, ya que una vez que las células L(tk-) son complementadas por las células B humanas o murinas, los genes MHC-II murinos se expresan normalmente. Estos resultados sugieren que la falta de expresión de las moléculas MHC-II por parte de las células L(tk-) en respuesta a IFN- $\gamma$ , se debería a un defecto en un factor no especie-específico, difusible, y específico de la regulación de la expresión de las moléculas MHC-II.

El análisis de nuestros resultados preliminares, nos llevaron a concentrar nuestros estudios en la investigación del defecto que les impide a las células L(tk-) expresar moléculas MHC-II en respuesta a IFN- $\gamma$ , como una manera de estudiar los mecanismos que regulan la expresión de estas moléculas. Los resultados mostraron que la incapacidad de las células L(tk-) de expresar en forma inducible por IFN- $\gamma$  moléculas MHC-II es debida a una mutación en el gen de CIITA. La mutación en CIITA encontrada en esta tesis es diferente a las detectadas anteriormente y sugiere mecanismos alternativos de regulación de la expresión de las moléculas MHC-II.

## OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de esta tesis es el estudio de los mecanismos de regulación de la expresión de moléculas MHC-II.

## HIPÓTESIS

En base a los antecedentes previamente descritos, planteamos como hipótesis de trabajo que: El defecto de las células L(tk-) que impide la expresión inducible de moléculas MHC-II por IFN- $\gamma$ , correspondería a un factor no especie-específico, difusible, y específico de la regulación de la expresión de moléculas MHC-II.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Los objetivos específicos de esta tesis son:

1. Analizar la complementación de la expresión inducible de las moléculas MHC-II murinos por IFN- $\gamma$  en híbridos celulares somáticos obtenidos entre células L(tk-) y células que expresan normalmente dichas moléculas.



2. Determinar si el defecto de las células L(tk-) que les impide expresar moléculas MHC-II en respuesta a IFN- $\gamma$ , corresponde a alguna de las mutaciones ya descritas para los distintos grupos de complementación BLS o si representa una nueva mutación.
3. Determinar la localización cromosomal del gen que codifica para el factor mutado en las células L(tk-).
4. Caracterización estructural y funcional del factor mutado de las células L(tk-).

# MATERIALES Y MÉTODOS

## CULTIVO CELULAR

Las siguientes líneas celulares fueron obtenidas de la ATCC (American Type Culture Collection, USA) : L(tk-) originada de un fibrosarcoma murino y deficiente en la enzima timidina quinasa; RAG proveniente de un adenocarcinoma renal de ratón; RAW 264.7 una línea macrófago-monocítica murina; A-20 una línea linfóide B murina y WISH, una línea celular humana de origen mesenquimático. Las células humanas GES y LM son líneas celulares B linfoblastoides transformadas con el virus EBV obtenidas de dadores normales. La línea celular BLS-2 fue proporcionada por la Dra. Janet Lee (Sloan-Kettering Institute, New York) (Hume y Lee, 1989). La línea celular BLS-2/Neo<sup>r</sup> corresponde a células BLS-2 transfectadas con el plásmidio pSV2neo (Clontech, USA). Los híbridos somáticos celulares L.GES, L.LM y L.W se obtuvieron anteriormente en nuestro laboratorio mediante fusión entre células L(tk-) y líneas celulares humanas GES, LM y WISH respectivamente.

Las células L(tk-) y RAG así como los híbridos L.GES, L.LM y L.W fueron cultivadas en medio DMEM (Gibco-BRL, USA) suplementado con 10 % de SFB (Gibco-BRL, USA) (DMEM + 10 % SFB), a 37 °C y en una atmósfera con 10 % de CO<sub>2</sub>. Las células RAW 264.7, GES, LM, BLS-2 y A-20 se crecieron en medio RPMI

suplementado con 10 % de SFB (Gibco-BRL, USA), a 37 °C y en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Todos los medios de cultivo se suplementaron con 50 UI/ml de penicilina, 50 mg/ml de estreptomycin y 50 mg/ml de L-glutamina.

## ANTICUERPOS

Las moléculas MHC-I murinas del haplotipo H-2<sup>k</sup> se reconocieron con el anticuerpo monoclonal 11.4.1 (IgG2a, ATCC TIB 95). Las moléculas MHC-II murinas del haplotipo I-A<sup>k</sup> se detectaron con el anticuerpo monoclonal H39.64.5 (Kapler y col.,1981). En los experimentos de inmunofluorescencia indirecta se utilizó como anticuerpo secundario el anticuerpo policlonal anti-IgG de ratón preparado en cabra conjugado con FITC (Byosis, Francia).

## PREPARACIÓN DE HÍBRIDOS SOMÁTICOS

La obtención de híbridos somáticos celulares L.BLS-2 se realizó mediante la fusión con polietilenglicol 4000 (PEG) (Merck, Alemania) de las células L(tk-) y BLS-2 neomicina resistentes (BLS-2/Neo<sup>r</sup>). Este método se esquematiza en la figura 9. El PEG se preparó fundiendo en el autoclave una cantidad determinada del producto, agregando luego un volumen de medio (sin suero) equivalente a la masa. Esto da una solución 50

% p/v de PEG. Previo a la fusión ambos tipos celulares se lavaron dos veces de manera de eliminar todo el suero del medio de cultivo. Luego, se mezclaron las células L(tk-) y BLS-2 en una proporción de 1:10 y se centrifugaron para eliminar trazas de suero fetal. Para fusionar las células, se agregó gota a gota 0,5 ml de PEG 50 % p/v en 1 min a temperatura ambiente. Posteriormente, la mezcla de células se incubó durante 2 min a 37 °C y se diluyó lentamente agregando 1 ml de medio DMEM sin suero en 30 seg. Enseguida, se agregaron 3 ml de medio DMEM sin suero en 30 seg y finalmente se agregaron 16 ml de este mismo medio en 1 min. Las células se dejaron reposar durante 5 min a temperatura ambiente, se llevaron a un volumen final de 40 ml de medio de cultivo, se centrifugaron a 500 x g durante 10 min a temperatura ambiente y se eliminó el sobrenadante. Las células se resuspendieron suavemente en 10 ml de medio DMEM + 10 % de SFB y se cultivaron a 37 °C y 10 % de CO<sub>2</sub>. Dos días después de la fusión, se cambió el medio de cultivo por medio DMEM + 10 % de SFB + neomicina 1 mg/ml (medio de selección). De este modo, las células L(tk-) son eliminadas al cabo de una semana, ya que no contienen el gen de resistencia a neomicina. Con el fin de eliminar las células BLS-2/Neo<sup>r</sup> que crecen en forma no adherente, se realizaron cambios sucesivos del medio de selección cada dos o tres días. Finalmente, se obtuvieron híbridos somáticos como células adherentes capaces de proliferar en presencia de Neomicina.

## SELECCIÓN MAGNÉTICA DE CÉLULAS

Este método permite enriquecer una población heterógena de células, utilizando microesferas magnéticas acopladas con un anticuerpo anti-inmunoglobulinas de ratón (Dynal, Dynabeads M-450, Noruega). En nuestro caso, la población de células L.W 7 inducible por IFN- $\gamma$  para la expresión de moléculas MHC-II fue separada de la población no inducible.

Las células L.W 7 se lavaron dos veces con 5 ml de medio de lavado (medio de cultivo + 2 % de SFB) y se resuspendieron a una concentración de  $10^6$  células/100  $\mu$ l de una dilución del anticuerpo específico, en este caso anti-MHC-II del haplotipo H-2<sup>k</sup>. Los anticuerpos se titularon previamente con el fin de determinar la concentración óptima para su uso. Luego de incubar durante 30 min a 4 °C, las células se lavaron dos veces en medio de lavado y se resuspendieron en 100  $\mu$ l de este mismo medio. Previamente, se lavó dos veces una cantidad de microesferas magnéticas equivalentes a 4 veces el número de células a seleccionar. Para esto, se agregó a las microesferas 2 ml de medio de lavado, se resuspendieron por agitación en el vortex y de inmediato se colocó el tubo conteniendo las microesferas contra el imán de un concentrador de partículas magnéticas (Dynal, MCP-1, Noruega) que separa el solvente de las microesferas. Se mantuvo la solución en contacto con el imán aproximadamente 1 min, y en seguida se aspiró el solvente y se retiró el tubo del imán. Esta operación se repitió en todos los lavados subsecuentes. Una vez realizados los dos lavados de las microesferas, estas se

mezclaron con las células que han sido previamente marcadas con el anticuerpo específico y resuspendidas en 100  $\mu$ l de medio de lavado. La mezcla de células y microesferas se incubaron en un rotador a 4 °C durante 30 min. Transcurrido este lapso de tiempo, se les agregó 2 ml de medio de lavado y se colocaron contra el imán por 2 min. Las células que no poseen las moléculas reconocidas por el anticuerpo específico pueden ser aisladas a partir del sobrenadante, mientras que las células que poseen el marcador de selección quedan adosadas al imán mediante las esferas magnéticas que se unieron al primer anticuerpo.

Con el fin de despegar las microesferas magnéticas de las células seleccionadas, estas se resuspendieron en 95  $\mu$ l de medio de lavado más 5  $\mu$ l de Detachbeads (Dyna, Noruega) y se incubaron en el rotador por 1 hora a temperatura ambiente. Este paso permite despegar las microesferas de las células por competencia. Finalmente, se les agregó 2 ml de medio de lavado y se separaron las células de las microesferas utilizando el imán, recuperando las células que quedan en el sobrenadante. Antes de poner las células en cultivo, se lavaron una vez con 5 ml de medio de cultivo, centrifugándolas a 400 x g por 7 min.

## CLONAMIENTO POR DILUCIÓN LÍMITE

Con el fin de obtener una población homogénea de células, estas se clonaron por dilución límite. Para esto, se preparó una solución de células a aproximadamente  $10^5$

células/ml y se determinó la concentración lo más exactamente posible mediante recuento repetido en un hematocitómetro. Se tomaron 1.000 células de esta solución y se llevaron a 1 ml con medio de cultivo. Luego, se tomaron 100  $\mu$ l de esta solución y se diluyeron en 20 ml de medio completo. Se distribuyeron 200  $\mu$ l de esta solución en una placa de 96 pocillos y se incubaron por una semana en el incubador de CO<sub>2</sub>. Pasada esta semana se verificó en el microscopio invertido la presencia de colonias individuales y se amplificaron estos cultivos pasando las células primero a placas de 24 pozos y enseguida a botellas de cultivo. Luego, se analizaron varios subclones y se seleccionaron aquellos con el fenotipo deseado.

## INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

Cultivos subconfluentes de células se trataron con 100 U/ml de IFN- $\gamma$  recombinante murino (Roussel-Uclaf, Francia) durante 72 horas. En el caso de células adherentes, estas se tripsinizaron, y se mantuvieron en reposo durante 1 hora antes de realizar la inmunofluorescencia, para permitir la re-expresión de aquellas moléculas de superficie que pudieran ser afectadas por el tratamiento con la tripsina. Luego,  $0,1-0,5 \times 10^6$  células por ensayo se lavaron con 1 ml de medio de lavado (medio de cultivo + 2 % de SFB) y se centrifugaron a 500 x g durante 4 min a 4 °C. El sobrenadante se retiró por aspiración, las células se resuspendieron en 100  $\mu$ l de la dilución apropiada del anticuerpo primario (determinada previamente por titulación) y se incubaron durante 30

min a 4 °C. Después, las células se lavaron con 1 ml de medio de lavado, se resuspendieron en 100 µl de una dilución apropiada del anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con FITC (BioSys, Francia) y se incubaron durante 30 min a 4 °C. Una vez finalizada la incubación las células se lavaron con 1 ml de PBS + 2 % de SFB, se resuspendieron a  $1 \times 10^6$  células/ml en este mismo medio y se agregó yoduro de propidio a una concentración de  $1 \mu\text{g}/1 \times 10^6$  células. El yoduro de propidio marca los núcleos de células muertas, lo que permite eliminarlas en la adquisición de datos en el citómetro de flujo. Las muestras se analizaron en un FACScan (Becton Dickinson, San José, CA) usando el programa computacional Lysis II.

## PREPARACIÓN DE DNA

Se obtuvo DNA genómico de cultivos semiconfluentes de células adherentes o de  $10^7$  células en suspensión. Para esto, se eliminó el medio de cultivo y las células se lavaron dos veces con 5 ml de PBS. Luego, se agregaron 3 ml de solución de lisis (Tris-HCl 50 mM, pH=8; EDTA 50 mM, pH=8; Sarcosyl 1 %; RNasa 200 ng/ml) para una placa de cultivo semiconfluyente de 100 mm ó 10 ml de esta solución por  $10^7$  células no adherentes y se mantuvo en reposo por 10 min a temperatura ambiente. El lisado celular se traspasó a un tubo Falcon de 50 ml (Falcon, USA) y se incubó durante 1 hora a 50 °C. Luego, se agregó proteínasa K (0,2 mg /ml final) y se incubó a 37 °C durante toda la noche. Al día siguiente, se agregó NaCl (2 M final) y se mezcló con dos volúmenes de



etanol 100 % frío. La fibra de DNA se aisló con una pipeta de 1 ml y se traspasó a un tubo Eppendorf de 1,5 ml. Se eliminó el exceso de medio y el DNA se lavó primero con 200  $\mu$ l de etanol 70 % frío y después con 200  $\mu$ l de etanol 100 % frío. El DNA se secó al aire y se resuspendió en 100  $\mu$ l de agua estéril. Finalmente, la concentración de DNA se determinó midiendo la densidad óptica ( $\lambda = 260$  nm) en un espectrofotómetro y la integridad del DNA se visualizó en un gel de agarosa.

## PCR

Se preparó una mezcla de reacción que contenía tampón de PCR (Tris-HCl 20 mM, pH= 8,4, KCl 50 mM) (Gibco-BRL, USA); MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM (Gibco-BRL, USA); una mezcla de los cuatro dNTP 0,2 mM (Gibco-BRL, USA); 200 ng de los partidores en dirección sentido y anti-sentido; taq DNA Polimerasa 2,5 unidades (Gibco-BRL, USA); 100 ng de DNA y agua nanopure estéril en un volúmen final de 50  $\mu$ l. La mezcla se incubó en un termociclador (MJ Research PTC-150, USA) bajo las siguientes condiciones: 1 ciclo de 95 °C durante 2 min; 30 ciclos de 95 °C durante 1 min, 60 °C durante 1 min, 72 °C durante 2 min y 1 ciclo de 72 °C durante 10 min. Para cada reacción, la temperatura de alineamiento se escogió de tal manera que fuese igual o cercana (+/- 5 °C) a la temperatura de desnaturación media ( $T_M$ ) de la pareja de partidores utilizada. El 10 % de la reacción de amplificación se mezcló con tampón de

muestra 6X (azul de bromofenol 0,25 %; glicerol 30 % y agua nanopure estéril), se cargó en un gel de agarosa al 1,4 % con 0,5 mg/ml de bromuro de etidio y se corrió con tampón TEA (Tris-acetato 40 mM, pH=8; EDTA 1mM, pH=8). Como marcador de tamaño molecular se utilizó una escalera (ladder) de 100 pares de bases (pb) (Gibco-BRL, USA) o de 1 kilo bases (kb) (Gibco-BRL, USA) a una concentración de 25 µg/ml preparado en tampón TE ( Tris-Cl 10 mM, pH=8; EDTA 1 mM, pH=8) al cual se le agregó tampón de carga 6x. La secuencia de los partidores (Biosource International, USA) utilizados son :

CIITA humano sentido: 5'- CGCCCTATTTGAGCTGTC - 3'

CIITA humano anti-sentido: 5'- GGTC AATGCTAGG TACTG - 3'

RFX-5 humano sentido: 5'- CCAATCCCAGTCTCTCCAC - 3'

RFX-5 humano anti-sentido: 5'- CACCACCTATGCCTACCTCT - 3'

RFX-AP humano sentido: 5'- GTTCTCATCAAGGGTCAATT - 3'

RFX-AP humano anti-sentido: 5'- TAGTTAATCCGTCAGGTTTT - 3'

PRM.I humano sentido: 5'- GCTTGGCACACTAGGAGCTATTAG - 3'

PRM.I humano anti-sentido: 5'- CCCTTGCCTTGCCTGTAAAGCATG - 3'

APRT humano sentido: 5'- GGTGCATGTCACTGGCCTTTCAGCT - 3'

APRT humano antisentido: 5'- TGTCTCAACCTCTCTGAGCTCCCAA - 3'

P1 S : 5'- GGTTGGGCTGAGATAGAGTG - 3'

P1 AS: 5'- CTGTGCCCCTGTCTTCTGAG - 3'

## PREPARACIÓN DE RNA

Luego de eliminar el medio de cultivo celular, ya sea por aspiración en el caso de células adherentes o por centrifugación para el caso de células no adherentes, se extrajo el RNA total siguiendo el método descrito por Chomzynski y Sacchi (1987). Para ello, se preparó una solución de lisis stock disolviendo a 60 °C con agitación, los siguientes reactivos: tiocianato de guanidina 4 M (Fluka, Suiza); citrato de sodio 53 mM, pH=7,0 (Merck, Alemania); sarcosil 1% y agua estéril nanopure tratada con dietilpirocarbonato (Gibco-BRL, USA) (agua/DEPC) en un volumen final de 50 ml. En el momento de la extracción de RNA, se agregó 2-β-Mercaptoetanol 0,7 mM (Gibco-BRL, USA) por cada 1 ml de solución de lisis. Luego, se agregó directamente sobre las células 1 ml de la solución de lisis por cada  $10^7$  células y se resuspendió varias veces con una micropipeta hasta obtener un lisado homogéneo el que se separó en dos tubos Eppendorf. A cada tubo se agregaron 50 µl de acetato de sodio 2M, pH= 4,0 (Merck, Alemania) y se mezcló por inversión. Luego, se agregaron 500 µl de fenol-agua/DEPC (pH=5,2), se mezcló por inversión y se adicionaron 100 µl de cloroformo: isoamilalcohol (49:1) (Merck, Alemania) a cada tubo. Después de incubar durante 15 min en hielo, los tubos se centrifugaron a  $10.000 \times g$  durante 20 min a 4 °C y la fase acuosa, que contenía el RNA, se traspasó a otro tubo Eppendorf. El RNA se incubó con 500 µl de isopropanol 100 % (Merck) durante 30 min a -20 °C y se centrifugó a  $10.000 \times g$  durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante se decartó y el RNA se resuspendió en 300 µl de solución de lisis final

juntando el producto de ambos tubos en uno solo. El RNA se precipitó nuevamente con isopropanol y se centrifugó tal como antes. El RNA se resuspendió con 1 ml de etanol 75 % (Merck, Alemania) agitando brevemente en un vortex, luego de lo cual, se incubó por 15 min a temperatura ambiente. Después de centrifugar a 10.000 x g durante 5 min a 4 °C, se eliminó el sobrenadante, se secó el RNA al aire y se resuspendió en 100 µl de agua/DEPC. La concentración de RNA se determinó midiendo su densidad óptica en un espectrofotómetro. Solo se utilizaron preparaciones que tuvieran una proporción de densidad óptica leída en las longitudes de onda de 260 nm y 280 nm mayor que 1,8.

La integridad y pureza de la preparación de RNA se comprobó mediante electroforesis en un gel desnaturante de agarosa al 1,2 % preparado en formaldehído 2,2 M en agua/DEPC y tampón MOPS 1X (Rosen y Villa-Komaroff, 1990). El tampón MOPS stock 10X, pH=7,0 preparado con agua/DEPC contiene: MOPS 0,2 M (Gibco-BRL, USA); Acetato de sodio 50 mM, pH=7,0 (Gibco-BRL, USA) y EDTA 10 mM (Sigma, USA). Las muestras de RNA (2 µg) se mezclaron con 10 µl de tampón de carga [formamida desionizada 65 % (Gibco-BRL, USA); formaldehído 7,7 % (Merck, Alemania); tampón MOPS 1X y bromuro de etidio 0,13 mg/ml (Sigma, USA)], se incubaron a 65 °C durante 10 min y luego se enfriaron en hielo. Posteriormente, se agregó 1 µl de mezcla de tinción ( xilen-cianol 0,2 % v/v; azul de bromofenol 0,2 % v/v; EDTA 10 mM (Sigma, USA) y glicerol 50 % v/v (Merck, Alemania) a cada tubo, se mezclaron en el vortex, se centrifugaron brevemente y se cargaron en el gel. El tampón de corrida utilizado fue MOPS 1X.

## RT-PCR

Dos microgramos de RNA total se desnaturaron a 70 °C durante 10 min, se enfriaron rápidamente en hielo y se incubaron durante 1 hora a 42 °C en el tampón de reacción del kit GeneAmp PCR (Tris-HCl 10 mM, pH= 8,3, KCl 50 mM) (Perkin Elmer, USA); MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM (Perkin Elmer, USA); 1mM de cada dNTP (Perkin Elmer, USA); 28 unidades de RNAsin (Promega, USA); 200 ng del partidador en dirección anti-sentido y 20 unidades de la enzima transcriptasa reversa AMV (TR) (Promega, USA) en un volúmen final de 20 µl. En todos los experimentos, se realizó una reacción control sin la enzima TR. Luego, todo el cDNA obtenido se amplificó por PCR, mezclándolo con tampón de reacción del kit GeneAmp PCR (Perkin Elmer, USA); MgCl<sub>2</sub> 2,0 mM (Perkin Elmer, USA); 200 ng del partidador en dirección sentido; 5 unidades de la enzima taq DNA Polimerasa (Perkin Elmer, USA) y agua nanopure estéril en un volúmen final de 100 µl. Las condiciones de amplificación fueron las ya descritas para la PCR. La secuencia de los partidores (Genaxis Biotechnology, Francia) utilizados son:

CM 2-S: 5'- TCAAGCAGCCTCAGTAT -3'

CM 2-AS: 5'- TCTAGGATGAGCAGAAC -3'

CM 5-LS: 5'- TGGCGTTGAGCCTTCTGGAC -3'

CM 5-LAS: 5'- CCGGCAGCCGTGAACTTGTT - 3'

CM 6-LS: 5'- GGAGCCAAGAGCCTGGCACA - 3'

CM 6-LAS: 5'- CCCTTAGCGTCTTCAGAGCC -3'

CM 10-S: 5'- GGAGACTTCCGGCACGCCAG - 3 '  
CM 11-S: 5'- CGACCCCCTACATCTCTACC -3'  
CM 12-AS: 5'- CTGAGGCTGCTTGAAGGGAG - 3'  
CM 13-S: 5'- GCCAGACCGTGTTCTGCTCA - 3'  
CM 14-AS: 5'- CGGGAGGACTGTTCTGAGCT - 3'  
CM 15-S: 5'- GGGCTGCCTTCCGTGGGTTC - 3'  
CM 16-AS: 5'- CCCAGACAGCAACTTGTGTC - 3'  
CM 20-AS: 5'- TGCTGAACTGGTCGCAGTTGATGG -3'  
CM 21-AS 5' - AGGTAGCTGCCCTCTGGAGATCC - 3'  
CM 22-S: 5'- GAGGCTGCACACTGCTCCTCAC - 3'  
CM 22-AS: 5'- GAGCCTCCGTGGTCTCCAGGGT -3'  
CM 23-S: 5'- CATCCGTGGAGGTGAAAACCTG - 3'  
CM 23-AS: 5'- CTCCCTGCTGCTGAAGGGACTC - 3'  
CM 24-S: 5'- GCTAGCCCACGGTGGTCTGGCA - 3'  
CM 24-AS: 5'- CAGTAGCTTCCGCTGGAAGATC - 3'  
CM 25-AS: 5'- GGGCCTCTAGCTCCTCGAAAGC - 3'  
CM 27-S: 5'- AACTCTGCATGCGCCCGTGTGC - 3'  
CM 27-AS: 5'- CCCTGAGCCCAAGGTCCTAAC - 3'  
CM 30-S: 5'- ATCTCTAGATGTGACAGGGAGCC - 3'  
CM 30-AS: 5'- GCACACGGGCGCATGCAGAGTGT - 3'  
CM 32-AS: 5'- CTGCAGTCACTGACAACCTG - 3'

CM 43-S: 5'- CTCCCTTCAAGCAGCCTCAG - 3'

IRF-1S: 5' - AAGCACGGCTGGGACATCAACAAG - 3' (Hobart y col., 1997)

IRF-1AS: 5'- GTGGTGTAAGTCTGTGGTCATCA - 3' (Hobart y col., 1997)

$\beta$ -Actina S: 5'- CACCCTGTGCTGCTCACCGAGGCC - 3' (Chang y col., 1994)

$\beta$ -Actina AS: 5'- CCACACAGAGTACTTGCGCTCAGG - 3' (Chang y col., 1994).

