

~~T. P. 22/27~~

T. 10/29

TESIS DOCTORAL

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha 15-9-97
ENTRADA NUM. 2692

POLIMORFISMO DE GENES DEL MHC EN LA ESPONDILITIS ANQUILOSANTE

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
N.º Documento _____
N.º Copia _____



Presentada por el licenciado Alberto Fraile Ramos
para optar al grado de Doctor en Biología.

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
N.º Documento 13377838
N.º Copia 16347730

Director:

Javier Martín Ibañez
Instituto de Parasitología y Biomedicina. CSIC.
Granada

Granada, Octubre de 1997

UNIVERSIDAD DE GRANADA
1 SET. 1997
COMISION DE DOCTORADO

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
A. LA ESPONDILITIS ANQUILOSANTE.....	3
B. EL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD.....	5
1. Estructura proteica de los antígenos HLA.....	5
1.1. Antígenos HLA de clase I.....	5
1.2. Antígenos HLA de clase II.....	7
2. Organización genómica del sistema HLA.....	9
3. Función biológica del sistema HLA.....	12
3.1. Procesamiento y presentación antigénica mediada por clase I.....	13
3.2. Procesamiento y presentación antigénica mediada por clase II.....	15
3.3. Excepciones.....	16
4. Polimorfismo del sistema HLA.....	17
5. Asociación HLA-enfermedad.....	18
C. ASOCIACIÓN HLA ESPONDILITIS ANQUILOSANTE.....	19
1.- Mecanismos propuestos para explicar la asociación....	20
1.1. Modelo del gen en desequilibrio de unión.....	20
1.2. Modelo del receptor.....	20
1.3. Mimetismo molecular.....	20
1.4. Modelo de la cisteína 67.....	21
1.5. Modelo del péptido artritogénico para la EA.....	21
2.- Subtipos de HLA-B*27.....	23
3.- ¿Otros genes HLA implicados en la EA?.....	26
3.1. Los genes LMP.....	27
3.2. Los genes TAP.....	27
3.3. Los genes HSP70.....	29
3.4. Los genes TNF.....	29
II. OBJETIVOS.....	33
III. PACIENTES.....	37
IV. MATERIAL Y MÉTODOS.....	41
1.- Análisis de los subtipos HLA-B*27.....	43
2.- Análisis de los genes LMP.....	46
3.- Análisis de los genes TAP.....	47
4.- Análisis de los genes HSP70.....	48
5.- Análisis de los genes TNF.....	49
6.- Análisis estadístico de los datos.....	50

V. RESULTADOS	53
1.-Distribución de HLA-B*27.....	55
2.-Distribución de LMP.....	56
3.-Distribución de TAP.....	58
4.- Distribución de HSP70 y TNF.....	63
4.1. Frecuencias de los genes HSP70 en pacientes y controles.....	63
4.2. Frecuencias de los genes TNF en pacientes y controles.....	67
4.3. Desequilibrio de unión entre HSP70 y TNF con B*27	69
VI. DISCUSIÓN	71
VII. CONCLUSIONES	85
VIII. BIBLIOGRAFÍA	89

I. INTRODUCCIÓN

A. LA ESPONDILITIS ANQUILOSANTE.

La espondilitis anquilosante (EA) es una enfermedad perteneciente al grupo de las espondiloartropatías seronegativas, denominadas así porque el suero es negativo para los factores reumatoideos y la artritis suele afectar a la columna. Las espondiloartropatías seronegativas pueden dividirse en cuatro grandes grupos: espondilitis anquilosante, artritis reactiva, artritis asociada con enfermedad inflamatoria del intestino y artritis psoriásica. La EA es la forma más pura de espondiloartritis, es un trastorno inflamatorio progresivo crónico que afecta a la columna de forma característica, donde produce anquilosis (fusión) de las articulaciones apofisiarias y sacroilíacas, y a las grandes articulaciones periféricas, como las rodillas. La EA es más común en los hombres que en las mujeres (2.4 : 1) y su presentación sucede en la segunda o tercera década de la vida.

La enfermedad comienza a manifestarse con dolores insidiosos de la parte baja de la espalda y rigidez, acentuándose en las mañanas. Los síntomas en la fase aguda incluyen dolor y sensibilidad en las articulaciones sacroilíacas y espasmos de los músculos paravertebrales. En estados avanzados se presenta anquilosis de la columna y articulaciones sacroilíacas, también puede observarse artritis periférica, particularmente de las articulaciones axiales. Un 25% de los pacientes presentan iritis o iridociclitis; en un 10% aparece carditis con o sin aortitis, llegando a progresar en un 1 - 4% a insuficiencia de las válvulas aórticas.

Los pacientes con EA son seronegativos para el factor reumatoideo; no se presenta hipergammaglobulinemia ni anticuerpos antinucleares, sin embargo durante la fase activa es común encontrar elevados niveles de sedimentación eritrocitaria y anemia media. Implicaciones cardíacas se reflejan en anormalidades electrocardiográficas. En los estadios iniciales de la enfermedad una radiografía de las articulaciones sacroilíacas mostraría osteoporosis y erosión, llegando a esclerosis con fusión en los estadios finales. Una radiografía de la columna muestra osificación del ligamento interespinoso dorsal y fusión en las articulaciones costo vertebrales.

I. Introducción

Bajo un examen patológico estos pacientes tienen una sinovitis proliferativa crónica muy similar a la de la artritis reumatoide. La manifestación característica en estados avanzados es una osificación de las articulaciones sacroilíacas y los ligamentos interespinoso y capsular. La patología cardíaca incluye inflamación localizada y fibrosis de la pared aórtica y base de la válvula.

La EA es el resultado de complejas interacciones del sistema inmune junto a factores genéticos y ambientales, sin embargo se desconoce el mecanismo exacto de la misma. La presencia de células mononucleares en el tejido afectado y la similitud histológica con la sinovitis de la artritis reumatoide sugieren un posible mecanismo inmunológico. Existe una fuerte predisposición genética a la EA, hay una tendencia familiar a la misma y se ha descrito concordancia en gemelos. El 90% de los pacientes con EA presentan el antígeno HLA-B27. Estos temas serán discutidos con mayor profundidad en el capítulo HLA y EA.

Aunque no hay cura para la EA el tratamiento consiste en la administración de fármacos antiinflamatorios que producen una disminución de la inflamación y un alivio considerable de los síntomas; se acompaña de una terapia con ejercicios posturales. En los pacientes con fusión en la cadera, el reemplazamiento de la misma supone un gran alivio, aunque una anquilosis recurrente puede ser un problema.

B. EL COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD.

El Complejo Principal de Histocompatibilidad (Major Histocompatibility Complex, MHC) es una región de genes altamente polimórfica. Se identificó porque determinaba el rechazo de trasplante de tejidos de un miembro de la misma especie a otro miembro genéticamente distinto de la misma especie. El primer sistema de histocompatibilidad descrito fue el de ratón, el equivalente humano es el denominado HLA (Human Leucocyte Antigens, HLA). Pese a su relevancia como responsables del rechazo de trasplantes de órganos, la función biológica de estas moléculas permaneció sin aclarar hasta la década de los setenta, cuando se puso de manifiesto que las moléculas codificadas por el MHC son las responsables de proporcionar el contexto adecuado para el reconocimiento de los antígenos extraños por los linfocitos T (Zinkernagel y Doherty, 1974), ejerciendo así un papel crucial en el desarrollo y control de la respuesta inmune (Benacerraf y McDevitt, 1972).

1. ESTRUCTURA PROTEICA DE LOS ANTÍGENOS HLA.

El sistema HLA se comporta como un sistema dialélico, autosómico y codominante constituido por una serie de genes que codifican para un amplio grupo de antígenos de la superficie celular. Entendiendo como moléculas HLA aquellas que proporcionan el contexto para el reconocimiento de antígenos por los linfocitos T (Klein, 1986), dichas moléculas se dividen en dos grupos, antígenos de clase I y antígenos de clase II.

1.1. ANTÍGENOS HLA DE CLASE I.

Las moléculas HLA-A, -B y -C son glicoproteínas de membrana que constan de una cadena pesada (44 kd) y de una cadena ligera (12 kd) denominada β_2 -microglobulina (β_2m) (Barnstable y col., 1978; Orr y col., 1979; Ploegh y col., 1981). La cadena pesada, denominada cadena α , es la única que atraviesa la membrana citoplásmica y se codifica en los genes del sistema HLA propiamente dicho, a diferencia de la β_2m

I. Introducción

que es codificada por un gen que no pertenece al sistema HLA y que se encuentra en el cromosoma 15 (Goodfellow y col., 1975).

La porción extracelular de la cadena pesada ha sido dividida en tres dominios denominados $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ (Figura I.1). Los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ son muy polimórficos. El dominio $\alpha 3$ es poco polimórfico y junto con la $\beta 2m$ tiene una fuerte homología de secuencia con las regiones constantes de las inmunoglobulinas (Srivastava y col., 1985; Björkman y Parham, 1990).

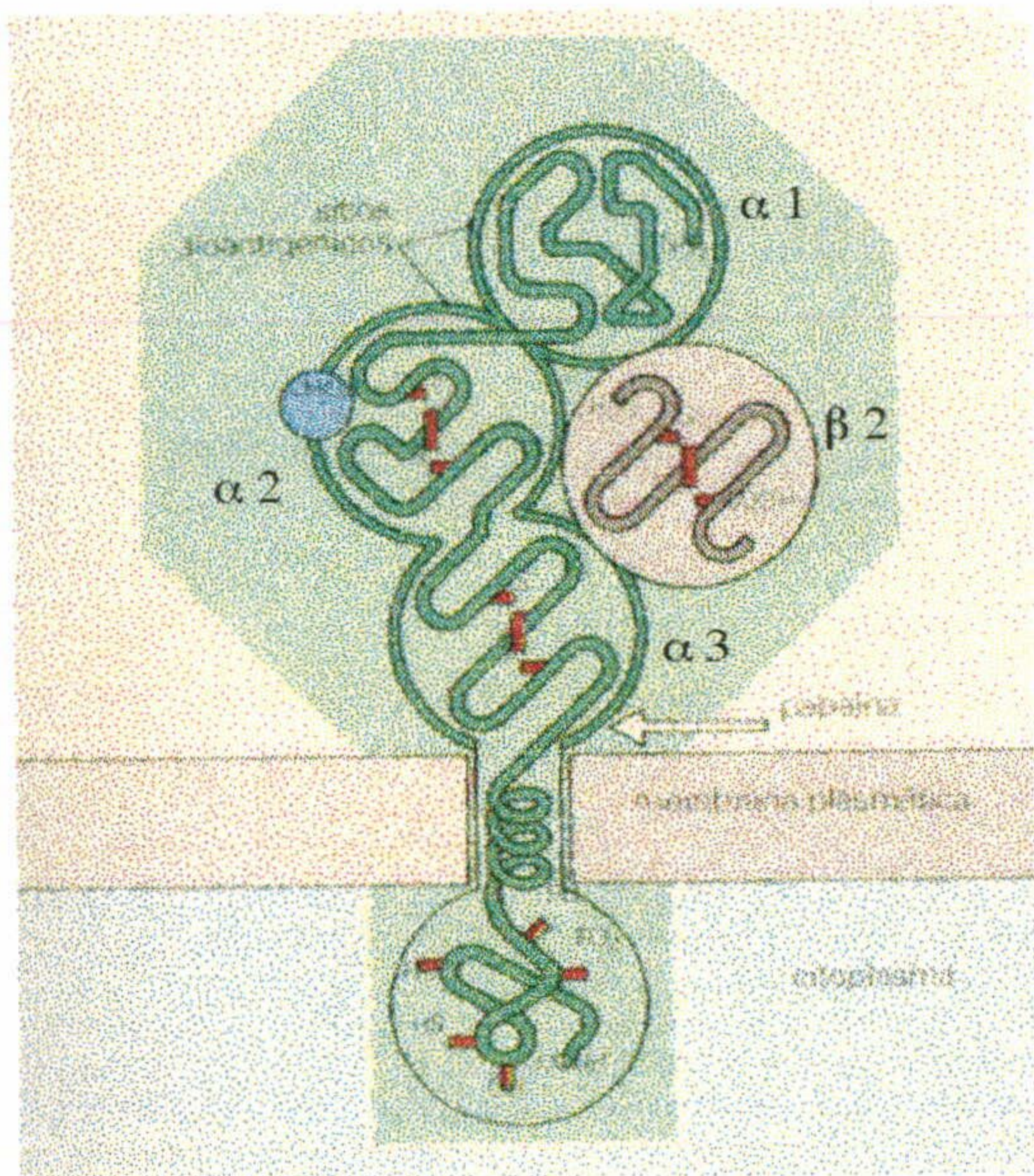


Figura I.1. Esquema de la estructura de las moléculas HLA de clase I.

Björkman y col. (1987a) definieron la primera estructura tridimensional de una molécula de clase I, HLA-A2 (Figura I.2a). Estructuralmente, cada uno de los dominios distales ($\alpha 1$, y $\alpha 2$) consta de cuatro cadenas β antiparalelas y una región α -hélice extendida. Así, la parte más distal de la molécula adopta una estructura que consiste en una lámina β de 8 cadenas y, por encima, paralelas entre sí están las dos estructuras α -hélice (Figura I.2b). Entre las dos α -hélices aparece una hendidura cuyo fondo viene dado por la lámina β antiparalela. Dentro de esta hendidura se visualizó material electrodensito (Björkman y col., 1987a). Como Björkman y col. especularon (1987a, 1987b) este material representa péptidos que

cocrystalizaron con las moléculas de clase I y, por tanto esta estructura se conoce como sitio de unión a péptido.

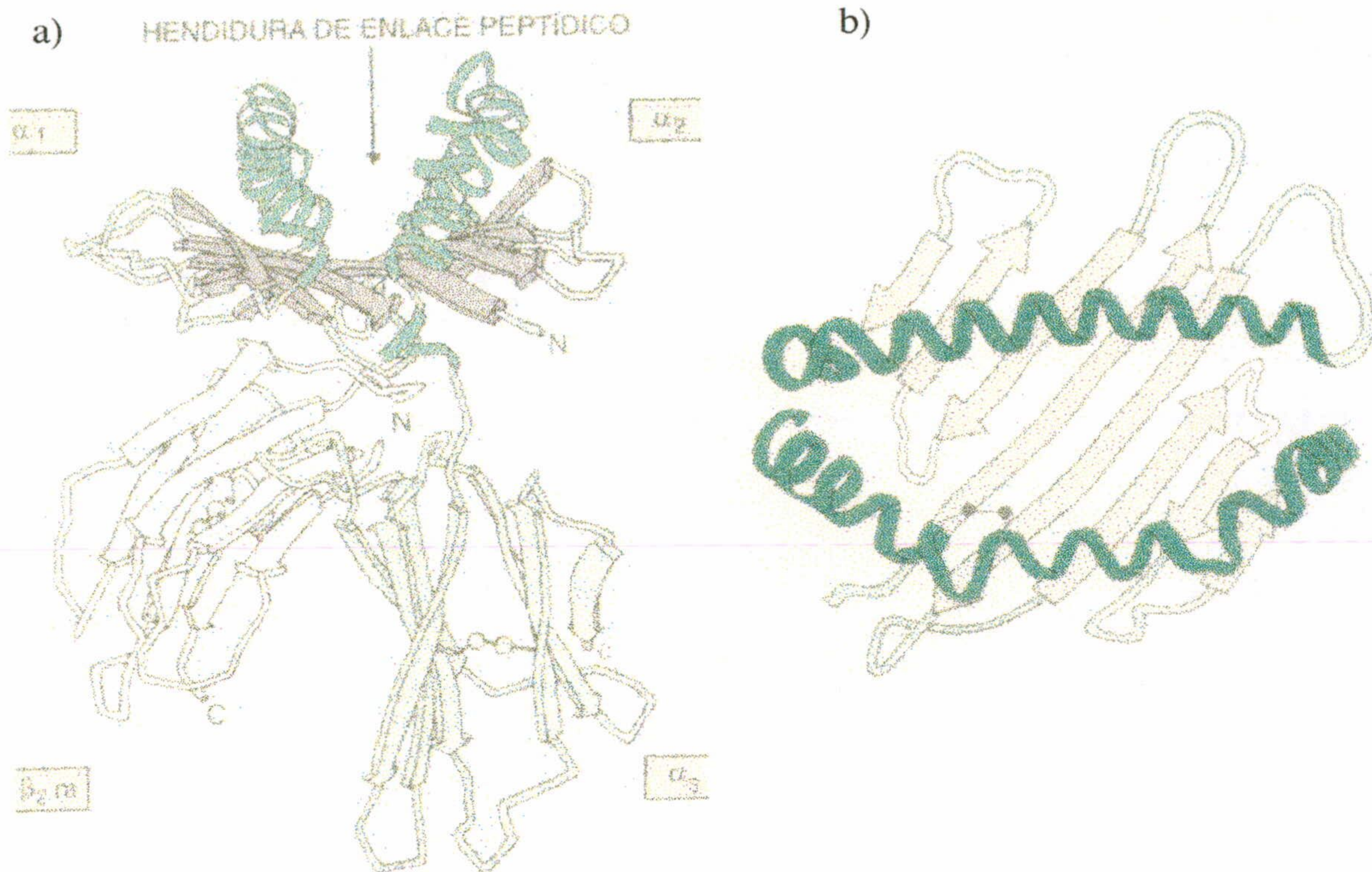


Figura I.2. Diagrama de la estructura tridimensional de una molécula HLA de clase I. (a) Visión lateral. Las líneas β antiparalelas se representan por flechas y las hélices α por lazadas enrolladas. Los puentes disulfuro se representan por dos esferas conectadas. (b) Visión superior de la parte más distal de la molécula HLA, el sitio de unión a péptido.

1.2 ANTÍGENOS HLA DE CLASE II.

Las moléculas de clase II HLA-DR, -DQ, -DP son glicoproteínas de membrana compuestas de dos cadenas polipeptídicas, α y β , unidas de forma no covalente. La cadena α es ligeramente más pesada (33-35 kd) que la cadena β (26-28 kd). Ambas son codificadas en la región del MHC. Tanto la cadena α como la β se dividen en dos dominios extracelulares de entre 90 y 100 aminoácidos, designados α_1 , α_2 , y β_1 , β_2 (Figura I.3). Continuando los dominios α_1 y β_2 , un péptido conector altamente hidrofílico de unos 10-12 aminoácidos une los dominios extracelulares a una porción transmembrana de 20 a 25 aminoácidos y un segmento citoplásmico de entre 8 y 15 aminoácidos (Kauffman y

I. Introducción

col., 1984; Kappes y Strominger, 1988). Tanto el dominio $\alpha 2$ como el $\beta 2$ comparten homología de secuencia con la región constante de las inmunoglobulinas; por tanto, las moléculas de clase II son también consideradas como miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas (Hunkapiller y Hood, 1989).

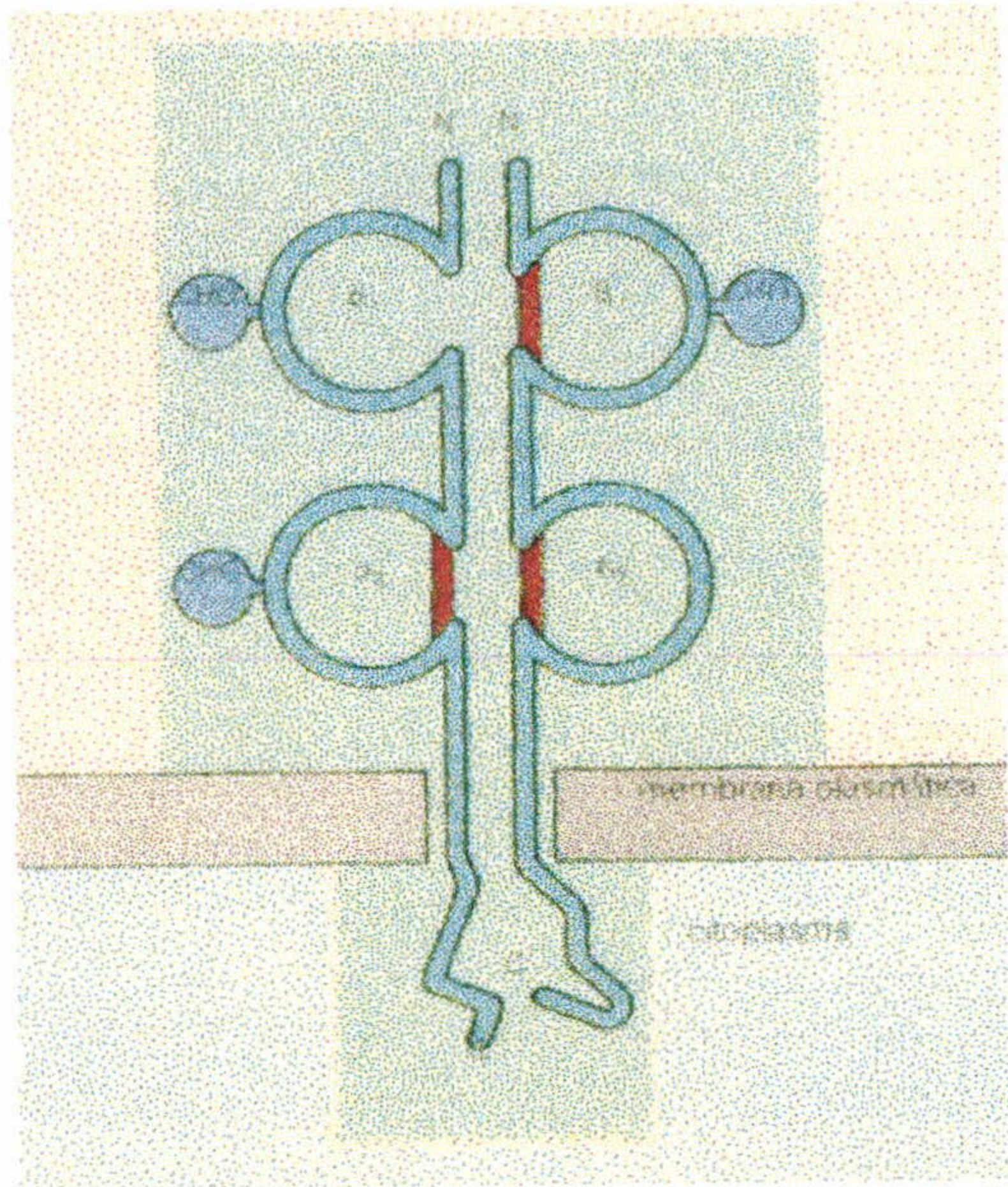


Figura I.3. Representación esquemática de una molécula HLA de clase II.

Brown y col. (1993) determinaron recientemente la estructura tridimensional de la molécula de clase II HLA-DR1 por difracción de rayos X. En general, y como fue pronosticado por un modelo hipotético basado en la estructura de las moléculas de clase I, las moléculas HLA de clase I y clase II presentan estructuras muy similares. Los dominios distales de la molécula de clase II forman una hendidura o sitio de unión a péptido consistente en una plataforma, compuesta de 8 cadenas en conformación β antiparalelas, flanqueadas por dos regiones helicoidales (cada dominio, $\alpha 1$ y $\beta 1$, aporta 4 de las cadenas β y una región α -hélice). Sin embargo, existen algunas diferencias en las regiones α -hélice entre las moléculas de clase I y clase II. El resultado final de estas diferencias hace que el sitio de unión a péptido en la molécula de clase II tenga extremos "abiertos" de tal forma que ambos extremos del péptido anclado sobresalen de la hendidura (Brown y col., 1993). Esto concuerda con la heterogeneidad de la longitud de los péptidos naturales aislados de moléculas de clase II, 12-24

aminoácidos. Por contra, las moléculas de clase I tienen el sitio de unión a péptido cerrado en sus extremos por lo que albergan péptidos de tamaño más homogéneo (8-10 aminoácidos) (Rammensee, 1995).

El análisis de la estructura de péptidos aislados a partir de moléculas HLA de clase I purificadas ha revelado la presencia de secuencias de aminoácidos específicas para formas alélicas particulares de moléculas HLA, poniendo de manifiesto la existencia de residuos de anclaje en posiciones fijas que interaccionan con "pockets" o bolsillos configurados por residuos en los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de clase I (Rammensee y col., 1993). También se ha observado una conservación en la longitud de los péptidos eluidos de estas moléculas (8-10 aminoácidos), demostrándose que los nonapéptidos se unen con una afinidad hasta 1000 veces superior a la que lo hacen versiones más cortas o largas de los mismos. Posteriormente, también se han eluido péptidos procesados naturalmente de moléculas de clase II y se ha observado que estos péptidos son más largos y exhiben una considerable variabilidad en su longitud (13-25 aminoácidos). Estos hallazgos son coherentes con los datos de la estructura cristalográfica de las moléculas de clase I y clase II, ya que en éstas, a diferencia de las moléculas de clase I, el sitio de unión a péptido está abierto en ambos extremos.

