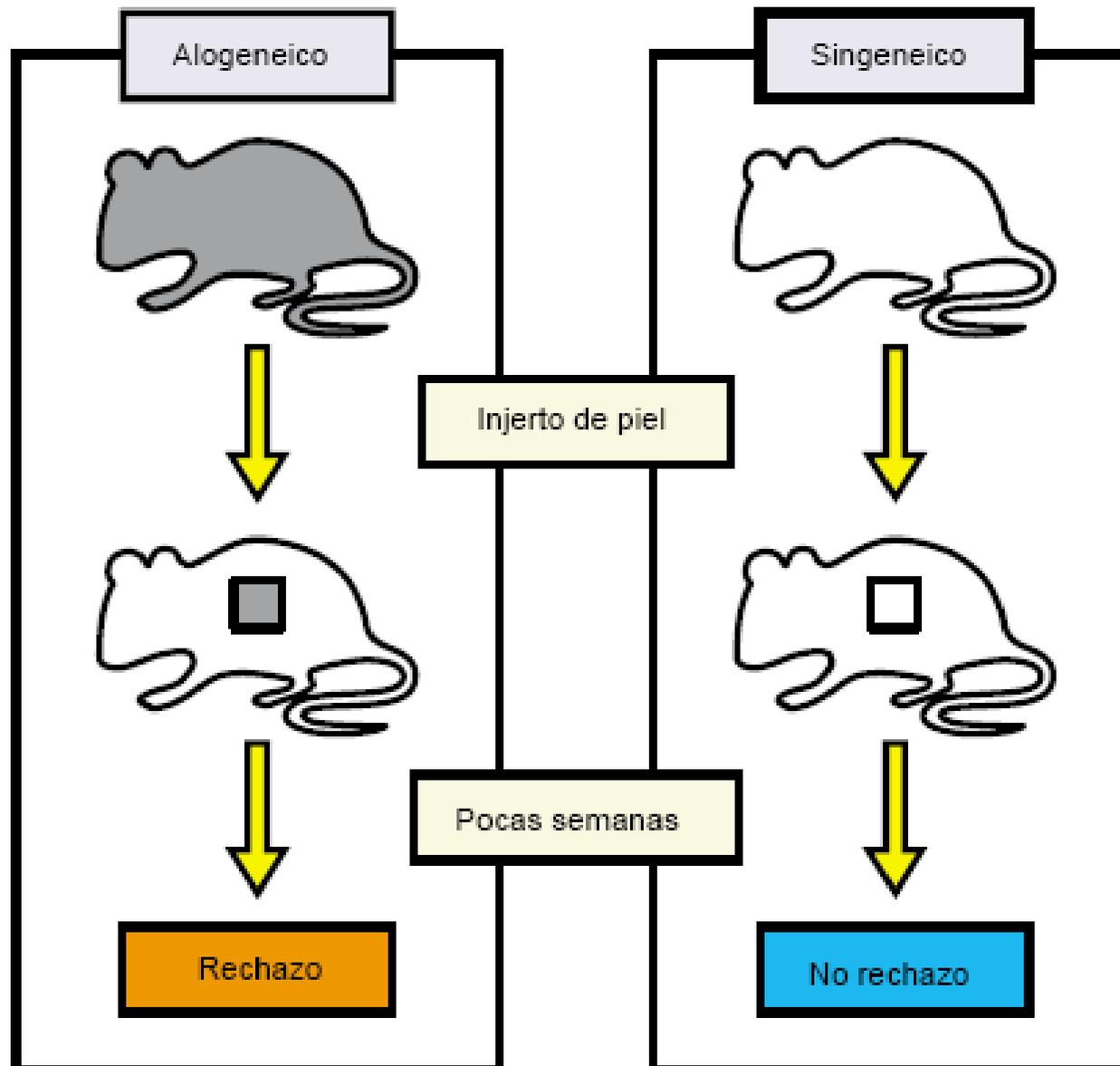


# **Estructura y Función del Complejo Mayor de Histocompatibilidad**

**Rosanna Ramhorst PhD.**

**Lab. de Inmunofarmacología  
Departamento de Química Biológica  
IQIBICEN FCEN-UBA**

**El injerto de piel entre cepas de ratones es aceptado o rechazado según el CMH de los animales**



## Rules of engagement: the discovery of MHC restriction

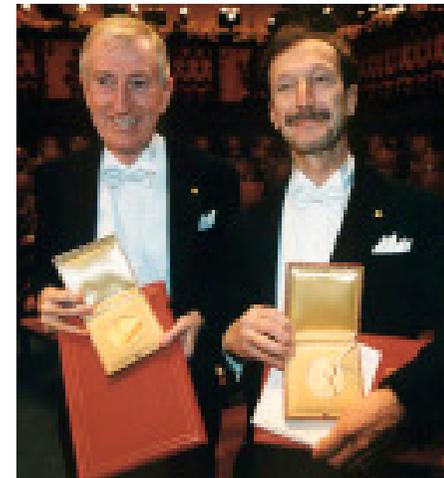
Before there was a defined T cell receptor, Peter Doherty and Rolf Zinkernagel deciphered the rules that governed its recognition of infected target cells.