## RT - PCR EXTENDIDO

La obtención de cDNA de gran tamaño se realizó siguiendo las instrucciones del kit Expand Reverse Transcriptase (Boehringer Mannheim, Alemania). Primero, una solución que contenía 2  $\mu$ g de RNA total, 200 ng del partidor en dirección antisentido y agua/DEPC en un volumen final de 4,5  $\mu$ l se desnaturalizó a 65 °C durante 10 min y se enfrió rápidamente en hielo. Luego, el RNA desnaturalizado se mezcló con una solución que contenía: tampón de reacción ( Tris-HCl 50 mM , KCl 40 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, Tween 20 0,5 % v/v, pH= 8,3), ditioneitol (DTT) 10 mM, cada uno de los dNTPs 1 mM, 20 unidades de Inhibidor de RNasa y 50 unidades de la enzima Transcriptasa Reversa Extendida en un volumen final de 20  $\mu$ l y se incubó durante 1 hr a 42 °C. La reacción se detuvo colocando el tubo en hielo y 10  $\mu$ l del cDNA se usaron para ser amplificados por PCR. En este caso, el partidor en dirección antisentido utilizado se localizó río arriba con respecto al partidor antisentido que fue usado en la reacción de obtención del cDNA. El resto de las condiciones y el programa de ciclos de PCR fueron las ya descritas.

## PURIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE RT-PCR

Los productos de amplificación obtenidos por PCR y RT-PCR se purificaron desde un gel cortando con un bisturí el trozo de agarosa que contenía el fragmento de DNA específico. Luego, el fragmento de agarosa se pasó a través de una jeringa de 1 ml con una aguja delgada (25 G x 5/8"), se agregó una cantidad de fenol (Merck, Alemania) (equilibrado con tampón Tris-HCl 0,1 M, pH=8) equivalente al volumen del trozo de agarosa, se mezcló vigorosamente en un vortex y se sumergió en nitrógeno líquido durante 5 min para ser en seguida descongelado a temperatura ambiente. La muestra se centrifugó a 12.000 x g durante 15 min a temperatura ambiente y se recuperó la fase superior. El DNA se mezcló con un volumen de fenol:cloroformo:isoamilalcohol (Merck, Alemania) (24:24:1) y se centrifugó a 12.000 x g durante 5 min a temperatura ambiente. Se recuperó la fase acuosa y se extrajo nuevamente con fenol: cloroformo: isoamilalcohol. Finalmente, se realizó una última extracción con un volumen de cloroformo:isoamilalcohol (24:1) y se centrifugó en las mismas condiciones. El DNA obtenido, se precipitó con etanol, incubándolo durante toda la noche a -20 °C con 1/10 volumen de acetato de sodio 3M, pH= 5,2 (Merck, Alemania) y dos volúmenes de etanol 100 %. Al día siguiente, el DNA se centrifugó a 12.000 x g durante 30 min a 4 °C, el pellet se lavó con 500 µl de etanol 70 % y se centrifugó a 12.000 x g durante 20 min a 4 °C. El pellet se dejó secar al aire y se resuspendió en 10 µl de agua nanopure estéril. La pureza de la preparación se comprobó en un gel de agarosa cargando 1 µl de la muestra



de DNA y la concentración de DNA se determinó en relación al marcador de tamaño molecular de DNA (escalera de 1 kb, Gibco-BRL, USA).

## SECUENCIACIÓN DE DNA

Los fragmentos de DNA obtenidos por PCR y RT-PCR se marcaron con desoxinucleótidos trifosfatos fluorescentes utilizando el kit ABI Prism Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Perkin Elmer, USA). Una mezcla de reacción conteniendo 100 ng de cDNA; 3,2 pmoles del partidor en dirección sentido; 8  $\mu$ l de la pre-mezcla de reacción proporcionada por el kit (dNTPs terminadores fluorescentes, dNTPs no marcados y AmpliTaq DNA Polimerasa) y agua estéril para un volumen final de 20  $\mu$ l. La mezcla se incubó en un termociclador (Perkin Elmer modelo 9600, USA) utilizando el siguiente programa: 1 ciclo de 5 min a 94 °C y 25 ciclos de: 10 seg a 96 °C, 5 seg a 55 °C, 4 min a 60 °C. Luego, los productos de PCR se precipitaron con etanol, tal como se describió previamente y se lavaron dos veces con etanol 70 %. El pellet se secó al aire y se resuspendió en 4  $\mu$ l de la mezcla EDTA 25 mM (Sigma, USA), pH=8:formamida desionizada 100 % (1:5) (Sigma, USA). Las muestras de cDNA fluorescentes se desnaturaron por incubación a 94 °C durante 5 min, se enfriaron rápidamente en hielo y se cargaron en un gel de secuencia [ urea 50 % (Gibco-BRL, USA); acrilamida-bis-acrilamida (19:1) 6 % (Bio-Rad, USA); APS 0,05 % (Sigma, USA); TEMED (Sigma, USA) y tampón TBE 1x (89 mM Tris borato, 2 mM EDTA) en

un volúmen final de 80 ml J. El gel de secuencia se corrió en un secuenciador automático de DNA (Perkin Elmer 370 A, USA) usando tampón TBE 1X como tampón de corrida y los resultados se analizaron con el programa computacional Edit View. Del mismo modo, los fragmentos de cDNA se secuenciaron en la dirección inversa empleando los partidores antisentido.

### RACE - PCR

Los productos de RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) se obtuvieron según las instrucciones del fabricante (kit 5'-RACE, Gibco-BRL, USA). El principio en el cual se basa este método se describe en la figura 18. El cDNA de las células A-20, RAW, RAG y L(tk-) se obtuvo utilizando el partidor en dirección antisentido CM 12AS (nucleótidos 739-758) cercano al inicio del extremo 5' del mRNA de CIITA. Luego, el híbrido RNA:DNA se incubó con 1 µl de una mezcla de enzimas Rnasa H y Rnasa T1 (proporcionada por el kit) durante 30 min a 37 °C. Luego, el cDNA se purificó del resto de los componentes de RT-PCR y de los productos de RNA degradados mediante el uso de columnas GlassMax (Gibco-BRL, USA) también proporcionadas por el kit. Para ello, el cDNA se mezcló con 120 µl de la solución de unión (NaI 6M) y se transfirió a una columna GlassMax con un filtro en su interior. Las columnas se centrifugaron a 13.000 x g durante 20 seg a temperatura ambiente. De esta manera, el cDNA quedó retenido en el filtro y el resto de los componentes fueron eluidos. Luego, el cDNA se

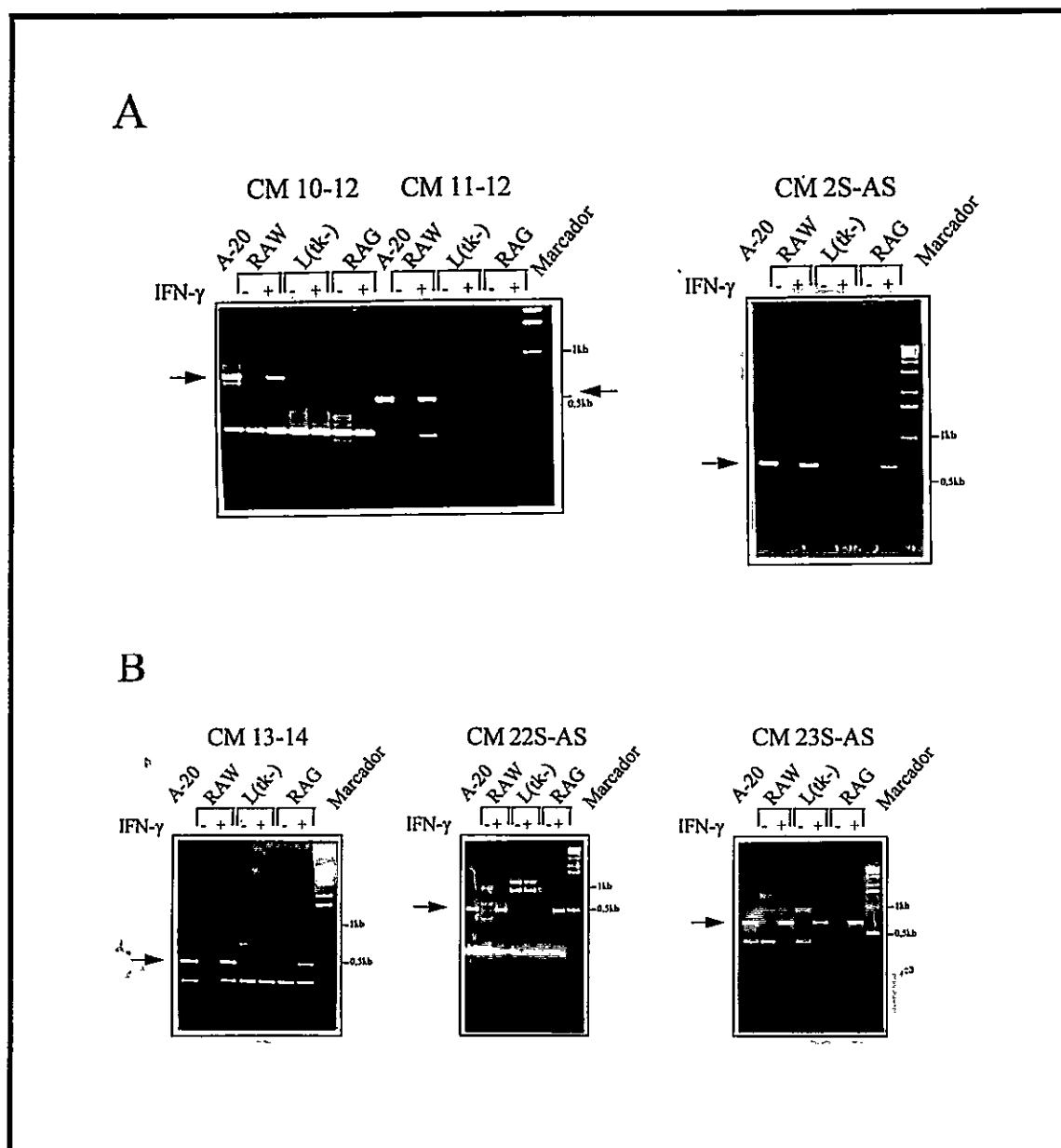
lavó cuatro veces en la columna con 400 µl de solución de lavado (proporcionada por el kit) bajo las mismas condiciones de centrifugación y tres veces con 400 µl de etanol 70 % frío. Finalmente, el cDNA se recuperó desde el filtro de la columna agregando 50 µl de agua estéril previamente calentada a 65 °C y centrifugando a 13.000 x g durante 20 seg a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadió un tallo homopolimérico de dCTP a 10 µl del cDNA puro en una solución que contenía dCTP 200 µM; tampón de reacción 1X (Tris-HCl 10 mM, pH= 8,4; KCl 25 mM; MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM) (Gibco-BRL, USA); 1 µl de la enzima Desoxinucleotidil Terminal Transferasa (TdT) (Gibco-BRL, USA) y agua nanopure estéril en un volumen final de 25 µl. Se incubó la mezcla durante 1 h en hielo. En todos los experimentos se realizó una reacción control sin la enzima TdT. En seguida, una muestra de 5 µl del cDNA-polidC se amplificó mediante PCR según el protocolo descrito anteriormente usando el partidor adaptador 1 en dirección sentido (5'- GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACG GGI IGG GII GGG IIG - 3', proporcionado por el kit) y el partidor en dirección antisentido CM 20AS (nucleótidos 308-331) localizado río arriba del partidor antisentido CM 12AS utilizado en la reacción de RT-PCR. Un PCR anidado se realizó con una dilución 1/50 (5 µl de DNA más 45 µl de agua nanopure estéril) del producto de PCR anterior, con el partidor adaptador 2 en dirección sentido (5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC-3', proporcionado por el kit) y con el partidor antisentido CM 21AS (nucleótidos 175-197) ubicado río arriba con respecto al partidor antisentido CM 20 AS usado en la primera reacción de PCR. Finalmente, los productos de amplificación se analizaron en un gel de agarosa al 1,4 %.

## RESULTADOS

### ANÁLISIS DE HÍBRIDOS CELULARES

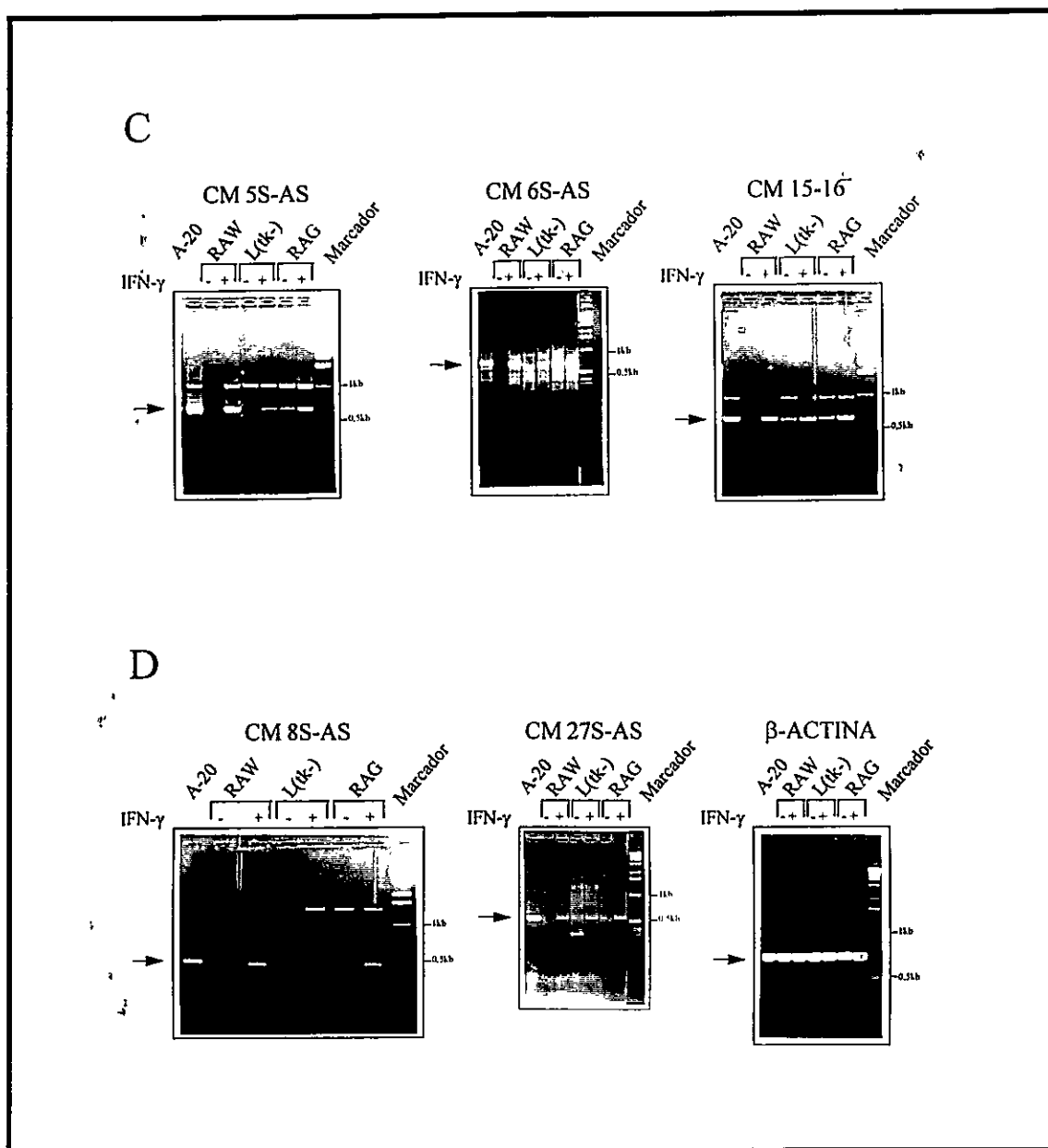
Tal como se mencionó en la introducción, antecedentes preliminares de nuestro laboratorio demostraron que las células L(tk-) poseen un defecto que les impide responder a IFN- $\gamma$  mediante la inducción de moléculas MHC-II. Sin embargo, estas células son capaces de responder a IFN- $\gamma$  para otras de las actividades biológicas atribuidas a esta citoquina. Los siguientes experimentos se realizaron con la finalidad de estudiar el defecto de estas células.

Se analizó mediante inmunofluorescencia indirecta la expresión de las moléculas MHC-II de origen murino inducida por IFN- $\gamma$  murino en un panel de híbridos somáticos preparados mediante la fusión de células L(tk-) con las líneas celulares humanas normales B linfoblastoide GES y LM y con la línea celular de origen mesenquimático WISH. Los híbridos somáticos se denominaron L.GES, L.LM o L.W, respectivamente. Los resultados, analizados mediante citometría de flujo, muestran que algunos de estos híbridos (L.LM 5.3, L.GES 4.7 y L.W 14) son incapaces de expresar las moléculas MHC-II después del tratamiento por 72 horas con IFN- $\gamma$  (Fig. 6), mientras que los híbridos L.LM 3.10, L.LM 3.30, L.GES 4.3, L.W2, L.W 1, L.W 7, L.W 10 y L.W 6 sí expresan dichas moléculas en respuesta a IFN- $\gamma$  (Fig. 6). En las figuras 7 y 8 se apreciaba que en los híbridos L.W 7 y L.W 10 solo un pequeño porcentaje de las células expresan



**Figura 12.** Análisis mediante RT-PCR de la expresión del mRNA de CIITA. Las células A-20, RAW, RAG y L(tk-) se cultivaron en presencia o ausencia de 100 U/ml de IFN- $\gamma$  murino durante 6 horas y se analizó la expresión del mRNA de CIITA mediante RT-PCR utilizando los siguientes partidores: (A) CM 10-12 (734 pb), CM 11-12 (539 pb), CM 2S-AS (688 pb); (B) CM 13-14 (493 pb), CM 22S-AS (498 pb), CM 23S-AS (669 pb).

se localizan en distintos exones, descartando la posibilidad de amplificar un fragmento del tamaño esperado a partir de posibles trazas contaminantes de DNA. En los casos

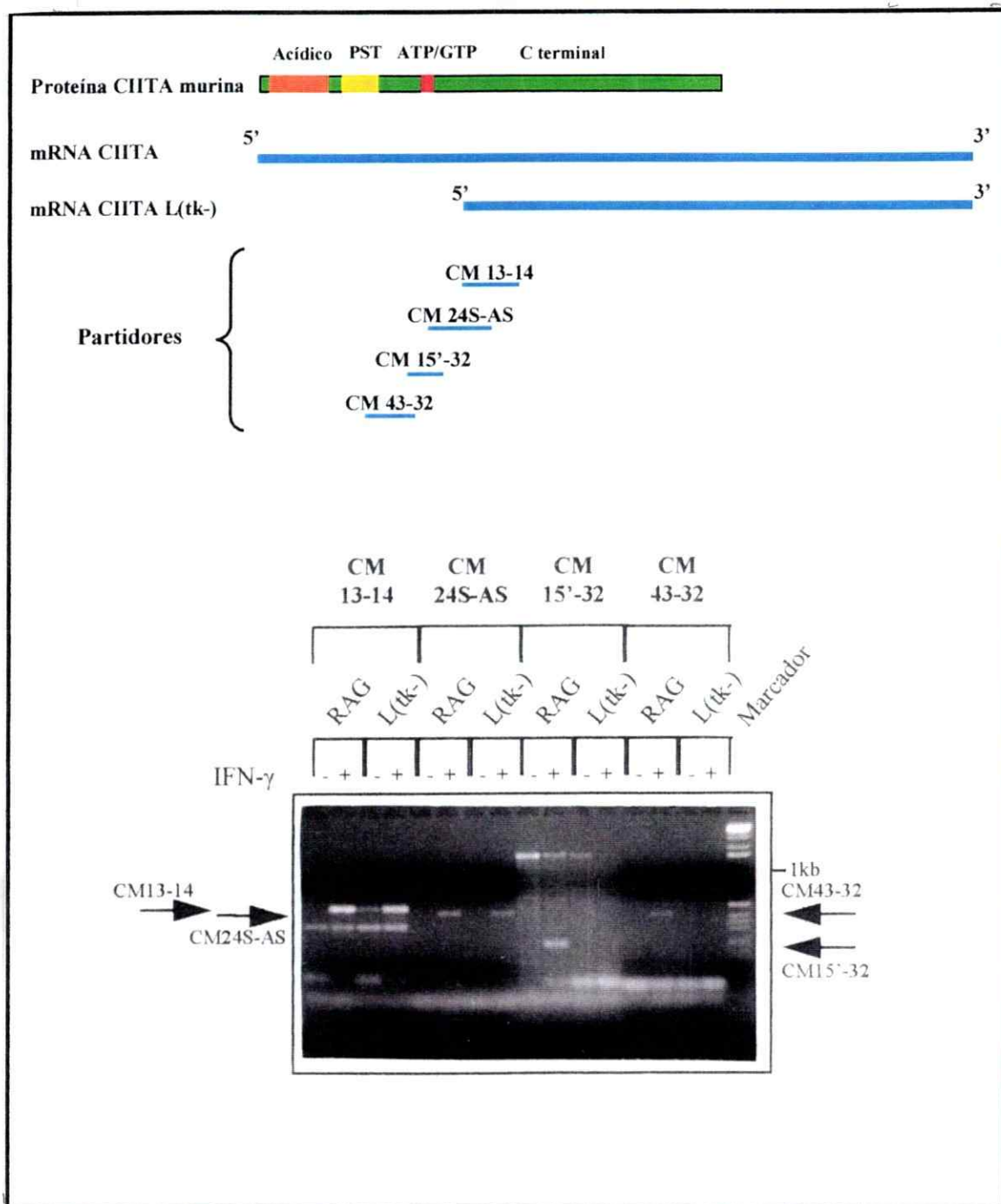


**Figura 12. Continuación de la figura anterior. (C) CM 5S-A (665 pb), CM 6S-AS (671 pb), CM 15-16 (673 pb); (D) CM 8S-AS (485 pb), CM 27S-AS (539 pb). Como control de la cantidad de RNA, se utilizaron los partidores para  $\beta$ -actina (650 pb) (D).**

donde esto no ocurrió, la especificidad de la reacción de RT-PCR a partir de mRNA y no de DNA, fue comprobada mediante la ausencia de productos de amplificación en la reacción control sin la enzima Transcriptasa Reversa.