2. ORGANIZACIÓN GENÓMICA DEL SISTEMA HLA.

Las moléculas HLA son codificadas por genes localizados dentro del denominado Complejo Principal de Histocompatibilidad. Estudios citogenéticos han mapeado la región del MHC humano en la banda p21.3 del brazo corto del cromosoma 6 (Breuning y col., 1997), abarcando unas 4000 kilobases. Esta compleja región contiene múltiples genes expresados y no expresados ordenados en tres regiones. La región donde se encuentran los genes que codifican para los antígenos de trasplante clásicos HLA-A, -B y -C recibe el nombre de región de clase I. La región donde residen los genes que codifican para

I. Introducción

las moléculas HLA-D (-DR, -DP, -DQ) recibe el nombre de región de clase II. Entre ambas regiones se encuentra la que se ha dado en llamar región de clase III, compuesta por una colección heterogénea de genes, entre ellos los que codifican para factores del complemento, para el factor de necrosis tumoral (gen $TNF\alpha$) (Tumor Necrosis Factor, TNF) y la linfotoxina ($TNF\beta$) o tres genes que codifican para miembros de la familia de las proteínas de choque térmico HSP70 (HSP70-1, HSP70-2 y HSP70-Hom) (Spies y col., 1986; Campbell, 1987; Carroll y Alper, 1987; Sargent y col., 1989; Milner y Campbell, 1990).

La orientación de las tres principales regiones del MHC en el cromosoma 6 y su relación entre sí fue clarificada mediante clonaje genómico y subsiguiente electroforesis de campo pulsado. Combinando los resultados obtenidos con estas técnicas, se ha elaborado un mapa físico del MHC (Campbell y Trowsdale, 1993), con el locus DP en el extremo centromérico y el locus HLA-A en el extremo telomérico. La región contiene un número elevado de genes transcritos; las funciones de la mayoría de estos genes está por definir. La organización genética del complejo HLA se muestra de forma detallada en la Figura I.4.

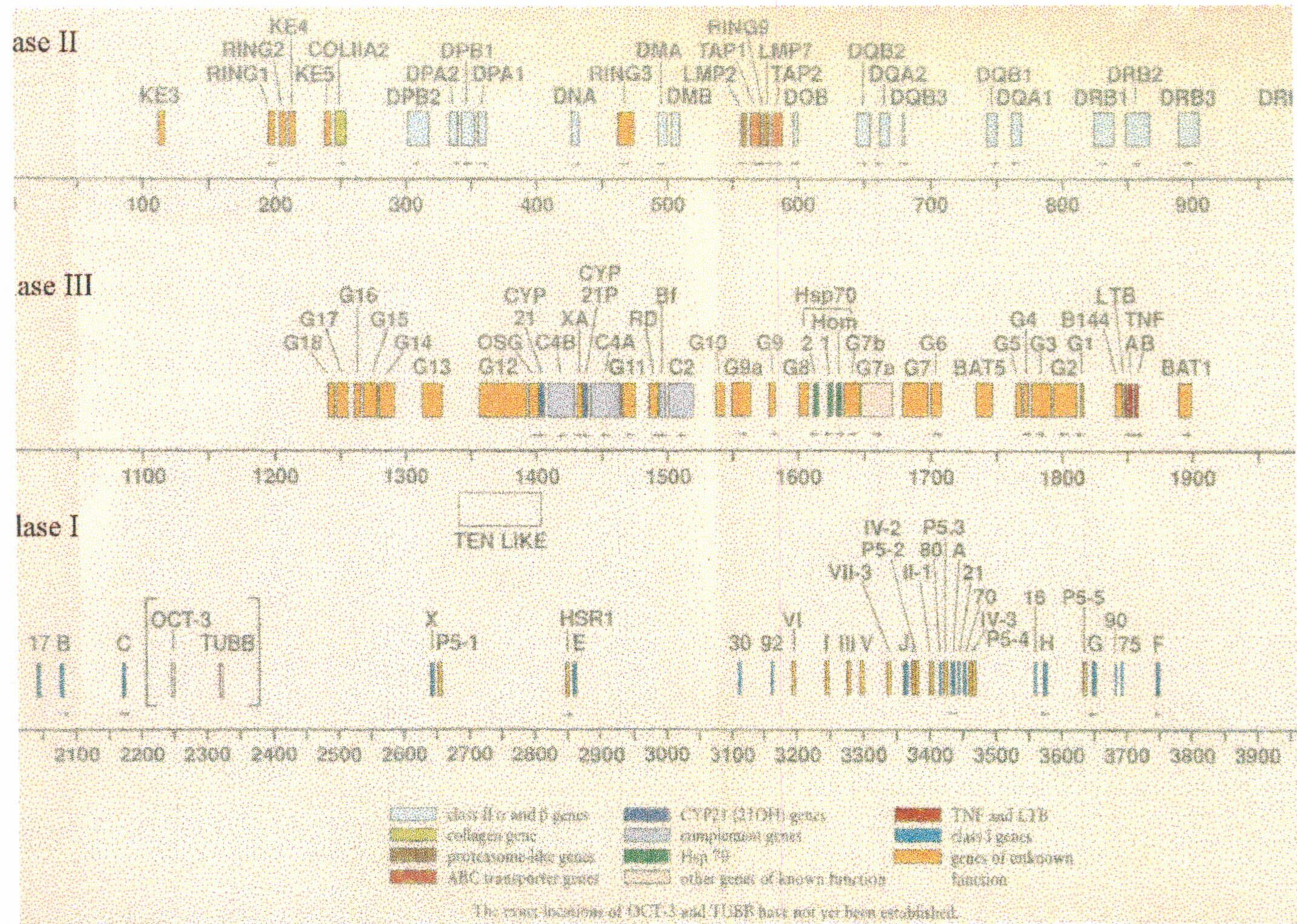


Figura I.4. Mapa génico del sistema HLA. (Campbell y Trowsdale, 1993)

3. FUNCIÓN BIOLÓGICA DEL SISTEMA HLA.

Un hecho de capital importancia en la actividad funcional de los linfocitos y en su participación en la respuesta inmune es el reconocimiento del antígeno de forma específica. A diferencia de las células B que reconocen, mediante sus inmunoglobulinas de superficie, determinantes antigénicos tridimensionales en las proteínas intactas, los linfocitos T sólo reconocen epítomos antigénicos en forma de péptidos unidos a moléculas HLA presentes en la membrana de las células presentadoras de antígeno. Por tanto la función primordial de las moléculas MHC consiste en captar péptidos dentro de la célula y transportarlos a la superficie celular, donde el complejo péptido-MHC puede ser reconocido por el receptor antigénico de la célula T (TCR).

Las moléculas de clase I se expresan en la superficie de todas las células nucleadas, plaquetas y espermatozoides (aquí de forma haploide), y son presentadoras de antígeno fundamentalmente a linfocitos CD8⁺. Las moléculas de clase II se expresan en macrófagos, linfocitos B, células de Langerhans, células dendríticas y células T activadas; y presentan el antígeno a linfocitos CD4⁺. Los linfocitos CD8⁺ son los principales responsables de combatir patógenos intracelulares que utilizan la maquinaria biosintética de la célula, como por ejemplo los virus. Son células efectoras que reconocen y destruyen células infectadas o transformadas. Los linfocitos CD4⁺ defienden fundamentalmente contra infecciones bacterianas; estas células no suelen actuar directamente sobre la bacteria, sino que reclutan a otros componentes del sistema inmune, como células B productoras de anticuerpos, para eliminar al invasor.

Desde el punto de vista de la biología de la célula, las diferencias clave para la presentación antigénica por las moléculas de clase I o de clase II radica en la procedencia de las proteínas de las cuales derivan los péptidos antigénicos, así como en los compartimentos en los que estos péptidos son generados. En este sentido se puede hablar de dos rutas diferentes de procesamiento y presentación antigénica para las moléculas de clase I y de clase II.

3.1. PROCESAMIENTO Y PRESENTACIÓN ANTIGÉNICA MEDIADA POR CLASE I.

Las moléculas de clase I generalmente unen péptidos derivados de proteínas sintetizadas por la propia célula, tras seguir la denominada vía de procesamiento endógena o exocítica (revisada en York y Rock, 1996, y en Brodsky y col., 1996). Por lo tanto, en condiciones normales las moléculas de clase I presentan en la superficie celular una muestra de las proteínas que se están expresando en la misma. Infecciones virales, mutaciones o transformaciones malignas darán como resultado un patrón alterado en la expresión de proteínas. Ahora, las moléculas de clase I presentarán estos péptidos en la superficie celular y los linfocitos CD8⁺ cuando los reconozcan desarrollarán un ataque citolítico.

Como las moléculas de clase I presentan péptidos, los antígenos intactos tienen que ser degradados en el citosol. El principal complejo proteolítico citosólico es el denominado proteasoma. Experimentos en líneas celulares mutantes y la utilización de inhibidores específicos, han implicado al proteasoma en la generación de los antígenos (revisado en Coux y col., 1996). Dos subunidades β del proteasoma, LMP2 y LMP7 localizadas en la región de clase II del MHC, inducibles por γ -interferón alteran las actividades catalíticas de la partícula, aumentando la presentación de al menos algunos antígenos. Tras la generación en el citosol, los péptidos tienen que ser transportados al lumen del retículo endoplásmico donde se asociarán a las moléculas de clase I. Dos genes localizados en la región de clase II, TAP1 y TAP2, codifican las dos subunidades del transportador asociado con el procesamiento antigénico (TAP), un miembro de la familia de proteínas transportadoras ABC (ATP-binding cassette). El transporte es dependiente de ATP y la afinidad más elevada es por péptidos de un tamaño de 8 a 13 aminoácidos (el tamaño aproximado de los péptidos unidos a moléculas de clase I). Una vez que los péptidos han accedido al RE pueden seguir varias rutas: (1) se unen a los heterodímeros ensamblados de clase I, (2) pueden ser degradados, aunque la tasa de degradación en el citosol es baja; o (3) vuelven a ser rápidamente transportados fuera del RE, este transporte también es dependiente de ATP. La vida media de los péptidos en el RE es corta, lo que aseguraría

I. Introducción

que solamente se unan péptidos con alta afinidad a las moléculas de clase I. Recientemente se ha observado que además de TAP hay una serie de proteínas, pertenecientes a la familia de proteínas de choque térmico (Heat Shock Proteins, HSP), que se asocian a las moléculas de clase I, como son la calnexina, la calreticulina o la tapasina. El estudio de tales asociaciones revelará de que manera influyen estas chaperonas en la unión de los péptidos antigénicos. Cuando se produce la unión del péptido, TAP se disocia de la molécula de clase I, tras lo cual el complejo péptido-molécula de clase I sigue la ruta exocítica hasta llegar a la superficie celular donde es presentado a los linfocitos CD8⁺.

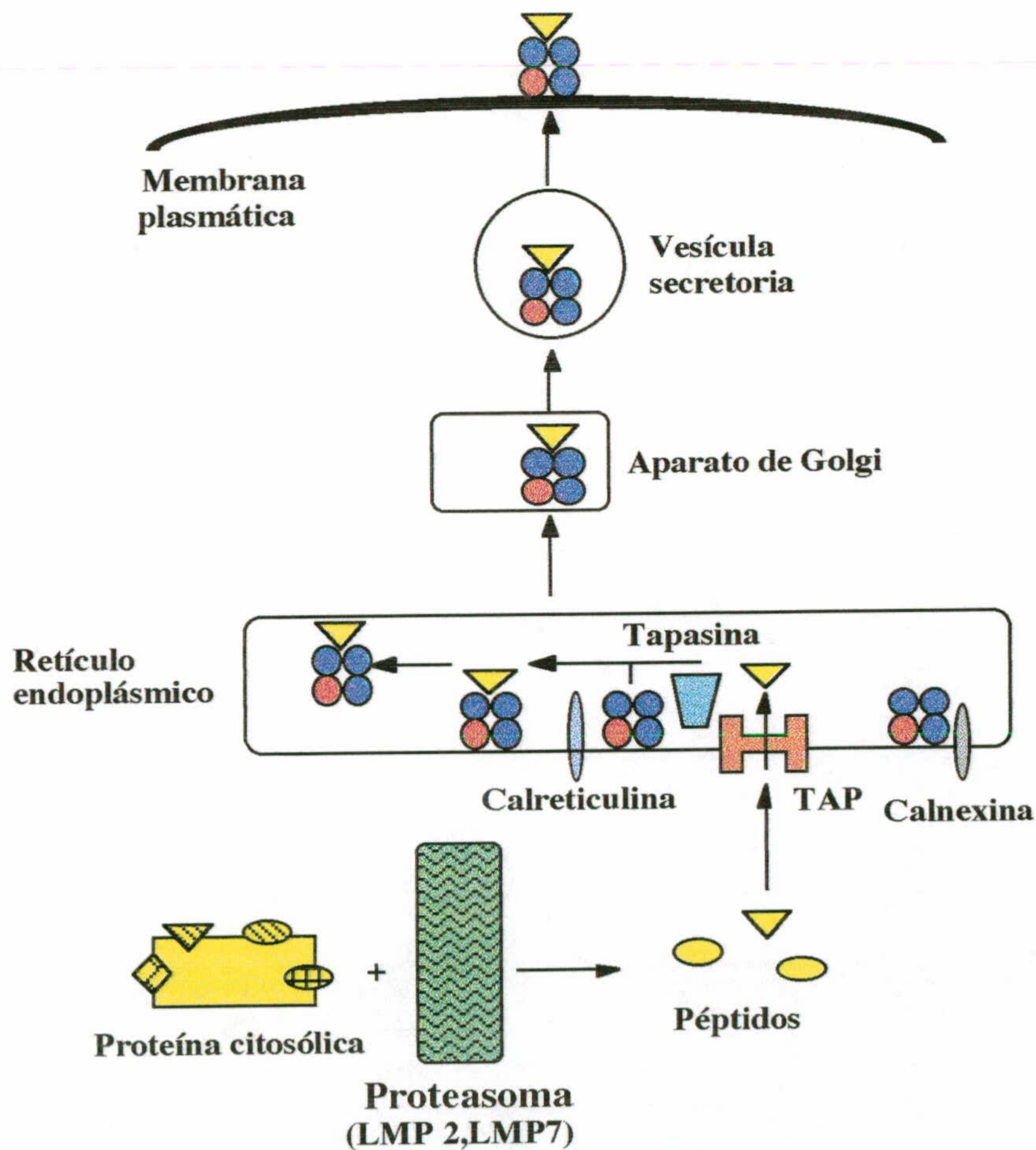


Figura 1.5. Procesamiento y presentación antigénica mediada por clase I.

3.2. PROCESAMIENTO Y PRESENTACIÓN ANTIGENICA MEDIADA POR CLASE II.

Los péptidos que se unen a clase II proceden de proteínas exógenas o propias reinternalizadas, por lo que la vía de procesamiento para clase II recibe el nombre de vía exógena o endocítica (revisada en Wolf y Ploegh, 1995). En ella interviene de forma decisiva la cadena invariante (Ii), molécula no codificada en el MHC que impide que los antígenos de clase II se carguen de péptido en el retículo endoplásmico a la vez que los dirige hacia la ruta endocítica. Una vez en los endosomas la Ii es degradada y el surco de unión a péptido queda expuesto permitiendo que se unan estos. La liberación de la Ii es necesaria para que las moléculas de clase II salgan de la ruta endocítica y lleguen a la superficie celular; en esta liberación interviene una molécula denominada DM. La carga de los péptidos tiene lugar en compartimentos endocíticos de características lisosomales, también denominados MIIC por compartimentos que contienen moléculas de clase II (MHC class II - containing compartments, MIIC). Estos compartimentos se caracterizan por presentar una apariencia multilaminar y/o multivesicular, y por contener proteasas lisosomales necesarias para la degradación de la Ii y moléculas DM para la posterior liberación de la misma. Permanecen sin aclarar las señales que liberan a las moléculas de clase II de los endosomas, al igual que los mecanismos de transporte de estas hacia la superficie celular. Una vez que el complejo péptido-molécula de clase II llega a la superficie celular es reconocido por los linfocitos CD4⁺.

I. Introducción

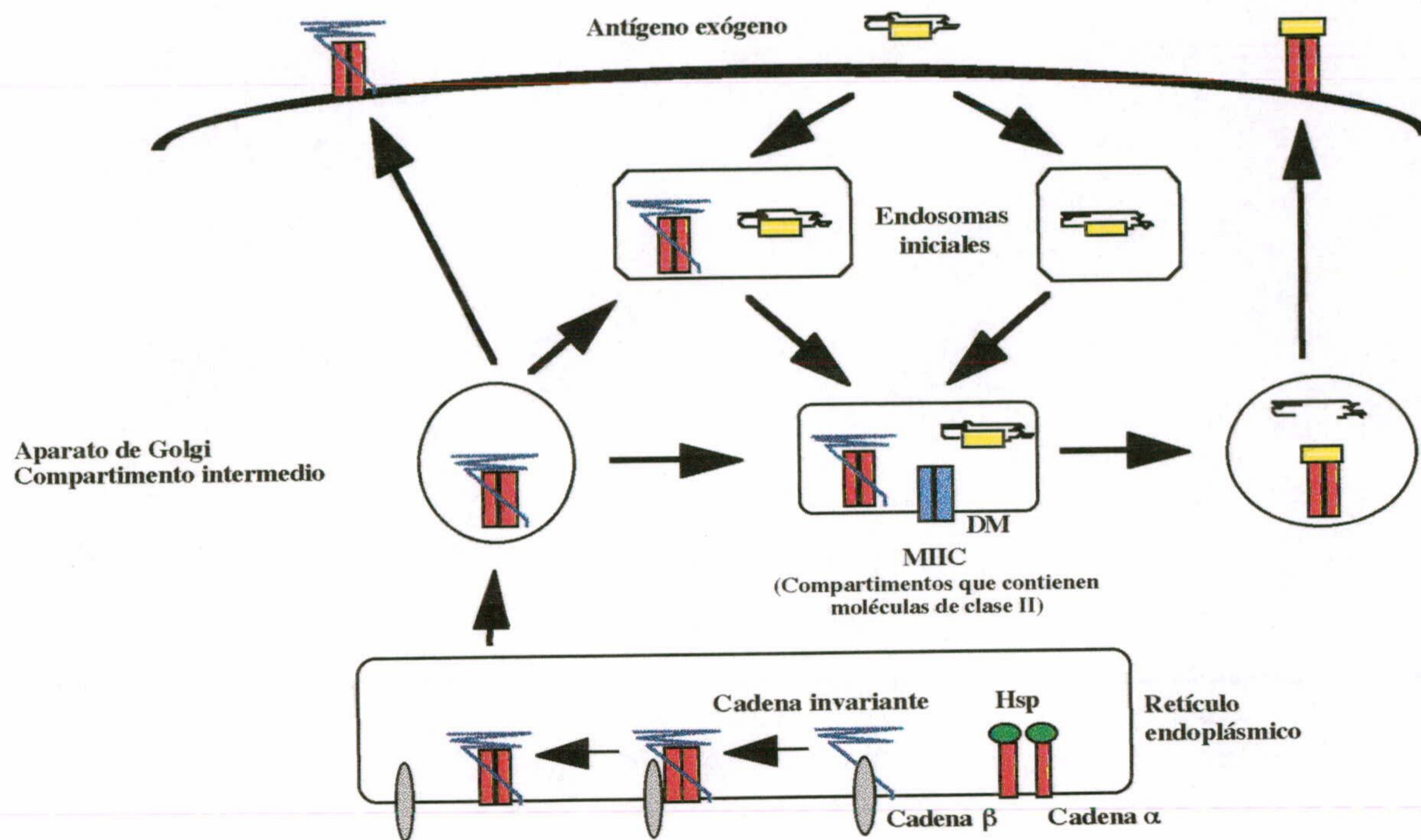


Figura 1.6. Procesamiento y presentación antigénica mediada por clase II.

3.3. EXCEPCIONES.

Últimamente se están acumulando claras evidencias de que la separación de las rutas de procesamiento antigénico para clase I y clase II no es tan estricta, existiendo una considerable comunicación entre ellas. Así, por ejemplo, péptidos derivados de proteínas citosólicas pueden ser cargados en moléculas de clase II (Jaraquemada y col., 1990; Malnati y col., 1992; Pinet y col., 1994) y, por otra parte, péptidos derivados de proteínas fagocitadas pueden ser presentados por moléculas de clase I, especialmente si la proteína es fagocitada como un agregado (revisado en Rock, 1996).

Además del crucial papel jugado por las moléculas HLA en el desarrollo de una respuesta inmune por su capacidad de presentar diferentes péptidos a nivel periférico, existe otro mecanismo por el cual los genes del MHC determinan la capacidad de respuesta de un individuo, y es su intervención en la conformación del repertorio de células T maduras (Jameson y col., 1995).

4. POLIMORFISMO DEL SISTEMA HLA.

Una de las características más esenciales del sistema HLA es el gran polimorfismo que posee, con la presencia de un gran número de variantes alélicas de cada uno de los loci genéticos. En este sentido, el MHC constituye el sistema genético conocido más polimórfico en todas las especies estudiadas. Cada alelo no se define por mutaciones únicas, sino que están formados por combinaciones diferentes de un grupo de polimorfismos comunes; así las diferentes mutaciones de un sitio polimórfico concreto se pueden encontrar en multitud de alelos (polimorfismo "a parches" , "patchwork polymorphism").

La frecuencia de alelos individuales en una población varía de acuerdo al grupo étnico y la población estudiada. Incluso dentro de un grupo étnico la frecuencia de un alelo particular puede variar dependiendo de la localización geográfica. Por otra parte, es bien conocido el hecho de que alelos de loci estrechamente ligados aparecen juntos más a menudo de lo previsible por asociación aleatoria, lo que se ha denominado *desequilibrio de unión*.

Si trasladamos las posiciones donde reside el mayor grado de diversidad de las moléculas HLA a la estructura determinada cristalográficamente, se hace evidente que dichas posiciones se agrupan en lo que constituye el sitio de unión a péptido o gruta, disponiéndose la mayoría de estas sustituciones con las cadenas laterales de dichos residuos dirigidas hacia la hendidura (para formar posibles contactos con el péptido) o hacia arriba de las α hélices (para formar posibles contactos con el TCR) (Björkman y col., 1987b). Así, el polimorfismo de las moléculas HLA confiere una naturaleza química y estructural única para cada alelo, y es el principal determinante de la especificidad y afinidad de la unión de péptidos y del reconocimiento por la célula T. De esta forma, el polimorfismo de estas moléculas determina la capacidad de respuesta de cada individuo frente a agentes exógenos.

El polimorfismo de los antígenos HLA tiene lugar a varios niveles: a) existencia de múltiples loci muy relacionados y variables de un haplotipo a otro; b) cada locus presenta un elevado número de alelos; y c) variaciones en estructura causadas por modificaciones

postranscripcionales tales como procesamiento alternativo (Lew y col., 1987). Todo ello hace que las diferentes moléculas se diferencien unas de otras estructuralmente en múltiples posiciones. Esta complejidad estructural no puede ser explicada más que implicando diversos mecanismos genéticos para la generación de polimorfismo. En este sentido, se han propuesto al menos tres mecanismos para la generación del polimorfismo de los antígenos HLA: mutación puntual, conversión génica o mecanismos análogos y recombinación.

5. ASOCIACIÓN HLA-ENFERMEDAD.

El conocimiento actual de la estructura y función biológica de las moléculas HLA proporciona la base para tratar de comprender los mecanismos de uno de los principales enigmas de la biología y la medicina moderna, que consiste en la asociación entre ciertos componentes del sistema HLA y la susceptibilidad o resistencia a determinadas enfermedades (Dausset, 1981). Aunque conocido desde hace más de 25 años, este fenómeno está comenzando ahora a ser comprendido en términos moleculares.

La primera demostración clara de una asociación entre un antígeno HLA y enfermedad surgió en 1973, cuando, usando métodos serológicos se observó que el 95% de los pacientes eran HL-A 27 (hoy HLA-B27) (Brewerton y col., 1973; Schlosstein y col., 1973). Este trabajo pionero condujo a una rápida expansión en el número de estudios a la búsqueda de establecer asociaciones entre antígenos HLA y enfermedades. Sin embargo, estos primeros estudios no fueron bien controlados y, especialmente, sólo se podía tipar para unas pocas de especificidades de las conocidas actualmente. Así, a pesar de la ingente literatura que se ha acumulado en este campo, parece que nos encontramos en lo que promete ser un período particularmente productivo para estudiar estas asociaciones, contribuyendo a ello de forma decisiva los avances tecnológicos, particularmente las técnicas de DNA recombinante, que han hecho la definición de los alelos considerablemente más precisa, rápida y eficiente.