Immunological compatibility in the 1970s was defined by transplantation antigens—now known as the molecules encoded by the major histocompatibility complex (MHC). These proteins dictated the compatibility of transplanted tumors among different strains of mice. They also set the stage for Rolf Zinkernagel and Peter Doherty to discover the phenomenon of MHC restriction of antiviral responses. For this discovery they were awarded the 1996 Nobel Prize in Physiology or Medicine.

Combined talents

some of the strains developed cytolytic T cell responses *in vitro* (3).

Genetic background and fortuity explained this finding. The available reagents had been a mouse strain (CBA) and a cell line (L cells) that both expressed MHC molecules of the H-2<sup>k</sup> haplotype. It was this combination that showed an effective cytolytic T cell response. Thus, the ability of T cells to recognize target cells was a function of both antigen and MHC haplotype. They proved this formally by replacing the L cells with macrophages from each of the mouse strains. Immune T cells

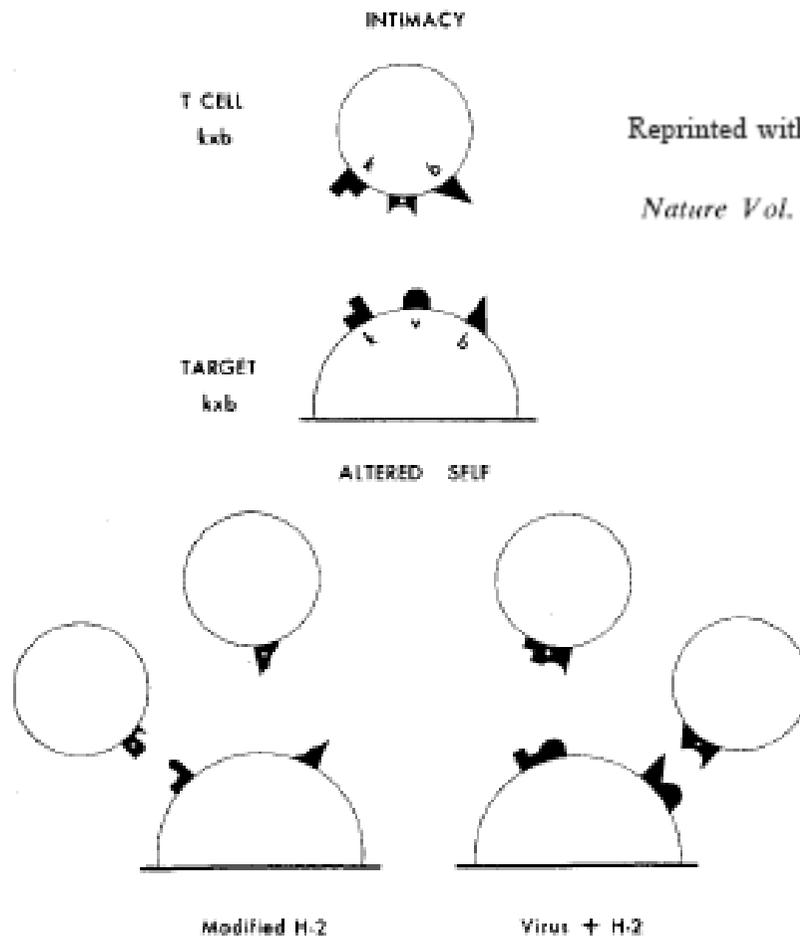


Doherty and Zinkernagel with their Nobel Prizes, 1996. Photo provided by the Nobel Foundation.

## Immunological surveillance against altered self components by sensitised T lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis

Reprinted with permission from Zinkemagel and Doherty, Nature 251: 547-548 (1974).

Nature Vol. 251 October 11 1974



**Fig. 1** Capacity of sensitised  $F_1$  ( $H-2^{k/b}$ ) T cells to interact only with histocompatible virus-infected target cells may be considered to reflect any one of the models shown. The intimacy concept proposes a single immunologically specific T cell receptor for viral (v) antigen, additional to a requirement for physiological interaction coded for by the H-2 gene complex (mutuality between either  $H-2^k$  or  $H-2^b$ ). The two models proposed for altered self postulate that, in each case, there are at least two T cell populations with receptors of different immunological specificities recognising modified H-2, or virus + H-2 of either parent type.

Cuando infectaban una cepa de ratones con un virus (LCM: lymphocytic choriomeningitis virus) se generaban LT citotóxicos capaces de eliminar células infectadas y éstas eran específicas del virus.