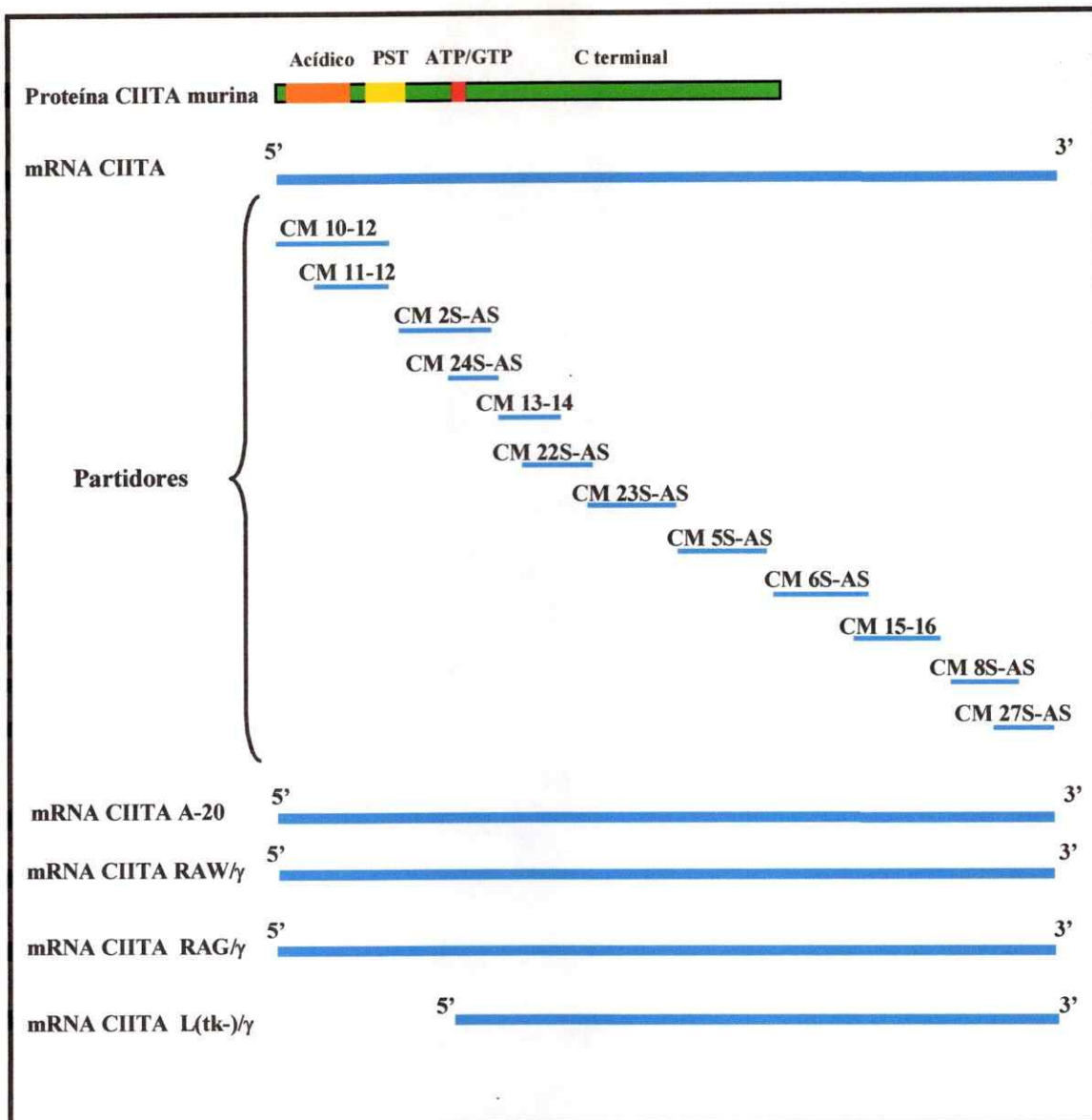
Con el fin de acotar aún más la región del mRNA de CIITA transcrita en las células L(tk-), se realizaron nuevos experimentos de RT-PCR usando partidores localizados río arriba del partidor CM13S (nucleótido 1.406) (Fig. 13). Los resultados mostraron que sólo con los partidores CM24S-AS hay expresión inducible de un cDNA del tamaño esperado. Esto permitió limitar aproximadamente el sitio de inicio de la transcripción del mRNA de CIITA en las células L(tk-) en una región cercana al nucleótido 1.110. El resumen de estos resultados está graficado en la figura 14. En esta representación se muestra que las células A-20, RAW y RAG expresan un transcrito de CIITA de tamaño normal mientras que las células L(tk-) expresan un mRNA de CIITA inducible por IFN- $\gamma$  de aproximadamente 1,1 kb más pequeño que el normal.

Debido a que con algunas parejas de partidores la amplificación obtenida por RT-PCR en las células L(tk-) fué débil y con el fin de confirmar la expresión inducible por IFN- $\gamma$  de un mRNA de CIITA más pequeño, se realizó un RT-PCR Extendido, que permitió la amplificación de un cDNA de gran tamaño (3,1 kb) usando los partidores CM24 en dirección sentido y CM16 en dirección antisentido que incluyen la región codificante del mRNA de CIITA (Fig.15). Los resultados mostraron que al igual que las células RAW y RAG, las células L(tk-) fueron inducidas por IFN- $\gamma$  a expresar un cDNA de 3,1 kb de esta región 3' del mRNA de CIITA.

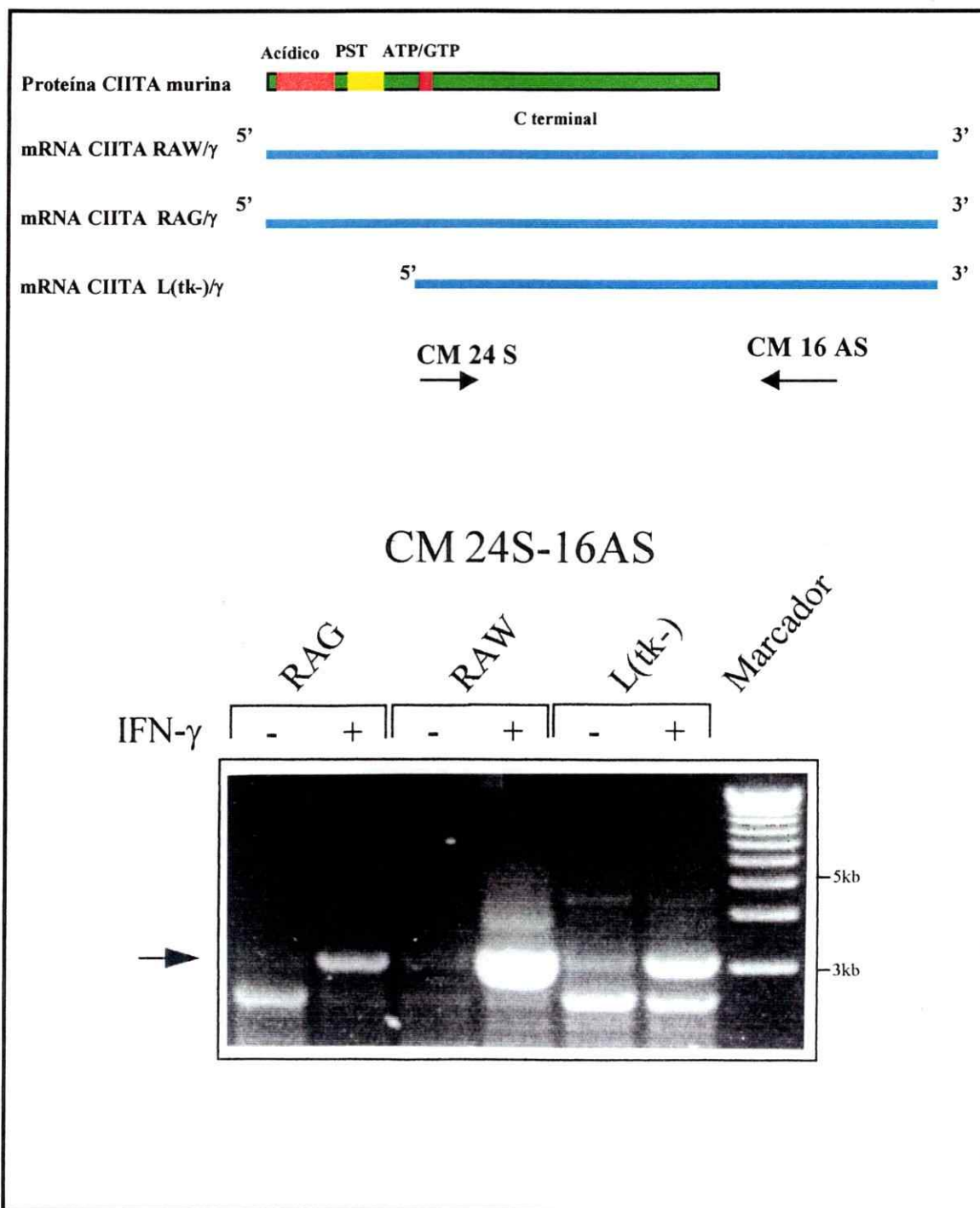


**Figura 13. Delimitación de la expresión del mRNA de CIITA en células L(tk-).** Análisis mediante RT-PCR del mRNA de CIITA en células RAG y L(tk-) cultivadas durante 6 horas en la presencia o ausencia de 100 U/ml de IFN- $\gamma$  murino. Se utilizaron los siguientes partidores: CM13-14 (493 pb), CM 24S-AS (441 pb), CM 15'-32 (208 pb) y CM 43-32 (422 pb). La ubicación de cada pareja de partidores dentro del mRNA de CIITA murino está representada en la parte superior de la figura.





**Figura 14. Esquema de la expresión del mRNA de CIITA.** En la parte inferior de la figura se representan los resultados obtenidos por RT-PCR. Las células A-20, RAW y RAG expresan un mRNA de CIITA del tamaño esperado, mientras que las células L(tk-) expresan un mRNA de CIITA más pequeño cuyo inicio transcripcional estaría en la región comprendida entre los partidores CM 2S y CM 24S. Las células L(tk-) expresarían un CIITA carente del dominio acídico y PST imprescindibles para la función transactivadora.



**Figura 15. Expresión de la región 3' del mRNA de CIITA.** Células RAG, RAW y L(tk-) cultivadas durante 6 horas en presencia o ausencia de 100 U/ml de IFN- $\gamma$  murino, se analizaron mediante RT-PCR Extendido utilizando los partidores CM 24S-CM 16AS (3.1 kb). El fragmento amplificado incluye la región codificante 3' del mRNA de CIITA.

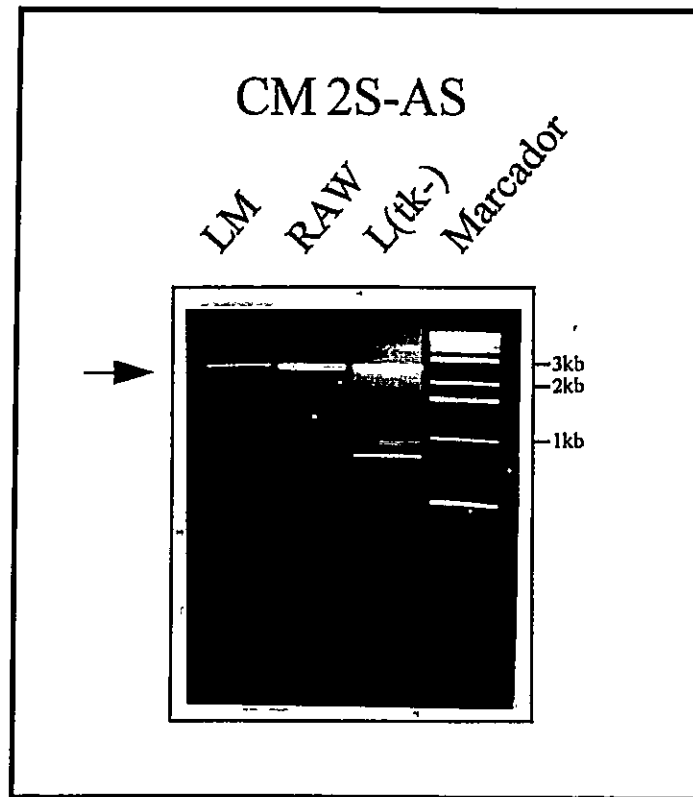
## SECUENCIACIÓN DE CIITA MURINO

Con el propósito de confirmar que todos los fragmentos de cDNA obtenidos por RT-PCR en las cuatro líneas celulares (A-20, RAW, L(tk-) y RAG) (Fig. 12) correspondían a CIITA, se cortó la banda del gel que contenía los cDNAs del tamaño esperado y se secuenció el cDNA purificado. Se secuenció el CIITA completo de todas las células controles mientras que en las células L(tk-) faltó secuenciar 93 pb localizadas en dos pequeñas regiones del cDNA de CIITA ubicadas entre los nucleótidos 1.957 y 2.000 (49 pb) y entre los nucleótidos 2.550 y 2.594 (44 pb). El análisis de las secuencias mostró que todos los fragmentos de cDNA amplificados correspondieron a la secuencia del cDNA de CIITA murino descrito en la literatura (Sims y col, 1997). Sin embargo, las distintas líneas celulares exhibieron mutaciones puntuales en algunas de las bases nucleotídicas. Sólo en el caso de las células L(tk-) algunos de éstos cambios de bases significaron un cambio en el aminoácido codificado. Estos cambios fueron: arginina por glicina (aminoácido 818), glicina por glutamato (aminoácido 851) y leucina por metionina (aminoácido 852). El resto de las mutaciones son cambios conservativos.

## LOCALIZACIÓN DE INTRONES DE CIITA

Con el fin de determinar en las células L(tk-) la distancia entre el inicio de la región transcrita del mRNA y el promotor IV de CIITA, fue necesario determinar la

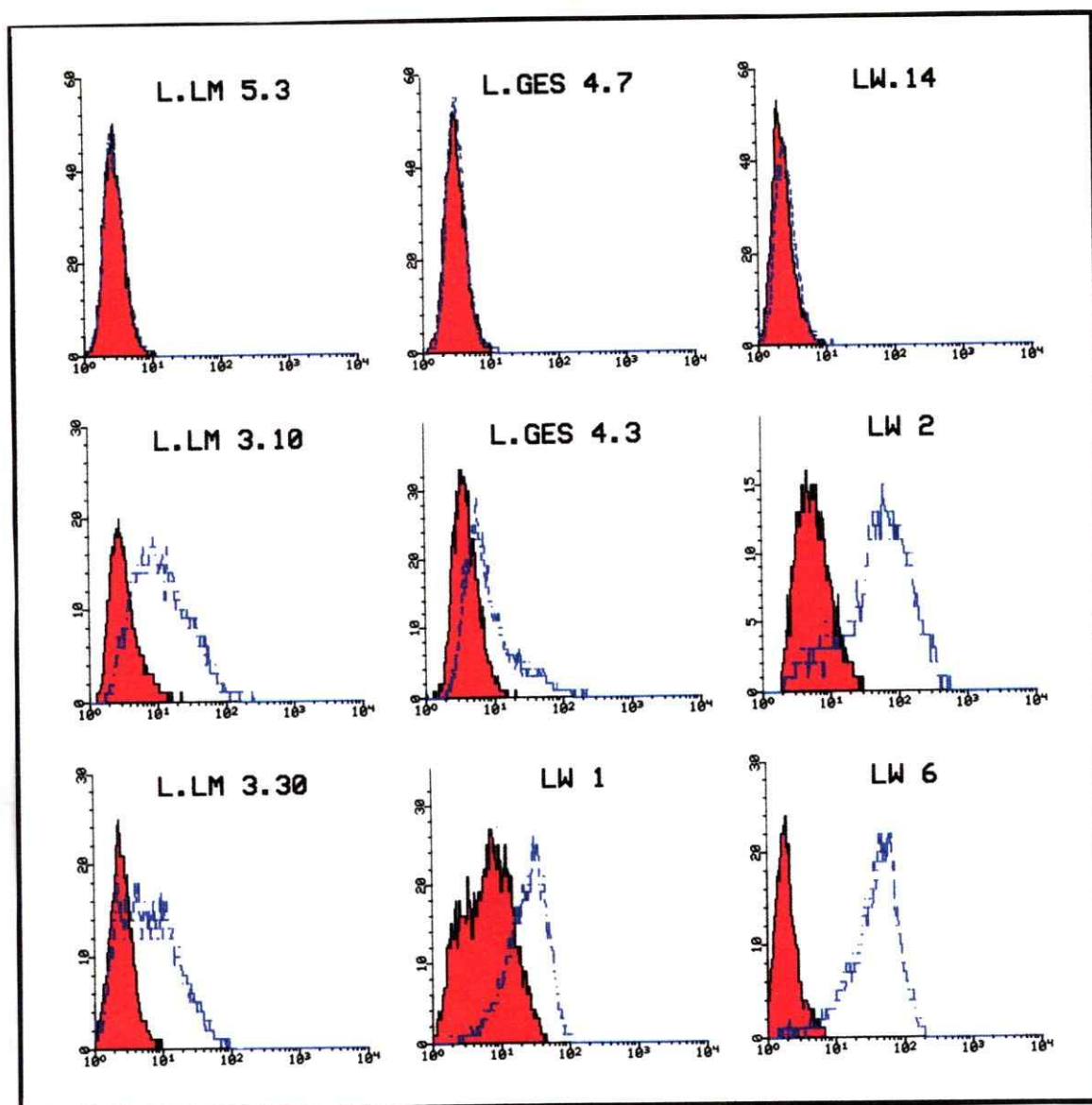
localización aproximada de los intrones del gen de CIITA. Para ello, se realizaron experimentos de PCR con DNA genómico de las líneas celulares LM, RAW, RAG y L(tk-) utilizando los mismos partidores usados en los experimentos de RT-PCR (Fig. 11). De esta manera, cuando el tamaño del fragmento de DNA obtenido por PCR genómico fue mayor que el tamaño del cDNA obtenido por RT-PCR, se infirió la presencia de un intrón dentro de la región amplificada. Los resultados de estos experimentos permitieron determinar que entre el sitio normal de inicio de la transcripción del mRNA de CIITA y el sitio de inicio encontrado en las células L(tk-) existen por lo menos tres intrones, algunos de ellos de gran tamaño. La distancia encontrada entre el promotor IV y la región transcrita del mRNA de CIITA en células L(tk-) es mayor a 18 kb. El intrón 3 se localizó al amplificar DNA genómico con los partidores CM 2S-AS, localizados en la región 5' del mRNA de CIITA, obteniendo un fragmento de DNA de 2,6 kb en lugar de un producto esperado de 0,6 kb, lo que indicó la presencia de un intrón de 2 kb (Fig. 16). Para comprobar que este fuera un producto específico de amplificación, se secuenciaron los extremos 5' y 3' de este fragmento, encontrando que ellos correspondían a la secuencia de CIITA murino. La ubicación del intrón 3 permitió determinar el sitio de inicio del exón 4 en el nucleótido 878 en la secuencia del cDNA cerca de la región de transcripción del mRNA de CIITA de las células L(tk-) (nucleótido 1.110).



**Figura 16. Determinación de un intrón cerca de la región transcrita del gen de CIITA en células L(tk-).** DNA genómico preparado de células LM, RAW y L(tk-) se amplificó mediante PCR empleando los partidores CM 2S-AS, obteniendo un fragmento de 2.6 kb (flecha).

### ¿ OCURRE UN SALTO DE EXÓN EN EL mRNA DE CIITA DE LAS CÉLULAS L(tk-) ?

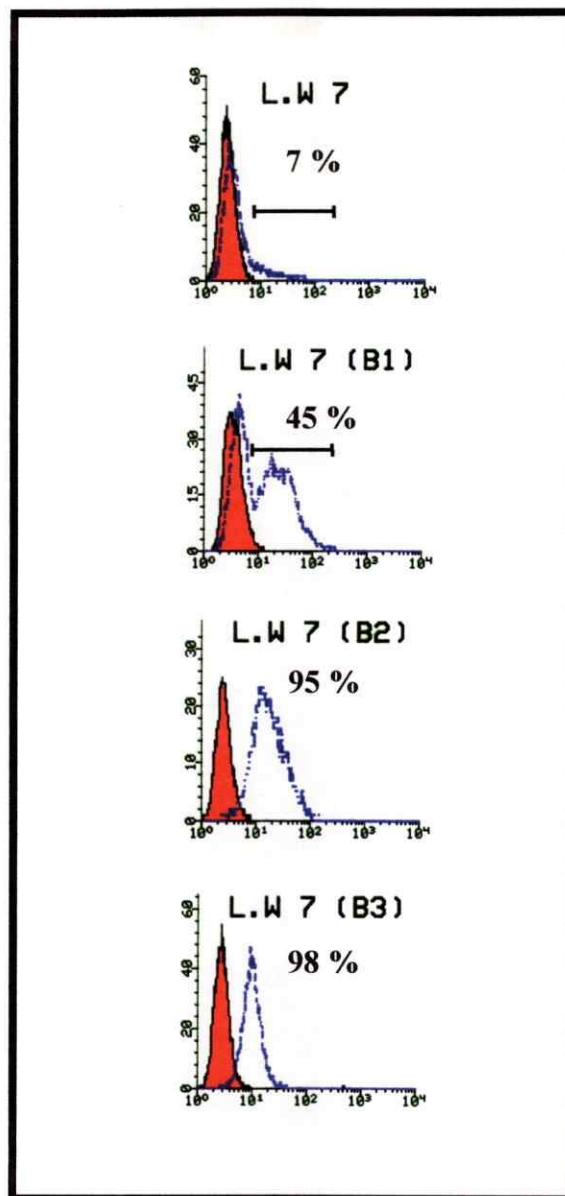
La expresión de un mRNA de CIITA más pequeño en células L(tk-) podría explicarse mediante la pérdida de uno o más de los exones que se encuentran entre el promotor inducible IV de CIITA y el exón 4 mediante un proceso de salto de exón (exón skipping). Esta posibilidad se analizó experimentalmente usando el método de RT-PCR Extendido y de partidores en dirección sentido localizados en los exones 1, 2 y 3 en



**Figura 6.** Inducción por IFN- $\gamma$  de la expresión de las moléculas MHC-II murinas en un panel de híbridos somáticos producidos entre células L(tk-) y diferentes líneas celulares humanas. Inmunofluorescencia indirecta utilizando el anticuerpo H.39.64.5, dirigido contra las moléculas MHC-II murinas. En rojo, los histogramas de fluorescencia de células control comparadas con células tratadas con 100 U/ml de IFN- $\gamma$  por 72 h (curvas blancas).