Muchos clínicos involucrados en los estudios de asociación HLA-enfermedad esperan que estas asociaciones permitan al final la identificación de grupos de pacientes con riesgo elevado para ciertas enfermedades lo suficientemente pronto como para aplicar medidas preventivas apropiadas. La estratificación de la población por el tipaje HLA también permite agrupar a los pacientes más apropiados para ciertas formas de terapia.

C. ASOCIACIÓN HLA - ESPONDILITIS ANQUILOSANTE.

Desde que se describió por vez primera la asociación de HLA-B27 con la EA (Brewerton y col., 1973; Schlosstein y col., 1973), numerosos estudios poblacionales han confirmado esta asociación. La frecuencia de un determinado antígeno HLA y la asociación con una enfermedad ha de ser evaluada en poblaciones con individuos del mismo origen étnico, ya que estos antígenos varían entre las diferentes poblaciones étnicas. HLA-B27 se ha encontrado en un 90% de los pacientes de raza blanca con EA y solamente en un 8% ó 3% de controles de raza blanca americanos y españoles respectivamente. La frecuencia más alta del antígeno HLA-B27 ha sido observada en una población de nativos de Norte América, indios Haidia en Canadá, con una frecuencia del 50%; la prevalencia de EA entre los hombres adultos de esta población se sitúa en el 4%. Por ejemplo en individuos americanos de raza negroide, la frecuencia de HLA-B27 en individuos controles es del 2 - 4% mientras que en pacientes es del 48%. Recientemente, Khan ha realizado una recopilación detallada de los datos sobre la distribución de HLA-B27 y sus subtipos a lo largo del mundo (Khan, 1995). Cabe recordar que la asociación de HLA-B27 no es absoluta, solamente una pequeña proporción de los individuos adquieren la enfermedad. Aunque un 90% de los individuos afectados presentan el antígeno, solamente un 2% de individuos sanos HLA-B27 positivos de raza blanca llegan a desarrollar la enfermedad. Además la enfermedad se puede presentar en individuos que no poseen este antígeno, lo que argumenta a favor de la interacción de otros factores genéticos o ambientales.

1. MECANISMOS PROPUESTOS PARA EXPLICAR LA ASOCIACIÓN.

Varias hipótesis han sido propuestas para explicar la naturaleza de la asociación entre HLA-B27 y la EA, aunque no se han encontrado evidencias concluyentes que apoyen definitivamente alguno de los mecanismos propuestos.

1.1. MODELO DEL GEN EN DESEQUILIBRIO DE UNIÓN.

Esta teoría propuesta en 1974 por McDevitt y Bodmer postulaba que la susceptibilidad a la EA podría deberse a un gen adyacente a HLA-B*27, cuyo producto mediaría el desarrollo de la EA. Los modelos animales de ratas transgénicas B*27 (Hammer y col., 1990), estos animales desarrollan espontáneamente una enfermedad con muchas similitudes a las espondiloartropatías humanas, apuntan a una implicación de la propia molécula B27 en el desarrollo de la enfermedad.

1.2. MODELO DEL RECEPTOR.

Esta teoría sugiere que el antígeno HLA-B27 es el receptor para un virus, una toxina o una sustancia no identificada que es la que causa la EA. Por lo tanto, los individuos HLA-B27 positivos poseen un alto riesgo de padecer la enfermedad, pero sólo aquellos expuestos al agente la desarrollarían. No se han aportado evidencias concluyentes que apoyen dicha hipótesis.

1.3. MIMETISMO MOLECULAR.

HLA-B27 tendría características estructurales compartidas con bacterias, de manera que una respuesta inmune desencadenada por la infección bacteriana provocaría una respuesta cruzada contra lo propio, causando el daño tisular y los síntomas de la enfermedad. Se han presentado un serie de estudios en los que antisueros contra determinadas bacterias muestran reacción cruzada frente a células HLA-B27 positivas, así como una secuencia homóloga entre una proteína bacteriana y B27 (Schwimmbeck y col., 1987). Estas

observaciones sugerirían que la EA está mediada por un mecanismo humoral contra lo propio desencadenado por la respuesta inmune anti bacteriana, sin embargo es improbable ya que no explicaría la especificidad de tejido de la EA.

1.4. MODELO DE LA CISTEÍNA 67.

Según este modelo variantes oxidativas de la cadena lateral sulfidrilo de la cisteína en la posición 67 (Archer y col., 1990) podría establecer puentes disulfuro intermoleculares, lo que provocaría un cambio conformacional en la molécula que daría lugar a su reconocimiento por los CTL como una alteración de lo propio, desencadenando una respuesta inmune. Se han realizado análisis del estado oxidativo de esta cisteína, pero se requieren más estudios para caracterizar mejor este residuo y sus implicaciones.

1.5. MODELO DEL PÉPTIDO ARTRITOGÉNICO PARA LA EA.

Esta teoría propuesta por Benjamin y Parham (Benjamin y Parham, 1990) postula que la enfermedad es el resultado de una respuesta inmune mediada por linfocitos CD8⁺ contra un péptido propio desconocido situado en los tejidos articulares, específicamente unido y presentado por todos los subtipos HLA-B27 a través de su motivo estructural común. En condiciones normales el péptido es presentado en niveles muy bajos para provocar la delección clonal o iniciar una respuesta inmune por las células T. En este modelo bacterias o virus portarían proteínas con secuencias similares al péptido patogénico y una infección sensibilizaría a las células T que podrían detectar bajos niveles de presentación del péptido patogénico e iniciar una respuesta contra lo propio que se propagaría por la posterior liberación de péptido del tejido dañado. Este modelo a su vez provee de una serie de explicaciones por las cuales la mayoría de los individuos HLA-B27 positivos no desarrollarían la EA: el péptido podría presentar un polimorfismo natural, el cual impediría la unión a HLA-B27 y por tanto la enfermedad; si el desencadenante de la enfermedad es una infección bacteriana, la ausencia de la misma prevendría de la enfermedad; por último podrían estar implicados mecanismos de inducción de tolerancia frente a lo propio, de tal manera que el péptido artritogénico sería presentado antigénicamente en el timo de la mayoría de los

I. Introducción

individuos, asegurándose la delección clonal, y así previendo la ruptura de la tolerancia que subyace en la patogénesis de la enfermedad.

En los últimos años se han realizado grandes avances que conducen a pensar que es la propia molécula B27 la que desempeña un papel fundamental en la patogénesis de la EA (revisado en Feltkamp, 1996; Inman y Scofield, 1994). A continuación se resumen algunos de los aspectos más relevantes que implican a la molécula B27 en la EA. Las propiedades clave para la asociación de HLA-B27 con la enfermedad son la especificidad en la presentación del antígeno y la antigenicidad de la célula T. La demostración de una relación patogénica directa entre la flora intestinal y la artritis periférica en el modelo de rata transgénica HLA-B27 (Taurog y col., 1994), estos animales en condiciones libres de gérmenes no desarrollan flora intestinal ni inflamación de las articulaciones, es compatible con el desencadenamiento de un ataque autoinmune mediado por linfocitos T frente a bacterias, como se postula en el modelo del péptido artrítogénico. Se han encontrado linfocitos CD8⁺ autoreactivos restringidos a B27 en el líquido sinovial de pacientes con artritis reactiva (Hermann y col., 1993); así como anticuerpos en el suero de pacientes con EA y artritis reactiva que reconocen péptidos derivados de HSP bacterianas unidos a HLA-B27 (Kellner y col., 1994). Las moléculas de clase I también son reconocidas por las células NK, este reconocimiento inhibe la lisis por parte de ciertas NK; el epítipo que determina la especificidad Bw4 está asociado con esta inhibición. Se ha analizado el reconocimiento de distintos subtipos HLA-B27 por clones NK determinándose que la Thr80 confiere protección contra la lisis, ya que esta no es inhibida por B*2702 (Ile80) o por B*2705 mutado en la posición 80 (Luque y col., 1996). A este respecto, Parham ha sugerido que es importante saber si B*2708 confiere susceptibilidad a la enfermedad de la misma manera que B*2705, ya que B*2708 no posee el epítipo Bw4, lo que podría implicar a las células NK en la patogenia de la enfermedad (Parham, 1996). Otros mecanismos como la modulación de la invasión o la supervivencia bacteriana (Kapasi y Inman, 1994; Latio y col., 1997), o el mimetismo de HLA-B27 con péptidos autoantigénicos (Wildner y Thureau, 1994), también podrían desempeñar un papel en la patogénesis

de la enfermedad. Todo esto lleva a pensar que en el mecanismo responsable de la EA hay que considerar la posibilidad de que más de una propiedad de la molécula B27 subyace en la asociación de la misma con la enfermedad.

2. SUBTIPOS DE HLA-B*27.

HLA-B27 fue identificado inicialmente mediante serología; desde entonces, utilizando métodos celulares, bioquímicos y moleculares se han definido diferentes subtipos del gen HLA-B*27 (Breuning y col., 1982; Choo y col., 1986; Ness y Grumet, 1987; Hill y col., 1991; Dominguez y col., 1992; D'Amato y col., 1995; Lopez-Larrea y col., 1995; Petersdorf y Hansen, 1995; Blasczyk y col., 1996). En la doceava Conferencia Internacional de Histocompatibilidad el número de alelos definido asciende a once (B*2701 - 11). Los subtipos de B*27 no están igualmente distribuidos entre los grupos étnicos. B*2705 se ha encontrado en todos los grupos étnicos analizados. B*2701, 02, 08 y 09 han sido descritos en caucasoides, mientras que B*2704, 06 y 07 solo se han encontrado en orientales (Choo y col., 1986; Breur-Vriesendorp y col., 1987; López de Castro, 1989; Choo y col., 1991; Gonzalez-Roces y col., 1994; Hildebrand y col., 1994). B*2703 ha sido observado en población del oeste de África (Hill y col., 1991) y en individuos de descendencia africana (Khan, 1995). Los dos últimos subtipos se han descrito en una familia caucasoide americana con espondiloartropatía, B*2710 , y en una persona japonesa sana, B*2711 (Hasegawa y col., 1997). La secuencia proteica de los subtipos difiere principalmente en trece posiciones localizadas en los exones 2 y 3 (Tabla I.1). La hipótesis más aceptada que explicaría la asociación con la enfermedad es la del péptido artritogénico, según la cual las moléculas B27 presentan un corto péptido artritogénico a los linfocitos CD8⁺. Se ha observado que la localización espacial de las posiciones polimórficas en el surco de unión a péptido, modula el reconocimiento antigénico por los CTL y la unión del péptido (Calvo y col., 1990; Rojo y col., 1993; López y col., 1994; Parker y col., 1994), haciendo posible que los subtipos difieran en la capacidad de presentar péptidos. En este contexto y según la

I. Introducción

hipótesis anterior, los moléculas correspondientes a los subtipos asociados con la enfermedad deben de ser capaces de presentar el péptido artritogénico a los CTL; por contra, las moléculas que no muestran asociación no deberían tener la capacidad de presentarlo. Entre los distintos subtipos B*27, algunos están ciertamente asociados con la EA como B*2705, B*2702 y B*2704 (Breur-Vriesendorp y col., 1987; López-Larrea y col., 1995), mientras que la implicación de otros es cuestionable. B*2701 y 07, los cuales son muy infrecuentes, han sido descritos en uno y varios pacientes respectivamente (MacLean, 1992; López-Larrea y col., 1995); B*2710 se ha descrito también en pacientes (Marcos, 1996). B*2708 sólo se ha encontrado hasta ahora en un individuo. B*2703, 06 y 09 están asociados negativamente con la EA (Hill y col., 1991; D'Amato y col., 1995; López-Larrea y col., 1995; Ren y col., 1997). Sin embargo, B*2703 y B*2706 han sido recientemente encontrados en pacientes con EA (Gonzalez-Roces y col., 1996).

Las propiedades de unión de péptidos por parte de los distintos subtipos B*27, así como el reconocimiento de estos por parte de las células T, han sido recientemente revisadas por López de Castro (López de Castro, 1995). Los péptidos unidos a B27 son normalmente nonámeros, los cuales son estabilizados por contactos que involucran al eje central del péptido y a varias cadenas laterales, las cuales interactúan con cavidades secundarias o "pockets", cuya estructura determina la selectividad por el péptido y es modulada por el polimorfismo. La mayoría de los péptidos unidos a B27 presentan una Arg en el residuo 2, la cual se inserta en la cavidad B; es el polimorfismo situado en la cavidad C/F el que modula la presentación a nivel del residuo carboxi terminal que se ancla en dicha cavidad. Una excepción es B*2703 cuyo polimorfismo afecta a interacciones con el extremo amino terminal del péptido, lo que resulta en una capacidad de unir péptidos y antigenicidad defectivas, con respecto a B*2705. También ha sido estudiada la especificidad de unión de B*2706 (Galocha y col., 1996; García y col., 1997) y B*2709 (Fiorillo y col., 1997), dos de los subtipos no asociados a la EA, y se ha comprobado que ambas moléculas no unen péptidos con Tyr en el extremo carboxiterminal, de manera que según el modelo del péptido artritogénico este tendría Arg en la posición 2 y Tyr en el extremo carboxiterminal.

Tabla I.1. Posiciones polimórficas entre los diferentes subtipos HLA-B27.

Sub tipo	Aminoácido ^a															
	59	74	77	(79)	80	81	82	83	97	(99)	113	(113)	114	116	131	152
2705 ^b	Tyr	Asp	Asp	cgg	Thr	Leu	Leu	Arg	Asn	tat	Tyr	tac	His	Asp	Ser	Val
2701	-	Tyr	Asn	cgc	-	Ala	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2702	-	-	Asn	-	Ile	Ala	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2703	His	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2704	-	-	Ser	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Glu
2706	-	-	Ser	-	-	-	-	-	-	-	-	tat	Asp	Tyr	-	Glu
2707	-	-	-	-	-	-	-	-	Ser	tac	His	-	Asn	Tyr	Arg	-
2708	-	-	Ser	-	Asn	-	Arg	Gly	-	-	-	-	-	-	-	-
2709	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	His	-	-
2710	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Glu
2711	-	-	Ser	-	-	-	-	-	Ser	-	His	-	Asn	Tyr	Arg	-
7301 ^c	-	-	Gly	-	Asn	-	Arg	Gly	Thr	-	-	tat	Asn	Phe	Arg	Val

^a Las posiciones entre paréntesis son mutaciones silentes.

^b Este subtipo puede ser codificado por B*27052 ó B*27053; la diferencia es una mutación silente en el codón 139 (gcg/Egca) que no será analizada.

^c El alelo B*7301 presenta polimorfismos en otras posiciones no indicadas en esta tabla.

Los métodos moleculares utilizados para analizar los subtipos de B*27 consisten en una amplificación del DNA y posterior hibridación con sondas de oligonucleótidos específicas de secuencia (PCR-SSO) (Dominguez y col., 1992) o bien métodos basados en la secuenciación (Petersdorf y Hansen, 1995; Blasczyk y col., 1996).

3. ¿OTROS GENES HLA IMPLICADOS EN LA EA?.

Aunque solamente el 2% de individuos B27+ llegan a desarrollar la EA, la prevalencia entre familiares B27+ de pacientes con EA B27+ está incrementada al menos diez veces (Van der Linden y col., 1984). Estas diferencias conducen a la hipótesis de que otros factores genéticos junto con HLA-B27 están implicados en la patogénesis de la EA, los cuales podrían contribuir o modular la expresión de la enfermedad. Varios trabajos (Robinson y col., 1989; Rubin y col., 1994; Brown y col., 1996) han mostrado que la presencia de HLA-Bw60 en individuos HLA-B27+ incrementa la susceptibilidad a la EA hasta tres veces, lo que sugiere que una subclase desconocida de HLA-Bw60, o un gen en desequilibrio de unión con este, podrían estar implicados en la patogénesis de EA en estas personas. Además, los resultados del reciente estudio de Järvinen sobre la EA en series de gemelos (50% de concordancia en monozigóticos y 20% en dizigóticos) indican que la enfermedad tiene una principal, aunque no completamente, base genética y que un(os) gen(es) distintos a B*27 podrían desempeñar un papel en la enfermedad (Jarvinen, 1995).

Pazmany y col. sugieren que factores genéticos estarían implicados en la presentación antigénica mediada por HLA-B27; esta hipótesis surgió tras la observación de que moléculas B*2702 en los miembros de una familia eran incapaces de presentar ciertos antígenos virales, a pesar de la normal expresión de B*2702 en la superficie celular (Pazmany y col., 1992). Se ha continuado trabajando sobre líneas celulares obtenidas de estos individuos pero no se ha encontrado una correlación entre los polimorfismos conocidos de TAP1 y TAP2 y ese fenotipo (Rowland-Jones y col., 1993), y las líneas celulares son reconocidas por la mayoría de CTL que reaccionan con B*2702 en otras células y los péptidos eluidos de estas moléculas no son anómalos (López y col., 1994). Sin embargo deben existir diferencias en la presentación antigénica, las cuales pueden desempeñar un papel en la susceptibilidad a la enfermedad.

Debido a su localización en el MHC y a su función en la presentación antigénica o en la respuesta inmune, los genes LMP, TAP,

HSP y TNF son ideales candidatos como factores que podrían contribuir en la susceptibilidad a la EA.

3.1. LOS GENES LMP.

Los genes polimórficos LMP2 y LMP7, localizados en la región de clase II del MHC (Glynn y col., 1991; Kelly y col., 1991), codifican para dos subunidades β del proteasoma, su incorporación al mismo está regulada por γ -interferón. Las evidencias más claras de su implicación en la presentación antigénica vienen de las observaciones realizadas en ratones mutantes que carecen de LMP2 (Van Kaer y col., 1994) o LMP7 (Fehling y col., 1994). Los ratones mutantes LMP7 presentan una reducción en los niveles de moléculas de clase I en la superficie celular, lo cual implica a LMP7 en el control de la disponibilidad de péptidos antigénicos. Los mutantes LMP2 aunque no presentan una reducción en los niveles de expresión de clase I, si que presentan una reducción (60-80%) en el número de CTL (posiblemente debido a una alteración en los péptidos disponibles para la selección de estos en el timo). Estas subunidades influirían en la presentación antigénica alterando el patrón de actividades catalíticas del proteasoma; la incorporación de las mismas tiene como resultado un aumento de las actividades tríptica y quimotríptica, corte tras residuos básicos o hidrofóbicos respectivamente, que son los residuos carboxi terminal de los péptidos unidos a clase I, favoreciendo la generación de péptidos inmunogénicos (revisado en Coux y col., 1996).

3.2. LOS GENES TAP.

Los genes polimórficos TAP1 y TAP2, localizados en la región de clase II del MHC (Spies y col., 1990; Trowsdale y col., 1990), codifican las moléculas que forman el heterodímero transportador de péptidos de el citoplasma al lumen del retículo endoplásmico. La primera evidencia de que un transportador específico estaba implicado en la presentación antigénica, derivó del estudio de líneas celulares mutantes que presentaban una baja expresión de moléculas de clase I en la superficie celular y eran deficientes en la presentación antigénica; este defecto se corregía al exponer las células a péptidos antigénicos, posteriormente se realizaron experimentos en los cuales la transfección con los genes que codificaban para TAP1 y TAP2 revertían el defecto en la

I. Introducción

presentación antigénica. Como cabría esperar ratones mutantes que carecen de TAP1 (Van Kaer y col., 1992) y pacientes humanos que carecen de TAP2 (de la Salle y col., 1994; Teisserenc y col., 1997) muestran profundos defectos en la presentación antigénica restringida a clase I.

La revisión más reciente sobre el transporte de péptidos ha sido realizada por York y Rock (York y Rock, 1996). La región de unión a ATP se localiza en porción citoplásmica, al igual que el sitio de unión a péptido que estaría formado por ambas subunidades; el péptido se une al heterodímero independientemente de ATP, pero el transporte es dependiente de ATP. TAP presenta la mayor afinidad por péptidos de 8 a 13 aminoácidos, el tamaño aproximado de los péptidos unidos a clase I, y aunque puede transportar péptidos más cortos o largos su afinidad es menor. También se han estudiado las preferencias por la secuencia de los péptidos que transportan, tanto en humano como ratón y rata. TAP de ratón y TAP de rata codificado por el alelo cim^b transportan preferentemente péptidos con aminoácidos hidrofóbicos o aromáticos en su extremo carboxi terminal; TAP humano y la variante cim^a en rata son más indiscriminados. Hasta ahora parece que el polimorfismo de TAP sólo tiene un principal efecto en su especificidad por péptidos en rata, en cuyos genes TAP existe un elevado grado de polimorfismo.

El polimorfismo de los genes TAP humano es limitado (Colonna y col., 1992; Powis y col., 1992; Powis y col., 1993), aunque continúan describiéndose nuevos polimorfismos (Moins-Teisserenc y col., 1994; Szafer y col., 1994; Cano y Baxter-Lowe, 1995). De los puntos polimórficos descritos en TAP1, uno de ellos (codón 333) está localizado en el dominio hidrofóbico y el resto (codones 637 y 648) se encuentran en la región de unión a ATP. Así mismo, en el gen TAP2 el codón polimórfico 379 se ubica en la región hidrofóbica y el resto de los polimorfismos (codones 565, 651 665 y 687) en la zona de unión a ATP. Los alelos de TAP1 y TAP2 vienen dados por la combinación de los diferentes puntos polimórficos.

Con respecto a la asociación de estos genes y la EA, las moléculas LMP y TAP podrían desempeñar un papel restrictivo en la presentación

antigénica de modo que influirían en el espectro de péptidos disponibles para la unión a HLA-B27 y consecuentemente su presentación a CTL autoreactivos. El polimorfismo de estos genes podría afectar su especificidad, dando como resultado diferentes tipos de péptidos derivados del mismo antígeno en diferentes individuos.

3.3. LOS GENES HSP70.

En la región de clase III, entre los genes del complemento y TNF, se han localizado tres genes que codifican para proteínas de la familia HSP70, a los que se les ha denominado HSP70-1, HSP70-2 y HSP70-hom (Sargent y col., 1989). HSP70-1 y HSP70-2 codifican un producto proteico idéntico que constituye una de las principales HSP70 inducibles por estrés térmico; sin embargo HSP70-hom codifica para uno de los miembros de HSP70 que no son inducibles por calor (Milner y Campbell, 1990). Se ha caracterizado e identificado un limitado polimorfismo en estos tres genes (Milner y Campbell, 1992). Varios estudios han mostrado que las moléculas HSP70 desempeñan un papel importante como chaperonas en el procesamiento y presentación antigénica (Pierce y col., 1991; DeNagel y Pierce, 1992; Suto y Srivastava, 1995). También constituyen el principal blanco de la respuesta inmune en infecciones y son comunes autoantígenos en enfermedades autoinmunes (Young y Elliot, 1989) ó (Winfield y Jarjour, 1991). Recientes estudios del polimorfismo de HSP70 en enfermedades autoinmunes sugieren que estos genes podrían ser determinantes de la susceptibilidad en autoinmunidad (Caplen y col., 1990; Partanen y col., 1993; Pociot y col., 1993a; Jarjour y col., 1996).

3.4. LOS GENES TNF.

Los genes para TNF α y TNF β se localizan entre los genes HSP y HLA-B, 350 kb centroméricamente al locus HLA-B (Carroll y col., 1987) (260 kb (Spies y col., 1986)). Los genes TNF codifican dos citoquinas estrechamente relacionadas que desempeñan un papel importante en la regulación de la respuesta inmune (revisado en Ruddle, 1992) (Ruddle, 1992). Los niveles serológicos de TNF α se encuentran incrementados en pacientes con EA (Gratacos y col., 1994). El examen de biopsias de las articulaciones sacroilíacas de pacientes con EA ha mostrado densos infiltrados celulares en la porción sinovial, con elevadas cantidades de

I. Introducción

mRNA del TNF α (Braun y col., 1995). Además es interesante considerar el hallazgo de Repo y col., los cuales encontraron que las células de pacientes HLA-B27 positivos o negativos con artritis reactiva desencadenada por *Yersinia* y las células de controles HLA-B27 positivos, producían significativamente más TNF que las células de controles HLA-B27 negativos, lo que sugiere que el aumento de la producción de TNF podría ser uno de los factores que contribuyen a los síntomas inflamatorios en pacientes con enfermedades asociadas a HLA-B27 (Repo y col., 1988).

