

UCH-FC
DOC-B
F383

EL COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD DEL RATON Y EL
SISTEMA DEL COMPLEMENTO: ESTUDIOS DE ALGUNAS MOLECULAS
MODELOS.

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 Básicas y Farmacéuticas.

por

Luis Arturo Ferreira Vigouroux

Septiembre, 1982

Director: Profesor Victor Nussenzweig

Patrocinante: Profesor Gustavo Hoecker S.

FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS Y FARMACEUTICAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

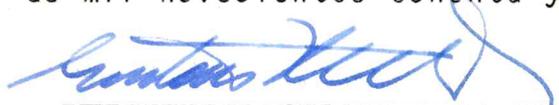
INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Comisión de Doctorado de la Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato

LUIS ARTURO FERREIRA VIGOUROUX

ha sido aprobada por la Comisión Informate de Tesis como requisito de Tesis para el Grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología en el Examen de Defensa de Tesis rendido el Jueves veintiseis de Agosto de mil novecientos ochenta y dos (26 -VIII - 1982).

Director de Tesis


Prof. Dr. Gustavo Hoecker
p. Prof. Dr. Victor Nussenzweig

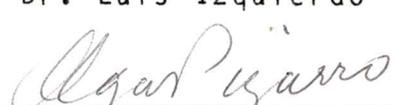
Patrocinante de Tesis


Prof. Dr. Gustavo Hoecker

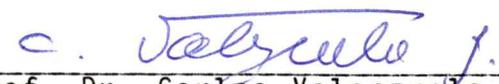
Comisión Informante de Tesis


Prof. Dr. Alfredo Ioannes


Prof. Dr. Luis Izquierdo


Prof. Dra. Olga Pizarro


Prof. Dr. Tito Ureta


Prof. Dr. Carlos Valenzuela

NEW YORK UNIVERSITY MEDICAL CENTER

A private university in the public service

School of Medicine

550 FIRST AVENUE, NEW YORK, N.Y. 10016

CABLE ADDRESS: NYUMEDIC

Department of Pathology

(212) 340- 5337

New York June 25 1982

Dr. Gustavo Hoecker
UNIVERSIDAD DE CHILE
Facultad de Medicina
Casilla 6556-Correo 7
SANTIAGO-CHILE

Dear Gustavo:

As you know, Arturo has successfully completed his doctoral thesis. Obviously it represents a series of important contributions to the understanding of the relationships between the major histocompatibility complex and the complement system. It certainly has my approval.

I regret I will not be able to attend his thesis defense and graduation exam, since several obligations will keep me in New York. I will appreciate therefore if you take over my responsibilities in this important matter.

My best regards,



Victor Nussenzweig, MD
Professor of Pathology

A la Memoria de la Señora Inés Arias de Ferreira.

AGRADECIMIENTOS

A mis profesores, Drs. Victor Nussenzweig y Gustavo Hoecker, por sus generosas e irrestrictas contribuciones a mi desarrollo.

A mi esposa por su ayuda, y compañía esenciales.

A la Dra. Alicia Ramos por su apoyo constante.

Al Dr. Luis Ferreira.

A mis padres.

A los Sres. Daniel Eichinger y Heriberto Coloma.

Esta Tesis ha sido parcialmente financiada por los siguientes Grants:

National Institutes of Health números 13224 y 24473 .

Universidad de Chile. Dirección General Académica. Departamento de Desarrollo de la Investigación, número B421-8244.

INDICE DE MATERIAS

	Página
Lista de Tablas	ix
Lista de Figuras	x
Lista de Abreviaturas	xiii
Resúmen	xiv
Introducción	1
Revisión de conceptos relevantes	3
1. Generalidades sobre familias multigénicas	3
2. Los complejos principales de histocompatibilidad.	4
2.1 Conceptos generales	4
2.2 El ratón (<u>Mus musculus</u>) como modelo experimental.	7
2.3 El complejo <u>H-2</u> . Sistema genético principal de histocompatibilidad del ratón.	10
2.3.1 Algunas definiciones sobre nomenclatura del complejo <u>H-2</u> .	13
2.3.2 Conceptos generales sobre genética, estructura y función de las cuatro clases de productos del complejo <u>H-2</u>	15
2.3.2.1 Clase I	16
2.3.2.2 Clase II	18
2.3.2.3 Clase III	20
2.3.2.4 Clase IV	37

2.3.2.5	Loci estructurales o reguladores ligados a <u>H-2</u> , de localización incierta o definitivamente fuera del complejo	40
3.	El sistema del complemento	45
3.1	Ruta clásica	46
3.2	Ruta alterna	55
3.3	Proteínas reguladoras de la actividad del complemento.	57
4.	Recapitulación de objetivos específicos.	58
	Materiales y Métodos	61
1.	Reactivos	61
2.	Soluciones tampones	62
3.	Animales	64
4.	Antisueros	66
4.1	Anti-Ss	66
4.2	Anti-Slp	81
4.2.1	Aloantisuero policlonal contra la proteína sexo-limitada.	81
4.2.2	Anticuerpos monoclonales anti-Slp	82
4.3	Anti H-2.7	84
4.4	Anti C4-bp	85
4.5	Otros antisueros	85
5.	Métodos analíticos	87
5.1	Radiomarcación	90
5.2	Inmunoprecipitación	90

5.3	Procedimientos electroforéticos	91
5.3.1	Electroforesis en geles de acrilamida	92
5.3.1.1	Electroforesis en presencia de dodecil sulfato sódico.	92
5.3.1.2	Electroforesis bidimensional	93
5.3.2	Electroforesis en agarosa	104
5.3.2.1	Inmunolectroforesis en cohete o "rocket" (RIE)	105
5.3.2.2	Inmunolectroforesis cruzada (CIE)	105
5.4	Titulación hemolítica de C4	106
5.5	Tratamiento de Ss y S1p con C1	107
5.6	Prueba de hemaglutinación	107
5.7	Prueba de inhibición de la hemoaglutinación.	108
5.8	Purificación parcial de C4d (fragmento α_2 de C4)	109
5.9	Radioinmunoensayo	109
6.	Análisis estadístico	111
	Resultados	112
1.	Los antígenos Ss y S1p son dos proteínas estructuralmente relacionadas pero funcionalmente diferentes	112
1.1	El comportamiento cromatográfico de los antígenos Ss y S1p y de la actividad hemolítica de C4 es <u>pre</u> dictible.	112
1.2	La proteína Ss está relacionada con la actividad hemolítica del cuarto componente del complemento	115

1.3	La proteína S1p no está relacionada con la actividad hemolítica de C4.	116
1.4	Ss y S1p: dos proteínas estructuralmente relacionadas pero con diferente sensibilidad a C1.	123
2.	El gen estructural del cuarto componente del complemento del ratón está ubicado en la región <u>S</u> del complejo principal de histocompatibilidad.	134
2.1	La cadena γ de C4 murino es polimórfica.	135
2.2	El gen que controla el polimorfismo de C4 está localizado en la región <u>S</u> del complejo <u>H-2</u>	143
3.	El grupo sanguíneo murino H-2.7 es un determinante aloantigénico C4d que es un fragmento del cuarto componente del complemento de esta especie.	145
3.1	La expresión de H-2.7 está relacionada con los alotipos de cadena γ del cuarto componente del complemento murino.	147
3.2	El aloantisuero contra H-2.7 inmuno precipita ("reconoce") moléculas de C4 en el plasma murino.	149
3.3	La especificidad H-2.7 está ubicada en el fragmento C4d ($\alpha 2$) de C4.	155
3.4	La expresión de los determinantes H-2.7 en la molécula de C4 está controlada por un mecanismo de efecto <u>cis</u> .	160

3.5	El determinante aloantigénico H-2.7 y la cadena de tipo γ 2 están presentes en una molécula excepcional de C4 codificada por el alelo <u>S_k</u> .	162
4.	El gen estructural de la proteína sexo-limitada del ratón (Slp) está ubicado en el complejo principal de histocompatibilidad.	165
4.1	La proteína Slp es polimórfica y el gen estructural está ubicado en el complejo <u>H-2</u> .	168
5.	Reevaluación de la sexo-limitación de la proteína Slp.	178
	Discusión	188
1.	Los antígenos Ss y Slp son dos proteínas estructurales relacionadas pero funcionalmente diferentes.	190
2.	El gen estructural del cuarto componente del complemento del ratón está ubicado en la región <u>S</u> del complejo <u>H-2</u>	197
3.	El grupo sanguíneo murino H-2.7 es un determinante antigénico de C4d que es un fragmento del cuarto componente del complemento de esta especie.	200
4.	El gen estructural de la proteína sexo-limitada (Slp) está ubicado en el complejo principal de histocompatibilidad.	209
5.	Reevaluación de la sexo-limitación de la proteína Slp.	211
6.	Los complejos principales de histocompatibilidad y el sistema del complemento: Discusión de los posibles significados biológicos, funcionales y evolutivos de esta asociación.	217
7.	Referencias.	

LISTA DE TABLAS

Tabla	Título	Página
I	Tipo de cadena γ de C4 (Ss) en ratones con diferentes alelos en la región <u>S</u> de <u>H-2</u> .	139
II	El gen que controla el polimorfismo de la cadena γ de C4 está ubicado en la región <u>S</u> del complejo <u>H-2</u> .	144
III	Relación entre las variantes de cadena γ de C4, controladas por la región <u>S</u> , y la expresión del aloantígeno H-2.7.	148
IV	Resumen de los resultados de la inmunoprecipitación de C4 y fragmentos de C4 de ratones H-2.7 positivos y negativos usando diversos antisueros específicos.	161
V	Distribución de Slp en las cepas endogámicas.	177
VI	Presencia de Slp en hembras previamente consideradas fenotípicamente negativas.	184
VII	Diferencias entre las moléculas Ss y Slp.	196.

LISTA DE FIGURAS.

Figura	Título	Página
1.	El cromosoma número 17 del ratón, el complejo <u>H-2</u> , <u>T1a</u> y otros marcadores.	11
2.	Simplificación esquemática de la activación del complemento.	47
3.	Representación esquemática del cuarto componente del complemento humano (C4) y de los fragmentos generados por acción de <u>C1s</u> , C3b-INA y C4-bp.	69
4.	Purificación cromatográfica en Sephadex G-200 del fragmento de C4c de C4 murino.	72
5.	Demostración de la monoespecificidad del antisuero anti-C4c <u>me</u> <u>diante</u> CIE.	77
6.	Demostración de la reactividad cruzada del antisuero anti-C4c con la proteína S1p mediante una combinación de CIE y RIE.	79
7.	Esquema general de la metodología usada en la búsqueda de variantes electroforéticas de Ss y S1p.	88
8.	Gradiente de pH de tres geles de IEF corridos independientemente.	99
9.	Cromatografía en Sephadex G-200 de plasma-EDTA o suero de ratones machos DBA/2J (<u>H-2_d</u>), Ss alto- <u>S1p^a</u>).	113
10.	Correlación entre el antígeno Ss y la actividad hemolítica de C4.	117

Figura	Título	Página
11.	Falta de correlación entre la concentración de antígeno S1p y la actividad hemolítica de C4.	119
12.	Correlación entre los niveles de Ss y la actividad hemolítica de C4 en plasma de diferentes cepas de ratones.	121
13.	Efecto C $\bar{1}s$ sobre las moléculas de Ss y S1p detectado en SDS-PAGE.	125
14.	Estructuras de las moléculas Ss y S1p determinadas en SDS-PAGE.	128
15.	Evaluación del efecto de C $\bar{1}s$ sobre las cadenas polipeptídicas de Ss y S1p.	131
16.	Radioautograma de IEF de C4 de ratón.	136
17.	Separación bidimensional de las cadenas γ de C4.	140
18.	Radioutograma de una gradiente lineal del 7 al 15% en SDS-PAGE de fracciones de plasma H-2.7 positivas de ratones SJL.	151
19.	Radioautografía de IEF de C4 murino.	153
20.	Radioautografía de una gradiente lineal del 7-15% en SDS-PAGE del fragmento C4d ($\alpha 2$) de C4,	158
21.	Radioautografía de IEF de C4 de ratón.	163

Figura	Título	Página
22.	Radioautografía de una gradiente de SDS-PAGE (7-15%) de C4 de ratón	166
23.	Radioautografía de un gel bidimensional de S1p purificado de ratones machos C3H.W7.	170
24.	Radioautografía de una electroforesis bidimensional de ratones machos C3H.OH.	172
25.	Radioautografía de una electroforesis bidimensional de una mezcla de S1p de ratones machos C3H.W7 y C3H.OH.	174
26.	Ensayo inmunoradiométrico (EIRM) para la detección de S1p.	181
27.	Determinación en SDS-PAGE de la estructura de cadenas polipeptídicas de la proteína S1p purificada de hembras.	185

LISTA DE ABREVIATURAS

CIE	inmunolectroforesis cruzada.
CPH	complejo principal de histocompatibilidad.
IEF	isoelectroenfoque.
RIE	rocket inmunolectroforesis.
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico.
Ss	substancia sérica.
Slp	proteína limitada al sexo.

RESUMEN

Esta disertación contribuye a la comprensión de las relaciones genéticas, estructurales y funcionales existentes entre los complejos principales de histocompatibilidad de las especies y el sistema del complemento. Se han usado como modelos al complejo H-2 del ratón y a dos especies moleculares presentes en el suero de estos animales, la substancia sérica o proteína Ss y la proteína limitada al sexo o Slp.

Ss se encuentra en todas las cepas de ratones estudiadas y sus niveles séricos son fuertemente dependientes del alelo presente en la región S, ubicada en el centro del complejo H-2. Slp ha sido descrita, con algunas excepciones, sólo en machos portadores de ciertos alelos en la región S, ya que sus niveles séricos son regulados por la testosterona.

La mayoría de los experimentos presentados aquí han tenido por objetivo ya sea la determinación de la estructura y la función o la búsqueda de variantes de estas proteínas para localizar sus genes estructurales.

Ambas proteínas fueron purificadas parcialmente mediante cromatografía en base a tamaño molecular,

radiomarcadas, inmunoprecipitadas con anticuerpos específicos y analizadas en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio. La detección de variantes estructurales se realizó mediante una modificación de la técnica electroforética bidimensional de O'Farrell y las funciones de Ss y Slp se estudiaron en ensayos para proteínas del complemento.

Los resultados demuestran que Ss y Slp son dos proteínas estructuralmente relacionadas pero funcionalmente diferentes. Ambas tienen un peso aproximado de 200 kilodaltons, son reconocidas como idénticas por heteroantisueros, están formadas por tres cadenas polipeptídicas designadas α , β y γ , con pesos de 98, 77 y 34 kilodaltons para Ss y 105, 74,5 y 32 kilodaltons para Slp. Ss tiene todas las propiedades del cuarto componente del complemento: es activado por $C\bar{3}$, tiene actividad hemolítica de C4 y afinidad por C4-bp que es una proteína reguladora de la actividad de C4. Slp carece de estas propiedades y su función sigue siendo desconocida.

Tres variantes estructurales de la cadena de C4 fueron detectadas ($\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$) y el control de este polimorfismo fue localizado en la región S de H-2. La caracterización de este polimorfismo permitió resolver el problema del grupo sanguíneo murino H-2.7 (controlado por la región G de H-2), ya que corresponde a una variación aloantigénica del fragmento C4d de la cadena γ de una de las

variantes de C4 (γ 1). En base a estos resultados se propone la eliminación de la región G.

La cadena γ de S1p presentó dos variantes electroforéticas controladas a la izquierda de la región D. La variante γ 1 fue detectada en cepas en que la expresión de S1p está limitada al sexo mientras que la variante γ 2 fue detectada sólo en las cepas B10.WR7 y C3H.W7 donde la molécula es constitutiva.

Finalmente, la producción de anticuerpos monoclonales contra diversos epitopos de S1p permitió el uso de un método inmunoradiométrico de alta sensibilidad con el cual se reevaluó la sexo-limitación de esta proteína. Se concluyó que S1p está presente en hembras en concentraciones que varían entre 0.2 y 1% de las de los machos. Por lo tanto, S1p no está limitada al sexo y el control de la testosterona sobre sus niveles no es fundamentalmente diferente del efecto de esta hormona sobre componentes de complemento tales como C5, C6 o C4-bp.

Del conjunto de estos resultados se puede concluir que Ss y S1p representan probablemente el producto de genes mutados y duplicados, estrechamente ligados en la región S de H-2. Ss conservó la función de C4 mientras que S1p no tiene función conocida.

Las conclusiones de esta disertación contribuyen a dar validez a la generalización de que todos

Los componentes del complemento que participan en la activación del tercer componente, o sea C4, C2 y el factor B, han sido localizados sin excepción en el complejo principal de histocompatibilidad de diversas especies de mamíferos. De estos componentes sólo el factor B y C2 están estructuralmente relacionados, pero ninguno de ellos está relacionado con otros productos del complejo H-2 (clase I o II), por lo cual sus ligamientos a este segmento cromosómico no puede explicarse por duplicación génica. No puede descartarse entonces la posibilidad de que la presencia de estos genes en los complejos principales de histocompatibilidad represente el resultado de alguna forma de presión selectiva.

ABSTRACT

This dissertation is concerned with the understanding of the genetic, structural and functional relationships between the major histocompatibility complexes of the species and the complement system. As models the H-2 complex of the mouse and two molecular species in the serum of these animals, the serum substance or Ss protein and the sex-limited protein or Slp, have been used.

Ss is present in all the mouse strains studied and its serum levels are strongly influenced by the allele present in the S region, located in the middle of the H-2 complex. With some exceptions and due to the testosterone regulation of Slp serum levels, this molecule is detected only in males carrying certain alleles in the S region.

The objective of most of the experiments presented here has been either to determine the structure and function or the search for variants of these proteins in order to locate their structural genes.

Both proteins were partially purified by molecular sieving chromatography, radiolabelled, immunoprecipitated with specific antibodies and analysed in polyacrylamide gels

in the presence of sodium dodecyl sulphate. The detection of structural variants was achieved by using a modification of the O'Farrell two-dimensional electrophoretic technique and the functions of Ss and Slp were studied in hemolytic assays for complement proteins.

The results show that Ss and Slp are structurally related but functionally different proteins. Both have a molecular weight around 200 kilodaltons and are recognized as identical by heteroantisera. Both are formed by three polipeptidic chains called α , β and γ , with molecular weights of 98, 77 and 34 kilodaltons for Ss and 105, 74.5 and 32 kilodaltons for Slp. Ss has all the properties of the fourth component of complement: is activated by C1s, has C4 hemolytic activity and has affinity for C4-bp. This is a protein that regulates C4 activity. Slp lacks these properties and its function is still unknown.

Three structural variants of the γ chains of C4 were detected (γ 1, γ 2, and γ 3) and the control of this polymorphism was located in the S region of the H-2 complex. The characterization of this polymorphism led to the solution of a problem related with the murine H-2.7 blood group (controlled by the G region of H-2), since it was determined that it is an alloantigenic variation located in the C4d fragment of the α chain from one of the C4 variants (γ 1). Based on these results, the elimination of the G region from the H-2 complex is proposed.

Two electrophoretic variants of the γ chain S1p were detected. The control of this variation was located to the left of the D region. The γ 1 variant was detected in all strains where the S1p expression is sex-limited. The γ 2 variant was detected only in the B10.WR7 and C3H.W7 strains where the molecule is constitutive.

Finally, the production of monoclonal antibodies against various epitopes of S1p allowed the use of a high-sensitivity immunoradiometric assay which allowed the reassessment of the sex-limitation of this protein.

It was concluded from these studies that females have 0.2 to 0.1 % of the S1p present in males. Thus, the protein is not sex-limited and its testosterone dependence is not fundamentally different from the effect of this hormone on complement components such as C5, C6 or C4-bp.

From these results it can be concluded that Ss and S1p are probably products of mutated and duplicated genes, tightly linked in the S region of H-2. One of these products (Ss), kept the C4 function while the function of the other is still unknown.

The conclusions of this thesis are in agreement with the generalization that all the complement components participating in the activation of the third component, that is C4, C2 and factor B. have been located, with no exception,

in the major histocompatibility complex of several mammalian species. From these components only factor B and C2 are structurally related, but none of them is related with the other products of H-2 (class I or II).

Therefore, their linkage to this chromosome segment can not be explained by gene duplication. Accordingly, the possibility that the presence of these genes in the major histocompatibility complexes is due to some sort of selective pressure, can not be ruled out.

INTRODUCCION

La existencia misma de todas las especies vertebradas depende, en gran medida, de la disponibilidad de mecanismos vitales de vigilancia que les permiten defenderse de la agresión patógena constante perpetrada por virus, bacterias, parásitos y células neoplásicas. El sistema inmune proporciona estos mecanismos involucrando, por lo menos, a tres grupos principales de entidades: células inmunocompetentes, anticuerpos y a un grupo complejo de proteínas séricas conocidas como sistema del complemento.

La evolución que muestra el sistema inmune, formado por estas tres entidades, ha permitido resolver el problema vital de reconocer a una enorme variedad de estructuras moleculares con las cuales contacta por primera vez. En otras palabras, ha adquirido la eficiencia en discriminar entre lo propio y lo ajeno a través de respuestas que implican variaciones en estados activos de tolerancia e inmunidad.

El control genético que, en primera instancia, determina el resultado de la respuesta inmune, está representado por un gran número de genes reguladores y estructurales dispersos en el genoma o agrupados en familias multigénicas.

Una parte importante de estos genes han sido caracterizados de acuerdo a la genética clásica y comienza a emerger la definición genético-molecular de algunos de ellos.

Durante los últimos 7 años, se ha acumulado una gran cantidad de información relacionada con el ligamiento entre los elementos genéticos estructurales de algunas proteínas del sistema del complemento y lo que parece ser una serie de familias multigénicas, incluidas en el complejo principal de histocompatibilidad de las especies. (C.P.H.)

Esta disertación analiza las relaciones entre el complejo principal de histocompatibilidad del ratón, o complejo H-2, y el control de algunas proteínas seleccionadas del complemento.

REVISION DE CONCEPTOS RELEVANTES

1. Generalidades sobre familias multigénicas.

Las familias multigénicas son una unidad fundamental de organización genética y evolución en eucariontes. Se caracterizan por exhibir cuatro propiedades fundamentales: multiplicidad genética, ligamiento estrecho de sus elementos, homología de la secuencia aminoacídica primaria de sus productos y funciones relacionadas e incluso duplicadas (1).

Aparte de los C.P.H. existen otros grupos de familias multigénicas entre los que se destacan las de RNA ribosomal (2), de RNA de transferencia (3), las de histonas (4), de las globinas de tipo β (5), de los satélites de DNA (6) y de las moléculas de anticuerpos (7). El número de genes de estas familias puede variar desde unos pocos a varios cientos.

Las familias multigénicas no han sido definidas en procariontes. El origen de estas familias en los organismos multicelulares puede estar dado por la duplicación de un solo gen o la duplicación en parte o en total de una familia preexistente, a través de mecanismos tales como crossing-over homólogo desigual, tetraploidización o duplicación y translocación de una porción de cromosoma (8).

El origen de una familia multigénica a partir de un gen requiere de un largo período de evolución. En cambio, la duplicación de una familia multigénica completa podría generar nuevas familias a partir de un solo suceso genético. Este tipo de duplicación está claramente ilustrado por las relaciones de homología existentes entre las familias de genes de anticuerpos, lo que sugiere que todas ellas se derivaron de una familia multigénica ancestral (9).

Los productos génicos de una nueva familia multigénica pueden interactuar con los productos de la familia ancestral y resultar de ello una unidad molecular funcional, como en el caso de las cadenas livianas y pesadas de las moléculas de los anticuerpos, que son el producto de dos familias de genes independientes (10). Alternativamente, la magnitud del cambio operado en la nueva familia puede ser tal que determine nuevas funciones.

2. Los complejos Principales de Histocompatibilidad de las especies (C.P.H.).

2.1. Conceptos Generales.

Durante los últimos 15 años se ha establecido que una variedad importante de fenómenos inmunológicos están controlados por un grupo de genes presentes en todos

los mamíferos, con una localización cromosómica definida.

Los C.P.H. fueron detectados originalmente por su participación en el rechazo rápido de alotransplantes (transplantes entre dos individuos genéticamente diferentes, de la misma especie). Los antígenos presentes en el tejido del donante que inducen una respuesta inmune en el huésped, se llaman antígenos de histocompatibilidad y son el producto de los genes de histocompatibilidad localizados en los C.P.H.. El C.P.H., en todas las especies estudiadas, corresponde a un segmento cromosómico que contiene un número de genes estrechamente ligados, cuya característica más notable es su alto polimorfismo dentro de una misma especie. Los genes clásicamente definidos en los C.P.H. tienen alguna relación con funciones inmunológicas o de reconocimiento celular. Estas funciones se realizan mediante interacciones moleculares que ocurren a nivel de superficies celulares o entre células y factores solubles.

Aparte de los antígenos de histocompatibilidad, se han caracterizado otros tipos de moléculas codificadas también en los C.P.H.. Se trata de los antígenos Ia, de los antígenos Qa y TL y de algunos componentes del sistema del complemento. El grueso de la evidencia actual indica que los antígenos Ia son el

producto de los genes de respuesta inmune (Ir). Los antígenos Ia y los antígenos de transplante parecen ser estructuras de reconocimiento que determinan el resultado de las interacciones entre los elementos celulares del sistema inmune (células derivadas del timo, o células T, células derivadas de la médula ósea, o células B, y macrófagos).

Los antígenos Qa y TL, cuyos genes estructurales también se consideran parte de H-2, se expresan en células linfóideas. Su función es desconocida.

El aspecto de los C.P.H. de importancia central en esta disertación, es la presencia de genes responsables del control de algunos componentes especiales del sistema del complemento. Este control se realiza tanto a nivel estructural como regulatorio y será discutido, cuando sea posible, en el contexto de los otros genes del complejo, especialmente aquellos cuyos productos sean conocidos. Esto hace necesario el incluir en esta introducción una revisión sumaria de conceptos generales sobre estructura y función del complejo H-2.

La posición relativa de los cuatro tipos de genes mencionadas anteriormente, varía en las diferentes especies. Los C.P.H. mejor estudiados son el murino (H-2) y el humano (HLA). En el trabajo descrito

aquí, se ha usado el ratón como modelo experimental con el convencimiento de que, con muy pocas excepciones, este modelo tiene validez biológica general. El rol del C.P.H. humano en inmunobiología general y en el sistema del complemento en particular, ha sido revisado en excelentes publicaciones recientes (11-12).

2.2. El ratón (*Mus musculus*) como modelo experimental.

Esta especie animal reúne varias ventajas que la han hecho adecuada para ser usada como modelo experimental en este trabajo.

Aparte de características ventajosas generales como tamaño conveniente, fertilidad, gestación corta y facilidad relativa de mantención, el ratón es una especie en la cual es posible controlar un gran número de variaciones genéticas de interés biológico y biomédico general.

A partir de 1930, una de las preocupaciones principales de los genetistas de vertebrados ha sido el estudio de la herencia y la localización de variaciones en cepas cuyo proceso de endocruza estaba en desarrollo en aquella época. El estudio del efecto de genes aislados se ha acumulado ya durante casi 7 décadas y, retrospectivamente, se puede asegurar que constituye la contribución principal del ratón a la genética clásica

y moderna. En 1935, existían 11 loci y 5 grupos de ligamiento, el primero de los cuales fue establecido por Haldane y colaboradores en 1915 (13). En 1965 existían 162 loci definidos en el ratón. En 1979 el número aumentó exponencialmente a 423 (14). Si se considera esta tendencia y la estimación que el número de genes estructurales en el genoma murino es superior a 30.000 (15), se puede predecir que durante la próxima década la cantidad de información a obtener será impresionante.

Los 423 loci identificados hasta ahora, están distribuidos homogéneamente en los 20 cromosomas de esta especie.

El conocimiento de la naturaleza físico-química y función de los productos génicos de un número importante de estos loci también ha aumentado considerablemente durante los últimos años. Esto se debe a tres hechos fundamentales: primero, la disponibilidad de cepas endocruzadas; segundo, el desarrollo de cepas congénicas y congénicas recombinantes, gracias al esfuerzo pionero del Dr. George D. Snell en el Laboratorio Jackson en Bar Harbor, Maine, y tercero, la incorporación de una importante variedad de métodos y técnicas bioquímicas y moleculares a los estudios genéticos.

En resumen, el ratón es la especie ideal para los estudios de genética del sistema del complemento

presentados aquí, ya que existe un extenso conocimiento de su genética general y de su C.P.H. en particular. Existen más de 200 cepas endocruzadas, por lo menos 15 haplotipos H-2 independientes, 60 recombinantes intracomplejo H-2 y más de 20 mutantes H-2. Por otra parte, más de 400 loci han sido ubicados fuera de H-2 y más de la mitad de estos han sido localizados a nivel cromosómico. Por último, todos los cromosomas del ratón son identificables citológicamente.

A pesar del cuadro favorable presentado en los párrafos anteriores, la mayor parte del conocimiento de la estructura molecular e interacciones de los componentes del complemento no se ha obtenido del ratón, sino fundamentalmente de suero humano y de cuy. Así, si bien el conocimiento del C.P.H. del ratón es el más completo, el progreso en el conocimiento de su sistema del complemento se ha visto seriamente entorpecido por dificultades en la purificación y en el ensayo funcional de sus componentes. Una gran parte de estas dificultades se deben al pequeño volúmen de sangre obtenible de estos animales. Las dificultades que presenta el cuy derivan fundamentalmente de la falta de estandarización genética en esta especie. En humanos, a pesar de las facilidades para obtener grandes volúmenes de suero, las dificultades genéticas son

obvias. Por estos motivos, en este trabajo se plantea aumentar nuestro conocimiento del sistema del complemento del ratón en sus aspectos funcionales y estructurales, para comprender los mecanismos genéticos que participan en el control del sistema.

2.3. El complejo H-2. Sistema genético principal de histocompatibilidad del ratón.

Existen por lo menos 20 loci de histocompatibilidad, diferentes de H-2, asignados a cromosomas individuales del ratón (16). Todos estos loci codifican antígenos de histocompatibilidad y median el rechazo lento (mas de tres semanas) de alotransplantes. El estudio de estos complejos menores de histocompatibilidad se ha visto dificultado por la falta de métodos serológicos rápidos para su análisis. Hasta ahora, su detección puede realizarse solo por medio de transplantes de tejidos.

Mientras los complejos menores de histocompatibilidad están ubicados en diferentes partes del genoma del ratón, el complejo principal ocupa una región cromosómica única y existen, además del transplante de tejidos, otros métodos para su detección (17-18).

La Fig. 1 representa un mapa del cromosoma número 17 del ratón. El complejo H-2 está ubicado en

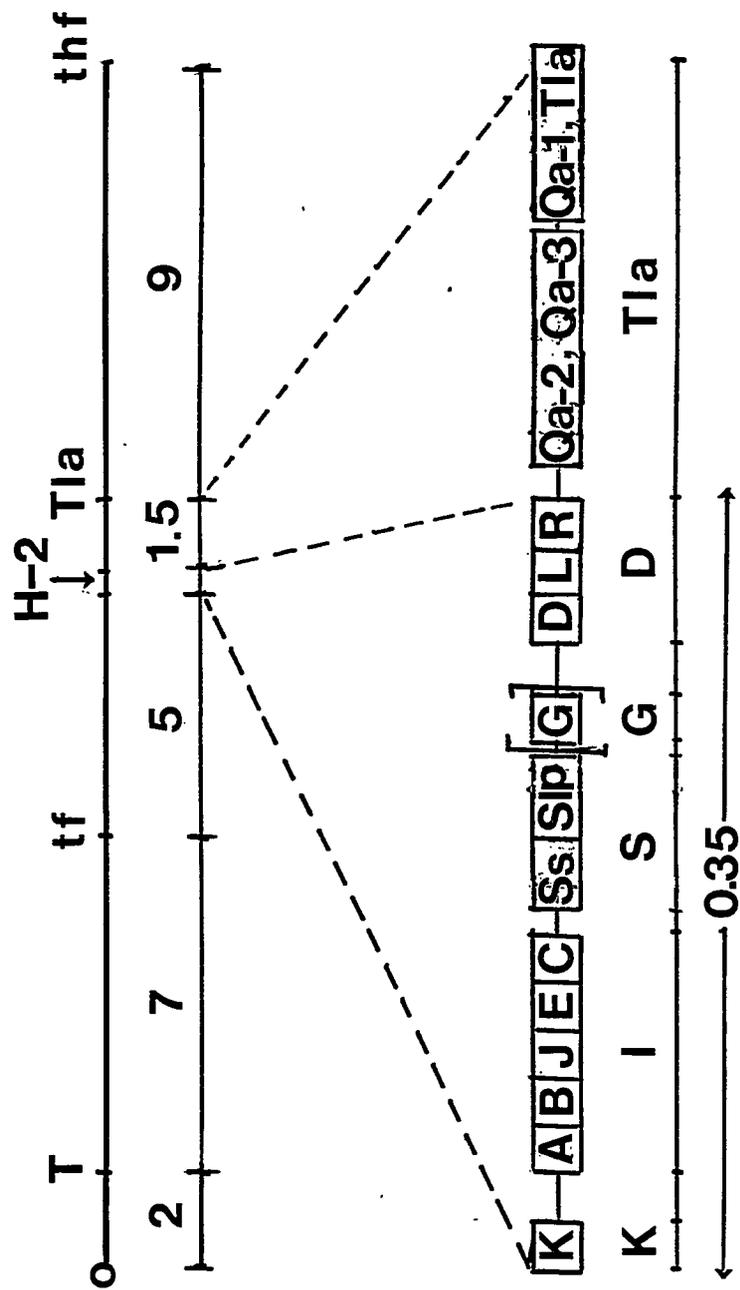


Figura 1

Figura 1: El cromosoma número 17 del ratón, el complejo H-2, T1a y otros marcadores. I, tf y thf representan a los marcadores "brachyury", "tufted" y "thin fur". Los números representan las distancias en centimorgans entre los diferentes marcadores. Los complejos H-2 y T1a han sido ampliados. El orden relativo de los loci D, L, R y de los loci Ss y Slp es desconocido. (El locus G ha sido incluido entre paréntesis en este mapa sólo como ilustración histórica. Experimentos presentados en la sección Resultados demuestran que este locus no existe.

el brazo derecho de este cromosoma, a 14 centimorgans del centrómero. Los límites del complejo, por ahora están dados por las regiones K y T1a, separadas por 1.5 centimorgans. Este segmento cromosómico tiene suficiente DNA para codificar 1600 polipéptidos de 1000 residuos aminoacídicos cada uno (9). Sin embargo solo 10 productos génicos de este complejo han sido caracterizados estructuralmente y de otros 5 se conocen solo rasgos funcionales. Este complejo genético ha sido objeto de intenso estudio por muchos laboratorios y durante los últimos 7 años, se han publicado extensas revisiones (17, 19-24). La información acumulada sobre el sistema H-2 permite asegurar que constituye el segmento cromosómico mejor caracterizado de las especies vertebradas.

2.3.1 Algunas definiciones sobre la nomenclatura del complejo H-2.

Dadas las relaciones estructurales entre los productos de los loci K, D, L, Qa y T1a (25-29), la nomenclatura más reciente limita el complejo H-2, al segmento cromosómico que abarca desde el locus K al locus T1a. El material genético presente en todas estas regiones parece cumplir con la definición de familia multigénica presentada anteriormente. Sin embargo, debido a lo limitado de la caracterización

Locus, se define como un lugar cromosómico que controla un carácter único. La individualidad del locus puede estar definida por sucesos recombinativos o, en genética moderna de H-2, por la individualidad estructural de su producto génico. El concepto de locus hará frecuentemente innecesario el uso en este trabajo del término región y subregión.

Alelos, son formas alternativas de material genético en un locus determinado. Por ejemplo Ssk, Ssb, Ssj y Ssf, son algunos de los alelos posibles en el locus Ss.

Según Klein y colaboradores (21) los loci se pueden agrupar en clases de acuerdo a sus homologías estructurales y/o funcionales. Actualmente se distinguen cuatro clases: clase I, (K, D, L, R,); clase II, (A α , A β , E β , B, J, E α , C,); III) Ss, Slp,) y IV (Qa, T1a). La asignación del locus G a la clase III es problemática. (En esta disertación se objetará experimentalmente la existencia de este locus).

2.3.2. Conceptos generales sobre genética, bioquímica y función de las cuatro clases de productos génicos del complejo H-2.

2.3.2.1 Clase I: Los loci de clase I mejor caracterizados son los K y D. Los productos génicos de estos loci corresponden a proteínas integrales de membranas con peso molecular de 45.000 daltons. Estas moléculas forman dímeros a través de una asociación no covalente con la β_2 -microglobulina cuyo gen estructural está ubicado en el cromosoma número 2 del ratón (30). La actividad antigénica y biológica de los antígenos H-2 residen en la cadena pesada.

Las relaciones estructurales entre algunos de los loci H-2 estudiados hasta ahora, indican que probablemente corresponden a genes duplicados (31). Uno de los aspectos más notables de estos loci es su extenso polimorfismo, ya que desde el punto de vista serológico se han definido aproximadamente 50 alelos en cada locus (32). Estudios de secuencia aminoacídica limitada sugieren que este polimorfismo puede explicarse por lo menos en parte, por diferencias en la estructura primaria (31). Este extenso polimorfismo ha estimulado a algunos investigadores (33-34) a proponer una hipótesis alternativa a la alélica. Básicamente, esta hipótesis postula que en las regiones K y D hay grupos de genes reguladores estrechamente ligados y polimórficos. Dos hechos experimentales apoyan este hipótesis: primero, los productos de los alelos presentes en K o D difieren

en 15 a 20 por ciento de los aminoácidos, mientras que los productos de alelos de otros loci difieren en uno o pocos aminoácidos (31, 34). Segundo, ciertos tumores murinos expresan determinantes antigénicos de clase I correspondientes a alelos que la cepa normal no posee (35). Esto se debería a que el fenómeno neoplásico activaría genes H-2 normalmente silentes en esa cepa. Este problema probablemente se aclarará con la información proveniente de las técnicas de clonamiento de DNA.

La función de las moléculas de clase I es aún tema de controversia. Klein y colaboradores (21) proponen que la participación de estas moléculas en el rechazo de alotransplantes (36), en la inducción de linfolisis en cultivo mixto (37-38) y en la reacción del transplante contra el huésped (39), constituyen situaciones artificiales creadas por el investigador. Estos (21) y otros (40) autores proponen que la verdadera función de las moléculas de clase I es servir como marcadores de lo propio ("self") en el reconocimiento de células con alteraciones en sus propiedades de superficie. Esta generalización se basa principalmente en las observaciones de Zinkernagel y Doherty en 1974 (40), quienes describieron las propiedades restrictivas de las moléculas de clase I en la respuesta de las

células T a antígenos virales.

2.3.2.2. Clase II: Los loci de clase II participan en el control de diversas funciones inmunológicas tales como respuesta inmune e interacciones entre células T, células B y macrófagos (41-42).

Aunque no todos los genes de respuesta inmune (Ir) están ubicados en H-2, McDevitt y colaboradores (43-44) demostraron que una parte importante de estos loci están en la región I, ubicada entre las regiones K y S del complejo. A pesar de la aparente variedad de funciones controladas por esta región, los únicos productos génicos identificados inmunológicamente hasta el momento son los antígenos Ia, que son codificados por loci identificados en las sub-regiones I-A e I-E de la región I (45).

Los antígenos Ia son muy polimórficos serológicamente y hay consenso entre los diferentes grupos de investigadores que estos antígenos, se expresan fundamentalmente en linfocitos B. La presencia de estos antígenos, en cantidades mucho menores, en otros tejidos ha sido tema de controversia durante los últimos cinco años. Sin embargo, parece cierta su presencia además en macrófagos y células epidérmicas (46). Se trata de proteínas integrales

de la membrana plasmática, formadas por dos subunidades de pesos moleculares aproximados de 35.000 y 28.000, llamadas α y β respectivamente y asociadas en forma no covalente (47).

Es muy probable que los cuatro polipéptidos, A_α , A_β , E_β y E_α , sean codificados por cuatro loci diferentes, los tres primeros en la sub-región IA y el cuarto en la subregión IE. Las cadenas α y β forman dímeros funcionales que se insertan normalmente en las membranas plasmáticas. Uno de estos dímeros ($A_\alpha - A_\beta$) es codificado en la subregión IA. El otro, $E_\alpha - E_\beta$ es codificado por dos subregiones diferentes, IE e IA respectivamente. De hecho, ambas regiones deben complementarse en cis o trans para producir un dímero funcional (48).

Con respecto a las subregiones IB, IJ e IC se conocen sólo rasgos funcionales, ya que sus productos génicos no han sido caracterizados y, más aún, sus existencias como loci independientes han sido seriamente objetadas (21).

En cuanto a la función de la región I, la asociación más directa entre genes Ir y antígenos Ia fue descrita originalmente por Schwartz y colaboradores (49) quienes demostraron que la respuesta proliferativa de células T, inducida antigénicamente in vitro, puede ser inhibida por anticuerpos anti Ia.

Más aún, cuando la respuesta estudiada es controlada por genes Ir específicos, la inhibición anti Ia muestra especificidad de haplotipo; en otras palabras, la respuesta proliferativa de linfocitos T provenientes de híbridos F1 (respondedor x no respondedor), sensibilizados, puede ser bloqueada sólo por anticuerpos dirigidos contra antígenos Ia codificados por los alelos del padre respondedor.

Estos experimentos implican, por primera vez, a productos génicos de la región I en el desarrollo de la respuesta inmune. Se desconoce el mecanismo íntimo mediante el cual estos productos génicos median la respuesta inmune. Sin embargo, en términos generales, se puede establecer que el proceso gobernado por los genes Ir (muy probablemente a través de las moléculas Ia) es el control de la respuesta inmune de células T. En otras palabras la producción de anticuerpos se afecta sólo como resultado de la necesidad de la presencia de células T ayudantes ("helper") para la respuesta de las células B (22).

2.3.2.2 Clase III. Estas moléculas, controladas por la región S del complejo H-2, constituyen el tema central de esta tesis.

La proteína Ss (substancia sérica) : La primera definición de la región S fue hecha por Shreffler y Owen (50) hace casi 20 años, durante la búsqueda de variantes serológicas proteicas en el ratón. El modelo experimental consistía básicamente en inocular conejos con fracciones globulínicas de suero de ratón. El suero inmune de los conejos era probado en un sistema simple de inmunodifusión en agar. Como era predecible, la respuesta de los conejos fue muy heterogénea, dado la complejidad de la mezcla inoculada. Numerosas líneas de precipitación fueron identificadas en diversas cepas de ratón y, aunque no se detectaron las variaciones cualitativas buscadas, estos autores hicieron una observación muy importante: una de las líneas de precipitación presente en animales DBA/2 (H-2^d), dió una reacción de identidad con una línea mucho más débil presente en animales CBA (H-2^k). Esto sugirió que el antisuero de conejo reconoció, entre otras proteínas, a una cuyos niveles séricos eran notoriamente diferentes en éstas dos cepas de ratones. Cuando se probó en este sistema a un híbrido DBA/CBA (H-2^d/H-2^k), se obtuvo una línea de intensidad intermedia y antigénicamente idéntica a la de los parentales. La notoria diferencia cuantitativa permitió a Shreffler y Owen absorber

el suero anti DBA con suero CBA y obtener así un producto operacionalmente monoespecífico contra una proteína que denominaron substancia sérica o Ss.

Estos mismos autores estudiaron la segregación de Ss en retrocruzas y F2 entre DBA/2 y CBA, usando el antisuero monoespecífico anti-Ss. Estos estudios permitieron determinar tres fenotipos: Ss alto, Ss bajo y Ss intermedio. La segregación en ambos tipos de cruzas concordó con un sistema de un locus y dos alelos codominantes: Ss^h (Ss alto) y Ss^l (Ss bajo), provenientes de los haplotipos d y k respectivamente.

El estudio de otras cepas con este mismo antisuero permitió clasificarlas en dos grupos principales: aquellas con altos niveles (SsH) y aquellas con bajos niveles (SsL) de Ss. En ese momento se hizo evidente rápidamente, que todas las cepas SsL eran portadores del haplotipo H-2^k o habían derivado de alguna manera por recombinación intra-H-2 del haplotipo H-2^k. Esta observación sugirió una asociación o ligamiento entre los genes que controlan las extensas variaciones cuantitativas de Ss y el complejo H-2. Los estudios de este ligamiento implicaron varias combinaciones de cepas y no tardaron en producir los resultados esperados (51-52). El

análisis de más de 1000 segregantes sugirió un estrecho ligamiento entre el gen que regula esta variación cuantitativa de Ss y el complejo H-2. Más aún, la única manera de interpretar los resultados obtenidos era asumir que el locus Ss está ubicado dentro de H-2 y que las escasas recombinaciones observadas se explican por crossing-over intra H-2. Esto permitió establecer la posición del locus Ss dentro del complejo (no se observaron) recombinaciones entre Ss y el complejo completo). Estos resultados fueron ampliamente confirmados mediante el uso de cepas congénicas y congénicas recombinantes (53-54).