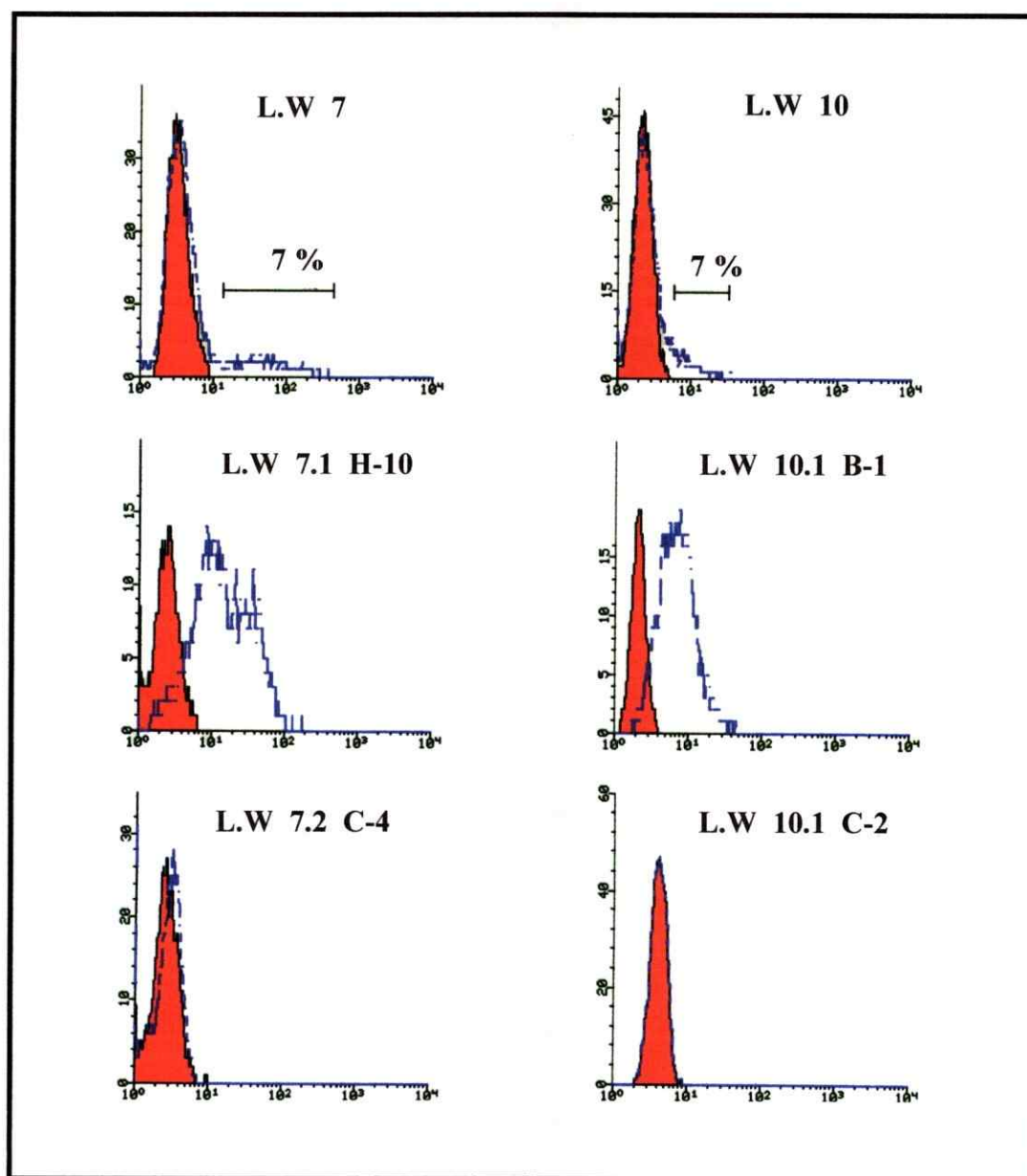
MHC-II en respuesta a IFN- $\gamma$ . Con el propósito de obtener líneas celulares que respondan en forma homogénea a IFN- $\gamma$  para la inducción de las moléculas MHC-II, los híbridos celulares L.W 7 y L.W 10 fueron sometidos a varios ciclos de selección

utilizando partículas magnéticas conjugadas con un anticuerpo secundario dirigido contra inmunoglobulinas de ratón. Así, a partir de una población de células L.W 7 donde sólo el 7 % de la población total expresa MHC-II después del tratamiento con IFN- $\gamma$ , al cabo de tres ciclos de selección un 98 % de las células expresaron MHC-II (Fig. 7). Además, estas células, así mismo como las células L.W 10, fueron clonadas por dilución límite de manera de obtener líneas celulares provenientes de una célula única. Los cultivos celulares de varios subclones se amplificaron y se analizaron por inmunofluorescencia para la expresión de MHC-II después del tratamiento con IFN- $\gamma$ . Se seleccionaron tanto clones positivos (L.W 7.1 H-10 y L.W 10.1 B1) como negativos (L.W 7.2 C-4 y L.W 10.1 C-2) para la expresión de estas moléculas (Fig. 8). Con la inclusión de estos clones, el panel de híbridos somáticos quedó constituido por 8 líneas celulares positivas y cinco líneas celulares negativas para la expresión de MHC-II inducida por IFN- $\gamma$ . Estos resultados muestran que el defecto de las células L(tk-) puede ser complementado en *trans* en híbridos somáticos producidos con diferentes líneas celulares humanas. Una observación interesante de señalar es que en todos los híbridos en los cuales se induce la expresión MHC-II por IFN- $\gamma$ , la expresión de estas moléculas es débil, es decir, presentan bajos niveles de expresión de MHC-II (Figs. 6, 7 y 8). Estos resultados se contraponen con resultados obtenidos anteriormente en híbridos somáticos preparados con la línea celular murina RAG, en los cuales se obtiene un alto nivel de expresión de las moléculas MHC-II (comparar la Fig. 4C con la Fig. 4D). Este punto será tratado más tarde en la Discusión.



**Figura 7. Selección magnética de células.** Las células LW.7 presentan un 7% de células que expresan heterogéneamente las moléculas MHC-II (panel superior) cuando son cultivadas con 100 U/ml de IFN- $\gamma$  murino (curva blanca) durante 72 horas. Las células fueron marcadas con el anticuerpo H39.64.5, que reconoce moléculas MHC-II murinos y seleccionadas magnéticamente. Las células seleccionadas (LW.7 B1) se analizaron por inmunofluorescencia indirecta y se sometieron a dos nuevos ciclos de selección (B2 y B3). En los histogramas se representa intensidad relativa de fluorescencia media (eje de las abscisas) versus número relativo de células (eje de las ordenadas).





**Figura 8. Selección por dilución límite.** Las células L.W. 7 y L.W.10 tratadas con IFN- $\gamma$  expresan las moléculas MHC-II en aproximadamente un 7 % de la población total (panel superior). El clonamiento de estas células por dilución límite permitió seleccionar nuevos híbridos completamente respondedores a IFN- $\gamma$  (L.W 7 H-10 y L.W 10 B-1), así como híbridos no respondedores a IFN- $\gamma$  (L.W 7 C-4 y L.W 10 C-2).

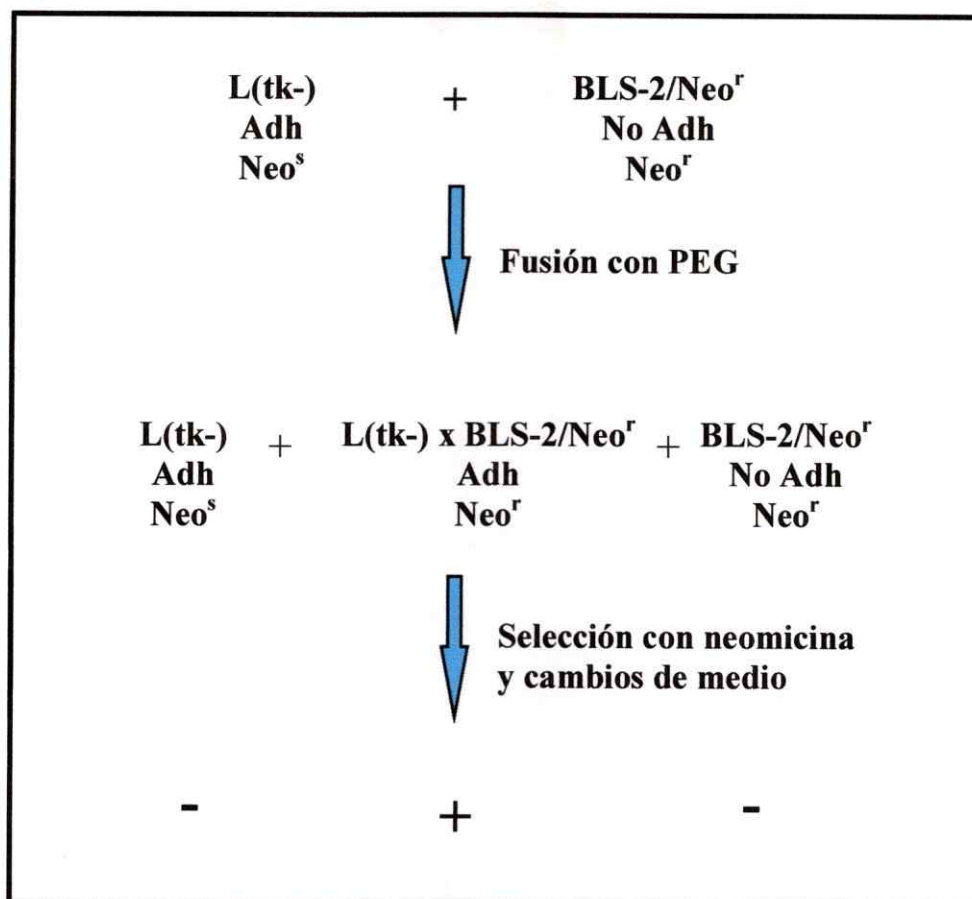
## COMPLEMENTACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS MOLÉCULAS MHC-II EN LAS CÉLULAS L(tk-) POR LÍNEAS CELULARES BLS

Una herramienta importante en la dilucidación de los mecanismos que regulan las moléculas MHC-II ha sido la utilización de líneas celulares obtenidas de pacientes con el Síndrome de Linfocitos Desnudos o BLS. Esto ha permitido caracterizar varios factores de transcripción responsables de la regulación transcripcional de las moléculas MHC-II. Actualmente, han sido definidos 5 grupos de complementación BLS, representando cada uno de ellos un defecto específico en factores o transactivadores transcripcionales.

Por lo tanto, como primera aproximación decidimos determinar si el defecto de las células L(tk-) correspondía a algunos de los factores descritos para los distintos grupos de complementación BLS. Para esto, se realizaron experimentos de complementación génica mediante fusión celular. Nuestro objetivo fue obtener híbridos estables entre la línea celular murina L(tk-) y líneas celulares humanas provenientes de los diferentes grupos BLS. Se ha demostrado que en los híbridos somáticos interespecie murino x humano, el híbrido mantiene las características fenotípicas de las células murinas y segrega los cromosomas humanos. Por lo tanto, en este caso los híbridos resultantes deberían corresponder a células adherentes al igual que las células L(tk-), a diferencia de las líneas BLS que crecen en suspensión.

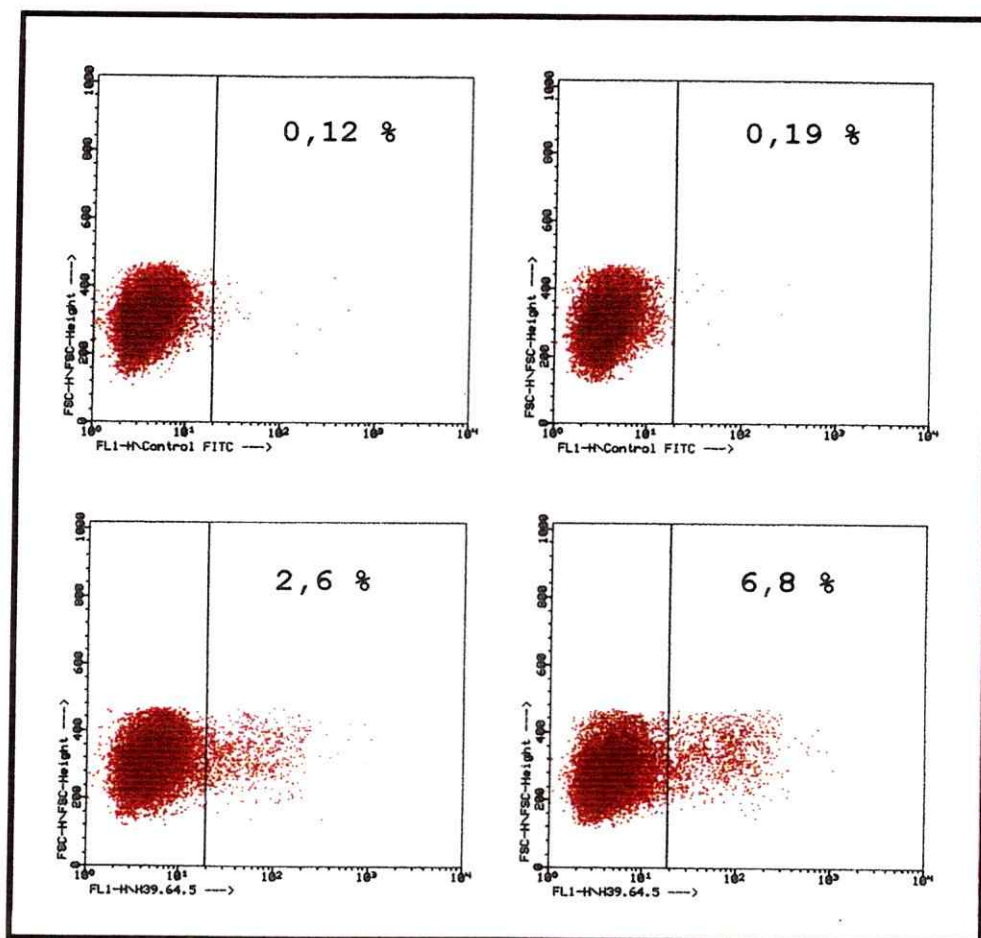
Generalmente, la eficiencia de fusión entre células es muy baja y se ha descrito que solamente entre un 5 y un 10 % de la población total de células se fusionan (Baron y

Maniatis, 1986; Kerkis y Zhdanova, 1991). Por lo tanto, la obtención de líneas celulares estables necesita de la utilización de un método de selección de los híbridos. Para esto, se diseñó un sistema de selección de híbridos estables que consistió en fusionar las células L(tk-) con las células BLS resistentes al antibiótico neomicina (BLS-2/Neo<sup>r</sup>), obtenidas mediante la transfección del gen de resistencia a neomicina. Según este protocolo, solo los híbridos somáticos tendrían las características de células adherentes y resistentes a neomicina, permitiendo su selección por estas dos características (Fig. 9). La primera fusión que se realizó fue con la línea celular BLS-2, cuyo defecto ha sido atribuido a una mutación en el gen que codifica para la proteína transactivadora CIITA. Los híbridos somáticos estables se obtuvieron después de un mes de realizada la fusión, al cabo del cual, todas las células que permanecían en el cultivo presentaban las características de células fibroblastoides adherentes y resistentes a neomicina. Los híbridos somáticos se analizaron por inmunofluorescencia indirecta utilizando anticuerpos anti-MHC-II murino del haplotipo H-2<sup>k</sup>, después del tratamiento por 72 horas con 100 U/ml de IFN- $\gamma$  murino. Los resultados obtenidos son representados como gráficos de puntos, donde el eje de las abscisas corresponde a tamaño celular (FSC) y el eje de las ordenadas a intensidad relativa de fluorescencia (Fig. 10). Se observa que solo un 2,6 % de la población total expresa constitutivamente MHC-II, mientras que el tratamiento con IFN- $\gamma$  induce la expresión MHC-II en un 6,8 % del total de las células. La complementación de L(tk-) por las células BLS-2 las cuales presentan una mutación en el gen de CIITA, sugiere que las células L(tk-) expresarían normalmente este transactivador.



**Figura 9. Estrategia de selección de híbridos celulares obtenidos entre las células L(tk-) y BLS-2/Neo<sup>r</sup>.** Las células L(tk-) son células adherentes y sensibles a neomicina mientras que las células BLS-2/Neo son células que crecen en suspensión y resistentes a dicho antibiótico. Después de la fusión celular con polietilenglicol (PEG), la adición de neomicina al medio de cultivo y cambios sucesivos de medio de cultivo permite la selección de los híbridos (+) y la eliminación de las células parentales (-).

Sin embargo, esta interpretación puede ser cuestionada por los resultados de Chang y col. (1994), quienes demostraron que la transfección de células L(tk-) con un plásmido que expresa el cDNA de CIITA humano dirigido por un promotor constitutivo fuerte, es suficiente para recuperar la expresión constitutiva de MHC-II. Estos resultados indican que el defecto de la células L(tk-) puede corresponder a CIITA



**Figura 10. Expresión constitutiva e inducible por IFN- $\gamma$  de las moléculas MHC-II murinas en híbridos celulares L.BLS-2.** Las células se cultivaron durante 72 horas en ausencia (paneles de la izquierda) o en presencia de 100 U/ml de IFN- $\gamma$  murino (paneles de la derecha). Luego, las células se incubaron con el anticuerpo H39.64.5, dirigido contra moléculas MHC-II murinas, y con un segundo anticuerpo conjugado con FITC (paneles inferiores) o solamente con el segundo anticuerpo (paneles superiores). En los gráficos de punto se representa intensidad de fluorescencia media (eje de las abscisas) versus tamaño celular (eje de las ordenadas).

mismo o bien a algún factor ubicado antes que CIITA en la cascada de transducción de señales inducida por IFN- $\gamma$ . Estos antecedentes y la débil expresión de las moléculas MHC-II obtenida en los híbridos L.BLS-2, nos impulsaron a desarrollar una estrategia experimental diferente con el fin de verificar las conclusiones alcanzadas previamente.

## **CORRELACIÓN ENTRE COMPLEMENTACIÓN GÉNICA Y LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN RFX-5, RFX-AP Y CIITA EN EL PANEL DE HÍBRIDOS SOMÁTICOS.**

Con el objetivo de determinar si existía una correlación entre la complementación obtenida en híbridos somáticos y la presencia o ausencia de los factores de transcripción mutados en células de los distintos grupos BLS, se preparó DNA genómico de todos los híbridos que componen el panel descrito anteriormente y se diseñaron partidores que amplificaran específicamente los genes humanos de los factores RFX-5, RFX-AP y CIITA. Ya que el gen de CIITA humano ha sido localizado en el cromosoma 16, además se incluyeron en el análisis dos genes marcadores del cromosoma 16 humano, que no tienen participación alguna en la regulación de la expresión de las moléculas MHC-II. Estos genes son: Protamina 1 (PRM1), ubicado en el brazo corto del cromosoma 16 (16p13.13) cercano al gen de CIITA y Adenosina Fosforibosil Transferasa (APRT) localizado en el brazo largo del cromosoma 16 (16q24.2). En la tabla 2 se muestra que existe una correlación positiva entre la presencia de los genes CIITA humano y PRM.1 y la inducción de moléculas MHC-II por IFN- $\gamma$ . No se obtuvo ninguna correlación con la presencia o ausencia de los genes RFX-5 o RFX-AP.

Estos resultados sugieren que CIITA o algún otro gen localizado en el cromosoma 16, cercano a CIITA y PRM1, sería responsable del defecto de las células L(tk-). En base a estos resultados, se decidió estudiar la expresión del mRNA de CIITA en las células L(tk-).



**Tabla 2. Correlación entre la inducción de las moléculas MHC-II murinas por IFN- $\gamma$  y la presencia de los genes humanos CIITA, RFX-5, RFX-AP, Protamina 1 (PRM.1) y adenosina fosforibosil transferasa (APRT) en híbridos celulares.**

HÍBRIDO CELULAR	INDUCCION MHC-II	CIITA <sub>h</sub>	PRM1 <sub>h</sub>	APRT <sub>h</sub>	RFX-5 <sub>h</sub>	RFX-AP <sub>h</sub>
L.LM 3.30	+	+	+	+	+	+
L.LM 3.10	+	+	+	-	+	+
L.GES 4.3	+	+	+	+	-	+
LW. 2	+	+	+	+	+	+
L.W 7 (B3)	+	+	+	-	-	-
LW.6	+	+	+	+	+	+
LW 10.1 B1	+	+	+	-	-	-
LW.1	+	+	+	+	+	+
L.LM 5.3	-	-	-	-	-	-
L.GES 4.7	-	-	-	-	+	+
LW.14	-	-	-	-	+	-
LW 10.1 C2	-	-	-	-	-	-
LW 7.2 C-4	-	-	-	-	-	+

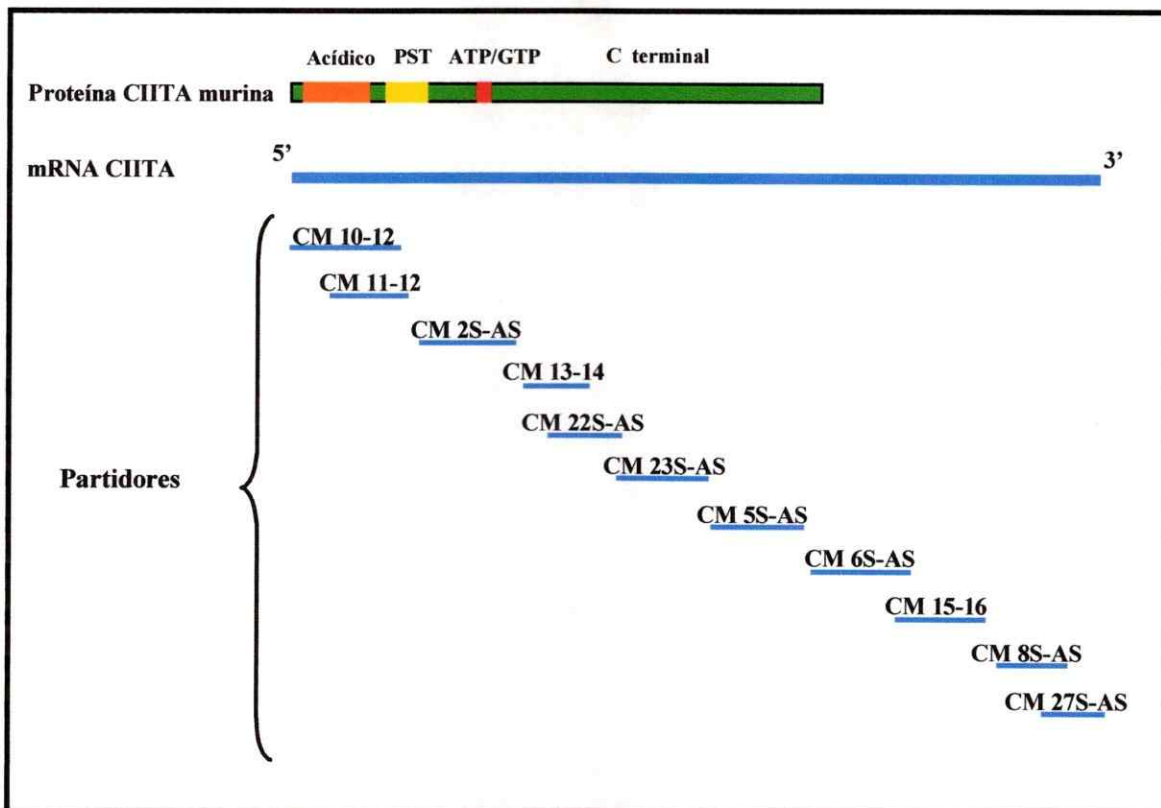
### EXPRESIÓN DEL mRNA DE CIITA EN LAS CÉLULAS L(tk-)

La expresión del mRNA de CIITA en las células L(tk-) se analizó por estudios de RT-PCR. Para ello, células L(tk-) se trataron durante seis horas con IFN- $\gamma$  murino y posteriormente se obtuvo su RNA total. El cDNA se sintetizó usando la enzima transcriptasa reversa y posteriormente se amplificó por PCR. En estas dos reacciones se utilizaron una serie de partidores en dirección sentido y antisentido que amplificaron fragmentos de 400 a 700 pares de bases pero que en su totalidad cubrieron la secuencia

completa del cDNA de CIITA murino (Fig. 11 y Anexo). Como control de expresión se utilizó la línea celular B murina A-20 que expresa en forma constitutiva moléculas MHC-II murinas y la línea celular macrófago-monocítica murina RAW 264.7 que expresa moléculas MHC-II en forma inducible por IFN- $\gamma$ . En estos experimentos se incluyeron las células RAG que han sido el objeto de numerosos estudios en nuestro laboratorio. Las células RAG provienen de un adenocarcinoma renal de ratón y al igual que las células L(tk-) son deficientes en la expresión inducible por IFN- $\gamma$  de moléculas MHC-II, aunque responden normalmente a IFN- $\gamma$  para la expresión de moléculas MHC-I (Bono y col., 1991b). Híbridos somáticos producidos entre células RAG y líneas celulares humanas permitieron demostrar que la mutación de células RAG era complementada siempre y cuando estuviese presente el cromosoma 16 humano. Luego, estudios de complementación génica realizados con células de todos los grupos BLS, mostraron que el factor defectuoso de las células RAG no corresponde a ninguno de los factores mutados descritos hasta ahora, es decir, representa un nuevo grupo de complementación génica (Lennon y col., 1996) (Tabla 2). Ya que RAG es complementada por un gen presente en el cromosoma 16 humano, y que CIITA se encuentra también en este cromosoma, decidimos incluir en este análisis a las células RAG de manera de confirmar la expresión normal de CIITA en estas células.