Varios estudios han mostrado que diferencias individuales en la producción de TNF α pueden estar ligadas al HLA (Bendtzen y col., 1988; Jacob y col., 1990; Pociot y col., 1993b), lo que sugeriría que la respuesta de TNF está controlada por elementos genéticos variables dentro del MHC. Una posible explicación de la producción diferencial de TNF α podría radicar en el polimorfismo dentro de la región(es) reguladoras del gen TNF α . El primer polimorfismo bi-alélico de TNF α descrito, implica un cambio de nucleótido de G por A (lo que define los alelos TNF1 y TNF2 respectivamente) en la posición -308 de la región promotora del gen (Wilson y col., 1992). Se ha encontrado un incremento de la frecuencia del alelo TNF2 en pacientes con enfermedades autoinmunes (Wilson y col., 1994; Galbraith y Pandey, 1995) así como en manifestaciones clínicas severas de enfermedades infecciosas (McGuire y col., 1994; Cabrera y col., 1995). Se ha demostrado que este polimorfismo tiene efectos directos sobre la regulación génica y que podría ser responsable de la mayor producción de TNF α (Wilson y col., 1997). Se ha descrito un segundo polimorfismo, que implica también una sustitución de G por A (alelos TNFG y TNFA respectivamente), en la posición -238 de la posible secuencia reguladora ("Y box") del gen (D'Alfonso y Richiardi, 1994), aunque no se ha encontrado una relevancia funcional al mismo (Pociot y col., 1995). Recientemente en la misma secuencia reguladora se ha descrito un tercer polimorfismo (cambio del nucleótido G por A) en la posición -244 en individuos de raza negroide de Sur América (Zimmerman y col., 1996).

En cuanto al gen TNF β , en el primer intrón existe un polimorfismo para Nco I, el cual define los alelos TNF β *1 y TNF β *2. Este

polimorfismo se encuentra siempre asociado con una sustitución en el aminoácido 26 codificado en el exón 3 y se correlaciona con un aumento del nivel de producción de TNF β (Messer y col., 1991). También se ha observado una asociación entre el polimorfismo de TNF β y los niveles de producción de TNF α , pero dependiendo de la población estudiada los alelos se asocian con mayores o con menores niveles de secreción de TNF α (Messer y col., 1991; Abraham y col., 1993; Pociot y col., 1993b).

El **OBJETIVO** de nuestro trabajo es estudiar el polimorfismo de genes implicados en la respuesta inmune: HLA(B27), TAP, LMP, HSP-70 y TNF en enfermos con espondilitis anquilosante. Y analizar la posible influencia de este en la susceptibilidad a la enfermedad comparado con los resultados que obtengamos del estudio de una población control sana.

III. PACIENTES

Se ha analizado B*27 y los subtipos de B*27, junto al polimorfismo de los genes LMP, TAP, HSP70 y TNF en 57 pacientes diagnosticados con espondilitis anquilosante. Los pacientes fueron diagnosticados en el Servicio de Reumatología del Hospital Virgen de las Nieves de Granada; fueron seleccionados siguiendo los criterios modificados de Nueva York para el diagnóstico de EA (Van der Linden y col., 1984b). Los pacientes habían sido tipados serológicamente para B27, sin embargo volvimos a analizar en todos ellos B*27 mediante una técnica basada en PCR-RFLP desarrollada en nuestro laboratorio (Nieto y col., 1996); resultando 52 pacientes B*27+ y 5 pacientes B*27-.

Para establecer las comparaciones se incluyeron en el estudio 746 controles sanos del mismo área geográfica que los pacientes y del mismo origen étnico. Todos ellos fueron tipados para B*27 mediante PCR-RFLP, resultando 35 B*27+. Estos 35 individuos conformarán el grupo de controles B*27+; no presentaban síntomas espondilíticos y no tenían antecedentes familiares de espondiloartropatías, aunque no se llevo a cabo un examen clínico ni radiografía de la pelvis. Se analizaron los subtipos de B*27, los genes LMP, TAP, HSP70 y TNF en todos ellos. Lo que hemos dado en llamar el grupo de "controles al azar", está conformado por 102 controles sanos, de los cuales 5 fueron B*27+ (estos cinco individuos se encuentran también incluidos en el grupo de controles B*27+). Se analizaron los genes LMP, HSP70 y TNF en todos ellos; el análisis del polimorfismo de los genes TAP se llevo a cabo en 61 individuos.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

1. ANÁLISIS DE LOS SUBTIPOS HLA-B*27.

El análisis de los subtipos B*27 se realizó mediante un método desarrollado en nuestro laboratorio basado en PCR-RFLP, el cual se encuentra detalladamente explicado en el capítulo anexo. El sistema de tipaje fue concebido en dos pasos, un tipaje genérico de B*27 seguido de varias dobles digestiones para asignar subtipos. El análisis de B*27 consiste en una amplificación por PCR del locus B con los cebadores CG5 y AN2 (Tabla IV.1) y una posterior digestión con la endonucleasa *Sty* I. El cebador CG5 ha sido previamente descrito y es capaz de hibridar con todos los alelos HLA-B excepto B*5401 (Yoshida y col., 1992); el cebador AN2 se diseñó en base a las secuencias de B*27, en el cebador se introdujeron tres sustituciones para crear sitios de restricción durante la amplificación (Amplification created restriction sites, ACRS) (Haliassos y col., 1989) para analizar determinados subtipos de B*27 (Tabla IV.1). *Sty* I reconoce la secuencia CC(AAG)G en las posiciones correspondientes a los codones 69-71 (codón 70 entre paréntesis) específicas para los alelos B*27 y B*7301 (Nieto y col., 1996); sin embargo B*7301 difiere de B*27 en el extremo 3' del cebador AN2 lo que le hace refractario a la amplificación. En los alelos B*27 la digestión con *Sty* I da como resultado dos fragmentos de 410 y 122 pares de bases (pb). Los alelos que presentan el motivo CCATGG en los codones 50-51 también pueden ser digeridos por *Sty* I pero generan fragmentos de tamaño distinto (466 + 66 pb); el resto de alelos HLA-B no presentan un sitio *Sty* I.

Tabla IV.1. Cebadores utilizados para el tipaje B*27.

	Secuencia* (5'-3')	Aminoácido posición 3'	Cebadores	Tamaño
CG5	GACGACACGCTGTTTCGTGA	29		
AN2	CGATGTAATCCTTGCCGaCGTAcaCGT	116	CG5-AN2	532pb
AN1	GCGCCGTGGATAGAGCAGGAGGGGCCGatG	49	AN1-AN2	472pb
P083	CGGCCTCGCTCTGGccGTAGTgGC	83	CG5-P083	187pb

(* En minúscula se muestran las disparidades introducidas para crear sitios de restricción (ver Tabla IV.2); en itálica cebadores antisentido.

IV. Materiales y Métodos

Para diseñar la estrategia del análisis de los subtipos, se estudiaron los exones 2 y 3 de los alelos B*27 (B*2701-09), con el fin de establecer los polimorfismos más informativos que permitieran su análisis con el menor número de determinaciones. Se realizó una búsqueda de las endonucleasas que reconocieran de forma natural los polimorfismos seleccionados. En el caso de que un polimorfismo de interés no era reconocido naturalmente por una endonucleasa, se diseñaron cebadores modificados que introducían sustituciones adyacentes al codón de interés creando un sitio de restricción durante la amplificación. Las mutaciones seleccionadas junto con las endonucleasas que las detectan se muestran en la Tabla IV.2.

Tabla IV.2. Endonucleasa, secuencias, codones y variaciones alélicas reconocidas por cada endonucleasa.

Endonucleasa	Secuencia	Codones	Variaciones alélicas reconocidas
<i>Sty</i> I	<u>gcc aag gca</u>	69-71	B*2701,02,03,04,05,06,07,08,09
# <i>Nsi</i> I	<u>atg</u> Cat	58-59	B*2703
<i>Dra</i> II	<u>gag Gac</u> ctg	76-78	B*2703,05,07,09
<i>Cac</i> 81 I	a <u>Gc</u> ctg <u>cgg</u>	77-79	B*2704,06,08
<i>Avi</i> II	ctg <u>cgC</u> acc	78-80	B*2701
<i>Dpn</i> II	cgg <u>aTc</u>	79-80	B*2702
§ <i>Sfi</i> I	<u>Ggc cac tac ggc cag</u>	83-87	B*2708
<i>Hsp</i> 92 II	ag <u>C</u> atg	97-98	B*2707
<i>Bse</i> NI	(g/a) <u>ac cag</u> Tac	114-116	B*2706,07
† <i>Pml</i> I	<u>Cac</u> <u>gtg</u>	116-117	B*2709
‡ <i>Drd</i> I	<u>Gac</u> <u>gtg</u> tac <u>gtc</u>	116-119	B*2701,02,03,04,05,08

La secuencia reconocida por la endonucleasa se muestra subrayada; los polimorfismos que se analizan se representan por el nucleótido en mayúscula; en negrita las disparidades introducidas en la amplificación por: # = el cebador AN1, § = el cebador P083, † = sustituciones en las posiciones -3 y -4 (posición 0 = extremo 3') del cebador AN2 y ‡ = sustitución en la posición -9 del cebador AN2.

Todos los polimorfismos que conforman los diferentes subtipos B*27 pueden estar presentes en otros alelos HLA-B, excepto la sustitución His59 que es única en B*2703. Con el fin de conocer si la mutación detectada de hecho corresponde al alelo B*27, independientemente de otro alelo presente en la muestra, las digestiones siempre se llevaron a cabo conjuntamente con *Sty* I. Como resultado de esta doble digestión se puede asegurar que un polimorfismo dado se halla en el mismo

cromosoma que el sitio definido por B*27. Dado que algunas enzimas (*Dpn II*, *Cac81 I* y *Dra II*) reconocen sitios adicionales al polimorfismo de interés y que otros alelos HLA-B podrían ser coamplificados y digeridos, en cada reacción de digestión podrían aparecer múltiples bandas. Sin embargo la interpretación de los resultados es fácil ya que el sistema está concebido de tal modo que solamente una de las bandas es informativa, aquella que comprende la distancia entre el sitio *Sty I* y el correspondiente sitio específico del polimorfismo de interés; el resto de las bandas no son de interés. La banda informativa en cada doble digestión y los patrones esperados para cada alelo se muestran en la Figura IV.1. Como se puede observar todas las amplificaciones se llevan a cabo sobre el producto de digestión CG5-AN2, excepto *Sty I+Sfi I* (CG5-P083) (que diferencia B*2704 de B*2708) y *Sty I+Nsi I* (AN1-AN2) (diferencia B*2703 de B*2705). Aunque el sistema está concebido para analizar los 9 subtipos de B*27, no es necesario realizar todas las dobles digestiones, sino que puede ser racionalmente aplicado en función de los subtipos más frecuentes en la población a estudiar.

CG5-AN2 Sty I +	Avi II	Dpn II	BseNI	Hsp 92 II	Pml I	Cac 8I	Dra II	Drd I	Amplificación con CG5-P083 AN1-AN2	Sty I + Sfi I 46 pb -	
	29pb	30pb	379pb	331pb	385pb	26 pb	22pb	389pb			Sty I + Nsi I 32 pb +
B*2701	+	-	-	-	-	-	-	+		B*2704	-
B*2702	-	+	-	-	-	-	-	+		B*2708	+
B*2704(08)	-	-	-	-	-	+	-	+			
B*2705(03)	-	-	-	-	-	-	+	+			
B*2706	-	-	+	-	-	+	-	-		Sty I + Nsi I	
B*2707	-	-	+	+	-	-	+	-		B*2703	+
B*2709	-	-	-	-	+	-	+	-		B*2705	-
B*73	-	-	+	+	-	+	-	-			

Figura IV.1. Esquema del tipaje de los alelos B*27.

El sistema fue verificado sobre un panel de líneas celulares, donde se observaron cada una de las bandas específicas; la aplicación de la metodología sobre estas líneas celulares y las bandas correspondientes se pueden ver detalladamente en el capítulo anexo.

2. ANÁLISIS DE LOS GENES LMP.

El polimorfismo de los genes LMP fue analizado por PCR-RFLP con sitios de restricción creados durante la amplificación (Vinasco y col., 1997a). El polimorfismo Arg/His en el codón 60 del gen LMP2 (alelos LMP2R/LMP2H) se detecta con: (1) *Cfo* I que reconoce directamente la variante Arg y (2) *Alw*21 I que reconoce directamente la variante His, sin embargo en sentido 3' existe otra secuencia reconocida por *Alw*21 I, el cebador LMP2Y se diseñó de tal modo que introduce una sustitución que destruye dicha secuencia, manteniendo intacta la polimórfica. El polimorfismo Gln/Lys en el codón 145 del gen LMP7 (alelos LMP7Q/LMP7K) se detecta con: (1) *Bsm* I que reconoce la variante Gln y (2) *Hind* III que reconoce la variante Lys, la secuencia para *Hind* III ha sido creada en la amplificación por el cebador LMP7Y. En la Tabla IV.3 se detallan la secuencia de los cebadores, los tamaños de los productos de amplificación, así como los tamaños tras la digestión con la correspondiente endonucleasa.

Tabla IV.3. Cebadores y endonucleasas utilizados para analizar los genes LMP.

	Secuencia (5'-3')	Especificidad	Tamaño del amplificado y el digerido
<u>LMP2</u>			
X	CTTGAACCAGGGAGGCGAAGTTTG*	Extremo 3'	
		Arg-60 (LMP2R)	228pb / <i>Cfo</i> I-199pb
Y	<i>CAGCTG AACCAGAGAGTGCA</i> tAGT#	His-60 (LMP2H)	228pb / <i>Alw</i> 21 I-199pb
<u>LMP7</u>			
X	CGGACAGATCTCTGGGTGCT*	Extremo 3'	
		Gln-145 (LMP7Q)	193 pb / <i>Bsm</i> I-174pb
Y	<i>CTTCCCTACTGCCCC</i> aAgCT#	Lys-145 (LMP7K)	193 pb / <i>Hind</i> III-174pb

(*) Cebadores descritos por Maksymowych y col. (Maksymowych y col., 1995c).

(#) Cebadores descritos por Vinasco y col. (Vinasco y col., 1997a). En minúscula se muestran las disparidades introducidas para destruir un sitio *Alw*21 I, 3' a la posición de interés en LMP2Y o crear un sitio de restricción en LMP7Y. En itálica cebadores antisentido.

El DNA genómico fue obtenido a partir de sangre periférica mediante una extracción estandar fenol/cloroformo previa digestión con proteinasa K. El DNA se amplificó en una mezcla de reacción de 50 μ l que contenía: 0.2-0.5 μ g de DNA genómico, 200 μ M de cada dNTP, 500 nM de cada cebador, 2 unidades de Taq polimerasa y 5 μ l de tampón PCR 10X, suministrado con la polimerasa. Las condiciones para llevar a cabo la PCR fueron: 5 min de desnaturalización inicial a 94°C; 30 ciclos de 94°C durante 1 min, 57°C de temperatura de hibridación durante 50 seg para LMP2 y 62°C durante 45 seg para LMP7, y 72°C durante 1 min; para terminar con 10 min de extensión final a 72°C. Los fragmentos amplificados fueron digeridos con las correspondientes endonucleasas durante 2 a 4 horas. Los productos de digestión se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 4% (3% Nusieve, 1% Seakem, FMC), y se visualizaron con luz ultravioleta obteniéndose registro fotográfico de los mismos.

3. ANÁLISIS DE LOS GENES TAP.

El análisis del polimorfismo de los genes TAP se realizó mediante un método desarrollado en nuestro laboratorio basado en PCR-RFLP con sitios de restricción creados durante la amplificación (Fraile y col., 1996). El gen TAP1 presenta polimorfismo que da lugar a un cambio de aminoácido en los codones 333, 637 y 648; en el gen TAP2 el polimorfismo da lugar a cambio de aminoácidos en las codones 379, 565, 651, 665 y 687. La Tabla IV.4 muestra los alelos de TAP observados hasta ahora, cada alelo es el resultado de una combinación de las dos alternativas en cada codón polimórfico.

IV. Materiales y Métodos

Tabla IV.4. Alelos de TAP1 y TAP2.

TAP1			WHO			
333	637	648				
Ile	Asp	Arg	TAP1A	*0101		
Val	Gly	Arg	TAP1B	*02011 #	*02012 #	
Val	Asp	Arg	TAP1C	*0301		
Ile	Gly	Arg	TAP1D			
Val	Gly	Gln	TAP1E	*0401		
TAP2						
379	565	651	665	687		
Val	Ala	Arg	Thr	Stop	TAP2A	*0101
Val	Ala	Arg	Ala	Gln	TAP2B	*0201
Ile	Ala	Arg	Thr	Stop	TAP2C	
Ile	Thr	Arg	Thr	Stop	TAP2D	
Val	Thr	Arg	Thr	Stop	TAP2E	*0102
Val	Ala	Cys	Thr	Stop	TAP2F	*0103
Val	Ala	Arg	Thr	Gln	TAP2G	
Ile	Ala	Arg	Ala	Gln		*0202

(*) Asignación según la nueva nomenclatura..

(#) TAP1*02011 y *02012 presentan la misma secuencia aminoacídica, se diferencian en un cambio de nucleótido silente.

La técnica se verificó satisfactoriamente en líneas celulares que abarcaban todos los sitios polimórficos (para una consulta detallada ver capítulo anexo). La Tabla IV.5 muestra los cebadores utilizados para analizar cada sitio polimórfico y la correspondiente endonucleasa, junto con los tamaños de los productos de la amplificación y tras la digestión.

Tabla IV.5. Cebadores, endonucleasas y variantes polimórficas de cada endonucleasa.

<u>Sitio polimórfico</u>	<u>Nombre</u>	<u>Secuencia de oligonucleótidos</u>	<u>Especificidad</u>	<u>Tamaño del amplificado y el digerido</u>
TAP1 333 (65°C)	TAP1 333B TAP1 333C	5'-ACCTGGGAACATGGACCACAGGGACAGGGT-3' 5'-GGATCAGTGTCCCTCACCATTTTCACCCTG-3'	Extremo 3' TAP1 Ile-333 TAP1 Val-333	242 bp / BclI-211 bp 242 bp / BstE II-210 bp
TAP1 637 (65°C)	TAP1 637B TAP1 637C	5'-TGGGGAGGCATCCAATGGAACTGGATTTGG-3' 5'-TCATCTTGGCCCTTTGCTCTGCAGAGGTCG-3'	Extremo 3' TAP1 Asp-637	308 bp / Taq I-280 bp
(65°C)	TAP1 637D	5'-TCATCTTGGCCCTTTGCTCTGGCCAGGTAG-3'	TAP1 Gly-637	308 bp / Bgl I-283 bp
TAP1 648 (62°C)	TAP1 637B TAP1 648B TAP1 648B	5'-TGGGGAGGCATCCAATGGAACTGGATTTGG-3' 5'-AGGCTGGGAGCCAGCTGTCAGGGGGTGATC-3'	Extremo 3' TAP1 Arg-648 TAP1 Gln-648	275 bp / Taq I-246 bp 275 bp / Bcl I-249 bp
TAP2 379 (55°C)	TAP2 379B TAP2 379X	5'-TCAGCATCAGCATCTGCA-3' 5'-TGGAACGCGCCTTGTACCTGCAC-3'	Extremo 3' TAP2 Val-379	231 bp / Bsa A I-202 bp
(65°C)	TAP2 379E	5'-TGGAACGCGCCTTGTACCTGATC-3'	TAP2 Ile-379	231 bp / Bcl I-206 bp
TAP2 565 (65°C)	TAP2 565A TAP2 565B	5'-CTCACAGTATGAACACTGCTACCTGCACAG-3' 5'-GGAGCAAGCTTACAATTTGTAGAAGATACC-3'	Extremo 5' Extremo 3'	299 bp / Bgl I-273 bp
(63°C)	TAP2 565C TAP2 565D	5'-TATCATCTTCGCAGCTCTGCGCCCATAGG-3' 5'-CTGTTCTCCGTTCTGTGAGGAACAACAGT-3'	TAP2 Ala-565 TAP2 Thr-565	162 bp / Sca I-132 bp
TAP2 651 (61°C)	TAP2 651A TAP2 651C	5'-GGTGTGAGGGCAGCCCCAGTTCCCT-3' 5'-ATCACCAGCACTGTGCGATCCCCC-3'	Extremo 5' TAP2 Arg-651	260 bp / Sma I-235 bp
(61°C)	TAP2 651T	5'-ATCACCAGCACTGTGCGATCCCCC-3'	TAP2 Cys-651	260 bp / Eco81 I-234 bp
TAP2 665 y 687 (56°C)	TAP2 665A TAP2 665M	5'-ACAGTGCTGGTGATTGCTC-3' 5'-CACAGCTTTAGGGAAACTC-3'	Extremo 5' Extremo 3'	1 ^a PCR-233bp
(56°C)	TAP2 665C	5'-CTGGTGATTGCTCACGCCCTGCAG-3'	TAP2 Ala-665	2 ^a PCR-227 bp / Bgl I-206 bp
(56°C)	TAP2 665D	5'-CTGGTGATTGCTCACAGGCTGTCG-3'	TAP2 Thr-665	2 ^a PCR-227 bp / Sal I-206 bp
(55°C)	TAP2 687A	5'-CTGCAGAAGCTTGCCCCGATC-3'	TAP2 Gln-687 TAP2 Stop-687	2 ^a PCR-158 bp / BamH I-141 bp Bfa I- 137 bp y 96 bp

Cebadores con su secuencia de nucleótidos, especificidad y temperatura de hibridación. Tamaños de los amplificados y después de la digestión con las endonucleasas. Los nucleótidos sub-rayados indican las disparidades introducidas para crear sitios de restricción. Los cebadores antisentido se indican en letra itálica (Fraile y col, 1996).

4. ANÁLISIS DE LOS GENES HSP70.

Los genes HSP70 fueron analizados mediante PCR-RFLP: el polimorfismo G/C en la posición 190 del gen HSP70-1 (define los alelos HSP70-1*b1 / HSP70-2*b2) fue detectado con la endonucleasa *BsrB I* (reconoce el nucleótido G); el polimorfismo A/G en la posición 1267 del gen HSP70-2 (define los alelos HSP70-2 1 / HSP70-2 2) fue detectado con *Pst I* (reconoce el nucleótido A); el polimorfismo T/C en la posición 2437 del gen HSP70-hom (define los alelos HSP70-hom 1 / HSP70-hom 2) fue detectado con *Nco I* (reconoce el nucleótido T). En la Tabla IV.6 se muestran los cebadores y las endonucleasas utilizadas para analizar los tres genes HSP70; las condiciones de amplificación, los tamaños de los amplificadores y de los productos de digestión han sido previamente descritos (Milner y Campbell, 1992; Ishihara y col., 1995; Vinasco y col., 1997b).

Tabla IV.6 Cebadores y endonucleasas utilizados para analizar los genes HSP70.

	Secuencia (5'-3')	Especificidad	Endonucleasa
<u>HSP70-1</u>	TCCGGCGTCCGGAAGGACC* <i>TGCGGCCAATCAGGCGCTT*</i>	HSP70-1*b1	<i>BsrB I</i>
<u>HSP70-2</u>	TTTGAGGGCATCGACTTCTACACG# <i>CTCAAAGACAAACATACTAAAGAA#</i>	HSP70-2 1	<i>Pst I</i>
<u>HSP70-hom</u>	GGACAAGTCTGAGAAGGTACAG§ <i>GTAAGTCTGAGAAGGTACAG§</i>	HSP70-hom 1	<i>Nco I</i>

(*) Cebadores descritos por Ishihara y col. (Ishihara y col., 1995)

(#) Cebadores descritos por Vinasco y col. (Vinasco y col., 1997b).

(§) Cebadores descritos por Milner y col. (Milner y Campbell, 1992).

En itálica cebadores antisentido.

5. ANÁLISIS DE LOS GENES TNF.

El análisis del polimorfismo en las posiciones -308 y -238 del gen TNF α se llevó a cabo mediante una técnica desarrollada en nuestro laboratorio basada en PCR-RFLP con sitios de restricción creados en la amplificación (Vinasco y col., 1997c). El polimorfismo -308 G/A (define los alelos TNF1 y TNF2) fue detectado con *Nco* I y *Rca* I (nucleótidos G y A respectivamente), y el polimorfismo -238 G/A (define los alelos TNFG y TNFA) fue detectado con *Ava* II y *Bgl* II (nucleótidos G y A respectivamente); el polimorfismo -244 G/A fue detectado sobre el mismo producto de PCR con *Dde* I (nucleótido A) (Zimmerman y col., 1996). El polimorfismo *Nco* I del gen TNF β , define los alelos TNF β *1 y TNF β *2, fue analizado aplicando un protocolo de PCR-RFLP descrito previamente en la literatura (Messer y col., 1991b).

Tabla IV.7. Cebadores y endonucleasas utilizados para analizar los genes TNF.

	Secuencia (5'-3')	Especificidad	Endonucleasa
TNFα			
α 1	AGGCAATAGGTTTTGAGGGcCAT	-308 G (TNF1)	<i>Nco</i> I
α 2	AGGCAATAGGTTTTGAGGGtCAT	-308 A (TNF2)	<i>Rca</i> I
α 3	ACACTCCCCATCCTCCCTGgTC	-238 G (TNFG)	<i>Ava</i> II
α 4	ACACTCCCCATCCTCCCaGaTC	-238 A (TNFA)	<i>Bgl</i> II
		-244 A	<i>Dde</i> I
TNFβ			
A	CCGTGCTTCGTGCTTTGGACTA	TNF β *1	<i>Nco</i> I
B	CAGACATGTCCCCACCAGCTC		

(*) En minúscula se muestran las disparidades introducidas para crear sitios de restricción; en itálica cebadores antisentido.