La diferencia descrita originalmente entre cepas con altos niveles y cepas con bajos niveles de Ss fue estrictamente cuantitativa. Las cepas con altos niveles demostraron tener entre 10 a 20 veces más Ss que las cepas con bajos niveles (50). La técnica de doble inmunodifusión usada no detectó variantes estructurales, lo cual dejó sin responder la pregunta si el gen presente en el centro de H-2 es en realidad el gen estructural de Ss. (Podría tratarse, por ejemplo, de un gen que regulara la síntesis o el catabolismo de Ss estando el gen estructural de esta proteína en otra parte del genoma). Esta pregunta quedó abierta a la investigación y constituye uno de los objetivos específicos de esta tesis.

La proteína Ss se expresa fundamentalmente en el suero. Su distribución tisular difiere radicalmente de la distribución de otros productos del complejo H-2 (moléculas de clase I y II). La proteína Ss ha sido detectada en el citoplasma de las células del parénquima hepático (55). Esta detección se logró incubando primero el tejido con el suero de conejo anti-Ss y luego con un conjugado de fluoresceína y anticuerpos de cabra anti-inmunoglobulina de conejo. La tinción específica citoplasmática también se observó en macrófagos obtenidos de diversas fuentes. La presencia de la proteína Ss en el citoplasma de estas células representa seguramente un estado previo a su secreción. Por otra parte, las únicas células que parecen expresar Ss en su superficie son los fibroblastos (55). Se desconoce el rol que estas moléculas juegan en la superficie de estas células.

Las primeras versiones sobre las propiedades fisicoquímicas de la proteína Ss fueron muy confusas. Shreffler y Passmore (56) describieron la sustancia sérica como una proteína con un peso molecular extremadamente variable, entre 150.000 y 1.200.000 daltons. El tratamiento con mercaptoetanol disocia esta sustancia en subunidades de peso 75.000. Este

mismo efecto se lograba dializando la proteína contra cloruro de sodio 1M . La actividad antigénica parecía conservarse en un amplio rango de concentración salina y pH. Además, la actividad antigénica se conservaba después de tratar la sustancia a 70°C durante 20 minutos. Cuando estos autores (56) sometieron suero a separación inmunolectroforética determinaron que la sustancia Ss tiene una movilidad de tipo β . Cuando el mismo suero se separó en columnas de Sephadex G-200 la actividad antigénica de Ss fué detectada principalmente en el volúmen de exclusión y una proporción menor en la región incluida. Diversos intentos de purificación por estos mismos autores, usando cromatografía por filtración en geles de DEAE-Sephadex, resultaron solo en purificación parcial de la sustancia Ss y no se obtuvo información con respecto a su posible función. Los esfuerzos para caracterizar esta sustancia sérica fueron retomados en 1975 por Capra y colaboradores (57). Estos investigadores usaron una combinación de cromatografía en columnas de Sephadex G-200 y DEAE-Sephadex, seguida por radiomarcación con yodo, inmunoprecipitación y electroforesis en geles de acrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico.

Este trabajo mostró que la substancia Ss tendría un peso de 120.000 daltons y estaría compuesta de subunidades de pesos 46.000, 35.000, 23.000 y 14.000. El peso de la substancia sin reducir sugirió a estos autores que podría tratarse del segundo componente del complemento (C2), considerando además que la deficiencia de C2 en humanos está ligada a HLA (58).

La primera indicación de una posible relación entre la proteína Ss y el sistema del complemento fué presentada por Démant y asociados en 1973 (59). Estos autores demostraron que la actividad hemolítica total del complemento en suero de ratones está relacionada directamente con los niveles de Ss, pero no presentaron datos con respecto a ningún componente particular.

En 1975, Meo y asociados (60) obtuvieron resultados que sugirieron una relación entre la substancia Ss y el cuarto componente del complemento humano (C4). Estos investigadores detectaron una reacción cruzada, en geles de agar, entre anti-Ss y C4 humano y entre anti-C4 humano y Ss. Estos experimentos demostraron que Ss y C4 humano comparten determinantes antigénicos, pero no se aclaró el problema de la identidad a nivel estructural y funcional.

Curman y asociados (61) observaron que anti-Ss reconoce una proteína de peso 200.000 en plasma tratado con EDTA. Además la proteína Ss purificada por inmunoabsorción inhibe la unión de C4 humano (radiomarcado) con anti-C4 humano y anti-C4 humano inhibe la reacción entre Ss y anti-Ss. Más aún, un suero al cual se le extrajo Ss no presentó actividad hemolítica de C4. Estos autores no presentaron estudios estructurales y funcionales directos.

Lachmann y colaboradores (62), también en 1975, publicaron resultados que, aunque indirectos, sugirieron nuevamente una relación funcional entre Ss y C4. Al comparar animales con altos y bajos niveles de Ss no encontraron diferencias cuantitativas notorias en la función de varios componentes del complemento: C1, inhibidor del C1, inactivador de C3b, C5-C9, factor B y factor D. En cuanto al tercer componente (C3), sus niveles inmunoquímicos fueron ligeramente más altos en la cepa con bajos niveles de Ss. Por lo tanto, estos experimentos sugieren, por exclusión, que la proteína Ss corresponde funcionalmente al cuarto (C4) o segundo (C2) componente del complemento. Para discernir entre estas dos

posibilidades, estos autores (60) incubaron eritrocitos sensibilizados con anticuerpos específicos (EA) y suero con altos o bajos niveles de Ss pero deficiente en C5. De este modo se logra la incorporación a los eritrocitos de los componentes 1, 4, 2 y 3 (EAC¹⁴²³). Estos eritrocitos fueron incubados con anti-Ss y la hemoaglutinación fué directamente proporcional a los niveles de Ss presente en los sueros usados para tratar a EA. Cuando se incubaron EA y sueros con altos niveles de Ss y luego se les trató con EDTA (para remover C1 y C2), la reacción con anti-Ss no fué afectada.

Considerando en conjunto los experimentos de estos tres laboratorios (60-62) se planteó una seria posibilidad de que Ss fuera en realidad el cuarto componente del complemento.

Sin embargo, en 1978 Goldman y colaboradores (63) objetaron la posible relación entre Ss y C4 ya que al fraccionar plasma de ratón en cromatografía de intercambio iónico y filtración en gel ellos pudieron separar la actividad antigénica de Ss de la actividad hemolítica de C4. Más aún, encontraron que al tratar EAC¹⁴² preparado con suero de ratón deficiente en C5 con EDTA, se perdía la actividad de todos los componentes conocidos del

complemento pero estas células aún conservaban la propiedad de reaccionar con anti-Ss. Por otra parte, cuando estos investigadores trataron el suero de ratón con amonio (que destruye selectivamente a C4 de cuy y humano) no lograron destruir la actividad hemolítica de C4. Además, este mismo suero fué incapaz de generar células aglutinables con anti-Ss. Estas observaciones son evidentemente contradictorias con aquellas de los autores mencionados anteriormente (60-62), pero concuerdan con otros trabajos del mismo laboratorio (64-65) en que se describen importantes diferencias estructurales y funcionales entre los primeros componentes del complemento del ratón y aquellos del hombre y del cuy.

De todos estos resultados (56-57; 59-65) se desprende un panorama confuso con respecto a las propiedades físico-químicas y funcionales de la proteína Ss. La mayor parte de los grupos implicados concuerdan en la existencia de una relación entre Ss y el cuarto componente del complemento. Sin embargo, estos trabajos dejan sin contestar varias preguntas importantes; por ejemplo :¿Cuál es la relación estructural entre Ss y C4?; ¿A cuántas especies moleculares reconoce el heteroantisuero anti-Ss?. Si este antisuero reconoce más de una especie molecular

¿están todas ellas relacionadas con C4?. ¿Cómo explicar las extensas variaciones de pesos moleculares de Ss descritas por algunos autores?.

En esta disertación se describirán estudios definitivos sobre el problema de la naturaleza y función de la proteína Ss.

La proteína sexo-limitada (Slp). El antisuero de conejo originalmente preparado por Shreffler y Owen (50) detectó solo variaciones cuantitativas en la proteína Ss, por lo tanto, estos autores no pudieron descartar la posibilidad de que en el locus presente en el centro del complejo H-2 exista un elemento genético regulador de un gen estructural presente en otro lugar del genoma. Passmore y Shreffler (66) trataron de descartar esta posibilidad iniciando la búsqueda de variantes alotípicas de Ss. Para esto procedieron a inmunizar diversas cepas de ratón con proteína Ss parcialmente purificada. Se obtuvieron así, varios aloantisueros. En inmunodifusión en agar estos aloantisueros dieron una línea de precipitación mas débil que la obtenida con anti-Ss. Todas las cepas donantes del antígeno dieron una reacción de identidad, lo que sugirió que todos los aloantisueros estaban dirigidos contra la misma proteína. Sin

embargo, varias cepas no produjeron precipitados al ser probadas con estos aloantisueros. En otras palabras, estos aloantisueros definieron cepas positivas y negativas para un aloantígeno presente en el suero. Sorprendentemente, en las cepas positivas solo el suero de machos adultos reaccionó con los aloantisueros. Las hembras fueron negativas sin excepción. Diversos cruzamientos demostraron que la herencia de esta proteína está determinada por un gen autosómico dominante. No hubo indicios de ligamiento a los cromosomas X o Y. Usando diversos cruzamientos se demostró que en las cepas positivas, las hembras tienen la información genética pero no expresan la proteína. Por este motivo este aloantígeno fué llamado S_{1p} ("sex limited protein"). Las dos clases de fenotipos detectados entre las diversas cepas fueron designados como S_{1p-a} y S_{1p-o} para denotar la presencia o ausencia del antígeno en la cepa, determinada por los alelos S_{1p^a} y S_{1p^o} respectivamente.

El locus responsable de la presencia o ausencia de esta proteína no ha sido separado por recombinación del locus que controla las variaciones cuantitativas de S_s en el suero.

Todas las cepas portadoras del alelo S_{s¹} son S_{1p^o} y las cepas portadoras del alelo S_{s^h} son

S1p^a o S1p⁰. No se ha detectado la combinación Ss¹S1p^a (56). En las cepas endocruzadas corrientes el alelo S1p^a está asociado con los siguientes haplotipos H-2: d, j, p, s y u. El alelo S1p⁰ está asociado con los haplotipos f, k, q, r y y.

Las primeras descripciones de las propiedades físico-químicas de la proteína S1p (56) fueron tan confusas como las de la proteína Ss. Se le atribuyó un peso molecular de 150.000 daltons y otras características similares a las de la proteína Ss. S1p reducido con 2-mercaptoetanol produjo subunidades de un peso aproximado de 75.000 daltons. Su movilidad electroforética, al igual que la de Ss, corresponde a β . S1p, a diferencia de Ss, es termolábil (52°C durante 20 minutos). Cuando se filtran sueros de machos Ss^hS1p^a por una columna de Sephadex G-200 la actividad antigénica de S1p se encuentra en una sola área correspondiente al segundo pico de actividad antigénica de Ss (56).

La proteína S1p ha sido detectada sólo en el suero de animales S1p^a. No se tiene información con respecto a su distribución tisular.

De lo expuesto anteriormente se desprende que la proteína S1p es reconocida por dos antisueros: un heteroantisuero producido en conejos por inoculación

de la proteína Ss parcialmente purificada, y un aloantisuero producido en ratones S1p⁰. Esto implica que el heteroantisuero reconoce por lo menos dos entidades moleculares (Ss y S1p) supuestamente independientes pero que comparten extensa homología antigénica. En otras palabras, el sistema inmune del conejo, no es capaz de discriminar entre Ss y S1p, por tratarse probablemente de moléculas muy similares. Por otra parte, el aloantisuero contra S1p reconoce una sola entidad molecular ya que la inmunización se hizo desde una cepa Ss^hS1p^a a cepas Ss^hS1p⁰ (56).

Al igual que en el caso de Ss, el control de H-2 sobre S1p se traduce en variaciones cuantitativas (presencia o ausencia en machos). Por lo tanto, este control se podría deber a un gen o genes) que regulan la actividad de genes estructurales localizados fuera de H-2, incluso en otro cromosoma.

El esclarecimiento de este problema es otro objetivo específico de esta tésis.

La proteína S1p constituye el único ejemplo de un producto controlado por un CPH cuya expresión está sujeta a un estricto control hormonal (67). Desde el punto de vista ontogénico esta proteína se detecta

por primera vez en machos Slp^a de 5 a 6 semanas de edad. Esta edad corresponde al comienzo de la madurez sexual en el ratón. Los niveles séricos de Slp aumentan progresivamente hasta los 3 meses y se estabilizan por el resto de la vida del animal. Si se procede a castrar machos Slp^a a las 3-4 semanas de vida, el antígeno no aparece en el suero. Estos animales, inoculados con propionato de testosterona, desarrollan niveles normales de la proteína. Si se tratan hembras jóvenes (castradas o no) con testosterona, también desarrollan niveles normales de Slp. En cambio, este tratamiento no inducirá la producción de Slp en machos o hembras Slp^o. De estos resultados se desprende que la presencia del antígeno Slp requiere de la inducción mediada por la testosterona. Esta inducción es posible a las 5-6 semanas de edad, lo cual indica que ocurre solo después de un proceso de diferenciación. El mecanismo mismo del proceso de inducción hormonal es discutible pero está claro que no se realiza a nivel periférico (67) y lo más probable es que la hormona actúe directa o indirectamente sobre el locus que codifica a la proteína (o que regula las variaciones cuantitativas entre hembras y machos).

En 1975, Klein (68) describió un haplotipo (H-2^{w7}) en que Slp se expresa en machos y hembras. El control de esta expresión en hembras no es separable del gen que controla las variaciones descritas anteriormente. Al respecto, en 1976 Hansen y Shreffler (69) proponen que la limitación al sexo en la expresión de Slp puede explicarse en términos de los mecanismos regulatorios del tipo Jacob-Monod. La expresión constitutiva del haplotipo H-2^{w7} representaría una mutación "operador-constitutiva".

La función de la proteína Slp ha sido un enigma desde su descubrimiento. En esta disertación se presentarán datos que demuestran una clara relación estructural entre Ss y Slp. Se demostrará además que Ss es el cuarto componente del complemento del ratón y que Slp no cumple con los requisitos básicos para ser considerado funcionalmente C4.

La región G. En 1959 Hoecker y asociados (70) describieron el antígeno G (H-2.7). Desde el punto de vista serológico este antígeno es similar a los de clase I y puede detectarse con precisión mediante técnicas serológicas (70).

En 1975 David y colaboradores (71) y Klein y colaboradores (72) analizaron diversas cepas recombinantes y concluyeron que el antígeno H-2.7 es

codificado por un locus ubicado entre las regiones S y D. La independencia del locus G de la región S se basó en un solo recombinante, H-2an1, usado por ambos grupos (71-72). Se trató de un doble recombinante cuyos loci K, A-S y G-D se originaron supuestamente de los haplotipos H-2s, H-2k y H-2f respectivamente. La existencia de este recombinante entre G y S fué objetada posteriormente por Huang y Klein (73) quienes demostraron que el locus G es heredado del haplotipo H-2k y no de H-2f como se pensó previamente. Por lo tanto, de acuerdo a estos resultados la región S y el locus G no pueden ser separados por recombinación.

En antígeno H-2.7 al igual que los antígenos de clase I, se expresa en los glóbulos rojos y, aunque en menor cantidad, en los linfocitos. Una diferencia importante con los antígenos clásicos de transplante es que H-2.7 está presente además, en el suero de los animales H-2.7 positivos (el suero de estos animales inhibe la reacción entre los glóbulos rojos H-2.7 positivos y anti-H-2.7).

El hecho que el antígeno H-2.7 (o una substancia con reactividad cruzada) se encuentre en

el suero y que el locus responsable esté en la proximidad de la región S (que presumiblemente codifica al cuarto componente del complemento), establece un paralelismo con la situación descrita para dos grupos sanguíneos humanos, Chido y Rodgers. O'Neill y colaboradores (74) y Tilley y colaboradores (75) demostraron que estos dos fenotipos resultan de la adsorción de fragmentos de C4 a la superficie del eritrocito. Esto sugiere una posible relación entre H-2.7 y C4 murino.

En esta disertación se presentará evidencia de que el antígeno H-2.7 del ratón corresponde a fragmentos de C4 (específicamente C4d) incorporados extrínsecamente a los glóbulos rojos y que por lo tanto C4 y H-2.7 son productos de un mismo gen estructural. En base a ésto se propondrá la eliminación de la región G del complejo H-2.

2.3.2.4. Clase IV. Desde el punto de vista del complejo H-2, estos loci han sido considerados clásicamente como misceláneos. Para ésto se ha tomado en cuenta sólo la característica común de estos loci de estar ubicados en la vecindad telomérica de H-2D. Sin embargo, recientemente se han realizado algunos estudios estructurales de los productos de algunos de estos loci y se ha planteado la existencia de diversos

grados de homología con el producto de la región D, lo que sugiere la posible existencia de un ancestro genético común. Entre estos loci hay que considerar a H-2L cuyo producto fué detectado serológicamente en 1961 por Stimpfling y Pizarro (76) como un antígeno público designado H-2.28. Este antígeno fué considerado originalmente bajo el control de los loci de clase I. Sin embargo, entre 1975 y 1977, diversos grupos (77-81) demostraron que H-2.28 es serológica y bioquímicamente independiente de los productos de las regiones K y D (clase I). No se ha descrito recombinantes que separen L de D.

La molécula L, al igual que los productos de K y D es una glicoproteína de peso molecular 45.000 que se encuentra asociada no covalentemente a la β 2-microglobulina (79, 80, 82). Por otra parte, el estudio comparativo de mapas peptídicos de las moléculas D y L demostró un 35% de homología entre ellas (83) lo que sugiere que estas moléculas son genéticamente homólogas. Estos resultados justifican la reclasificación de las moléculas L en la clase I, revalidando la observación original de Stimpfling y Pizarro (76). Esta reclasificación es apoyada también por diversas pruebas funcionales (83-88) que

implican a las moléculas L en el rechazo de tejidos y en la linfocitotoxicidad mediada por células contra antígenos de transplante o virales.

Recientemente se ha descrito un tercer locus cercanamente ligado a D y L (89). Este locus ha sido llamado R, no ha sido separado por recombinación de D y L, su caracterización estructural y bioquímica es preliminar y no se conoce su función.

Actualmente existe la tendencia a aceptar a la inclusión de los loci Qa y T1a en el complejo H-2 dadas las relaciones estructurales entre los productos de estos loci y los de las regiones K y D. Las moléculas de Qa y T1a, al igual que las de clase I tienen un peso de 45.000 y están asociadas no covalentemente con la β 2-microglobulina (28, 90-91). Más aún, Solosky y colaboradores (92) han demostrado que esta homología se extiende a nivel estructural primario. Estos autores determinaron homología, a nivel de péptidos tripticos, entre un antígeno Qa (Qa-2) y antígenos K y D. Esto indica posiblemente un ancestro genético común. Por lo tanto, los elementos genéticos que controlan las moléculas H-2K, H-2D, H-2L, Qa y posiblemente, T1a forman una familia multigénica. La función de las moléculas Qa y T1a es desconocida. La genética de estos loci está en pleno

desarrollo y hasta el momento se han caracterizado por lo menos cinco loci Qa (Qa-1 - Qa-5) y un locus T1a. En cada uno de estos loci se describe constantemente nuevos alelos cuyos productos se expresan en diversas subpoblaciones de linfocitos. La genética de Qa y T1a ha sido revisada recientemente (29). Todos estos loci han sido ubicados a la derecha de la región D, siendo el locus T1a el más distante (1.5 centimorgans de D). En el intervalo D-T1a se ubican los loci Qa. No se conoce las relaciones funcionales entre las moléculas Qa y T1a, ni tampoco las relaciones funcionales entre estas moléculas y los productos de las regiones K, I, S y D.

2.3.2.5 Loci estructurales o reguladores, ligados a H-2, de localización incierta o definitivamente fuera del complejo.

El locus para el tercer componente del complemento está teloméricamente a 11 centimorgans de H-2 (93-95), por lo cual, su inclusión como parte de H-2 es discutible.

En 1975, en nuestro laboratorio, se describió por primera vez la existencia de un gen ligado a H-2

que regula, temprano en la ontogenia, variaciones significativas en los niveles séricos de C3 (97-98). No fué posible establecer en esa época si se trataba de un gen estructural o regulador, pero si se consideran los resultados citados anteriormente (93-96), esta pregunta está contestada: el gen estructural para C3 está a la derecha de H-2; el elemento descrito dentro de H-2 (97-98) corresponde seguramente a un gen regulador.

Por lo menos dos componentes del complemento (C3 y C4) se unen, al ser activados, a receptores específicos presentes en las membranas de algunas subpoblaciones celulares. Al respecto, en 1974, Gelfand y colaboradores (99-100) describieron un ligamiento entre genes que controlan la expresión ontogénica de los receptores para C3 y el complejo H-2. Estos hallazgos están relacionados con los de otro grupo (101) que realizó investigaciones similares en humanos. Estos autores describieron una asociación entre dos especificidades determinadas por el complejo HLA, 4a y 4b, y los receptores para C3 en las membranas de los leucocitos. En 1976 demostramos (102-103) que los modelos experimentales usados por estos dos grupos (99-101) no prueban el ligamiento en

el ratón ni la asociación propuesta en humanos.

Fuera de H-2, pero ligados al complejo existen una serie de loci que controlan variaciones electroforéticas de diversas enzimas (isoenzimas). Su localización en el mismo cromosoma que H-2 puede tener o no tener significado funcional, ya que los loci estructurales para diversas isoenzimas están distribuidas con relativa homogeneidad en los 20 pares de cromosomas murinos. Los loci estructurales de isoenzimas localizadas en el cromosoma 17 son por lo menos 5.

Glo-1 controla el polimorfismo electroforético de la S-lactoil-glutation metilglioxal liasa o glioxalasa, ubicado a 1.7 centimorgans centromérica con respecto a K (95-104). Se han descrito dos alelos en este locus, presentes en la mayoría de las cepas endogámicas y silvestres (Glo-1^a) y, en una cepa llamada MA, (Glo-1^b). La glioxalasa convierte dialdehidos a hidroxiaácidos.

Pgk-2 controla variaciones electroforéticas en la 3-fosfo-D-glicerato 1-fosfotransferasa o fosfoglicerato kinasa o PGK. Esta es una enzima glicolítica que cataliza la conversión de 1,3-difosfoglicerato y ADP a 3-fosfoglicerato y ATP. En el ratón se han descrito dos loci que codifican esta enzima. Uno de ellos, Pgk-1, está ligado al

cromosoma X y Pgk-2 ligado a H-2 (105-107). Pgk-2 está ubicado cerca de T1a. Se expresa solo en espermios de testis y epidídimo y tiene tres alelos electroforéticos.

Ce-2, controla una sustancia aún no identificada en el riñón. Esta sustancia se une a la catalasa o de alguna manera altera postsintéticamente su carga eléctrica (108). La catalasa es una enzima que degrada el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a oxígeno y agua. Este mecanismo supuestamente protege a las células renales contra la oxidación exagerada. Este locus tiene dos alelos y está localizado teleméricamente a la región D.

Ap1, es un locus que controla la sialidación de la fosfatasa ácida del hígado. Esta enzima hidroliza, a pH bajo, a monoésteres fosfóricos y se encuentra en la fracción lisosómica de un lisado hepático (109). El locus Ap1 está teloméricamente a 7 centimorgans de H-2 (110).

Map-2. Este locus controla el grado de sialidación de una enzima hepática llamada -manosidasa que se detecta en dos formas electroforéticas (111-112). Este locus y el locus Ap1 no han sido separados por recombinación, su función es muy parecida y en realidad, pueden ser idénticos.

Estos cinco loci que controlan variaciones isoenzimáticas no parecen tener una relación obvia con los loci de clase I-IV. Su presencia en el cromosoma número 17 puede ser simple producto del azar.

Por último, centroméricamente a la región K se encuentra ubicado un complejo genético que controla una serie de factores dominantes (I) y una de recesivos (t). Estos factores se expresan pleiotropicamente en forma de una variedad de síndromes que van desde alteraciones de la cola a letalidad intrauterina. Estos efectos se deben a la acción conjunta de varios loci, cuyos productos no han sido caracterizados bioquímicamente. La genética de estos factores es considerablemente extensa y compleja y ha sido revisada en varias oportunidades (20, 113-118). La presencia de estos loci en el cromosoma 17 parece tener un efecto muy interesante relacionado con la supresión o disminución de los sucesos recombinatorios en este cromosoma (119-120). Este fenómeno se discutirá mas adelante.

En lo transcurrido de esta introducción se ha presentado una visión somera de la organización genética del complejo H-2 y de los loci de sus vecindades telomérica y centromérica. Cuando ha sido

posible, se han presentado algunos conceptos sobre la función y estructura de los productos de estos loci. Esto se ha hecho con el objeto de definir al ambiente genético en que se encuentran los genes que controlan a Ss y Slp que son las dos proteínas relacionadas con el complemento y que constituyen el interés central de esta tesis. En otras palabras, se han presentado los elementos imprescindibles que permitirán discutir los productos génicos Ss y Slp en el contexto de H-2.

En los párrafos siguientes se revisarán algunos conceptos relevantes generales sobre el sistema del complemento. Se enfatizará la iniciación de la activación del sistema, considerando que todos los componentes cuyos genes estructurales se encuentran ligados a los CPH participan precisamente en esta etapa.

3. El sistema del complemento.

El sistema del complemento tiene un rol biológico fundamental como efector de la respuesta inmune contra numerosos organismos patógenos. Esto puede lograrse mediante diversos mecanismos que van desde la alteración profunda de la función y estructura de las membranas biológicas a actuar en forma si nérgica con las moléculas de anticuerpo para determinar

la ingestión y destrucción de microorganismos por células fagocíticas.

La naturaleza fisico-química de la señal que inicia la activación del complemento puede ser muy variada y las primeras etapas implican la activación secuencial de zimógenos a proteasas.

Se han descrito dos rutas de activación del complemento llamadas ruta clásica y ruta alterna. La fig.2 es un diagrama de la activación de ambas rutas, en que el suceso central es la activación del tercer componente.

3.1 Ruta clásica. La ruta clásica es iniciada principalmente por complejos antígenos-anticuerpo. Esta activación puede ocurrir in vivo o in vitro (121) y en ella se generan tres proteasas complejas:

a. La C1 esterasa (C1), formada por tres tipos de subunidades, C1q, C1 \bar{r} y C1 \bar{s} . C1 \bar{r} y C1 \bar{s} son serino-proteasas cuyos zimógenos son C1r y C1s. (La línea sobre el componente indica que éste se encuentra activado).

b. La C3 convertasa o C4bC2a es una proteasa cuyo substrato es C3. Está formada por cantidades

Complejos antígeno-anticuerpo

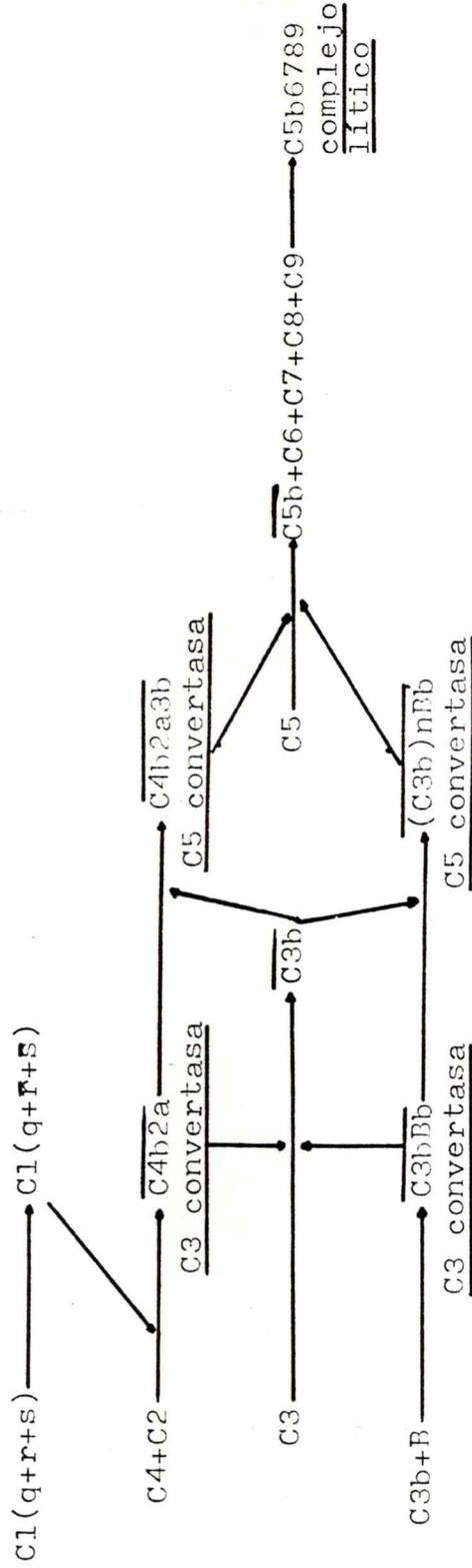


Figura 2

Figura 2: Simplificación esquemática de la activación del complemento. Este esquema se centra en la formación de las convertasas de C3 y C5 a través de las dos rutas de activación, con formación de un complejo lítico final común.

equimoleculares de $C4\bar{b}$ y $C2\bar{a}$, generadas después de la activación de C4 y C2 por $C1s$.

c. La C5 convertasa, formada por $C4\bar{b}$ y $C2\bar{a}$ más C3b que es el producto de la activación de C3 por la C3 convertasa.

La activación de C5 es el último suceso proteolítico después del cual se produce la asociación estequiométrica, no proteolítica, sobre membranas biológicas de los componentes C6 a C9, con profunda alteración de la estructura y fisiología de éstas. Esta última etapa se manifiesta dramáticamente in vitro cuando se usan glóbulos rojos sensibilizados con anticuerpos como sistema indicador. La liberación de hemoglobina de los glóbulos rojos implica que hubo daño irreversible de sus membranas.

Las proteasas del sistema del complemento son muy complejas pues, con la única excepción del inactivador de las anafilotoxinas, requieren para su actividad de la asociación de dos o más proteínas.

Un aspecto interesante desde el punto de vista biológico, es que en el sistema del complemento se encuentran por lo menos tres proteínas con estructuras excepcionales, no descritas hasta el momento en

otros sistemas. Se trata de C1q, C2 y el factor B. C1q tiene una estructura en parte fibrilar, similar al colágeno y en parte globular. C2 y el factor B son dos serino-proteasas muy similares con un péptido catalítico característico de las serinoproteasas pero, con 300 residuos aminoacídicos adicionales hacia el lado aminoterminal. El C3b inactivador es otra proteasa con aspectos estructurales especiales. Estas estructuras excepcionales de algunos componentes del complemento sugieren que la historia evolutiva del sistema también es especial. Estos y otros aspectos de las proteasas del sistema del complemento han sido revisados en detalle recientemente (122-124).

A continuación se revisará en forma muy general la estructura de los primeros componentes. Mayor detalle al respecto ha sido publicado recientemente (121-128).

El subcomponente C1q puede ser aislado gracias a su afinidad por la inmunoglobulina G ya sea acoplada a soportes inertes o en complejos inmunes (125). Su peso molecular es de 400.000 y está formado por un total de 18 cadenas de 3 tipos, 6A, 6B y 6C de tamaño y estructura similar. En el extremo amino terminal cada cadena tiene aproximadamente 80

residuos aminoacídicos con una secuencia similar a la del colágeno. Los residuos carboxiterminales, no tienen aspectos estructurales especiales, su secuencia es muy similar en las cadenas A, B y C y adoptan una estructura globular. Esta estructura, sugerida originalmente por Porter y Reid (123), concuerda muy bien con el tamaño y forma de la molécula visualizada al microscopio electrónico.

Los subcomponentes C1r y C1s pueden aislarse de la fracción euglobulínica del suero por cromatografía de intercambio iónico (126-127). Ambas moléculas están formadas por una sola cadena polipeptídica de peso 85.000. Al ser activadas su conformación cambia a dos cadenas de pesos 27.000 y 56.000 unidas por puente disulfuro. En ambos casos, el sitio enzimático activo está ubicado en la cadena b que es la más pequeña.

A pesar de la gran homología existente entre las cadenas b de C1r y C1s, la especificidad de estas proteasas es muy diferente. C1r actúa solo sobre C1s y éste, en cambio, hidroliza enlaces peptídicos en C4, C2 y otros substratos sensibles a la tripsina (121).

El segundo componente del complemento (C2) es especialmente difícil de purificar debido a su baja

concentración sérica (15 mg por litro de suero) y a su extrema vulnerabilidad a la degradación proteolítica (128). Está formado por una sola cadena glicoproteica de peso aproximado 100.000 (129). Cuando es activado por $\overline{C1s}$ origina dos cadenas de peso 70.000 (C2a) y 30.000 (C2b).

El cuarto componente (C4), tiene un peso aproximado de 200.000 y está compuesto por tres cadenas unidas por puentes disulfuro. Las cadenas han sido designadas α , β y δ con pesos 93.000, 78.000 y 30.000 respectivamente (130). La molécula ha sido aislada en estado puro y las cadenas pueden separarse, después de reducir la molécula, mediante diversos métodos cromatográficos y electroforéticos (131). La secuencia aminoacídica del extremo aminoterminal de las cadenas α comparte cierta homología con las secuencias aminoterminal de las cadenas α de C3 y C5, lo cual puede deberse a un origen genético común (121). Las cadenas β y δ muestran cierto grado de heterogeneidad que puede estar relacionada con las variantes de C4 encontradas con técnicas electroforéticas (132).

C4 es sintetizado como una sola cadena polipeptídica que debe ser hidrolizada en puntos

específicos para originar la estructura funcional de tres cadenas (133). El precursor se encuentra en el plasma en una proporción del 1 a 3% de la forma de tres cadenas (133-136). No se sabe donde se realiza la conversión de precursor a producto. En el precursor el orden de las cadenas es β , α , γ (137-138), de acuerdo con la secuencia aminoacídica aminoterminal de pro-C4, de la cadena β de C4 y del producto de la digestión de pro-C4 con $\overline{C1s}$.

Para pasar a formar parte de la C3 convertasa de la ruta clásica, C4 debe ser activado por $\overline{C1s}$, presente en el complejo C1. Esta activación se realiza por digestión de un solo enlace peptídico en la cadena α de C4 con liberación de un pequeño fragmento llamado C4a y constituido por 66 residuos aminocídicos del extremo aminoterminal (139). El fragmento mayor, llamado C4b, puede unirse fuertemente a través del resto de la cadena α (α'), probablemente en forma covalente, a las superficies celulares o a la inmunoglobulina G agregada. Los puntos de unión a las superficies celulares no han sido caracterizados. La unión a la molécula de IgG ocurre en el fragmento Fc que corresponde a la mitad aminoterminal de las cadenas pesadas de la inmunoglobulina (140).

Los componentes C3 y C5 tienen una estructura general muy similar, con un peso molecular de 185.000 y están formados por dos cadenas unidas por puentes disulfuros, llamadas α y β , con pesos de 115.000 y 70.000 respectivamente. Estas propiedades similares permiten la separación conjunta de estos dos componentes hasta etapas finales de la purificación (141). Cuando C3 y C5 son activados por las correspondientes convertasas cada uno pierde un péptido del extremo aminoterminal de la cadena. Estos péptidos se llaman C3a y C5a, tienen aproximadamente 70 residuos aminoácídicos de longitud y una importante homología en sus secuencias (142). C3, al igual que C4 es sintetizado como un precursor de una sola cadena (143).

Cuando la C3 convertasa se une a una o más moléculas de C3 activado ($\overline{C3b}$), forma el complejo $\overline{C4b}$, $\overline{2a}$, $\overline{3b}$ y cambia su especificidad a C5 convertasa (143). El cambio en especificidad no requiere necesariamente de un cambio estructural muy grande en C2a (que contiene el sitio activo) ya que C3 y C5 son muy parecidos. En ambos casos se libera un péptido anafilotóxico (C3a y C5a) del extremo amino terminal de la cadena.

Uno de los hallazgos recientes más interesantes en la activación del complemento es el hecho de que C4 y C3, al ser activados, forman enlaces covalentes con proteínas o polisacáridos que se encuentran próximos al sitio de activación. Este mecanismo fue descrito por Law y Levine en 1977 (144). Estos autores demostraron que C3 al ser activado por EAC14b2a (eritrocitos sensibilizados por anticuerpos que han incorporado la C3 convertasa) forma un enlace estable, probablemente de naturaleza covalente, con componentes de la superficie celular. Este enlace, de tipo éster, es sensible a la acción de la hidroxilamina. Una situación similar puede ocurrir con C4, después de su activación por C1 (145).

- 3.2. Ruta alterna. Debido a que esta ruta no tiene especial relevancia en el tema central de esta tesis, solo se mencionarán brevemente algunas generalidades. La biología molecular y la química de esta ruta ha sido revisada en detalle recientemente (146).

En la ruta alterna la activación también puede ser iniciada por anticuerpos agregados. Esto ha sido demostrado con complejos entre antígenos y moléculas de anticuerpos a los cuales se le ha removido el fragmento Fc (porción de las cadenas pesadas distales a los sitios de combinación de la molécula de

anticuerpo) $(F(ab')_2-Ag)$. Estos complejos no activan la ruta clásica (146-147).

La función biológica principal de la ruta alterna parece basarse en su capacidad de activación in vivo por polisacáridos presentes en las paredes bacterianas y de los hongos a los cuales causa destrucción mediante la fagocitosis de éstos o por el ataque lítico sobre sus membranas. La ruta alterna formaría así la primera línea de defensa contra las infecciones, antes que ocurra una respuesta inmune (producción de anticuerpos) y, por ende, antes de que se active la ruta clásica. El suceso central en esta ruta, al igual que en la clásica, es la activación del tercer componente (fig.2). La C3 convertasa ($\overline{C3bBb}$) en este caso, está formada por C3b y factor B activado (\overline{Bb}) que contiene el sitio enzimático activo. La C5 convertasa ($\overline{(C3b)_nBb}$) se origina por incorporación de moléculas de C3b adicionales a la C3 convertasa (146).

Los sucesos iniciales de la activación de esta ruta están menos caracterizados que los de la clásica. Se acepta que esta iniciación implica la asociación de pequeñas cantidades del factor B y C3b en un complejo bimolecular (C3bB) en el cual el factor B

es sensible a la acción de una enzima, presente en forma activa en el plasma, llamada factor D (146).

Los componentes terminales (C6-C9) participan de igual manera en ambas rutas.

3.3 Proteínas reguladoras de la actividad del complemento.

La actividad del sistema del complemento como mecanismo central defensivo se realiza generando gran cantidad de productos activados que no solo están capacitados para atacar al organismo invasor sino también a tejidos del huésped. Este daño potencial al huésped puede realizarse a través de diversos mecanismos, tales como opsonización, alteración de membranas celulares, liberación de anafilotoxinas, etc. lo cual puede originar o contribuir a una reacción inflamatoria local o sistémica. Es esencial, por lo tanto, la existencia de mecanismos regulatorios altamente eficientes, cuyo objetivo principal se cumple mediante la inactivación de componentes del complemento. Esta inactivación se logra de diversas maneras. Así, algunos componentes, indispensables en la iniciación de la cascada, tienen una vida media muy corta durante la cual pueden unirse a membranas biológicas. Por otra parte, las tres enzimas complejas centrales del sistema están restringidas en su

actividad por una tendencia intrínseca a la inactivación debida a la pérdida espontánea del componente que tiene el sitio enzimático activo (C2a) tanto por parte de la C3 convertasa como de la C5 convertasa de la ruta clásica ($\overline{C4b,2a}$ y $\overline{C4b2a3b}$ respectivamente). Un fenómeno similar ocurre por disociación del fragmento activo del factor B (Bb) de la C3 y C5 convertasas de la ruta alterna ($\overline{C3bBb}$ y $\overline{C3b(Bb)n}$ respectivamente).

Un tercer tipo de control está representado por inhibidores naturales de proteasas, como el inhibidor de C1 y los inactivadores, como el C3b inactivador (C3b-INA), cuya especificidad sobre C3b y C4b requiere de los cofactores β_1H y C4-bp respectivamente. La biología molecular y función de estas 4 moléculas reguladoras ha sido revisada en detalle recientemente (121-146). Una de estas proteínas (C4-bp) tiene especial relevancia en esta disertación y, en este contexto, será discutida más adelante.

4. Recapitulación de objetivos específicos.

El objetivo central del trabajo descrito aquí, es el de contribuir a la comprensión de la naturaleza de las relaciones existentes entre el complejo principal de histocompatibilidad de las especies y el

sistema del complemento. El hallazgo de la participación de estos complejos genéticos en la regulación y la síntesis de algunos componentes claves del sistema del complemento aparece como algo inesperado, debido principalmente a que los productos genéticos clásicos de los CPH (Clase I y II) se expresan principalmente como constituyentes estructurales en las membranas de diferentes poblaciones celulares y solo secundariamente en el suero, en contraste con los productos de clase III.

El modelo genético escogido ha sido el complejo H-2 del ratón. Este sistema controla extensas variaciones cuantitativas de dos proteínas del suero, la substancia sérica (Ss), implicada por diversos laboratorios en el sistema del complemento, y la proteína sexo-limitada (Slp), de función desconocida.

Los objetivos de los experimentos presentados aquí pueden clasificarse en dos grupos:

- a. Determinar la estructura y función de Ss y Slp.
- b. Buscar variaciones estructurales de estas proteínas y usar estas variaciones como marcadores para identificar y localizar los genes que las codifican.

Uno de los objetivos específicos de algunos de los experimentos descritos aquí se cumplió al demostrar que Ss es estructural y funcionalmente el cuarto componente del complemento del ratón. Esta demostración ha sido publicada (150). Por lo tanto, el uso del término "substancia sérica (Ss)" es actualmente obsoleto. Sin embargo, respetando la secuencia histórica, en los siguientes capítulos este término y el de "cuarto componente del complemento (C4)" serán usados como equivalentes.

MATERIALES Y METODOS

1. Reactivos: En esta sección se identificará primero a las compañías o laboratorios seguido de los reactivos que allí se obtuvieron.
American Hoechst Corporation, Sommerville, Nueva Jersey, U.S.A.: Agarosa.
Bio-Rad Laboratories, Richmond, California:
N,N'-metilen-bis-acrilamida; N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamina (TEMED); persulfato de amonio y dodecil sulfato sódico (SDS).
Cal-Biochem, San Diego California, U.S.A.: diisopropilfluorofosfato (DFP).
Miles Laboratories, Inc., Miles Research Products, Elkhart, Indiana, U.S.A.: albúmina sérica bovina (BSA).
New England Enzyme Center, Boston, Massachusetts, U.S.A.: Staphylococcus aureus de la cepa Cowan I (S. aureus).
Shell Chemicals Corp., Londres, Inglaterra: Nonidet P-40.

Sigma, Chemical Corp., Saint Louis, Montana, U.S.A.
:ovoalbúmina; β -galactosidasa (de Escherichia coli);
catalasa (de hígado bovino); mioglobina (de hígado
equino); dehidrogenasa alcohólica (de levadura) y
fosforilasa A (de músculo de conejo).
Pharmacia Fine Chemicals, Div. of Pharmacia, Inc.,
Piscataway, Nueva Jersey, U.S.A.: DEAE-Sephacel,
Sephadex G-200.

Whatman Chemicals Div. W. and R. Balston, Maidstone,
Kent, Inglaterra: DEAE-celulosa (DE-52).

Stockholm Superfosfat Fabriks A.B. Stockholm, Suecia:
Pevikon G-870.

Shwarz/Mann Div., Becton Dickinson and Co. Orange-
burg, Nueva York, U.S.A.: sulfato de amonio y urea
ultrapura.

LKB Instruments, Inc., Rockville, Mariland, U.S.A.:
Anfolitos, pH 3.5 a 10 y 5 a 7.

2. Soluciones tampones: Salino tamponado con fosfato
(Dulbecco's PBS) fué obtenido de Grand Island Biolo-
gical Co., Grand Island, Nueva York.

PBS-EDTA: PBS con 0.002M de etilendiaminotetracetato
sódico (Na_3HEDTA), pH 7.55.

PBS-EDTA-EACA: PBS-EDTA con 0.005M de ácido
 ϵ -aminocaproico (EACA).

Tampón barbital, pH 8.6: 0.023M barbital sódico, 0.037M ácido barbitúrico y 0.002M Na₃HEDTA.