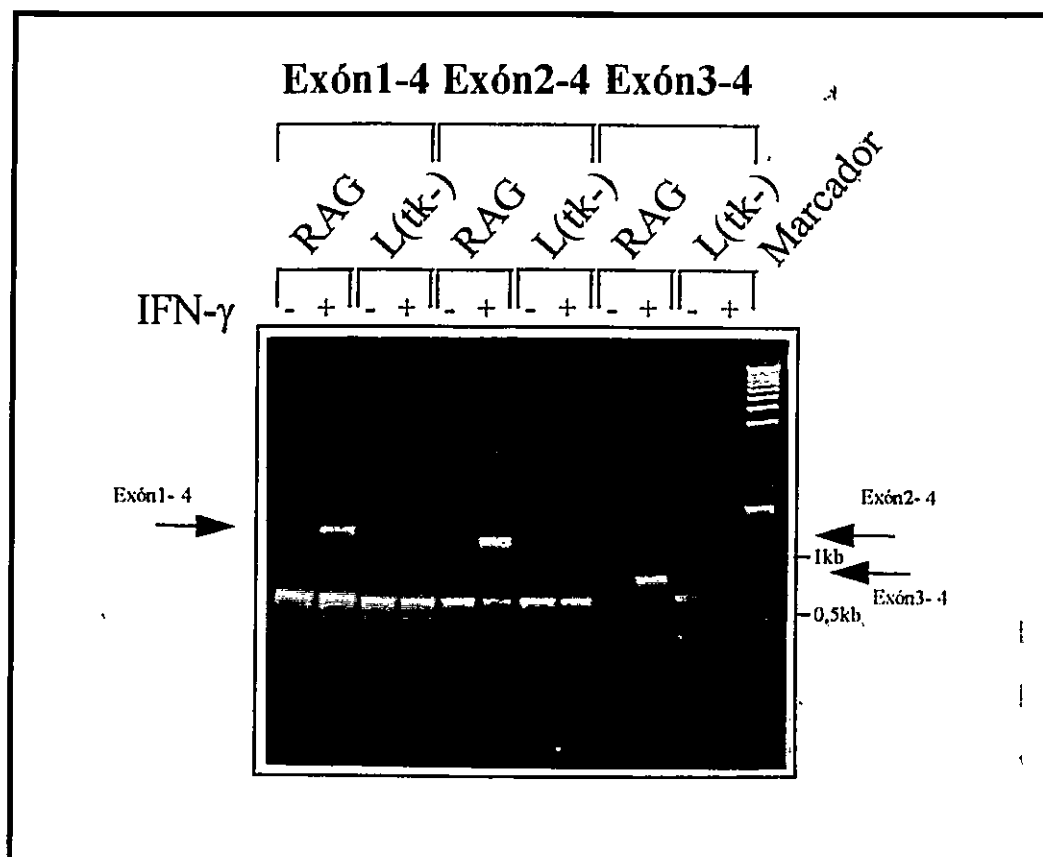
Los productos de amplificación de la reacción de RT-PCR se corrieron en geles de agarosa al 1,4 % y los resultados obtenidos se muestran en la figura 12. Se observa que con todos los partidores utilizados, las células A-20 expresaron en forma constitutiva un fragmento de DNA del tamaño esperado y que las células RAW y RAG





**Figura 11. Esquema del mRNA de CIITA murino, principales dominios de su proteína y la localización de partidores utilizados en estudios de RT-PCR.**

expresaron los mismos fragmentos pero en forma inducible por IFN- $\gamma$ . En cambio, en las células L(tk-) no se detectó amplificación del cDNA de CIITA con tres de los pares de partidores (CM10-12, CM11-12 y CM 2S-AS) (Fig. 12 A). Sin embargo, con todos los partidores restantes se encontró expresión inducible por IFN- $\gamma$  del mRNA de CIITA (Fig. 12 B, C y D). La expresión constitutiva de  $\beta$ -actina obtenida con todas las células, indica que en todos los experimentos se utilizó la misma cantidad de RNA (Fig.12 D), descartando la posibilidad de que la inducción en la expresión del mRNA de CIITA observada después del tratamiento con IFN- $\gamma$ , sea producto de una diferencia en la cantidad del RNA utilizado. Además, la mayoría de las parejas de partidores utilizados



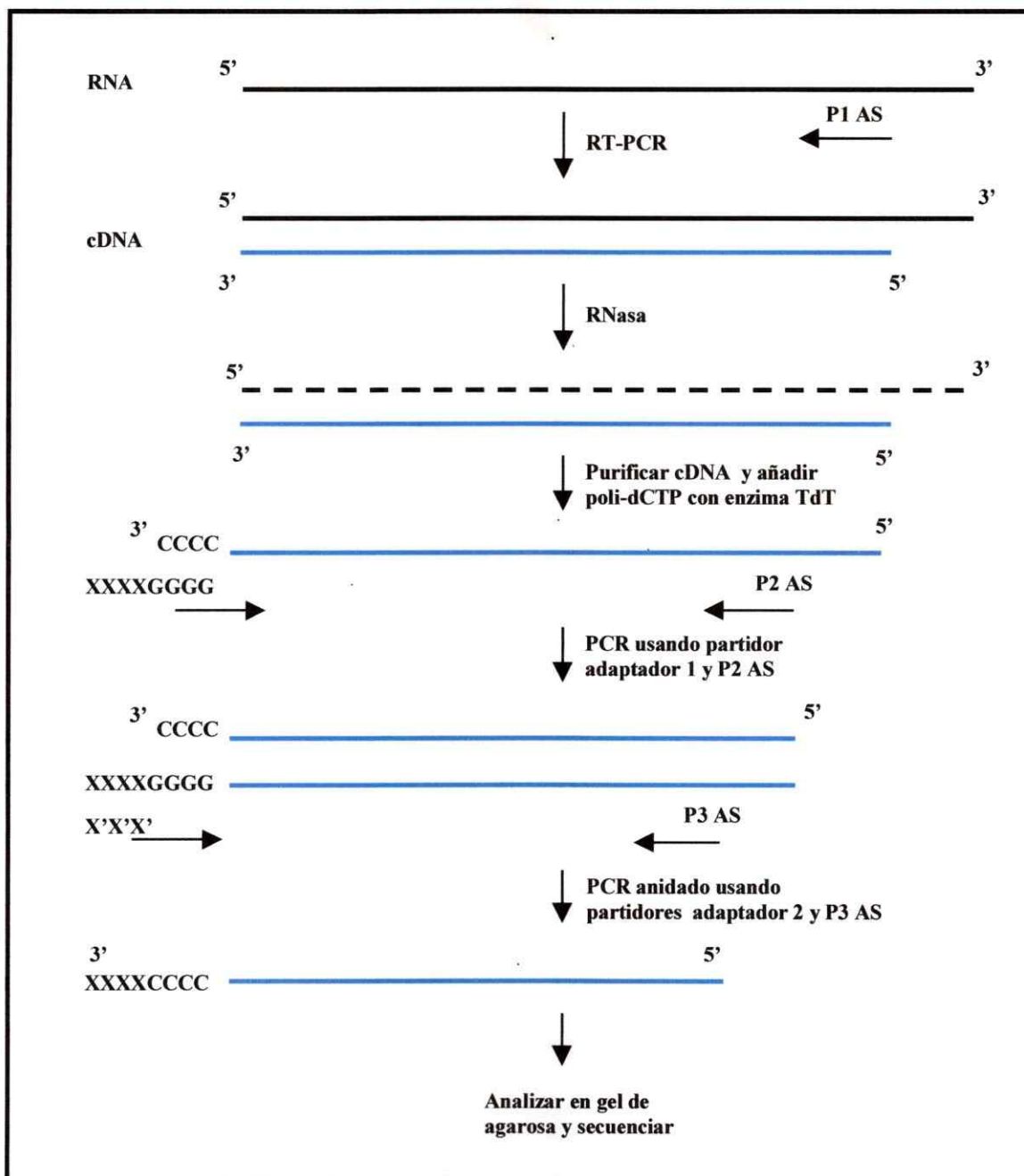
**Figura 17. Expresión de la región 5' del mRNA de CITA comprendida entre los exones 1 y 4.** Células RAG y L(tk-) cultivadas durante 6 horas en medio con y sin 100 U/ml de IFN- $\gamma$  murino, se analizaron mediante RT-PCR Extendido. Se utilizaron partidores en dirección sentido y antisentido que amplificaron fragmentos de cDNA entre los exones 1 y 4 (CM 37S-CM 25AS, 1.344 pb), 2 y 4 (CM 11S-CM 25AS, 1.240 pb) y 3 y 4 (CM 42S-CM 25AS, 834 pb).

conjunto con un partidor en dirección antisentido ubicado en el exón 4. Si en las células L(tk-) ha ocurrido un evento de salto de exón, entonces al amplificar por RT-PCR entre dos exones alejados, como por ejemplo entre los exones 1 y 4, se esperaría que las células silvestres expresaran un fragmento de cDNA del tamaño equivalente a la suma de los exones 1, 2, 3 y 4, mientras que en las células L(tk-) se obtendría un fragmento de menor tamaño equivalente a la diferencia entre el tamaño del fragmento de cDNA silvestre y el tamaño del exón perdido. Como control de estos experimentos se utilizó el

cDNA de la línea celular murina RAW. Los resultados muestran que las células RAW y L(tk-) expresan en forma inducible por IFN- $\gamma$  un fragmento de cDNA del tamaño esperado con todos los partidores utilizados (Fig. 17), a pesar de que la expresión en las células L(tk-) fue débil y variable entre diferentes experimentos. Sin embargo, tal como se aprecia en la figura 17 el resultado más relevante es que no se observa expresión inducible de fragmentos de cDNA de menor tamaño en ninguna de las dos líneas celulares, lo cual descarta la posibilidad de que en células L(tk-) haya ocurrido un evento de salto de exón.

### **¿ ES EL INICIO DE LA TRANSCRIPCIÓN DEL mRNA DE CIITA EN LAS CÉLULAS L(tk-) DISTINTO DEL DESCRITO PARA OTRAS CÉLULAS ?**

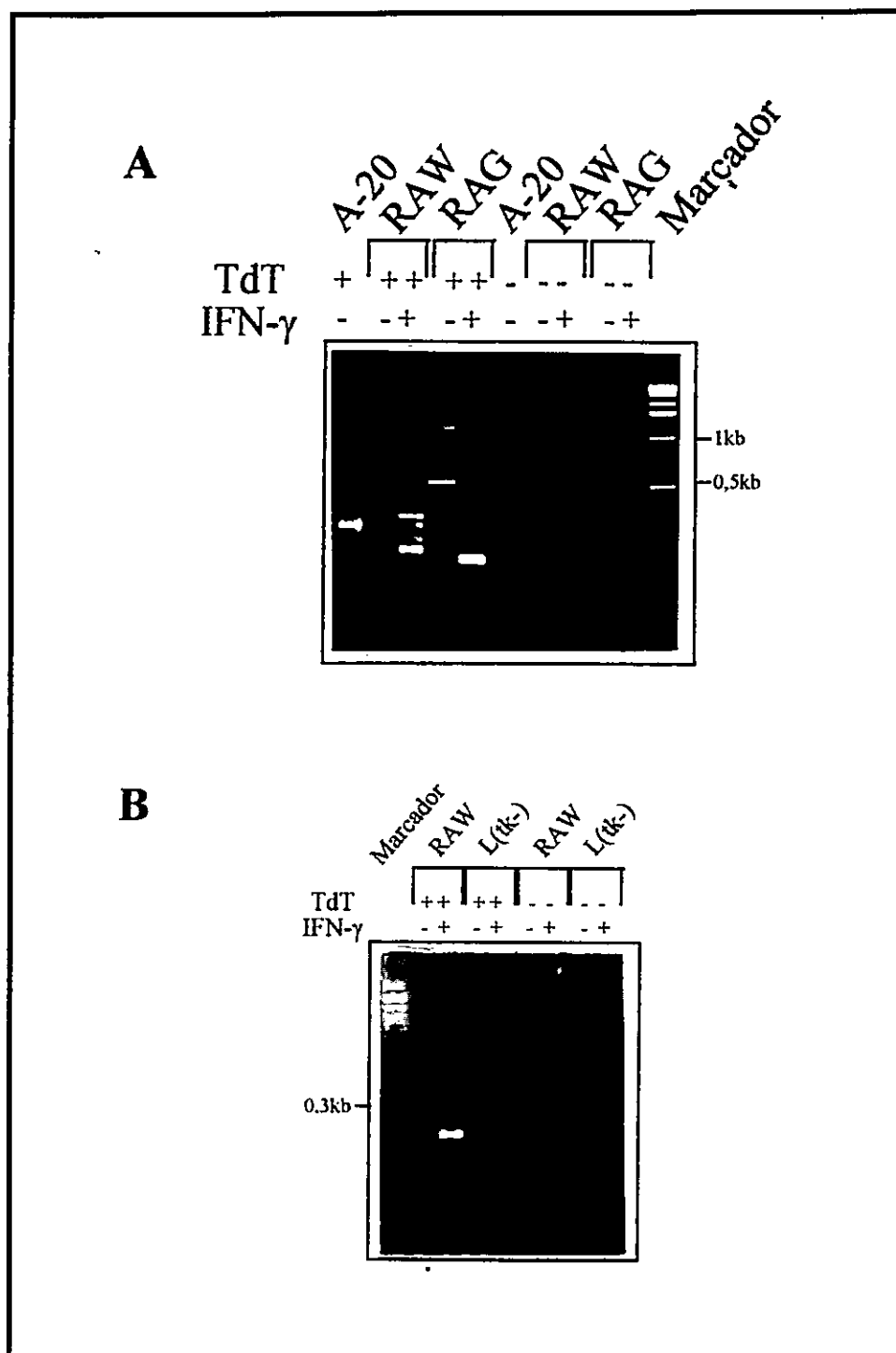
Los experimentos de RT-PCR mostraron que el mRNA de CIITA de las células L(tk-) es aproximadamente 1,1 kb más pequeño y que la región transcrita está lejos del inicio de transcripción normal y cercano al inicio del exón 4. Con el objetivo de determinar más precisamente el sitio de inicio de la transcripción del mRNA de CIITA se realizaron experimentos de 5' RACE-PCR (5' Rapid Amplification cDNA Ends - Polymerase Chain Reaction). Este tipo de experimento permite la amplificación y determinación del sitio de inicio de la transcripción del mRNA de un determinado gen. El procedimiento es explicado en la figura 18. Los resultados del PCR anidado usando los partidores adaptador 2 y CM 21AS (nucleótidos 175-197) con las células A-20,



**Figura 18. Procedimiento RACE-PCR.** La técnica de RACE-PCR utilizada para determinar el extremo 5' ó 3' de un mRNA, consiste en amplificar RNA total mediante RT-PCR utilizando un partidor en dirección antisentido (P1 AS), cercano al sitio que se presume es el inicio de la transcripción. Después de degradar el RNA con RNasa, el cDNA es purificado a través de columnas y en su extremo 5' desconocido se le adiciona enzimáticamente (enzima TdT) un tallo homopolimérico poli-dCTP. Posteriormente, el cDNA-dCTP es amplificado mediante PCR utilizando un partidor adaptador 1 en dirección sentido (XXXXGGGG) y un segundo partidor en dirección antisentido (P2 AS) localizado río arriba con respecto al partidor P1 AS. Finalmente, mediante un PCR anidado el cDNA obtenido es reamplificado empleando un segundo partidor adaptador en dirección sentido (X'X'X'X') y un tercer partidor en dirección antisentido (P3 AS) ubicado río arriba con respecto al partidor P2 AS. Los productos de amplificación son analizados en un gel de agarosa y secuenciados. Un experimento realizado en paralelo sin la enzima TdT es usado como control de la especificidad de los productos amplificados.

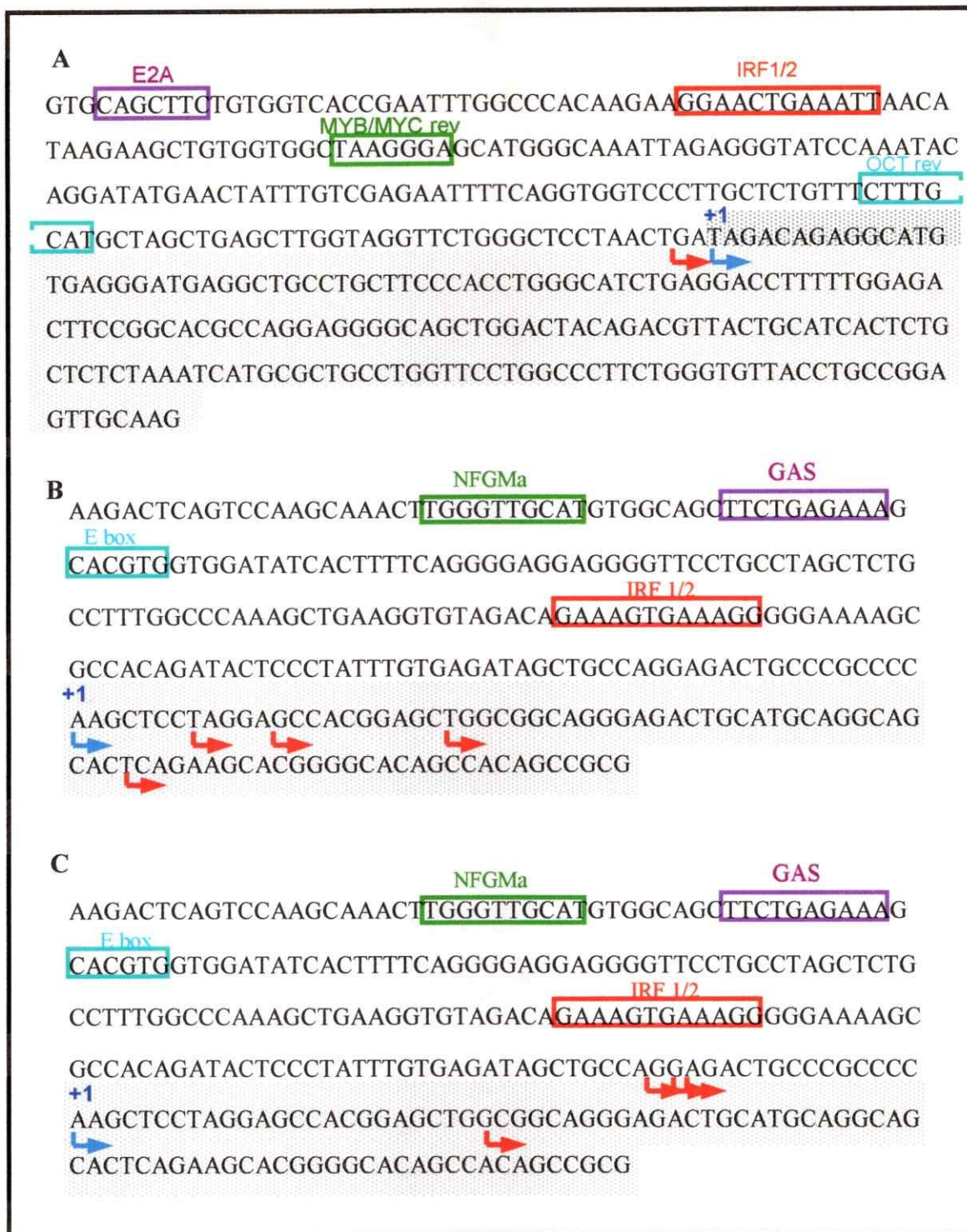
RAW y RAG se muestran en la figura 19A. Se observa, que las células A-20 expresan constitutivamente un fragmento único de cDNA, las células RAW expresan varios fragmentos de cDNA inducidos por IFN- $\gamma$  y las células RAG expresan un único fragmento de cDNA inducido por IFN- $\gamma$ . Cada uno de estos fragmentos corresponde a productos específicos de amplificación, ya que no se detectó ningún fragmento de tamaño similar en los controles realizados sin la enzima TdT. Los resultados obtenidos con las células L(tk-) se muestran en la figura 19B. En este experimento, se utilizaron como control positivo las células RAW, las cuales expresaron un único fragmento inducible por IFN- $\gamma$ , que coincide en tamaño con el fragmento de mayor intensidad obtenido con estas mismas células en la figura 19A. No se detectó amplificación de ningún fragmento de cDNA con las células L(tk-). Estos resultados son representativos de dos experimentos independientes.

Posteriormente, en el caso de las células controles el fragmento de DNA amplificado se purificó desde la banda del gel y se secuenció. Los análisis de secuencia mostraron que el inicio de la transcripción del mRNA de CIITA en las células A-20 corresponde al inicio de la transcripción descrito para células que expresan constitutivamente CIITA y que el exón 1 corresponde al expresado cuando la transcripción de CIITA es dirigida por el promotor III (Muhlethaler-Mottet y col, 1997) (Fig. 20 A). Los sitios de inicio de la transcripción encontrados en células A-20 en dos experimentos independientes (flechas rojas) coinciden con los sitios descritos en la literatura (flechas azules). En las células RAW y RAG se encontró que el sitio de inicio de la transcripción corresponde al descrito para células que expresan CIITA en forma



**Figura 19.** Amplificación del extremo 5' del mRNA de CIITA. A partir del RNA total de células A-20, RAW, RAG y L(tk-) cultivadas en medio sin y con 100 U/ml de IFN- $\gamma$  murino durante 6 horas, realicé experimentos de RACE-PCR con y sin la enzima TdT. El cDNA de CIITA se obtuvo con el partidor CM 12AS. La amplificación del cDNA mediante PCR, se realizó con los partidores adaptador 1 y CM 20AS. Para realizar el PCR anidado se utilizaron los partidores adaptador 2 y CM 21AS. Se muestran los productos finales de amplificación obtenidos con las células A-20, RAW, RAG (A) y L(tk-) (B).