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.

Parte del análisis estadístico de los datos se realizó en el programa Epi Info Versión 6. Las diferencias entre las frecuencias de los distintos genotipos, haplotipos o alelos, se evaluaron mediante el método de la Chi-cuadrada (Mantel-Haenszel); la prueba exacta de Fisher se aplicó cuando uno de los valores esperados era menor de 5. El valor estadístico de cada test (p) fue multiplicado por el número de comparaciones realizadas (p_c), corrección de Bonferroni. La razón de ventajas (odds ratio, OR) fue calculada según el método de Woolf o la modificación de Haldane cuando era necesario. El nivel de significación de la OR se calculó según la fórmula $(1/V) (\text{Log}_e \text{OR})^2$; el valor es comparado según una distribución chi-cuadrada con un grado de libertad y debe de ser mayor de 3.84 para alcanzar significación estadística ($p < 0.05$) (Dyer y Warrens, 1994).

El desequilibrio de unión entre dos loci (por ejemplo, B*27 y TNF), se evaluó mediante el método de la Chi-cuadrada (Mantel-Haenszel) a partir de tablas 2 X 2. Los valores delta se calcularon de acuerdo con la fórmula: $\Delta = h_{ij} - p_i q_j$, donde h_{ij} es la frecuencia observada de un haplotipo dado (por ejemplo, B*27-TNF) y $p_i q_j$ es la frecuencia esperada de estos dos loci, basada en el producto de las frecuencias de cada uno de ellos (de B*27 y de TNF). Cuando no se conoce la homocigosidad u heterocigosidad de un gen, la frecuencia génica (g) se calcula a partir de la frecuencia observada (f) según la fórmula: $g = 1 - \sqrt{1 - f}$.

En el caso de que dos factores estén asociados a la enfermedad, se siguió el análisis propuesto por Svejgaard y Ryder (Svejgaard y Ryder, 1994) para detectar la asociación más fuerte.

V. RESULTADOS

1. DISTRIBUCIÓN DE HLA-B*27.

El gen HLA-B*27, así como sus subtipos, se analizaron en 746 individuos controles sanos y en 57 pacientes con espondilitis anquilosante; en la Tabla V.1.a se muestra la frecuencia de los alelos B*27 en individuos sanos y en pacientes con EA. Treinta y cinco de 746 controles fueron positivos para B*27 mediante PCR-RFLP, lo que establece una frecuencia del alelo B*27 del 4.69%; la frecuencia entre los pacientes con EA fue del 91.2% ($p=10^{-8}$; OR=211.27). El posterior análisis de los subtipos de B*27 reveló la presencia de los alelos B*2705, B*2702 y B*2707; todos ellos se encontraban asociados a la enfermedad (Tabla V.1.a) aunque con diferentes intensidades (diferente fuerza), reflejando probablemente las diferencias en la frecuencia de cada alelo. No se observaron diferencias significativas en la distribución de los subtipos B*27 entre controles sanos y pacientes con EA, B*27 positivos (Tabla V.1.b). B*2705 fue el alelo predominante tanto en pacientes con EA como en controles (90.38% y 77.1%, respectivamente). B*2702 se encontró incrementado en los controles (20% vs 7.7% en EA) aunque la diferencia no alcanzó significación estadística ($p = 0.09$). B*2707 no se había observado en población caucasoide hasta la fecha, sin embargo en los grupos estudiados se presentó en un control y en un paciente con EA (2.9% y 1.92%, respectivamente).

Tabla V.1. Análisis de las frecuencias de B*27 en pacientes con EA comparadas con controles sanos.

A						
	Controles (n=746)		Pacientes EA (n=57)		<i>p</i>	OR (<i>p</i>)
B*27	35 (4.69%)	52 (91.2%)			10^{-8}	211.27 (10^{-7})
B*2705	27 (3.61%)	47 (82.45%)			10^{-8}	125.16 (10^{-7})
B*2702	7 (0.93%)	4 (7%)			0.005*	7.97 (10^{-3})
B*2707	1 (0.13%)	1 (1.75%)			0.13*	13.3 (0.06)

* Test exacto de Fisher.

V. Resultados

B

B*27+	Controles		Pacientes EA		<i>p</i>
	(n=35)		(n=52)		
B*2705	27	(77.1%)	47	(90.38%)	NS
B*2702	7	(20%)	4	(7.7%)	NS
B*2707	1	(2.9%)	1	(1.92%)	NS

NS = no significativo.

2. DISTRIBUCIÓN DE LMP.

Se analizó el polimorfismo de los genes LMP2 y LMP7 en 57 pacientes con EA y en el grupo de "controles al azar" (Tabla V.2). No se observaron diferencias significativas en la distribución de los genotipos de LMP2 entre pacientes y controles. Sin embargo, se observaron diferencias significativas en la distribución de genotipos de LMP7, el genotipo LMP7-Q/Q estaba incrementado en pacientes con respecto a controles ($p_c < 0.018$; OR = 14.45, $p < 0.011$). La aparente asociación entre LMP7 y la EA podría deberse a una asociación de este con HLA-B*27, para determinar esta asociación o desequilibrio de unión evaluamos la asociación de los alelos LMP7 y HLA-B*27 y calculamos sus valores delta en el grupo de controles al azar. No se encontró desequilibrio de unión entre el alelo LMP7Q y B*27 ($\Delta_{rel} = 0.015$; $p = 0.14$).

Tabla V.2. Distribución de los genotipos de LMP2 Y LMP7 en pacientes con EA y controles.

	EA		Controles al azar		<i>p_c</i>	OR (<i>p</i>)
	n=57	(%)	n=102	(%)		
LMP2						
R/R	33	(58)	56	(55)	NS	1.12
H/H	1	(2)	3	(3)	NS	0.58
R/H	23	(40)	43	(42)	NS	0.92
LMP7						
Q/Q	57	(100)	91	(89)	0.018	14.45 (0.011)
K/K	0	(0)	3	(3)	NS	0.24
Q/K	0	(0)	8	(8)	NS	0.09

Si como parece LMP7 esta asociado a la EA, tales diferencias se deben de mantener al comparar la distribución entre pacientes y controles B*27 positivos (Tabla V.3). La frecuencia del genotipo LMP7-Q/Q volvía a estar significativamente incrementada en pacientes ($p_c < 0.024$; OR = 18.93, $p < 0.008$); consecuentemente la presencia del alelo LMP7-K se encontraba disminuida ($p_c < 0.016$; OR = 0.05, $p < 0.006$).

Tabla V.3. Distribución de los genotipos y fenotipos de LMP7 entre pacientes y controles B*27 positivos.

	EA B27 + *		Controles B27+ †		p_c	OR (p)	
	n=52	(%)	n=35	(%)			
LMP7							
Q/Q	52	(100)	30	(86)	0.024	18.93	(0.008)
K/K	0	(0)	2	(6)	NS	0.24	
Q/K	0	(0)	3	(9)	NS	0.09	
Presencia de Q	52	(100)	33	(94)	NS	7.83	
Presencia de K	0	(0)	5	(14)	0.016	0.05	(0.006)

(*) Los 5 pacientes B*27 negativos también fueron LMP7-Q/Q.

(†) Incluye el grupo de controles sanos B*27 positivos (n = 30) y los individuos B*27 positivos seleccionados del grupo de controles al azar (n = 5; 4 LMP7-Q/Q y 1 LMP7-K/K).

Para determinar si el efecto de HLA-B27 y LMP7-Q/Q es independiente o sinérgico, analizamos los datos como sugieren Svejgaard y Ryder (Svejgaard y Ryder, 1994) (Tabla V.4). Los test 1 y 2 indican que tanto HLA-B27 como LMP7-Q/Q están significativamente asociados a la EA. El test 3 indica que B*27 está asociado en los individuos LMP7-Q/Q positivos; sin embargo el test 4 no se pudo llevar a cabo ya que ningún paciente presenta el alelo LMP7-K. Los test 5 y 6 nos informan de que LMP7-Q/Q no está asociado independientemente de B*27, si no que ambos factores están interaccionando (test 8) con el riesgo más elevado para aquellos individuos que poseen ambos factores (OR = 268) en comparación con aquellos que presentan solamente B*27 (OR = 201).

V. Resultados

Tabla V.4. Asociación de B*27 y LMP7-Q/Q con la EA.

Factor A: B27	Factor B: LMP7-Q/Q	Pacientes (n°)	Controles (n°)
+	+	52	4
+	-	0	1
-	+	5	87
-	-	0	10

Comparaciones	OR	p_c^*	Test	Conclusión
A vs no-A	201	5×10^{-8}	1. A asociado?	A asociado
B vs no-B	14.4	0.04	2. B asociado?	B asociado
++ vs --	226	5×10^{-8}	3 A asociado en B positivos?	
+- vs --	-	-	4 A asociado en B negativos?	
++ vs +-	35	NS	5 B asociado en A positivos?	B no asociado independiente de A
-+ vs --	1.32	NS	6 B asociado en A negativos?	
+- vs -+	5.3	NS	7. Diferencias entre A y B?	No diferencia
++ vs --	268	5×10^{-8}	8. Asociación combinada de A-B?	A y B interaccionan

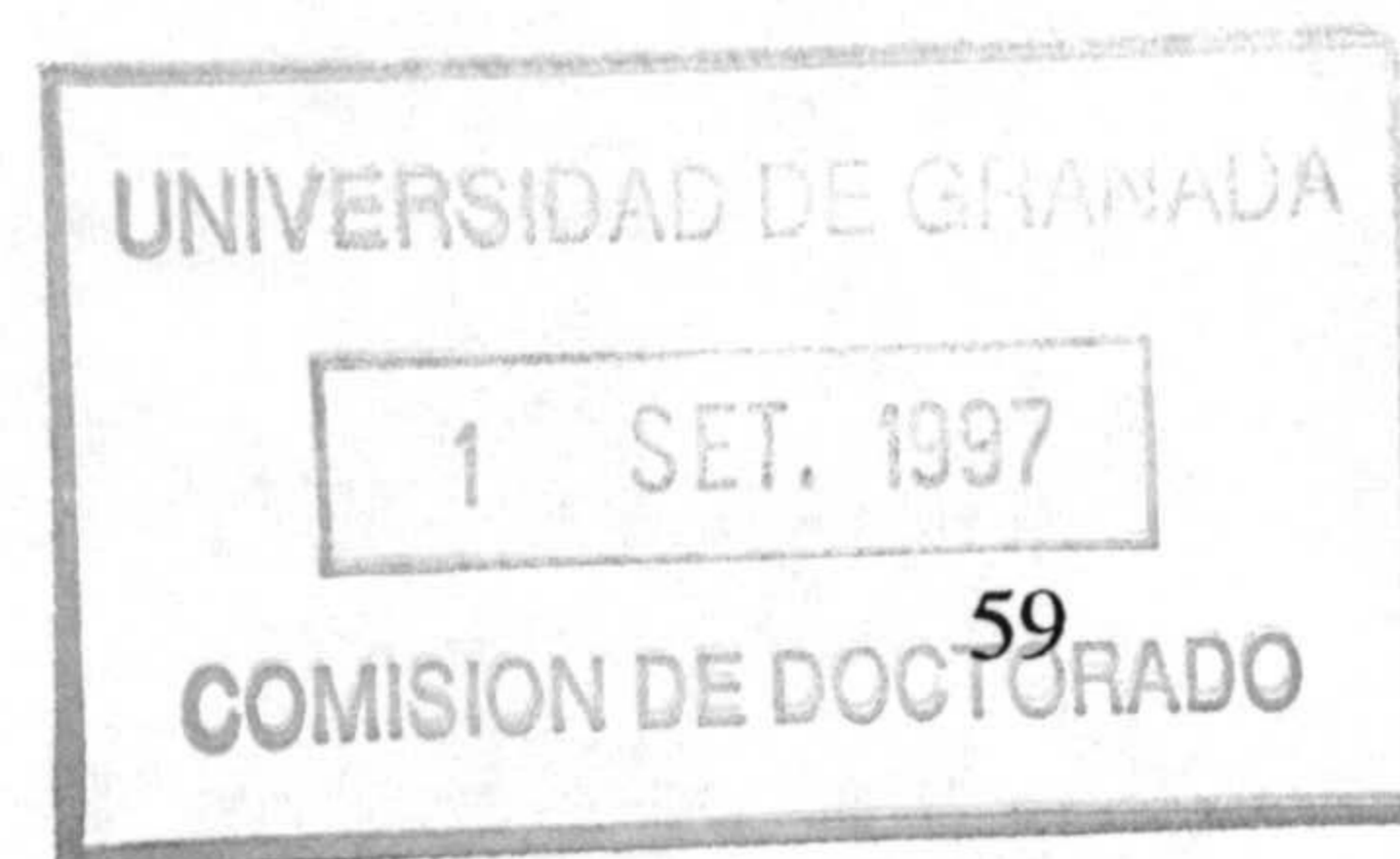
(*) El factor de corrección es 8: tres genotipos + 5 comparaciones (los factores A y B están asociados y el test 4 no se puede realizar).

3. DISTRIBUCIÓN DE TAP.

La combinación de las tres posiciones polimórficas en TAP1 y las 5 posiciones en TAP2 da lugar a una serie de potenciales alelos, sin embargo no todas las combinaciones han sido encontradas; en la Tabla IV.4 se resumían los alelos de TAP1 y TAP2 observados. Hasta ahora, en población caucasoide la sustitución que define Ala-665 siempre se ha encontrado unida a la que define Gln-687; del mismo modo la Thr-665 se ha encontrado con Stop-687 (Carrington y col., 1993).

Se determinaron las sustituciones presentes en los genes TAP1 y TAP2 en 44 pacientes con EA, en 61 individuos controles que conformaban el grupo de "controles al azar", y en 35 controles B*27 positivos. Los alelos TAP1 se pudieron asignar inequívocamente en el 88% de los pacientes con EA, el 77% de los controles al azar y en el 86% de los controles B*27 positivos; en el resto no fue posible asignar alelos debido a que estos individuos eran heterocigotos en las posiciones 333 y 637. En cuanto a TAP2, no se pudieron asignar alelos en 9 de los 44 pacientes con EA, en 5 de los 61 controles al azar y en 6 de los 35 controles B*27 positivos. Considerando la aparente unión de Ala-665/Gln-687 y Thr-665/Stop-687 se pudieron asignar alelos en tres pacientes y dos de estos controles, de manera que dos pacientes y los controles fueron asignados como TAP2 BF y un paciente como TAP2 BE. En el resto de los individuos, a los cuales no se pudieron asignar alelos, las combinaciones de los polimorfismos podrían dar lugar a alelos descritos; a excepción de un paciente con las siguientes sustituciones: Val/Ile-379, Thr-565, Arg-651, Ala/Thr-665 y Gln/Stop-687, las cuales pueden dar lugar a al menos un alelo no descrito hasta ahora.

En la Tabla V.5 se muestra la distribución de los genotipos de TAP1 y TAP2 en los pacientes con EA, controles al azar y controles B*27 positivos. No se observaron diferencias significativas en ninguno de los genotipos entre los distintos grupos estudiados.



V. Resultados

Tabla V.5. Distribución de los genotipos de TAP1 y TAP2 en pacientes con EA y controles.

	EA		Controles al azar		p_c	Controles B27 +	
	n=44	(%)	n=61	(%)		n=35	(%)
TAP1							
A/A	33	(75)	41	(67)	NS	26	(74)
A/C	0	(0)	1	(2)	NS	3	(9)
A/D	1	(2)	3	(5)	NS	0	(0)
B/B	1	(2)	0	(0)	NS	1	(3)
B/D	4	(9)	0	(0)	NS	0	(0)
D/D	0	(0)	1	(2)	NS	0	(0)
F/F	0	(0)	1	(2)	NS	0	(0)
NA*	5	(11)	14	(23)	NS	5	(14)
TAP2							
A/A	6	(14)	14	(23)	NS	8	(23)
A/B	12	(27)	15	(25)	NS	10	(29)
A/C	4	(9)	5	(8)	NS	1	(3)
A/D	0	(0)	1	(2)	NS	0	(0)
A/E	1	(2)	2	(3)	NS	0	(0)
A/F	4	(9)	6	(10)	NS	4	(11)
B/B	6	(14)	5	(8)	NS	4	(11)
B/E	1	(2)	0	(0)	NS	0	(0)
B/F	3	(7)	5	(8)	NS	2	(6)
C/C	0	(0)	2	(3)	NS	0	(0)
C/D	0	(0)	1	(2)	NS	1	(3)
D/E	1	(2)	0	(0)	NS	1	(3)
NA*	6	(14)	5	(8)	NS	4	(11)

(*) NA: no asignados; no fue posible asignar alelos en aquellos individuos que eran heterocigotos para dos o más posiciones polimórficas.

La comparación de las frecuencias de los alelos TAP1 y TAP2 en pacientes y controles se muestra en la Tabla V.6. La frecuencia del alelo TAP1B estaba significativamente incrementada en pacientes con EA en comparación con controles al azar ($p_c < 0.035$; OR = 15.8, $p < 0.01$). Sin embargo, cuando se comparaba la frecuencia de TAP1B entre pacientes y controles B*27 positivos dicha diferencia desaparecía (7%

Tabla V.6. Distribución de los alelos TAP1 y TAP2 en pacientes con EA y controles.

	EA		Controles al azar		<i>pc</i>	OR (<i>p</i>)		EA B27 +		Controles B27 +		<i>pc</i>
	n=39	(%)	n=47	(%)		n=37	(%)	n=30	(%)			
TAP1												
A	67	(86)	86	(91)	NS			65	(88)	55	(92)	NS
B	6	(8)	0	(0)	0.035	15.8	(0.01)	5	(7)	2	(3)	NS
C	0	(0)	1	(1)	NS			0	(0)	3	(5)	NS
D	5	(6)	5	(5)	NS			4	(5)	0	(0)	NS
F	0	(0)	2	(2)	NS							
	<u>n=38</u>	<u>(%)</u>	<u>n=56</u>	<u>(%)</u>				<u>n=35</u>	<u>(%)</u>	<u>n=31</u>	<u>(%)</u>	
TAP2												
A	33	(43)	57	(51)	NS			31	(44)	31	(50)	
B	28	(37)	30	(27)	NS			26	(37)	20	(32)	
C	4	(5)	10	(9)	NS			3	(4)	2	(3)	
D	1	(1)	2	(2)	NS			1	(1)	2	(3)	
E	3	(4)	2	(2)	NS			2	(1)	1	(2)	
F	7	(9)	11	(10)	NS			7	(10)	6	(10)	

Tabla V.7. Distribución de los fenotipos de TAP1 y TAP2 en pacientes con EA y controles.

	EA		Controles al azar		pc	EA B27 +		Controles B27 +	
	n=39	(%)	n=47	(%)		n=37	(%)	n=30	(%)
TAP1									
A	34	(87)	45	(96)	NS	33	(89)	29	(97)
B	5	(13)	0	(0)	NS	4	(11)	1	(3)
C	0	(0)	1	(2)	NS	0	(0)	3	(10)
D	5	(13)	4	(9)	NS	4	(11)	0	(0)
F	0	(0)	1	(2)	NS				
	<u>n=38</u>	<u>(%)</u>	<u>n=56</u>	<u>(%)</u>		<u>n=35</u>	<u>(%)</u>	<u>n=31</u>	<u>(%)</u>
TAP2									
A	27	(71)	43	(77)	NS	26	(74)	23	(74)
B	22	(58)	25	(45)	NS	21	(60)	16	(52)
C	4	(11)	8	(14)	NS	3	(9)	2	(6)
D	1	(3)	4	(7)	NS	1	(3)	2	(6)
E	3	(8)	2	(4)	NS	2	(6)	1	(3)
F	7	(18)	11	(20)	NS	7	(20)	6	(19)

vs 3%). En cuanto a la distribución de las frecuencias los alelos de TAP2 no se observaron diferencias entre los grupos estudiados.

En la Tabla V.7 se muestran las frecuencias de los fenotipos de TAP1 y TAP2 en los grupos estudiados. El fenotipo TAP1B se encontraba incrementado en pacientes con respecto a controles ($p < 0.016$), aunque dicha diferencia no fue significativa tras la corrección. Las frecuencias de los fenotipos de TAP2 fueron similares en los grupos estudiados.

4. DISTRIBUCIÓN DE HSP70 y TNF.

4.1. FRECUENCIAS DE LOS GENES HSP70 EN PACIENTES Y CONTROLES.

El polimorfismo G/C 190 en la región 5'UT del gen HSP70-1, el polimorfismo A/G 1267 en la región codificante del gen HSP70-2 y el polimorfismo T/C 2437 también en la región codificante del gen HSP70-hom fue determinado en 56 pacientes con EA y en 132 individuos controles. Los genotipos de HSP70-1 y HSP70-2 se encontraban uniformemente distribuidos en el grupo de "controles al azar" sin embargo no lo estaban en el grupo de pacientes (Tabla V.8 y V.9). En la Tabla V.8 se muestran las frecuencias genotípicas de HSP70-1; se observaron diferencias significativas para el genotipo b2/b2 entre los pacientes con EA y los controles al azar ($p_c < 0.021$), el genotipo b2/b2 presentaba una frecuencia menor en pacientes comparada con controles (OR = 0.21, $p < 0.015$). En la Tabla V.9 también se muestran diferencias significativas para el genotipo HSP70-2 1/1 ($p_c < 0.045$), este genotipo también presentaba una frecuencia menor en el grupo de pacientes comparado con controles (OR = 0.23, $p < 0.022$). Como se muestra en la Tabla V,10 no se encontraron diferencias significativas para el polimorfismo de HSP70-hom en los grupos estudiados; el genotipo poco común HSP70-hom 2/2 se encontraba ausente entre los pacientes y el grupo de controles al azar, solamente un individuo control B*27 positivo presentó este genotipo. Para comprobar que las diferencias que encontramos en la distribución de genotipos de HSP70-1 y HSP70-2 entre pacientes y controles al azar, estaban asociadas con la enfermedad, procedimos a comparar la

V. Resultados

frecuencia de estos genotipos entre pacientes B*27 positivos con EA y controles B*27 positivos (Tabla V.8 y V.9); tras comparar observamos que dichas diferencias desaparecían. Por otra parte, analizamos la distribución de genotipos HSP70 en cada subtipo B*27 por separado, con el fin de evaluar si existían diferencias significativas entre pacientes y controles con un subtipo determinado, sin embargo no se encontraron diferencias en ninguno de los tres subtipos presentes.

Recientemente se ha analizado la asociación entre los alelos de estos tres loci HSP70, tanto en líneas celulares homocigotas como en estudios en familias (revisado en Westman y col., 1994) (Westman y col., 1994), encontrándose de las ocho combinaciones alélicas posibles solamente tres, lo que sugería una asociación entre estos tres loci. Con el fin de investigar esta asociación en nuestros grupos de estudio, pudimos asignar combinaciones alélicas en 28 pacientes con EA y en 74 controles (se asignaban en el caso de homocigosis para los tres loci o cuando uno de los tres era heterocigoto) (Tabla V.11). El alelo HSP70-hom 2 se encontró sólo en combinación con HSP70-2 2 como había sido previamente descrito; sin embargo, el alelo HSP70-hom 1 se encontró en todas las combinaciones posibles (con: 1 1 - 2 1, 1 1 - 2 2, 1 2 - 2 1 y 1 2 - 2 2), aunque con distintas frecuencias. Aunque el sitio polimórfico de HSP70-1 analizado en nuestro caso no es el mismo que el estudiado en los otros trabajos, nuestros resultados sugieren que los genes HSP70 no segregan en combinaciones tan fijas como las descritas hasta ahora. Observamos diferencias significativas en la distribución de combinaciones alélicas entre pacientes y controles al azar, pero estas desaparecían cuando comparábamos pacientes y controles B*27 positivos.

Tabla V.8. Distribución de los genotipos de HSP70-1 en pacientes con EA y controles.

	EA		Controles al azar		<i>p</i> c	OR	<i>p</i>	EA B27 +		Controles B27+		<i>p</i> c
	n=56	(%)	n=102	(%)				n=51	(%)	n=35	(%)	
b1/b1	24	(43)	34	(33)	NS			22	(43)	20	(57)	NS
b2/b2	3	(5)	22	(22)	0.021	0.21	(0.015)	3	(6)	3	(9)	NS
b1/b2	29	(52)	46	(45)	NS			26	(51)	12	(34)	NS

Tabla V.9. Distribución de los genotipos de HSP70-2 en pacientes con EA y controles.

	EA		Controles al azar		<i>p</i> c	OR	<i>p</i>	EA B27 +		Controles B27+		<i>p</i> c
	n=56	(%)	n=102	(%)				n=51	(%)	n=35	(%)	
1/1	3	(5)	20	(20)	0.045	0.23	(0.022)	2	(4)	3	(9)	NS
2/2	20	(36)	35	(34)	NS			18	(35)	16	(46)	NS
1/2	33	(59)	47	(46)	NS			31	(61)	16	(46)	NS

Tabla V.10. Distribución de los genotipos de HSP70-hom en pacientes con EA y controles.

