

## SECUENCIAS ESPECÍFICAS PARA EL INTRÓN 2 DEL GENE DRB1: POSIBLE UTILIDAD EN LA TIPIFICACIÓN ALÉLICA PARA MOLÉCULAS DE CLASE II

Jorge Flavio Mendoza Rincón\*\*, Ann-Margaret Little\*, Jesús Rafael Argüello\*, José Alejandro Madrigal\*

### RESUMEN

Debido al gran polimorfismo del gene DRB1 de clase II del MHC que se encuentra específicamente codificado por el exón 2 y a que se comparten «motifs» incluso entre alelos de clase I, ha sido difícil tipificar los diferentes alelos para el gene DRB1 clase II. En el presente trabajo se ha evaluado una inserción/delección presente en el intrón 2 del gene DRB1 para conocer su utilidad para la tipificación de los diferentes alelos que codifica este gene. Los resultados obtenidos muestran que la región utilizada del intrón 2 es específica ya que permite reconocer a diferentes alelos para el gene DRB1. Esta estrategia puede ser utilizada para caracterizar las diferentes especificidades presentes en este gene.

**Palabras Clave:** secuencias, intrón, exón, gene, polimorfismo.

### ABSTRACT

The MHC class II molecules are codified for a polymorphic gene that is localized in human chromosome 6. Basically, the polymorphic region is present in exon 2. However, due to the polymorphism present in this region and to the motifs shared even with class I molecules, it has been difficult to characterize this region. Here, we showed that the insertion/deletion present in intron 2 lies between exon 2 and exon 3 of HLA class II DRB genes could be useful designing DRB1 specific primers and to allow us to characterize this polymorphic gene.

**Key Words:** sequences, intron, exon, gene, polymorphism.

FECHA DE RECEPCIÓN 15 DE DICIEMBRE DE 1997, FECHA DE ACEPTACIÓN 27 DE ENERO DE 1998.

### ANTECEDENTES

Los genes del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) codifican para moléculas que participan tanto para el reconocimiento inmune como para el rechazo de tejidos u órganos<sup>1</sup>. Las moléculas de clase II tienen un papel importante en la respuesta inmune al unir y presentar péptidos antigénicos a linfocitos T; generalmente se localizan en la superficie de células presentadoras como linfocitos B, macrófagos, células T y algunas otras células profesionales presentadoras de antígenos<sup>2,3</sup>. Aunque su función preponderante es el reconocimiento inmune algunas de estas moléculas han sido asociadas a ciertos padecimientos inmunológicos<sup>4,5</sup>. Asimismo, es conocido que la variabilidad genética de los loci donde se encuentran los genes del MHC es lo que origina su gran polimorfismo<sup>6</sup>. Para el caso de las moléculas de clase II la variabilidad a nivel del gene se encuentra presente exclusivamente en el exón 2<sup>7</sup>. Sin embargo, no es conocido si existe variabilidad a nivel de las secuencias no codificantes intrónes ya que solamente algunos de ellos han sido estudiados<sup>8</sup>. Recientemente, se ha propuesto

que estas regiones tienen una función importante ya que las secuencias para los intrónes 1, 3 y 5 se han utilizado para estudios filogenéticos<sup>8,9</sup>. Sin embargo, el intrón 2 que se encuentra adyacente a la región de mayor variabilidad genética no ha sido estudiada. En el presente trabajo se han generado secuencias específicas para el intrón 2 del gene DRB1 con la finalidad de determinar si existe variabilidad en esta región no codificante que pueda ser utilizada para la tipificación de este gen polimórfico.

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### CULTIVO CELULAR

La línea celular homocigótica Boleth (IHW 9031) de origen linfoblastoide transformada con el virus de Epstein-Bar fue descongelada a 37°C en un baño María. Posteriormente, el contenido del vial fue colocado gota a gota en un tubo cónico (Falcón, Denmark) conteniendo 15 ml de RPMI (Gibco, USA) al 10% con suero fetal de bovino (SFB) (Gibco). Se centrifugó a 1500 rpm durante 3 minutos y se desechó el sobrenadante realizándose 2 lavados más con las mismas condiciones. Las células fueron contadas y su viabilidad determinada usando azul de tripano (Sigma, USA). En una botella de cultivo de 80

\*\* AUTOR DE CORRESPONDENCIA: DR. JORGE FLAVIO MENDOZA RINCÓN, LABORATORIO DE ONCOLOGÍA, UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN DIFERENCIACIÓN CELULAR Y CÁNCER, FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA, UNAM.

\*THE ANTHONY NOLAN RESEARCH INSTITUTE, RESEARCH BUILDING, THE ROYAL FREE HOSPITAL, POND STREET, HAMPSTEAD, LONDON. NW3 2QT. UK.



cm<sup>2</sup> (Falcón) se colocaron  $1 \times 10^6$  células en RPMI al 10% en SFB. Después de 2 días de cultivo se volvieron a alimentar adicionado 20 ml de RPMI al 10% de SFB. Se mantuvo el cultivo hasta que la densidad celular fue de  $30 \times 10^6$  células para proceder a la extracción de DNA.