**Figura 20. Secuencias de los productos de amplificación obtenidos mediante RACE-PCR.**

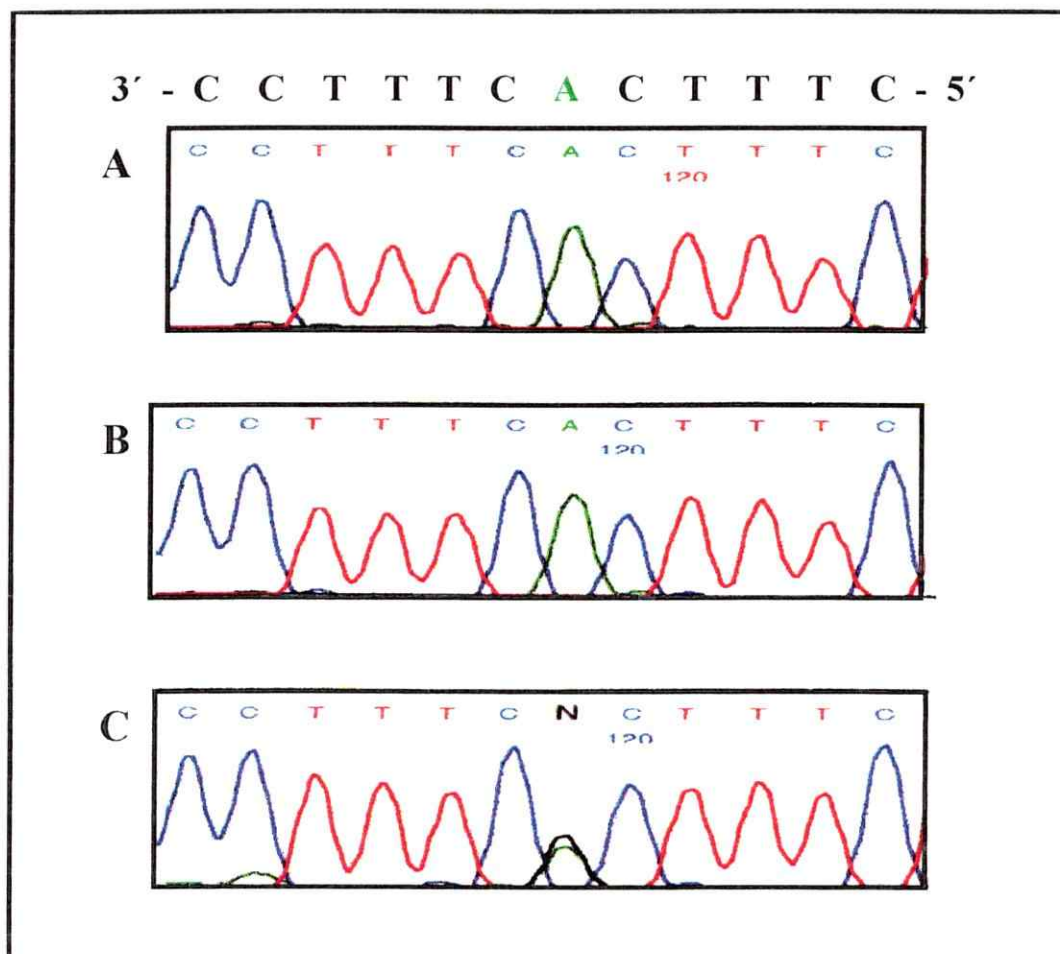
Se muestran las secuencias de los productos de RACE-PCR obtenidos en las células A-20 (A), RAG (B) y RAW (C). La región promotora es graficada con fondo de color blanco y las secuencias de consenso de unión a diversos factores de transcripción es destacada con rectángulos de color. La secuencia correspondiente al exón 1 es representada con fondo punteado. El sitio de inicio de la transcripción determinado por RACE-PCR para las células A-20 (A), RAG (B) y RAW (C) es representado con una flecha roja. El sitio de inicio de la transcripción descrito en la literatura para otros tipos celulares es señalado con una flecha azul.

inducible por IFN- $\gamma$  y que la secuencia del exón 1 en estas células corresponde al expresado por la activación del promotor IV de CIITA (Fig. 20 B y C). Los sitios de inicio de la transcripción encontrados en las células RAW y RAG en dos experimentos independientes (flechas rojas) están cercanos a los sitios descritos para otras células inducibles (flechas azules) (Muhlethaler-Mottet y col, 1997). El análisis de las secuencias demostró que los experimentos de RACE-PCR permitieron determinar inequívocamente el sitio de inicio de la transcripción del mRNA de CIITA en las células A-20, RAW y RAG los cuales corresponden con lo descrito en la literatura para otras células. Sin embargo, no fue posible detectar ningún producto de amplificación con las células L(tk-), lo cual sugiere y confirma los resultados de RT-PCR en el sentido de que el mRNA de CIITA en estas células no es transcrito desde su punto de inicio normal.

### **ANÁLISIS DEL PROMOTOR IV DE CIITA EN LAS CÉLULAS L(tk-)**

Con el fin de determinar si en la secuencia del promotor IV de CIITA de las células L(tk-) existía algún cambio que pudiera explicar que el mRNA de CIITA no fuese transcrito desde el sitio de iniciación normalmente descrito, se secuenció el promotor IV. Como control de estos experimentos se utilizaron las células RAW y RAG. Para ello, se amplificó mediante PCR el promotor IV de CIITA utilizando los partidores P1 S - P1 AS (417 pb), luego el DNA se purificó desde la banda del gel y se secuenció en dirección sentido y antisentido. El análisis de las secuencias mostró que la





**Figura 21. Secuencias de unión al factor transcripcional IRF-1 del promotor IV de CIITA.** Se muestra la secuencia de unión al factor IRF-1 del promotor IV de CIITA de las células RAW (A), RAG (B) y L(tk-) (C). Se muestra un cambio de nucleótido adenina (curva verde) por guanina (curva negra). Esta figura corresponde a la secuencia determinada en dirección antisentido (3' a 5'), de modo que, en dirección sentido (5' a 3') el cambio de base nucleotídica presentado por las células L(tk-) corresponde a una timina por una citosina.

secuencia del promotor IV de las células RAW y RAG corresponde a la secuencia descrita en la literatura (Muhlethaler-Mottet y col, 1997), mientras que en las células L(tk-) se encontró una única mutación puntual. Esta mutación implica un cambio en una base de timina por una citocina. Este cambio, presente sólo en uno de los dos alelos, se encuentra en la secuencia de consenso de unión del factor IRF1/2 (Fig. 21) (Muhlethaler-Mottet y col., 1997).

## ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DEL mRNA DEL FACTOR IRF 1

Debido a la importancia del factor de transcripción IRF-1 en el proceso de regulación de expresión de CIITA y al cambio en una de las bases nucleotídicas de la

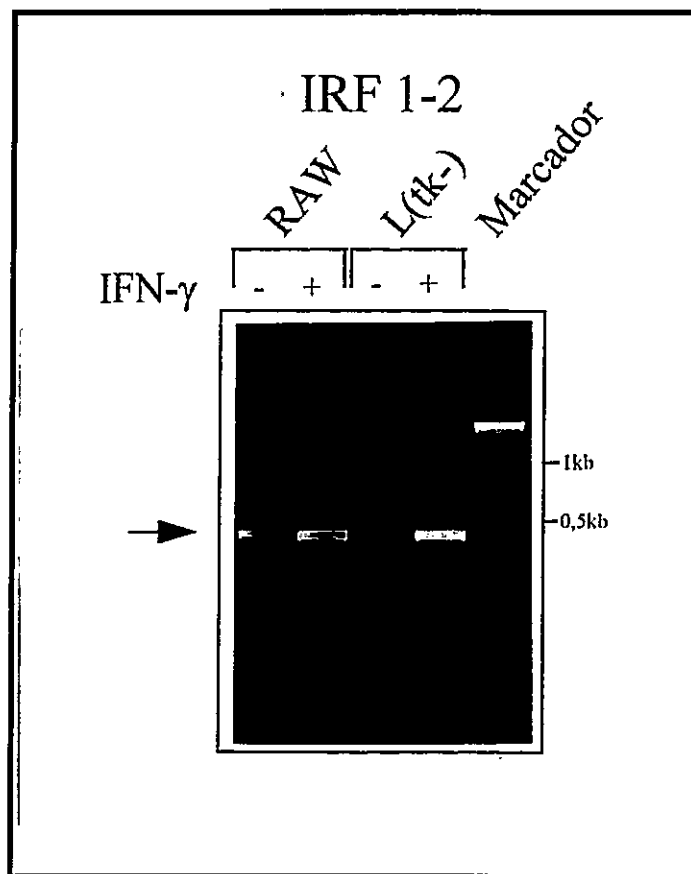


Figura 22. **Expresión del mRNA de IRF-1.** Células RAW y L(tk-) cultivadas en medio sin y con 100 U/ml de IFN- $\gamma$  murino durante 6 horas, se analizaron mediante RT-PCR utilizando los partidores IRF-1S e IRF-1AS (490 pb).

secuencia de consenso de unión a este factor en el promotor IV de CIITA en células L(tk-), se analizó por RT-PCR la expresión del mRNA de IRF-1 en estas células. Los

resultados mostraron que las células L(tk-) al igual que las células RAW expresan, en forma inducible por IFN- $\gamma$ , un fragmento de cDNA del tamaño esperado para un amplificado de IRF-1 (Fig. 22).

## DISCUSIÓN

Las moléculas de histocompatibilidad de clase II, o MHC-II, son moléculas expresadas en la superficie celular que cumplen un importante papel en el proceso de presentación de antígenos a células T durante la respuesta inmune. Su expresión tanto constitutiva como inducible es controlada mediante un complejo mecanismo de regulación (Glimcher y Kara, 1992; Mach y col., 1996; Boss, 1997).

Antecedentes previos obtenidos en nuestro laboratorio, mostraron que las células L(tk-), deficientes en la expresión de moléculas MHC-II inducida por IFN- $\gamma$ , representan un buen modelo para el estudio de los mecanismos de regulación de la expresión de moléculas MHC-II. En esta sección se analizan y discuten nuestros resultados obtenidos con la línea celular L(tk-).

### 1.0 ANÁLISIS DE HÍBRIDOS SOMÁTICOS

Los híbridos somáticos han sido ampliamente usados en la localización cromosomal de genes, en el estudio de factores reguladores positivos y negativos de la expresión génica y en experimentos de complementación génica (Kennett, 1979; Baron y Maniatis, 1986; Stuart y col., 1989; Bono y col., 1991b). Con el fin de estudiar el defecto de las células L(tk-) se empleó un panel de once híbridos somáticos preparados

mediante la fusión de células L(tk-) con las líneas celulares humanas normales B linfoblastoides GES y LM y con la línea celular de origen mesenquimático WISH. Los análisis de citometría de flujo mostraron que en ocho de estos híbridos somáticos se restablece la expresión de las moléculas MHC-II murinas después del tratamiento con IFN- $\gamma$  (Figs. 6, 7 y 8). Estos resultados y la descripción en la literatura de células B murinas (A-20) que complementan a las células L(tk-) (Lennon y col., 1998), confirman que el defecto de las células L(tk-) puede ser complementado en *trans* por algún factor difusible no especie-específico aportado por células humanas o murinas normales. La ausencia de complementación en algunos de los híbridos somáticos puede explicarse mediante la pérdida del cromosoma humano que contiene el gen que complementa el defecto de las células L(tk-). Inicialmente, los híbridos celulares poseen un juego completo de cromosomas de cada célula parental. Posteriormente, y debido en parte a una desigual distribución de cromosomas durante la mitosis, algunos cromosomas se pierden azarosamente durante la proliferación. Después de algún tiempo en cultivo, estos híbridos llegan a ser más estables y las pérdidas de cromosomas son más graduales (Kennett, 1979). Se ha descrito que en el caso de híbridos preparados entre células de ratón y humano, los cromosomas humanos son segregados y prevalecen las características murinas (Kennett, 1979; Baron y Maniatis, 1986; Kerkis y Zhdanova, 1992).

Un análisis más detallado de la complementación del defecto de las células L(tk-) reveló que la expresión constitutiva de las moléculas MHC-II de las células B A-20, GES y LM es reprimida luego de la fusión con las células L(tk-) (Stuart y col., 1989;

Lennon y col., 1998). Este mismo efecto fue anteriormente demostrado en híbridos somáticos producidos con la línea celular murina RAG y las mismas células B utilizadas en este trabajo (Bono y col., 1991; Lennon y col., 1998.). Esto sugiere que las células L(tk-) y RAG poseen factores reguladores negativos de la expresión constitutiva de moléculas MHC-II, los cuales pueden actuar en *trans* sobre células que expresan normalmente estas moléculas. Esta represión podría llevarse a cabo mediante la inactivación del promotor III de CIITA. Sería de gran interés poder determinar si estos factores forman parte del mecanismo normal por el cual se reprime la expresión constitutiva de moléculas MHC-II en células que normalmente no expresan MHC-II.

Por otro lado, los análisis de citometría de flujo realizados en los híbridos producidos entre L(tk-) y BLS-2 mostraron que estas células expresan constitutivamente moléculas MHC-II murinas en un bajo porcentaje de la población total (Fig. 10). Además, en la figura 5 B, se observa que el híbrido L.GES 4.3 expresa constitutivamente el mRNA de las moléculas MHC-II murinas. Por lo tanto, la fusión de células L(tk-) con células B linfoblastoides reprime la expresión constitutiva de las moléculas MHC-II en las células B, pero permite la expresión constitutiva de estas moléculas en las células L(tk-). Este es un fenómeno particular de las células L(tk-) y los antecedentes actuales no permiten formular una hipótesis coherente.

## 2.0 CIITA EN CÉLULAS L(tk-) : ¿ UN NUEVO MECANISMO DE REGULACIÓN ?

### 2.1 EXPRESIÓN DEL mRNA DE CIITA EN CÉLULAS L(tk-)

Los análisis de la expresión del mRNA de CIITA en células L(tk-) se realizaron mediante RT-PCR en lugar de Northern blot debido a la baja expresión del mRNA de CIITA y la mayor sensibilidad del primero de estos métodos. Los resultados muestran que las células A-20, RAW y RAG expresan un mRNA de CIITA del tamaño esperado, mientras que las células L(tk-) expresan un mRNA de CIITA más pequeño (Figs. 12 y 14). El mRNA de CIITA expresado en las células L(tk-) carece de los dominios ácido y PST del extremo 5'. La especificidad de los productos amplificados con todos los partidores en las cuatro líneas celulares fue confirmada por secuenciación de cada fragmento obtenido por RT-PCR. En estos análisis, se encontró que sólo en el caso de las células L(tk-) el cambio de una base nucleotídica significó el cambio en el aminoácido codificado. Los cambios de aminoácidos ocurren en las posiciones 818, 851 y 852 y están localizados en la región C-terminal de la proteína. Desconocemos si estos cambios podrían alterar significativamente la función de especificidad del dominio de activación del extremo C-terminal de CIITA. El resto de los cambios en bases nucleotídicas encontrados en el cDNA de las células L(tk-) y en las restantes líneas celulares analizadas, no implican un cambio en el aminoácido codificado y pueden ser atribuidos a polimorfismos las diferentes cepas de ratón de las cuales provienen las células estudiadas.

Se ha descrito que mutaciones en las secuencias de consenso localizadas en la unión intrón/exón que determinan los sitios de corte del pre-mRNA durante el procesamiento alternativo (splicing), pueden originar la pérdida de uno o varios exones. Este evento es conocido como salto de exón (exon skipping) y es la causa de varias enfermedades (Krawczak y col. 1992) entre las que se incluyen casos de pacientes BLS (Mach y col., 1996). El salto de exón puede generar un mRNA más pequeño que puede ser traducido en una proteína trunca. Por esta razón, se investigó la posibilidad de que el mRNA de CIITA más pequeño encontrado en las células L(tk-) se debiera a un salto de exón. Análisis de los productos obtenidos por RT-PCR Extendido permitieron descartar un salto de exón en el procesamiento del pre-mRNA de CIITA (Fig. 17). En algunos de estos experimentos se detectó una expresión débil y variable de esta región 5' del mRNA de CIITA, la que puede ser atribuida principalmente a una activación basal del promotor IV de CIITA. Esto será discutido en la sección 2.3.

El conjunto de estos resultados sugiere que las células L(tk-) no expresan moléculas MHC-II debido a la expresión de un mRNA de CIITA más pequeño el cual carece de los dominios acídicos y PST, fundamentales para la actividad funcional de CIITA. Por otra parte, los resultados obtenidos en las células RAG demuestra que estas células expresan un mRNA de CIITA similar al de las células control, confirmando los resultados de complementación génica que sugerían que el defecto de éstas células es distinto de CIITA (Lennon y col., 1997).

La expresión de un mRNA de CIITA más pequeño en L(tk-), permitiría explicar la complementación encontrada en los híbridos L.BLS-2, a pesar de que las células BLS-



2 expresen un CIITA mutado. Las células BLS-2 y todas las células del grupo BLS-A poseen una mutación en la región 3' del cDNA de CIITA. La expresión de un mRNA de CIITA carente de la región 5' en células L(tk-) y la expresión de un mRNA de CIITA mutado en la región 3' en las células BLS-2 sugiere la ocurrencia de un evento de  $\alpha$ -complementación. La probabilidad de un evento de  $\alpha$ -complementación es baja y explicaría la baja frecuencia de obtención de híbridos L.BLS-2 en los cuales se complementa la expresión de moléculas MHC-II. Resultados preliminares obtenidos recientemente en nuestro laboratorio, mostraron que células L(tk-) transfectadas con un plasmidio que expresa el cDNA de CIITA obtenido a partir de células BLS-2 expresan moléculas MHC-II en forma constitutiva en un débil porcentaje. Estos resultados confirman nuestra hipótesis de una  $\alpha$ -complementación entre células L(tk-) y BLS-2.

## 2.2 CIITA COMO DOMINANTE NEGATIVO

La comparación de la secuencia de cDNA y de la secuencia deducida de aminoácidos en humano y en ratón mostró que los principales dominios funcionales de CIITA están altamente conservados entre estas dos especies (Sims y col., 1997). En la región amino terminal de CIITA murino, entre los aminoácidos 30 y 160 se localiza una región rica en aminoácidos ácidos encontrada también en otros factores de transcripción ácidos ( Zhou y Glimcher, 1995; Fontes y col., 1997) y que funciona como activador transcripcional (Riley y col., 1995). Luego, entre los aminoácidos 162 y

276 existe un dominio rico en los aminoácidos prolina/serina/treonina (PST) que funcionaría como un dominio estructural y también como activador, mediante la interacción con factores de la maquinaria transcripcional (Chin y col., 1997b; Zhou y col., 1997). Entre los aminoácidos 365 y 376 se encuentra un dominio de unión a ATP. Los restantes dos tercios de la proteína (aminoácidos 376 al 1078) corresponden al dominio carboxilo terminal que determina la activación específica de los genes MHC-II.

Análisis de la secuencia primaria de CIITA reveló que los primeros 125 aminoácidos de la región N-terminal originan tres potenciales estructuras de  $\alpha$ -hélices. Análisis moleculares y funcionales de mutagénesis *in vitro* de la secuencia del cDNA de CIITA mostraron que dos de éstas  $\alpha$ -hélices (aminoácidos 51-71 y 84-103) son imprescindibles para la actividad transcripcional de CIITA y que una proteína carente de éstas dos  $\alpha$ -hélices presenta actividad de dominante negativo (Fontes y col., 1997). En el mismo sentido, otros trabajos han mostrado que la transfección de células normales con un cDNA de CIITA carente del dominio ácido de activación N-terminal o del dominio PST reprime la expresión constitutiva o inducible de las moléculas MHC-II (Chin y col., 1997b; Zhou y col., 1997). En ambos trabajos se demostró mediante Western blot que un cDNA de CIITA murino carente de los dominios de la región amino terminal es traducido en una proteína (Chin y col., 1997b; Zhou y col., 1997).

Basados en estos antecedentes, planteamos que la expresión de un mRNA de CIITA más pequeño en células L(tk-), carente de su región 5', sería traducido en una proteína trunca sin sus dominios ácido y PST, lo cual tendría un efecto dominante

negativo sobre la activación transcripcional del promotor de las moléculas MHC-II inducidas por IFN- $\gamma$ , explicando así el defecto de las células L(tk-).

Todos los resultados de dominancia negativa se han obtenido utilizando construcciones *in vitro* de un cDNA de CIITA y no han sido observadas *in vivo* debido a que todas las células mutadas en CIITA descritas hasta ahora poseen una mutación que afecta a la región C-terminal de la proteína, sin que ellas tengan efectos represores sobre la expresión de las moléculas MHC-II (Mach y col., 1996). Las células L(tk-) son las primeras células en las que se encuentra un defecto en la región N-terminal de la proteína de CIITA, lo que la convierte en una valiosa herramienta para estudiar los efectos de dominancia negativa de CIITA trunco *in vivo*.

Una característica de los híbridos somáticos obtenidos entre células L(tk-) y células GES, LM y WISH fue la débil expresión de moléculas MHC-II murinas inducida por IFN- $\gamma$  (Fig. 6). Incluso, en híbridos celulares donde la expresión de las moléculas MHC-II murinas fue homogénea, debido a que las células se seleccionaron magnéticamente o por dilución límite, la expresión de estas moléculas siguió siendo débil (Figs. 7 y 8). Esto contrasta con la fuerte expresión inducida por IFN- $\gamma$  de las moléculas MHC-II murinas en híbridos producidos entre RAG y GES (Compare la Fig. 4C con las Figs. 4D y 6). Estos resultados fueron reproducibles en varios clones distintos, descartando que las diferencias observadas en la expresión de moléculas MHC-II se deban solamente a variaciones experimentales. La posibilidad de que el anticuerpo H39.64.5, que reconoce moléculas MHC-II del haplotipo MHC de las células L(tk-), tenga menor afinidad que el anticuerpo MKD6 usado para reconocer las

moléculas MHC-II de las células RAG puede ser eliminada en base a resultados previos de nuestro laboratorio. En esos experimentos las células L(tk-) se transfectaron con DNA genómico de células B y se seleccionaron clones de células que expresaron moléculas MHC-II. El uso del anticuerpo H39.64.5 permitió distinguir entre clones que presentaban expresión débil y fuerte de moléculas MHC-II. Basados en estos resultados, proponemos que la expresión en las células L(tk-) de un CIITA trunco que actuaría como un dominante negativo, explicaría la débil expresión de moléculas MHC-II observada en los híbridos obtenidos con las células L(tk-). La fusión de las células L(tk-) con células humanas normales llevaría a que en el híbrido celular resultante, se encuentren presentes la forma trunca y silvestre de CIITA. La complementación de las células L(tk-) dependería del balance que resulte entre los efectos positivos y negativos de ambas formas de CIITA. Ya que en los experimentos de fusión realizados se utilizó una mayor proporción de células B que de células L(tk-) y dadas las diferencias de tamaño celular, es probable que se produzca la fusión de una célula L(tk-) con más de una célula B humana. Esto implicaría que algunos híbridos podrían contener varias copias del cromosoma 16 humano y por ende, un mayor número de copias del gen de CIITA. En efecto, experimentos nuestros de hibridación fluorescente *in situ* (FISH en inglés), mostraron la presencia de varios cromosomas 16 humanos en placas mitóticas del híbrido L.LM 3.30 al utilizar una sonda fluorescente que hibrida con dicho cromosoma (resultados no mostrados). La mayor expresión de CIITA silvestre complementaría el defecto de las células L(tk-), pero el efecto dominante negativo de la forma trunca de

CIITA limitaría la expresión de moléculas MHC-II. Esto no ocurriría en las células RAG, ya que su defecto es distinto de CIITA.