	EA		Controles al azar		<i>p</i> c
	n=55	(%)	n=102	(%)	
1/1	46	(84)	70	(69)	NS
2/2	0	(0)	0	(0)	-
1/2	9	(16)	32	(31)	NS

Tabla V.11. Distribución de combinaciones alélicas HSP70 en pacientes con EA y controles.

HSP70			EA		Controles al azar		<i>p</i> _c	OR (<i>p</i>)		EA B27 +		Controles B27+		<i>p</i> _c
-1	-2	-hom	n=56	(%)	n=112	(%)				n=52	(%)	n=35	(%)	
1	1	1	6	(11)	5	(5)	NS			6	(11)	3	(7)	NS
1	2	1	37	(66)	45	(41)	0.006	2.9	(0.001)	33	(63)	29	(66)	NS
1	2	2	5	(9)	12	(11)	NS			5	(10)	6	(13)	NS
2	1	1	5	(9)	39	(35)	0.001	0.18	(7 x 10 ⁻⁴)	5	(10)	6	(13)	NS
2	2	1	3	(5)	8	(7)	NS			3	(6)	0	(0)	NS
2	2	2	0	(0)	1	(1)	NS			0	(0)	0	(0)	NS

Tabla V.14. Distribución de combinaciones alélicas TNF en pacientes con EA y controles.

TNF α		TNF β	EA		Controles al azar		<i>p</i> _c	OR (<i>p</i>)		EA B27 +		Controles B27+		<i>p</i> _c
-308	-238		n=94	(%)	n=170	(%)				n=88	(%)	n=35	(%)	
1	G	1	40	(43)	27	(16)	7 x 10 ⁻⁶	3.92	(4 x 10 ⁻⁶)	39	(44)	23	(40)	NS
1	G	2	49	(52)	126	(74)	0.001	0.38	(3 x 10 ⁻⁴)	45	(51)	32	(55)	NS
1	A	2	0	(0)	12	(7)	0.016	0.06	(0.009)	0	(0)	2	(3)	NS
2	G	1	5	(5)	5	(3)				4	(5)	1	(2)	NS

4.2. FRECUENCIAS DE LOS GENES TNF EN PACIENTES Y CONTROLES.

En la Tabla V.12 se muestra la distribución del polimorfismo en las posiciones -308 y -238 del gen TNF α , en pacientes con EA y en controles al azar. No se observaron diferencias significativas ni en las frecuencias genotípicas ni alélicas de TNF α entre los pacientes y los controles. Como se esperaba, el polimorfismo *Dde* I de TNF α estaba ausente en la población estudiada. Las frecuencias genotípicas de TNF β se muestran en la Tabla V.13a. Se observó una frecuencia significativamente más alta del genotipo TNF β *1/TNF β *2 en pacientes que en controles ($p_c < 0.003$; OR = 3, $p < 9 \cdot 10^{-4}$), y una frecuencia menor de TNF β *2/TNF β *2 ($p_c < 2 \times 10^{-5}$; OR = 0.19, $p < 9 \cdot 10^{-6}$). El alelo TNF β *1 era significativamente más frecuente en pacientes con EA ($p_c < 6 \times 10^{-5}$; OR = 2.85, $p < 2 \cdot 10^{-5}$). Sin embargo, cuando comparamos el polimorfismo de TNF β entre pacientes y controles B*27 positivos, no detectamos ni diferencias genotípicas ni alélicas. El análisis en los distintos subtipos de B*27 tampoco reveló diferencias.

Se han descrito diferentes niveles de producción de TNF por monocitos HLA-B27 positivos en comparación con monocitos HLA-B27 negativos (Repo y col., 1988). Por lo tanto nos propusimos analizar los genes TNF entre individuos B*27 positivos y B*27 negativos con el fin de encontrar diferencias que explicasen dicho fenómeno. Con respecto a los polimorfismos estudiados de TNF α no observamos diferencias. Encontramos diferencias significativas en la distribución de los alelos TNF β ($p_c < 8 \times 10^{-6}$), el alelo TNF β *1 presentaba una frecuencia más elevada en individuos B*27 positivos (OR = 2.82, $p < 5 \times 10^{-6}$), mientras que el alelo TNF β *2 presentaba una frecuencia más baja (OR = 0.22, $p < 5 \times 10^{-6}$) (Tabla V.13b).

Se pudieron asignar combinaciones alélicas TNF α -TNF β en 47 pacientes y en 111 controles, solamente se encontraron cuatro de las ocho combinaciones posibles. El alelo TNF β *1 se encontró en combinación con TNF1-TNFG y TNF2-TNFG, mientras que el alelo TNF β *2 aparecía en combinación con TNF1-TNFG y TNF1-TNFA. La distribución de estas combinaciones entre pacientes y controles al azar

Tabla V.12. Distribución de los genotipos de TNF α en pacientes con EA y controles.

	EA		Controles al azar		<i>p</i> _c
	n=54	(%)	n=102	(%)	
-308					
1/1	46	(85)	84	(82)	NS
2/2	0	(0)	2	(2)	NS
1/2	8	(15)	16	(16)	NS
-238					
G/G	48	(89)	83	(81)	NS
A/A	0	(0)	0	(0)	-
G/A	6	(11)	19	(19)	NS

Tabla V.13.

A) Distribución de los genotipos de TNF β en pacientes con EA y controles.

	EA		Controles al azar		<i>p</i> _c	OR (<i>p</i>)	EA B27 +		Controles B27+		<i>p</i> _c
	n=57	(%)	n=102	(%)			n=52	(%)	n=35	(%)	
b1/b1	9	(16)	6	(6)	NS		8	(15)	2	(6)	NS
b2/b2	12	(21)	59	(58)	2×10^{-5}	0.19 (9×10^{-6})	10	(19)	7	(20)	NS
b1/b2	36	(63)	37	(36)	0.003	3 (9×10^{-4})	34	(65)	26	(74)	NS

B) Distribución de los alelos TNF β entre individuos B*27 positivos y negativos.

	B27 +		B27 -		<i>p</i> _c	OR (<i>p</i>)
	n=87	(%)	n=97	(%)		
1	80	(46)	45	(23)	8×10^{-6}	2.82 (5×10^{-6})
2	94	(54)	149	(77)	8×10^{-6}	0.22 (5×10^{-6})

V. Resultados

reveló diferencias significativas aunque estas desaparecían al comparar pacientes y controles B*27 positivos (Tabla V.14)

4.3. DESEQUILIBRIO DE UNIÓN ENTRE HSP70 Y TNF CON B*27.

Para explicar los resultados discrepantes obtenidos entre pacientes y controles al azar y los obtenidos entre pacientes y controles B*27 positivos, analizamos la posible existencia de un desequilibrio de unión entre B*27 y los alelos HSP70 o TNF. En una primera aproximación, analizamos el desequilibrio de unión en pacientes y en controles por separado; no se observaron diferencias en la asociación de B*27 con alguno de los alelos de HSP70 o de TNF. Por lo tanto, decidimos agrupar los pacientes y los controles y analizarlos conjuntamente para el desequilibrio de unión. Como se muestra en la Tabla V.15, el alelo HSP70-1 b1 está fuertemente asociado con B*27 ($p_c < 0.002$, OR = 1.96) con un valor delta de 0.157, comparado con el valor delta del alelo HSP70-1 b2 de 0.034; también el alelo TNF β *1 mostró una fuerte asociación con B*27 ($p_c < 1 \times 10^{-5}$, OR = 2.69) con un $\Delta = 0.118$, comparado con el valor delta del alelo TNF β *2 de 0.061. Se observó una asociación entre los alelos B*27 y HSP70-2 2 ($p < 0.04$, OR = 1.53) pero esta no fue significativa tras la corrección. En vista de la proximidad física de los loci HSP70 y TNF a HLA-B, estas asociaciones, con bastante seguridad, se deben a desequilibrio de unión. Por lo tanto, la asociación de B*27 con los alelos HSP70-1 b1 y HSP70-2 2 podría explicar la baja frecuencia de los genotipos HSP70-1 b2/b2 y HSP70-2 1/1 en los pacientes con EA. Del mismo modo, la fuerte asociación de B*27 con TNF β *1 podría explicar la elevada frecuencia del alelo TNF β *1 en pacientes con EA.

Tabla V. 15. Asociación de Hsp70-1 y TNF β con B*27.

	Frecuencias observadas	p_c	OR	(p)	Δ
<u>B*27 - Hsp70-1</u>					
b1	0.32	0.002	1.96	(0.002)	0.157
b2	0.13	0.002	0.50	(0.002)	0.034
<u>B*27 - TNFβ</u>					
1	0.21	1×10^{-5}	2.69	(1×10^{-5})	0.118
2	0.24	1×10^{-5}	0.37	(1×10^{-5})	0.061

VI. DISCUSIÓN

La tecnología de la PCR ha sido de gran utilidad en el estudio del polimorfismo de genes humanos permitiendo fácilmente la investigación de una variante particular (alelo) de un individuo. Durante estos últimos años se han desarrollado gran cantidad de métodos basados en la amplificación de extensiones de DNA que codifican las partes polimórficas de un gen, utilizando la PCR. Podemos resumir los métodos utilizados para detectar polimorfismos en: a) la hibridación del producto amplificado con oligonucleótidos específicos de secuencia (PCR-SSO), b) la detección de polimorfismo en el mismo paso de la PCR mediante el uso de cebadores específicos de secuencia (PCR-SSP) o c) la utilización de cebadores refractarios a la amplificación (PCR-ARMS), d) cambios conformacionales del producto de la PCR como el polimorfismo conformacional de cadena sencilla (PCR-SSCP), e) secuenciación del producto amplificado y f) la digestión específica del producto amplificado con enzimas de restricción (PCR-RFLP). La PCR-RFLP, es un técnica rápida y simple para estudiar polimorfismos o mutaciones puntuales (Inoko, 1990). Las endonucleasas de restricción se seleccionan por su capacidad de definir el polimorfismo a través de los fragmentos de restricción de los productos de la PCR. Sin embargo en la mayoría de los casos no hay una endonucleasa que reconozca directamente el polimorfismo, en tales circunstancias un cebador modificado introduce sustituciones adyacentes al codón de interés durante la amplificación (ACRS), de tal forma que se genera artificialmente un sitio de restricción específico (Haliassos y col., 1989).

La estrategia PCR-RFLP+ACRS ha sido ampliamente utilizada en nuestro laboratorio para el tipaje de una serie de genes del MHC como son el grupo de genes HLA de clase II DRB1*04 (Nieto y col., 1997), el gen B*27 y sus subtipos (Nieto y col., 1996; Fraile y col., 1997), los genes TAP (Fraile y col., 1996), los genes LMP (Vinasco y col., 1997a) y el gen TNF α (Vinasco y col., 1997c).

Encontramos que la PCR-RFLP+ACRS es una alternativa favorable a otros métodos utilizados para identificar los alelos del gen B*27 como la PCR-SSO (Dominguez y col., 1992) o la secuenciación del gen amplificado (Petersdorf y Hansen, 1995; Blasczyk y col., 1996), y de

los genes TAP por PCR-SSO (Powis y col., 1992), PCR-SSCP (Colonna y col., 1992) o la más comúnmente utilizada PCR-ARMS (Powis y col., 1993). En cuanto al análisis por PCR-RFLP de una de las variantes de los genes LMP (Maksymowych y col., 1994; Maksymowych y col., 1995c) o del gen TNF α (Wilson y col., 1992; D'Alfonso y Richiardi, 1994; McGuire y col., 1994) ACRS complementa el método al ser analizadas las dos variantes polimórficas. El análisis por PCR-SSCP seguido de secuenciación del DNA que presente un patrón alterado, es un sistema muy útil para identificar nuevos polimorfismos pero no se utiliza rutinariamente para el análisis de polimorfismos descritos debido al gran consumo de tiempo que conlleva y al alto coste (Orita y col., 1989). En la PCR-SSO, las reacciones de hibridación requieren de un ajuste fino de las temperaturas de hibridación y lavado para evitar hibridaciones falso positivas y falsos negativos; la discriminación de secuencias que difieren en un solo nucleótido puede resultar difícil de conseguir; otro inconveniente reside en los problemas de interpretación derivados de la intensidad de la señal obtenida, ya que en muchos casos no se trata de reacciones "todonada", y en un mismo filtro pueden observarse señales de distinta intensidad. En cuanto a las técnicas basadas en la amplificación específica, la especificidad de una reacción de amplificación va a depender de muchos factores, los cuales han de ser cuidadosamente calibrados para obtener un resultado realmente específico; factores que influirían en la amplificación serían: cantidad y calidad del DNA, la temperatura de hibridación de los cebadores, la concentración de la DNA polimerasa, los dNTPs y el ion Mg $^{++}$; por lo tanto, es obligatorio el ajuste fino, fundamentalmente de estos parámetros, para conseguir la especificidad deseada; también hay que considerar las restricciones a la hora de diseñar los cebadores, ya que se ha demostrado que no todas las disparidades en el extremo 3' del cebador con respecto a la secuencia molde, son igualmente refractarias a la amplificación. En cuanto a los métodos basados en secuenciación, en general, poseen una alta fiabilidad; sin embargo surgen problemas en el caso de que se analicen los dos alelos conjuntamente, ya que en las posiciones heterocigotas es frecuente que la incorporación de nucleótidos no sea equivalente; en ciertos casos se intenta solventar el problema analizando los alelos por

separado y para ello se recurre a amplificaciones específicas, con los inconvenientes anteriormente citados.

Aunque la PCR-RFLP+ACRS necesita un paso adicional en comparación con los métodos basados en amplificaciones específicas, los resultados son mucho más fiables que los obtenidos por otros métodos. La principal ventaja del método es la fiabilidad que se basa en varios hechos: a) Como herramienta para detectar polimorfismos, las enzimas de restricción son muy superiores a la amplificación específica y a la hibridación, haciendo que los falsos positivos sean muy improbables. b) Solo los resultados positivos son tomados en cuenta para asignar un alelo, por ello es por lo que se analizan las dos variantes de cada sitio polimórfico. c) La información redundante, en virtud de la necesidad de ser congruente, es un mecanismo de control del sistema del que otros métodos carecen; de esta forma se controlan posibles falsos negativos, y la aparición de incongruencias llevaría a la repetición cuidadosa de los experimentos. Otra característica importante del sistema es la flexibilidad, se pueden incorporar nuevos polimorfismos al método de tipaje y el uso de ACRS permite beneficiarse del análisis de restricción de una forma ilimitada, ya que puede crear o eliminar sitios de restricción cuando no se dispone de uno natural o informativo. Además, las endonucleasas son reactivos muy bien caracterizados, las cuales trabajan idénticamente sin la necesidad de procesos laboriosos de optimización, de manera que los métodos pueden ser transferidos fácilmente de laboratorio a laboratorio.

El característico polimorfismo "a parches" del sistema HLA hace necesario que cada alelo sea analizado independientemente del otro, para obtener así una inequívoca asignación de los alelos. Esto se ha conseguido en otros métodos de tipaje mediante amplificaciones grupo-específicas. Esta aproximación en el contexto de un número aún indeterminado de genes y pseudogenes estrechamente relacionados como es el MHC, conlleva el riesgo de amplificaciones inespecíficas. Sin embargo, como en el caso del tipaje de los alelos de B*27, la utilización de co-digestiones hace innecesaria la amplificación grupo-específica. Al mismo tiempo la interpretación de los resultados es fácil ya que solamente un fragmento dado es

informativo en cada caso. El método desarrollado para el analizar los subtipos permite buscar primero el alelo más frecuente en una población dada; también permite incorporar nuevos alelos en el esquema de tipaje, en este sentido se diseñarán los correspondientes cebadores y endonucleasas para discriminar B*2710 y B*2711. Al igual que en el método por PCR-SSO, sólo se detectarían nuevos alelos en el caso en el que los polimorfismos normalmente analizados estén implicados en la nueva combinación.

Utilizando el método PCR-RFLP hemos estudiado la asociación de B*27 y sus subtipos con la espondilitis anquilosante en una población del sur de España. La asociación observada con B*27 fue muy fuerte (OR = 211.27, $p < 10^{-7}$). Cuando analizamos los subtipos, inesperadamente encontramos que B*2707 estaba representado tanto en pacientes con EA como controles, aunque con baja frecuencia. El producto de la PCR CG5-AN2 del paciente fue clonado y secuenciado, y fue idéntico a la secuencia descrita para B*2707 (Choo y col., 1991); sin embargo no excluimos la posibilidad formal de que existan mutaciones en otros lugares fuera del fragmento secuenciado. B*2707 se ha descrito solamente en población oriental (López-Larrea y col., 1995), confirmamos la falta de antecedentes orientales en el paciente positivo para B*2707, aunque no fue posible obtener este dato en el individuo control.

B*2705 fue el subtipo más fuertemente asociado con la EA (OR = 125.16, $p < 10^{-7}$) seguido de B*2702 (OR = 7.97, $p < 10^{-3}$). La asociación con B*2707 fue menos clara, pero a pesar de su baja frecuencia el hallazgo de un paciente positivo para este alelo lleva a la conclusión de que este también está asociado con la EA (Sorrentino, 1996). No se encontraron diferencias significativas en la distribución de los diferentes subtipos entre pacientes y controles B*27 positivos en nuestra población. La distribución de B*2705 y B*2702 en los pacientes con EA es muy similar a la previamente descrita en pacientes españoles con EA (Gonzalez-Roces y col., 1994), sin embargo difiere en el grupo control (B*2702: 20% vs 3.6% en Gonzalez-Roces, 1994; B*2705: 77.1% vs 96.4% en Gonzalez-Roces, 1994). Creemos importante señalar que recientemente se ha encontrado que el subtipo B*2702 está sobrerrepresentado en

individuos caucasiodes del Norte de África (Gonzalez-Roces y col., 1996), de manera que la frecuencia incrementada de B*2702 a expensas de B*2705 en nuestra población del sur de España podría ser un reflejo de su origen ancestral.

A pesar de la fuerte asociación de HLA-B27 con la EA, un 90% de los enfermos presentan el antígeno B27, solamente un 2% de individuos sanos HLA-B27 positivos desarrollan la enfermedad, sin olvidar que la enfermedad se puede presentar en individuos que carecen de este antígeno. Además, la prevalencia de EA en familiares adultos B27 positivos de pacientes con EA B27 positivos, está incrementada al menos diez veces (Van der Linden y col., 1984a). Este incremento entre los miembros de las familias afectadas llevó a la hipótesis de que otros factores genéticos junto al alelo B*27 podrían participar en la susceptibilidad a la EA. Se ha estudiado la distribución de otros alelos del locus HLA-B entre los pacientes B27 positivos con EA que actuasen conjuntamente con B27 e incrementasen la susceptibilidad a la EA. Se encontró que HLA-Bw60 estaba significativamente aumentado en los pacientes B*27 positivos, incrementado la susceptibilidad a la EA hasta tres veces (Robinson y col., 1989; Rubin y col., 1994); lo que sugiere que HLA-Bw60 o un gen en desequilibrio de unión con este podrían estar implicados en la patogénesis de la EA en estos individuos. Con el propósito de buscar otros factores genéticos que contribuyesen a la EA, analizamos una serie de genes localizados en el MHC y que están implicados de una manera u otra en la respuesta inmune.

Los genes polimórficos LMP2 y LMP7 codifican para dos subunidades del proteasoma que se incorporan al mismo tras la inducción con γ -interferón; la importancia de los productos de estos genes en el procesamiento antigénico para las moléculas de clase I, se evidenció claramente en los modelos de ratones mutantes que carecían de estos genes, una reducción en los niveles de moléculas de clase I en la superficie celular y una reducción en el número de CTLs, se observaron en los ratones que carecían de LMP7 y LMP2 respectivamente. En nuestro estudio no hemos encontrado ninguna diferencia entre el polimorfismo del gen LMP2 y la susceptibilidad a la EA. No hemos contemplado el polimorfismo de LMP con respecto

a la expresión de la enfermedad. En concordancia con nuestros resultados, estudios previos tampoco han encontrado una asociación entre el polimorfismo de LMP2 y la susceptibilidad a la EA (Burney y col., 1994; Maksymowych y col., 1994; Ploski y col., 1995; Maksymowych y col., 1995a; Maksymowych y Russell, 1995b). Los estudios de Maksymowych y col. encuentran un incremento significativo del genotipo LMP2-R/R entre pacientes con uveitis anterior aguda o artritis periférica, en comparación con los pacientes que no presentan estas manifestaciones clínicas o los controles B*27 positivos; estos autores proponen que el gen LMP2 desempeñaría un papel en las manifestaciones clínicas de la enfermedad más que en la susceptibilidad a la EA. Sin embargo, los resultados de otros autores no apoyan esta hipótesis, ya que no encuentran dichas diferencias en sus poblaciones estudiadas (Burney y col., 1994; Ploski y col., 1995). Las razones de estas discrepancias no están claras.

Un estudio sobre el polimorfismo del gen LMP7 y la posible asociación con la susceptibilidad a la EA no se había realizado hasta ahora. Interesantemente, observamos una asociación significativa entre el genotipo LMP7-Q/Q y la EA en nuestra población. Estos resultados también podrían ser interpretados como un papel protector del alelo LMP7-K en la susceptibilidad a la EA. Consideramos que hay tener precaución a este respecto debido a la baja frecuencia del alelo LMP7-K (14%) y pensamos que estudios más amplios en diferentes poblaciones serán necesarios para confirmar esta observación. Una posible explicación para la asociación que encontramos podría radicar en que la distribución de los haplotipos en los individuos B*27 positivos fuera diferente entre los pacientes y los controles, lo que explicaría tales diferencias con respecto a LMP7. Sin embargo, en el análisis de otros genes polimórficos (subtipos de B*27, TAP, HSP70 y TNF) no encontramos diferencias en la distribución de las frecuencias de esos alelos en pacientes con EA comparados con controles, lo que sugiere una homogeneidad entre los grupos estudiados. Además nuestros datos indican que el riesgo conferido por el genotipo LMP7-Q/Q es más débil que el asignado a HLA-B27 y que la presencia de ambos factores, B27 y LMP7-Q/Q, confiere un riesgo relativo mayor que el

de B27 por sí solo. Por lo tanto es probable que el gen LMP7 pueda actuar como un factor menor adicional de susceptibilidad a la EA.

El mecanismo que subyace al efecto de los alelos LMP7 es meramente especulativo y se necesitan estudios funcionales para valorar el efecto que podría tener la incorporación de las subunidades LMP7Q y/o LMP7K en el proteasoma. Estos estudios deberían contestar la cuestión de si la incorporación de subunidades alélicas en el proteasoma influiría en la eficiencia y/o el espectro de péptidos generados a partir de proteínas durante el procesamiento antigénico. Es interesante señalar que una sustitución en el gen LMP2 en ratón es idéntica tanto en posición como en el cambio de aminoácido que produce a la presente en el LMP2 humano (Nandi y col., 1996), y que observaciones preliminares sugieren que este polimorfismo estructural podría tener consecuencias funcionales. En el caso de que el polimorfismo de LMP7 tuviera consecuencias funcionales nos podríamos encontrar que dependiendo de las subunidades que se incorporasen al proteasoma (LMP7-Q/Q, LMP7-K/K o LMP7-K/Q) tendríamos diferentes péptidos a partir de la misma proteína para ser presentados por las moléculas de clase I, de manera que la incorporación de dos subunidades LMP7Q facilitaría la generación del péptido artritogénico que sería presentado por la molécula HLA-B27.

La importancia de los productos de los genes TAP y su relación con las moléculas de clase I surgió de la observación de que líneas celulares que presentaban una deleción en la región de clase II del MHC eran incapaces de presentar antígenos a los CTLs (Spies y col., 1990; Trowsdale y col., 1990). Estudios posteriores demostraron que los productos de los genes TAP1 y TAP2 pertenecían a la familia de transportadores ABC, y su función como transportadores de péptidos era fundamental en la expresión estable de las moléculas de clase I en la superficie celular. Tanto TAP1 como TAP2 son polimórficos, sin embargo continúa sin aclararse completamente cual de estos polimorfismos tiene implicaciones funcionales. Se han caracterizado los homólogos de TAP1 y TAP2 en rata y ratón; parece que sólo en rata el extenso polimorfismo de este transportador influye en el espectro de péptidos que transporta. Es más, no se ha

observado que diferentes alelos de TAP difieran en la especificidad de transporte de péptidos unidos a la molécula HLA-B27 (Kuipers y col., 1996). Aunque hasta ahora no se haya descrito que el polimorfismo de los genes TAP humanos altere la especificidad por los péptidos a transportar, un estudio reciente ha mostrado que la creación de una mutación puntual en el gen TAP2 es suficiente para alterar la especificidad de transporte (Armandola y col., 1996). Por otro lado las variaciones recientemente descritas en TAP1 (codón 648) y TAP2 (codón 651) no han sido estudiadas con relación a la selectividad del transporte (Obst y col., 1995), pudiendo tener significado funcional.