Salino isotónico tamponado con veronal (VBS⁼), pH 7.4: 0.0025M barbital, NaCl cantidad suficiente para lograr una conductividad de 7.4 mS a 0°C, y 0.002M Na₃HEDTA (VBS-EDTA).

GVB⁺⁺: VBS con 0.1% de gelatina, 0.005M de CaCl₂, y 0.00015M MgCl₂.

DGVB⁺⁺: GVB⁺⁺ vol/vol con dextrosa al 5% en agua con 0.001M MgCl₂.

Tampón cloruro de sodio-EDTA-Tris (NET), pH 8.6: 0.15M NaCl, 0.005M Tris, 0.002M Na₃HEDTA y 0.02% peso/volumen de azida de sodio (NaN₃).

NET-0.5% NP-40: NET con 0.5% volumen/volumen de NP-40.

NET-0.05% NP-40: NET con 0.05% volumen/volumen de NP-40.

Tampón deoxicolato (DOC), pH 8.6: 0.02M Tris-HCl, 0.05M NaCl, y 0.05% peso/volumen de deoxicolato.

Tampón barbital-lactato de calcio, pH 8.6: 0.023M barbital sódico, 0.037M ácido barbitúrico y 0.0009M lactato de calcio.

Tampón cloruro de sodio-fosfato, pH 6.7: 0,05M fosfato y 1M cloruro de sodio.

Tampón acetato, pH 5: 0.1M ácido acético.

3. Animales: Una gran variedad de cepas de ratones de ambos sexos han sido usadas en este trabajo. La edad de estos animales varió entre 4 y 8 meses, con una media de 6 meses. En esta sección se identificará la fuente que proporcionó los animales y luego a las cepas correspondientes.

Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, U.S.A.:

DBA/2J, DBA/1J, C57B1/10, AKR/J, B10.D2, Balb/c, A.Sw, C3H, B10.Br, A.By, B10.M.

Dr. D.C. Shreffler, Washington University, Saint Louis, Montana, U.S.A.: C3H.OH, C3H.OL, C3H.B10, C3H.W7. Estos animales fueron reproducidos posteriormente en nuestro vivero.

Dr. G. Biozzi, Fondation Curie, Paris, Francia, : machos MP.

Dr. J. Stimpfling, Mc Laughlin Research Institute, Great Falls, Montana, U.S.A.: B10.RIII, B10.RIII(20R) y B10.BSVS.

Dr. M. Dorf, Harvard University Medical School, Boston Massachusetts, U.S.A.: A.TFR4 y B10.TFR5.

Dr. H. Passmore, Rutgers University, New Brunswick, Nueva Jersey, U.S.A.: A.BY, B10.LIB55, B10.STA12, B10.CAS2 y B10.KPB128.

Dr. R. Bash, New York University School of Medicine, Nueva York, U.S.A.: A.TL y A.TH.

Dr. C. David, Mayo Medical School, Rochester, Minnesota, U.S.A.: B10.WB, (B10.F(13R)xA/J)F1, B10.P, B10.BDR-2, B10.HTG, B10.S(7R), B10.F(14R).

Dr. F. Figueroa, Universidad de Chile, Facultad de Medicina, Santiago, Chile: Primera generación entre ratones silvestres, capturados en la vecindad de Santiago, constitutivos para la expresión de la proteína SIp y ratones C3H. Estos animales están actualmente en la sexta generación de retrocruza contra C3H para preparar una cepa congénica para la expresión constitutiva de SIp.

Todos estos animales fueron usados para obtener suero, plasma y glóbulos rojos o para producir aloantisueros.

Para la obtención de plasma los animales fueron sangrados por la vena y arteria axilar en tubos de vidrio a los cuales se agregó previamente Na_3HEDTA y EACA para obtener concentraciones finales de 0.002 y 0.005M respectivamente. Los tubos se centrifugaron para separar el plasma al cual se agregó DFP para obtener una concentración de 0.004M. Este plasma fue usado inmediatamente o congelado a -70°C por periodos no superiores a un mes.

Para la obtención de suero, los animales se sangraron de igual manera, la sangre se dejó coagular

durante 10 minutos a temperatura ambiente y una hora a 0°C. Después de separar el coágulo por centrifugación se agregó EDTA, EACA, y DFP al suero en concentraciones iguales a las usadas para el plasma.

Para la obtención de glóbulos rojos los animales fueron sangrados por la arteria y vena central de la cola, en una solución anticoagulante isotomica de citrato de sodio, pH 7.4, a 4°C. Los glóbulos rojos, separados por centrifugación, fueron lavados dos veces con PBS y una vez con 0.85% peso/volumen de NaCl.

4. Antisueros:

- 4.1 Anti Ss. De gran importancia en los estudios descritos aquí es la disponibilidad de un suero anti-C4 de ratón de alta calidad. Dos tipos de heteroantisueros anti-C4 fueron usados en este trabajo. El primero donado por el Dr. H. Passmore, Rutgers University, New Brunswick, Nueva Jersey, (148). Este heteroantisuero fue producido inoculando en conejos fracciones parcialmente purificadas de C4. El antisuero producido en estos casos es poliespecífico, lo que hace necesaria su absorción con el suero de ratón con bajos niveles de C4 (H-2k). El producto obtenido así, puede ser operacionalmente

monoespecífico, si se prueba con técnicas de sensibilidad moderada, tales como inmunodifusión doble en agar, inmunolectroforésis en cohete ("rocket immunoelectrophoresis":RIE) o inmunolectroforésis cruzada (CIE). Sin embargo en ensayos más sensibles (radioinmunoensayo o simple inmunoprecipitación de C4 a partir de fracciones de suero radiomarcadas) este heteroantisuero puede presentar problemas debido fundamentalmente a la imposibilidad de absorber completamente los anticuerpos contaminantes, a la presencia de componentes séricos de la cepa usada para absorber y a la presencia de complejos inmunes solubles. Todos estos problemas se resolvieron con el desarrollo en nuestro laboratorio de un método para purificar en tres pasos, un fragmento de Ss (identificado como C4c que es un fragmento del cuarto componente del complemento), y la inoculación de este producto en conejos que produjeron un antisuero monoespecífico anti Ss (149). El aislamiento de C4 se basó en la observación realizada previamente en nuestro laboratorio de que, al menos que se tomen precauciones especiales, el C4 de ratón es fácilmente activado por C $\bar{5}$, con producción de un fragmento menor llamado C4a y un fragmento mayor llamado C4b. Este

fragmento se une a una nueva proteína reguladora del complemento, descrita en nuestro laboratorio llamada "C4-binding protein" o C4-bp (151), formando un complejo macromolecular. C4b en este complejo es sensible al ataque enzimático del C3b inactivador que digiere a C4b en dos fragmentos, uno menor llamado C4d (45.000 daltons) y uno mayor (150.000 daltons) llamado C4c (Figura 3). Este fragmento permanece unido no covalentemente a C4-bp.

Los complejos C4b/C4-bp o C4c/C4-bp pueden separarse de otros componentes séricos más pequeños mediante precipitación con tampón acetato, pH 5.0, resolubilización en PBS-EDTA seguida de un simple pasaje a través de una columna de Sephadex G-200. El volúmen excluido de esta columna es concentrado y dializado contra cloruro de sodio 1M, a pH6. Esta concentración salina disocia los complejos entre C4c o C4b y C4-bp. Si este material se pasa por una segunda columna de Sephadex G-200, equilibrada con NaCl 1M, pH 6, se puede separar eficientemente C4-bp de C4b y C4c. Este último fragmento se obtiene con un grado de pureza tal que al ser inoculado en conejos produce un antisuero monoespecífico contra Ss y con reactividad cruzada contra S1p.

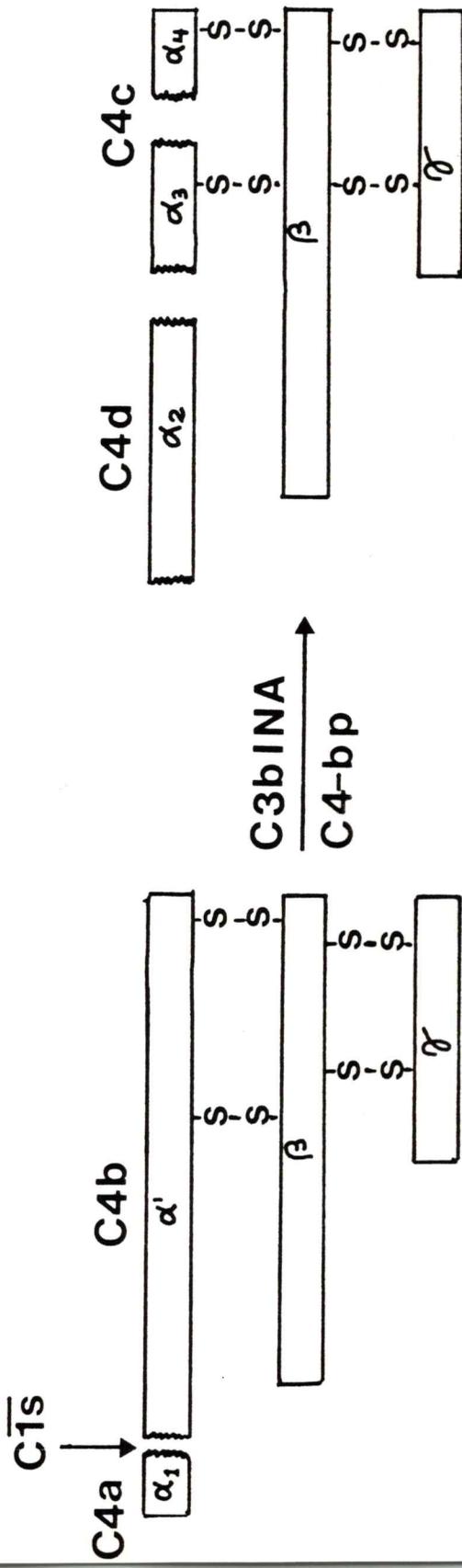


Figura 3

Figura 3: Representación esquemática del cuarto componente del complemento humano (C4) y de los fragmentos generados por la acción de $\overline{C1s}$, C3bINA y C4-bp. C4 es una beta globulina formada por tres cadenas polipeptídicas, α , β y γ de pesos 90, 75 y 31 kilodaltons respectivamente, unidas covalentemente por puentes disulfuro. C1s es una esterasa, activable por complejos inmunes, que puede hidrolizar un enlace peptídico en la cadena α de C4, generando un fragmento pequeño, de peso 4.000, llamado C4a o α_1 , y un fragmento mayor, C4b, de peso 195.000, formado por las cadenas α' , β y γ . El catabolismo de C4b incluye la acción de una enzima, C3bINA, y de un cofactor, C4-bp, esencial para la acción de la enzima. Esta acción resulta en la digestión de C4b en dos fragmentos, de C4d o α_2 y uno mayor, de peso 150.000, llamado C4c. Este último tiene 2 fragmentos de cadena α (α_3 y α_4 de pesos 25.000 y 17.000 respectivamente) unidos covalentemente al resto de la molécula formada por la cadena β y la γ , ambas intactas. De todos éstos fragmentos solo se conoce la función de C4b que es la de formar parte de la C3 convertasa de la ruta clásica ($\overline{C4b2a}$).

Dada la importancia de este antisuero en este trabajo, en los párrafos siguientes se describe un protocolo tipo para producirlo. Todo el proceso de purificación se hizo a 4°C. 20ml de suero de una cepa de ratón con altos niveles de Ss fueron dializados durante 12 horas contra dos litros de tampón acetato, pH 5.0. El precipitado obtenido fue solubilizado en PBS-EDTA y analizado mediante RIE, determinándose que contenía más del 90% del C4 presente en el suero original. Este material fue pasado por una columna de Sephadex G-200 (100 x 2.5 cm) equilibrada con PBS-EDTA. Se recolectaron fracciones de 3.7 ml. Como se observa en la Figura 4A, se obtuvo un pico proteico excluido agudo, seguido de una cola de material de peso molecular menor. El antígeno C4 se encontró en el primer pico, formando un complejo con C4-bp (151). Para disociar estos complejos, se procedió a juntar las fracciones 44-50 y a concentrarlas mediante diálisis a presión contra tampón fosfato, con cloruro de sodio 1M. La separación de los antígenos C4 y C4-bp se logró mediante un segundo

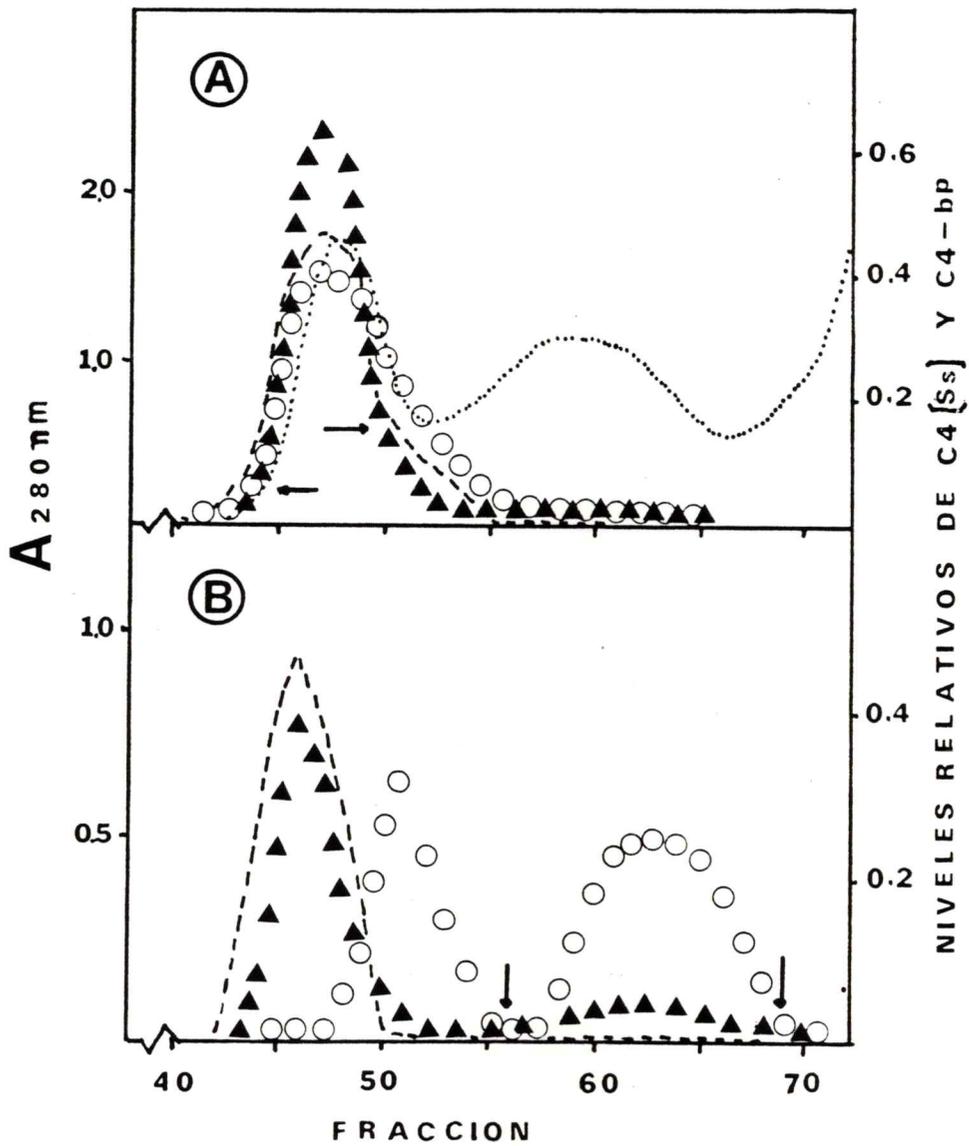


Figura 4

Figura 4: (A), 20 ml de suero de machos MP (C4-alto, S1p^a) fueron dialisados contra buffer acetato 0.1 M, pH 5.0. El precipitado obtenido fue disuelto en 5 ml de PBS y filtrado en una columna de Sephadex G-200. La concentración relativa de Ss (círculos) y C4-bp (línea segmentada) fue determinada en las fracciones mediante RIE contra antisueros monoespecíficos. Ss y C4-bp fueron detectados solo en el primer pico de densidad óptica. El tampón de elución usado fue PBS-EDTA, pH 7.55. La columna fue calibrada previamente con suero completo de ratón y el perfil de densidad óptica está representado por la línea punteada (el pico de la albúmina se representa solo parcialmente). Los triángulos representan la densidad óptica obtenida con el precipitado redisolto. Las fracciones 44 a 50 (entre flechas) fueron combinadas, concentradas mediante diálisis a presión contra tampón fosfato, 0.1M, pH 6.7, conteniendo NaCl 1M, y filtradas a través de una segunda columna de Sephadex G-200 equilibrada con el mismo tampón. Los resultados de este pasaje se muestran en (B). El antígeno C4 (círculos) aparece ahora en dos áreas separadas. Los triángulos representan el perfil de densidad óptica obtenido. Las fracciones conteniendo C4c puro (identificados en SDS-PAGE), ubicados entre las flechas, fueron combinadas, concentradas mediante diálisis a presión contra PBS, pH 7.3 y usadas para

Figura 4 (continuación)

inmunizar conejos. El pico contenido entre las fracciones 47 a 55 corresponde a C4b (identificado en SDS-PAGE). Este material no se usó para inmunizar por estar contaminado con C4-bp. No se detectó actividad hemolítica de C4 en ambos picos (C4b y C4c).

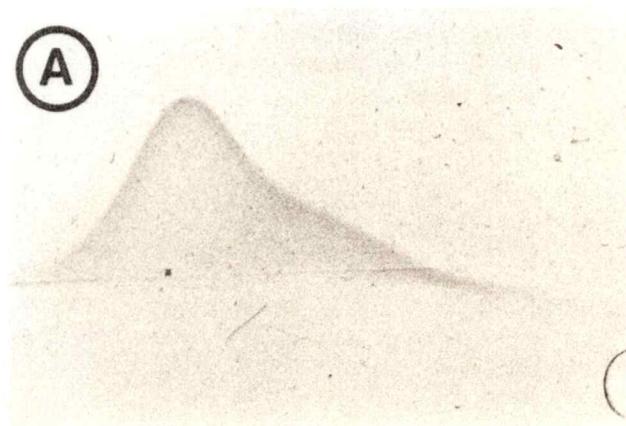
pasaje por Sephadex G-200, equilibrado con el mismo tampón. En estas condiciones, la actividad antigénica de C4 eluyó en dos picos: el primero correspondiente a C4b y el segundo a C4c (Figura 4b). Este segundo pico fue concentrado a 7 ml por diálisis a presión contra PBS-EDTA. Lectura a 280 nm (A_{280nm}) fue de 0,2. Este material fue analizado en electroforesis en gel de acrilamida en la presencia de dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE), en condiciones no reductoras, obteniéndose una sola banda de peso molecular 140.000 (C4c).

La preparación de C4c fue inoculada en conejos hembras New Zealand/White de 6 meses de edad. En cada conejo se inoculó un total de 3 ml consistentes de volúmenes iguales de adyuvante de Freund completo (CFA) y antígeno. El día 0 la mitad de esta preparación se inoculó subcutáneamente en el cojinete plantar izquierdo y la otra mitad intramuscularmente en el muslo derecho. Los animales fueron reinoculados el día 14 con 200 μ g de C4c en CFA, distribuidos en partes iguales en el cojinete plantar derecho y el muslo izquierdo. Una tercera inoculación de 100 μ l de C4c por conejo fue hecha en día 25 inoculando antígeno intraperitonealmente, sin CFA. A partir del

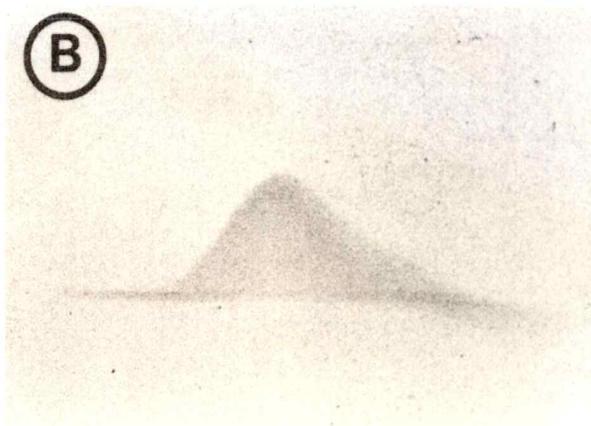
día 32, los animales fueron sangrados semanalmente, por lo menos durante 1 mes.

Los antisueros fueron probados en CIE y RIE contra sueros de ratones de diversas cepas. Cuando se usó suero de ratones C4-alto, Slp⁰, se observó un solo pico en CIE (Figura 5A y 5B, macho C3H.B10 y hembra C3H.OH respectivamente). Cuando se probaron ratones C4-bajo (Figura 5C, C3H.OL) en CIE se observó un pico muy pequeño (5% del área obtenida con animales C4-alto). En RIE, los animales con bajos niveles de C4 nuevamente presentaron menos de un 10% de los niveles presentes en el suero de animales C4-alto (Figura 5D). Por otra parte, en todos los ratones Slp^a-Slp-a, se observó otro pico, con movilidad electroforética mas lenta (Figura 6A). En la Figura 6B se demuestra que este pico corresponde en realidad a Slp. Para ésto se usó una combinación de RIE y CIE. En este experimento se sometió a CIE el suero de machos C3H.WSlp (C4-alto, Slp^a) y se incluyó el aloantisuero anti-Slp en la primera dimensión, por lo cual se formó un "rocket" de precipitación y la eliminación del pico correspondiente a Slp en la segunda dimensión. Como control negativo se incluyó en la primera dimensión un antisuero contra un antígeno no relacionado (C5: quinto componente del complemento)

A



B



C



D

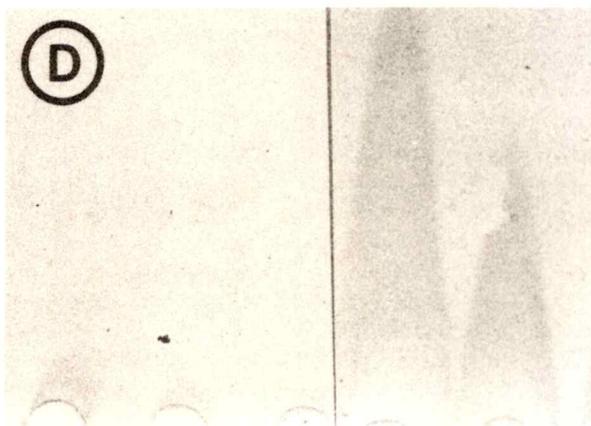


Figura 5

Figura 5: Demostración de la monoespecificidad del anti-suero anti C4c mediante CIE (A, B, C, ánodo a la izquierda) y RIE (D, ánodo en la parte superior). A y B, machos C3H.B10 (Ss alto S1p⁰) y hembras C3H.B10 (Ss alto-S1p⁰) respectivamente. C, machos C3H.0L (Ss bajo-S1p⁰). Estos machos produjeron un precipitado equivalente a un 5% del área de precipitado presente en A o B. RIE fue hecho diluyendo 1/2, 1/4, 1/8 sueros con bajos niveles de C4 (D, lado izquierdo y altos niveles (D, lado derecho).

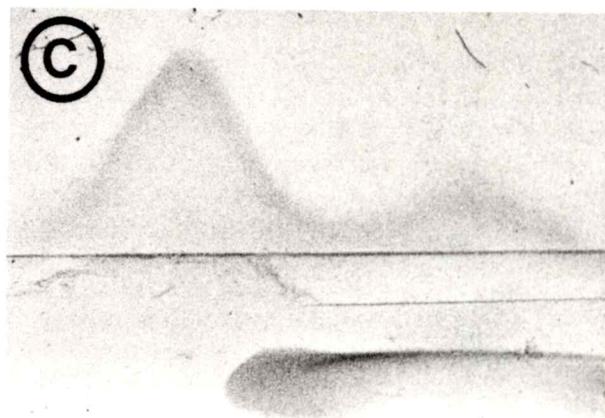
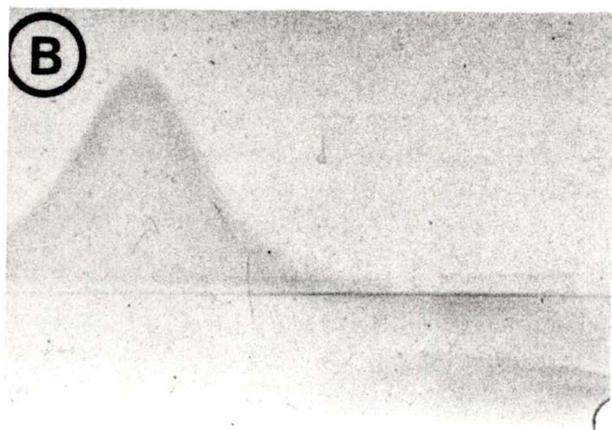
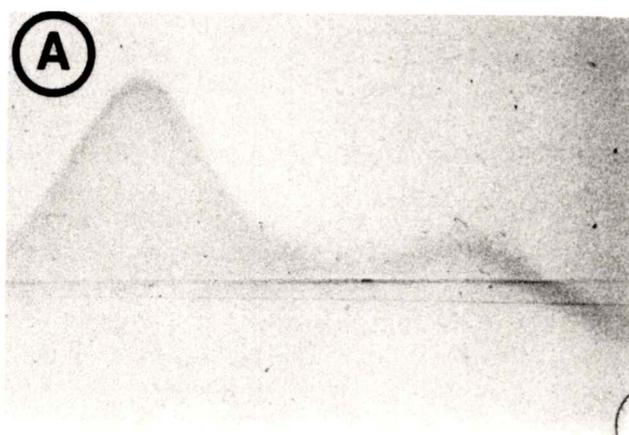


Figura 6

6

Figura 6: Demostración de la reactividad cruzada del anti-suero anti-C4c con la proteína S1p, mediante una combinación de RIE y CIE. Suero de machos C3H.W7 (Ss alto-S1p^a) fue probado con CIE contra anti C4c (A). Se obtuvo dos picos de movilidad electroforética diferente: uno mayor (anódico) y uno menor (catódico). Si se incluye IgG anti-S1p en la primera dimensión (B) se forma un "rocket" y el pico es eliminado específicamente de la segunda dimensión. Como control negativo de este último experimento se incluyó IgG anti-C5 en la primera dimensión (C), nuevamente se formó un "rocket" pero no hubo efecto sobre ninguno de los picos presentes en la segunda dimensión.

que produjo un precipitado que no afectó a C4 o S1p (Figura 6C).. Este protocolo de purificación de C4c e inmunización ha sido usado por lo menos cuatro veces en nuestro laboratorio con resultados similares. El antisuero obtenido ha sido de gran utilidad en gran parte de los experimentos descritos en la sección Resultados.

4.2 Anti S1p

4.2.1. Aloantisuero policlonal contra la proteína

sexolimitada: Este fue preparado de acuerdo a un método publicado anteriormente (148). Brevemente: 5 ml de plasma de ratones DBA/2J machos (Ss alto-S1p^a) al cual se le agregó EDTA, EACA y DFP en concentraciones finales de 0,001, 0,005 y 0,002M respectivamente, fueron pasados por una columna de Sephadex G-200 (100 x 25 cm) a 4°C. Las fracciones de la parte ascendente del segundo pico de densidad óptica fueron combinadas, concentradas a un volúmen igual al del plasma original e inoculadas en ratones DBA/1J (Ss alto-S1p⁰), hembras o machos. El día 0 se inoculó el antígeno emulsionado volúmen a volúmen con CFA, 20 μ l en cada cojinete plantar posterior. El día 7 se inoculó 50 μ l del mismo material en la

región supraescapular, el día 21, 50 μ l intraperitoneal sin CFA y, el día 28, 50 μ l intravenoso (vena lateral derecha de la cola). Los animales fueron sangrados los días 35, 42, 49 y 56 por la vena y arteria ventral de la cola. El día 63 se inoculó 50 μ l de antígeno intravenoso y el día 70 los animales fueron sacrificados mediante sangría exhaustiva, bajo anestesia etérea. Cuando este antisuero fue probado en RIE dió una reacción positiva con una serie de machos Ss alto-Slp^a y negativa con hembras Ss alto-Slp^a. Las cepas DBA/2J (donante de Slp) y DBA/1J (productora del aloantisuero) tienen los mismos alotipos de inmunoglobulinas y no se han detectado otras diferencias en el suero aparte de la respectiva presencia y ausencia de Slp. Por lo tanto, este antisuero es monoespecífico contra Slp, de acuerdo a todos los criterios disponibles.

4.2.2 Anticuerpos monoclonales anti-Slp: Anticuerpos monoclonales contra Slp han sido preparados recientemente en nuestro laboratorio. El método usado incluye la descripción fundamental de Köhler y Milstein (153) y Pontecorvo (154) con algunas modificaciones introducidas en nuestro laboratorio por Potocnjak y colaboradores (155). Brevemente; ratones hembras DBA/1J fueron inmunizados de acuerdo a lo

descrito en la sección 4.2.1. Cuatro días después de la última inyección se procedió a sacar los bazos y preparar una suspensión celular que fue fusionada con una línea de células mielomatosas (P3U1). La presencia de anticuerpos específicos, fue detectada en un radioinmunoensayo. Para ésto se procedió a cubrir placas de microtitulación, hechas de cloruro de polivinilo, con inmoglobulina de conejo anti-Ss de ratón (como se mencionó anteriormente estos anticuerpos reconocen a Ss y S1p). Luego las placas fueron incubadas secuencialmente con: (a) plasma S1p positivo o negativo; (b) sobrenadantes de los cultivos de hibridomas o inmunoglobulina G normal (no inmune); (c) Inmunoglobulina G de cabra marcada con ^{125}I anti-inmunoglobulina de ratón.

Así se logró detectar 15 híbridos estables productores de anti-S1p, 9 de los cuales fueron clonados mediante diluciones límite y tres de estos clones fueron inoculados intraperitonealmente en ratones histocompatibles, produciéndose así líquido con grandes cantidades de inmunoglobulinas monoclonales anti-S1p. Estas inmunoglobulinas fueron purificadas mediante precipitación con sulfato de amonio seguido por cromatografía en DEAE-Sephacel y elución

con gradiente salina. Los tres anticuerpos monoclonales obtenidos son IgG1, de acuerdo a tipificación en inmunodifusión doble contra antisueros específicos. Estos anticuerpos monoclonales anti-Slp han sido usados fundamentalmente para detectar la presencia de Slp en hembras de algunas cepas murinas mediante un radioinmunoensayo de gran sensibilidad que será descrito más adelante.

- 4.3 Anti H-2.7: Un tercer antisuero de gran importancia en los experimentos descritos en esta disertación es el aloantisuero contra el grupo sanguíneo H-2.7. Este antisuero fue generado en la combinación (B10.F (13R) x A/J)F1 anti B10.P que implica a los haplotipos (KPIPSbDb x KIKSdDd)F1 anti KPIPSDP. La incompatibilidad es tal que implica sólo a las regiones S y D. En pruebas de citotoxicidad el antisuero reacciona solo con H-2DP (H-2.22). En pruebas de hemaglutinación, la reactividad con H-2f, H-2S y H-2j es específica para H-2.7. La absorción in vivo en animales H-2k puede remover la actividad anti H-2.7 pero no la actividad anti H-2.22. La hemaglutinación con glóbulos rojos H-2P podría deberse a la reacción con H-2.2.7 o H-2.22.

4.4 Anti C4-bp: Un cuarto antisuero importante en este trabajo, es aquel contra C4-bp. Este antisuero fue obtenido en nuestro laboratorio (151) usando el siguiente procedimiento: 5 ml de plasma de ratones AKR/J (H-2^k, Ss-bajo-S1p⁰) con 0.010 M EDTA fue filtrado por una columna de Sephadex G-200. C4bp fue excluida con otras macromoléculas en el primer pico proteico cuyas fracciones se combinaron. 1.5 mg de este material fueron emulsionados en CFA e inoculados al día 0 en conejos en los cojines plantares. Estos animales fueron reinoculados intraperitonealmente el día 14 con 0.75 mg de proteína y sangrados los días 21 y 24. Estos antisueros fueron probados en CIE contra plasma de ratón, detectándose anticuerpos contra C4-bp y varios contaminantes. La actividad contra estos contaminantes pudo eliminarse absorbiendo los antisueros con suero de hembras que comparten otros antígenos y que tienen sólo un 30% de los niveles séricos de C4-bp presentes en los machos (151-152). Este antisuero nos permitió caracterizar a C4-bp como un nuevo componente regulatorio del sistema del complemento (151).

4.5 Otros antisueros: Una serie de antisueros fueron usados como controles positivos o negativos en los experimentos presentados aquí. Un aloantisuero

contra el quinto componente del complemento del ratón fue preparado de acuerdo al método de Cinader y colaboradores (156). Antisuero de cabra contra C4 humano fue adquirido de Meloy Laboratories Inc., Springfield, Vancouver. Este antisuero reacciona fuertemente en forma cruzada con Ss y débil con Slp. Un antisuero contra C3 humano fue preparado inoculando conejos con 100 μ g de C3 humano puro, incorporado en CFA.

De todos los antisueros descritos aquí se procedió a purificar IgG. Cuando el antisuero fue preparado en ratones (aloantisueros) el suero inmune fue filtrado por columnas Sephadex G-200, se combinaron las fracciones del segundo pico de densidad óptica y se agregó un volúmen igual de una solución saturada de sulfato de amonio. El precipitado fue disuelto en PBS y la IgG purificada electroforéticamente en bloques de Pevikon (157). La presencia de inmunoglobulinas específicas en las fracciones de Pevikon fue detectada en RIE, usando suero de ratones positivos para los antígenos respectivos.

Cuando el antisuero fue preparado en conejos, las inmunoglobulinas fueron purificadas por fraccionamiento del suero completo en columnas de DEAE-celulosa.

5. Métodos analíticos: La Figura 7 representa un esquema general de la metodología usada en la búsqueda de variantes electroforéticas de Ss y S1p. Esta metodología se puede describir resumidamente como sigue: Volúmenes que variaron de 1 a 5 ml de plasma con EDTA, EACA y DFP fueron filtrados a través de columnas de Sephadex G-200, las fracciones de la porción ascendente del segundo pico de densidad óptica fueron combinadas y una porción de ellas radiomarcada con ^{125}I . Este material fue tratado con IgG anti-S1p y después de un corto período de incubación los complejos inmunes fueron separados con S. aureus. El pellet se utilizó para el análisis de S1p y el sobrenadante para el análisis de Ss. Este pellet fue eluido ya sea con tampón para muestras a ser corridas en SDS-PAGE (SDS-SB) o con tampón para muestras a ser corridas en isoelectroenfoque (IEF) o en geles bidimensionales (IEF seguida de SDS-PAGE) (IEF-SB).

El sobrenadante fue tratado con inmunoglobulina anti-Ss, seguido por S. aureus y el pellet obtenido fue tratado al igual que el pellet usado en el análisis de S1p (nótese que este material carece de S1p ya que éste fue removido en una primera etapa. Esto es esencial para estudiar Ss ya que anti-Ss precipita Ss y S1p).

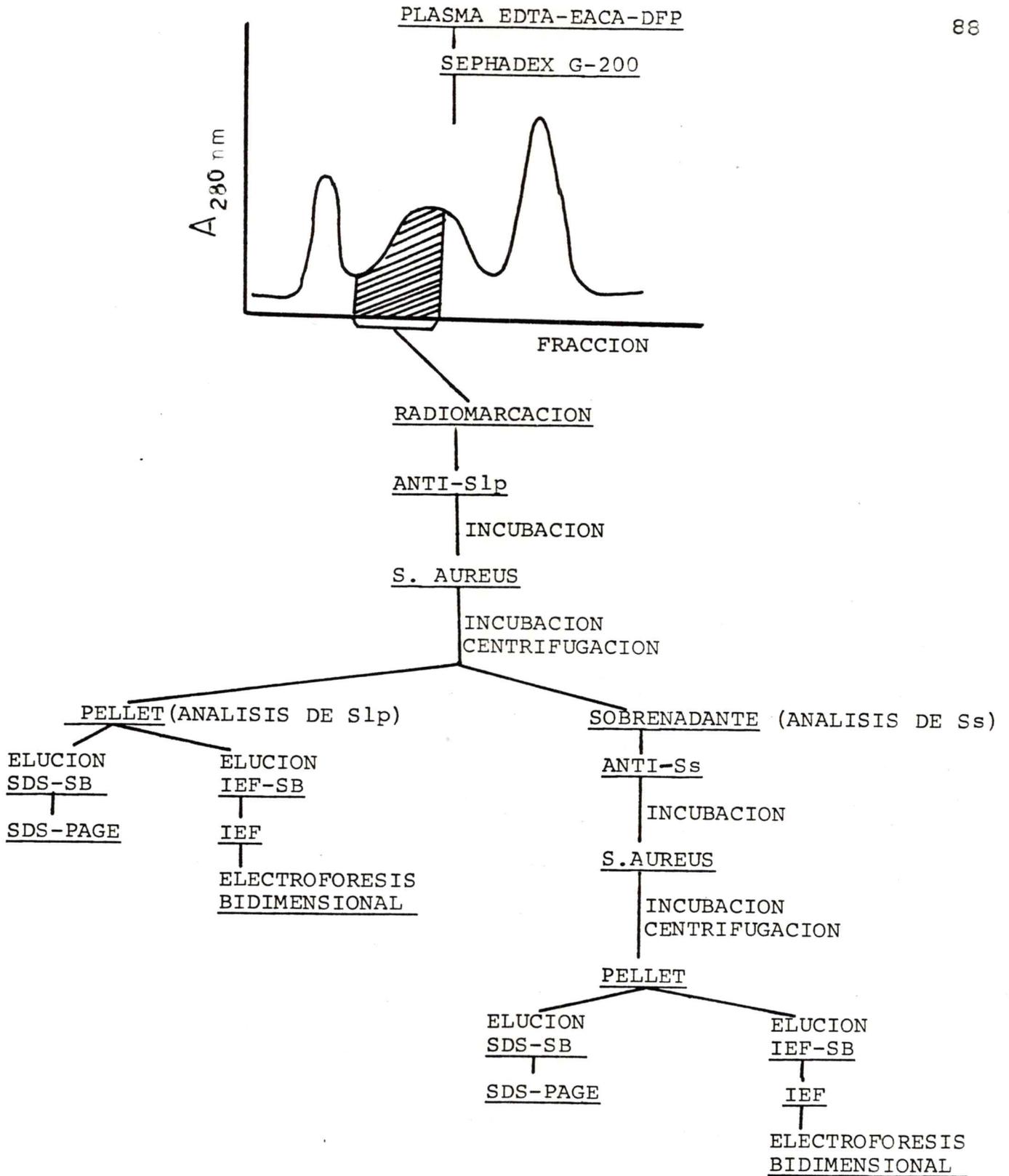


Figura 7

Figura 7: Esquema general de la metodología usada en la búsqueda de variantes electroforéticas de Ss y SIp (ver texto).

- 5.1 Radiomarcación: Las fracciones de plasma conteniendo Ss y S1p fueron radiomarcadas de acuerdo a una modificación de un método descrito previamente (158) como sigue: 25 μ l de tampón tris-HCl 0,8 M fueron mezclados con 2 mC de yodo 125 (New England Nuclear, Boston, Massachusetts, U.S.A.) contenidos en 20 μ l de PBS. Luego se agregó 50 μ l de la muestra conteniendo Ss/S1p y 25 μ l de cloramina T (0,5 mg/ml). La muestra fue incubada 4 minutos a temperatura ambiente. La reacción fue detenida al agregar 25 μ l de metabisulfito de sodio (0,5 mg/ml) y 0,5 ml de PBS a 40°C. El material radiomarcado fue dializado contra 200 y 1000 volúmenes de PBS durante 6 y 12 horas respectivamente. Al sacarlo de la bolsa de diálisis, se agregó 0,1 ml de albúmina sérica bovina (BSA) (10 mg/ml) para evitar pérdidas por adsorción no específica.
- 5.2 Inmunoprecipitación: Este método se basó fundamentalmente en aquel descrito por Kessler en 1975 (159) para el aislamiento rápido de complejos inmunes. Este método se basa en la fuerte afinidad de la proteína A (presente en la superficie de algunas cepas de S. aureus) por la porción Fc de las moléculas de inmunoglobulina.

Aproximadamente 10^7 cpm de las muestras radiomarcadas conteniendo Ss y SIp fueron tratadas con las fracciones inmunoglobulínicas experimentales o controles. Estas muestras fueron incubadas por períodos que variaron entre 2 y 30 minutos a 4°C . Los complejos inmunes fueron separados agregando entre 30 y 100 μl de una suspensión al 10% de S. aureus en NET-0,05% NP-40. Esta mezcla fue incubada 10 minutos en el hielo, agitando cada 2 minutos. Los tubos fueron centrifugados a 2000 g durante 15 minutos y los pellets lavados 2 veces con tampón NET-0,05% y 2 veces con tampón DOC. Luego se midió la radioactividad unida a las bacterias y los complejos fueron eluidos con tampones apropiados para el análisis en SDS-PAGE o en IEF (SDS-SB y IEF-SB respectivamente), incubando 20 minutos a temperatura ambiente. Después de centrifugar se procedió a contar la radioactividad en los sobrenadantes y a calcular la recuperación específica.

5.3 Procedimientos electroforéticos: Los procedimientos electroforéticos utilizados en este trabajo tuvieron cuatro objetivos:

- a) Determinar la estructura, en términos de cadenas polipeptídicas, de las moléculas Ss

y S1p (SDS-PAGE).

- b) Buscar variantes estructurales expresadas en variaciones en carga eléctrica de las cadenas polipeptídicas (IEF y electroforésis bidimensional).
- c) Cuantificar Ss y S1p después de procedimientos de purificación (RIE).
- d) Controlar la especificidad de diversos antisueros (CIE).

5.3.1 Electroforésis en geles de acrilamida: La acrilamida polimerizada forma geles compactos de porosidad variable de acuerdo a su concentración. Esta porosidad restringe la movilidad de las moléculas proteicas, las que en un campo eléctrico se separarán no solo de acuerdo a carga eléctrica neta sino también de acuerdo a tamaño, el que generalmente está relacionado con peso molecular.

5.3.1.1 Electroforésis en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE). Para estimar el peso molecular de cadenas polipeptídicas en geles de poli(acrilamida), es necesario eliminar el efecto diferencial de la carga eléctrica de las moléculas. Esto se logra saturándolas con SDS. Este detergente aniónico otorga

a todas las cadenas polipeptídicas una carga fuertemente negativa. La carga eléctrica no ejercerá un efecto significativo en la discriminación electroforética la que será ejercida por la porosidad de la poliacrilamida en base a tamaño molecular.

Esta técnica se usó de acuerdo a la descripción para geles en bloques ("slabs") de Laemmli publicada en 1970 (160). En la mayoría de los casos se usó un gel concentrador ("stacking gel") al 3,5% y geles separadores al 7%. Diversas proteínas no radioactivas fueron usadas como patrones de pesos moleculares. Como todas las muestras estudiadas fueron radiomarcadas, fue necesario someter los geles teñidos y secos a radioautografía, durante 1 a 5 días, a -70°C , usando películas Kodak, Rohester, Nueva York, U.S.A.) y pantallas intensificadoras (Cronex; Dupont Instruments, Wilmington, Dalaware, U.S.A.).

5.3.1.2 Electroforésis bidimensional: La técnica electroforética bidimensional en geles de poliacrilamida introducida por O'Farrel en 1975 (161) significó un importante avance en el análisis de mezclas complejas de polipéptidos. Esta técnica combina la alta sensibilidad del enfoque isoeléctrico (IEF) y SDS-PAGE en una primera y segunda dimensión respectivamente. Por

lo tanto, las moléculas se separaron en base a dos criterios independientes: punto isoeléctrico (pI) y peso molecular.

La decisión de usar esta técnica en este trabajo fue estimulada por la posibilidad de introducir varias modificaciones importantes que facilitaron un procedimiento altamente laborioso y aumentaron la precisión de la comparación entre las muestras (162). Esta técnica es de importancia central en una parte substancial de los experimentos presentados aquí. Más aún, se podría asegurar que sin las modificaciones introducidas a esta técnica, muchos de los experimentos presentados aquí habrían sido extremadamente difíciles de llevar a cabo. En los párrafos siguientes se detallan estas modificaciones.

Los tampones y soluciones usados son aquellos descritos por O'Farrel (160) y detallados en la sección 1.