Esta proposición lleva implícita la noción de que el efecto de dominancia negativa de esta forma trunca del mRNA de CIITA de las células L(tk-) dependería de la dosis génica, es decir, sería cuantitativamente dependiente del número de transcritos y moléculas de CIITA y podría ser anulado por la sobreexpresión de un mRNA de CIITA silvestre. En apoyo a esta hipótesis se encuentran los resultados de Chang y colaboradores (1994), quienes mostraron que la expresión en las células L(tk-) del cDNA de CIITA normal dirigida por un promotor constitutivo fuerte, restituye en estas células la expresión constitutiva de moléculas MHC-II.

Otra proposición es que la expresión de un mRNA de CIITA más pequeño por parte de las células L(tk-) podría formar parte de algún proceso fisiológico celular. La hibridación de una genoteca de cDNA, obtenida de células B, con sondas de cDNA de la región 5' del mRNA de CIITA, reveló la presencia de varios clones de cDNA de CIITA de diferentes tamaños, productos del procesamiento alternativo (Riley y col., 1995). Esto sugiere que las células B expresan normalmente varias formas del mRNA de CIITA. Por otro lado, las células B expresan moléculas MHC-II en forma diferencial a lo largo de su proceso normal de diferenciación (Glimcher y Kara, 1992). Así, células pre-B inmaduras no expresan moléculas MHC-II en su superficie celular. En cambio, células B maduras sí expresan éstas moléculas, las que cumplen un papel importante durante el proceso de presentación de péptidos a células T. Finalmente, las células B se diferencian en células B plasmáticas o plasmocitos secretores de inmunoglobulinas, que

dejan de expresar moléculas MHC-II. Estudios con híbridos celulares mostró que el silenciamiento de la expresión de moléculas MHC-II en plasmocitos se debe a un mecanismo represor dominante (Latron y colaboradores, 1988; Dellabona y col., 1989). Posteriormente, análisis moleculares encontraron que el promotor de las moléculas MHC-II de plasmocitos está desocupado, aunque todos los factores que se unen a las distintas secuencias de este promotor se encuentran normalmente presentes en extractos nucleares y pueden unirse a sus respectivas cajas de secuencia de consenso *in vitro* (Silacci y col., 1994). Experimentos de protección a RNasa mostraron que los plasmocitos, a diferencia de células B maduras, no expresan el mRNA de CIITA. La transfección de plasmocitos con un plásmido que expresa el cDNA completo de CIITA restauró la expresión de moléculas MHC-II (Silacci y col., 1994; Sartoris y col., 1996). Esto llevó a proponer que el proceso normal de extinción de la expresión de moléculas MHC-II en plasmocitos es producto de un mecanismo de represión de la expresión de CIITA, impidiendo la formación del complejo multiproteico necesario para la activación transcripcional de los genes MHC-II (Silacci y col., 1994; Sartoris y col., 1996). No se ha identificado hasta ahora cual sería el factor represor de CIITA. Dado que se ha determinado la existencia de variadas formas de mRNAs de CIITA producto del procesamiento alternativo del pre-mRNA, es posible postular que a medida que estas células se diferencian a células plasmáticas expresarían un mRNA de CIITA similar al encontrado en células L(tk-), el cual mediante un efecto de dominante negativo reprimiría la expresión de las moléculas MHC-II y la expresión del mRNA de CIITA de largo total. La pregunta que surge es: ¿Cómo se regularía la expresión de esta nueva

forma de mRNA de CIITA?. La respuesta a esta pregunta, será discutida en la sección 2.4.

### 2.3 PROMOTOR IV DE CIITA

La secuencia del promotor IV de CIITA en las células L(tk-) muestra que estas células poseen una mutación puntual que cambia una timina por una citocina en la secuencia de consenso de unión del factor IRF 1/2.

La presencia de secuencias de consenso de unión para los factores transcripcionales STAT1 $\alpha$  e IRF-1 en el promotor IV de CIITA (Muhlethaler-Mottet y col., 1997) llevó a proponer que la expresión de CIITA inducible por IFN- $\gamma$ , sería regulada a través de la activación de STAT1 $\alpha$  (Lee y Benveniste, 1996; Muhlethaler-Mottet y col., 1998) y de la inducción de la expresión del gen de IRF-1 (Hobart y col., 1997; Muhlethaler-Mottet y col., 1998) (ver Introducción y Fig. 3). La síntesis de IRF-1 en respuesta a IFN- $\gamma$ , explicaría por qué la expresión de CIITA depende parcialmente de la síntesis de proteínas (Steinle y col., 1994; Hobart y col., 1997).

IRF-1 es un factor transcripcional que participa en la regulación de la expresión inducible por IFN- $\gamma$  de las moléculas MHC-I, MHC-II y de CIITA (Hobart y col., 1997; Muhlethaler-Mottet y col., 1998). IFN- $\gamma$  induce la expresión de IRF-1 a través de la activación de STAT1 $\alpha$ , el cual se une a la secuencia GAS del promotor del gen de IRF-

1. La inducción por IFN- $\gamma$  de las moléculas MHC-I en las células L(tk-) (Stuart y col., 1989; Bono y col., 1991a; Fig. 4A ) y los resultados de RT-PCR mostrados en esta tesis (Fig. 20) demuestran que el factor IRF-1 se expresa normalmente en éstas células y que no es la causa del defecto de las células L(tk-). Consecuente con la participación de IRF-1 en la regulación de la expresión de CIITA, se ha demostrado que ratones knock out para IRF-1 muestran una expresión disminuída del mRNA de CIITA, equivalente aproximadamente al 30% de la expresión normal (Hobart y col., 1997). Además, estudios funcionales y de mutagénesis *in vitro*, mostraron que el cambio de cuatro bases nucleotídicas de la secuencia de consenso de unión de IRF-1 en el promotor IV de CIITA reduce en un 23 % la actividad inducible del promotor (Muhlethaler-Mottet y col., 1998). Una de estas cuatro mutaciones estudiadas ocurre en el mismo sitio y es del mismo tipo (cambio de timina por citocina) que la encontrada en las células L(tk-). Estos resultados indican que un defecto en la unión del factor IRF-1 al promotor IV de CIITA resulta en una reducción parcial de la expresión de CIITA. Lo anterior, podría explicar la débil y variable expresión de la región 5' del cDNA de CIITA de las células L(tk-) observada en algunos experimentos de RT-PCR Extendido (Fig. 16). Esto podría significar que la mutación puntual encontrada en la secuencia de unión del factor IRF-1 en el promotor IV de CIITA en las células L(tk-) sería capaz de inducir una expresión basal y variable de la expresión del mRNA de CIITA de tamaño normal, pero que esta expresión no sería suficiente para sobrepasar el efecto dominante negativo de la forma del mRNA de CIITA más pequeña.

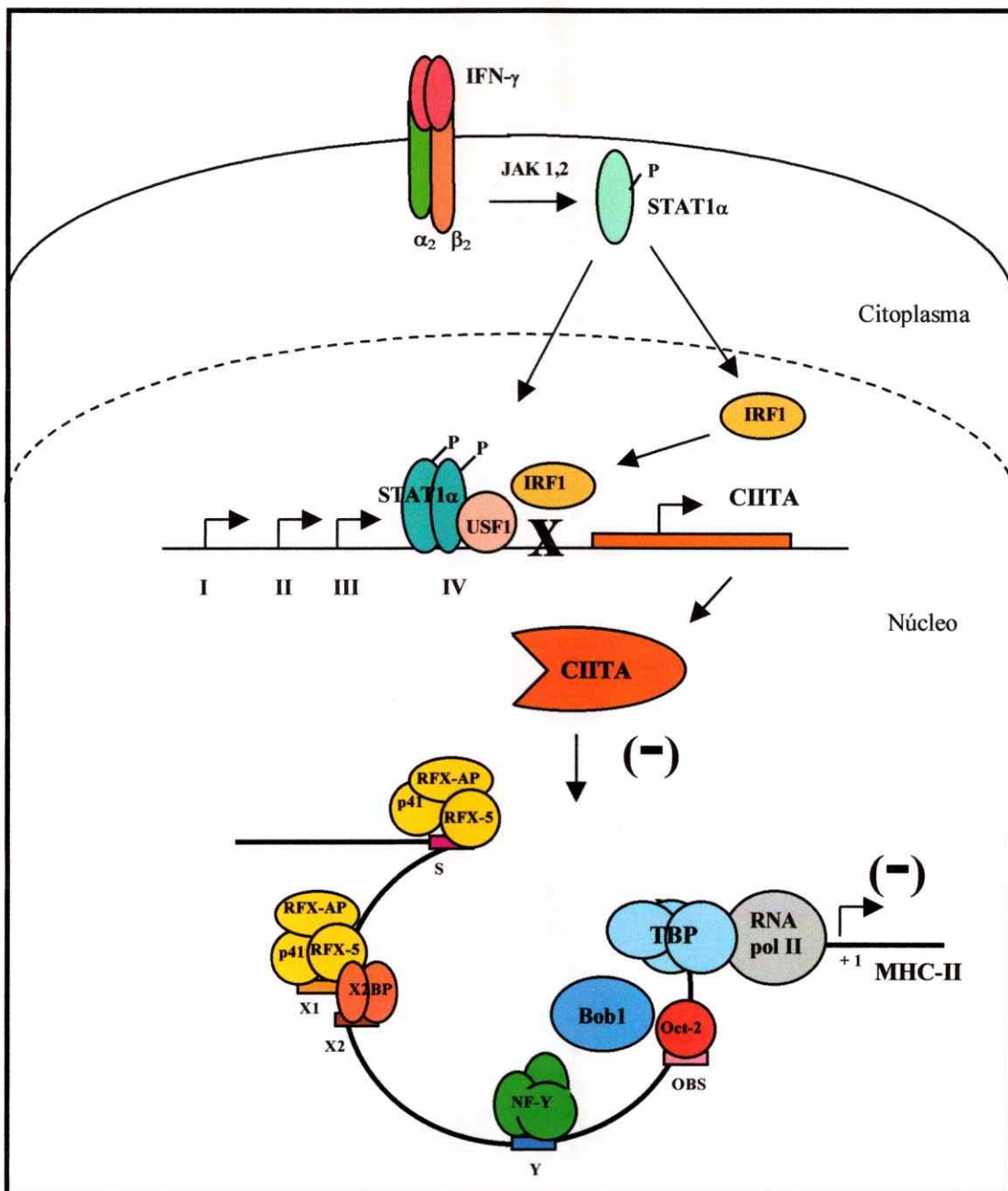


En estos momentos se están realizando nuevos experimentos dirigidos a determinar en qué medida la mutación en la secuencia de consenso del factor IRF-1/2 encontrada en las células L(tk-), afecta la actividad del promotor IV<sub>4</sub> de CIITA (ver sección Perspectivas). Si estos experimentos muestran que esto así ocurre, entonces las células L(tk-) serían las primeras células en las cuales se describe una mutación a nivel de la región promotora del gen de CIITA.

La mutación puntual encontrada en la secuencia de unión al factor IRF-1 en células L(tk-) es heterocígota, es decir, el gen de sólo uno de los dos alelos posee este tipo de defecto. Sin embargo, la ausencia de expresión significativa de un mRNA de CIITA de tamaño completo, sugiere que el gen de CIITA del segundo alelo posee una mutación, distinta a la del primer alelo. Esto no sería extraño, ya que se han informado varios casos de células de pacientes BLS en los cuales las mutaciones encontradas son heterocígotas (Fig. 2). Las mutaciones que afectan al gen de CIITA de las células RJ 2.2.5 (Brown y col., 1995) y BCH (Bontron y col., 1997) y las mutaciones del gen del factor RFX-5 encontradas en las células SJO (Mach y col., 1996) son un ejemplo de esto. En estos momentos, se están llevando a cabo experimentos de Southern blot utilizando sondas que hibridan con la región 5' del gen de CIITA de células L(tk-), para determinar si en el gen de CIITA existe algún tipo de mutación, como por ejemplo una delección.

## 2.4 EXISTENCIA DE UN PROMOTOR INTRAGÉNICO DE CIITA

Los resultados de RT-PCR mostraron que las células L(tk-) expresan un mRNA de CIITA que es 1,1 kb más pequeño que el mRNA silvestre, cuyo inicio de transcripción estaría cercano al comienzo del cuarto exón. Por otro lado, los experimentos de RACE -PCR mostraron que esta nueva forma de mRNA no tiene el inicio de transcripción en el sitio descrito para células inducibles. Experimentos de PCR genómico determinaron la ubicación aproximada de intrones y exones, lo que permitió inferir que en células L(tk-), la transcripción del mRNA de CIITA comenzaría cerca del inicio del cuarto exón. A nivel genómico, este exón estaría ubicado aproximadamente 18 kb río abajo del promotor IV de CIITA. Todos éstos resultados nos hacen proponer la existencia de un nuevo promotor intragénico inducible por IFN- $\gamma$ , localizado probablemente en el tercer intrón. En el caso de las células L(tk-), el promotor intragénico inducible podría ser activado como consecuencia de la mutación en la secuencia de unión del factor IRF-1 en el promotor IV, lo que silenciaría su actividad. Este promotor intragénico regularía la expresión de esta nueva forma de transcrito de CIITA que actuaría como un dominante negativo sobre la expresión de las moléculas MHC-II. A pesar de la presencia de todos los otros factores de transcripción necesarios para iniciar la transcripción de los genes de las moléculas MHC-II, CIITA no podría cumplir con su función activadora sin sus dominios ácidos y PST (Fig. 23).



**Figura 23. Representación esquemática del defecto de las células L(tk-) que les impide expresar moléculas MHC-II.** La mutación encontrada en la secuencia de unión del factor IRF-1 en el promotor IV de CIITA de las células L(tk-), provocaría una inactivación de este promotor y la consecuente ausencia de expresión de un mRNA de CIITA de tamaño completo. La activación de un promotor intragénico de CIITA, inducible por IFN- $\gamma$ , conduciría a la expresión de una forma trunca de CIITA, carente de sus dominios ácido y PST, que actuaría como un dominante negativo sobre la expresión de moléculas MHC-II.

La existencia de un promotor intragénico de CIITA inducible por IFN- $\gamma$ , está apoyada por los resultados del trabajo de Lennon y colaboradores (1997), en el cual se demostró que la transfección en las células L(tk-) y RAW 264.7 de un cosmidio humano que contiene el gen de CIITA sin sus regiones promotoras, induce la expresión de un cDNA de CIITA después del tratamiento con IFN- $\gamma$ . Los autores sugieren la presencia de un promotor intragénico en el gen de CIITA, inducible por IFN- $\gamma$ , localizado a una distancia mayor a 10 kb del promotor III de CIITA. Además, se han publicado resultados que indican que el gen de la cadena invariante, una proteína intracelular importante en la expresión de las moléculas MHC-II en la superficie celular (ver Introducción), posee en el primer intrón un elemento amplificador (enhancer) de su expresión constitutiva e inducible por IFN- $\gamma$  (Beilue y col., 1998). Este promotor intragénico, que posee secuencias homólogas a las cajas X1, X2 e Y del promotor de las moléculas MHC-II, actuaría aumentando (enhancer) la transcripción del gen de la cadena invariante.

## PERSPECTIVAS

Las moléculas MHC-II juegan un papel crítico en el proceso de presentación de antígenos y su expresión está sometida a un estricto mecanismo de regulación. El estudio de nuevos moduladores que puedan controlar la expresión de las moléculas MHC-II ha despertado un gran interés por su potencial uso como inmunoterapia. Desde este punto de vista, la continuación de esta tesis y posteriores experimentos que demuestren fehacientemente que el mRNA de CIITA de las células L(tk-) posee funciones de dominante negativo sobre la expresión de las moléculas MHC-II *in vivo*, abrirá una nueva perspectiva en este campo de investigación.

Con la finalidad de demostrar inequívocamente el efecto dominante negativo del mRNA de las células L(tk-), se propone clonar el mRNA de CIITA de las células L(tk-) en un vector de expresión eucarionte, para luego mediante experimentos de transfección introducirlo en células que expresen normalmente moléculas MHC-II. Estos experimentos deberían mostrar que esta forma más pequeña del mRNA de CIITA, extingue la expresión de las moléculas MHC-II.

Por otra parte, sería interesante clonar el promotor IV mutado de CIITA de las células L(tk-) en un vector que contenga un gen reportero de manera de poder determinar en que magnitud la mutación encontrada en la secuencia de unión de IRF-1 afecta la funcionalidad del promotor IV.

Ya que los resultados de esta tesis y resultados anteriores de nuestro grupo de investigación, sugieren la existencia de un promotor intragénico en el intrón 3, se propone clonar este intrón en un vector que contenga un gen reportero de manera de demostrar la actividad promotora de la transcripción. Posteriormente, las regiones promotoras serían delimitadas por análisis de diferentes fragmentos del intrón obtenidos con distintas enzimas de restricción y secuenciados con el fin de identificar secuencias de consenso de unión a diversos factores de transcripción.

Por otro lado, sería interesante poder determinar si esta forma trunca del mRNA de CIITA de las células L(tk-) es traducido en una proteína. Para ello, se propone la producción de anticuerpos que reconozcan epitopos de la región amino y carboxilo terminal de la proteína de CIITA. Estos anticuerpos serían posteriormente utilizados en experimentos de Wester blot, empleando lisados celulares de células L(tk-) y células controles cultivadas en ausencia o presencia de IFN- $\gamma$ . Se esperaría encontrar que las células L(tk-) expresarían en forma inducible por IFN- $\gamma$  una proteína de CIITA de menor peso molecular, reconocida únicamente por el anticuerpo dirigido contra la región C-terminal de la proteína. En cambio, las células controles expresarían la proteína de CIITA del peso molecular descrito para células normales y sería reconocida por ambos anticuerpos.

## CONCLUSIONES

Las conclusiones de este trabajo son las siguientes:

1. Las células L(tk-) expresan una forma distinta del mRNA de CIITA, inducible por IFN- $\gamma$ . Esta nueva forma es aproximadamente 1,1 kb más pequeña y carece de la región 5'.
2. El sitio de inicio de la transcripción del mRNA de CIITA en células L(tk-) es distinto al sitio encontrado en células que expresan normalmente CIITA por acción de IFN- $\gamma$ . El sitio de inicio de la transcripción estaría cercano al comienzo del exón 4, sugiriendo la existencia de un promotor intragénico inducible por IFN- $\gamma$ .
3. La mutación encontrada en la secuencia de unión del factor transcripcional IRF-1 en el promotor IV de CIITA explicaría en parte, el impedimento de las células L(tk-) para expresar un mRNA completo de CIITA.
4. La proteína codificada por esta forma más pequeña de CIITA, de ser expresada en las células L(tk-) carecería de los dominios N-terminal ácidos y PST, lo que según antecedentes de la literatura podría actuar como un dominante negativo sobre la expresión de moléculas MHC-II, explicando así el defecto de las células L(tk-).

5. Las células L(tk-) corresponderían a las primeras células descritas que expresan un mRNA de CIITA con una deficiencia en la expresión de su región 5', lo que las convierte en una valiosa herramienta para estudiar *in vivo* los efectos dominantes negativos de CIITA sobre la expresión de las moléculas MHC-II.

6. Aunque este trabajo estuvo centrado principalmente en el estudio de las células L(tk-), se obtuvieron además resultados importantes con la línea celular murina RAG, que representa también un mutante de regulación de las moléculas MHC-II. Se demostró que en las células RAG el mRNA de CIITA corresponde al descrito para células que expresan normalmente moléculas MHC-II en forma inducible por IFN- $\gamma$ . El sitio de inicio de la transcripción es el normalmente descrito para otras células inducibles y se encuentra bajo la acción del promotor IV de CIITA. Esto, descarta a CIITA como el factor defectuoso en las células RAG.



## BIBLIOGRAFÍA

Abbas, A.K., Lichtman, A.H., y Pober, J.S. 1997. The Major Histocompatibility Complex y Antigen Processing and Presentation to T Lymphocytes. *En Cellular and Molecular Immunology*. pp 96-114 y 115-137 respectivamente. Tercera Edición. Saunders Company. Philadelphia.

Baron, M.H., y Maniatis, T. 1986. Rapid Reprogramming of Globin Gene Expression in Transient Heterokaryons. *Cell* 46: 591-602.

Bénichou, B., y Strominger, J. 1991. Class II-Antigen-Negative Patient and Mutant B-Cell Lines Represent at Least Three, and Probably Four, Distinct Genetic Defects Defined by Complementation Analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 4285-4288.

Blum, J.S., y Cresswell, P. 1988. Role for Intracellular Proteases in the Processing and Transport of Class II HLA Antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 3975-3979.

Boehm, U., Klamp, T., Groot, M., y Howard, J.C. 1997. Cellular Responses to Interferon- $\gamma$ . *Annu. Rev. Immunolog.* 15: 749-795.

Bono, M.R., Benech, P., Couillin, P., Alcaïde-Loridan, C., Grisard, M.C., Jouin, H., Fischer, D.G., y Fellous, M. 1989. *Somatic Cell and Molecular Genetics* 15: 513-523.

Bono, M.R., Alcaïde-Loridan, C., Letouzé, B., Jouin, H., Gobin, S.J.P. y Fellous, M. 1991a. The Recombinant Human Interferon- $\gamma$  Receptor Is Functional in a Human x Murine Hybrid Containing Human Chromosome 21. *Res. Immunol.* 142: 765-772.

Bono, M.R., Alcaïde-Loridan, C., Couillin, P., Letouzé, M.C., Grisard, M.C., Jouin, H., y Fellous, M. 1991b. Human Chromosome 16 Encodes a Factor Involved in Induction of Class II Major Histocompatibility Antigens by Interferon  $\gamma$ . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 6077-6081.

Bontron, S., Steimle, V., Ucla, C., Eibl, M., y Mach, B. 1997. Two Novel Mutations in the MHC Class II Transactivator CIITA in a Second Patient From MHC Class II Deficiency Complementation Group A. *Hum. Genet.* 99: 541-546.

Boss, J. 1997. Regulation of Transcription of MHC Class II genes. *Curr. Opin. Immunolog.* 9: 107-113.

Brown, J.A., He, X.F., Westerheide, S.D., y Boss, J.M. 1995. Characterization of the Expressed CIITA Allele in the Class II MHC Transcriptional Mutant RJ2.2.5. *Immunogenetics* 43: 88-91.

Chang, C.H., Fontes, J.D., Peterlin, M., y Flavell, R. 1994. Class II Transactivator (CIITA) Is Sufficient for the Inducible Expression of Major Histocompatibility Complex Class II Genes. *J. Exp. Med.* 180: 1367-1374.

Chang, C.H., y Flavell, R.A. 1995a. Class II Transactivator Regulates the Expression of Multiple Genes Involved in Antigen Presentation. *J. Exp. Med.* 181: 765-767.

Chang, C.H., Hong, S.C., Hughes, C.W., Janeway, C.A. Jr, Flavell, R.A. 1995b. CIITA Activates the Expression of MHC Class II genes in Mouse T Cells. *Intern. Immunol.* 7: 1515-1518.

Chang, C.H., Guerder, S., Hong, S.C., van Ewijk, W., y Flavell, R.A. 1996. Mice Lacking the MHC Class II Transactivator (CIITA) Show Tissue-Specific Impairment of MHC Class II Expression. *Immunity* 4: 167-178.