En el presente estudio analizamos la asociación de los genes TAP, que incluye las posiciones polimórficas en los codones 333, 637 y 648 de TAP1 y en los codones 379, 565, 651, 665 y 687 de TAP2, y la susceptibilidad a la EA. Encontramos un incremento significativo del alelo TAP1B en pacientes comparado con el grupo de controles "al azar", sin embargo esta diferencia desaparecía al comparar los pacientes con EA B*27 positivos con el grupo de controles B*27 positivos. Aunque hemos sido incapaces de encontrar una asociación significativa entre B*27 y el alelo TAP1B en los grupos estudiados, tanto por separado como conjuntamente, el no encontrar diferencias significativas en la frecuencia del alelo TAP1B entre los pacientes y controles B*27 positivos sugiere que este alelo es más prevalente en los individuos B*27 y que no es un factor que desempeñe un papel en la susceptibilidad a la EA. En cuanto al polimorfismo de TAP2 no encontramos diferencias significativas entre pacientes y controles. De acuerdo con nuestros resultados otros estudios tampoco han encontrado una asociación entre el polimorfismo de los genes TAP y la susceptibilidad a la EA (Colonna y col., 1992; Burney y col., 1994; Westman y col., 1995; Maksymowych y col., 1995d). El estudio de Colonna y col. analizaba un número pequeño de pacientes; en los estudios de Burney y col. y Westman y col. el análisis de TAP1 se realiza mediante ARMS, además ambos grupos asumen que debido a que no se había observado el alelo TAP1D, a los individuos heterocigotos para las dos posiciones estudiadas, 333 y 637, se les asignaban los alelos TAP1AB. Mediante nuestro método, y al igual que Maksymowych y col. que utilizan PCR-RFLP para analizar las

posiciones 333 y 637 de TAP1, encontramos que el alelo TAP1D está presente tanto en pacientes como en controles, y ambos no asignamos alelos en los individuos heterocigotos para estas dos posiciones. Aunque en nuestro estudio no hemos contemplado las manifestaciones clínicas de la enfermedad, el estudio de Burney y col. subdivide a los pacientes según la presencia o ausencia de uveítis y no encuentran diferencias con respecto a los genes TAP, por contra el estudio de Maksymowych y col. encuentra que el alelo TAP1B está significativamente incrementado en los pacientes que presentan manifestaciones extraespinales (uveítis y artritis periférica) en comparación con aquellos que no las presentan; la discrepancia de estos dos estudios debe residir en que el primer grupo no contemplaba la asignación del alelo TAP1D lo que daría como resultado una distribución errónea de los alelos en las poblaciones estudiadas, de manera que el polimorfismo del locus TAP1 podría influir la manifestación de la enfermedad en los pacientes con EA. Con respecto al locus TAP2 este también ha sido analizado por Burney y col. y Westman y col., ambos grupos encuentran un incremento significativo del alelo TAP2E tanto en pacientes como en controles B*27 positivos comparados con controles al azar (3.5% y 4.3% vs 0% en el estudio de Burney y col.; 13-20% y 16-22% vs 1-7% en el estudio de Westman y col.). En nuestro análisis no encontramos dicho incremento (4% y 2% vs 2%), estas discrepancias creemos que son debidas a los polimorfismos estudiados y como consecuencia los alelos asignados; ambos grupos solamente estudian las posiciones 379, 565 y 665 lo que limita el número de alelos que pueden asignar y la equivocada asignación que pueden hacer de estos, de hecho en su estudio el alelo TAP2E responde a la combinación Val-379, Thr-565 y Thr-665 la cual puede ser asignada entre otras en los individuos Val-379, Ala/Thr-565 y Thr-665, si se tienen en cuenta las cinco posiciones polimórficas de TAP2 las combinaciones anteriores se pueden asignar a los alelos TAP2A, TAP2E y TAP2F (este último sólo se diferencia del A en la posición 651, lo que también aumenta en esos estudios el número de asignaciones equivocadas), lo que sobrestimaría el alelo TAP2E en perjuicio de TAP2F, de hecho en nuestro estudio encontramos que el alelo TAP2F supone un 10% de los alelos en los grupos estudiados. Creemos que el estudio de la asociación de los

genes TAP en enfermedades autoinmunes hay que realizarlo de la forma más exhaustiva posible y teniendo en cuenta todas las posiciones polimórficas, lo que permitirá una más exacta asignación de alelos y al mismo tiempo la posibilidad de descubrir nuevas combinaciones que den lugar a alelos no descritos, y quizás relevantes en la susceptibilidad o desarrollo de alguna enfermedad.

Las HSP70 han sido analizadas por su posible asociación con varias enfermedades autoinmunes debido a su localización en el MHC, su participación en la presentación antigénica y en la respuesta inmune. Recientemente se ha demostrado que el dominio de unión a péptido de las proteínas HSP70 podría tener una estructura muy similar a la de las moléculas de clase I, en base a esta similitud con las moléculas de clase I se ha sugerido un modelo hipotético para el dominio de unión a péptido de HSP70 (Rippmann y col., 1991). El polimorfismo *Nco* I del gen HSP70-hom identifica un cambio de T por C en la posición 2437, que provoca una sustitución del aminoácido Met por Thr el cual se situaría en el propuesto surco de unión a péptido, es más en uno de los bolsillos que determinan especificidad de unión. Si el modelo estructural fuera correcto este cambio podría estar asociado con variaciones en la especificidad de unión a péptido de HSP70-hom entre haplotipos. En nuestro estudio no encontramos diferencias significativas en las frecuencias genotípicas de HSP70-hom entre pacientes con EA y controles; nuestros resultados confirman los obtenidos previamente por Westman y col. (Westman y col., 1994), los cuales tampoco encontraron diferencias. Con respecto a las frecuencias genotípicas de HSP70-1 y HSP70-2, encontramos que los genotipos HSP70-1 b2/b2 y HSP70-2 1/1 estaban significativamente disminuidos en pacientes con EA comparados con controles al azar. Cuando se compararon las frecuencias entre pacientes y controles B*27 positivos, estas diferencias desaparecían ya que la frecuencia de dichos genotipos también estaba disminuida en los controles B*27 positivos. De hecho cuando analizamos la posible asociación de B*27 con los genes HSP70, encontramos que B*27 estaba asociado con los alelos HSP70-1 b1 y HSP70-2 2 lo que explicaría la diferencias significativas en la primera comparación. También analizamos la distribución de genotipos HSP70 en cada uno de los subtipos de B*27 entre

pacientes con EA y controles pero no encontramos diferencias significativas.

Por otra parte se había analizado la asociación entre alelos de estos tres loci HSP70, encontrándose sólo tres de las ocho combinaciones posibles, lo que sugeriría que los tres genes HSP70 segregan en combinaciones alélicas fijas y que tales combinaciones alélicas podrían ser funcionalmente diferentes. Estos aspectos son meramente especulativos hasta que se conozca la función exacta de estos tres genes en la respuesta inmune. Cuando analizamos la asociación de las tres HSP70 al nivel de nuestro estudio, encontramos seis de las ocho combinaciones alélicas posibles, lo que sugiere que la segregación de estos genes no se produce de una manera tan fija como la descrita previamente. Creemos que estas tres HSP70 del MHC ni individualmente ni en posibles combinaciones funcionales, desempeñen un papel independiente en la susceptibilidad a la EA.

El TNF ha sido implicado en la etiología de algunas enfermedades autoinmunes. Con respecto a la EA, se ha encontrado que los niveles del suero de TNF α están incrementados en pacientes con EA (Gratacos y col., 1994) y se han detectado elevadas cantidades de mRNA de TNF α en infiltrados celulares en la porción sinovial de biopsias de articulaciones sacroilíacas. Se ha mostrado que el polimorfismo de los genes TNF determina los niveles de TNF α ; de hecho se ha descrito un efecto directo del polimorfismo -308 del gen TNF α en la producción de TNF α . Sin embargo cuando analizamos este polimorfismo no encontramos diferencias ni genotípicas ni alélicas entre los pacientes con EA y los individuos controles, como había sido previamente descrito por Verjans y col. (Verjans y col., 1994). Con respecto al polimorfismo en las posiciones -244 y -238 en el mismo gen TNF α , tampoco encontramos diferencias. El polimorfismo *Nco* I en el gen TNF β se ha correlacionado con los niveles de producción de TNF β (Messer y col., 1990a); es más este polimorfismo parece influir los niveles de secreción de TNF α , pero como ocurre esto se desconoce, podría deberse a un desequilibrio de unión con otros elementos dentro del propio gen TNF α . En nuestro estudio detectamos diferencias alélicas y genotípicas del gen TNF β

entre pacientes y controles al azar, estas diferencias no fueron encontradas en un estudio previo realizado por Verjans y col. (Verjans y col., 1991). Sin embargo cuando el polimorfismo de TNF β se comparó entre pacientes y controles B*27 positivos, estas diferencias desaparecían.

El estudio de haplotipos de TNF α -TNF β reveló diferencias significativas en pacientes con EA en comparación con controles al azar, sin embargo estas de nuevo no se observaban al comparar pacientes y controles B*27 positivos. Nuestro estudio mostró que B*27 está fuertemente asociado con el alelo TNF β *1, el cual se encuentra solamente en combinación con TNFG (TNF1-TNFG y TNF2-TNFG), estos resultados podrían sugerir que el alelo TNF β *1 está en desequilibrio de unión con otros elementos reguladores de la producción de TNF α . En este punto es importante recordar las observaciones de Repo y col. (Repo y col., 1988), los cuales muestran un incremento significativo de la producción de TNF por células B*27 positivas en comparación con las células B*27 negativas; según nuestros resultados postulamos que esta mayor producción de TNF se debe a la fuerte asociación de B*27 con el alelo TNF β *1 y otros elementos reguladores, tal producción podría tener consecuencias en el desarrollo de la EA y otras enfermedades asociadas a HLA-B27. Consideramos que se requieren futuros análisis de los genes TNF α -TNF β para identificar todos los polimorfismos asociados con enfermedad y analizar su importancia en la regulación de TNF α . Al margen de las consideraciones anteriores creemos que el polimorfismo de los genes TNF no es un factor independiente en la susceptibilidad a la EA.

VII. CONCLUSIONES

VII. Conclusiones.

- 1.- PCR-RFLP+ACRS se ha mostrado como un método adecuado para el análisis del polimorfismo conocido de genes del MHC.
- 2.- Los alelos B*2705, B*2702 y B*2707 se encuentran asociados a la espondilitis anquilosante.
- 3.- El gen LMP7 influye, conjuntamente con B*27, en la susceptibilidad a la espondilitis anquilosante.
- 4.- Los genes LMP2, TAP, HSP70 y TNF no desempeñan un papel independiente en la susceptibilidad a la espondilitis anquilosante.



VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Abraham, LJ, French, MA , Dawkins, RL. (1993). Polymorphic MHC ancestral haplotypes affect the activity of tumour necrosis factor-alpha. *Clin Exp Immunol* **92**: 14-8.
- Archer, JR, Whelan, MA, Badakere, SS, McLean, IL, Archer, IV , Winrow, VR. (1990). Effect of a free sulphhydryl group on expression of HLA-B27 specificity. *Scand J Rheumatol Suppl* **87**: 44-50.
- Armandola, EA, Momburg, F, Nijenhuis, M, Bulbuc, N, Frü, K , Hämerling, GJ. (1996). A point mutation in the human transporter associated with antigen processing (TAP2) alters the peptide transport specificity. *Eur J Immunol* **26**: 1748-1755.
- Barnstable, CJ, Jones, EA , Crumpton, MJ. (1978). Isolation, structure and genetics of HLA-A, -B, -C and -DRw (Ia) antigens. *Br Med Bull* **34**: 241-246.
- Benacerraf, B , McDevitt, HD. (1972). Histocompatibility-linked immune response genes. *Science* **175**: 273-279.
- Bendtzen, K, Morling, N, Fomsgaard, A, Svenson, M, Jakobsen, B, Odum, N , Svejgaard, A. (1988). Association between HLA-DR2 and production of tumour necrosis factor alpha and interleukin 1 by mononuclear cells activated by lipopolysaccharide. *Scand J Immunol* **28**: 599-606.
- Benjamin, R , Parham, P. (1990). Guilt by association: HLA-B27 and ankylosing spondylitis. *Immunol. Today* **11**: 137-142.
- Björkman, P , Parham, P. (1990). Structure, function and diversity of class I major histocompatibility complex molecules. *Annu Rev Biochem* **59**: 253-258.
- Björkman, PJ, Saper, MA, Samraoui, B, Bennett, WS, Strominger, JL , Wiley, DC. (1987a). Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* **329**: 506-512.
- Björkman, PJ, Saper, MA, Samraoui, B, Bennett, WS, Strominger, JL , Wiley, DC. (1987b). The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature* **329**:
- Blasczyk, R, Weber, M, van Lessen, A, Schewella, N, Huhn, D , Salama, A. (1996). Discrimination of HLA-B27 Alleles by Group-Specific Amplification Followed by Solid-Phase Sequencing. *Hum. Immunol.* **45**: 117-123.
- Braun, J, Bollow, M, Neure, L, Seipelt, E, Seyrekbasan, F, Herbst, H, Eggens, U, Distler, A , Sieper, J. (1995). Use of immunohistologic and in situ hybridization techniques in the examination of sacroiliac joint biopsy specimens from patients with ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* **38**: 499-505.
- Breuning, MH, Lucas, CJ, Breur, BS, Engelsma, MY, de Lange, GG, Dekker, AJ, Biddison, WE , Ivanyi, P. (1982). Subtypes of HLA-B27 detected by cytotoxic T lymphocytes and their role in self-recognition. *Hum. Immunol.* **5**: 259-268.
- Breuning, MH, van der Berg-Llonen, EM, Bernini, MF, Bijlmsa, JB, van Looghem, E, Meera, P , Nijenhuis, RE. (1997). Localization of HLA on the short arm of chromosome 6. *Hum Genet* **37**: 131-139.
- Breur-Vriesendorp, BS, Dekker-Saeys, AJ , Ivanyi, P. (1987). Distribution of HLA-

VIII. Bibliografía

B27 subtypes in patients with ankylosing spondylitis: the disease is associated with a common determinant of the various B27 molecules. *Ann Rheum Dis* **46**: 353-356.

- Brewerton, DA, Harf, FD, Caffrey, M, Nicholls, A, James, DCO, Sturrock, RD. (1973). Ankylosing spondylitis and HL-A 27. *Lancet* **I**: 904-907.

- Brodsky, FM, Lem, L, Bresnhan, PA. (1996). Antigen processing and presentation. *Tissue Antigen* **47**: 464-471.

- Brown, JH, Jardetzky, TS, Gorga, JC, Stern, LJ, Urban, RG, Strominger, JL, Wiley, DC. (1993). Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen DR1. *Nature* **346**: 33-39.

- Brown, MA, Pile, KD, Kennedy, LG, Calin, A, Darke, C, Bell, J, Wordsworth, BP, Cornelis, F. (1996). HLA class I associations of ankylosing spondylitis in the white population in the United Kingdom. *Ann Rheum Dis* **55**: 268-270.

- Burney, RO, Pile, KD, Gibson, K, Calin, A, Kennedy, LG, Sinnott, PJ, Powis, SH, Wordsworth, BP. (1994). Analysis of the MHC class II encoded components of the HLA class I antigen processing pathway in ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* **53**: 58-60.

- Cabrera, M, Shaw, M-A, Sharples, C, Williams, H, Castes, M, Convit, J, Blackell, JM. (1995). Polymorphism in tumor necrosis factor genes associated with mucocutaneous leishmaniasis. *J Exp Med* **182**: 1259-1264.

- Calvo, V, Rojo, S, López, D, Galocha, B, López de Castro, JA. (1990). Structure and diversity of HLA-B27-specific T cell epitopes. Analysis with site-directed mutants mimicking HLA-B27 subtype polymorphism. *J. Immunol.* **144**: 4038-4045.

- Campbell, RD, Trowsdale, J. (1993). Map of the MHC. *Immunol Today* **14**: 349-352.

- Campbell, RD. (1987). The molecular genetics and polymorphism of C2 and factor B. *Br Med Bull* **43**: 37-49.

- Cano, P, Baxter-Lowe, LA. (1995). Novel human TAP2*103 allele shows further polymorphism in the ATP-binding domain. *Tissue Antigens* **45**: 139-142.

- Caplen, NJ, Patel, A, Millward, A. (1990). Complement C4 and heat shock protein 70 (HSP70) genotypes and type I diabetes mellitus. *Immunogenetics* **32**: 427-430.

- Carrington, JC, Colonna, M, Spies, T, Stephens, L, Mann, D. (1993). Haplotypic variation of the transporter associated with antigen processing (TAP) genes and their extension of HLA class II region haplotypes. *Immunogenetics* **37**: 266-273.

- Carroll, MC, Alper, CA. (1987a). Polymorphism and molecular genetics of human C4. *Br Med Bull* **43**: 50-65.

- Carroll, MC, Katzman, P, Alicot, EM, Koller, BH, Geraghty, DE, Orr, HT, Strominger, JL, Spies, T. (1987b). Linkage map of the human major histocompatibility complex including the tumor necrosis factor genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 8535-8539.

- Choo, SY, Antonelli, P, Nisperos, B, Nepom, GT, Hansen, JA. (1986). Six variants of HLA-B27 identified by isoelectric focusing. *Immunogenetics* **23**: 24-29.

- Choo, SY, Antonelli, P, Nisperos, B, Nepom, GT, Hansen, JA. (1986). Six variants of HLA-B27 identified by isoelectric focusing. *Immunogenetics* **23**: 24-29.
- Choo, SY, Fan, LA, Hansen, JA. (1991). A novel HLA-B27 allele maps B27 allospecificity to the region around position 70 in the alpha 1 domain. *J. Immunol.* **147**: 174-180.
- Colonna, M, Bresnahan, M, Bahram, S, Strominger, JL, Spies, T. (1992). Allelic variants of the human putative peptide transporter involved in antigen processing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 3932-3936.
- Coux, O, Tanaka, K, Goldberg, AL. (1996). Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu Rev Biochem* **65**: 801-847.
- D'Alfonso, S, Richiardi, PM. (1994). A polymorphic variation in a putative regulation box of the TNF α promoter region. *Immunogenetics* **39**: 150-154.
- D'Amato, M, Fiorillo, MT, Carcassi, C, Mathieu, A, Zuccarelli, A, Bitti, PP, Tosi, R, Sorrentino, R. (1995). Relevance of residue 116 of HLA-B27 in determining susceptibility to ankylosing spondylitis. *Eur. J. Immunol.* **25**: 3199-3201.
- D'Amato, M, Fiorillo, MT, Carcassi, C, Mathieu, A, Zuccarelli, A, Bitti, PP, Tosi, R, Sorrentino, R. (1995). Relevance of residue 116 of HLA-B27 in determining susceptibility to ankylosing spondylitis. *Eur. J. Immunol.* **25**: 3199-3201.
- Dausset, J. (1981). The major histocompatibility complex in man. *Science* **213**: 1469-1474.
- de la Salle, H, Hanau, D, Fricker, D, Urlacher, A, Kelly, A, Salamero, J, Powis, SH, Donato, L, Bausinger, H, Laforet, M, Jeras, M, Spohner, D, Bieber, T, Falkenrodt, A, Cazenave, JP, Trowsdale, J, Tongio, MM. (1994). Homozygous human TAP peptide transporter mutation in HLA class I deficiency. *Science* **265**: 237-241.
- DeNagel, DC, Pierce, SK. (1992). A case for chaperones in antigen processing. *Immunol Today* **13**: 86-89.
- Dominguez, O, Coto, E, Martinez-Naves, E, Choo, SY, López-Larrea, C. (1992). Molecular typing of HLA-B27 alleles. *Immunogenetics* **36**: 277-282.
- Dyer, P, Warrens, A. (1994). Design and interpretation of studies of the major histocompatibility complex in disease. En: R. Lechler (eds). *HLA & disease*. London: Academic Press Limited, 93-122.
- Fehling, HJ, Swat, W, Laplace, C, Kuhn, R, Rajewsky, K, Muller, U, Von Boehmer, H. (1994). MHC class I expression in mice lacking the proteasome subunit LMP-7. *Science* **265**: 1234-1237.
- Feltkamp, TWE, Khan, MA, López de Castro, JA. (1996). The pathogenetic role of HLA-B27. *Immunol Today* **17**: 5-7.
- Fiorillo, MT, Meadows, L, D'Amato, M, Shabanowitz, J, Hunt, DF, Appella, E, Sorrentino, R. (1997). Susceptibility to ankylosing spondylitis correlates with the C-terminal residue of peptides presented by various HLA-B27 subtypes. *Eur J Immunol* **27**: 368-373.
- Fraile, A, Martín, J, Mataran, L, Nieto, J. (1997). HLA-B*27 subtyping by PCR-

VIII. Bibliografía

RFLP in Spanish patients with ankylosing spondylitis. *Tissue Antigens* (enviado a publicación).

- Fraile, A, Vinasco, J, Nieto, J, Pareja, E, Martín, J. (1996). Typing for TAP alleles using PCR-RFLP with amplification-created restriction sites. *Tissue Antigens* **47**: 346-352.

- Galbraith, GMP, Pandey, JP. (1995). Tumor necrosis factor alpha (TNF α) gene polymorphism in alopecia areata. *Hum Genet* **96**: 433-436.

- Galocha, B, Lamas, JR, Villadangos, JA, Albar, JP, López de Castro, JA. (1996). Binding of peptides naturally presented by HLA-B27 to the differentially disease-associated B*2704 and B*2706 subtypes, and to mutants mimicking their polymorphism. *Tissue Antigens* **48**: 509-518.

- García, F, Marina, A, López de Castro, JA. (1997). Lack of carboxyl-terminal tyrosine distinguishes the B*2706-bound peptide repertoire from those of B*2704 and other HLA-B27 subtypes associated with ankylosing spondylitis. *Tissue Antigens* **49**: 215-221.

- Glynne, R, Powis, SH, Beck, S, Kelly, A, Kerr, L, Trowsdale, J. (1991). A proteasome-related gene between the two ABC transporter loci in the class II region of the human MHC. *Nature* **353**: 357-360.

- Gonzalez-Roces, S, Alvarez, MV, Gonzalez, S, Dieye, A, Makni, H, Woodfield, DG, Housan, L, Konenkov, V, Abadi, MC, Grunnet, N, Coto, E, López-Larrea, C. (1996). HLA-B27 polymorphism and worldwide susceptibility to ankylosing spondylitis. *Tissue Antigens* **49**: 116-123.

- Gonzalez-Roces, S, Brautbar, C, Peña, M, Dominguez, O, Coto, E, Alvarez, V, Segal, R, López-Larrea, C. (1994). Molecular analysis of HLA-B27 haplotypes in Caucasoids. Frequencies of B27-Cw in Jewish and Spanish populations. *Hum. Immunol.* **41**: 127-134.

- Goodfellow, PN, Jones, EA, van Heyningen, V, Solomon, E, Bobrow, M, Miggiano, V, Bodmer, WF. (1975). The β_2 microglobulin gene is on chromosome 15 and not in the HL-A region. *Nature* **254**: 267-269.

- Gratacos, J, Collado, A, Filella, X, Sanmarti, R, Canete, J, Llena, J, Molina, R, Ballesta, A, Munoz-Gomez, J. (1994). Serum cytokines (IL-6, TNF-alpha, IL-1 beta and IFN-gamma) in ankylosing spondylitis: a close correlation between serum IL-6 and disease activity and severity. *Br J Rheumatol* **33**: 927-931.

- Haliassos, A, Chomel, J, Tesson, A. (1989). Modification of enzymatically amplified DNA for the detection of point mutations. *Nucleic Acids Res* **17**: 3606.

- Hammer, RE, Maika, SD, Richardson, JA, Tang, JP, Taurog, JD. (1990). Spontaneous inflammatory disease in transgenic rats expressing HLA-B27 and human β_2 -m: an animal model of HLA-B27 associated human disorders. *Cell* **63**: 1099-1112.

- Hasegawa, T, Ogawa, A, Sugahara, Y, Moriyama, Y, Nanzai, H, Tawara, K, Tokunaga, K, Juji, T, Kondo, S. (1997). A novel HLA-B27 allele (B*2711) encoding an antigen reacting with both B27- and B40-specific antisera. *Tissue Antigens* **49**: 649-652.