Primera dimensión: El isoelectroenfoque fue hecho en placas de vidrio estandar para SDS-PAGE en bloque ("slab") (16 x 27 cm), usando espaciadores de plástico de 1.5 mm de grosor. Una solución de acrilamida al 4.5% (18.5 g de urea ultrapura, 5.7 ml de una solución madre de acrilamida al 30% p/v, 6.7 ml

de NP-40 al 10% v/v, 5.8 ml de agua, 2% p/v de anfólitos, 50 μ l de Temed y 25 μ l de persulfato de amonio al 10% p/v, con un volúmen final de 37 ml) se vacía entre las placas de vidrio (este molde debe sellarse cuidadosamente con agarosa al 2% p/v derretida en agua). Los pozos para cargar las muestras se forman en el extremo superior (catódico) del gel por polimerización de la acrilamida alrededor de peines de plástico.

Una vez que el gel ha polimerizado, se procede a sacar el peine, a aspirar el líquido residual presente en los pozos para las muestras y a colocar el molde en un aparato para electroforésis vertical similar al descrito por Laemmli (159). Luego, se procede a equilibrar los pozos para muestra con 50 μ l de IEF-SB durante 10 a 20 min. Este tampón es eliminado por aspiración. El volúmen de muestra radiomarcada a ser cargada por pozo no debe superar el 70% de la capacidad de éste y dependerá del número de cpm por volúmen de muestra, del número de bandas proteicas específicas esperadas y del tiempo de exposición radioautográfica previsto. 6000 cpm por banda requieren 1-2 h de exposición a -70°C usando pantallas intensificadoras. Alternativamente, 0.5-3.0 μg

de proteína por banda son detectados fácilmente después de tinción con Coomasi blue. Los pozos que no se cargan con muestras deben cargarse con IEF-SB para mantener una conductividad homogénea a través del gel. El espacio restante en el orificio de la muestra debe ser cuidadosamente llenado con tampón para cubrir (IEF-OB o IEF-"overlay buffer") de modo tal que se obtenga una interfase entre este tampón y la muestra. Luego, el extremo catódico completo del gel es cubierto cuidadosamente con 0.02M NaOH degasificado y se procede a llenar el estanque superior con el mismo electrolito. La función del tampón para cubrir es proteger a la muestra de la acción directa de este electrolito, por lo cual debe tenerse especial cuidado de no alterar las interfaces muestra/IEF-OB/NaOH. El estanque inferior se llena con H_3PO_4 degasificado y se eliminan las burbujas que se retienen en la superficie anódica del gel. Para ésto se usa una jeringa con una aguja curva. La electroforésis se realiza a 10 mA, amperaje constante, hasta alcanzar 400 V; en este momento se aplica un voltaje constante de 400 V durante 18 horas. Si se dispone de una fuente de poder constante la electroforésis se puede realizar a 1,5 Watts durante 18 horas.

Segunda dimensión: La composición (porosidad) del gel usado en esta dimensión varía de acuerdo al peso molecular del producto a ser analizado. En estos experimentos descritos aquí se usó generalmente un gel concentrador al 3,5% y un gel separador al 7%. La solución de acrilamida se vacía en un molde similar al usado en la primera dimensión, excepto que los espaciadores de plástico son 0,1 mm más gruesos. El volumen del gel separador debe calcularse para dejar espacio a un gel concentrador de 1,5 cm de profundidad y 1,5 cm de espacio sobre este gel.

Cuando se completa la primera dimensión, se saca una placa de vidrio del molde y la otra, con el gel adherido, se coloca sobre una hoja de papel milimetrado. Este papel se usa como referencia para cortar tiras de acrilamida de 1,5 cm de ancho conteniendo los polipéptidos enfocados. Cada tira de acrilamida se coloca en un tubo de ensayo conteniendo 10 ml de SDS-SB y se deja equilibrar durante 90 minutos a temperatura ambiente. Una porción del gel conteniendo también muestras experimentales y controles, puede ser fijada con tres cambios de solución para desteñir (este tratamiento también eluirá los anfolitos), teñida, secada y radioatografiada. Esto proporcionará información sobre el comportamiento

isoeléctrico (primera dimensión) de las muestras. Algunas tiras centrales, que no contengan muestras, y los bordes laterales de la primera dimensión pueden ser cortados en segmentos de 1 cm y eluidos durante 2 horas a temperatura ambiente con agua destilada degasificada, para determinar la gradiente de pH. La calidad de estas gradientes permite hacer separaciones de excepcional sensibilidad y reproducibilidad. La Figura 8 muestra tres de estas gradientes obtenidas en experimentos realizados en días diferentes.

Para la segunda dimensión se usó un aparato del mismo tipo usado en la primera, con ambos estanques llenos con tampón para SDS-PAGE. La tira de IEF ya equilibrada en SDS-SB se coloca sobre una hoja de parafilm o plástico, se levanta con una regleta de plástico y se coloca entre las placas de vidrio sobre el gel concentrador de la segunda dimensión. Es importante que el contacto entre la tira de IEF y el gel concentrador sea completo. El espaciador más grueso (1,6 mm) usado en esta segunda dimensión, permite la colocación con un mínimo de esfuerzo y presión de la tira de IEF, entre las placas de vidrio, manteniendo a esta tira en contacto

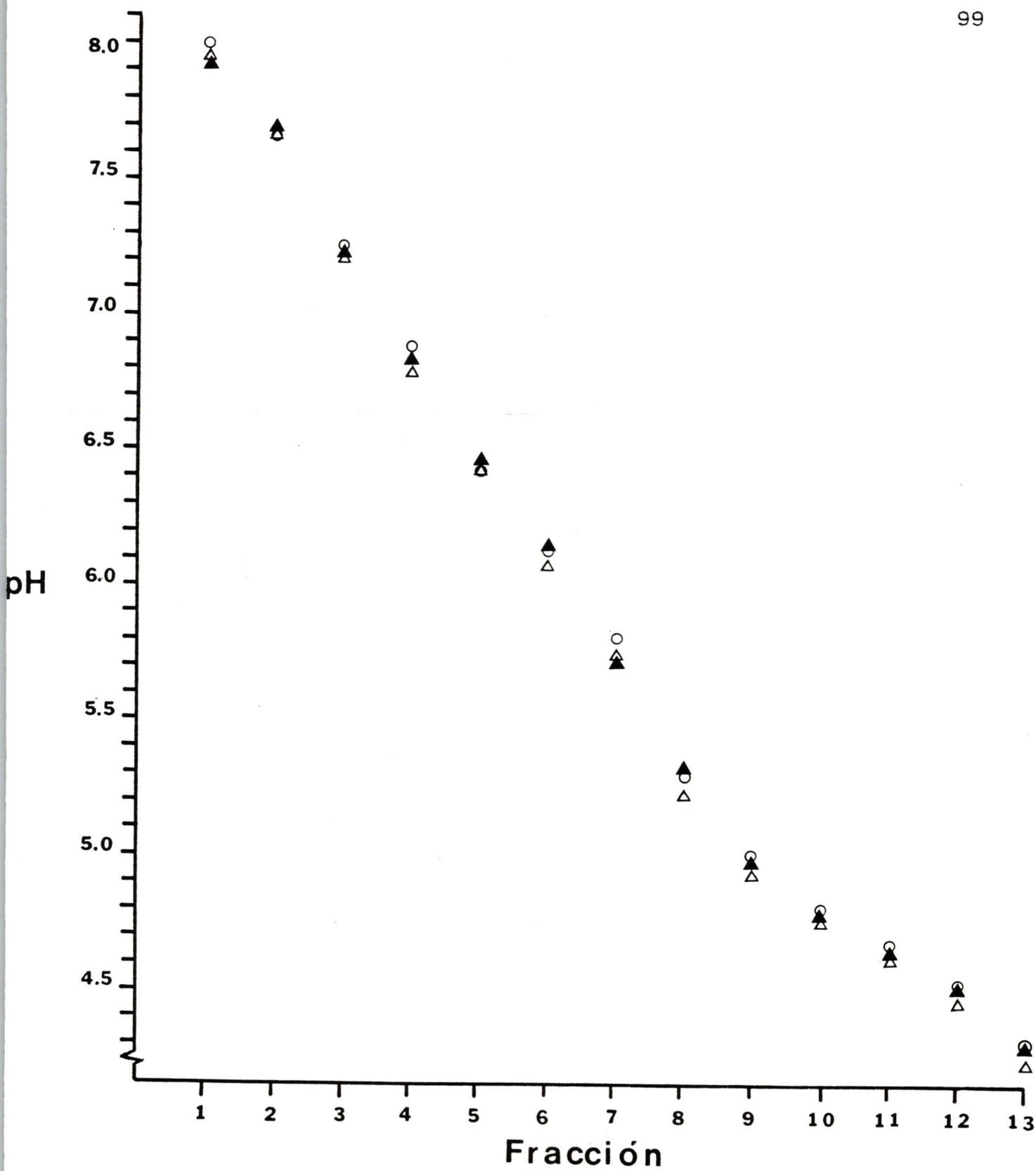


Figura 8

Figura 8: Gradiente de pH de tres geles de IEF corridos independientemente. Después de correr la primera dimensión se cortaron tres tiras de 1 cm. de ancho de poliacrilamida de cada gel (2 de los border y una del centro), en sentido anódico-catódico. Estas tiras se cortaron en segmentos de 2 cm, se eluyeron durante 2 h en 2 ml de agua degasificada y se midió el pH. Cada valor representa el pH promedio de tres puntos a través del gel. Círculos, triángulos abiertos y triángulos cerrados representan tres experimentos independientes

estrecho y uniforme con el gel concentrador. En las cavidades que quedan entre los extremos de la tira y los espaciadores laterales se pueden incluir marcadores de peso molecular y la muestra experimental, eluída con SDS-SB. La electroforesis se corre hasta que el frente teñido salga del gel. Luego el gel se tiñe, se seca y se radioautografía.

Las modificaciones propuestas aquí se basan en que la primera dimensión electroforética se realiza en un bloque vertical en lugar de tubos. De esto se derivan varias ventajas:

- a. Es un hecho conocido que en la técnica de O'Farrel la longitud de los tubos afecta la reproducibilidad. En otras palabras, cada tubo es prácticamente un experimento independiente. En cambio, en el sistema en bloque, la longitud, posición y ancho de cada senda electroforética es determinada uniformemente por el peine de plástico y el molde único usado.
- b. En el sistema O'Farrel cada tubo debe llenarse individualmente con una jeringa y una aguja larga, comenzando en el fondo para evitar la retención de

burbujas. En el sistema en bloque, el molde, que puede recibir hasta 14 muestras, puede llenarse rápidamente vaciando la solución directamente.

- c. En la técnica O'Farrell, después de la polimerización debe sacarse el Parafilm usado para sellar el fondo de cada tubo y reemplazarse por membranas de diálisis, sujetas al tubo con elásticos. En el sistema en bloque, se saca el espaciador del fondo y todo el extremo anódico del gel es expuesto al electrolito ácido.
- d. En el sistema O'Farrell, después de la primera dimensión, los geles se sacan individualmente conectando una jeringa a los tubos y aplicando presión positiva. En el sistema en bloque, todas las muestras enfocadas son expuestas simultáneamente al separar las placas de vidrio con una espátula.
- e. El correr el IEF en bloque tiene otra ventaja general que consiste en que todas las muestras pueden correrse en

el mismo gel. Por lo tanto, la variación o error experimental entre las muestras se reduce al mínimo. Esto es fundamental si esta técnica se va a usar en la búsqueda de variantes electroforéticas de proteínas. En el sistema O'Farrell la comparación entre cilindros requiere del alineamiento manual de éstos para su secado y posterior radioautografía. Además, frecuentemente, los cilindros secos producen una resolución deficiente de las bandas.

- f. En el sistema O'Farrell, la separación en la segunda dimensión requiere una modificación de las placas de vidrio (que debe ser hecha por personal especializado) para poder recibir el cilindro de acrilamida del IEF. Para mantener este cilindro en su lugar y evitar que se mezclen los frentes proteicos durante la migración hacia el bloque de SDS-PAGE, el cilindro debe incluirse en una solución de agarosa caliente. Esta etapa requiere manipulación rápida y cuidadosa. Estos pasos

se simplifican o eliminan, en la modificación usada aquí, simplemente porque ambas dimensiones se hacen en bloque, usando el mismo equipo y las tiras del IEF simplemente se colocan sobre el segundo bloque.

- g. Por último, del hecho de usar el mismo equipo para ambas dimensiones se deriva una ventaja económica importante, ya que el aparato de electroforesis en bloque puede ser fabricado a menos de un cuarto del costo del aparato para electroforésis en tubo.

Por los motivos citados anteriormente esta modificación ha sido exitosamente usada en algunos de los experimentos presentados aquí.

- 5.3.2 Electroforesis en agarosa: En este caso las moléculas proteicas migran de acuerdo a la carga eléctrica ya que la porosidad es tal que no restringe la movilidad en base a diferencias de tamaño molecular. Si la migración se realiza en la presencia de anticuerpos contra alguno de los componentes presentes en la mezcla (inmunolectroforesis) se producirá un precipitado que puede usarse con fines cualitativos o cuantitativos.

5.3.2.1 Inmunolectroforesis en cohete o "rocket" (RIE)

(163). El antígeno se coloca en orificios hechos en una placa de agarosa disuelta en un tampón de baja fuerza iónica, a pH 8.6. Esta agarosa contiene una concentración preterminada de anticuerpo (IgG). A este pH, la gran mayoría de las proteínas séricas tienen una carga neta negativa por lo cual migrarán hacia el ánodo. Las inmunoglobulinas presentes precipitarán a las moléculas respectivas formando "rockets" cuya altura será directamente proporcional a la cantidad de antígeno cargado e inversamente proporcional a la cantidad de inmunoglobulina presente en la agarosa. La base del "rocket" es constante pues está dada por el tamaño del orificio donde se cargó la muestra.

5.3.2.2 Inmunolectroforesis cruzada (CIE) (164)

En este caso el antígeno o mezcla antigénica se corre, en una primera dimensión, en ausencia de anticuerpos y luego se someten a una segunda dimensión en agarosa conteniendo una concentración de anticuerpos preestablecida. En este caso se formarán áreas de precipitados con forma de una curva de distribución aproximadamente normal. El área debajo de esta curva

será directamente proporcional a la concentración de antígeno e inversamente proporcional a la concentración de anticuerpos presentes en la segunda dimensión. Esta técnica permite estimar movilidad electroforética, cuantificar determinados antígenos y establecer relaciones de identidad entre antígenos de movilidad similar.

- 5.4. Titulación hemolítica de C4. Glóbulos rojos de oveja o vacuno fueron sensibilizados con inmunoglobulina M (hemolisina) anti-oveja o anti-vacuno, preparada por inoculación de los eritrocitos respectivos en conejos (EA). EAC1 fueron preparados mezclando EA, en DGVB⁺⁺, con un volúmen igual de C1 de cuy parcialmente purificado y diluido para proporcionar 250 moléculas efectivas por célula. El C4 presente ya sea en suero murino, plasma o mezclas de fracciones obtenidas de columnas Sephadex G-200 fue eficientemente titulado incubando 0,5 ml de EAC1, a una concentración de 1×10^8 células/ml, con un volúmen igual de diluciones seriadas del material investigado. Después de incubar durante 15 minutos a 30°C la reacción fue completada agregando una dilución de 1/100 de suero de cuy genéticamente deficiente en el cuarto componente del complemento. A este suero se

le agregó C2 humano oxidado (estabilizado) con el objeto de resolver el problema de la incompatibilidad de especies entre C4 de ratón y C2 de cuy para formar una C3 convertasa efectiva. Después de 60 minutos a 37°C se procedió a medir la hemoglobina liberada, en un espectrofotómetro a 415 nm. Los títulos fueron calculados graficando las diluciones de las muestras investigadas contra $y/1-y$, donde $y = \% \text{ lisis}/100$, y determinando la dilución en que $y/1-y=1$.

5.5 Tratamiento de Ss y SIp con $\bar{C1}$. 10 μl de C1 purificado (1,4 mg/ml en DGVB⁺⁺), preparado de acuerdo a un método publicado anteriormente (165), fueron agregados a 100 μl de una muestra positiva para Ss y SIp. Los tubos controles recibieron volúmenes iguales de tampón. Todos los tubos fueron incubados 1 h a 37°C. El efecto de C1 sobre Ss y SIp fue estimado funcionalmente de acuerdo a lo descrito en la sección 5.4, electroforéticamente en CIE y estructuralmente en SDS-PAGE. Esto último se hizo bajo condiciones reductoras y no reductoras.

5.6 Prueba de hemaglutinación. La prueba de la polivinilpirrolidona (PVP) fue realizada de acuerdo a Stimpfling (166) con algunas modificaciones menores, Se prepararon diluciones seriadas de antisueros en

una solución de PVP al 0,9% p/v (0,9% PVP en PBS, pH 7,5 con 0,2% p/v de albúmina sérica bovina), comenzando con una solución de 1/10. Se prepararon además, suspensiones al 2% en 0,85% p/v NaCl de eritrocitos lavados (dos veces en PBS y una en 0,85 p/v NaCl). 0,05 ml/tubo de la respectiva suspensión de eritrocitos fueron agregados a volúmenes de 0,1 ml de antisuero diluido. Las mezclas de sueros y eritrocitos fueron incubadas durante dos horas a temperatura ambiente, centrifugadas durante 30 segundos a 1000 g. resuspendidas suavemente co 0,85% NaCl y leídas.

- 5.7 Prueba de inhibición de la hemaglutinación. Los ratones fueron sangrados por la arteria y vena ventral de la cola en tubos con Na₃HEDTA suficiente para una concentración final de 0,010M, a pH 7,5. Estos tubos fueron centrifugados inmediatamente en frío y el plasma obtenido usado en el ensayo. El aloantisuero se diluyó como se describe en la sección 5.6. Plasma completo o fracciones de él se mezclaron con las soluciones de antisuero en una proporción de 1:1 y luego se agregó la suspensión de eritrocitos al 2%. Las mezclas fueron incubadas, centrifugadas y los resultados leídos como se

describe en la sección anterior.

5.8 Purificación parcial de C4d (fragmento $\alpha 2$ de C4).

Este fragmento se genera por la acción conjunta de C3b-INA y C4-bp sobre C4b (Figura 3). Suero de animales DBA/2J fue recolectado en tubos de vidrio y dejado coagular a temperatura ambiente durante 20 minutos, en el hielo durante 1 hora, a 37°C durante 1 hora y centrifugado a 2000 g durante 10 minutos. El suero se dejó a 4°C durante 12 horas y luego fue pasado por una columna de Sephadex G-200. El tercer pico de densidad óptica fue concentrado (PM 30; Amicom Corp., Scientific Systems Div., Lexington, Massachusetts, U.S.A.) al volúmen original de suero. Esta preparación parcialmente purificada de C4d y otra de C4c (sección 4.1) fueron radiomarcadas e inmunoprecipitadas como se describe en las secciones 5.1 y 5.2 respectivamente.

5.9 Radioinmunoensayo. Un radioinmunoensayo de alta sensibilidad, fue usado para detectar la presencia de la proteína sexo-limitada en el suero de hembras. (Como se describió anteriormente, el uso de técnicas convencionales no ha permitido la detección de S1p en

hembras de diversas cepas murinas). Este ensayo consiste en una modificación del método de doble determinante antigénico ("sandwich") descrito recientemente por Uotila y colaboradores (167). Placas cloruro de polivinilo (usadas para microtitulación) fueron cubiertas primero con 50 ul/tubo de una solución de 5 ug/ml de IgG monoclonal anti S1p, (contra un determinante antigénico A) diluída en 0.1M NaHCO₃, pH 9.6, incubando 12 horas a 4°C. Luego las placas fueron lavadas tres veces con NaCl conteniendo 0.05% Tween 20, incubadas con PBS-1% BSA durante 2 horas a 4°C y lavadas nuevamente. En seguida se agregó 24 ul/tubo de plasma murino diluído seriadamente en PBS con 1% de BSA. Después de incubar 2 horas a 4°C y lavar 3 veces con NaCl-Tween, se procedió a agregar 25 ul/tubo (25 nanogramos) de anticuerpos monoclonales anti-S1p (contra un determinante antigénico B), marcados con ¹²⁵I e incubado a 4°C durante 2 horas. La placa se lavó nuevamente 3 veces con NaCl-Tween y se procedió a contar la radioactividad presente en cada tubo. Para estandarizar este radioinmunoensayo, fue necesario determinar la especificidad relativa, con respecto a determinantes antigénicos presentes en la molécula de S1p, de 3 anticuerpos monoclonales, usando todas las combinaciones posibles y eligiendo aquella que dió el mayor número de cuentas específicas.

6. Análisis estadístico. La relación funcional entre Ss, S1p y el cuarto componente del complemento fue estudiada en diferentes fracciones de plasma. Para esto se procedió a remover específicamente los antígenos Ss o S1p y estimar el efecto de esto sobre la actividad hemolítica de C4. El coeficiente de correlación entre las variables (remoción versus actividad hemolítica residual) fue calculado mediante análisis de regresión por el método de los cuadrados mínimos.

RESULTADOS

1. Los antígenos Ss y Slp son dos proteínas estructuralmente relacionadas pero funcionalmente diferentes (150). Los experimentos presentados en esta sección demuestran que Ss y Slp pueden ser diferenciados funcionalmente considerando: (a) participación en el sistema hemolítico del complemento, (b) susceptibilidad a la actividad enzimática de C1s y (c) afinidad por C4-bp. Además se demostrará aquí que Ss y Slp tienen rasgos estructurales generales similares con algunas diferencias que los identifica claramente.

- 1.1 El comportamiento cromatográfico de los antígenos Ss y Slp y de la actividad hemolítica de C4 es predecible. La Figura 9 muestra el modo de elución de los antígenos Ss y Slp en relación a la actividad hemolítica de C4. Cuando la cromatografía se hace con plasma (Figura 9A) la mayor parte del antígeno Ss y la actividad hemolítica de C4 (área punteada) coeluyen en la porción ascendente del segundo pico proteico. En suero (Figura 9B), la mayor parte de la actividad hemolítica se pierde y el antígenos Ss se detecta ahora en el primer pico, coeluyendo con

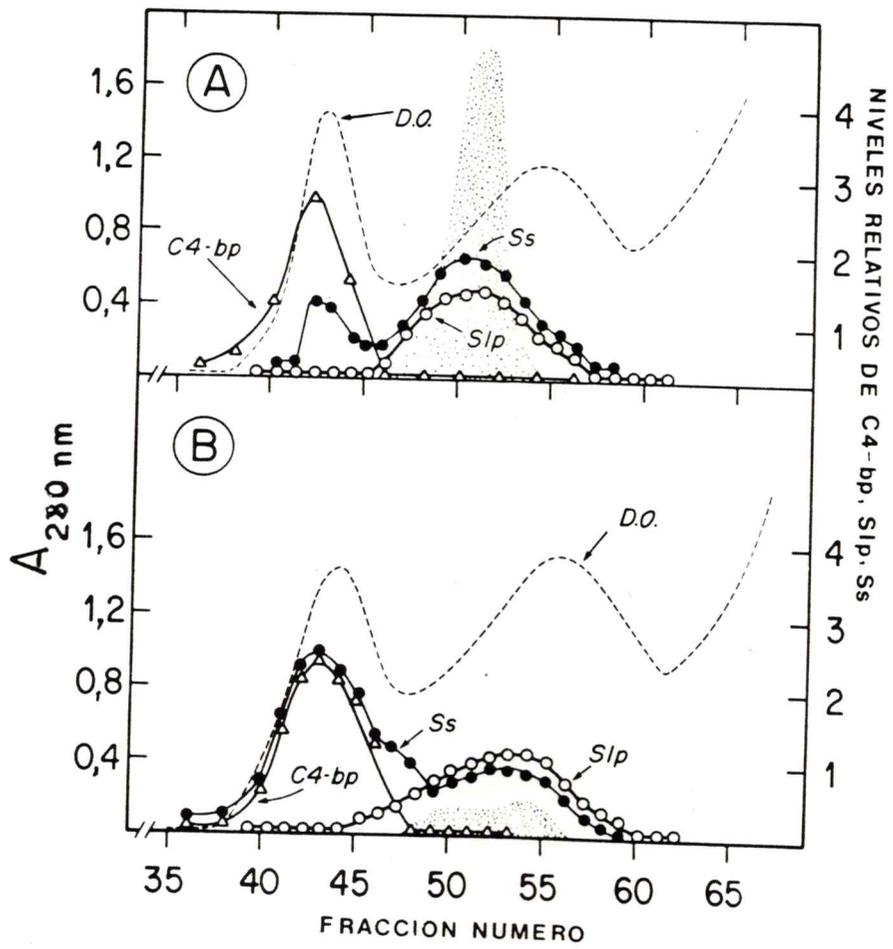


Figura 9

Figura 9: Cromatografía en Sephadex de G-200 de plasma-EDTA (A) o suero (B) de ratones machos DBA/2J (H-2^d, Ss-alto-Slp^a). Tampón VBS⁼, pH 7.4, 7.4mS a 0°C, con 0.002M NaH₃EDTA y 0.005M EACA.

Las concentraciones relativas de C4-bp, Ss y Slp fueron determinadas en RIE. La actividad hemolítica de C4 se representa en el área sombreada. C4-bp fue detectado en el primer pico cuando se usó suero y plasma. Slp y la actividad hemolítica de C4 fueron detectados en el brazo ascendente del segundo pico. Después del fraccionamiento el suero contuvo sólo un 7 a 8% de la actividad hemolítica del plasma fraccionado. En plasma, la mayor parte del antígeno Ss fue detectado en el segundo pico proteico, en cambio en suero antígeno Ss fue detectado en el primer pico, junto con C4-bp.

Resultados similares fueron obtenidos con suero y plasma de machos C3H.W7 y MP.

C4-bp. Por otra parte, S1p eluye en el segundo pico, independientemente del uso de suero o plasma.

Las fracciones con actividad hemolítica de C4 fueron combinadas y usadas como fuente de Ss y S1p en la mayoría de los experimentos descritos en esta sección.

1.2 La proteína Ss está relacionada con la actividad hemolítica del cuarto componente del complemento.

Para determinar si Ss y S1p tienen actividad hemolítica de C4, la combinación de fracciones cromatográficas positivas para Ss y S1p fueron tratadas con IgG anti-S1p y con IgG anti-C4 humano (purificadas de antisueros de ratón y cabra respectivamente). La IgG anti-C4 humano reconoce, en reacción cruzada, a Ss. En este experimento inicial se prefirió usar esta inmunoglobulina en lugar del anti-Ss convencional disponible en esa época que, por las absorciones necesarias, contenía complejos inmunes y anticuerpos residuales contra otras sustancias. Sin embargo, este antisuero fue satisfactorio para cuantificar, en RIE, la remoción de Ss por el antisuero anti-C4 humano. En este experimento se incluyeron dos controles: tratamiento con IgG de conejo anti-C3 humano que reacciona en forma cruzada

con C3 ratón y tratamiento con IgG de ratón. Después de eliminar los complejos inmunes (tratando con S. aureus), se procedió a medir en los sobrenadantes los niveles de Ss y Slp y la actividad hemolítica residual de C4. La Figura 10a muestra que la remoción de Ss se correlaciona casi perfectamente ($r=0,99$, $P<0,001$) con la disminución de la actividad hemolítica de C4. Por otra parte, esta actividad no es afectada si se elimina un componente no relacionado como C3 (Figura 10b). En estos dos casos la fuente de Ss fue plasma de machos. Estas observaciones son válidas también cuando la fuente de Ss es plasma de hembras (Figuras 10c y 10d).

- 1.3 La proteína Slp no está relacionada con la actividad hemolítica de C4. El tratamiento de fracciones de plasma con IgG anti-Slp no afecta la actividad hemolítica de C4, como se demuestra en la Figura 11. Estos resultados, conjuntamente con los de las secciones 1.1 y 1.2, permitieron predecir la existencia de una correlación entre los niveles variables de Ss, en plasma de ratones de diferentes cepas, y la actividad hemolítica de C4. En la Figura 12 se observa que esta correlación es bastante aceptable ($r=0,94$, $P 0.001$) cuando se incluye solo cepas de ratones Slp

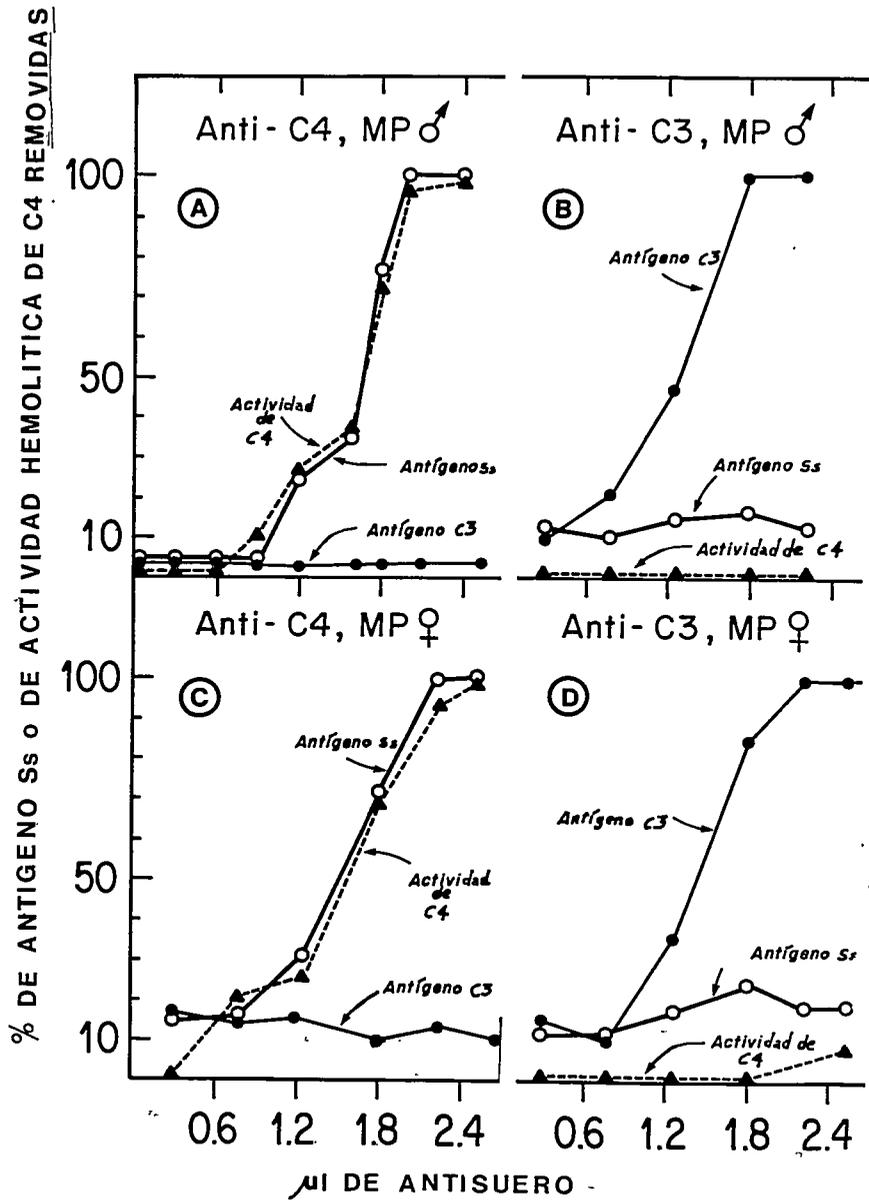


Figura 10

Figura 10: Correlación entre el antígeno Ss y la actividad hemolítica de C4. Las fracciones del brazo ascendente del segundo pico protéico de cromatografía de plasma en Sephadex G-200 (Figura 9A) fueron combinadas y 100 ul de estas muestras fueron incubadas con IgG anti-C4 humano, que reacciona cruzadamente con Ss (A y C), o con IgG anti-C3 humano, que reacciona cruzadamente con C3 de ratón (B y D). Después de extraer los complejos inmunes con S. aureus los niveles de los antígenos Ss y C3 fueron medidos mediante RIE y se procedió a estimar la actividad hemolítica residual de C4. El coeficiente de correlación entre los niveles de antígeno Ss y la actividad hemolítica de C4 es 0.99 para machos (A) y 0.98 para hembras (C), para 7 y 5 grados de libertad respectivamente ($P < 0,001$ en ambos casos). La remoción de un antígeno no relacionado (B y D) no afectó los niveles de Ss ni la actividad hemolítica de C4. Resultados similares a los presentados en estas figuras (A-D) fueron obtenidos cuando los experimentos se realizaron con animales DBA/2J y C3H.W7.

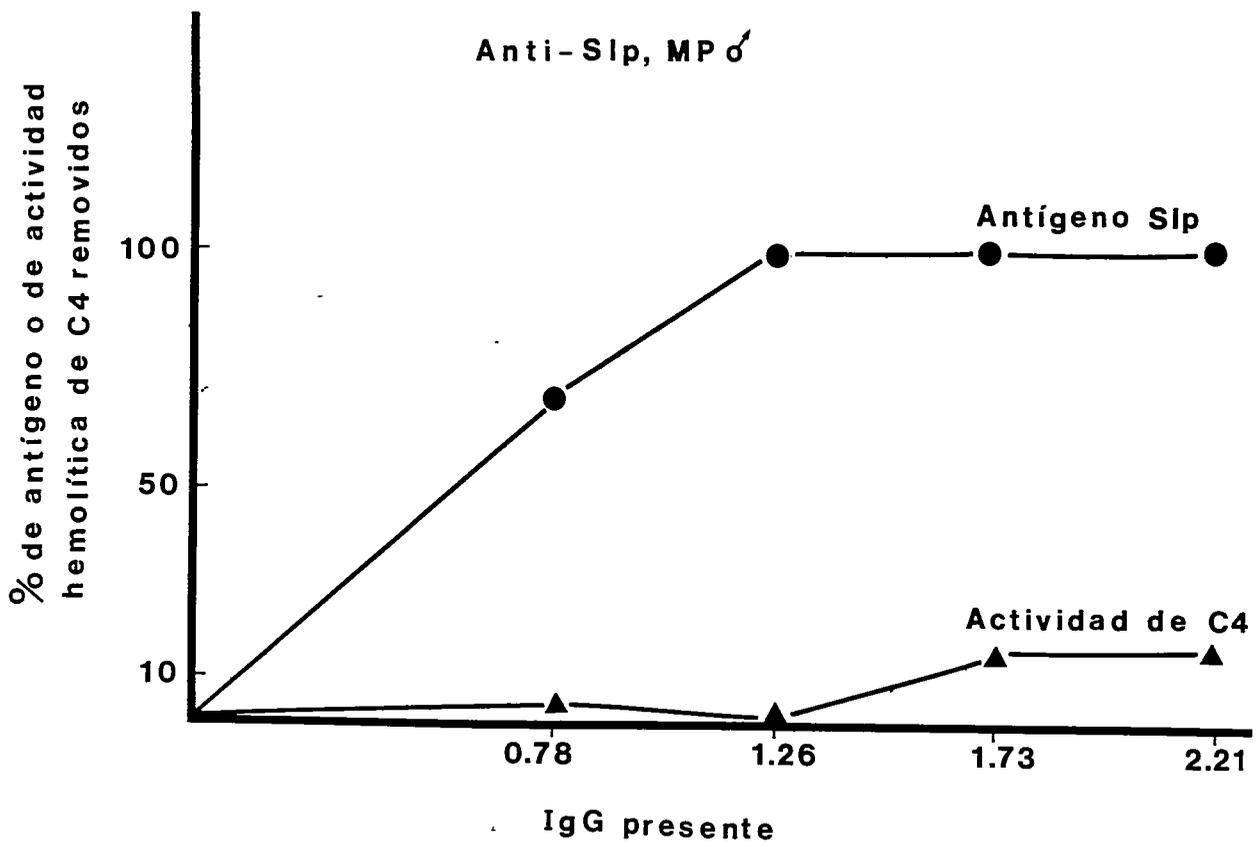


Figura 11

Figura 11: Falta de correlación entre la concentración de antígenos S1p y la actividad hemolítica de C4. La fuente de Ss/S1p se describe en la Figura 10. Muestras de 100 μ l fueron incubadas con IgG anti S1p. Después de extraer los complejos inmunes con S. aureus, los niveles de Ss y S1p fueron determinados mediante RIE y luego se determinó la actividad hemolítica residual de C4. El 100% del antígeno S1p pudo ser removido sin un efecto significativo sobre la actividad hemolítica de C4.

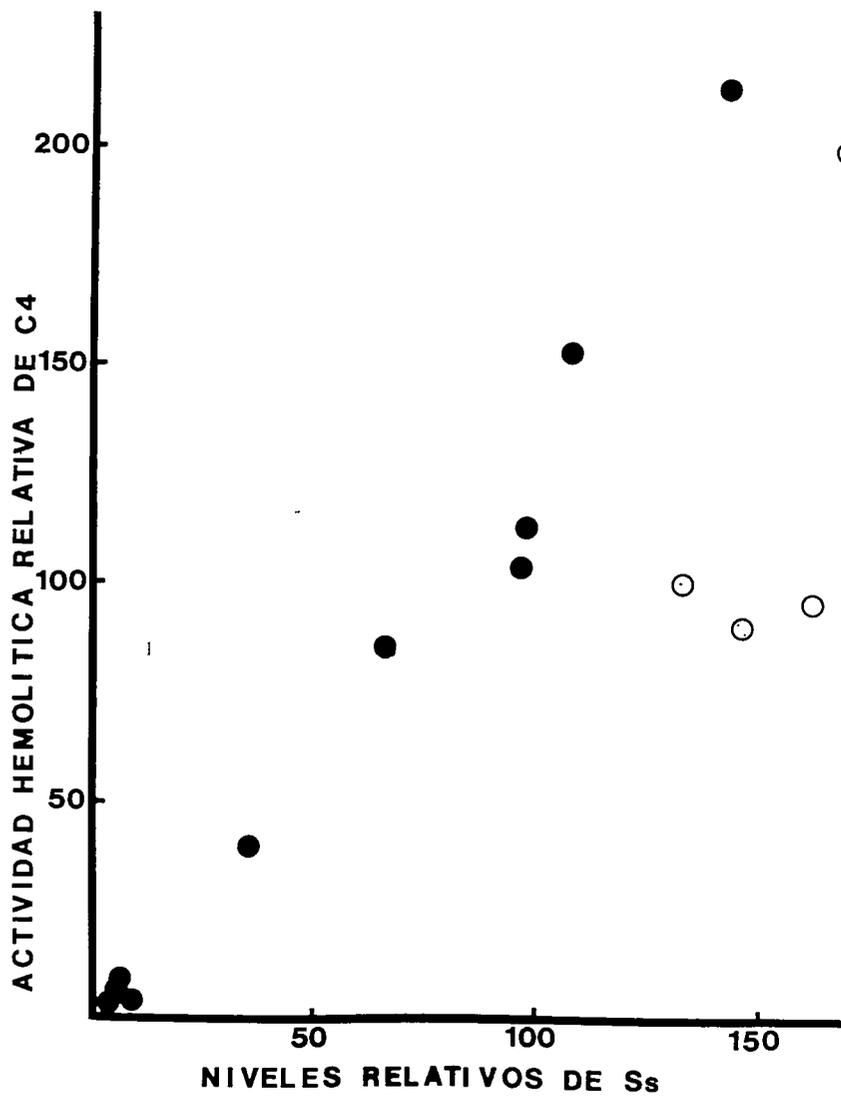


Figura 12

Figura 12: Correlación entre los niveles de Ss y la actividad hemolítica de C4 en plasma de diferentes cepas de ratones. Las mediciones se hicieron en una combinación de plasma de 3 ratones por cepa. Los círculos cerrados representan los resultados obtenidos con animales $S1p^0$. Los cuatro círculos cerrados cerca del origen corresponden a dos cepas con bajos niveles de Ss (C3H.0L y AKR/J, ambas portadoras del alelo k en la región S). Los otros cinco círculos cerrados representan, en orden creciente de actividad hemolítica, a hembras y machos C57 B1/10Sn(S^b), hembras C3H.0H(S^d), hembras y machos A.CA(S^f). El coeficiente de correlación entre los niveles de Ss y la actividad hemolítica de C4 en las muestras $S1p^0$ fue de 0,94 ($P < 0,001$ para 7 grados de libertad). Cuando se incluyó cuatro muestras $S1p^a$ - $S1p$ -a (genotipo positivo-fenotipo negativo), el coeficiente de correlación descendió a 0,74 ($0,01 > P > 0.001$, para siete grados de libertad).

Niveles similares de actividad hemolítica de C4 fueron obtenidos en muestras de suero de los mismos animales sólo si se agregaba EACA-DFP y NaH_3EDTA inmediatamente después de coagular.

negativas. Si se incluyen cepas S1p positivas, la correlación se deteriora y el nivel de significancia disminuye ($r=0,74$, $0,01 > P > 0,001$). Esto es esperable si se acepta que S1p no tiene actividad hemolítica de C4, a pesar de ser reconocido por el antisuero anti-Ss usado en este experimento.

- 1.4 Ss y S1p dos proteínas estructuralmente relacionadas pero con diferente sensibilidad a C1s. C1s es una esterasa con actividad específica sobre el cuarto (Figura 3) y segundo componente del complemento. Si Ss es en realidad el cuarto componente del complemento su cadena α debe ser sensible a la acción de esta enzima. Muestras parcialmente purificadas de Ss y S1p con un título hemolítico de C4 de 3000 U/ml, fueron tratadas con C1s humano purificado o con el tampón correspondiente. Después de este tratamiento la actividad hemolítica de C4 fue totalmente abolida. Para determinar el efecto de C1s sobre la estructura de Ss y S1p se procedió a radiomarcarse estas muestras y a inmunoprecipitarlas con anti-C4 humano (que reacciona en forma cruzada fuerte con Ss y débil con S1p) y un anti-S1p. Los complejos inmunes fueron separados con S. aureus, lavados varias veces, y las moléculas de Ss y/o S1p que permanecieron unidas a

las bacterias, fueron eluidas y analizadas en SDS-PAGE en bloque y radioautografía. En condiciones de no reducción (Figura 13) las moléculas nativas de Ss y SIp tienen un peso molecular aproximado de 205.000 daltons (sendas 1 y 3). Este peso es similar al C4 humano. Las sendas 2 y 4 muestran el efecto del tratamiento con $\overline{\text{C1s}}$ de las moléculas Ss y SIp respectivamente. Es evidente, que $\overline{\text{C1s}}$ actuó sobre Ss el que perdió un fragmento de 7.000 a 8.000 daltons. No se observa un efecto de la enzima sobre SIp. Las sendas 5 y 6 son controles negativos de precipitación no específica con sueros normales de ratón y conejo respectivamente.

El objetivo del siguiente experimento fue investigar si existe una relación entre la estructura de Ss y SIp y el cuarto componente del complemento humano, el que ha sido muy bien caracterizado (Figura 3). Esta molécula tiene un peso de 200.000 daltons y está formada por 3 cadenas polipeptídicas unidas covalentemente por puentes disulfuro. Estas cadenas han sido llamadas α , β , γ , con pesos de 93.000, 78.000 y 30.000 daltons respectivamente (121).