### EXTRACCIÓN DE DNA

El DNA de la línea celular Boleth fue extraído utilizando la técnica de salting out<sup>10</sup>. Brevemente, a  $30 \times 10^6$  células de la línea Boleth contenidas en un tubo cónico de 15 ml se le adicionó 3 ml de buffer de lisis resuspendiendo el contenido firmemente pero sin generar burbujas. Posteriormente, se agregó 120  $\mu$ l de Proteínasa K (Merck, Germany) agitándose manualmente de un lado a otro vigorosamente. Se incubó el contenido a 37°C toda la noche en un baño María. Transcurrido este tiempo se remueve la muestra del baño y se le adiciona 1 ml de NaCl 6 M (Sigma) agitándose vigorosamente por 1 minuto. Se centrifuga la mezcla por 20 minutos a 4500 rpm, se colecta el sobrenadante y se vierte en un tubo universal de 50 ml conteniendo 10 ml de Propan-2-ol (BDH laboratory, England). Se rotamanealmente el tubo universal hasta que el DNA aparece, se colecta el DNA utilizando una jeringa Pasteur sellada por la punta y se deja a temperatura ambiente hasta que no se percibe olor a alcohol. Posteriormente, el DNA se disuelve en 200  $\mu$ l de Buffer TE 1X (Bio-Whittaker, USA) en un tubo eppendorf y se coloca en rotador automático (Sandrest Ltd. England) hasta que todo el DNA se ha disuelto. Para conocer la concentración de DNA se hace la lectura a 260/280 nm y se preparan las alícuotas respectivas para tener una concentración final de 200 ng/ $\mu$ l.

### CONDICIONES PARA EL PCR

Fragmentos de DNA conteniendo el exón 2, el intrón 2 y el exón 3 del HLA DRB\*0104 fueron amplificados con primers específicos para dicho *locus*. Las amplificaciones por PCR fueron realizadas usando 200 ng/ml de DNA, 25 pmol de cada primer, 0.2 mM de dNTPs, 16 mM de Buffer (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub> y 0.5 unidades de Taq Polimerasa (Bioline Ltd, UK). Las amplificaciones fueron realizadas de la siguiente manera: desnaturalización a 95°C por 5 minutos. Posteriormente, 30 ciclos de 95°C por 1.30 minutos, 55°C por 1.30 minutos, 72°C por 2.30 minutos y finalmente un ciclo de 72°C por 8 minutos.

### RESULTADOS

#### ALINEAMIENTO Y SECUENCIACIÓN DEL INTRÓN 2 DEL GENE DRB\*0104.

En la figura 1 se encuentran alineadas las secuencias del intrón 2 de 4 secuencias obtenidas a través del archivo de datos Genbank. Como se puede observar también se incluyen las secuencias obtenidas de DR53, de un pseudogene (Null) y de DRB78. Se volvió a secuenciar el gene para DRB\*0104, obteniéndose algunos errores en la región del intrón 2 (una deleción para «C» en la posición 49 de la reportada en la original). La secuencia del intrón 2 corregida fue alineada con la de los otros alelos. La similitud con la secuencia de DRB\*0104 está representada por una línea horizontal (-). Las interrupciones

introducidas para optimizar el alineamiento están indicadas por un punto (.)

#### ESTRATEGIA Y GENERACIÓN DE LOS PRIMERS PARA EL INTRÓN 2 DE DRB\*0104

Teniendo en cuenta que el intrón 2 de las moléculas para clase II es más largo que su contraparte para moléculas de clase I y que se encuentra adyacente al exón 2 que es bastante polimórfico, se decidió utilizar esta propiedad para diseñar un primer que cubriera los nucleótidos 260 a 280 que representan una inserción/deleción en el intrón 2 del gene DRB1 (Fig. 1). De esta manera, se esperaba que pudiéramos cubrir todos los alelos conocidos para DRB1 (hasta la fecha se han reportado alrededor de 180 alelos)<sup>11</sup>. En la figura 2 está representada la estrategia seguida para cubrir la inserción/deleción ya indicada que pueda utilizarse para cubrir todos los alelos hasta ahora descritos para DRB1.

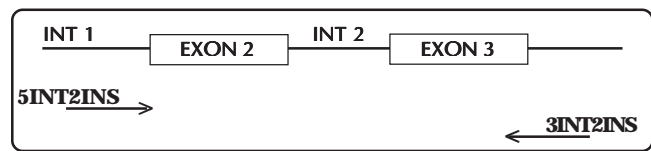


Figura 2. Representación esquemática de la amplificación específica para el gene DRB1 usando el primer 3'INT2INS para amplificar el intrón 2 y el exón 2 de manera simultánea.

#### EL PRIMER PARA EL INTRÓN 2 DEL GENE DRB1 (INT2INS) GENERA PRODUCTOS ESPECÍFICOS DE PCR

Al realizar los ensayos utilizando la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) para determinar si la secuencia diseñada para cubrir el intrón 2 del gene DRB1 producía productos específicos después de realizar la amplificación de PCR, el INT2INS fue utilizado en líneas celulares con diferentes alelos para DRB1 encontrándose una generación del amplicón específica y abundante (Fig. 3).