Chin, K.C., Mao, C., Skinner, C., Riley, J.L., Wright, K.L., Moreno, C.S., Stark, G.R., Boss, J.M., y Ting, J.P. 1994. Molecular Analysis of G1B and G3A IFN-g Mutants Reveals that Defects in CIITA or RFX Result in Defective Class II MHC and Ii Gene Induction. *Immunity* 1: 687-697.

Chin, K.C., Li, G., y Ting, J.P. 1997a. Activation and Transdominant Suppression of MHC Class II and HLA-DMB Promoters by a Series of C-Terminal Class II Transactivator Deletion Mutants. *J. Immunol.* 159: 2789-2794.

Chin, K.C., Li, G.G., y Ting, J.P. 1997b. Importance of Acidic, Proline/ Serine/ Threonine-Rich, and GTP-Binding Regions in the Major Histocompatibility Complex Class II Transactivator: Generation of Transdominant-Negative Mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 2501-2506.

Darnell, J.E. Jr, Kerr, I.M., y Stark, G.R. 1994. JAK-STAT Pathways and Transcriptional Activation in Response to IFNs and Other Extracellular Signaling Proteins. *Science* 264: 1415-1421.

Dellabona, P., Latron, F., Maffei, A., Scarpellino, L., y Acolla, R.S. 1989. Transcriptional Control of MHC Class II Gene Expression During Differentiation From B Cells to Plasma Cells. *J. Immunol.* 142: 2902-2910.

Durand, B., Kobr, M., Reith, W., and Mach, B. 1994. Functional Complementation of Mayor Histocompatibility Complex Class II Regulatory Mutants by the Purified X-Box-Binding Protein RFX. *Mol. Cell. Biol.* 14: 6839-6847.

Durand, B., Sperisen, P., Emery, P., Barras, E., Zufferey, M., Mach, B., y Reith, W. 1997. RFXAP, A Novel Subunit of the RFX DNA Binding Complex Is Mutated in Class II Deficiency. *EMBO J.* 16: 1045-1055.

Emery, P., Durand, B., Mach, B., y Reith, W. 1996a. RFX Proteins, A Novel Family of DNA Binding Proteins Conserved in the Eukaryotic Kingdom. *Nucleic Acids Res.* 24: 803-807.

Emery, P., Strubin, M., Hofmann, K., Bucher, P., Mach, B., y Reith, W. 1996b. A Consensus Motif in the RFX DNA Binding Domain and Binding Domain Mutants with Altered Specificity. *Mol. Cell. Biol.* 16: 4486-4494.

Farrar, M., y Schreiber, R. 1993. The Molecular Cell Biology of Interferon- $\gamma$  and Its Receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 11: 571-611.

Fertsch, D., Schoenberg, D.R., Germain, R.N., Tou, J.Y., y Vogel, S.N. 1987. Induction of Macrophage Ia Antigen Expression by rIFN-gamma and Down-Regulation by IFN-alpha/beta and Dexamethasone are Mediated by Changes in Steady-State Levels of Ia mRNA. *J. Immunol.* 139: 244-249.

Fling, S.P., Arp, B., y Pious, D. 1994. HLA-DMA and DMB Genes Are Both Required for MHC Class II/Peptide Complex Formation in Antigen-Presenting Cells. *Nature* 368: 554-558.

Fontes, J.D., Jabrane-Ferrat, N., Toth, C., y Peterlin, M. 1996. Binding and Cooperative Interactions Between Two B Cell-Specific Transcriptional Coactivators. *J. Exp. Med.* 183: 2517-2521.

Fontes, J.D., Jiang, B., and Peterlin, M. 1997. The Class II *trans*-Activator CIITA Interacts with the TBP-Associated Factor TAFII32. *Nucleic Acids Res.* 25: 2522-2528.

Germain, R. 1994. MHC-Dependent Antigen Processing and Peptide Presentation: Providing Ligands for T Lymphocyte Activation. *Cell* 76: 287-299.

Glimcher, L., y Kara, C. 1992. Sequences and Factors: A Guide To MHC Class II Transcription. *Annu. Rev. Immunol.* 10: 13-49.

Greenlund, A.C., Farrar, M.A., Viviano, B.L., y Schreiber, R.D. 1994. Ligand-Induced IFN- $\gamma$  Receptor Tyrosine Phosphorylation Couples the Receptor To Its Signal Transduction System (p91). *EMBO J.* 13: 1591-1600.

Hansen, T.H., Carreno, B.M., y Sachs, D.H. 1993. The Major Histocompatibility Complex. En Paul, W.E.(ed.). *Fundamental Immunology*. pp 577-676. Tercera Edición. Raven Press. New York.

Hemmi, S., Böhni, R., Stark, G., Di Marco, F., y Aguet, M. 1994. A Novel Member of the Interferon Receptor Family Complements Functionality of the Murine Interferon  $\gamma$  Receptor in Human Cells. *Cell* 76: 803-810.

Hobart, M., Ramassar, V., Goes, N., Urmson, J., y Halloran, P. 1997. IFN Regulatory Factor-1 Plays a Central Role in the Regulation of the Expression of Class I and II MHC Genes In Vivo. 1997. *J. Immunol.* 158: 4260-4269.

Hume, C.R., y Lee, J.S. 1989. Congenital Immunodeficiencies Associated with Absence of HLA Class II Antigens On Lymphocytes Results From Distinct Mutations in *trans*-acting Factors. *Hum. Immunol.* 26: 288-309.

Hunt, D.F., Michel, H., Dickinson, T.A., Shabanowitz, J., Cox, A.L., Sakaguchi, K., Appella, E., Grey, H.M., y Sette, A. 1992. Peptides Presented to the Immune System by the Murine Class II Major Histocompatibility Complex Molecule I-A<sup>d</sup>. *Science* 256: 1817-1820.

Ihle, J.N., Witthuhn, B.A., Quelle, F.W., Yamamoto, K., Thierfelder, W.E., Kreider, B., y Silvennoinen, O. 1994. Signaling by the Cytokine Receptor Superfamily: JAKs and STATs. *TIBS* 19: 222-227.

Janeway, C.A. Jr, y Travers, P. 1994. Immunogenetics: The Major Histocompatibility Complex (Cap. 2) y Antigen Recognition by T Lymphocytes (Cap. 4). *En Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. pp 2:45-2:53 y 4:2-4:30 respectivamente. Garland Publishing Inc. New York and London.

Kara C.J., y Glimcher, L.H. 1991. In Vivo Footprinting of MHC Class II Genes: Bare Promoters in the Bare Lymphocyte Syndrome. *Science* 252: 709-712.

Kara C.J., y Glimcher, L.H. 1993. Three In Vivo Promoter Phenotypes in MHC Class II Deficient Combined Immunodeficiency. *Immunogenetics* 37: 227-230.

Kappler, J.W., Skidmore, B., White, J., y Marrack, P. 1981. Antigen-Inducible, H-2-Restricted, Interleukin-2-Producing T Cell Hybridomas. *J. Exp. Med.* 153: 1198-1214.

- Kennett, R. 1979. Cell Fusion. *En* Jacoby, W., y Pastan, Y (eds), Cell Culture. pp 345-359. Academic Press, Inc. San Diego, California.
- Kerkis, A.Y., y Zhdanova, N.S. 1992. Formation and Ultrastructure of Somatic Cell Hybrids. *Electron Microsc. Rev.* 5: 1-24.
- Kern, I., Steimle, V., Siegrist, C.A., y Mach, B. 1995. The Two Novel MHC Class II Transactivators RFX5 and CIITA Both Control Expression of HLA-DM Genes *International Immunology.* 7: 1295-1299.
- Kovats, S., Nepom, G.T., Coleman, M., Nepom, B., Kwok, W.W., y Blum, J. 1995. Deficient Antigen-Presenting Cell Function in Multiple Genetic Complementation Groups of Type II Bare Lymphocyte Syndrome. *J. Clin. Invest.* 96: 217-223.
- Krawczak, M., Reiss, J., y Cooper, D.N. 1992. The Mutational Spectrum of Single Base-Pair Substitutions in mRNA Splice Junctions of Human Genes: Causes and Consequences. *Hum. Genet.* 90: 41-54.
- Larner, A.C., David, M., Feldman, G.M., Igarashi, K.I., Hackett, R.H., Webb, D.S.A., Sweitzer, S.M., Petricoin, E.F., y Finbloom, D.S. 1993. Tyrosine Phosphorylation of DNA Binding Proteins by Multiple Cytokines. *Science* 261: 1730-1733.
- Latron, F., Jotterand-Bellomo, M., Maffei, A., Scarpellino, L., Bernard, M., Strominger, J.L., y Accolla, R.S. 1988. Active Suppression of Major Histocompatibility Complex Class II Gene Expression During Differentiation From B Cells to Plasma Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2229-2233.
- Lee, Y.-J., y Benveniste, E.N. 1996. Stat1a Expression Is Involved in IFN- $\gamma$  Induction of the Class II Transactivator and Class II MHC Genes. *J. Immunol.* 157: 1559-1568.
- Lee, Y.-J., Han, Y., Lu, H.-T., Nguyen V., Qin, H., Howe, P.H., Hocesvar, B.A., Boss, J., Ransohoff, R.M., y Benveniste, E.N. 1997. TGF- $\beta$  Suppresses IFN- $\gamma$  Induction of Class II MHC Gene Expression by Inhibiting Class II Transactivator Messenger RNA Expression. *J. Immunol.* 158: 2065-2075.
- Lennon, A.M., Ottone, C., Peijnenburg, A., Hamon-Benais, C., Colland, F., Gobin, S., van den Elsen, P., Fellous, M., Bono, R., y Alcaïde-Loridan, C. 1996. The RAG Line Cell Defines a New Complementation Group of Class II Deficiency. *Immunogenetics* 43: 352-359.
- Lennon, A.M., Ottone, C., Rigaud, G., Deaven, L.L., Longmire, J., Fellous, M., Bono, R., y Alcaïde-Loridan, C. 1997. Isolation of a B-Cell Promotor for the Human Class II Transactivator. *Immunogenetics* 45: 266-273.

- Lennon, A.M., Ottone, C., Roseblatt, M., Fellous, M., Bono, R., y Alcaide-Loridan, C. 1998. CIITA B-Cell-Specific Promotor Suppression in MHC Class II-Silenced Cell Hybrids. *Immunogenetics* 48: 283-291.
- Louis-Plence, P., Moreno, C.S., y Boss, J.M. 1997. Formation of a Regulatory Factor X/X2 Box-Binding Protein/Nuclear Factor-Y Multiprotein Complex on the Conserved Regulatory Regions of HLA Class II Genes. *J. Immunol.* 159: 3899-3909.
- Mahanta, S., Scholl, T., Yang, F.C., y Strominger, J.L. 1997. Transactivation by CIITA, the Type II Bare Lymphocyte Syndrome-Associated Factor, Requires Participation of Multiple Regions of the TATA Box Binding Protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 6324-6329.
- Mach, B., Steimle, V., Martinez-Soria, E., y Reith, W. 1996. Regulation of MHC Class II Genes: Lessons From a Disease. *Annu. Rev. Immunol.* 14: 301-331.
- Martin, W.D., Hicks, G.G., Mendiratta, S.K., Leva, H.I., Ruley, H.E., y Kaer, L.V. 1996. H2-M Mutant Mice Are Defective in the Peptide Loading of Class II Molecules, Antigen Presentation, and T Cell Repertoire Selection. *Cell* 84: 543-550.
- Miyazaki, T., Wolf, P., Tourne, S., Waltzinger, C., Dierich, A., Barois, N., Ploegh, H., Benoist, C., y Mathis, D. 1996. Mice Lacking H2-M Complexes, Enigmatic Elements of the MHC Class II Peptide-Loading Pathway. *Cell* 84: 531-541.
- Moore, B.B., Cao, Z.A., McRae, T.L., Woo, C.H., Conley, S., y Jones, P.P. 1998. The Invariant Chain Gene Intronic Enhancer Shows Homology to Class II Promotor Elements. *J. Immunol* 161: 1844-1852.
- Moreno, C.S., Rogers, E.M., Brown, J.A., y Boss, J.M. 1997. Regulatory Factor X, a Bare Lymphocyte Syndrome Transcription Factor, Is a Multimeric Phosphoprotein Complex. *J. Immunol.* 158: 5841-5848.
- Morris, P., Shaman, J., Attaya, M., Amaya, M., Goodman, S., Bergman, C., Monaco, J.J., y Mellins, E. 1994. An Essential Role for HLA-DM in Antigen Presentation by Class II Major Histocompatibility Molecules. *Nature* 368: 551-553.
- Muhlethaler-Mottet, A., Otten, L.A., Steimle, V., y Mach, B. 1997. Expression of MHC Class II Molecules in Different Cellular and Functional Compartments Is Controlled by Differential Usage of Multiple Promotors of the Transactivator CIITA. *EMBO J.* 16: 2851-2860.

Muhlethaler-Mottet, A., Di Bernardino, W., Otten, L.A., y Mach, B. 1998. Activation of the MHC Class II Transactivator CIITA by Interferon- $\gamma$  Requires Cooperative Interaction Between Stat1 and USF-1. *Immunity* 8: 157-166.

Otten, L.A., Steimle, V., Bontron, S., y Mach, B. 1998. Quantitative Control of MHC Class II Expression by the Transactivator CIITA, *Eur. J. Immunol.* 28: 473-478.

Pieters, J. 1997. MHC Class II Restricted Antigen Presentation. *Curr. Opin. Immunol.* 9: 89-96.

Piskurich, J.F., Wang, Y., Linhoff, M.W., White, L.C., y Ting, J.P.-Y. 1998. Identification of Distinct Regions of 5' Flanking DNA That Mediate Constitutive, IFN- $\gamma$ , STAT1, and TGF- $\beta$ -Regulated Expression of the Class II Transactivator Gene. *J. Immunol.* 160: 233-240.

Ramassar, V., Goes, N., Hobart, M., y Halloran, P. 1996. Evidence for the In Vivo Role of Class II Transactivator in Basal and IFN- $\gamma$  Induced Class II Expression in Mouse Tissue. *Transplantation.* 62: 1901-1907.

Reith, W., Satola, S., Herrero Sanchez, C., Amaldi, Y., Lisowska-Grospierre, B., Griscelli, C., Hadam, M.R., y Mach, B. 1988. Congenital Immunodeficiency with a Regulatory Defect in MHC Class II Gene Expression Lacks a Specific HLA-DR Promoter Binding Protein, RF-X. *Cell* 53: 897-906.

Reith, W., Kobr, M., Emery, P., Durand, B., Siegrist, C.A., y Mach, B. 1994a. Cooperative Binding Between Factors RFX and X2BP to the X and X2 Boxes of MHC Class II Promoters. *J. Biol. Chem.* 269: 20020-20025.

Reith, W., Siegrist, C.A., Durand, B., Barras, E., y Mach, B. 1994b. Function of Major Histocompatibility Complex Class II Promoters Requires Cooperative Binding Between Factors RFX and NF-Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 554-558.

Riley, J.L., Westerheide, S.D., Price, J.A., Brown, J.A., y Boss, J.M. 1995. Activation of Class II MHC Genes Requires Both the X Box Region and the Class II Transactivator (CIITA). *Immunity* 2: 533-543.

Rohn, W., Tang, L.P., Dong, Y., y Benveniste, E.N. 1999. IL-1 $\beta$  Inhibits IFN- $\gamma$ -Induced Class II MHC Expression by Suppressing Transcription of the Class II Transactivator Gene. *J. Immunol.* 162: 886-896.

Rudensky, A., Preston, H.P., Hong, S.C., Barlow, A., y Janeway, C.J. 1991. Sequence Analysis of Peptides Bound to MHC Class II Molecules. *Nature* 353: 622-627.

Sadowski, H.B., Shuai, K., Darnell, J.E.Jr, Gilman, M.Z. 1993. A Common Nuclear Signal Transduction Pathway Activated by Growth Factor and Cytokine Receptors. *Science* 261: 1739-1744.

Sartoris, S., Tosi, G., De Lerma Barbaro, A., Cestari, T., y Acolla, R.S. 1996. Active Suppression of the Class II Transactivator-Encoding AIR-1 Locus Is Responsible For The Lack of Mayor Histocompatibility Complex Class II gene Expression Observed During Differentiation From B Cells to Plasma Cells. *Eur. J. Immunol.* 26: 2456-2460.

Schindler, C., y Darnell, J.E.Jr. 1995. Transcriptional Responses To Polypeptide Ligands: The Jak-Stat Pathway. *Annu. Rev. Biochem.* 64: 621-651.

Scholl, T., Mahanta, S., y Strominger, J. 1997. Specific Complex Formation Between the Type II Bare Lymphocyte Syndrome-Associated Transactivator CIITA and RFX5. *Pro. Natl. Acad. Sci USA* 94: 6330-6334.

Shuai, K., Stark, G., Kerr, I., y Darnell, J.E.Jr. 1993. A Single Phosphotyrosine Residue of STAT91 Required for Gene Activation by Interferon- $\gamma$ . *Science* 261: 1744-1746.

Shuai, K., Horbath, C., Tsai Huang, L., Qureshi, S., Cowburn, D., y Darnell, J.E.Jr. 1994. Interferon Activation of the Transcription Factor STAT91 Involves Dimerization Through SH2-Phosphotyrosyl Peptide Interactions. *Cell* 76: 821-828.

Silacci, P., Mottet, A., Steimle, V., Reith, W., y Mach, B. 1994. Developmental Extinction of Major Histocompatibility Complex Class II Gene Expression in Plasmocytes Is Mediated by Silencing of the Transactivator Gene CIITA. *J. Exp. Med.* 180: 1329-1336.

Sims, T., Elliot, J.F., Ramassar, V., Denney, D.W., y Halloran, P.F.Jr. 1997a. Mouse Class II Transactivator: cDNA Sequence and Amino Acid Comparison With the Human Class II Transactivator. *Immunogenetics* 45: 220-222.

Sims, T., Goes, N.B., Ramassar, V., Urmson, J., y Halloran, P.F. 1997b. In Vivo Class II Transactivator Expression In Mice Is Induced by A Non-Interferon- $\gamma$  Mechanism In Response to Local Injury. *Transplantation* 64: 1657-1664.

Soh, J., Donnelly, R.J., Kotenko, S., Mariano, T.M., Cook, J.R., Wang, N., Emanuel, S., Schwartz, B., Miki, T., y Pestka, S. 1994. Identification and Sequence of an Accessory Factor Required for Activation of the Human Interferon- $\gamma$  Receptor. *Cell* 76: 793-802.

Steimle, V., Otten, L.A., Zufferey, M., y Mach, B. 1993. Complementation Cloning of an MHC Class II Transactivator Mutated in Hereditary MHC Class II Deficiency (or Bare Lymphocyte Syndrome). *Cell* 75: 135-146.



Steimle, V., Siegrist, C.A., Mottet, A., Lisowska-Groszpiere, B., y Mach, B. 1994. Regulation of MHC Class II Expression by Interferon- $\gamma$  Mediated by the Transactivator Gene CIITA. *Science* 265: 106-109.

Steimle, V., Durand, B., Barras, E., Zufferey, M., Hadan, M.R., Mach, B., y Reith, W. 1995. A Novel DNA-Binding Regulatory Factor Is Mutated in Primary MHC-Class II Deficiency (Bare Lymphocyte Syndrome). *Genes & Dev.* 9: 1021-1032.

Stuart, P.M., Yarchover, J.L., y Woodward, J.G. 1989. Negative Trans-Acting Factors Extinguish Ia Expression in B Cell-L 929 Somatic Cell Hybrids. *Cell. Immunol.* 122: 391-404.

Tanaka, N., Kawakami, T., y Taniguchi, T. 1993. Recognition DNA Sequence of Interferon Regulatory Factor 1 (IRF-1) and IRF-2, Regulators of Cell Growth and the Interferon System. *Mol. Cell. Biol.* 13: 4531-4538.

Ting, J. P.-Y., y Baldwin, A.S. 1993. Regulation of MHC Gene Expression. *Curr. Opin. Immunol.* 5: 8-16.

Trinchieri, G., y Perussia, B. 1985. Immune Interferon: A Pleiotropic Lymphokine with Multiple Effects. *Immunology Today.* 6: 131-136.

Villard, J., Lisowska-Groszpiere, B., van den Elsen, P., Fischer, A., Reith, W., y Mach, B. 1997. Mutation of RFXAP, A Regulator of MHC Class II Genes, in Primary MHC Class II Deficiency. *N. Engl. J. Med.* 337: 748-753.

Zhou, H., y Glimcher, L. 1995. Human MHC Class II Gene Transcription Directed by the Carboxyl Terminus of CIITA, One of the Defective Genes in Type II MHC Combined Immune Deficiency. *Immunity* 2: 545-553.

Zhou, H., Su, H., Zhang, X., Douhan III, J., y Glimcher, L. 1997. CIITA Dependent and -Independent Class II MHC Expression Revealed by a Dominant Negative Mutant. *J. Immunol.* 158: 4741-4749.

Ziemiecki, A., Harpur, A., y Wilks, A. 1994. Jak Protein Tyrosine Kinases: Their Role in Cytokine Signalling. *Trends Cell Biol.* 4: 207-212.

## ANEXO

SECUENCIA DEL cDNA DE CIITA MURINO Y LOCALIZACIÓN DE PARTIDORES UTILIZADOS EN EXPERIMENTOS DE RT-PCR.

1 acctgggcatctgaggactttttgagacttccggcagccaggaggggc 50  
CM 10S  
51 agctggactacagacgttactgcatcactctgctctctaaatcatgcgt 100  
101 gcctggttcctggcccttctgggtcttacctgccggagttgcaagacat 150  
151 agtctgtgtgccaccatggatctgggatctccagagggcagctacctgga 200  
201 actccttaacagtgatgcccgaeeccctaeatctctaceacctctatgacc 250  
CM 11S  
251 agatggacctggctggggaggaggagatcgaactcagctcagagccagac 300  
301 acagataccatcaactgcgaccagttcagcaagctgttgaggacatgga 350  
351 actggatgaagagacccgggaggccctatgccaacattgeggnaactggatc 400  
401 agtacgtgttccaggatacccagctcgagggcctgagcaaggacctcttc 450  
451 atagagcacattggagcagaggaaggccttggtgagnacatagagatccc 500  
501 tgtagaagcaggacagaagcctcagaagagacgcttcccggnaagagcatg 550  
551 ctatggactcaaagcacaggaagctagtgccaccctctaggacctcactg 600  
601 aactatttggatctccccactgggcacatccagatcttcaccactctgcc 650  
651 ccagggactctggcaaatctcaggggctggcacaggtctctccagtgtcc 700









4701 agtgccgctgctcctgtttcctctgggacacccccttgagetcaggeac 4750  
CM 8AS

4751 caccatccctccatcgagacagtgacagcttgctttcttgtcttggcag 4800

4801 agggagctgtgtggctccaccatgccagccctgatgccagcaggactggc 4850

4851 acatcctaggaagtgggagctgggctagagggccctggggccggggtggtc 4900

4901 tgcattggctgctgggggcgattcttaaagagacaggtccagctgcagctc 4950

4951 aggcttacattatgaactgttaggaccttgggctcagggtggcacatgga 5000  
CM 27AS

5001 agtcccatttctgtggccaccagggacagcactgaggcactctccaaggc 5050

5051 aggcattctgctgtacctgtcaggagaaaggcagatctgtatcgctcgctg 5100

5101 cctttggtctgtctggaaatgccaaaaatgtctctcattactctgtgtt 5150

5151 gaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa 5178