Cuando Ss y SIp fueron analizados en condiciones reductoras (Figura 14), SIp nativo mostró 3

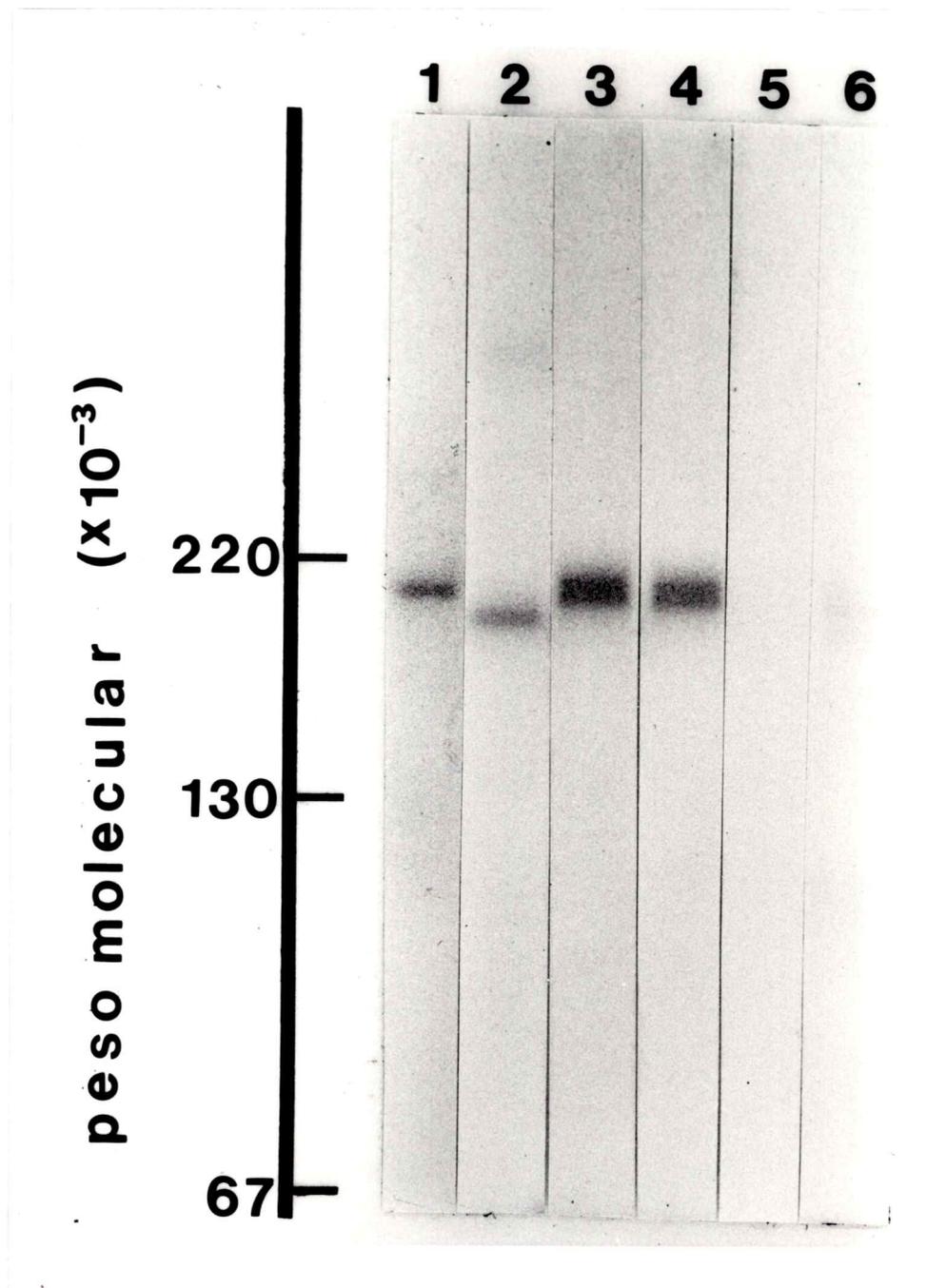


Figura 13

Figura 13: El efecto de $\overline{\text{Cl}}$ s sobre las moléculas Ss y S1p detectado en SDS-PAGE. Las fracciones del brazo ascendente del segundo pico proteico de cromatografía en Sephadex G-200 (Figura 9A) fueron combinadas. Una muestra fue marcada con ^{125}I y 100 μl de ella fueron incubados con 14 μg (10 μl) de Cls humano purificado. El experimento control consistió en incubar el material radiomarcado con un volúmen igual de tampón. Después de la incubación cada muestra fue dividida en cuatro alícuotas y tratadas con uno de los siguientes reactivos: IgG obtenida de un suero de cabra anti-C4 humano (que reacciona cruzadamente con Ss), anti-S1p, suero normal de conejo, o suero normal de ratón. Los complejos inmunes fueron removidos con S. aureus, eluidos con SDS-SB y sometidos a SDS-PAGE al 5%, bajo condiciones no reductoras.

Las sendas 1-6 muestran respectivamente: Ss nativo, Ss tratado con $\overline{\text{Cl}}$ s, S1p, S1p tratado con $\overline{\text{Cl}}$ s y controles de inmunoprecipitación con sueros normales de ratón y conejo. Es evidente que Cls digiere a Ss pero no a S1p.

cadena polipeptídica que siguiendo el modelo de C4, humano fueron designados como α , β y γ con pesos de 105.000, 74.500 y 32.000 daltons respectivamente (senda 3). La suma de los pesos de estas tres cadenas es de 211.500, lo que concuerda con el peso calculado para S1p en condiciones de no reducción (Figura 13, senda 3 y 4). El Ss nativo se muestra en la senda número 2 de la Figura 14. Al igual que S1p, Ss tiene 3 cadenas polipeptídicas que fueron designadas α , β y γ , pero sus pesos moleculares (98,000, 77,000 y 34,000 respectivamente) son ligera pero definitivamente diferentes de aquellas de las cadenas de S1p. El peso de las cadenas de Ss suma 209.000 lo que está de acuerdo con el peso calculado para la molécula no reducida.

La inmunoprecipitación de Ss se hizo con anti-C4 humano. Este suero no parece haber reconocido a S1p. En realidad este antisuero reacciona en forma cruzada con S1p y los complejos inmunes se unen al S. aureus. Sin embargo, después de los múltiples lavados realizados en estos experimentos, las moléculas de S1p se disocian de los anticuerpos mientras que las moléculas de Ss permanecen firmemente unidas.

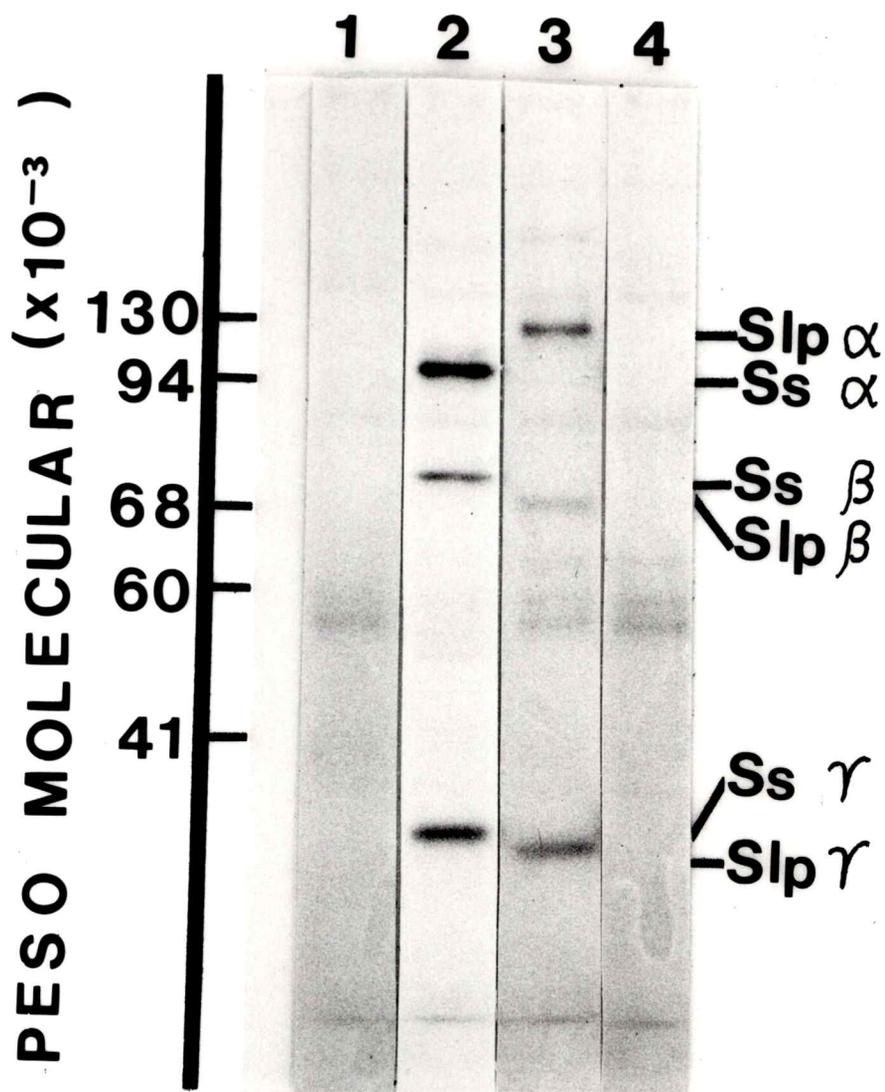


Figura 14

Figura 14: Estructura de las moléculas Ss y Slp determinadas en SDS-PAGE. Las condiciones experimentales fueron descritas en la Figura 13, excepto que se omitió el tratamiento con $\overline{\text{C1s}}$ y que el gel usado fue al 7% en condiciones reductoras. Las sendas 1 y 4 muestran los resultados de los controles con sueros normales de conejo y ratón respectivamente. Las sendas 2 y 3 muestran los resultados de la inmunoprecipitación con IgG anti-C4 humano y anti-Slp respectivamente. Ss y Slp difieren ligeramente en el peso de sus cadenas α , β y γ . En la senda 2 no se observan las cadenas Slp, lo cual indica que anti-C4 humano no inmunoprecipita a ésta molécula.

En los experimentos siguientes se investigó el efecto de $\overline{C1s}$ en las cadenas individuales de Ss y Slp. La predicción fue que si Ss es C4 su cadena α debería perder un fragmento de peso 5.000 por acción de $\overline{C1s}$. Por otra parte, la falta de actividad hemolítica de C4, por parte de Slp, podría deberse, por lo menos en parte, a la insensibilidad de su cadena α a la acción de $\overline{C1s}$. Estas predicciones resultaron verdaderas y se ilustran en la Figura 15. Como puede verse en las sendas 1 y 2, $\overline{C1s}$ no indujo cambios en las cadenas α , β o γ de Slp. En cambio, al comparar las sendas 3 y 4 se puede apreciar que la cadena α de Ss perdió un fragmento de peso aproximado a 7.000 daltons, transformándose en α' , de peso 90.000 daltons. No se observa un efecto de $\overline{C1s}$ sobre las cadenas β y γ de Ss. En las sendas 5 y 6 se muestran los resultados de un experimento que demuestra la acción selectiva de $\overline{C1s}$ sobre la cadena α de Ss. En este caso la inmunoprecipitación se hizo con anti Ss que reconoce a Ss y Slp. Si las cadenas de estas moléculas tienen diferente peso molecular, en este experimento debería demostrarse la existencia de 6 cadenas específicas en una senda (3 para Ss y 3 para Slp). Además este experimento reúne la condición ideal de mostrar en una misma senda el control

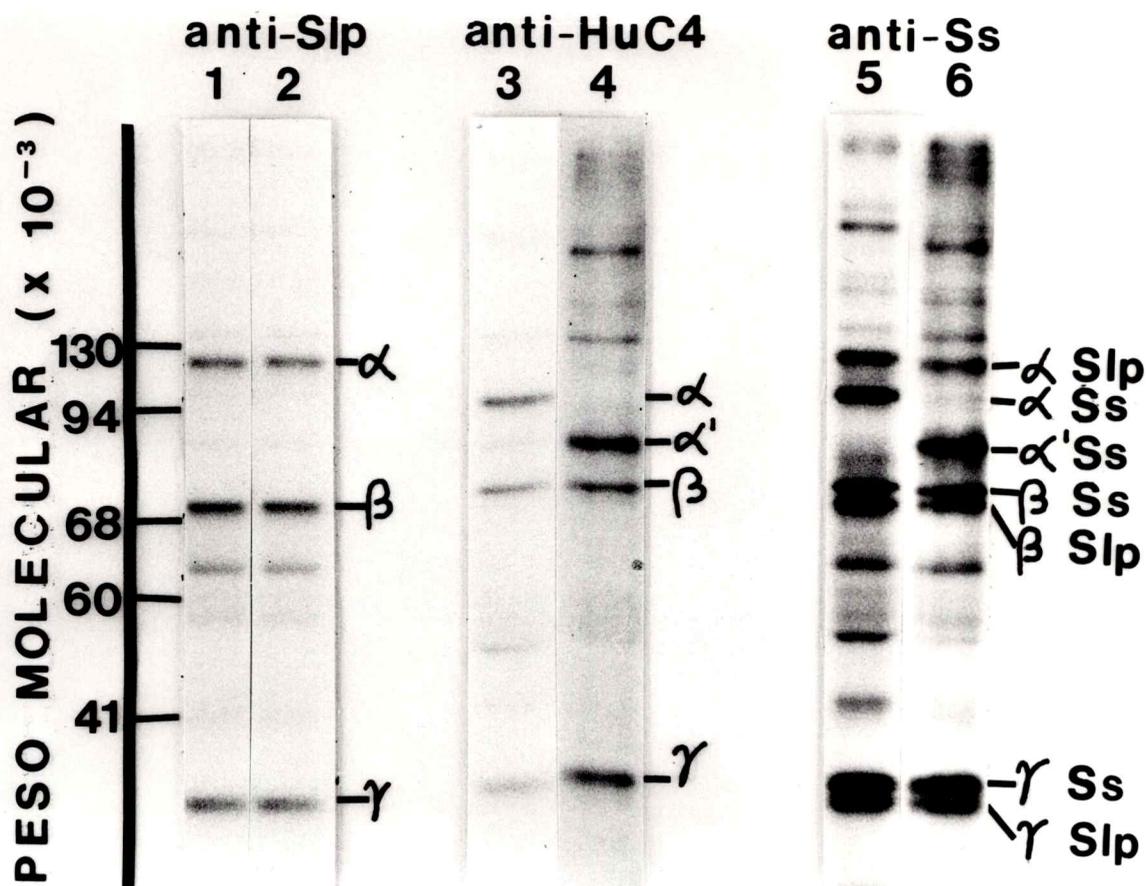


Figura 15

Figura 15: Evaluación del efecto de $\overline{C1s}$ sobre las cadenas polipeptídicas de Ss y SIp. Las condiciones experimentales fueron descritas en la leyenda de las Figuras 13 y 14. Las sendas 1 a 6 representan respectivamente: SIp nativo, SIp tratado con $\overline{C1s}$, Ss nativo, Ss tratado con $\overline{C1s}$, una mezcla de Ss y SIp nativos, una mezcla de Ss y SIp tratados con $\overline{C1s}$. Es evidente que sólo la cadena α de Ss es digerida por $\overline{C1s}$ (senda 4 y 6). La senda 6 representa el experimento con el control negativo interno ideal para demostrar la especificidad de $\overline{C1s}$ para la cadena α de Ss. Los mismos resultados fueron obtenidos con otras dos cepas Ss alto-SIp^a (C3H.W7 y C3H.OH). Cuando anti-Ss fue usado para inmunoprecipitar cepas SIp⁰ tales como C57.B1/10(H-2b) y A.CA(H-2f) sólo tres bandas específicas fueron detectadas y sus pesos moleculares coincidieron con las sendas inmunoprecipitadas por anti-C4 humano.

negativo interno representado por la cadena α de Slp, que no es digerida por $\overline{C1s}$ (Senda 6). En la senda 5 se observan claramente las 6 cadenas esperadas (el resto de bandas más débiles son inespecíficas pues también se detectaron cuando la inmunoprecipitación se hizo con sueros preinmunes).

Al determinar que las cadenas de Ss y Slp pueden diferenciarse en base a peso molecular (si se inmunoprecipita con el heteroantisuero anti-Ss), surgió la pregunta si los animales genotípicamente negativos para Slp tienen en sus sueros moléculas Slp-símiles, equivalentes a un producto alélico no reconocido por el aloantisuero anti-Slp. Si estas moléculas existen, la probabilidad de ser reconocidas por el heteroantisuero anti-Ss debería ser alta. Suero de machos C57B1/10 y A.CA (ambos Ss-alto Slp⁰) fueron procesados como se describió anteriormente, e inmunoprecipitados con anti-Ss y anti-C4 humano. En ambos casos, solo tres bandas fueron identificadas en SDS-PAGE y sus pesos coincidieron exactamente con los de Ss. Por lo tanto, parecería que Slp no es producido en estos animales o, alternativamente, sus cadenas tienen pesos iguales o muy parecidos a los de Ss y no son muy diferenciables con la tecnología usada.

En esta sección se ha demostrado estructural y funcionalmente que la proteína Ss es el cuarto componente del complemento del ratón (en las secciones que siguen la abreviación C4 reemplazará a la abreviación Ss).

Se ha determinado además la estructura de la proteína sexo limitada y su incapacidad de actuar como cuarto componente del complemento.

2. El gen estructural del cuarto componente del complemento del ratón está ubicado en la región S del complejo principal de histocompatibilidad (168). En esta sección se demostrará que el gen estructural del cuarto componente del complemento del ratón está en el centro del complejo H-2 (región S). Para ésto, se procedió a la búsqueda de variantes electroforéticas de esta proteína en diferentes cepas de ratones. Con este objetivo se usó una modificación (162) de la técnica bidimensional de O'Farrel (161), en la cual las cadenas polipeptídicas se separan, en condiciones de denaturación completa, en base a tres criterios: especificidad antigénica, punto isoeléctrico y peso molecular. Esta técnica modificada es descrita en detalle en la sección Materiales y Métodos.

En el análisis de los resultados presentados aquí es importante considerar que la detección de un

polimorfismo estructural en cualquiera de las cadenas de C4 representa, probablemente, variaciones en el material genético que codifica la molécula completa. Esto se basa en que C4 se sintetiza como un precursor de una sola cadena (133-135), que es procesada post-sintéticamente en las tres subunidades (α , β y γ) de la molécula funcional.

- 2.1 La cadena γ de C4 murino es polimórfica. En el rango de pH usado en estos experimentos no se logró enfocar simultáneamente las tres cadenas de C4. Como el polimorfismo de la cadena γ fue rápidamente evidente, se procedió a estandarizar las condiciones del IEF de modo de obtener una resolución adecuada de estas cadenas.

En la Figura 16 (primera dimensión o IEF) se observan los tres fenotipos detectados para la cadena γ de C4. Estos tres fenotipos son representativos de los resultados obtenidos con todas las cepas estudiadas. Así, la cadena γ de C4 en cepas portadoras de los haplotipos H-2s, H-2p, H-2f y H-2ja, tiene un pI de 7,4 y fue designada γ 1; en cepas portadoras de los haplotipos H-2k, H-2q, H-2d, H-2r, H-2b, H-2u y H-2w7 las cadenas γ de C4 presentaron un pI de 6,9 (γ 2) y, en dos cepas, portadoras

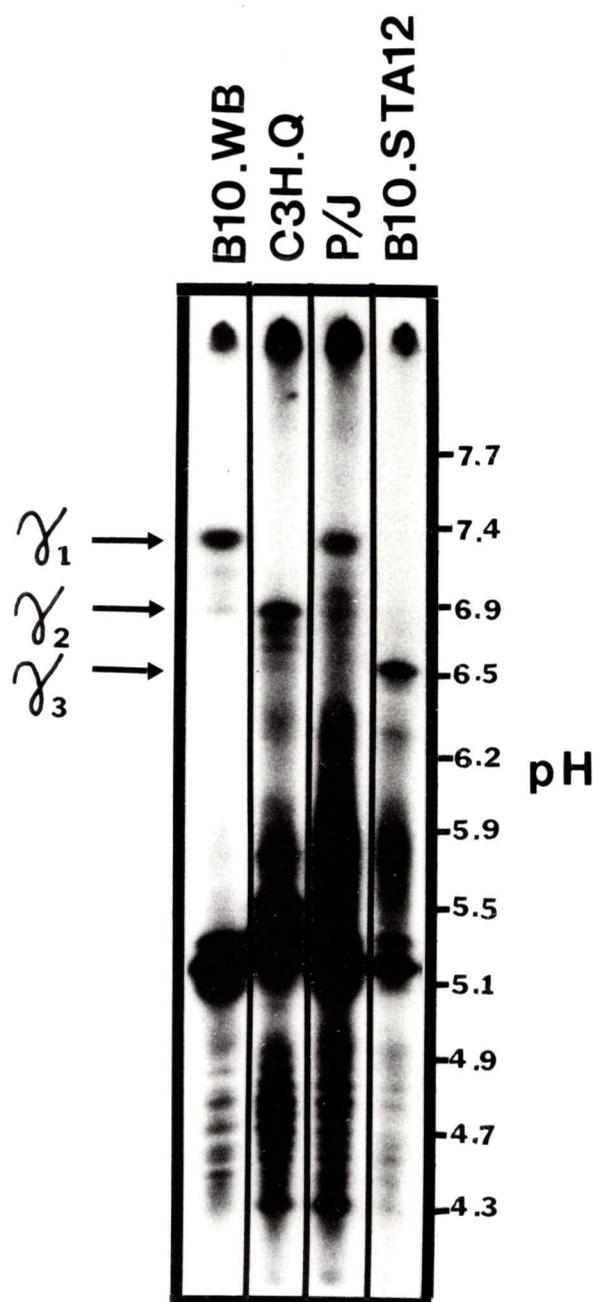


Figura 16

Figura 16: Radioautograma de IEF de C4 de ratón. Fracciones de plasma C4-positivas fueron marcadas con ^{125}I e inmunoprecipitadas de acuerdo con Kessler (159) con antisuero de conejo contra C4 de ratón. Los inmunoprecipitados desnaturalizados fueron enfocados en un EIF en bloque. Se pueden distinguir 3 variantes de cadena γ : γ_1 , presente en animales B10.WB(H-2^{Ja}) y P/J(H-2^P), esta cadena también está presente en animales portadores de los haplotipos H-2^S y H-2^f; γ_2 , presente en C3H.Q(H-2^Q) y también en cepas portadoras de los haplotipos H-2^k, H-2^d, H-2^r, H-2^b, H-2^u, H-2^{w7} y H-2^{wr7}. γ_3 , presente en la cepa B10.STA12 y también detectada en B10.LIB55. Estas dos últimas cepas son portadoras de complejos H-2 no designados, derivados de ratones silvestres.

de haplotipos silvestres, no designados, las cadenas presentaron un pI de 6,5 (γ 3). Estos resultados se resumen en la Tabla I.

La demostración de que las cadenas polimórficas observadas en la Figura 16 corresponden en realidad a las cadenas γ de C4 fue obtenida sometiendo el material analizado en IEF a una segunda separación en base a peso molecular. La figura 17 muestra resultados representativos de alrededor de 40 geles bidimensionales estudiados. En todos estos experimentos la cadena polipeptídica polimórfica tuvo pesos moleculares aparentes de 34.000, lo que está de acuerdo con lo descrito anteriormente para la cadena γ de C4. Más aún, inmunoprecipitados obtenidos con antisuero contra C4 humano, que reacciona cruzadamente con C4 de ratón, produjeron resultados similares a los obtenidos con anti-C4 de ratón.

La cantidad de cadena γ de C4 varió cuantitativamente de cepa a cepa, de acuerdo con datos serológicos publicados previamente (169). Así, cuando se analizaron muestras de animales portadores del haplotipo H-2k, en los cuales se ha descrito la existencia de solo un 5% del nivel normal de C4 (Ss) (169), se detectó también una cantidad equivalente

TABLA I

Tipo de cadena γ de C4(S₅) en ratones con diferentes alelos en la región S de H-2.

Cepa de ratón	Alelo en la región <u>S</u>	Tipo de cadena γ
P/J	p	1
B10.M	f	1
A.SW, B10.S, SJL, A.TFR4, A.TH, B10.RIII(20R)	s	1
B10.WB	ja	1
B10.CAS2	w17	1
B10.KPB128	w19	1
DBA/2J, C3H.OH, B10.A, A/J, B10.BSVS	d	2
AKR/J, C3H.OL, A.TL, B10.TFR5, B10.HTT	k	2
B10.RIII	r	2
PL/J	u	2
B10.Q	q	2
A.BY	b	2
C3H.W7, B10.W7R	w7	2
B10.LIB55, B10.STA12	silvestre, no designado	3

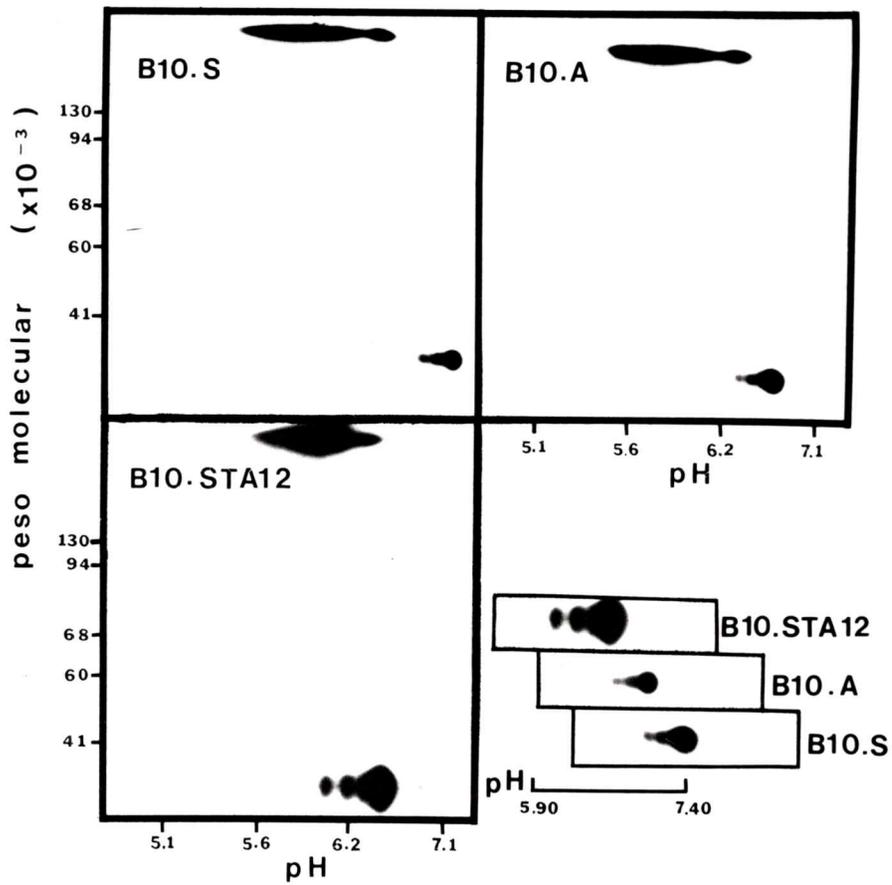


Figura 17

Figura 17: Separación bidimensional de las cadenas γ de C4. Después de enfocadas, las cadenas γ de C4 fueron sometidas a una separación en segunda dimensión, de acuerdo a tamaño, en bloque de SDS-PAGE. La cadena γ aparece en la esquina inferior izquierda de cada bloque con el peso molecular esperado de 34.000 daltons. La naturaleza de la mancha heterogénea localizada en la parte superior de cada bloque representa probablemente el precursor de la molécula de C4. Este precursor consta de una sola cadena de peso aproximado de 200.000 (134-135, 176). En el cuadro inferior derecho se muestra una composición de las tres variantes de la cadena γ , con el objeto de mostrar la magnitud de la variabilidad electroforética de ellas. Más del 90% de las cuentas estuvieron asociadas a la banda principal. Es probable que las bandas más débiles resulten de modificaciones post-traduccion que ocurren in vivo o in vitro (ver texto para discusión de este problema).

de cadena γ en la segunda dimensión. En ninguno de los grupos de controles negativos se detectó material radioactivo en la posición de las cadenas γ de C4. Estos controles incluyeron inmunoprecipitados obtenidos con aloantisueros contra S1p y C5 con antisuero de conejo o cabra contra C3 y factor B murinos. Además, se usaron sueros normales de ratón, conejo y cabra. En todos los experimentos positivos, más del 90% de las cadenas se enfocaron a los pI mencionados anteriormente, de acuerdo a lo determinado cortando las sendas en segmentos de 1 mm y midiendo la radioactividad asociada en un contador gama. El 10% restante de las moléculas se enfocaron en un rango de pH más amplio, formando bandas bien resueltas pero más débiles (Figura 17). Nótese que una de las bandas más débiles en $\gamma 1$ tiene un pI similar al de la banda principal de $\gamma 2$. Esto podría interpretarse como indicativo de la presencia de pequeñas cantidades de C4- $\gamma 2$ (menor de un 10%) en cepas portadoras C4- $\gamma 1$.

Sin embargo, esto es poco probable ya que la inmunoprecipitación con un aloantisuero contra C4 (anti H-2.7, ver sección 3) produjo precisamente el mismo patrón de $\gamma 1$, obtenido en cepas portadoras de C4- $\gamma 1$, mientras que no reaccionó en absoluto con

ninguna de las bandas de C4- δ 2. Es probable entonces que el patrón de bandeo obtenido resulte de modificaciones post-traducción in vivo o in vitro, tales como deamidación y/o carbamilación. La posibilidad de que estas variaciones se deban a glicosilación, con incorporación de ácido siálico, puede descartarse, ya que el tratamiento de las tres variantes de C4 con exceso de neuraminidasa no alteró el patrón electroforético.

- 2.2 El gen que controla el polimorfismo de C4 está localizado en la región S del complejo H-2. La Tabla II reúne los elementos de juicio que permiten ubicar el gen responsable del polimorfismo de C4 en la región S del complejo H-2. La participación exclusiva del complejo H-2 en la determinación de los fenotipos descritos se demuestra a través de la identidad del pI de las cadenas δ entre cepas con un mismo haplotipo H-2 y con diferente base ("background") genética. Por ejemplo, A.Sw, B10.S y S.JL son todas cepas con haplotipo H-2^S y en todas ellas C4 es de tipo δ 1. Por otra parte, cepas con haplotipos H-2 diferentes pero con la misma base producen C4 con cadenas δ de diferente pI, esto es ilustrado por ejemplo, por la presencia de cadenas δ 1 y δ 3 en las

TABLA II

El gen que controla el polimorfismo de la cadena γ de C4 está ubicado en la región S del complejo H-2.

Cepa	Origen de las regiones de <u>H-2</u>								Tipo de cadena γ de C4	Conclusión
	K	A	B	J	E	C	S	D		
A.SW;B10.S;SJL	s	s	s	s	s	s	s	s	1	La base genética (no H-2) no parece influenciar el tipo de cadena γ de C4.
B10/A;A/J	k	k	k	k	k	d	d	d	2	
B10.WB	j	j	j	j	j	j	j	b	1	
B10.Q	q	q	q	q	q	q	q	q	2	El control del polimorfismo de la cadena γ de C4 está ubicado dentro de H-2.
B10.LIB55	silvestre, no designadas								3	
A.SW	s	s	s	s	s	s	s	s	1	
A.BY	b	b	b	b	b	b	b	b	2	
B10.S	s	s	s	s	s	s	s	s	1	El gen responsable del polimorfismo está ubicado en las regiones S o D.
B10.BSVS	s	s	s	s	s	s	d	d	2	
B10.RIII	r	r	r	r	r	r	r	r	2	
B10.RIII(2OR)*	s	s	s	s	s	s	s	r	1	La región <u>D</u> no participa en el control del polimorfismo.
A.TH	s	s	s	s	s	s	s	d	1	
A.TL	s	k	k	k	k	k	k	d	2	

* La cepa B10.RIII(2OR) es un recombinante entre ratones $S1p^a$ portadores del haplotipo t2 (K_SA_SS_SJ_SF_SC_SS_SD_d) y ratones $S1p^0$ (K_RA_RB_RJ_RF_RC_RS_RD_R). Información presentada en (170) muestra la posición del intercambio genético entre I-C y S e indica que la región S de B10.RIII(2OR) se originó del haplotipo H-2^S. Sin embargo, los ratones B10.RIII(2OR) son $S1p-a$ y, por lo tanto, el suceso recombinatorio se realizó probablemente entre las regiones S y D como se indica en esta tabla.

cepas B10.S, B10.LIB55 respectivamente, o de cadenas γ_1 , γ_2 en las cepas A.Sw y A.BY. La comparación de las cepas B10.S con B10.BSVS ubica al gen responsable en la región S o D. La región D puede ser descartada al comparar dos combinaciones de cepas congénicas: B10.RIII con B10.RIII(20R) y A.TH con A.TL.

De acuerdo a este análisis el gen estructural del cuarto componente del complemento murino está ubicado en la región S del complejo H-2.

La expresión de las variantes de cadenas es codominante en individuos F1. Esta codominancia sugiere nuevamente que la diferenciación fenotípica entre γ_1 , γ_2 y γ_3 es una propiedad intrínseca de la molécula de C4 (secuencia aminoacídica y no una modificación postsintética).

3. El grupo sanguíneo murino H-2.7 es un determinante aloantigénico de C4d, que es un fragmento del cuarto componente del complemento de esta especie (171). El grupo sanguíneo murino H-2.7 descubierto por Hoecker y colaboradores (70, es expresado por los haplotipos H-2f, H-2s, H-2j y H-2p. David y colaboradores (71) y Klein y colaboradores (72) demostraron, que a diferencia de otras especificidades H-2, H-2.7 se

expresa predominantemente en los eritrocitos y ubicaron el gen que controla la expresión de esta especificidad en una nueva región que llamaron H-2G, entre S y D, basándose en la reactividad de la cepa recombinante A.TFR1. Estudios recientes (73) han demostrado que la ubicación propuesta por David y colaboradores y Klein y colaboradores (71, 72) es errónea y que éste gen está ubicado en realidad, en la región S. De acuerdo a lo descrito en la sección 2.2, esta región contiene el gen estructural del cuarto componente del complemento. De este hecho surgió la interesante posibilidad que H-2.7 esté de alguna manera relacionado con C4. La presencia de H-2.7 en los glóbulos rojos, suero y plasma de los animales positivos, conjuntamente con el hecho de ser controlado por el C.P.H del ratón, es reminiscente de los grupos sanguíneos humanos Chido y Rodgers cuya expresión es controlada por el CPH humano o HLA. Observaciones recientes han demostrado que estos grupos sanguíneos corresponden a determinantes antígenicos de un fragmento de C4 (C4d, Figura 3) y que éste fragmento puede incorporarse pasivamente a los eritrocitos durante la activación del complemento (74-75, 172). Por otra parte, el gen estructural del

cuarto componente del complemento humano está ubicado en el complejo HLA (12). Además, H-2.7, al igual que C4 se expresa en el suero y plasma. Esto ha sido probado mediante inhibición de la hemaglutinación de glóbulos rojos H-2.7 positivos si se preincuba el anti-H-2.7 con suero o plasma de animales H-2.7 positivos.

De los hechos citados en los párrafos anteriores se desprende la obvia necesidad de estudiar, en el ratón, la naturaleza de la molécula que expresa el antígeno H-2.7, con la hipótesis de trabajo de que este antígeno H-2.7 corresponde a un fragmento de C4 murino.

3.1 La expresión de H-2.7 está correlacionada con los alotipos de la cadena γ del cuarto componente del complemento murino. En las secciones 2.1 y 2.2 se ha descrito un polimorfismo de C4 murino basado en diferencias en pI de la cadena γ y el control genético de esta variación estructural fue ubicado en la región S del complejo H-2. La Tabla III muestra la notoria correlación existente entre las variantes de la cadena γ de C4 y la expresión del antígeno H-2.7. La distribución del antígeno H-2.7 en las

TABLA III

Relación entre las variantes de cadena γ de C4, controladas por la región S, y la expresión del aloantígeno H-2.7.

Alelo en la región <u>S</u>	Tipo de cadena γ de C4.*	H-2.7
p	1	Positivo
f	1	Positivo
s	1	Positivo
j	1	Positivo
Desconocido (MP)	1	Positivo
k	2	Positivo**
d	2	Negativo
r	2	Negativo
u	2	Negativo
q	2	Negativo
b	2	Negativo
w7	2	Negativo
silvestre, no designado (B10.LIB55 y B10.STA12)	3	Negativo

* Tipos 1, 2 y 3 con puntos isoeléctricos 7.4, 6.9 y 6.5 respectivamente.

** Negativo en los eritrocitos, negativo o debilmente positivo en el suero por inhibición de la hemaglutinación; positivo por absorción in vivo del aloantisuero anti H-2.7.

diferentes cepas fue obtenida de la literatura (70-73). Los ratones portadores de los alelos p, f, s, y j en la región S de H-2 producen C4 de tipo $\gamma 1$ y son H-2.7 positivos. Con una excepción, la presencia de otros alelos en la región S está asociada con C4- $\gamma 2$ o C4- $\gamma 3$ y negatividad para H-2.7. La excepción está dada por el alelo k en la región S. En este caso, los animales producen C4- $\gamma 2$ y sin embargo han sido clasificados como H-2.7 positivos porque absorben in vivo la actividad de aloantisueros anti-H-2.7 (71-72). Esta única discrepancia para la correlación establecida será analizada experimentalmente más adelante.

- 3.2 El aloantisuero contra H-2.7 inmunoprecipita ("reconoce") moléculas de C4 en el plasma murino. Plasmas-EDTA de ratones H-2.7 positivos (S^JL-H-2^S) y negativos (DBA/2J-H-2^d) fueron fraccionados en una columna de Sephadex G-200 y la presencia del antígeno H-2.7 fue determinada en estas fracciones, mediante inhibición de la hemaglutinación. Una fuerte actividad inhibitoria fue detectada solo en la porción ascendente del segundo pico protéico del plasma de ratones S^JL. Esta área contiene además la mayor parte de C4. Los tubos positivos fueron combinados, marcados e inmunoprecipitados con antisuero de conejo

contra C4 y con aloantisuero contra H-2.7. Una porción de este material fue incubado con $\overline{\text{CTs}}$ antes de la inmunoprecipitación. Los complejos inmunes, eluidos de S. aureus, fueron sometidos a SDS-PAGE o a IEF, bajo condiciones de denaturación completa, seguido de radioautografía. La figura 18 demuestra que el aloantisuero contra H-2.7 inmunoprecipita del suero de ratones SLJ tres cadenas polipeptídicas con pesos moleculares idénticos al de las cadenas de C4 (Figura 18, senda 3), determinados en la sección 1.4. Además, la cadena α de la molécula H-2.7 positiva es digerida por $\overline{\text{CTs}}$, con generación de un fragmento con peso molecular idéntico al de la cadena α' de C4 humano (Figura 18, senda 2; Figura 3). Por otra parte, en condiciones de no reducción, anti-H-2.7 inmunoprecipita una sola molécula con un peso aparente de 205.000 daltons (datos no mostrados), que es el mismo peso determinado para la molécula completa de C4 murino (Figura 13).

De los resultados resumidos en la Tabla I, puede predecirse que anti-H-2.7 inmunoprecipitará C4 de tipo γ 1. La figura 19 demuestra que la predicción es correcta. La senda 1 muestra el resultado de la precipitación de C4- δ 1 con anti-C4.

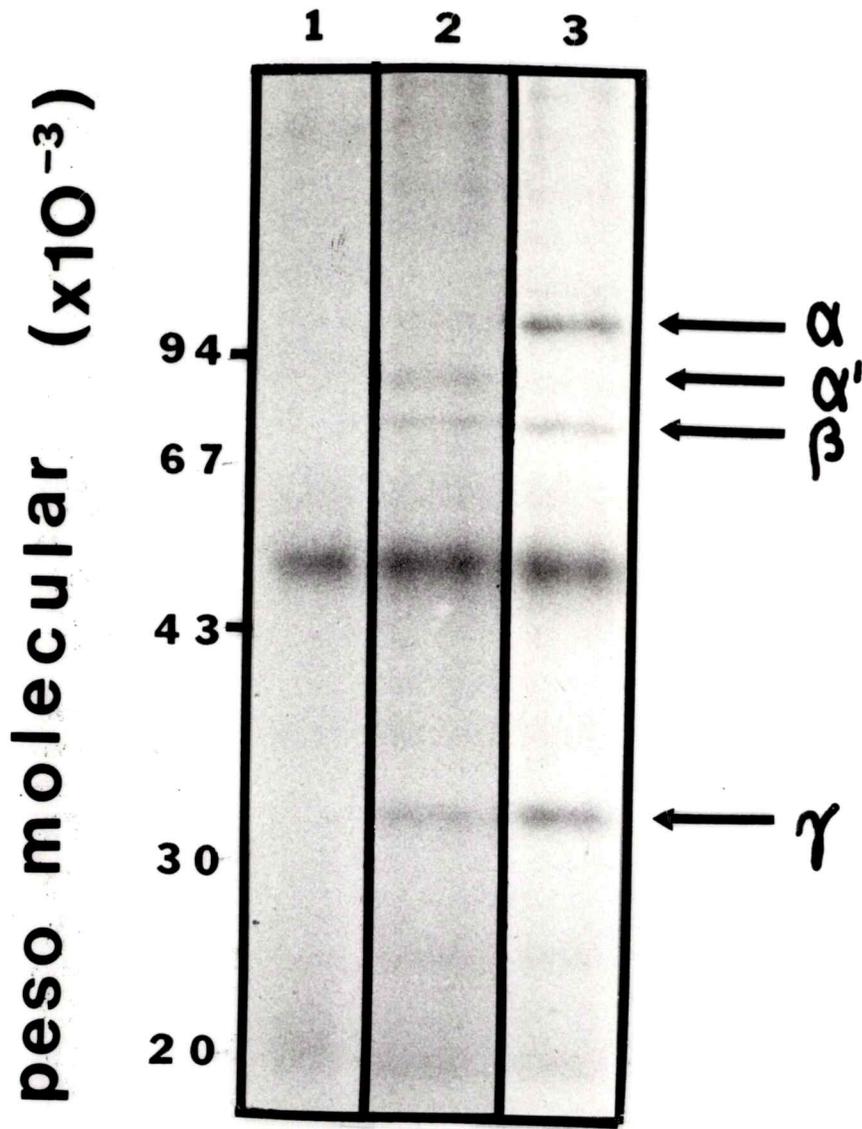


Figura 18

Figura 18: Radioautograma de una gradiente lineal de 7-15% en SDS-PAGE de fracciones de plasma H-2.7 positivas de ratones SJL. La inmunoprecipitación se hizo con un aloantisuero anti H-2.7. Este experimento es representativo de los resultados obtenidos con plasma-EDTA de cepas portadoras de alelos s, p, j y f en la región S del complejo H-2. Las sendas 1-3 representan respectivamente: inmunoprecipitación con suero normal de raton, inmunoprecipitación con anti-H-2.7 después de tratar con $\overline{\text{C1s}}$, inmunoprecipitación sin tratar con $\overline{\text{C1s}}$. Es evidente que la cadena de la molécula reconocida por anti H-2.7 es sensible a la acción de $\overline{\text{C1s}}$. La comparación de las sendas 1 y 3 demuestra que el aloantisuero anti H-2.7 inmunoprecipita C4 del plasma de los ratones SJL (cadenas α , β y γ con pesos de 98,77 y 34 kilodaltons respectivamente. La senda número 2 demuestra que el aloantisuero también reconoce a C4b).

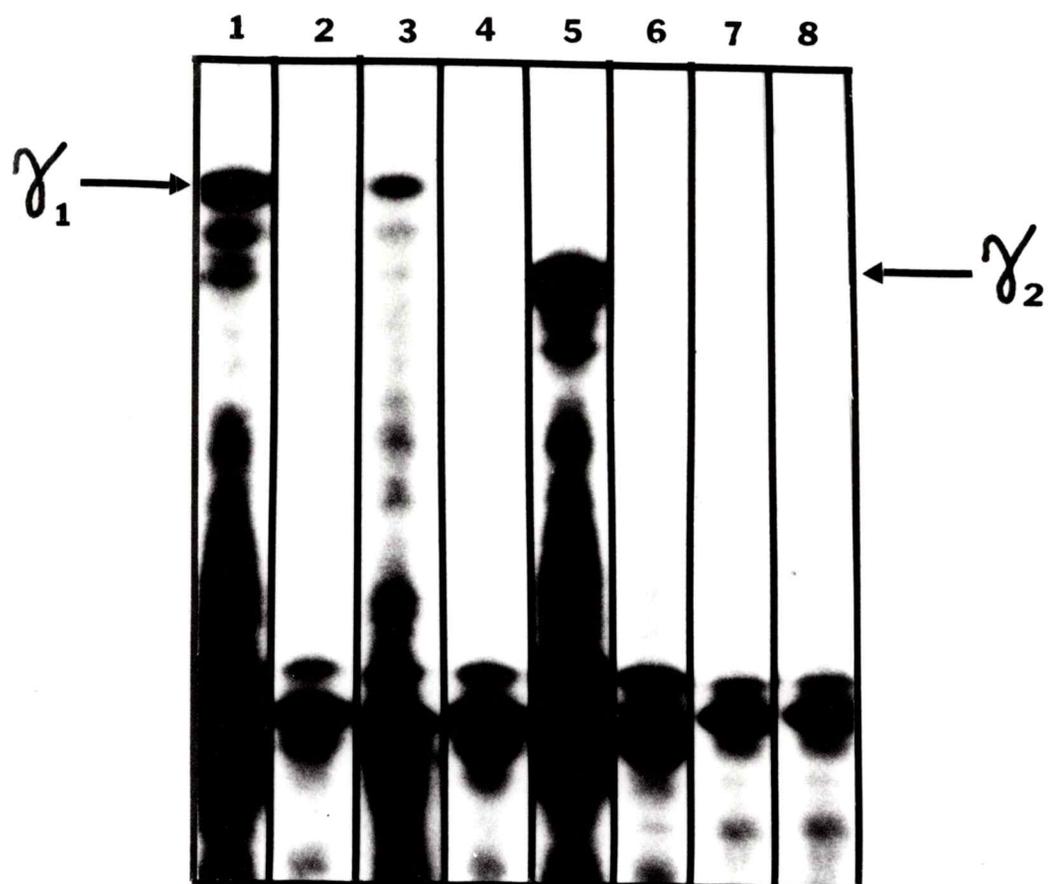


Figura 19

Figura 19: Radioautografía de IEF de C4 murino: Fracciones de plasma C4-positivos fueron inmunoprecipitadas, desnaturadas y enfocadas. Las sendas 1 a 4 muestran los resultados obtenidos con la cepa SJL (representante de las cepas H-2.7 positivas, C4- γ 1) y las sendas 5 a 8 muestran los resultados obtenidos con la cepa DBA/2J (representante de las cepas C4- γ 2, H-2.7 negativas). La inmunoprecipitación fue hecha con suero de conejo anti-C4 de ratón (senda 1 y 5), suero normal de conejo (sendas 2 y 6), suero de ratón anti H-2.7 (sendas 3 y 7) y suero normal de ratón (sendas 4 y 8). El hetero antisuero (anti-Ss inmunoprecipita C4- γ 1 y C4- γ 2 (sendas 1 y 5). El anti H-2.7 inmunoprecipita C4 de tipo γ 1 (senda 3) pero no C4 de tipo γ 2 (senda 6). Las bandas específicas adicionales en las sendas 1, 3 y 5 son fragmentos de cadena α (168).