- Hermann, E, Yu, DTY, Meyer zum Büschenfelde, KH, Fleischer, B. (1993). HLA-B27-restricted CD8 T cells derived from synovial fluids of patients with reactive arthritis and ankylosing spondylitis. *Lancet* **342**: 646-650.
- Hildebrand, WE, Domena, JD, Shen, SY, Marsh, SG, Bunce, M, Guttridge, MG, Darke, C, Parham, P. (1994). The HLA-B7Q antigen is encoded by a new subtype of HLA-B27 (B*2708). *Tissue Antigens* **44**: 47-51.
- Hill, AV, Allsopp, CE, Kwiatkowski, D, Anstey, NM, Greenwood, BM, McMichael, AJ. (1991). HLA class I typing by PCR: HLA-B27 and an African B27 subtype. *Lancet* **337**: 640-642.
- Hill, AV, Allsopp, CE, Kwiatkowski, D, Anstey, NM, Greenwood, BM, McMichael, AJ. (1991). HLA class I typing by PCR: HLA-B27 and an African B27 subtype. *Lancet* **337**: 640-642.
- Hunkapiller, T, Hood, L. (1989). Diversity of the immunoglobulin gene superfamily. *Adv Immunol* **44**: 1-63.
- Inman, RD, Scofield, RH. (1994). Etiopathogenesis of ankylosing spondylitis and reactive arthritis. *Curr Opin Rheumatol* **6**: 360-370.
- Inoko, H. (1990). PCR-RFLP method holds great promise for complete HLA class II genotyping. *Tissue Antigens* **36**: 88-92.
- Ishihara, M, Ohno, S, Ishida, T, Mizuki, N, Ando, H, Naruse, T, Ishihara, H, Inoko, H. (1995). Genetic polymorphism of the TNFB and HSP70 genes located in the human major histocompatibility complex in sarcoidosis. *Tissue Antigens* **46**: 59-62.
- Jacob, CO, Fronek, Z, Lewis, GD, Koo, M, Hansen, JA, McDevitt, HO. (1990). Heritable major histocompatibility complex class II-associated differences in production of tumor necrosis factor alpha: relevance to genetic predisposition to systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 1233-7.
- Jameson, SC, Hogquist, KA, Bevan, MJ. (1995). Positive selection of thymocytes. *Ann Rev Immunol* **13**: 93-126.
- Jaraquemada, D, Marti, M, Long, EO. (1990). An endogenous processing pathway in vaccinia virus-infected cells for presentation of cytoplasmic antigens to class II-restricted T cells. *J Exp Med* **172**: 947-954.
- Jarjour, W, Reed, AM, Gauthier, J, Hunt, S, Winfield, JB. (1996). The 8.5-kb PstI allele of the stress protein gene, HSP70-2. An independent risk factor for systemic lupus erythematosus in African Americans? *Human Immunol* **45**: 59-63.
- Jarvinen, P. (1995). Occurrence of ankylosing spondylitis in a nationwide series of twins. *Arthritis Rheum.* **38**: 381-383.
- Kapasi, K, Inman, RD. (1994). MEI epitope of HLA-B27 confers class I-mediated modulation of gram-negative bacterial invasion. *J Immunol* **153**: 833-840.
- Kappes, D, Strominger, JL. (1988). Human class II major histocompatibility complex genes and proteins. *Annu Rev Biochem* **57**: 991-1028.
- Kauffman, JF, Auffray, C, Korman, AJ, Shackelford, DA, Strominger, JL. (1984). The class II molecules of the human and murine major histocompatibility complex.

VIII. Bibliografía

Cell **36**: 1-13.

- Kellner, H, Wen, J, Wang, J, Raybourne, RB, Williams, KM , Yu, DTY. (1994). Serum antibodies from patients with ankylosing spondylitis and Reiter's syndrome are reactive with HLA-B27 cells transfected with the *Mycobacterium tuberculosis* hsp60 gene. *Infect Immun* **62**: 484-491.

- Kelly, A, Powis, SH, Glynne, R, Radley, E, Beck, S , Trowsdale, J. (1991). Second proteasome-related gene in the human MHC class II region. *Nature* **353**: 667-668.

- Khan, MA. (1995). HLA-B27 and its subtypes in world populations. *Curr Opin Rheumatol* **7**: 263-269.

- Klein, J. (1986). The story. En: J. W. & sons (eds). *Natural History of the Major Histocompatibility Complex*. New York: Wiley Interscience publication, 21-22.

- Kuipers, JG, Raybourne, RB, Williams, KM, Zeidler, H , Yu, DT. (1996). Specificities of human TAP alleles for HLA-B27 binding peptides. *Arthritis Rheum* **39**: 1892-1895.

- Latio, P, Virtala, M, Salmi, M, Pelliniemi, LJ, Yu, DTY , Granfors, K. (1997). HLA-B27 modulates intracellular survival of *Salmonella enteritidis* in human monocytic cells. *Eur J Immunol* **27**: 1331-1338.

- López de Castro, JA. (1989). HLA-B27 and HLA-A2 subtypes: structure, evolution and function. *Immunol. Today* **10**: 239-246.

- López de Castro, JA. (1995). Structural polymorphism and function of HLA-B27. *Curr Opin Rheumatol* **7**: 270-278.

- López, D, García-Hoyo, R , López de Castro, JA. (1994a). Clonal analysis of alloreactive T cell responses against the closely related B*2705 and B*2703 subtypes. Implications for HLA-B27 association to spondyloarthropathy. *J Immunol* **152**: 5557-5571.

- López, D, García-Hoyo, R, García, F , López de Castro, JA. (1994b). T cell allorecognition and endogenous HLA-B27-bound peptides in a cell line with defective HLA-B27-restricted antigen presentation. *Eur J Immunol* **24**: 1194-1199.

- López-Larrea, C, Sujirachato, K, Mehra, NK, Chiewsilp, P, Isarangkura, D, Kanga, U, Dominguez, O, Coto, E, Peña, M, Setien, F , Gonzalez-Roces, S. (1995). HLA-B27 subtypes in Asian patients with ankylosing spondylitis. Evidence for new associations. *Tissue Antigens* **45**: 169-176.

- López-Larrea, C, Sujirachato, K, Mehra, NK, Chiewsilp, P, Isarangkura, D, Kanga, U, Dominguez, O, Coto, E, Peña, M, Setien, F , Gonzalez-Roces, S. (1995). HLA-B27 subtypes in Asian patients with ankylosing spondylitis. Evidence for new associations. *Tissue Antigens* **45**: 169-176.

- Luque, I, Solana, R, Galiani, MD, Gonzalez, R, García, F, López de Castro, JA , Peña, J. (1996). Threonine 80 on HLA-B27 confers protection against lysis by a group of natural killer clones. *Eur J Immunol* **26**: 1974-1977.

- MacLean, IL. (1992). HLA-B27 subtypes: implications for the spondyloarthropathies. *Ann. Rheum. Dis.* **51**: 929-931.

- Maksymowych, WP , Russell, AS. (1995b). Polymorphism in the LMP2 gene influences the relative risk for acute anterior uveitis in unselected patients with ankylosing spondylitis. *Clin Invest Med* **18**: 42-46.
- Maksymowych, WP, Suarez-Almazor, M, Chou, CT , Russell, AS. (1995a). Polymorphism in the LMP2 gene influences susceptibility to extraspinal disease in HLA-B27 positive individuals with ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* **54**: 321-324.
- Maksymowych, WP, Tao, S, Li, Y, Wing, M , Russell, AS. (1995d). Allelic variation at the TAP1 locus influences disease phenotype in HLA-B27 positive individuals with ankylosing spondylitis. *Tissue Antigens* **45**: 328-332.
- Maksymowych, WP, Tao, S, Luong, M, Suarez-Almazor, M, Nelson, R, Pazderka, F , Russell, AS. (1995c). Polymorphism in the LMP2 and LMP7 genes and adult rheumatoid arthritis: no relationship with disease susceptibility or outcome. *Tissue Antigens* **46**: 136-139.
- Maksymowych, WP, Wessler, A, Schmitt-Egenolf, M, Suarez-Almazor, M, Ritzel, G, Von Borstel, RC, Pazderka, F , Russell, AS. (1994). Polymorphism in an HLA linked proteasome gene influences phenotypic expression of disease in HLA-B27 positive individuals. *J Rheumatol* **21**: 665-669.
- Malnati, MS, Marti, M, LeVaute, T, Jaraquemada, D, Biddison, W, DeMars, R , Long, EO. (1992). Processing pathways for presentation of cytosolic antigens to MHC class II-restricted T cells. *Nature* **357**: 702-704.
- Marcos y col.. (1996). Annual Meeting of the American Society for Histocompatibility and Immunogenetics, San Diego.
- McDevitt, HO , Bodmer, WF. (1974). HLA immune response gene and disease. *Lancet* **1**: 1269-1275.
- McGuire, W, Hill, AVS, Allsopp, CEM, Greenwood, BM , Kwiatkowski, D. (1994). Variation in the TNF α promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria. *Nature* **371**: 508-511.
- Messer, G, Spengler, U, Jung, MC, Honold, G, Blomer, K, Pape, GR, Riethmüller, G , Weiss, EH. (1991a). Polymorphic structure of the tumor necrosis factor (TNF) locus: an Nco I polymorphism in the first intron of the human TNF- β correlates with a variant amino acid in position 26 and reduces level of TNF- β production. *J Exp Med* **173**: 209-219.
- Messer, G, Spengler, U, Jung, MC, Honold, G, Eisenburg, J, Scholz, S, Albert, ED, Pape, GR, Riethmüller, G , Weiss, EH. (1991b). Allelic variation in the TNF- β does not explain the low TNF- β response in patients with primary biliary cirrhosis. *Scand J Immunol* **34**: 735-740.
- Milner, CM , Campbell, RD. (1990). Structure and expression of the three MHC-linked HSP70 genes. *Immunogenetics* **32**: 242-251.
- Milner, CM , Campbell, RD. (1992). Polymorphic analysis of the three MHC-linked HSP70 genes. *Immunogenetics* **36**: 357-362.
- Moins-Teisserenc, H, Bobrynina, V, Loiseau, P , Charron, D. (1994). New

VIII. Bibliografía

polymorphisms within the human TAP1 and TAP2 coding region. *Immunogenetics* **40**: 242.

- Nandi, D, Iyer, M , Monaco, JJ. (1996). Characterization and polymorphism of the mouse MHC-linked Lmp-2 and Lmp-7 genes. *Exp Clin Immunogenet* **13**: 20-29.

- Ness, DB , Grumet, FC. (1987). New polymorphisms of HLA-B27 and other B locus antigens detected by RFLP using a locus-specific probe. *Hum. Immunol.* **18**: 65-73.

- Nieto, A, Fraile, A, Vinasco, J , Martín, J. (1996). HLA-B*27 typing by PCR-restriction fragment length polymorphism. *Tissue Antigens* **48**: 283-286.

- Nieto, A, Tobes, R, Martín, J , Pareja, E. (1997). Allele walking: a new and highly accurate approach to HLA-DRB1 typing. *Tissue Antigens* **49**: 141-151.

- Obst, R, Armandola, EA, Nijenhuis, M, Momburg, F , Hämmerling, GH. (1995). TAP polymorphism does not influence transport of peptide variants in mice and humans. *Eur J Immunol* **1995**: 2170-2176.

- Orita, M, Suzuki, Y, Sekiya, T , Hayashi, K. (1989). Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* **5**: 874-879.

- Orr, HT, Lancet, D, Robb, RJ, López de Castro, JA , Strominger, JL. (1979). The heavy chain of human histocompatibility antigen HLA-B27 contains an immunoglobulin-like region. *Nature* **282**: 266-270.

- Parham, P. (1996). B27 polymorphism and peptide repertoire. *Clin Rheumatol* **15** (supl 1): 72-73.

- Parker, KC, Biddison, WE , Coligan, JE. (1994). Pocket mutations of HLA-B27 show that anchor residues act cumulatively to stabilize peptide binding. *Biochemistry* **33**: 7736-7743.

- Partanen, J, Milner, C, Campbell, RD, Mäki, M, Lipsanen, S , Koskimies, S. (1993). HLA-linked heat-shock protein 70 (HSP70-2) gene polymorphism and celiac disease. *Tissue Antigen* **41**: 15-19.

- Pazmany, L, Rowland-Jones, S, Huet, S, Hill, A, Sutton, J, Murray, R, Brooks, J , McMichael, A. (1992). Genetic modulation of antigen presentation by HLA-B27 molecules. *J Exp Med* **175**: 361-369.

- Petersdorf, EW , Hansen, JA. (1995). A comprehensive approach for typing the alleles of the HLA-B locus by automated sequencing. *Tissue Antigens* **46**: 73-85.

- Pierce, SK, DeNagel, DC , VanBuskirk, AM. (1991). A role for heat shock proteins in antigens processing and presentation. *Curr Top Microbiol Immunol* **167**: 83-92.

- Pinet, V, Malnati, MS , Long, EO. (1994). Two processing pathways for the MHC class II-restricted presentation of exogenous influenza virus antigen. *J Immunol* **152**: 4852-4860.

- Ploegh, HL, Orr, HT , Strominger, JL. (1981). Major histocompatibility antigens: the human (HLA-A, -B, -C) and murine (H-2K, H-2D) class I molecules. *Cell* **24**: 287-299.

- Ploski, R, FlatØ, B, Vinje, O, Maksymowych, W, FØrre, Ø , Thorsby, E. (1995).

Association to HLA-DRB1*08, HLA-DPB1*0301 and homozygosity for an HLA-linked proteasome gene in juvenile ankylosing spondylitis. *Hum Immunol* **44**: 88-96.

- Pociot, F, Briant, L, Jongeneel, CV, Molvig, J, Worsaae, H, Abbal, M, Thomsen, M, Nerup, J, Cambon-Thomsen, A. (1993b). Association of tumor necrosis factor (TNF) and class II major histocompatibility complex alleles with the secretion of TNF-alpha and TNF-beta by human mononuclear cells: a possible link to insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur J Immunol* **23**: 224.

- Pociot, F, D'Alfonso, S, Compasso, S, Scorza, R, Richiardi, PM. (1995). Functional analysis of a new polymorphism in the human TNF alpha gene promoter. *Scand J Immunol* **42**: 501-504.

- Pociot, F, Rønningen, KS, Nerup, J. (1993a). Polymorphic analysis of the human MHC-linked heat shock protein (HSP70-2) and HSP70-HOM genes in insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Scand J Immunol* **38**: 491-495.

- Powis, SH, Mockridge, I, Kelly, A, Kerr, LA, Glynne, R, Gileadi, U, Beck, S, Trowsdale, J. (1992). Polymorphism in a second ABC transporter gene located within the class II region of the human major histocompatibility complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 1463-1467.

- Powis, SH, Tonks, S, Mockridge, I, Kelly, AP, Bodmer, JG, Trowsdale, J. (1993). Alleles and haplotypes of the MHC-encoded ABC transporters TAP1 and TAP2. *Immunogenetics* **37**: 373-380.

- Rammensee, HG, Falk, K, Rötzschke, O. (1993). Peptides naturally presented by MHC class I. *Ann Rev Immunol* **11**: 213-244.

- Rammensee, HG. (1995). Chemistry of peptides associated with MHC class I and class II molecules. *Curr Opin Immunol* **7**: 85-96.

- Ren, EC, Koh, WH, Sim, D, Boey, ML, Wee, GB, Chan, SH. (1997). Possible protective role of HLA-B*2706 for ankylosing spondylitis. *Tissue Antigens* **49**: 67-69.

- Repo, H, Jäättelä, M, Leirasalo-Repo, M, Hurme, M. (1988). Production of tumor necrosis factor and interleukin 1 by monocytes of patients with previous *Yersinia* arthritis. *Clin. exp. Immunol.* **72**: 410-414.

- Rippmann, F, Taylor, WR, Rothbard, JB, Green, NM. (1991). A hypothetical model for the peptide binding domain of hsp70 based on the peptide binding domain of HLA. *EMBO J* **10**: 1053-1059.

- Robinson, WP, Van der Linden, S, Khan, MA, Rentsch, HU, Cats, A, Russell, A, Thompson, G. (1989). HLA-Bw60 increases susceptibility to ankylosing spondylitis in HLA-B27+ patients. *Arthritis Rheum* **32**: 1135-1141.

- Rock, KL. (1996). A new foreign policy: MHC class I molecules monitor the outside world. *Immunol Today* **17**: 131-137.

- Rojo, S, Garcia, F, Villadangos, JA, López de Castro, JA. (1993). Changes in the repertoire of peptides bound to HLA-B27 subtypes and to site-specific mutants inside and outside pocket B. *J. Exp. Med.* **177**: 613-620.

- Rowland-Jones, SL, Powis, SH, Sutton, J, Mockridge, I, Gotch, FM, Murray, N, Hill, AB, Rosenberg, WM, Trowsdale, J, McMichael, AJ. (1993). An antigen processing

VIII. Bibliografia

polymorphism revealed by HLA-B8-restricted cytotoxic T lymphocytes which does not correlate with TAP gene polymorphism. *Eur J Immunol* **23**: 1999-2004.

- Rubin, LA, Amos, CI, Wade, JA, Martin, JR, Bale, SJ, Little, AH, Gladman, DD, Bonney, GE, Rubenstein, JD, Siminovitch, KA. (1994). Investigating the genetic basis for ankylosing spondylitis. Linkage studies with the major histocompatibility complex region. *Arthritis Rheum.* **37**: 1212-1220.

- Ruddle, NH. (1992). Tumor necrosis factor (TNF- α) and lymphotoxin (TNF- β). *Curr Opin Immunol* **4**: 327-332.

- Sargent, CA, Dunham, I, Trowsdale, J, Campbell, RD. (1989). Human histocompatibility complex contains genes for the major heat shock protein HSP70. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 1968-1972.

- Schlosstein, L, Terasaky, PI, Bluestone, R, Pearson, CM. (1973). High association of HL-A antigen, W27, with ankylosing spondylitis. *N. Engl. J. Med* **288**: 704-706.

- Schwimbeck, PL, Yu, DTY, Oldstone, MBA. (1987). Autoantibodies to HLA-B27 in the sera of HLA-B27 patients with ankylosing spondylitis and Reiter's syndrome. *J Exp Med* **166**: 173-181.

- Sorrentino, R. (1996). HLA-B27 and ankylosing spondylitis: new perspectives. *EFI Newsletter* **16**: 18-22.

- Spies, T, Bresnahan, M, Bahram, S, Arnold, D, Blanck, G, Mellins, E, Pious, D, DeMars, R. (1990). A gene in the human major histocompatibility complex region controlling the class I antigen presentation pathway. *Nature* **348**: 744-747.

- Spies, T, Morton, CC, Nedospasov, SA, Fiers, W, Pious, D, Strominger, JL. (1986). Genes for the tumor necrosis factor α and β are linked to the human major histocompatibility complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**: 8699-8702.

- Srivastava, R, Duceman, BW, Biro, PA, Sood, AS, Weissman, SM. (1985). Molecular organization of the class I gene of human major histocompatibility complex. *Immunol Reviews* **84**: 93-121.

- Suto, R, Srivastava, PK. (1995). A mechanism for the specific immunogenicity of heat shock protein-chaperoned peptides. *Science* **269**: 1585-1588.

- Svejgaard, A, Ryder, LP. (1994). HLA and disease associations: detecting the strongest association. *Tissue Antigens* **43**: 18-27.

- Szafer, F, Oksenberg, JR, Steinman, L. (1994). New allelic polymorphism in TAP genes. *Immunogenetics* **39**: 374.

- Taurog, JD, Richardson, JA, Croft, JT, Simmons, WA, Zhou, M, Fernandez-Sueiro, JL, Balish, E, Hammer, RE. (1994). The germfree state prevents development of gut and joint inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rats. *J Exp Med* **180**: 2359-2364.

- Teisserenc, H, Schmitt, W, Blake, N, Dunbar, R, Gadola, S, Gross, WL, Exley, A, Cerundolo, V. (1997). A case of primary immunodeficiency due to a defect of the major histocompatibility gene complex class I processing and presentation pathway. *Immunol Lett* **57**: 183-187.

- Trowsdale, J, Hanson, I, Mockridge, I, Beck, S, Townsed, A , Kelly, A. (1990). Sequences encoded in the class II region of the MHC related to the "ABC" superfamily of transporters. *Nature* **348**: 741-744.
- Van der Linden, S, Valkenburgh, HA , Cats, A. (1984b). Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis: a proposal for modification of the New York criteria. *Arthritis Rheum* **27**: 361-368.
- Van der Linden, S, Valkenburgh, HA, de Jongh, BM , Cats, A. (1984a). The risk of developing ankylosing spondylitis in HLA-B27 positive individuals: a comparison of relatives of spondylitis patients with general population. *Arthritis Rheum* **27**: 241-249.
- Van Kaer, L, Ashton-Rickardt, PG, Eichelberger, M, Gaczynska, M, Nagashima, K, Rock, KL, Goldberg, AL, Doherty, PC , Tonegawa, S. (1994). Altered peptidase and viral-specific T cell response in LMP2 mutant mice. *Immunity* **1**: 533-541.
- Van Kaer, L, Ashton-Rickardt, PG, Ploegh, HL , Tonegawa, S. (1992). TAP1 mutant mice are deficient in antigen presentation, surface class I molecules, and CD4-8+ T cells. *Cell* **71**: 1205-1214.
- Verjans, GM, Brinkman, BMN, Van Doornik, CEM, Kijlstra, A , Verweij, CL. (1994). Polymorphism of the tumor necrosis factor-alpha (TNF α) at position -308 in relation to ankylosing spondylitis. *Clin Exp Immunol* **97**: 45-47.
- Verjans, GM, van der Linden, SM, van Eys, GJ, de Waal, LP , Kijlstra, A. (1991). Restriction fragment length polymorphism of the tumor necrosis factor region in patients with ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* **34**: 486-489.
- Vinasco, J, Beraun, Y, Nieto, A, Fraile, A, Mataran, L, Pareja, A , Martín, J. (1997c). Polymorphism at the TNF loci in rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens* **49**: 74-78.
- Vinasco, J, Beraun, Y, Nieto, A, Fraile, A, Pareja, A, Mataran, L , Martín, J. (1997b). Heat shock protein 70 gene polymorphism in rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens* **50**: 71-73.
- Vinasco, J, Fraile, A, Nieto, A, Beraun, Y, Pareja, A, Mataran, L , Martín, J. (1997a). Analysis of the LMP and TAP polymorphism by PCR-RFLP in rheumatoid arthritis: no association with disease susceptibility or outcome. *Ann Rheum Dis* (en prensa).
- Westman, P, Partanen, J, Leirisalo-Repo, M , Koskimies, S. (1994). HSP70-Hom NcoI polymorphism and HLA-associations in the Finnish population and in patients with ankylosing spondylitis or reactive arthritis. *Eur J Immunogenet* **21**: 81-90.
- Westman, P, Partanen, J, Leirisalo-Repo, M , Koskimies, S. (1995). TAP1 and TAP2 polymorphism in HLA-B27- positive subpopulations: no allelic differences in ankylosing spondylitis and reactive arthritis. *Hum Immunol* **44**: 236-242.
- Wildner, G , Thureau, SR. (1994). Cross-reactivity between an HLA-B27 derived peptide and a retinal autoantigen peptide : a clue to mayor histocompatibility complex association with autoimmune disease. *Eur J Immunol* **24**: 2579-2585.
- Wilson, AG, di Giovine, FS, Blakmore, AF , Duff, GW. (1992). Single base polymorphism in the human necrosis factor alpha (TNF α) gene detectable by Nco I restriction of PCR product. *Hum Mol Genet* **1**: 353.
- Wilson, AG, Gordon, C, di Giovine, FS, de Vries, N, van de Putte, LBA, Emery, P ,

VIII. Bibliografia

Duff, GW. (1994). A genetic association between systemic lupus erythematosus and tumor necrosis factor alpha. *Eur J Immunol* **24**: 191-195.

- Wilson, AG, Symons, JA, McDowell, TL, McDevitt, HO, Duff, GW. (1997). Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 3195-3199.

- Winfield, JB, Jarjour, WN. (1991). Stress proteins, autoimmunity and autoimmune disease. *Curr Top Microbiol Immunol* **167**: 161-189.

- Wolf, PR, Ploegh, HL. (1995). How MHC class II molecules acquire peptide cargo: Biosynthesis and trafficking through the endocytic pathway. *Ann Rev Cell Dev Biol* **11**: 267-306.

- York, IA, Rock, KL. (1996). Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. *Annu Rev Immunol* **14**: 369-396.

- Yoshida, M, Kimura, A, Numano, F, Sasazuki, T. (1992). Polymerase-chain-reaction based analysis of polymorphism in the HLA-B gene. *Hum Immunol* **34**: 257-266.

- Young, AR, Elliot, TJ. (1989). Stress proteins, infection and immune response. *Cell* **59**: 5-8.

- Zimmerman, PA, Guderain, RH, Nutman, TB. (1996). A new TNFA promoter allele identified in South American Blacks. *Immunogenetics* **44**: 485-486.

- Zinkernagel, RM, Doherty, PC. (1974). Restriction of in vitro T cell mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semi-allogenic system. *Nature* **248**: 701-702.