Figura 3. Amplificaciones de diferentes DNAs provenientes de líneas celulares homocigóticas y heterocigóticas para el gene DRB. Se utilizaron 2.5  $\mu$ l de DNA (200 ng/ $\mu$ l) en cada carril de acuerdo a las especificaciones anotadas en materiales y métodos. En este caso se obtuvo amplificación en 12 de los 14 DNAs amplificados.

## DISCUSIÓN

La región del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase II contiene al menos 15 loci que codifican por lo menos para 4 diferentes isoformas de moléculas clase II<sup>12</sup>. Estas moléculas son expresadas como heterodímeros a/b en la superficie de células B maduras, células T activadas, macrófagos así como de otras células presentadoras de antígenos. Los heterodímeros a/b tienen una función central en la respuesta inmune al unir y presentar péptidos procesados antigénicos a células Th CD4+. Los heterodímeros DR son las moléculas de clase II predominantemente expresadas en la superficie de las células presentadoras. Asimismo, estas moléculas son las más polimórficas dentro de clase II, aunque no participan directamente en el rechazo de tejidos u órganos, si lo hacen en la respuesta inmune. Además, recientemente han sido asociadas a diversos padecimientos autoinmunes<sup>13,14</sup>. Una de las limitantes para estudiar la participación de estos alelos en ciertos padecimientos autoinmunes es la dificultad para tipificarlos molecularmente, debido principalmente a que la mayoría de estos alelos comparten ciertos «motifs» entre algunos de ellos y con otros alelos de clase I<sup>14</sup>. Este trabajo tuvo como finalidad la generación de primers específicos utilizando el intrón 2 del gene DRB1 y determinar la utilidad de esta región para la tipificación de este gene. Los resultados obtenidos muestran que la inserción/delección (Fig. 1) en la región del intrón 2 utilizada reconoce específicamente alelos para DRB1 que se comprueba claramente por la cantidad de producto obtenido a través de PCR y utilizando alrededor de 20 DNAs de diferentes líneas celulares utilizadas a nivel internacional para tipificar clase II (datos no mostrados). Inclusive, ya que los intrones para DRB1 poseen diferente longitud dependiendo del alelo en cuestión se puede comprobar que el primer INT2INS reconoce específicamente al intrón 2 y que se correlaciona con el tamaño del mismo (Fig. 3). En conclusión el primer INT2INS puede ser utilizado para amplificar específicamente al exón 2 y al intrón 2 del gene para DRB1 y puede ser una herramienta importante para la tipificación de esta región polimórfica.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Browning M, McMichael A. HLA and MHC: genes, molecules and function. Oxford: BIOS Scientific Publishers Ltd, 1996: 329.
2. Klein J. Natural history of the major histocompatibility complex. New York, John Wiley, 1986.
3. Trowsdale J, Hanson I. MHC genes. In Solheim BG, Ferone S, Moller E (eds): The HLA system in clinical transplantation. Heiderber, Springer-Verlag, 1993, 41.
4. Arvidsson A-K, Svensson A-C, Widmark E, Andersson G, Rask L and Larhammar D. Characterization of three separated exons in the HLA class II region of the Human major histocompatibility complex. *Human Immunol* 1995, 42: 254-264.
5. Svensson A-C, Setterblad N, Pihlgren U, Rask L, Andersson G. Evolutionary relationship between human major histocompatibility complex HLA-DR haplotypes. *Immunogenetics* 1996, 43: 304-314.
6. Rask L, Jonsson A-K, Svensson A-C, Gustafsson K, Andersson L. The structure of human MHC class II genes. *Autoimmunity* 1991, 8: 237-244.
7. Gongora R, Figueroa F, Klein J. The HLA-DRB9 gene and the original HLA-DR haplotypes. *Human Immunol* 1996, 51: 23-31.
8. Satta Y, Mayer WE, Klein J. HLA-DRB intron 1 sequences: Implications for the evolution of HLA-DRB. *Human Immunol* 1996, 51: 1-12.
9. Satta Y, Mayer WE, Klein J. Evolutionary relationship of HLA-DRB genes inferred from intron sequences. *J Mol Evolution* 1996, 42: 648-657.
10. Higuchi R. Rapid efficient DNA extraction for PCR from cells blood. *Amplifications Perkin Elmer Cetus* 1989, 2: 1-3.
11. Marsh SGE, Bodmer JG. HLA class II region nucleotide sequences. *Tissue Antigens* 1995, 46: 258-280.
12. Rask L, Jonsson A-K, Svensson A-C, Gustafsson K, Andersson L. Review. The structure of human MHC class II genes. *Autoimmunity* 1991, 8: 237-244.
13. Apple RJ, Becker TM, Wheeler CM, Erlich HE. Comparison of HLA DR-DQ disease associations found with cervical dysplasia and invasive cervical carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1995, 87: 427-436.
14. Apple RJ, Erlich HA, T, Kitz W, Manos MM, Becker TM, Wheeler CM. HLA DR-DQ disease associations with cervical carcinoma show papillomavirus-type specificity. *Nature Genetics* 1994, 6: 157-162.