La senda número 3, el mismo material inmunoprecipitado con anti-H-2.7. En la senda número 5, C4 de tipo γ 2 inmunoprecipitado con el heteroantisuero contra C4 y en la senda 7, el mismo material inmunoprecipitado con el aloantisuero contra H-2.7. Las sendas 2, 4, 6 y 8 corresponden a controles negativos inmunoprecipitados con los correspondientes sueros preinmunes. Es obvio de estos resultados que el heteroantisuero de conejo reconoce C4 de tipo γ 1 y γ 2. En cambio, el aloantisuero anti H-2.7 reconoce solo C4 tipo γ 1. Nótese que estos resultados no implican que anti H-2.7 reacciona con sitios antigénicos ubicados en la cadena γ de C4. El aloantisuero podría reconocer otras áreas de la molécula y la cadena γ ser sólo un indicador de la especificidad de la aloreacción. Este problema se resuelve en la próxima sección.

3.3 La especificidad de H-2.7 está ubicada en el fragmento C4d (α 2) de la cadena α de C4. Los experimentos descritos en las secciones 3.1 y 3.2 demuestran que, con una excepción, la especificidad H-2.7 se encuentra en C4 o C4b (anti H-2.7 reacciona con C4 después de tratarlo con $\overline{C1s}$), siempre que sean de tipo γ 1. Para determinar la localización del o

los sitios antigénicos H-2.7, se procedió a analizar los fragmentos C4c y C4d producidos por la acción de C3b-INA y C4-bp sobre C4b (Figura 3). Fragmentos C4c purificados fueron obtenidos de suero de ratones MP (H-2.7 positivos) mediante el procedimiento descrito en la sección 4.1 de Materiales y Métodos. C4c está formado por 2 fragmentos de cadena α (α_3 y α_4), una cadena β y una γ (Figura 3). Las cadenas β y γ no son afectadas por el C3b-INA y C4-bp. Sin embargo, el fragmento C4c es H-2.7 negativo de acuerdo a dos criterios: (a) es inactivo en ensayos de inhibición de hamaglutinación en concentraciones similares a la de C4 en suero normal y, (b) estos fragmentos no son inmunoprecipitables por anti H-2.7.

Estos resultados sugirieron que el determinante H-2.7 no está ubicado en C4c, sino en otro lugar de la molécula, probablemente en el fragmento C4d (α_2) (Figura 3). Para resolver este problema se procedió a fraccionar cromatográficamente (Sephadex G-200) suero de animales H-2.7 positivos (S JL, H-2^s) y negativos (DBA/2J, H-2^d) y la presencia de H-2.7 en las fracciones fue detectada mediante inhibición de la hemoaglutinación. (C4 en suero es rápidamente

activado y fragmentado a C4c más C4d, a menos que se tomen las precauciones especiales detalladas en la referencia 151). Una fuerte actividad inhibitoria fue detectada solo en el tercer pico de densidad óptica. Las fracciones positivas fueron combinadas, radiomarcadas e inmunoprecipitadas con anti H-2.7 o con anti-C4.

Los resultados de las radioautografías de los bloques de SDS-PAGE son mostradas en la Figura 20. Una sola banda específica de peso molecular aparente de 45.000 fue revelada por inmunoprecipitación con antisuero contra H-2.7 y C4 (sendas número 2 y 3 respectivamente) La demostración de que el mismo polipéptido es en realidad reconocido por anti-H-2.7 y anti C4 fue hecha mediante inmunoprecipitación secuencial. Primero, el material radiomarcado fue incubado con antisuero contra C4 y C4c, en exceso de anticuerpo, o con suero normal de conejo, y los complejos inmunes fueron removidos con S. aureus y centrifugación. Luego, los sobrenadantes fueron incubados con aloanticuerpos contra H-2.7, tratados con S. aureus y centrifugados. Los complejos inmunes eluidos de las bacterias fueron analizados en SDS-PAGE y radioautografía. Debe señalarse que se puede

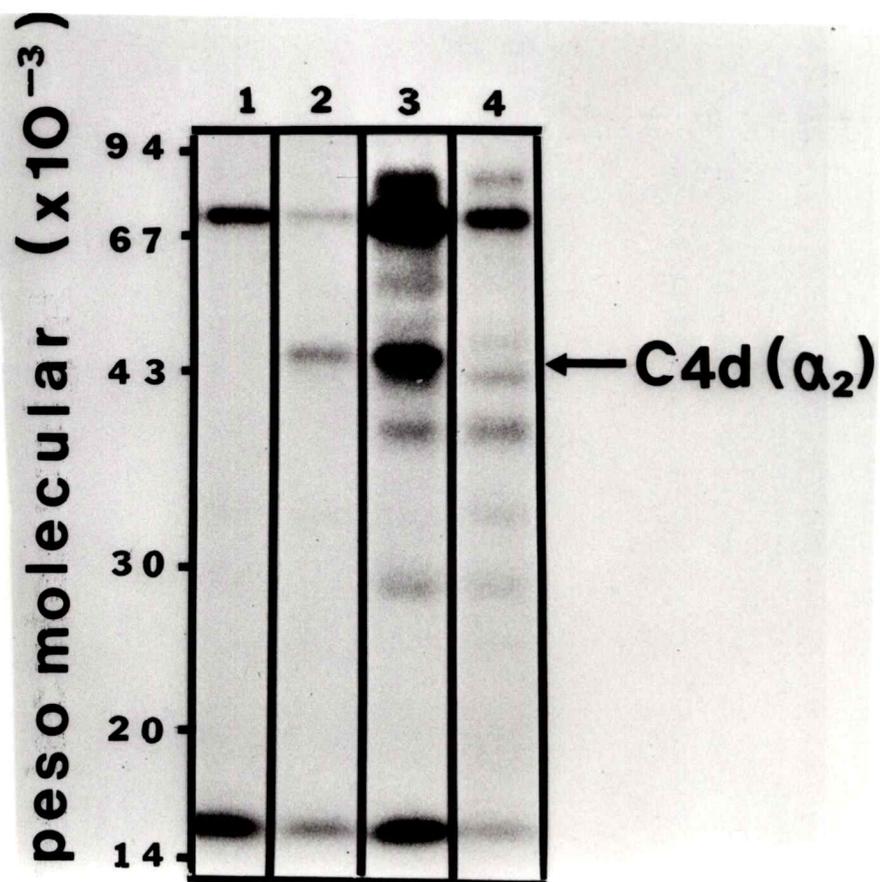


Figura 20

Figura 20: Radioautografía de una gradiente lineal del 7-15% en SDS-PAGE del fragmento C4d(α 2) de C4. Suero de ratones SLJ (H-2.7 positivos) fue fraccionado en una columna de Sephadex G-200 en la presencia de Ca^{++} y Mg^{++} . El tercer pico proteico fue radiomarcado e inmunoprecipitado con suero normal de ratón (senda 1), suero de ratón anti-H-2.7 (senda 2), suero de conejo anti C4 (senda 3) y suero normal de conejo (senda 4). Un fragmento de 45.000 daltons fue inmunoprecipitado específicamente por anti-C4 y anti H-2.7 (C4d o α 2).

predecir que el fragmento C4d de cepas H-2.7 negativas es inmunoprecipitado por anti C4 pero no por anti H-2.7. La Tabla IV resume los resultados de la inmunoprecipitación, con diversos antisueros, de C4 y fragmentos C4 de cepas H-2.7 positivas y negativas.

- 3.4 La expresión de los determinantes H-2 en la molécula de C4 está controlada por mecanismos de efecto cis. Es posible que algunas de las variaciones detectables en la estructura de C4 mediante métodos serológicos o inmunoquímicos sean debidos a modificaciones post-traducción. Por ejemplo, Huang y colaboradores (173) han sugerido que la especificidad aloantigénica H-2.7 podría generarse después de la digestión de la molécula de C4 por enzimas controladas en la región S de H-2. De esto se desprende la importancia de la búsqueda de efectos trans en animales F1 originados del cruzamiento de cepas H-2.7 positivas (C4 δ 1) y H-2.7 negativas (C4- δ 2). Si la sugerencia de Huang y colaboradores (173) es verdadera, o si H-2.7 es el producto de otro efecto post-sintético tal como glicosilación, en estos animales F1 tanto C4- δ 1 como C4 δ 2 deberían ser portadores la especificidad H-2.7 (efecto trans). Se probaron híbridos F1 entre animales SJL (H-2^S, H-2.7

TABLA IV

Resumen de los resultados de la inmunoprecipitación de C4 y fragmentos de C4 de ratones H-2.7 positivos y negativos usando diversos antisueros específicos.

Cepa*	Naturaleza del fragmento de C4.	Inmunoprecipitación con antisuero contra:		
		C4(C4c + C4d)#	C4c#	H-2.7§
H-2.7 positiva	C4 o C4b	Positivo	Positivo	Positivo
	C4c	Positivo	Positivo	Negativo
	C4d	Positivo	Negativo	Positivo
H-2.7 negativa	C4 o C4b	Positivo	Positivo	Negativo
	C4c	Positivo	Positivo	Negativo
	C4d	Positivo	Negativo	Negativo

* La inmunoprecipitación de C4 nativo, con tres antisueros, fue realizada con preparaciones de 29 cepas de ratones portadores de diversos alelos en la región S, de acuerdo a lo mostrado en la Tabla I.

La inmunoprecipitación de C4b, C4c y C4d fue realizada con preparaciones de ratones SJL, MP(H-2.7 positivos) y DBA/2J (H-2.7 negativos).

Heteroantisuero.

§ Aloantisuero.

positivos, C4- γ 1) y DBA/2J (H-2^d), H-2.7 negativo, C4- γ 2). No se observó efecto trans, como se demuestra en la Figura 21: en la senda 2 se ven las cadenas γ 1 y γ 2 de C4 inmunoprecipitadas por el heteroantisuero contra C4. De estas cadenas solo γ 1 fue inmunoprecipitada por anti H-2.7 (a través del fragmento C4d de la cadena α de C4) (senda 3). (El resto de la Figura 4 es pertinente a la sección que sigue).

- 3.5 El determinante aloantigénico H-2.7 y la cadena γ de tipo 2 están presentes en una molécula excepcional de C4 codificada por el alelo S^k. Los ratones portadores del alelo k en la región S tienen niveles excepcionalmente de bajos C4 circulante, de acuerdo a lo demostrado en titulaciones hemolíticas (150) o mediante RIE usando un heteroantisuero (149). Estos ratones son excepcionales pues expresan de alguna manera la especificidad H-2.7 a pesar de ser portadores de C4 de tipo γ 2. C4 de ratones B10.HTT(S^k) fue inmunoprecipitado específicamente con H-2.7 y, como se demuestra en el IEF presentado en la Figura 21, senda 5, la cadena γ obtenida fue de tipo 2. Los pesos moleculares aparentes de las cadenas α , β y γ obtenidas fueron idénticos a los de las cadenas

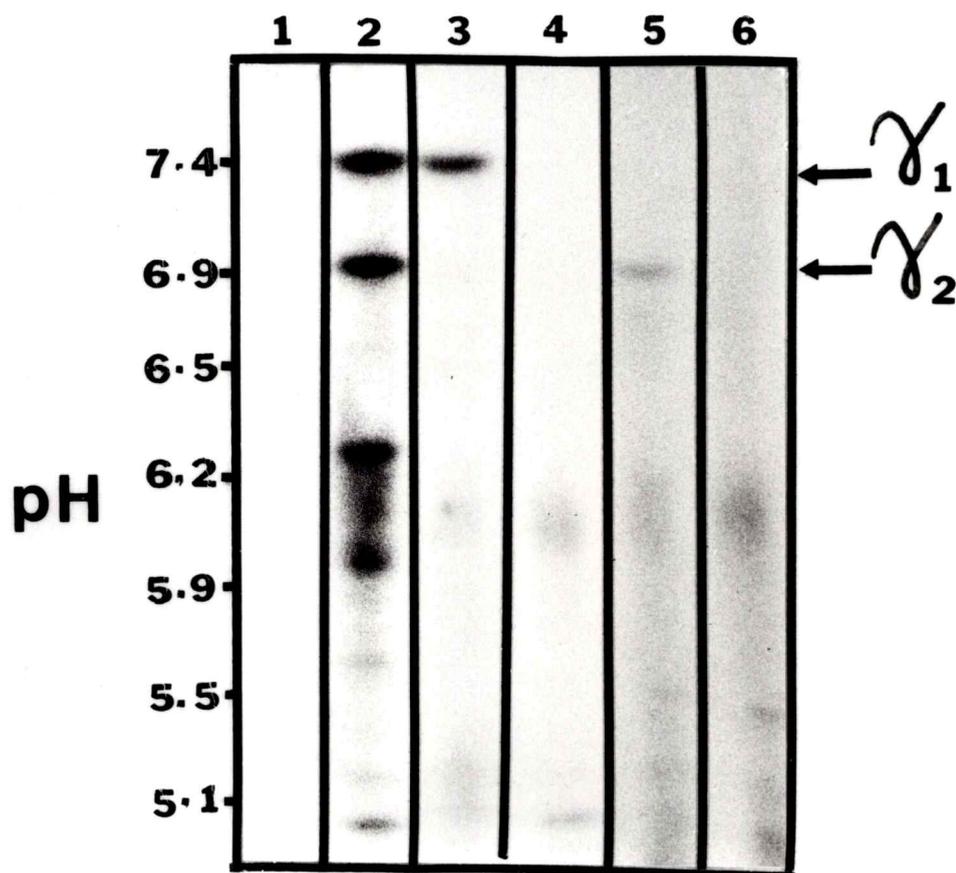


Figura 21

Figura 21: Radioautografía de IEF de C4 de ratón. Las condiciones experimentales fueron descritas en la Figura 19. Las sendas 1 a 4 muestran los resultados obtenidos con C4 de ratones híbridos F1 entre SJL (S^S , H-2.7 positivos, C4- γ_1) y DBS/2J (S^d H-2.7 negativos, C4- γ_2). Las sendas 5-6 muestran los resultados obtenidos con ratones B10.HTT (S^k , C4- γ_2 , H-2.7 positivos). La senda 1 muestra los resultados de inmunoprecipitación con suero normal de conejo, la senda 2 con suero de conejo anti-C4, la senda 3 y 5 con suero de ratón anti H-2.7, y las sendas 4 y 6 con suero normal de ratón. El heteroantisuero reconoce a C4- γ_1 y C4- γ_2 en el suero del híbrido. El aloantisuero anti H-2.7 en cambio reconoce solo C4 de tipo γ_1 (comparar sendas 2 y 3). Las bandas específicas, presentes en la senda 2, y que se enfocan entre pH 6.25 y 5.95 corresponden a productos de degradación de la cadena α . Esta Figura también muestra que C4 de la cepa B10.HTT (S^k , C4 bajo- γ_2 , H-2.7 positivo) es reconocido por anti-H-2.7. La diferencia en intensidad entre la banda γ en la senda 5 y las intensidades γ de las sendas 2 y 3 es esperada ya que todos los animales portadores del alelo k en la región S tienen bajos niveles de C4.

de C4 de otras cepas de ratón, como se demuestra en la Figura 22, sendas 2 y 3. De acuerdo a lo esperado la intensidad de las bandas obtenidas fueron mucho menores.

4. El gen estructural de la proteína sexo-limitada del ratón (Slp) está ubicado en el complejo principal de histocompatibilidad. Los resultados presentados en secciones anteriores han demostrado que la proteína Slp es una entidad molecular definitivamente diferente del cuarto componente del complemento, a pesar de compartir notorias homologías estructurales. También se demostró en secciones anteriores que el gen estructural de C4 está ubicado en la region S de H-2. Por otra parte, el control de la sexo limitación de Slp ha sido atribuido también a genes presentes en la region S (56, 66-67). Estos hechos sugieren que el gen estructural de Slp podría estar también en la region S, cercanamente ligado al gen estructural C4. Sin embargo, estos hechos no descartan la posibilidad de que exista allí uno o varios genes que regulan la actividad de genes estructurales localizados fuera de H-2, incluso en otro cromosoma. En las Secciones siguientes se abordará este problema experimentalmente. Para ésto se inició la búsqueda de variantes electroforéticas de Slp.

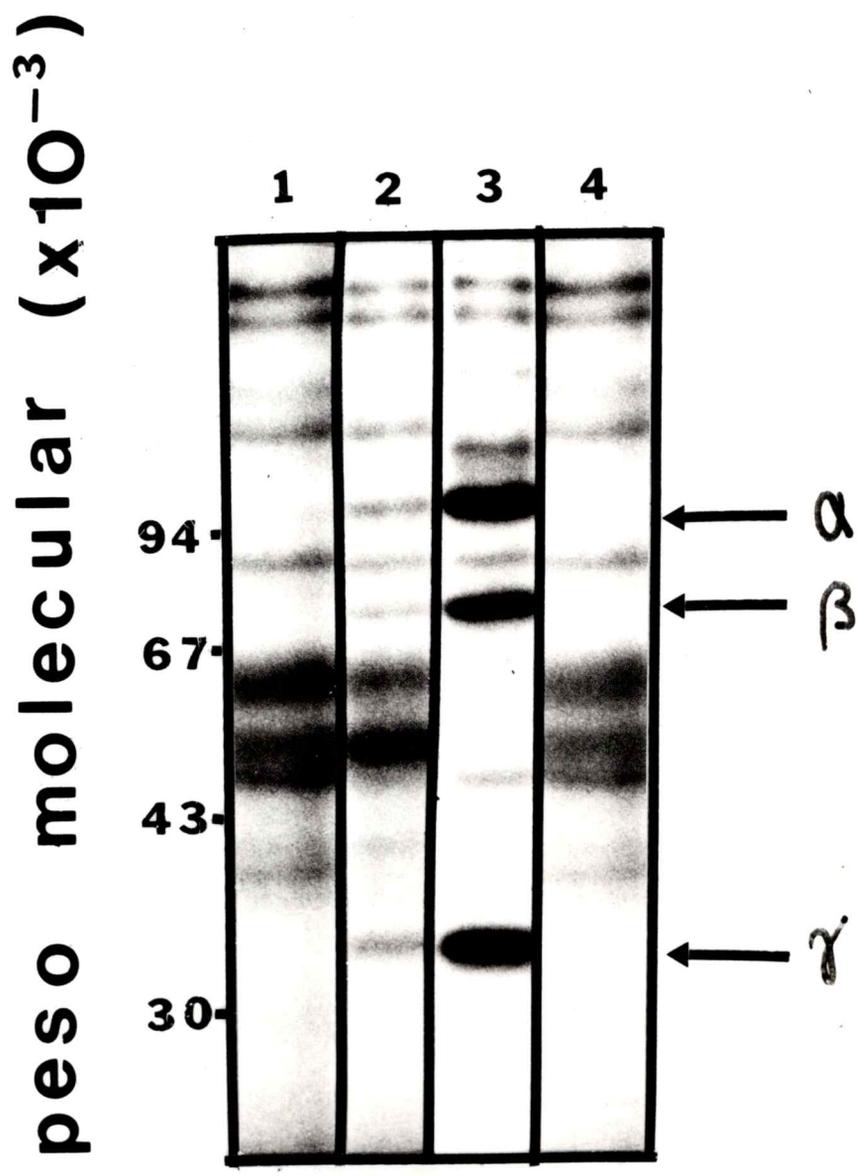


Figura 22

Figura 22: Radioautografía de gradiente de SDS-PAGE (7-15%). Las condiciones experimentales fueron descritas en la Figura 18. Las sendas 1-2 muestran los resultados de inmunoprecipitación de fracciones de plasma, positivas para C4, provenientes de ratones B10 HTT (Sk, C4-bajo, H-2.7 positivos). Las sendas 3 y 4, SJL (Ss, C4-alto, H-2.7 positivos). La senda 2 y 3 muestran los resultados de la inmunoprecipitación con anti H-2.7 y las sendas 1 y 4 son controles con suero normal de ratón. Los pesos moleculares aparentes de las cadenas α , β y γ de C4 de ratones Sk y ratones Ss son idénticas lo que está de acuerdo con resultados anteriores (150).

4.1 La proteína S1p es polimórfica y el gen estructural está ubicado en el complejo H-2. S1p, parcialmente purificado de ratones machos, fué radiomarcado, inmunoprecipitado con aloantisuero y analizado en la modificación (162) de la técnica bidimensional de O'Farrell (161). En la gradiente de pH usada, la cadena β de S1p no entró en los geles. Las cadenas α y γ penetraron en la primera dimensión y fueron identificados en los radioautogramas de la segunda dimensión por sus pesos moleculares. En algunos geles pudo visualizarse una mancha de peso molecular 200.000 que probablemente representa el precursor de la molécula S1p.

Diversos controles negativos fueron analizados, incluyendo fracciones equivalentes, radiomarcadas, obtenidas de machos de cepas que son genéticamente S1p positivas pero fenotípicamente negativas (S1p^a-S1p-o). Estos controles negativos y también inmunoprecipitaciones de S1p con suero normal de ratón y con aloantisueros contra C5 y C4 (anti H-2.7), no produjeron manchas en las segundas dimensiones en las posiciones correspondientes a las cadenas α y γ de S1p.

Aunque no se detectaron variaciones genéticas en las cadenas α de S1p, las cadenas γ

resultaron ser claramente polimórficas. Así, las cadenas γ de ratones C3H.W7 mostraron un pI de 6,55 (γ 2, Figura 23) que, comparado con la cepa C3H.OH, pI 6,71 (1 Figura 24), resulta claramente diferente. Como es de esperar, una mezcla de S1p de ratones C3H.OH y C3H.W7, produjo cadenas γ con ambos puntos isoeléctricos y con la misma intensidad, como se demuestra en la Figura 25.

Resultados idénticos a los mostrados en la Figura 25 fueron obtenidos con machos (C3H.OH x C3H.W7) F1. Las hembras sin embargo produjeron resultados como los de la Figura 1. La explicación de esto radica en que en la cepa C3H.W7 el complejo H-2 deriva de una hembra silvestre, fenotípicamente S1p positiva (S1p^a-S1p-a), descrita por Klein (68). Con el complejo H-2 de esta hembra se preparó la cepa C3H.W7, en que la expresión de S1p es constitutiva (independiente de la regulación hormonal y por lo tanto expresada en hembras y machos). El hecho de que hembras (C3H.OH x C3H.W7)F1 produzcan solo S1p con cadena similar a la de la cepa constitutiva (γ 2) demuestra que el control de la constitutividad, aparte de residir en H-2, actúa con un efecto de tipo cis. En otras palabras, el elemento regulador presente en el cromosoma número 17, proveniente de la

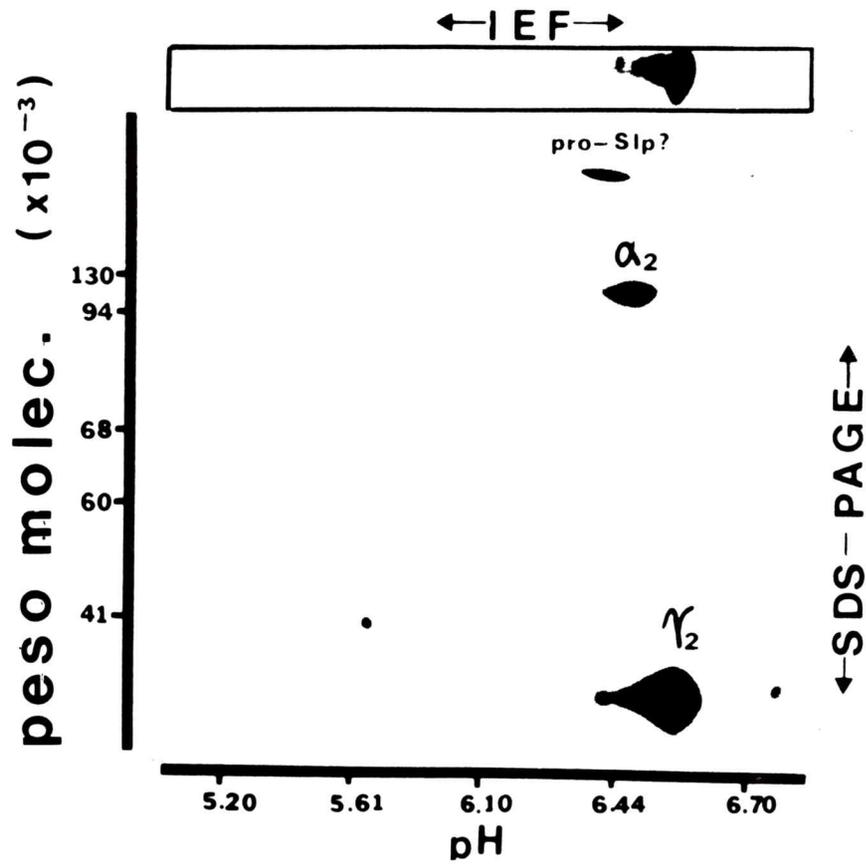


Figura 23

Figura 23. Radioautografía de un gel bidimensional de S1p purificado de ratones machos C3 H.W7. Se observan 3 manchas específicas: la mancha superior corresponde probablemente al precursor de S1p (pI 6,4, 200.000 daltons); la cadena α (pI 6,50; 105.000 daltons) y la cadena γ (pI 6.55, 34.000 daltons). El mismo resultado se obtuvo con ratones B10.W7R. En la mayoría de las separaciones, menos de un 5% de cadenas γ específicamente inmunoprecipitadas se enfocan a pH más altos o bajos que el grueso de las cadenas. Esto ocurre, probablemente, como consecuencia de modificaciones post-traducción de las moléculas S1p. Este tipo de microheterogeneidad ocurre con la mayoría de las proteínas sometidas a este sensible procedimiento. Resultados idénticos fueron obtenidos con ratones (B10D2 x B10 WR7) F1 hembras, demostrando que el control de la expresión de S1p en hembras es de un efecto cis.

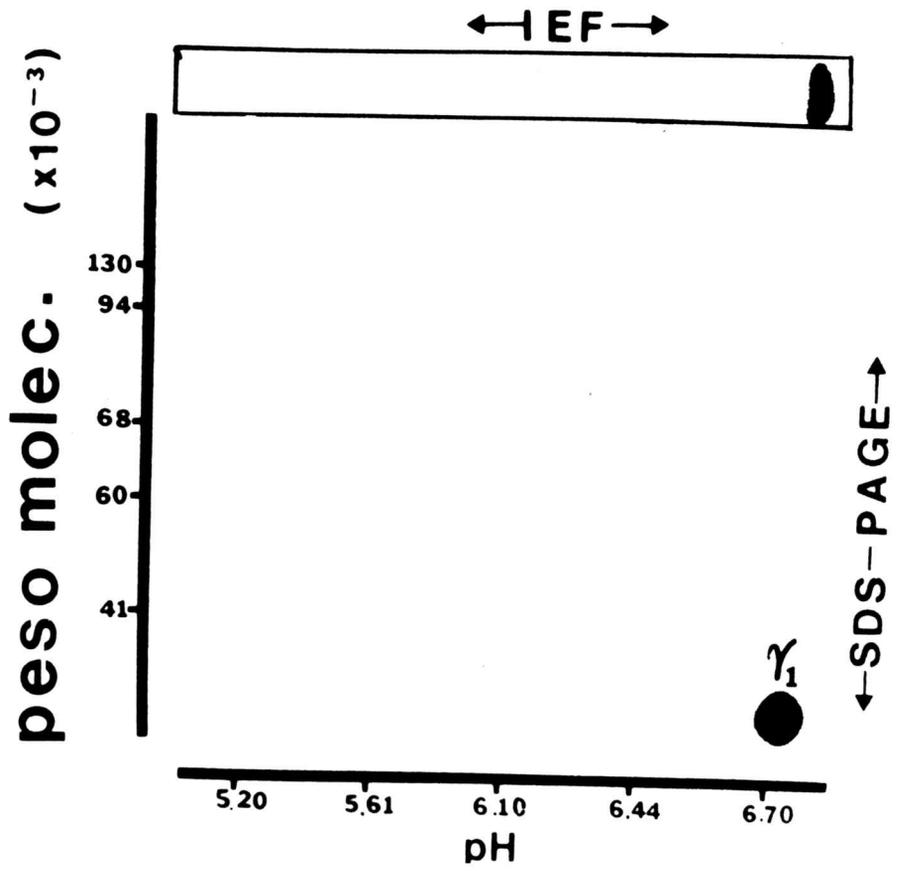


Figura 24

Figura 24: Radioautografía de electroforesis bidimensional de S1p de ratones machos C3H.0H. Se visualiza una mancha específica: la cadena γ (pI 6,75, 34.000 daltons). Resultados idénticos fueron obtenidos con todas las cepas S1p positivas excepto C3H.W7 y B10.WR7. (En este experimento la cadena α es visible sólo después de sobreexponer la película).

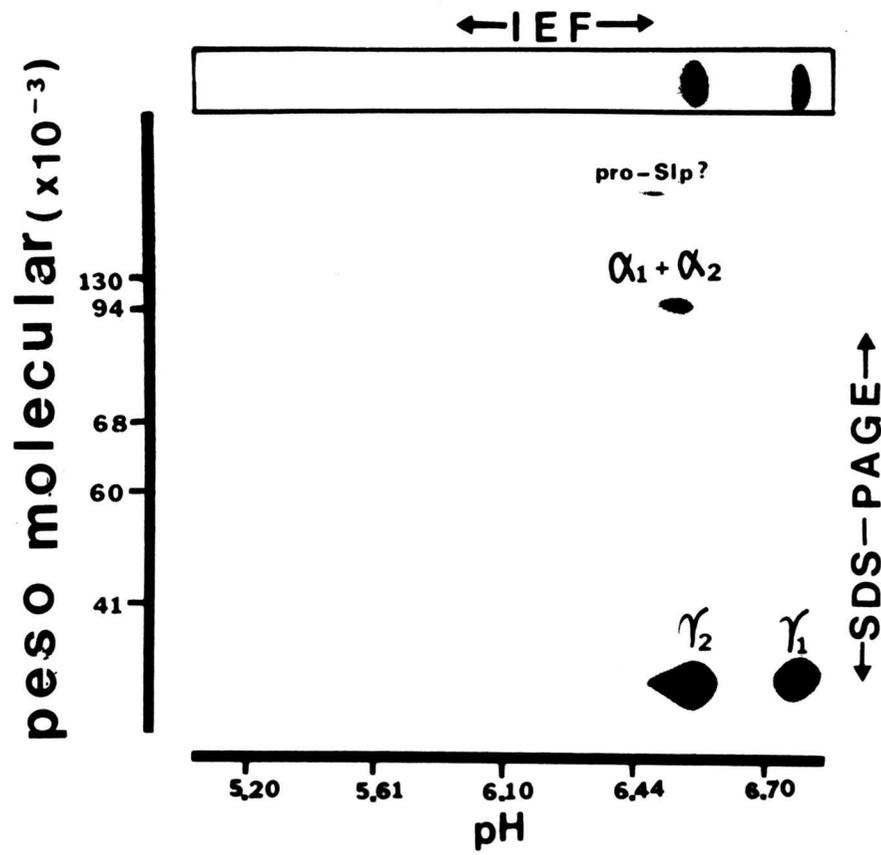


Figura 25

Figura 25: Radioautografía de una electroforesis bidimensional de una mezcla de S1p de ratones machos C3H.W7 y C3H.OH. Cuatro manchas específicas son visibles: pro-S1p, cadenas α , cadenas γ 1 y γ 2. Resultados idénticos fueron obtenidos con ratones machos (C3H.OH x C3H.W7)F1.

cepa C3H.W7, no puede inducir la producción de SIp por parte del gen estructural presente en el cromosoma homólogo, proveniente de la cepa C3H.OH (174).

La Tabla V muestra la distribución de los fenotipos electroforéticos de ratones SIp positivos. Con la excepción de las cepas C3H.W7 y B10.WR7, que son portadoras del haplotipo H-2 derivado de la hembra constitutiva capturada por Klein en 1975 (68), todas las cepas son portadoras de SIp con cadena de pI 6,71 (δ 1), incluyendo la progenie F1 de tres hembras constitutivas capturadas en la vecindad de Santiago.

El locus responsable de este polimorfismo podría designarse Slp-1 y, de acuerdo a los datos presentados mas arriba, podría postularse la existencia de dos alelos, Slp-1^a, que determina la presencia de cadena δ 1 con pI 6,71, y Slp-1^b, que determina la presencia de cadena δ 2 con pI 6,55. Si se comparan las cepas B10.WR7 con B10.WB o B10.S y C3H.OH con C3H.W7, se puede concluir que el locus responsable de este polimorfismo está ubicado en el complejo H-2. La ubicación precisa de este locus dentro del complejo no ha sido posible por no existir recombinantes informativos.

TABLA V

Distribución de Slp en las cepas endogámicas.

		Propiedades de Slp.		
		Presencia en hembras	Control de la expresión en hembras	Tipo de cadena γ^*
B10.WB	j	no	--	1
B10.S	s	no	--	1
P/J	p	no	--	1
C3H.0H	d	no	--	1
C3H.W7	w7	sí	H-2	2
B10.WR7	wr7	sí	H-2	2
NZB	d	sí	no H-2	1
PL/J	u	sí	no H-2	1
(C3H x W1)F ₁ §	k/w1	sí	desconocido	1
(C3H x W2)F ₁ §	k/w2	sí	desconocido	1
(C3H x W3)F ₁ §	k/w3	sí	desconocido	1

* Tipo 1 = pI 6.55, tipo 2 = pI 6.71.

§ Híbridos F₁ entre ratones C3H/HeJ y ratones silvestres (W1,W2,W3) capturados en las vecindades de Santiago. Los números 1-3 indican que los animales F₁ se originaron de tres ratones diferentes.

5. Reevaluación de la sexolimitación de la proteína Slp (175). Los resultados presentados hasta ahora se resúmen en que la región S de H-2 contiene los genes que codifican al cuarto componente del complemento y muy probablemente, a la proteína Slp. A pesar de que la función de Slp es desconocida, su expresión está sujeta a un interesante control hormonal que se traduce en la sexo-limitación (presencia en machos y no en hembras en la mayoría de las cepas endogámicas). Esta sexo-limitación se debe a que los andrógenos son necesarios para inducir la síntesis de la proteína, de acuerdo a lo demostrado por Passmore y Shreffler (67). Esta inductividad por andrógenos hace de Slp una herramienta de utilidad muy promisoría para el estudio de los mecanismos de activación génica por parte hormonas esteroidales. La primera excepción a esta sexo-limitación estuvo dada por la hembra silvestre, Slp positiva, capturada por Klein (68). Esta hembra tenía niveles Slp tan altos como los de los machos de cepas endogámicas positivas para Slp.

La conclusión de que la expresión de Slp es dependiente de la testosterona y, por lo tanto, limitada a los machos adultos portadores de ciertos alelos en la región S, se basa en mediciones realizadas

con técnicas convencionales. Las más importantes de éstas, han sido, inmunodifusión doble, RIE e inmunodifusión radial simple (52, 56, 66-69). En todos estos casos la positividad de los sueros pudo detectarse solo hasta diluciones de 1/20. Las hembras, con la excepción mencionada más arriba (68), fueron siempre negativas, incluso cuando se probó suero sin diluir. Estos hechos indicaron a diversos autores (52, 56, 66-69, 150, 162, 168-170, 174) que las hembras de cepas genotípicamente S1p positivas son fenotípicamente S1p negativas (S1p^a-S1p^o). Un aspecto contradictorio con estas observaciones está dado por el hecho de que las hembras genotípicamente S1p positivas son incapaces de producir aloanticuerpos contra S1p (67), a pesar de no tener S1p detectables en circulación. Este hecho sugiere que el sistema inmune de estas hembras es tolerante a S1p por tener estas pequeñas cantidades de la proteína circulante no detectable con la tecnología clásica.

En esta última sección de resultados se establecerá experimentalmente que las hembras genéticamente S1p positivas en realidad expresan S1p, en cantidades relativamente bajas, pero detectable en forma consistente. La detección de S1p en estas

hembras ha sido posible gracias a la producción en nuestro laboratorio de dos anticuerpos monoclonales dirigidos contra diferentes sitios antigénicos de Slp. Estos anticuerpos permitieron adaptar un radioinmunoensayo (R.I.E.) de muy buena sensibilidad, para dos sitios antigénicos. La producción de anticuerpos monoclonales y R.I.E han sido descritos en la sección Materiales y Métodos).

La figura 26 muestra la curva estandar obtenida en el R.I.E de doble sitio antigénico. Para esto se probaron diferentes diluciones de plasma de machos B10.D2(H-2^d, C4-alto, Slp positivo). Como control negativo se usó plasma de machos DBA/1J (H-2^b, C4-alto, Slp negativo).

Hembras y machos de diferentes cepas fueron probados en este R.I.E. y sus niveles relativos de Slp fueron calculados por intrapolación a la curva standard. La sensibilidad de este R.I.E. es tal que el plasma puede diluirse por lo menos hasta 1/3200 y aún detectar Slp con confianza. El uso de este R.I.E. ha permitido demostrar que las hembras genéticamente positivas, "fenotípicamente negativas" en realidad expresan Slp en cantidades que pueden alcanzar hasta 4% del Slp presente en los machos respectivos.

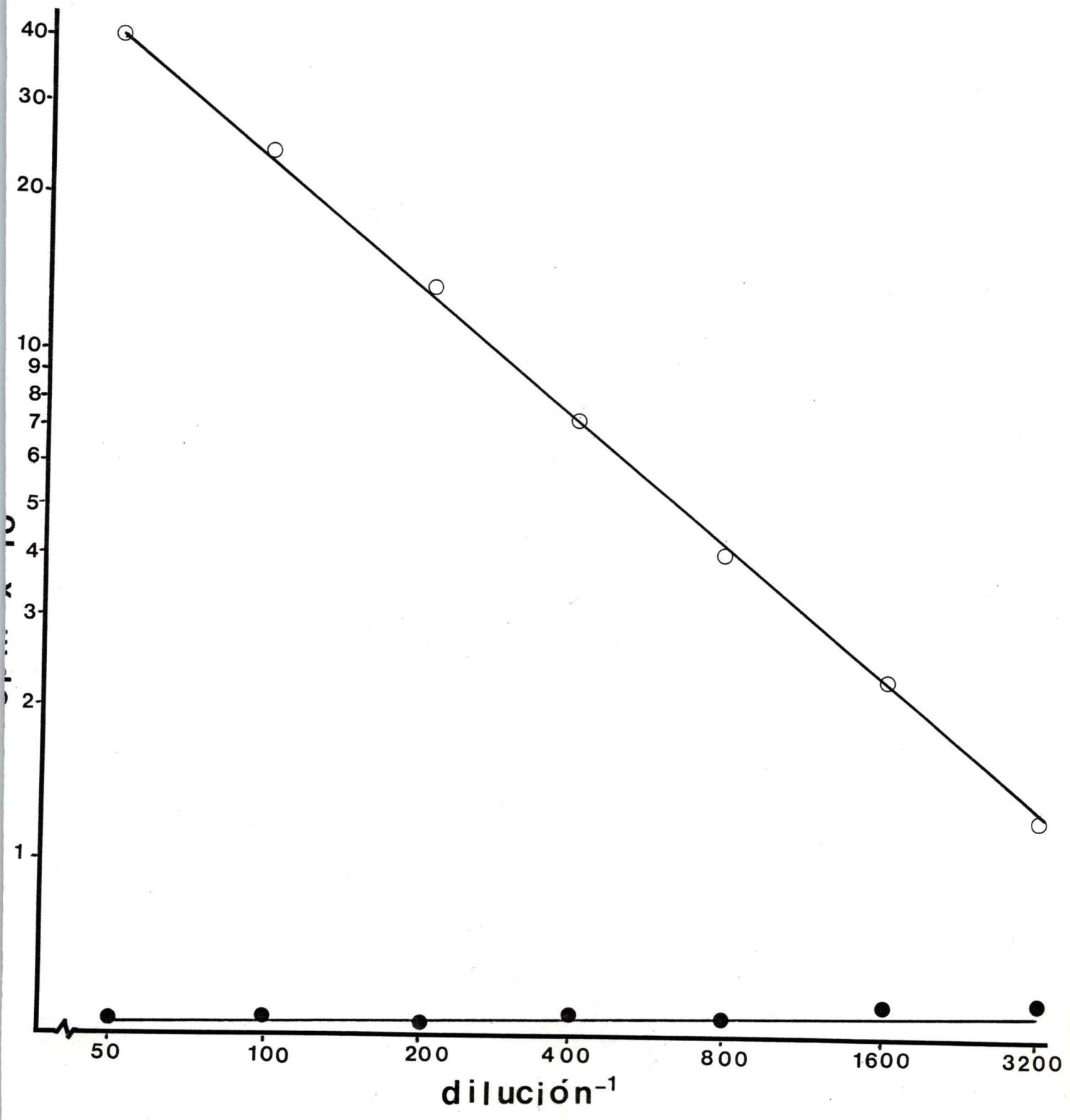


Figura 26

Figura 26: Radioinmunoensayo (RIE) para la detección de SIp. Modificación del RIE de doble sitio antigénico (167). Placas de microtitulación de PVC fueron precubiertas con 50 μ l/pozo de una solución de IgG monoclonal (5 μ g/ml) dirigida contra un sitio antigénico 1 de la molécula de SIp. Después de saturar la placa con exceso BSA fue incubada con 25 μ l/pozo de diferentes soluciones de plasma SIp positivo (B10.D2, S_d, macho) círculos cerrados. En un cuarto paso la placa se incubó con 25 μ l de IgG monoclonal anti-sitio antigénico 2 de la molécula de SIp, a una concentración de 1 μ g/ml. Después de incubar, se determinó la cantidad de radioactividad asociada con los pozos.

La Tabla VI resume los resultados de esta reevaluación. Las hembras portadoras de los alelos d, s, o p (clásicamente considerados negativos) expresan S1p en cantidades que varían entre 4% (B10.F(14R)) y 0.2% (B10.DBR-2) de los niveles presentes en los machos respectivos. No se detectó S1p en machos y hembras considerados clásicamente S1p⁰ (aquellos portadores de los alelos k, b o f en la región S).

Los anticuerpos monoclonales permitieron además la purificación parcial de S1p del plasma de hembras mediante cromatografía por afinidad. Esto permitió demostrar conclusivamente que el R.I.E. para doble sitio antigénico reconoce en realidad S1p, y no una molécula con reactividad cruzada. La Figura número 27 resume esta demostración. Se trata de una radioautografía de moléculas de C4 y S1p de diferentes fuentes, incluso hembras, analizadas en SDS-PAGE. C4 (senda 1), una mezcla de C4 y S1p (senda 2) y S1p solo (senda 4) fueron inmunoprecipitados de plasma de machos B10WR y usados como controles positivos. S1p de hembras Balb/c (H-2^d, C4 alto, S1p^a-S1p^o), fue purificado por afinidad en columnas de Sepharosa a las cuales se acopló anticuerpos monoclonales anti-S1p. El material eluido conteniendo S1p fue radiomarcado, inmunoprecipitado con

TABLA VI

Presencia de SIp en hembras murinas previamente consideradas fenotípicamente SIp-negativas.

Cepa	Genotipo SIp	Unidades de SIp*		Alelo en la región <u>S</u> .
		Hembras	Machos	
B10.D2	SIp ^a	50 (5)	10,000	d
B10.BDR.2	SIp ^a	10 (1)	4878 (131)	d
BALB/c	SIp ^a	57 (15)	6061 (616)	d
B10.HTG	SIp ^a	--	8000 (3800)	d
A.SW	SIp ^a	28 (8)	--	s
B10.RIII(20R)	SIp ^a	13 (3)	1562 (132)	s
B10.S(7R)	SIp ^a	10 (3)	--	s
B10.F(14R)	SIp ^a	4 (0,4)	100 (45)	p
B10.P	SIp ^a	--	20 (3)	p
C3H	SIp ⁰	0	0	k
B10.Br	SIp ⁰	0	0	k
DBA/1J	SIp ⁰	0	0	b
A.BY	SIp ⁰	0	0	b
B10.M	SIp ⁰	0	0	f

* A la cantidad de SIp presente en una combinación de plasma de machos B10.D2 adultos le fue asignado un valor arbitrario de 10.000 unidades. Diluciones de este material fueron usadas para construir una curva estandar para el ensayo inmunoradiométrico. Los valores experimentales mostrados (media de 6 a 10 animales con sus errores estandar entre paréntesis) fueron calculados por intrapolación a la curva estandar.

-- Experimento no realizado.

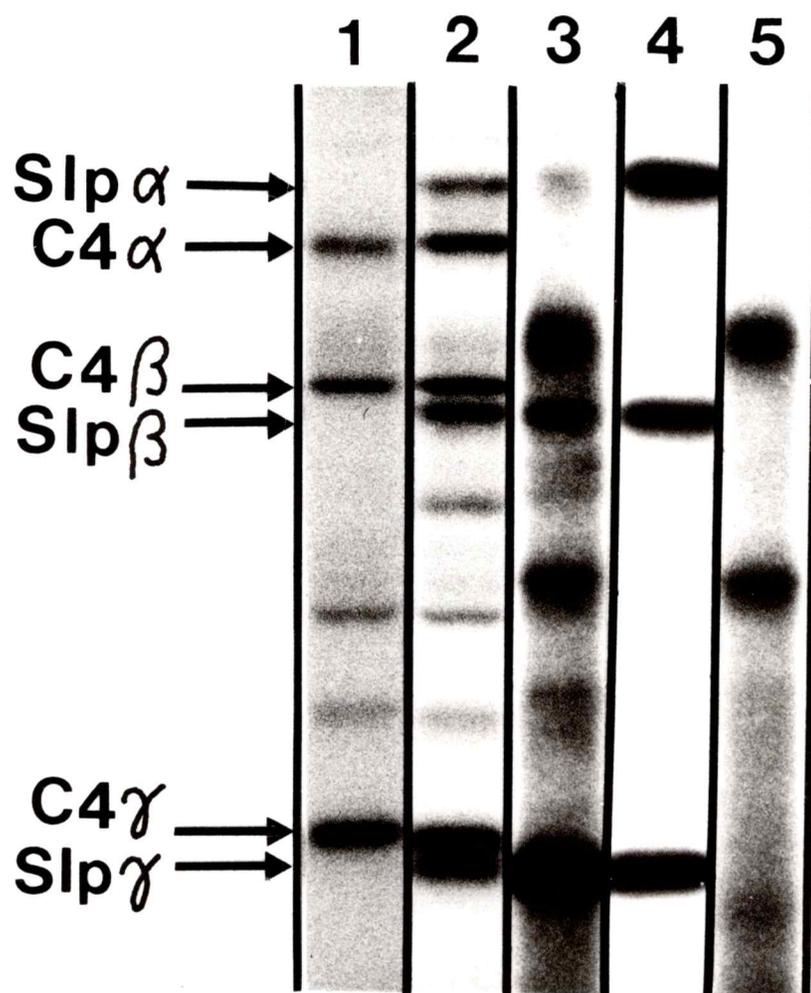


Figura 27

Figura 27: Determinación en SDS-PAGE de la estructura de cadenas polipeptídicas de la proteína S1p purificada de plasma de hembras. Las condiciones experimentales de la electroforésis fueron descritas en la Figura 15. Tres anticuerpos monoclonales (IgG 1), dirigidos contra tres sitios antigénicos diferentes fueron combinados y acoplados a Sepharosa. El S1p de hembras Balb/c parcialmente purificado en esta columna fue inmunoprecipitado con suero de conejo anti C4 (senda 3) o con anti S1p (senda 4). Se incluyeron dos controles positivos obtenidos de machos C3H.W7: C4, inmunoprecipitado con anti C4 después de extraer S1p con anti S1p (senda 1); una mezcla de C4 y S1p inmunoprecipitada con anti C4 (senda 2). La senda 5 incluye uno de los controles negativos corridos.

diversos antisueros. La senda 3 muestra este material inmunoprecipitado con anti C4. La senda 4 muestra el mismo material inmunoprecipitado con anti S1p. Es evidente de estos resultados que anti C4 reconoce en esta preparación a S1p (comparar sendas 3 y 2). También es evidente que anti S1p reconoce en estas hembras a una molécula idéntica al S1p de los machos (comparar sendas 4 con 2). Esta molécula, presente en hembras, tiene tres cadenas unidas covalentemente con pesos moleculares como el de las cadenas presentes en el plasma de los machos. Por último, es también evidente que esta molécula es diferente de C4. Por lo tanto, esta molécula ha sido identificada, por todos los criterios disponibles, como S1p y se ha determinado en forma concluyente que esta molécula no está restringida (sexo-limitada) a los machos.

DISCUSION

En esta disertación se analizan experimentalmente las relaciones genéticas estructurales y funcionales existentes entre Ss y Slp, dos proteínas controladas por el complejo H-2. La elección de estas proteínas para los estudios presentados aquí tuvo un triple objetivo. Primero, aumentar nuestro conocimiento con respecto a la genética del sistema del complemento, ya que ambas proteínas han sido implicadas de una u otra manera con este sistema por diversos investigadores (57, 59-65). Segundo, la presencia de genes estructurales y/o reguladores para estas dos proteínas en el segmento cromosómico mejor caracterizado de las especies vertebradas, permite el estudio de polimorfismos (regulatorios o estructurales) a través de una variedad de métodos serológicos, bioquímicos e inmunoquímicos. Estos polimorfismos pueden ser utilizados como marcadores para contestar preguntas de gran interés en genética de vertebrados, especialmente aquellas relacionadas con el control de la expresión génica. En tercer lugar la elección de estas proteínas fue influenciada por el hecho de ser los únicos productos del complejo H-2 expresados fundamentalmente en el suero y sólo secundariamente en células o tejidos. Dadas las funciones de los otros productos del complejo H-2 en el control de diversas interacciones celulares, era entonces obvia la necesidad de estudiar las

funciones de los productos expresados en el suero (Ss y S1p) y establecer en lo posible, las relaciones genéticas, estructurales y funcionales con los productos expresados primariamente a nivel de membranas celulares.

Los resultados experimentales presentados aquí contribuyen a la satisfacción de los dos primeros objetivos. Con respecto al tercero, ésto es, la integración de los genes estructurales o reguladores de Ss (C4), S1p y otras proteínas relacionadas con el complemento al contexto de los otros genes de los CPH, es aún tema de controversia.

En esta sección analizaré primero los resultados concretos relacionados con los dos primeros objetivos y luego utilizaré la información disponible para discutir (y especular) sobre el significado biológico del ligamiento entre loci relacionados con el complemento y los CPH.

En la sección Resultados se demostró que la proteína Ss es en realidad el cuarto componente del complemento murino. En esta discusión, por razones didácticas, seguiré la secuencia cronológica de los hechos y utilizaré el nombre original de la proteína hasta que la homología estructural y funcional con C4 sea formalmente discutida.

1. Los antígenos Ss y Slp son dos proteínas estructuralmente relacionadas pero, funcionalmente diferentes:

La demostración que las proteínas Ss y Slp son estructural y funcionalmente diferentes aclaró un gran número de observaciones contradictorias con respecto a la relación entre estas proteínas y el sistema del complemento.

La Figura 9 muestra el comportamiento cromatográfico de las proteínas Ss y Slp, y su relación con el modo de elución de la actividad hemolítica de C4. Cuando se usó plasma-EDTA, la mayoría del antígeno Ss fue detectado en la porción ascendente del segundo pico proteico. En cambio, cuando se usó suero el antígeno Ss fue detectado en el primer pico de densidad óptica, asociado con C4-bp (151). Por otra parte, Slp tuvo un comportamiento claramente diferente, ya que siempre eluyó en el segundo pico, independientemente del uso de suero o plasma.

Resultados idénticos fueron obtenidos al probar plasma o suero de varias cepas Ss-alto, Slp-positivas (C3H.WSlp, C3H.OH, DBA/2J y MP). En todos estos experimentos la actividad hemolítica de C4 fue siempre detectada sólo en el segundo pico de densidad óptica, lo que contradice las observaciones de

Goldman y colaboradores (63). Estos autores argumentan que la presencia de antígeno Ss en el primer pico, no acompañada de actividad hemolítica de C4, está en contra de la posibilidad de que Ss sea el cuarto componente del complemento. La validez de este argumento es dudosa ya que la presencia Ss en el primer pico, refleja probablemente la activación de C1 durante el proceso cromatográfico (177), con fragmentación de C4 (Ss) a C4b y formación de complejos con C4-bp. Los complejos C4b/C4-bp son macromoleculares y hemolíticamente inactivos. En concordancia con lo anterior, la Figura 9 también muestra que la actividad hemolítica de C4 en el suero es sólo un 10% de la que se encuentra en el plasma. Sin embargo, cuando se tomaron precauciones para que no se activara el C1 del suero (agregando EACA y DFP después de sacar el coágulo), la actividad hemolítica fue idéntica a la obtenida al fraccionar plasma (en plasma se usa EDTA que bloquea a los iones Ca^{++} y Mg^{++} , esenciales para la actividad de C1).

La evidencia directa de que Ss media la actividad hemolítica de C4 se obtuvo en experimentos en los que se extrajeron específicamente cantidades variables del antígeno Ss de fracciones de plasma.

Luego se procedió a correlacionar esta remoción con la actividad hemolítica residual de C4 (Figura 10). Estas dos variables se correlacionaron con un alto grado de significancia ($r=0,99$, $P < 0,001$). Sin embargo, como se demuestra en la Figura 11, no hubo un descenso en la actividad hemolítica de C4 cuando se procedió a extraer hasta un 100% del antígeno S1p. El pequeño descenso en la actividad hemolítica de C4 observado al agregar un exceso de IgG anti-S1p (1,73 y 2,21 μg) se debe probablemente a adsorción no específica de Ss a los complejos inmunes.

Al comparar los niveles de Ss con la actividad hemolítica de C4 en plasma de ratones fenotípicamente S1p negativos (hembras S1p^a - S1p⁰, o hembras y machos S1p⁰), se obtuvo una correlación altamente significativa ($P < 0,001$) (Figura 12). Este nivel de significancia disminuyó al incluir plasma de animales fenotípicamente S1p positivos (machos S1p^a). Este resultado está de acuerdo con la predicción de que S1p no tiene actividad hemolítica pero sí es reconocido por el heteroantisuero utilizado para cuantificar Ss. Estos resultados explican algunas de las discrepancias descritas previamente entre los niveles de Ss y la actividad hemolítica de C4, especialmente aquellas destacadas por Goldman y asociados

(63-65). Los estudios de las relaciones entre Ss y actividad hemolítica realizados por estos autores no consideraron que Slp contribuye significativamente a las mediciones de antígeno Ss realizada con anti-sueros heterólogos y no detectaron que Slp carece de actividad hemolítica de C4. Dificultades adicionales surgen del hecho de que si no se toman precauciones especiales para prevenir la activación de una variedad de proteasas séricas, la proteína Ss es rápidamente fragmentada durante los procesos cromatográficos a que se somete el suero. Una vez fragmentada, esta proteína se une a C4-bp (Ss-bp) (151), formando complejos macromoleculares hemolíticamente inactivos. Por último, la mayoría de las técnicas usadas previamente para la detección de la actividad de C4 murino no reuniría las condiciones óptimas. En los experimentos presentados aquí se usaron eritrocitos de vacuno sensibilizados con la correspondiente hemolisina (IgM) y además se usó suero de cuy deficiente en C4, al cual se agregó C2 humano oxidado (178) para resolver el problema de incompatibilidad de especies en la formación de la C3 convertasa ($\overline{C4b2a}$) (179).

Estas modificaciones ciertamente aumentaron

la sensibilidad de la titulación de C4 en plasma o suero de ratón.

De lo discutido anteriormente se desprende que la proteína Ss expresa la actividad funcional de C4. Se podría postular, por lo tanto, que esta proteína debería ser susceptible a la acción enzimática de C1 (Figuras 2 y 3). En las Figuras 13 y 15 se demuestra que el tratamiento con C1 fragmenta a la proteína Ss pero no a S1p. En la Figura 15 se demuestra que la acción de C1 es específica para la cadena α de Ss, eliminando de ésta un fragmento de peso 7.000 a 8.000. Esta acción de C1 transforma a Ss en una molécula hemolíticamente inactiva.

Las proteínas Ss y S1p comparten una gran homología antigénica y estructural ya que ambas son reconocidas como idénticas por heteroantisueros de conejo y ambas están formadas por 3 cadenas polipeptídicas. Sin embargo hay algunas diferencias que han sido demostradas experimentalmente en esta disertación. Por ejemplo, en la senda 2 de la Figura 14, se observa que Ss, al igual que C4 humano, consiste de tres cadenas polipeptídicas unidas covalentemente (este experimento se realizó en condiciones reductoras). Estas cadenas tienen pesos moleculares aparentes de 98, 77 y 34 kilodaltons. En condiciones

no reductoras (Figura 13), la proteína S1p tiene el mismo peso que Ss. Sin embargo, en condiciones de reducción, S1p también muestra 3 cadenas cuyos pesos moleculares son ligeramente diferentes de los de Ss (105, 74 y 32 kilodaltons respectivamente, Figura 14, senda 3).

La Tabla VII resume los datos funcionales y estructurales de las proteínas Ss y S1p presentados aquí. Estos datos permiten concluir que Ss es el cuarto componente del complemento del ratón. La homología de S1p con Ss se desprende de la similitud en estructura de cadenas polipeptídicas y de sus relaciones antigénicas con Ss. Sin embargo, la función de S1p sigue siendo desconocida.

En consecuencia con los resultados discutidos hasta aquí, en el resto de esta disertación la designación de sustancia sérica o Ss será reemplazada por la de cuarto componente del complemento o C4.

De acuerdo a lo mencionado en varias secciones anteriores, ratones con diferentes haplotipos H-2 tienen concentraciones relativas de C4 sérico que pueden variar entre 1 y 20 veces. En otras palabras, H-2 controla estas extensas variaciones cuantitativas de C4, pero el gen estructural de esta proteína podría

TABLA VII

Diferencias entre las moléculas Ss y Slp

Propiedad	Ss	Slp
Reconocimiento por anti C4 humano	Si	Pobre
Afinidad por C4-bp	Si	No
Activación por C1	Si	No
Actividad hemolítica de C4	Si	No
Peso molecular de las cadenas:		
α	98.000	105.000
β	77.000	74.500
γ	34.000	32.000

estar en otro lugar del genoma. Por lo tanto, después de identificar a Ss como el cuarto componente del complemento parecería lógico tratar de responder la pregunta de la ubicación de su gen estructural. Con este objetivo, buscamos marcadores estructurales de esta proteína. La discusión de estos resultados se presenta en la sección siguiente.

2. El gen estructural del cuarto componente del complemento del ratón está ubicado en la región S del complejo H-2. En estos estudios se usó una modificación (162) de la técnica electroforética bidimensional de O'Farrell (161), cuyas ventajas se discuten en la sección Métodos. Esta técnica permite el análisis de mezclas complejas de polipéptidos radiomarcados mediante tres criterios independientes: punto isoeléctrico (pI), peso molecular y especificidad antigénica. Esto se logra separando las muestras primero en IEF (pI) y luego en SDS-PAGE (peso molecular). El realizar el IEF en condiciones de denaturación completa permite evitar las interacciones débiles proteína-proteína que ocurren entre los componentes del complemento y que pueden complicar seriamente la interpretación de las diferencias de sus movilidades electroforéticas

(151). Esto permite también discernir entre los precursores de los componentes estudiados, tales como pro-C4 (134-135) y la proteína nativa o productos de degradación de ella.

Usando este método pudimos detectar 3 variantes de C4 murino con diferentes pI de sus cadenas γ . Designamos estas variantes como $\gamma 1$ (pI 7.4), $\gamma 2$ (pI 6.9) y $\gamma 3$ (pI 6.5). Los genes que controlan esta variación están localizados en la región S del complejo H-2.

Como se resume en la Tabla I y se demuestra en la Tabla II, en las cepas comercialmente disponibles se detectó C4 de tipo $\gamma 1$ y $\gamma 2$ (Figuras 16 y 17). C4 con cadena $\gamma 3$ fue identificado en dos cepas, B10.LIB55 y B10.STA12, cuyos genotipos H-2 derivan de ratones silvestres capturados en sectores rurales de Michigan, U.S.A (1980). Es interesante el que, a pesar de que los genes de la subregión IA son muy polimórficos en los haplotipos de derivación silvestre, estas dos cepas pertenecen al mismo grupo IA e IE (W13) (180). Los resultados presentados aquí indican que estas dos cepas también tienen regiones S muy similares o idénticas.

El polimorfismo descrito hace surgir la pregunta obvia acerca de la relación entre los genes

que determinan el pI de la cadena γ de C4 y los genes descritos previamente que controlan la cantidad de C4 circulante (181-182).

La distribución de estos caracteres en diversas cepas indica que se trata de entidades independientes. Por ejemplo, los ratones de genotipo S_k y S_d comparten el mismo fenotipo de cadena de C4 (γ_2). Sin embargo, estos ratones muestran diferencias de 10 a 20 veces en la concentración de C4 circulante, mientras que los ratones de genotipo S_d y S_f (γ_2 y γ_1) respectivamente) tienen diferentes pI y concentraciones muy similares de C4 sérico (182).

En cuanto a la base genética de la variación estructural de las cadenas γ , la explicación más directa es que C4- γ_1 , C4- γ_2 y C4- γ_3 son formas alélicas de C4, cuyo gen estructural estaría localizado en la región S. La cadena γ sirve como marcador de polimorfismo de la molécula C4 completa ya que ésta se traduce como una sola cadena polipeptídica de peso 200.000 que es procesada post-sintéticamente en las tres cadenas α , β y γ (133-183). No obstante, debe tenerse presente la alternativa que las diferentes formas de C4 representen alotipos complejos codificados por genes

estrechamente ligados, productos de la duplicación de un gen ancestral. En este caso sería necesario invocar mecanismos desconocidos de control que permitieran la expresión de una sola forma de C4 por cepa. Como los alotipos complejos generalmente difieren en muchas substituciones aminoacídicas (1), esta hipótesis es compatible con la variación aloantigénica simultánea de la cadena α de C4 murino que será discutida en la próxima sección.

Por último, se puede descartar la posibilidad de que las variaciones de pI de las cadenas γ discutidas aquí se deban a la incorporación post-traducción de ácido siálico a estas cadenas ya que, el tratamiento con exceso de neuraminidasa de las tres variantes de C4, no alteró en absoluto el patrón de IEF. (Resultados no mostrados por ser idénticos a los de la Figura 16).

3. El grupo sanguíneo murino de H-2.7 es un determinante aloantigénico de C4d que es un fragmento del cuarto componente del complemento de esta especie. Hemos demostrado aquí que el determinante aloantigénico H-2.7 está presente en un fragmento de C4. La evidencia que permite concluir esto es múltiple. En

ausencia de activación del complemento, el aloantisuero anti-H-2.7 identifica a una molécula del plasma con las características funcionales y estructurales del cuarto componente del complemento. Esto es señalado por el peso molecular de las tres cadenas polipeptídicas de la molécula reconocida por este aloantisuero (α , β y γ), por el pI de su cadena γ y por la sensibilidad a Cls de su cadena α .

En el suero, la especificidad H-2.7 está asociada con un péptido más pequeño. Este péptido, de peso 45.000, ha sido identificado aquí como un fragmento de la cadena α de C4 (c4d o α 2, ver Figura 3). Este fragmento pudo ser inmunoprecipitado por el aloantisuero anti-H-2.7 y por el heteroantisuero anti-C4, pero no por un hetero-antisuero anti-C4c (Tabla IV). Por otra parte, C4c purificado de suero de ratones H-2.7 positivos no pudo ser inmunoprecipitado por el aloantisuero (este fragmento carece de C4d). Huang y colaboradores (184) y Huang y Klein (185) encontraron que el aloantígeno H-2.7 puede ser incorporado pasivamente, in vitro o in vivo, a glóbulos rojos H-2.7 negativos. Esta observación es explicada por los resultados expuestos aquí, ya que el fragmento de C4d, portador del

aloantígeno H-2.7, media la unión de C4b a las membranas celulares después de la activación del complemento (186).

Como se indica en la Tabla III (con una excepción que se discutirá más adelante), el C4 de diferentes cepas de ratones puede ser H-2.7 positivo y portador de cadena γ 1 o H-2.7 negativo y portador de cadena γ 2. Las variaciones de pI de las cadenas γ y la expresión del determinante aloantigénico H-2.7 son independientes, ya que el fragmento portador de la especificidad H-2.7 (C4d) se origina de la cadena α (Figura 3). Es difícil explicar estas variaciones estructurales múltiples presentes en una sola molécula en base a un solo locus con alelos múltiples. Considerando ésto, podría argumentarse que algunas de las modificaciones de las cadenas α o β resultaron de sucesos post-traducción como, por ejemplo, glicosilación. Sin embargo, los resultados presentados aquí demuestran la ausencia de efectos genéticos de tipo trans, lo que podría esperarse, por ejemplo, si una enzima controlada por la región S estuviese implicada en la generación de las variantes de C4. Esto fue demostrado al probar híbridos F1 entre animales portadores de C4- γ 1 (H-2.7 positivo) y animales

portadores de C4-Y2 (H-2.7 negativo). Estos híbridos expresan en el suero ambas variantes de C4, pero solo una (C4Y1) expresó en su cadena α la especificidad de H-2.7. No hubo indicación de recombinación de marcadores (efecto trans), como se demuestra en la Figura 21.

De acuerdo a lo establecido anteriormente, los animales portadores del alelo k en la región S presentaron varias anomalías con respecto a C4. Estos animales han sido identificados como H-2.7 positivos en base a absorción específica del aloantisuero in vivo. A pesar de ésto, el uso de técnicas tales como hemaglutinación e inhibición de la hemaglutinación no permiten detectar el aloantígeno en sus eritrocitos o suero (71-72). La explicación mas probable para estos hechos contradictorios estaría dada por los bajos niveles de C4 en ratones sk. Como se demuestra en la Figura 22, fue posible demostrar la presencia del aloantígeno H-2.7 en la molécula de C4 de estos animales mediante el uso de una técnica de inmunoprecipitación de sensibilidad adecuada.

Resultó inesperado el hecho de que C4 de ratones sk esté asociado con cadenas Y2, mientras

que todas las otras cepas H-2.7 positivas son portadoras de C4 tipo $\gamma 1$ (Tabla III). La naturaleza de esta combinación excepcional dentro de la molécula de C4 es una pregunta de gran interés, por reflejar quizás la expresión de una molécula defectuosa cuyos niveles en el suero alcanzan solo un 5% de los niveles normales. Al respecto, una posibilidad interesante es que el gen estructural para C4 en los animales Sk se originará a partir de una recombinación intracistrónica entre genes para C4- $\gamma 1$ y C4- $\gamma 2$.

Información definitiva sobre este punto emergerá probablemente ya sea del análisis de cromatogramas peptídicos de los tres tipos de C4 ($\gamma 1$, H-2.7 positivo; $\gamma 2$, H-2.7 negativos y $\gamma 2$, H-2.7 positivo), de la secuencia aminoacídica o de la secuencia del RNA mensajero de éstas moléculas.

La homología entre el grupo sanguíneo murino H-2.7 y los grupos sanguíneos humanos Chido y Rodgers ha sido establecida aquí en el sentido de que, en ambos casos, las especificidades antigénicas radican en el fragmento C4d de la molécula de C4. En el ratón, la demostración de la existencia de un antígeno antitético de H-2.7 tuvo que esperar durante largo tiempo. Recientemente, Passmore (187) ha demostrado la existencia de un antígeno (aún no

designado) que se expresa en glóbulos rojos, plasma y suero, cuya distribución en las diferentes cepas de ratón es exactamente opuesta a la de H-2.7 (negativo en animales S_f, S_k, S_j, S_p y S_s; positivo en animales S_b, S_d, S_r, S_q y S_u). Aunque aún no hay información disponible con respecto a la naturaleza molecular de este aloantígeno antitético, es probable su ubicación futura en C4 de tipo $\gamma 2$, en cuyo caso el paralelismo con los grupos sanguíneos Chido y Rodgers será mas completo. Persiste el problema de que en humanos es muy probable que C4 (hemolíticamente activo) sea codificado por dos loci cercanamente ligados (188-189), ya que la distribución poblacional de las variantes electroforéticas de C4 claramente no cumple con el equilibrio de Hardy-Weinberg para un modelo genético de un sólo locus. Cada uno de estos loci despliega un polimorfismo bastante importante, de acuerdo a lo determinado por Awdeh y colaboradores (190-191). Estos dos loci fueron designados C4A y C4B. El polimorfismo electroforético de C4 humano concuerda con la presencia de seis alelos en el locus C4A y dos alelos en el locus C4B. Estos autores (190-191) no detectaron la existencia de "crossovers" entre estos dos loci. El producto del locus C4A

es Rodgers positivo y el del locus C4B es Chido positivo. Dada la existencia de aproximadamente un 4% de genes nulos en cada uno de estos loci, y la presencia de haplotipos "seminulos", la eventual generación de individuos C4 deficientes es posible. Sin embargo, la gran mayoría de los individuos expresa ambas formas de C4 en el suero, o sea son Chido-Rodgers positivos.

Con respecto a H-2.7 murino y al antígeno antitético recientemente discutido (187), la situación es obviamente diferente ya que, por lo menos en las cepas endogámicas estudiadas, se ha demostrado la presencia exclusiva de uno u otro antígeno. Debe considerarse, no obstante, la posibilidad alternativa a la alélica, de que en el ratón, al igual que en humanos, existan por lo menos 2 loci que codifican C4 hemolíticamente activo correspondientes a las formas C4- γ 1-H-2.7 positivo y C4- γ 2-H-2.7 negativo (positivo para un antígeno antitético). Esto implicaría la existencia de mecanismos muy precisos de control, ligados a H-2, que permitirían la expresión de un solo gen por haplotipo. Otras posibilidades serán discutidas más adelante.

Recientemente, Ramos y colaboradores (192) y Ramos y Zavala (193) han descrito un nuevo aloantígeno en el ratón cuya distribución es similar a la de H-2.7 con respecto a su presencia en glóbulos rojos y en el suero. Aunque la expresión de este nuevo antígeno, denominado Gh, es independiente de la expresión de H-2.7, ambos estarían relacionados de una manera paradójica ya que es posible absorber simultáneamente la actividad de los 2 antisueros respectivos (anti-Gh y anti-H.2.7) con tejidos de ratones Gh positivos-H-2.7 negativos (192). Esta observación es difícil de explicar en términos inmunológicos convencionales. Una explicación posible podría estar dada por el fenómeno de Matuhasi-Ogate (194-195). Este fenómeno consiste en que si durante o después de la formación in vitro de un complejo antígeno-anticuerpo específico se introduce al sistema un anticuerpo de especificidad no relacionada con el antígeno presente en el complejo, frecuentemente se producirá adsorción del anticuerpo no específico. Se desconoce el mecanismo de esta interacción.

La distribución por haplotipo del antígeno Gh permite suponer que no está asociado con H-2.7 y,

probablemente, tampoco con C4. La caracterización estructural de la entidad Gh-positiva presente en el suero podría definir si este aloantígeno es parte de otro componente del complemento. Por otra parte, el ligamiento de Gh a H-2, detectado por Ramos y colaboradores (192-193), abre la interesante posibilidad de la existencia de otra proteína sérica controlada por este complejo.

En esta sección se ha discutido la naturaleza molecular del antígeno H-2.7, concluyéndose que se trata de una especificidad aloantigénica presente en C4. Por lo tanto, en base a estos resultados y considerando el hecho que S y G no han sido separados por recombinación (73), se propone la eliminación de la región G como entidad independiente dentro del complejo H-2.

Los experimentos discutidos en las secciones 1, 2 y 3 han estado relacionados con la proteína Ss y las conclusiones obtenidas pueden resumirse como sigue: a) SS es el cuarto componente del complemento murino; b) el gen estructural de esta proteína está ubicado en la región S del complejo H-2; c) el grupo sanguíneo H-2.7 corresponde a una variación aloantigénica de C4, por lo cual la región G debe ser eliminada del complejo H-2.

Concluye aquí la discusión de la parte experimental relacionada con C4 murino. En las próximas secciones se retomará el problema de la proteína 'sexo limitada.

4. El gen estructural de la proteína sexo limitada (Slp) está ubicado en el complejo principal de histocompatibilidad. Los resultados presentados aquí permiten concluir que, a pesar de las semejanzas estructurales de esta proteína con C4 y a la probabilidad de que C4 y Slp sean el producto de genes duplicados, la proteína sexo-limitada no tiene función hemolítica de C4.

En la mayoría de las cepas de ratones, Slp es detectada sólo en machos porque, aparentemente, su expresión está bajo un control estricto por parte de la testosterona. Sin embargo ratones de los haplotipos H-2w7 y H-2wr7, ambos derivados de una hembra silvestre capturada por Klein en 1975 (68), y también los ratones de las cepas endogámicas PL/j, NZB, FM y LG/J (196), expresan Slp en machos y hembras. Dado que, de acuerdo al alelo en la región S de H-2 las diferentes cepas pueden o no expresar la proteína Slp en el suero, es posible que el gen estructural para Slp esté en esta región, cercanamente ligado al de C4.

No obstante, es posible también que el gen estructural para S1p esté en otro punto del genoma y que lo regulado por la región S sea su expresión. Los resultados presentados aquí han resuelto parcialmente este problema al demostrar que la cadena γ de S1p es polimórfica en su carga eléctrica intrínseca (pI) y que el control de este polimorfismo reside en el complejo H-2. La localización del control dentro de H-2 no fue posible por falta de recombinates informativos.

El polimorfismo descrito para las cadenas γ de S1p podría deberse a diferencias en composición aminoacídica o a modificaciones post-sintéticas (glicosilación por ejemplo). Esta última posibilidad parece poco probable ya que los machos heterocigotos (S_d/S_{w7}) expresan ambas formas alélicas en forma codominante y las hembras expresan sólo la forma constitutiva S1p (174). Del resumen presentado en la Tabla V se puede concluir que el único caso en que la expresión de S1p en hembras es controlado por el complejo H-2, ocurre en animales portadores del haplotipo H-2_{w7} o H-2_{wr7}. Basados en este hallazgo Hansen y Shreffler propusieron en 1976 (69) que la región S del complejo H-2 contiene, aparte del gen estructural para S1p, un gen regulador controlado por

la testosterona. La expresión constitutiva de S1p en el haplotipo H-2^{w7} estaría dada por una mutación del gen regulador. Los resultados presentados aquí demuestran que este haplotipo también es excepcional en el sentido de expresar un tipo particular de S1p ($\gamma 2$, codificado por el alelo S1p^{w7}). En otras palabras, S1p- $\gamma 2$ es el único tipo de S1p en que la expresión en hembras está controlada por un gen ligado a H-2. Esta asociación puede ser producto del azar y no puede descartarse hasta ahora la posibilidad de que la mutación del gen hipotético regulatorio ligado a H-2 (69) no exista y que sea el alelo S1p^{w7} mismo el que, por haber mutado, escape al control hormonal. En la sección próxima se discutirán otros elementos relacionados con este fenómeno.

5. Reevaluación de la sexo-limitación de la proteína S1p. A pesar de que todos los estudios iniciales han indicado que la proteína S1p se encuentra exclusivamente en machos de ciertas cepas de ratones (S1p^a), y que su presencia en el suero está controlada estrictamente por la testosterona, se han observado posteriormente varias excepciones a esta sexo-limitación.

En 1975 Klein (68) descubrió la presencia de SIp en el suero de una hembra silvestre. En las hembras congénicas endogámicas portadoras del haplotipo H-2W7, derivado de la hembras silvestre, SIp es expresado constitutivamente. En otras palabras, está presente en el suero de machos, hembras, machos castrados e incluso en machos portadores del gen Tfm (feminización testicular). Tfm es una mutación recesiva, ligada al cromosoma X que determina insensibilidad a la testosterona en los ratones portadores (197-198). Esta insensibilidad se debería a que este gen induciría la presencia en el citoplasma de un receptor defectuoso para la testosterona (198). Hansen y Shreffler (69) y Klein (68) han propuesto que la expresión de SIp en animales portadores del haplotipo H-2W7 podría explicarse en base a mecanismos reguladores del tipo Jacob-Monod (202) o, por lo menos, a un mecanismo que reúna alguno de los aspectos centrales de este modelo. Por ejemplo, el modelo regulador-operador podría explicar las diferencias en términos de limitación al sexo entre animales portadores del complejo S_d de expresión sexo-limitada y animales S_{W7} de expresión constitutiva; en el

caso sd, la testosterona (inductor) evitaría la interacción entre represor y operador en los machos, por lo cual se induciría la expresión de SIp en estos animales. En cambio en hembras sd, la concentración de testosterona sería insuficiente para inducir la producción de moléculas SIp. Por otra parte, en los ratones sw7, el operador habría mutado o sufrido una deleción tal que sería incapaz de unirse al represor. Esta mutación "operador-constitutiva" resultaría en la síntesis de SIp, independiente de la presencia de la testosterona; por lo tanto, SIp se expresaría en ambos sexos.

Para acomodar esta explicación a los resultados obtenidos con la introducción de la mutación Tfm, se postula que este gen codificaría la proteína represora que interactúa con el operador del gen estructural para SIp. Esto estaría de acuerdo con la proposición de Ohno y Lyon (197) de que Tfm codifica un represor del tipo Jacob-Monod que puede inactivar genes en diferentes partes del genoma. La testosterona podría interactuar con el producto del gen Tfm normal e inducir así la síntesis de los productos de los genes reprimidos. Si se acepta que el Tfm normal codifica una proteína

represora, el gen Tfm mutante codificaría una proteína represora defectuosa, incapaz de interactuar con el inductor (testosterona), aunque conservaría su capacidad de unirse al operador y reprimir.

Esto resultaría en la no inductibilidad de los genes estructurales regulados por Tfm. En el caso específico de Slp los datos disponibles con respecto al efecto Tfm, podrían resumirse así: en animales sd, portadores del gen Tfm mutante, el represor, al estar unido al operador, no podría ser desplazado por la testosterona y, por lo tanto, Slp no se expresaría en estos animales. En cambio, en animales sw7, el operador mutante no interactuaría con el represor normal ni con el represor alterado producto del gen Tfm mutante. Por lo tanto, en animales sw7 Slp sería expresado en forma constitutiva, irrespectivamente de la presencia del gen Tfm mutante y de la presencia o ausencia de testosterona.

Aunque el sistema operón parece ser la unidad básica del control de expresión génica en procariontes, el modelo presentado anteriormente parece tener cierta base en el CPH del ratón. Uno

de los aspectos mas característicos de la organización del sistema operón es el hecho que los genes reguladores y estructurales interactúan en forma cis. Este efecto es detectable en individuos F1 heterocigotos para el gen estructural y para el gen regulador. Si la relación es de tipo cis y si se dispone de los marcadores adecuados para el gen estructural se puede determinar que el gen regulador controla solo al gen estructural al cual está ligado. En otras palabras, el gen regulador no controla la expresión del gen estructural ubicado en el cromosoma homólogo. Los elementos que regulan la cantidad de C4 presente en el suero de diferentes cepas (por ejemplo S_k comparado con S_d) y la regulación, ligada a H-2, de la constitutividad de SIp actúan sólo en forma cis de acuerdo a lo demostrado recientemente en nuestro laboratorio (174). Esto constituye un elemento más que hace a la región S un modelo de utilidad promisorio para el estudio de la regulación génica en organismos superiores.

Una segunda excepción a la sexo-limitación de SIp ha sido descrita recientemente por Brown y Shreffler (196). Estos investigadores encontraron

S1p en varias hembras de otras cepas (FM, PL/J y LG/S). La producción de S1p en estas hembras depende de la presencia de uno o más genes permisivos, no ligados a H-2. El mecanismo de acción de estos genes es desconocido.

En ésta tésis se han presentado resultados basados en el uso de un método inmunoradiométrico para medir S1p en varias cepas de ratones S1p^a, en las cuales la expresión de la proteína ha sido clásicamente considerada limitada al sexo. Sin excepción, S1p fué detectada en el suero de todas las hembras. Las cantidades detectadas fueron pequeñas variando entre 0,2 y 4% de las cantidades presentes en los machos de las cepas respectivas.

Estos hallazgos hacen difícil la distinción entre los mecanismos implicados en la sexo-limitación y en la constitutividad de la expresión de S1p, ya que incluso en las cepas en las que la producción de S1p es constitutiva, los niveles de la proteína en el suero de las hembras son de sólo un 30% de la cantidad presente en los machos (69, 196). Podría argumentarse, por ejemplo, que la producción de S1p es constitutiva en todas las cepas S1p^a. De acuerdo con ésto, el sistema S1p puede ser

informativo no sólo en la comprensión de algunos de los efectos hormonales sobre la producción de proteínas del complemento, sino también para contestar preguntas básicas sobre el mecanismo genético-molecular de la acción de hormonas esteroidales. Por ejemplo, a pesar de haber documentación amplia de una afinidad por el ADN por parte de los complejos formados por hormonas esteroidales y sus receptores (203), aún no hay suficiente evidencia de que la interacción produzca cambios en la transcripción. Tampoco hay evidencia de que los complejos receptor-hormona deban interactuar con secuencias nucleotídicas específicas en el ADN para regular la expresión génica.

6. Los CPH y el sistema del complemento: Discusión del posible significado biológico, funcional y evolutivo de esta asociación.

Hasta el momento de redactar esta discusión, C4 y C3 eran los únicos componentes del complemento cuyos ligamientos a H-2 habían sido formalmente demostrados: C4 en la región S, dentro de H-2; C3 a la derecha, a 11 centimorgans de S. Recientemente, Roos y Démant (219) han descrito un polimorfismo electroforético del factor B de la ruta alterna. El control de este polimorfismo está cercanamente ligado a H-2 pero, debido a la falta de recombinantes informativos, estos autores no pudieron localizar con precisión el gen o genes

responsables. Este nuevo ligamiento a H-2 extiende la homología entre este complejo y los correspondientes en el hombre (HLA), cuy (GPLA) y rhesus (RhLA).

A estos hechos hay que agregar los resultados de Kaidoh y asociados (208) quienes han detectado lo que parece ser un polimorfismo estructural de C4-bp murino, cofactor en la degradación proteolítica de C4b por parte del C3b-INA (151, 205-207). Los datos presentados por estos autores sugieren un polimorfismo del punto isoeléctrico de C4-bp en varias cepas congénicas de ratones. Estudios de ligamiento en dos combinaciones de retrocruzas indicaron que los dos tipos de C4-bp detectados son controlados por un solo locus codominante, ligado a H-2. El análisis de recombinantes intra-H-2 sugirió que el locus responsable está a la derecha de la región D, aproximadamente a 17 centimorgans de la región S. Es importante hacer notar que estos resultados deben interpretarse con cautela ya que se basan en diferencias sutiles de pI obtenidas en un isoelectroenfoque realizado en condiciones no reductoras y de semidenaturación. En estas circunstancias no es posible descartar interacciones residuales con otras proteínas del

plasma cuya estructura, afinidad por C4-bp, concentración sérica, etc., podrían ser las reguladas por H-2. En cualquier caso, si estos resultados son confirmados, constituirían el primer caso de una proteína no implicada en la formación de las convertasas de C3, cuyo gen estructural estaría ligado a H-2.

Todos estos hechos conducen a la última parte de esta disertación que se referirá a las principales opiniones con respecto al significado biológico y evolutivo de las asociaciones entre los complejos principales de histocompatibilidad de las especies y genes estructurales y reguladores de algunas proteínas especiales del complemento.

Estas asociaciones implican estudios, revisados recientemente (12), en por lo menos 5 especies (ratón, hombre, cuy, rhesus) y no muestran excepciones para C4, C2 y el factor B, lo cual sugiere que ésto puede ser una característica común del CPH de todos los mamíferos e, incluso, de todos los vertebrados superiores. Es tentador por lo tanto, el pensar que esta no es una asociación por azar.

El tercer componente del complemento que, entre otras funciones, participa en la formación de

la C3 convertasa de la ruta alterna ($\overline{C3b, Bb}$) y en la C5 convertasas alterna ($\overline{C3b}nBb$) y clásica ($\overline{C4b, 2a, 3b}$), es excepcional en su control genético. Esta excepcionalidad se basa en que el hombre, a diferencia del ratón, no hay evidencia del ligamiento entre el gen estructural de esta proteína y HLA. Más aún, recientemente Whitehead y asociados (204) usando híbridos somáticos entre fibroblastos humanos y murinos han obtenido resultados que sugieren que el gen estructural de C3 estaría ubicado en el cromosoma número 19 de la especie humana. La ubicación del gen estructural de C3 en el ratón ha sido determinada por dos grupos independientes de investigadores (93-96). Ambos concuerdan en que este gen está ubicado a 11 centimorgans a la derecha de la región D. Es muy probable que este gen sea diferente del gen que regula la concentración sérica de C3 y que ha sido ubicado en la cercanía de las regiones S y D (97-98). A pesar de esta divergencia en la localización de los genes estructurales para C3 en el ratón y humano, queda aún en pie la generalización de que todos los genes estructurales de los componentes que participan en la conversión (activación) de C3 están ligados a los CPH.

Las opiniones con respecto al significado de esta asociación en general conducen a una de dos conclusiones: a) estas asociaciones son aleatorias y no tienen significado biológico adaptativo, o b) estas asociaciones tienen un significado central en la fisiología de los CPH. Aunque ninguna de estas conclusiones tiene base experimental, en los párrafos siguientes se citan algunos de los elementos de juicio que favorecen a una u otra posición.

La primera hipótesis se basa en argumentos de tipo evolutivo. Se puede pensar por ejemplo, que los genes del complemento se originaron por duplicación de un gen primordial. Esto parece haber ocurrido con otros genes de los CPH (31, 210-212), tales como los de las regiones K y D. El ligamiento entre los genes del complemento y estos complejos se habría mantenido por no haber transcurrido suficiente tiempo para la translocación de estos genes o porque fuerzas selectivas que habrían actuado sobre otros genes del complejo, no relacionados con el complemento, habrían contribuido a mantener una integridad estructural, que no tendría un significado funcional estricto.

La posibilidad de que C2 y el factor B sean productos de genes duplicados es favorecida

por el hecho de que estas proteínas tienen una estructura y funciones similares: C2 en la C3 convertasa de la ruta clásica y el factor B en la C3 convertasa alterna (121, 136). C4, sin embargo, no parece compartir propiedades físico-químicas con C2 ni con el factor B, sino mas bien con C3 y C5 (213). Por lo tanto, la presencia simultánea de C4, C2 y el factor B en los CPH no puede explicarse sólo por duplicación génica. Tampoco puede explicarse por este mecanismo la presencia simultánea en H-2 de los genes Ir y de los genes que codifican los antígenos de transplante, ya que aparentemente no hay relación estructural entre sus productos.

Klein y asociados (21) se destacan entre los investigadores que no otorgan importancia a la asociación CPH-complemento. Ellos manifiestan que la región S del complejo H-2 es "notoriamente diferente del resto del complejo, ya que no controla ninguno de los caracteres asociados con las regiones K, D o I. En cuanto a la actividad del complemento (el único carácter que controla) no es afectada por las otras regiones, Esto da la impresión que la región S es un inmigrante extraño en el complejo H-2 y que no tienen ninguna relación funcional con el complejo mismo". En seguida,

Klein y asociados (21) hacen notar la poca validez del argumento de que la región S es parte de H-2 porque, al igual que el complejo mismo, afecta funciones inmunológicas. De acuerdo con estos autores, si este argumento fuese válido, entonces todos los loci que afectan funciones inmunológicas deberían ser considerados miembros del complejo.

No existen antecedentes experimentales en favor o en contra de las opiniones anteriores, pero algunos de los argumentos usados para descalificar a la región S como miembro de H-2 podrían usarse para descalificar a las regiones K, D o I. Por ejemplo, si se plantea que la región S no controla caracteres relacionados con I, K o D, también se puede argumentar que la región I tampoco controla caracteres asociados con K o D. En otras palabras, las funciones conocidas para I pueden realizarse en diversas cepas congénicas, irrespectivamente de los alelos presentes en K o D. El argumento (121) de que el reconocimiento por parte de células T de antígenos virales en el contexto de los antígenos de transplante de la célula infectada, habla en favor del ligamiento entre las regiones K, D e I, tampoco es necesariamente válido, ya que no hay

evidencia de que las regiones K y D no podrían proporcionar este contexto si estuviesen ubicados en otra parte del genoma.

El problema central entonces es si los genes actualmente descritos en los CPH podrían o no cumplir sus funciones si estuviesen dispersos en el genoma. Se podría pensar que el ligamiento de todos estos genes ha persistido (incluidos los del complemento) por razones selectivas. Se podría especular, por ejemplo, que existe algún tipo de interacción entre los productos de los genes estructurales del complemento con los productos de los otros genes de los CPH. Esta interacción podría realizarse a nivel de la superficie de algunas de las poblaciones celulares implicadas en la respuesta inmune. Si se postula que estas interacciones ocurrirían con mayor eficiencia entre productos alélicos específicos de dos o más loci del complejo, las fuerzas selectivas actuarían para mantenerlos en los haplotipos específicos. En otras palabras si estos loci no estuviesen ligados, la generación de combinaciones eficientes de alelos específicos sería difícil de explicar, debido a la asociación independiente de los cromosomas en la placa metafísica meiótica.

Al respecto Lachmann y Hobart (214) piensan que es más que una coincidencia que de los tres componentes del complemento codificados en los CPH, dos hayan sido detectados en las membranas celulares: el factor B (215-216) y C4 (217). En ambos casos las cantidades detectadas son muy pequeñas y las funciones desconocidas. El mecanismo de incorporación de estos componentes a las membranas celulares podría ser similar al discutido anteriormente para Chido y Rodgers en humanos y H-2.7 en el ratón, cuyas funciones son desconocidas.

Una atractiva posibilidad propuesta por Lachmann y Hobart (214) es que lo importante en la superficie celular no serían los componentes del complemento (o derivados de ellos), idénticos a los del suero, sino un conjunto distinto de componentes similares pero no idénticos al complemento, codificados por una familia de genes duplicados relacionados con los del complemento. Estas moléculas actuarían, en concentraciones muy bajas, a nivel de superficies celulares, por ejemplo en reacciones de citotoxicidad mediada por células. Para congruenciar estas posibilidades con la necesidad de mantener todos estos genes ligados en H-2, habría que

postular que estas moléculas relacionadas con el complemento actúan mas eficientemente en el contexto de (interactuarían con) combinaciones de productos específicos de alelos ligados.

Otra posible explicacion de por qué todos estos genes estan ligados en los CPH estaría dada por requerimientos fisiológicos de regulación común para coordinar la expresión de los loci respectivos.

El genoma murino abarca aproximadamente 1600 centimorgans de ADN (218) lo que equivale aproximadamente a 3×10^6 kilobases de ADN en el genoma murino haploide. Si mecanismos tales como el crossing-over ocurrieran al azar en todo el genoma, 1 centimorgan sería igual a 1875 kb aproximadamente. Por lo tanto H-2 (incluyendo T1a), con 1.5 cm, tendría 2800 kb de DNA. Este cálculo puede estar distorsionado si se considera que en la vecindad de H-2 se encuentra el locus t, uno de cuyos efectos es la casi completa supresión del crossing-over del cromosoma 17 (116, 118, 219-220). En otras palabras, loci que manifiestan pequeñas fracciones de recombinación pueden estar en realidad separados por distancias físicas mayores a las calculadas. En todo caso, este complejo parece

contener suficiente DNA para codificar por lo menos 1000 polipeptidos de tamaño promedio. Sólo unos pocos han sido caracterizados funcional y estructuralmente y en esto ha consistido la contribución principal de esta tesis. Irónicamente, de los relacionados con el complemento es de los que se tiene mas información en cuanto a sus funciones (en la interacción con complejos inmunes, en la promoción de funciones fagocitarias, en la lisis celular, etc.). Sin embargo, aún no se pueden explicar sus funciones en el contexto de los otros genes de los CPH. La respuesta a esto emergerá probablemente de la comprensión a nivel molecular de las interacciones de las superficies celulares en la respuesta inmune, de la caracterización futura de muchos otros genes y productos ligados a H-2 y de la aplicación de la tecnología de ADN recombinante al estudio de este complejo. Esta última nos promete no sólo la comprensión de los mecanismos regulatorios que operan en H-2 sino también a un paseo cromosómico de extremo a extremo del CPH murino y, eventualmente, del de otras especies.

Referencias

1. Hood, L., J.H. Campbell., S.C.R. Elgin. 1975
The organization, expression and evolution of anti-body genes and other multigene families. Ann. Rev. Genet. 9 :305.
2. Birnstiel, M.L., M. Chipchase; J. Spiers. 1971.
The ribosomal RNA cistrons. In: Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol. 11:351.
3. Clarkson, S.G., M.L. Birnstiel. 1973.
Clustered arrangement of tRNA genes in Xenopus laevis. Cold Spring Harbor. Symp. Quant. Biol. 38:451.
4. Shaffner, W., K. Gross., J. Telford., M. Birnstiel. 1976.
Molecular analysis of the histone gene cluster of Psamechinus miliatrix: II. The arrangement of the five histone-coding and spacer sequences. Cell. 8:471.
5. Kitchen, H., S. Bayer (Eds). 1974.
Hemoglobin: Comparative molecular biology models for the study of disease. Ann. N.Y. Acad. Sci. 24:19.
6. Gall, J.G., E.H. Cohen., D.D. Atherton. 1973.
The satellite DNA of Drosophila virilis. Cold Spring Harbor. Symp. Quant. Biol. 38:417.
7. Hunkapiller, T., H. Huang., L. Hood. 1982.
The impact of modern genetics on evolutionary theory. In: Perspectives on Evolution, Roger Milkman (Ed.) Sinauer Associates, Inc. (In Press).
8. Ohno. S. 1970.
Evolution by gene duplication. New York, Springer-Verlag.
9. Hood, L., H.V. Huang., W.J. Dreyer. 1977.
The area-code hypothesis: The immune system provides clues to understanding the genetic and molecular basis of cell recognition during development. J. Supramolec. Struc. 7:531
10. Gally, J. 1973.
Structure of immunoglobulins In: The antigens. Sela, M. (Ed.), New York Acad. Press. 1:162.

Referencias (continuación)

11. Van Rood, J.J., R.R.P. de Vries., B.A. Bradley. 1981. Genetics and biology of the HLA system. In: The Role of the Major Histocompatibility Complex in Immunobiology. Martin, E. Dorf (Ed). Garland STPM Pres. New York; page 59.
12. Alper, C.A. 1981. Complement and the MHC. In: The Role of the Major Histocompatibility Complex in Immunobiology. Martin E. Dorf (Ed). Garland STPM Press, New York; page 173.
13. Haldane, J.B.S., A.D. Sprunt; N.M. Haldane. 1915. Reduplication in mice. J. Genet. 5:133.
14. Morse, H.C. 1981. The laboratory mouse. A historical perspective. In: The Mouse in Biomedical Research. Vol. I. Foster, H.L., J.D. Small., J.G. Fox (Eds). Academic Press, New York, page 1.
15. Mc Kusick, V.A., and F.H. Ruddle. 1977. The status of gene map of human chromosomes. Sciences 196:390.
16. Graff. R.J. 1979. Minor histocompatibility genes and their antigens. In: Origins of Inbred Mice. Morse, H.C. (Ed). Academic Press. New York, page 667.
17. Klein, J. 1981. The Histocompatibility-2 (H-2) Complex. In: The Mouse in Biomedical Research. Vol. I. Foster, H.L., J.D. Small., J.G. Fox (Eds). Academic Press. New York, page 119.
18. Klein, J. 1979. Why associative recognition? In: Cell Biology and Immunology of Leukocyte Function. Quastel, M. (Ed). Academic Press. New York, page 306.
19. Murphy, D.B. 1981. Genetic fine structure of the H-2 gene complex In: The Role of the Major Histocompatibility Complex in Immunobiology. Dorf, M.E. (Ed). Garland STPM Press. New York, page 1.

Referencias (continuación)

20. Klein, J. 1975.
Biology of the mouse histocompatibility-2 complex. Principles of immunogenetics applied to a single system. Springer-Verlag. New York.
21. Klein, J., A. Juretic., C.N. Baxevanis., Z.A. Nagy. 1981.
The traditional and the new version of the mouse H-2 complex. Nature 291:455.
22. Benacerraf, B., 1981.
Role of the MHC products in immune regulation. Science 212:1229.
23. Snell. G.D. 1981.
Studies in histocompatibility. Science 213:172.
24. Vitetta. E., J.D. Capra. 1978.
The protein products of the murine 17th chromosome: genetics and structure. Adv. Immunol. 26:147(193).
25. Old, L.J., E.A. Stockert. 1963.
Antigenic properties of experimental leukemias. I. Serological studies in vitro with spontaneous and radiation-induced leukemias. J. Natl. Cancer Inst. 31:977.
26. Vitetta, E., E.W. Uhr., E.A. Boyse. 1972.
Isolation and characterization of H-2 and TL alloantigens from the surface of mouse lymphocytes. Cell Immunol. 4:187.
27. Anundi, H., L. Rask., L. Ostberg., P.A. Peterson. 1975.
The subunit structure of thymus leukemia antigens. Biochemistry. 14:5046.
28. Michaelson, J., L. Flaherty., E. Vitetta., and M.D. Poulik. 1977.
Molecular similarities between Qa-2 alloantigens and other gene products of the 17th chromosome of the mouse. J. Exp. Med. 145:1066.
29. Flaherty, L. 1981.
Ila antigens. In: The Role of the Major Histocompatibility Complex in Immunobiology. Martin E. Dorf (Ed). Garland STPM Press, New York, page 33.

Referencias (continuación)

30. Michaelson, J. 1981. Genetic polymorph of β 2-microglobulin (β_{2m}) maps to the H-3 region of chromosome 2. Immunogenetics 13:167.
31. Nathenson. S.G., H. Uehara., B.M. Ewestein. 1981. Primary structural analysis of the transplantation antigens of the murine H-2 major histocompatibility complex. Ann. Rev. Biochem. 50:1025.
32. Klein, J. 1979. The major histocompatibility complex of the mouse Science 203:516.
33. Bodmer, W.F. 1973. A new genetic model for allelism at histocompatibility and other complex loci: polymorphism for control of gene expression. Transpl. Proc. 5:1471.
34. Silver, J., L. Hood. 1976. Preliminary aminoacid sequences of transplantation antigens: genetic and evolutionary implications. In: Contemporary Topics in Molecular Immunology. H.N. Eisen and R.A. Reisfeld (Eds). New York Plenum Publishing Corp; page 35.
35. Parmiani, G., G. Carbone., G. Invernizzi., M.A. Pieritti., M.L. Sensi., M.J. Rogers., E. Apella. 1979. Alien histocompatibility antigens on tumor cells. Immunogenetics 9:1.
36. Gorer, P.A. 1937. Further studies on antigenic differences in mouse erythrocytes. Br. J. Exp. Pathol. 18:31.
37. Alter, B.J., D.J. Schendel., M.L. Bach., F.H. Bach., J. Klein., J.H. Stimpfling. 1973. Cell mediated lympholysis: Importance of serologically defined H-2 regions. J. Exp. Med. 137:1303.
38. Klein, J., M.B. Widmer., M. Segall., F.H. Bach. 1972. Mixed lymphocyte culture reactivity and H-2 histocompatibility loci differences. Cell. Immunol. 4:442.

Referencias (continuación)

39. Klein, J., J.M. Park. 1973.
Graft versus host reactions across different regions of the H-2 complex of the mouse. *J. Exp. Med.* 137: 1213.
40. Zinkernagel, R.M., P.Doherty. 1974.
Immunological surveillance against altered self components of sensitized T lymphocytic choriomeningitis. *Nature (London)* 251:547.
41. Dorf, M.E. 1981.
Genetic control of immune responsiveness. In: The Role of the Major Histocompatibility complex in Immunobiology. Dorf, M.E. (Ed). Garland STPM Press, New York, page 221.
42. Benacerraf, B., R.N. Germain. 1978.
The immune response genes of the major histocompatibility complex. *Immunol. Rev.* 38:70.
43. Mc Devitt, H.O., A. Chinitz. 1969.
Genetic control of antibody response: relationship between immune response and histocompatibility (H-2) type. *Science* 163:1207.
44. Mc Devitt, H.O., B.D. Deak., D.C. Shreffler., J. Klein., J.H. Stimpfling., G.D. Snell 1972.
Genetic control of the immune response. Mapping of the Ir-1 locus. *J. Exp. Med.* 135:1259.
45. Shreffler, D.C., C.S. David. 1974.
The H-2 major histocompatibility complex and the I immune response region: genetic variation, function and organization. *Adv. Immunol.* 20:125.
46. Hamerling, G.J., G. Mauve., E. Goldberg., H.O. Mc. Devitt. 1975.
Tissue distribution of Ia antigens: Ia on spermatozoa, macrophages and epidermal cells. *Immunogenetics* 1:428.
47. Cullen, S.E., J.H. Freed., S.G. Nathenson. 1976.
Structural and serological properties of murine Ia alloantigens. *Transpl. Rev.* 30:236.

Referencias (continuación)

48. Jones, P.P., D.B. Murphy., H.O. Mc Devitt. 1978.
Two gene control of a murine Ia antigen. *J. Exp. Med.* 148:925.
49. Schwartz, R.H., C.S. David., M.E. Dorf., B. Benacerraf., W.E Paul. 1978.
Inhibition of the dual *Ir* gene-controlled T-lymphocyte proliferative response to poly (glu⁵⁶Lys³⁵ Phe⁹) with anti-Ia antisera directed against either the IA or IC subregion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75: 2387.
50. Shreffler, D.C., R.D. Owens., 1963.
A serologically detected variant in mouse serum: Inheritance and association with the histocompatibility 2 locus. *Genetics* 48:9.
51. Shreffler, D.C. 1964.
A serologically detected variant in mouse serum. Further evidence for genetic control by the histocompatibility-2 locus. *Genetics* 43:973.
52. Shreffler, D.C. 1965.
The Ss system of the mouse: A quantitative serum protein difference genetically controlled by the H-2 regions. In: Isoantigens and Cell Interactions. Palm. J. (Ed). Wistar Institute Press. Philadelphia. page 11.
53. Shreffler, C.C., 1970.
Immunogenetics of the mouse H-2 system. In: Blood and Tissue Antigens. Aminoff. D. (Ed). Academic Press. New York, page 85.
54. Shreffler, D.C. 1971.
Studies on genetic fine structure of the H-2 region. In: Immunogenetics of the H-2 Systems. Lengerová A., M. Voj tiskova (Eds). Karger Basel, page 138.
55. Saunders, D., M. Edidin, 1974.
Sites of localization and synthesis of the Ss protein in mice. *J. Immunol.* 112:2210.
56. Shreffler, D.C., H.C. Passmore. 1971.
Genetics of the H-2 associated Ss-Slp trait. In: Immunogenetics of the H-2 system. Lengerová. A., M. Voj tiskova (Eds). Karger-Basel, page 58.

Referencias (continuación)

57. Capra, D., E.Vitteta., J. Klein. 1975.
Studies on the murine Ss protein. I. Purification,
molecular weight, and sub-unit structure. *J.Exp. Med.*
142:664.
58. Fu, S.M., H.G. Kunkel., H.P. Brusman., F.H. Allen.,
M. Fotino. 1974.
Evidence for linkage between HLA histocompatibility
genes and those involved in the synthesis of the
second component of complement. *J. Exp. Med.*
140:1108.
59. Démant, P., J. Capková., E. Hinzova., B. Yorácová.
1973.
The role of histocompatibility-2 linked Ss-Slp region
in the control of mouse complement. *Proc. Natl.*
Acad. Sci. U.S.A. 70:863
60. Meo, T., T. Krasteff., D.C. Shreffler. 1975.
Immunochemical characterization of murine H-2
controlled Ss (serum substance) protein through iden-
tification of its human homologue as the fourth com-
ponent of complement. *Proc. Natl. Acad. Sci.*
72:4536.
61. Curman, B., L. Ostberg., L. Sandberg.,
I.Malmheden-Eriksson., G. Stalenheim., L. Rask., P.A.
Peterson. 1975.
H-2 linked Ss protein is C4 component of complement.
Nature 258:242.
62. Lachmann. P.J., D. Grennan., A. Martín., P. Démant.
1975.
Identification of Ss protein as murine C4. *Nature*
258: 242.
63. Goldman, J.N., K.R. Gleason., M. Goldman. 1978.
Immunochemical properties of the murine Ss protein.
J. Immunol. 120:225.
64. Goldman, M.B., J.N.Goldman. 1976.
Relationship of functional levels of early components
of complement to the H-2 complex of mice. *J. Immu-
nol.* 117:1584.

Referencias (continuación)

65. Goldman, M.B., S. Bangalore., J.N. Goldman 1978. Functional and biochemical properties of the early classical complement system of mice. *J. Immunol.* 120:216.
66. Passmore, H.C., D.C. Shreffler. 1970. A sex-limited serum protein variant in the mouse: Inheritance and association with the H-2 region. *Biochem. Genet.* 4:351.
67. Passmore, H.C., D.C. Shreffler. 1971. A sex-limited protein variant in the mouse: Hormonal control of phenotypic expression. *Bioch. Genetics* 5:201.
68. Klein, J. 1975. A case of no sex limitation of Slp in the murine H-2 complex. *Immunogenetics* 2:297.
69. Hansen, T.H., D.C. Shreffler. 1976. Characterization of a constitutive variant of the murine serum protein allotype Slp. *J. Immunol.* 117:1507.
70. Hoecker, G., O. Pizarro., A. Ramos. 1959. Some new antigens and histocompatibility factors in the mouse. *Transpl. Bull.* 6:407.
71. David, C.S., J.H. Stimpfling., D.C. Schreffler. 1975. Identification of specificity H-2.7 as an erythrocyte antigen: Control by an independent locus H-2G, between S and D regions. *Immunogenetics* 2:131.
72. Klein, J., V. Hauptfeld., M. Hauptfeld. 1975. Evidence for a fifth region (G) in the H-2 complex of the mouse. *Immunogenetics* 2:241.
73. Huang, C.M., J. Klein. 1979. Murine erythrocyte antigen H-2.7. Its genetics, tissue expression and strain distribution. *Immunogenetics* 9:233.
74. O'Neill., G.J. Iang., J. Tegoli., R. Berger., B. Dupont. 1978. Chido and Rodgers blood groups are distinct antigenic components of human complement C4. *Nature (London)* 273:668.

Referencias (continuación)

75. Tilley, C.A., D.G. Romans., M.C. Crookston. 1978.
Localization of Chido and Rodgers determinants to the C4d fragment of human C4. *Nature (London)* 276:713.
76. Stimpfling, J.H., O. Pizarro. 1961.
On the antigenic products of the H-2^m allele in the laboratory mouse. *Transplant. Bull.* 28:102.
77. Démant, P., G.D. Snell., M. Hess., F. Lemmonier., C. Neauport-Sautes., F. Kuorilsky. 1975.
Separate and polymorphic genes controlling two types of polypeptide chains bearing H-2 private and public specificities. *Immunogenetics* 2:263.
78. Lemmonier, F., C. Neauport-Sautes., F.M. Kourilsky., P. Démant. 1975.
Relationship between private and public H-2 specificities on the cell surface. *Immunogenetics* 2:517.
79. Neauport-Sautes, C., D. Morello., J.H. Freed., S.G. Nathanson., P. Démant. 1977.
The private specificity H-2.7 and the public specificity H-2.8 of the D region are expressed on two independent polypeptide chains. *Eur. J. Immunol.* 8:511.
80. Hansen, T.H., S.E. Cullen., D.H. Sachs. 1977.
Immunochemical evidence for an additional H-2 region closely linked to H-2D. *J. Exp. Med.* 145:438.
81. Neauport-Sautes, C., M. Joskowicz., P. Demant. 1978.
Further evidence for two separate loci (H-2D and H-2L) in the D region of the H-2 complex. *Immunogenetics* 6:513.
82. Démant, P., C. Neauport-Sautes. 1978.
The H-2L locus and the system of H-2 specificities. *Immunogenetics* 7:295.
83. Sears, S.W., C.M. Polizzi. 1979.
Biochemical evidence for a separate MHC-linked locus encoding H-2.28 antigens. *Immunogenetics*. 10:67.
84. Melvod, R.W., H.I. Kohn. 1976.
Eight new histocompatibility mutations associated with the H-2 complex. *Immunogenetics* 3:185.

Referencias (continuación)

85. Mc Kenzie, I.F.C., G. M. Morgan., R.W. Melvod., H.I. Kohn. 1977.
BALB/c-H-2^{db}. A new mutant in BALB/c-Kk that identifies a locus associated with the D region. Immunogenetics 4:333.
86. Blanden, R.Y., U. Kees. 1978.
Cytotoxic T-cell responses show more restricted specificity for self than for non-self H-2D coded antigens. J. Exp. Med. 147:1661.
87. Hansen. T.H., R.B. Levy. 1978.
Alloantigens determined by a second D region locus elicit a strong in vitro cytotoxic response. J. Immunol. 120:1836.
88. Blanden, R.V., I.F.C. Mc Kenzie., R.W. Melvod., H.I. Kohn. 1977.
Cytotoxic T-cell response to ectromelia virus-infected cells. J. Exp. Med. 146:869.
89. Ozato, K., T.H. Hansen., D.H. Sachs. 1980.
Monoclonal antibodies to mouse MHC antigens. II. Antibodies to H-2^d antigens, the product of a third polymorphic locus of the mouse major histocompatibility complex. J. Immunol. 125: 2473.
90. Vitetta, E.S., J.W. Uhr., E.A. Boyse. 1975.
Association of a 2-microglobulin-like subunit with H-2 and TL alloantigens on murine thymocytes. J. Immunol. 114:252.
91. Ostborg, L., L. Rask., H. Wigzell., P.A. Peterson. 1975.
Thymus leukemia antigen contains 2-microglobulin. Nature (London) 253:735.
92. Solosky, M.J., J.W. Uhr., K. Flaherty., E.S.Vitetta. 1981.
Qa-2, H-2K and H-2D alloantigens evolved from a common ancestral gene. J. Exp. Med. 153:1080.
93. Da Silva, F.P., G.F. Hoecker., N.K. Day., K. Vienne., P. Rubinstein. 1978.
Murine complement component 3: genetic variation and linkage to H-2. Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 75:963.

Referencias (continuación).

94. Natsuume-Sakai, S., J.I. Hayakawa., M. Takakashi. 1978.
Genetic polymorphism of murine C3 controlled by a single co-dominant locus on chromosome 17. *J. Immunol.* 121:491.
95. Rubinstein, P., K.Vienne., G. Hoecker. 1979.
The location of the C3 and GLO (glyoxalase 1) loci of the IXth linkage group in mice. *J. Immunol.* 122:2584.
96. Natsuume-Sakai, S., S. Amano., S. Hayakawa., M. Takahashi. 1978.
Preparation of an alloantiserum to murine C3 and demonstration of multiple alleles. I. *Immunol.* 121:2025.
97. Ferreira, A., V. Nussenzweig. 1975.
Genetic linkage between the control of serum levels of the third component of complement and the H-2 complex. *J. Exp. Med.* 141:513.
98. Ferreira, A., V. Nussenzweig. 1976.
Control of C3 levels in mice during ontogeny by a gene in the central region of the H-2 complex. *Nature (London)* 260:613.
99. Gelfand, M.C., G.J. Effenbein., M.M. Frak., W. Paul. 1974.
Ontogeny of B lymphocytes. II. Relative rates of appearance of lymphocytes bearing surface immunoglobulin and complement receptors. *J. Exp. Med.* 139:1125.
100. Gelfand, M.C., D.H. Sachs., R. Liebermann., W. Paul. 1974.
Ontogeny of B lymphocytes III. H-2 linkage of a gene controlling the rate of appearance of complement receptor lymphocytes. *J. Exp. Med.* 139:1142.
101. Arnaiz-Villena, A., H. Festenstein. 1976.
4a(W4) and 4b(W6) human histocompatibility antigens are specifically associated with complement receptors. *Nature.* 258:732.

Referencias (continuación)

102. Ferreira, A., V. Nussenzweig. 1976.
Influence of H-2 on the ontogenesis of a spleen cell population which lacks C3 receptors and the Thy-1 antigen. *J. immunol.* 117:771.
103. Ferreira, A., M. Fotino., V. Nussenzweig. 1976.
Relationship between 4a and 4b HLA-determined specificities and C3 receptors on leukocyte membranes. *Eur. J. Immunol.* 6:832.
104. Meo. T., T. Douglas., A.M. Rijnbeek. 1977.
Glyoxylase I polymorphism in the mouse: A new genetic marker linked to H-2. *Science* 198:311.
105. VandeBerg, J.L., S.X. Blohm. 1977.
An allelic isozyme of mouse Pgk-2 with low activity. *J. Exp. Zool.* 201: 479.
106. Eicher, E.M., C. Cherry., L. Flaherty. 1978.
Autosomal phosphoglycerate kinase linked to mouse major histocompatibility complex. *Mol. Gen. Genet.* 158:225.
107. VandeBerg, J.L., J. Klein. 1978.
Localization of mouse Pgk-2 gene at the D end of the H-2 complex. *J. Exp. Zool.* 203:319.
108. Hoffman, H.A., C.K. Grieshaber. 1976.
Genetic studies of murine catalasa: Regulation of multiple molecular forms of kidney catalase. *Biochem. Genet.* 14:59.
109. Lalley, P.A., T.B. Shous. 1977.
Lysosomal acid phosphatase deficiency: Liver specific variant in the mouse. *Genetics* 87:305.
110. Womack, J.E., E.M. Eicher. 1977.
Liver-specific lysosomal acid phosphatase deficiency (Ap1) on mouse chromosome 17. *Mol. Gen. Genet.* 155:315.
111. Dizik, M., R.W. Elliot. 1977.
A gene apparently determining the extent of syalation of lysosomal -mannosidase in mouse liver. *Biochem. Genet.* 15:13.

Referencias (continuación)

112. Dizik, M., R.W. Elliot. 1978.
A second gene affecting the sylation of lysosomal
-mannosidase in mouse liver. *Biochem. Genet.*
16:247.
113. Gruneberg, H. 1952.
In. The Genetics of the Mouse. 2nd Ed. Nijhoff, The
Hague.
114. Dunn, L.C., D. Bennett., A.B. Beasley. 1962.
Mutation and recombination in the vicinity of a
complex gene. *Genetics* 47:285.
115. Dunn, L.C. 1964.
Abnormalities associated with a chromosome region in
the mouse. *Science* 144:260.
116. Bennett, D. 1964.
Embryological effects of lethal alleles in the t
region. *Science* 144:263.
117. Gluecksohn-Waelsch, S., R.P. Erickson 1970.
The T locus of the mouse: Implications for mechanisms
of development. *Curr. Topics Devel. Biol.* 5:218.
118. Bennet, D. 1975.
The T locus of the mouse. *Cell* 6:441.
119. Dunn, L.C., E. Caspari. 1975.
A case of neighboring loci with similar effects.
Genetics 30:543.
120. Lyon, M.F., R.J.S. Phillips. 1959.
Crossing-over in mice heterozygous for t-alleles.
Heredity 13:33.
121. Reid, K.B.M., R.R. Porter. 1981.
The proteolytic activation systems of complement.
Ann. Rev. Biochem. 50:433.
122. Muller-Eberhard, H.J. 1978.
Complement: Molecular mechanisms, regulation and
biologic function. In. Molecular Basis of Biological
Degradative Processes. Berliner, R.D., H. Hermann.,
I.H. Lepow., J.M. Tanzer. (Eds). New York, Academic
Press, page 65.

Referencias (continuación)

123. Porter, R.R., K.B.M. Reid. 1979.
Activation of the complement system by antibody-antigen complex: the classical pathway. *Adv. Prot. Chem.* 33:1.
124. Lachmann, P.J. 1979.
Complement. In. *The Antigens*. M. Sela. M. (Ed). New York Academic Press, 5:283.
125. Kolb, D.P., L.M. Kolb., E.R. Podack. 1979.
Clq: Isolation from human serum in high yield by affinity chromatography and development of a highly sensitive hemolytic assay. *J. Immunol.* 122:2103.
126. Shinkai, H., K., Yonemasu. 1979.
Hidroxylysine-linked glycosides of human subcomponent Clq and various collagens. *Biochem. J.* 177:847.
127. Lepow. I.H., G.B. Naff., E.W. Todd., J. Pensky., C.F. Hinz. 1963.
Chromatographic resolution of the first component of human complement into three activities. *J. Exp. Med.* 117:983.
128. Kerr, M.A. 1979.
Limited proteolysis of complement components C2 and factor B. *Biochem. J.* 183:615.
129. Cooper, N.R. 1975.
Enzymatic activity of the second component of complement. *Biochemistry* 14:4245.
130. Schreiber, R.D., H.J. Muller-Eberhard. 1974.
Fourth component of human complement: description of a three polypeptide chain structure. *J. Exp. Med.* 140:1324.
131. Gigli, I., I.von Zabern., R.R. Porter. 1977.
The isolation and structure of C4, the fourth component of human complement. *Biochem. J.* 165:439.
132. Hobart, M.J. P.J Lachmann. 1976.
Allotypes of complement components in man. *Transpl. Rev.* 32:26.

Referencias (continuación)

133. Hall, R.E., H.R. Colten. 1977.
Cell free synthesis of the fourth component of guinea pig complement (C4): Identification of a precursor of serum C4 (pro C4). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74:1707.
134. Gorski, J.P., H.J. Muller-Eberhard. 1978.
Single chain C4 from human plasma. J. Immunol. 120:1775.
135. Gigli, I. 1978.
A single chain precursor of C4 in human serum. Nature 272:836.
136. Abraham, G.N., G.G. Goldberger., H.R. Colten., J. Williams. 1980.
Primary structure of the precursor of the fourth component (C4) of guinea pig complement. Fed. Proc. 39:1201.
137. Goldberger, G., H.R. Colten. 1980.
Precursor complement protein (pro-C4) is converted in vitro to native C4 by plasmin. Nature 286:514.
138. Budzko, D.B., H.J. Muller-Eberhard. 1970.
Cleavage of the fourth component of human complement (C4) by C1 esterase: isolation and characterization of the low molecular weight product. Immunochemistry 7:227.
139. Campbell, R.D., A.W. Dodds., A.W. Porter. 1980.
The binding of human complement component C4 to antibody-antigen aggregates. Biochem. J. 189:67.
140. Tack, B.F., S.C. Morris., J.W. Prah1. 1979. Fifth component of human complement. Purification from plasma and polypeptide chain structure. Biochemistry 18:1490.
141. Hugli, T.E., H.J. Muller-Eberhard. 1978.
Anaphylotoxins: C3a and C5a. Adv. Immunol. 26:1.
142. Brade, V., R.E. Hall., H.R. Colten. 1977.
Biosynthesis of pro-C3, a precursor of the third component of complement. J. Exp. Med. 146:759.

Referencias (continuación)

143. Cooper, N.R., H.J. Muller-Eberhard. 1970. The reaction mechanism of human C5 in immune hemolysis. *J. Exp. Med.* 132:775.
144. Law, S.K., R.P. Levine. 1977. Interaction between the third complement protein and cell surface molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74:2701.
145. Law, S.K., N.A. Lichtenberg., R.P. Levine. 1980. Interaction of the labile binding sites of C4b and C5b with sheep erythrocyte membrane. *J. Immunol.* 124:1428.
- 146.. Muller-Eberhard, H.J., R. Schreiber. 1980. Molecular biology and chemistry of the alternative pathway of complement. *Adv. Immunol.* 29:1.
147. Sandberg, A.L., B. Oliveira., A.G. Osler. 1971. Two complement interaction sites in guinea pig immunoglobulins. *J. Immunol.* 106:282.
148. Passmore, H.C., K.W. Biesel. 1977. Preparation of antisera for the detection of the Ss protein and the S1p alloantigen. *Immunogenetics.* 4:393.
149. Ferreira, A., V. Nussenzweig. 1979. Murine fourth component of complement: Three step purification of its C4c fragment and production of a monospecific antiserum. *J. Immunol.* 122:490.
150. Ferreira, A., V. Nussenzweig., I. Gigli. 1978. Structural and functional differences between the H-2 controlled Ss and S1p proteins. *J. Exp. Med.* 148:1186
151. Ferreira, A., M. Takahashi., V. Nussenzweig. 1977. Purification and characterization of a mouse serum protein with specific binding affinity for C4 (Ss protein). *J. Exp. Med.* 146:1001.
152. Ferreira, A., P. Weiz-Carrington., V. Nussenzweig. 1978. Testosterone control of serum levels of C4-binding protein in mice. *J. Immunol.* 121:1213.

Referencias (continuación)

153. Kohler, G., C. Milstein. 1975.
Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature (London)* 256:495.
154. Pontecorvo, G. 1975.
Production of mammalian somatic cell hybrids by means of polyethylene glycol treatment. *Somatic Cell. Genet* 1:397.
155. Potocnjak, P., N. Yoshida., R.S. Nussenzweig., V. Nussenzweig. 1980.
----- Monovalent fragments (Fab) of monoclonal antibodies to sporozoite surface antigen (Pb44) protect mice against malarial infection. *J. Exp. Med.* 151:1504.
156. Cinader, B., M.D. Dubisky., C. Wardlaw. 1964.
Distribution, inheritance and properties of an antigen MuBi and its relationship to hemolytic complement. *J. Exp. Med.* 120: 897.
157. Muller-Eberhard., H.J. 1960.
A new supporting medium for preparative electrophoresis. *Scand. J. Chem. Invest.* 12:23.
158. Hunter, W.M., F.C. Greenwood. 1962.
Preparation of Iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature (London)* 194:495.
159. Kassler, S.W. 1975.
Rapid isolation of antigens from cells with staphylococcal protein A-antibody absorbent: parameters of interaction of antigen antibody complexes with protein A. *J. Immunol.* 115:1617.
160. Laemmli, J.K. 1970.
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 227:680.
161. O'Farrell, P.H. 1975.
High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250:4007.

Referencias (continuación)

162. Ferreira, A., D. Eichinger. 1981.
A simplified two-dimensional electrophoretic technique. *J. Immunol. Methods.* 43:291.
163. Weeke, B. 1973.
Rocket immunoelectrophoresis. In: A Manual of Quantitative Immunoelectrophoresis. Axelsen N.H., J.Krol., B. Weeke (eds) Universitetforlaget. Oslo, page 36.
164. Weeke, B., 1973.
Crossed immunoelectrophoresis. In: A Manual of Quantitative Immunoelectrophoresis. Axelsen, N.H., J.Krol., B. Weeke (Eds) Universiterforlaget. Oslo, page 47.
165. Gigli, I., R.R. Porter., R.B. Sim. 1976.
The unactivated form of the first component of human complement C1. *Biochem. J.* 157:541.
166. Stimpfling, J.H. 1961.
The use of PVP as a developing agent in mouse hemagglutination tests. *Transpl. Bull.* 27:109.
167. Uotila, M., E.Ruoslahti., E. Engvall. 1981.
Two-site sandwich enzyme immunoassay with monoclonal antibodies to human alpha-fetoprotein. *J. Immunol. Meth.* 42:11.
168. Ferreira, A., J. Michaelson., V. Nussenzweig. 1980.
A polymorphysm of the chain of mouse C4 controlled by the S region of the major histocompatibilty complex. *J. Immunol.* 125:1178.
169. Shreffler, D.C. 1976.
The S region of the mouse major histocompatibility compTex (H-2): Genetic variation and functional role in the complement system. *Transpl. Rev.* 32:146.
- 170.a Klein, J., L. Flaherty., J.L. Von de Berg., D.C. Schreffler. 1978.
H-2 haplotypes, genes, regions and antigens: firat Tisting. *Immunogenetics* 6:489.
- 170.b Ferreira, A., J. Michaelson., V. Nussenzweig. 1980.
H-2 controlled polymorphism of the chain of S1p (Sex-limited protein). *Immunogenetics* 11:491.

Referencias (continuación)

171. Ferreira, A., C.S. David., V. Nussenzweig. 1980. The murine H-2.7 specificity is an antigenic determinant of C4d, a fragment of the fourth component of the complement systems. *J. Exp. Med.* 151:1424.
172. Chu, V., J. Sorvillo., I. Gigli. 1980. Structural characterization of C4 fragments on human erythrocytes. *J. Immunol.* 124:1516.
173. Huang, C.M., R.W. Geib., J.K. Klein. 1979. Murine antigen H-2.7 phenotypic conversion of erythrocytes in radiation chimeras. *Immunogenetics* 9:583.
174. Michaelson., J., A Ferreira., V. Nussenzweig. 1981. *Cis* interacting genes in the *S* region of the major histocompatibility complex. *Nature* 289:306
175. Ferreira, A., D. Eichinger., V. Nussenzweig 1982. The H-2 controlled Slp: reassessment of its sex limitation. Submitted for publication.
176. Parker, K.L., M.H. Roos., D.C. Schreffler. 1979. Structural characterization of the murine fourth component of complement and sex-limited proteins: evidence for two loci in the *S* region of the *H-2* complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76:5863.
177. Sjöhlman, S.G., A.B. Laurell. 1973. Conversion of the fourth component of the complement system studied by crossed immunoelectrophoresis. *Clin. Exp. Immunol.* 14:515.
178. Polley, M.J., H.J. Muller-Eberhard. 1966. The effect of iodine on the hemolytic activity of the second component of human complement. *Immunochemistry* 3:501
179. Koethe, S.M., K.F. Austen., I. Gigli. 1971. Differentiation of binding from complete activation by use of heterologous components of complement. *J. Immunol.* 108:1063.
180. Wakeland, E.K., J. Klein. 1979. The histocompatibility-2 system in wild mice. VII. Serological analysis of 29 wild derived *H-2* haplotypes using antisera to inbred *J*-region antigens. *Immunogenetics.* 8:27

Referencias (continuación)

181. Hansen, T.H. 1975.
Studies of regulatory and functional aspects of the Ss serum protein systems in the mouse. PhD thesis. University of Michigan. Ann. Harbor U.S.A.
182. Shreffler, D.C. 1976.
The S region of the mouse major histocompatibility complex (H-2): Genetic variation and in the complement system. *Transplantation. Rev.* 32:140.
183. Patel, F., T. Irizawa., J.O. Minta. 1979.
Subcellular localization of mRNA coding C3,C4 and C5. *Fed. Proc.* 38:1011.
184. Huang, C.M., R.W. Geib., J. Klein. 1979.
Murine antigen H-2.7: phenotypic conversion of erythrocytes in radiation chimeras. *Immunogenetics.* 9:583.
185. Huang, C.M., O.J. Klein 1979.
Murine antigen H-2.7: in vitro conversion of erythrocytes. *Immunogenetics.* 9:575.
186. Fujita, T., S. Kai., I. Gigli., V. Nussenzweig. 1980.
Isolation and characterization of mouse C4b inactivator. *J. Immunol.* 124:1520.
187. Passmore, H.C. 1982.
An erythrocyte and serum antigen with specificity antithetical to mouse C4 associated H-2.7 antigen. *J. Immunol.* In press.
188. Rosenfeld, S.I., S. Ruddy., K.F. Austen. 1969.
Structural polymorphism of the fourth component of human complement. *J. Clin. Invest.* 48:2283.
189. O'Neill, G.J., S.V. Iang., B. Dupont. 1978.
Two HLA-linked loci controlling the fourth component of human complement. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75:5165.
190. Awdeh, Z.L., D. Raum., C. Alper. 1981.
Genetic polymorphism of human complement C4 and detection of heterozygotes. *Nature.* 282:205.

Referencias (continuación)

191. Awdeh, S. L., C. Alper. 1980.
Inherited structural polymorphism of the fourth component of human complement (C4). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77:3676.
192. Ramos, A., M. Gajardo., G. Hoecker. 1981.
Gh. un antígeno sanguíneo y del suero, ligado a H-2 del ratón. Arch. Biol. Med. Exp. 14: 79.
193. Ramos, A., F. Zavala. 1982.
Gh, a new public antigen. Mouse News Letter 66:50.
194. Ogata, T., T. Matahasi. 1962.
Problems of specificity and cross reactivity of blood group antibodies. Proc. 8th Congr. Int. Blood Transfer. Tokyo. 1960.
Karger, Basel, New York, 208.
195. Allen. F.H., P.D. Issitt., T.J. Degnan., V.A. Jackson., J.K. Reihart., R.J. Knowlin., M.E. Adebahr. 1969.
Further observation on the Matuhasi-Ogata phenomenon. Vox Sanguinis. 96:47.
196. Brown, L.J., D.C. Shreffler. 1980.
Female expression of the H-2 linked sex limited protein (Slp) due to non-H-2 genes. Immunogenetics. 10:19.
197. Ohno, S., M. Lyon. 1970.
X-linked testicular feminization in the mouse as a non-inductible regulatory mutation of the Jacob-Monod type. Clin. Genet. 1:121.
198. Gehring, V., G.M. Tompkins and S. Ohno. 1971.
Effect of the androgen-insensitivity mutation on a cytoplasmic receptor for dihydrotestosterone. Nature New Biol. 232:106.
199. Weintraub, R.M., W.H. Churchill., C. Crisler., H.J. Rapp., T. Borsos. 1966.
Mouse complement: Influence of sex hormones on its activity. Science 152:783.

Referencias (continuación)

200. Churchill, W.H., R.M. Weintraub., T. Borsos., H.J. Ropp. 1967.
Mouse complement: The effect of sex hormones and castration on two of the late acting components. *J. Exp. Med.* 125:657.
201. Hansen, T.H., T.N. Krasteff., D.C. Shreffler. 1974.
Quantitative variations in the expression of the mouse antigens Ss and its sex-limited allotype Slp. *Biochem. Genet.* 12:281.
202. Jacob, F., J. Monod. 1961.
Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.* 3:318.
203. Lee, F., R. Mulligan., P. Berg., G. Ringold 1981.
Glucocorticoids regulate expression of dihydrofolate reductase cDNA in mouse mammary tumour virus chimeric plasmids. *Nature.* 294: 228.
204. Whitehead, A.S., E. Solomon., S.P. Chambers., S. Povey., W.F. Bodmer. 1982.
Assignment of a gene for the third component of human complement (C3) to chromosome 19 using human-mouse somatic cell hybrids IXth International complement Workshop. November 22-25, 1981.
205. Sharfstein, J., A. Ferreira., I. Gigli., V. Nussenzweig. 1977.
C4-binding protein. I. Isolation and characterization. *J. Exp. Med.* 148: 207.
206. Fujita, T., I. Gigli., V. Nussenzweig. 1978.
Human C4-binding protein II. Role in proteolysis of C4b by C3b-inactivator. *J. Exp. Med.* 148:1044.
207. Fujita, T., V. Nussenzweig. 1979.
The role of C4-binding protein and B1H. in proteolysis of C4b and C3b. *J. Exp. Med.* 150:267.
208. Kaidoh, T., S. Natsuume-Sakai., M. Takahashi. 1981
Murine binding protein of the fourth component of complement: Structural polymorphism and its linkage to the major histocompatibility complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:3794.

Referencias (continuación)

209. Roos, M.H., P. Demant. 1982.
Murine complement factor B (BF): Sexual dimorphism and H-2 linked polymorphism. *Immunogenetics*. 15:23.
210. Mc Millan, M., J.M. Cecka., K. Hood., D.B. Murphy., H.O. Mc Devit. 1979.
Peptide map analysis of murine Ia antigens of the IE subregion using HPLC. *Nature* 277:663.
211. Kimball, E.S., W.L. Maaloy., J.M. Martinko., S.G. Nathenson., J.E. Coligan. 1980.
Structural Studies on H-2^b and H-2^d molecules indicate that murine major histocompatibility b and d haplotype alloantigens share structural features. *Molec. Immunol.* 17:1283.
212. Solosky, M.J., J.W. Uhr., L. Flaherty., E.S. Vitetta.
Qa-2, H-2K and H-2D alloantigens evolved from a common ancestral gene. *J. Exp. Med.* 153:1080.
213. Fernández, H.N., T.E. Hugli. 1977.
Chemical evidence for common genetic ancestry of complement components C3 and C5. *J. Biol. Chem.* 252:1826.
214. Lachmann. P.J., M.J. Hobart. 1978.
Complement Genetics in relation to HLA. *British Med. Bull.* 34:247.
215. Halbwachs, L., P.J. Lachmann. 1976.
Factor B of the alternative complement pathway on human lymphocytes. *Scand. Immunol.* 5:697.
216. Ooi, Y.M., B.S. Ooi. 1982.
Biosynthesis of membrane factor B by mouse peritoneal macrophages. In press. *Nature*.
217. Ferrone, S., M.A. Pellegrino., N.R. Cooper. 1976.
Expression of C4 on human lymphoid cells and possible involvement in immune recognition phenomena. *Science (New York)* 193:53.
218. Steinmetz, M., A. Winoto., K. Minard., L. Hood. 1982.
Cluster of genes encoding mouse transplantation antigens. *Cell* 28:489.

Referencias (continuación)

219. Arzt, K., P.Mc Cormick., D.Bennett. 1982.
Gene mapping within the T/t complex of the mouse. I.
t-lethal genes are nonallelic. Cell 28:463.
220. Arzt, K., H.S. Shin., D. Bennett. 1982.
Gene mapping within within the T/t complex of the
mouse. II. Anomalous position of the H-2 complex
in t haplotypes. Cell 28:471.