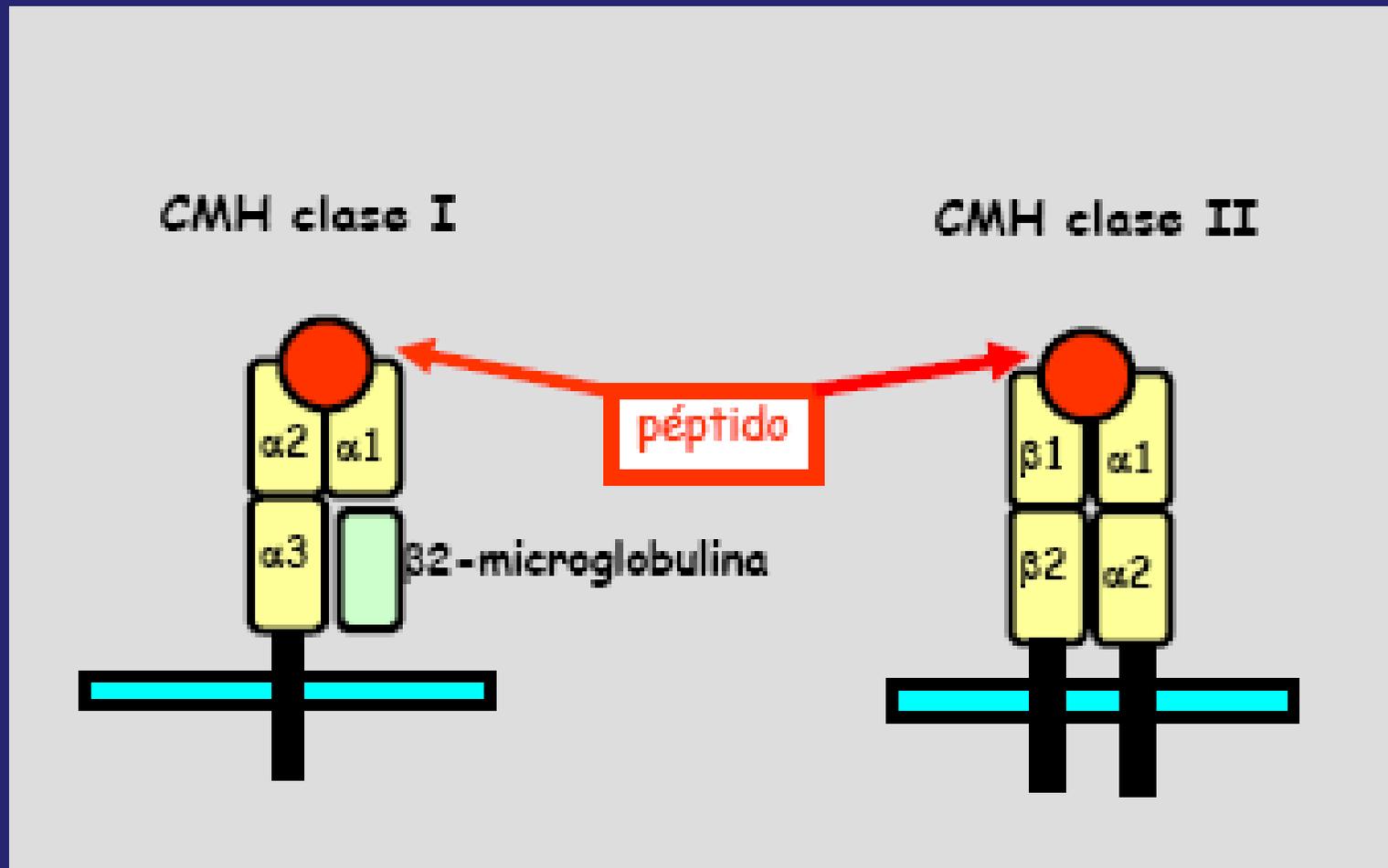
Los LT no solo eran específicas del virus sino también de las MCH expresadas en las células infectadas.



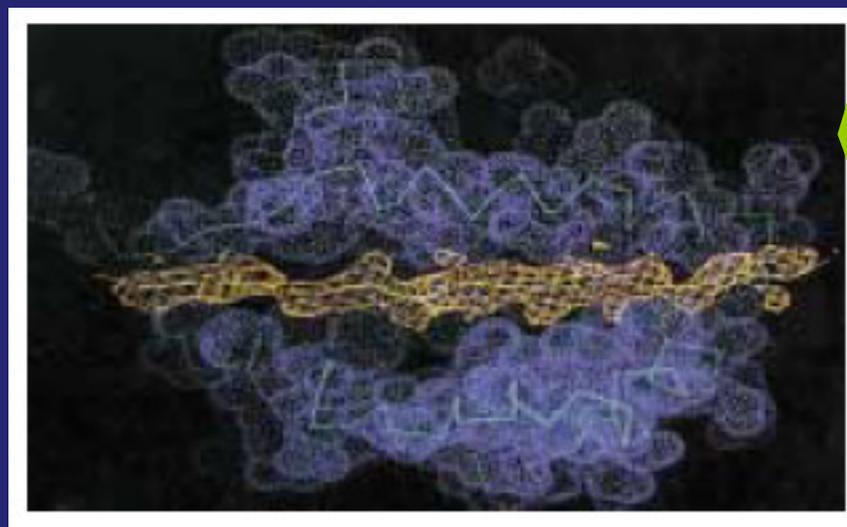
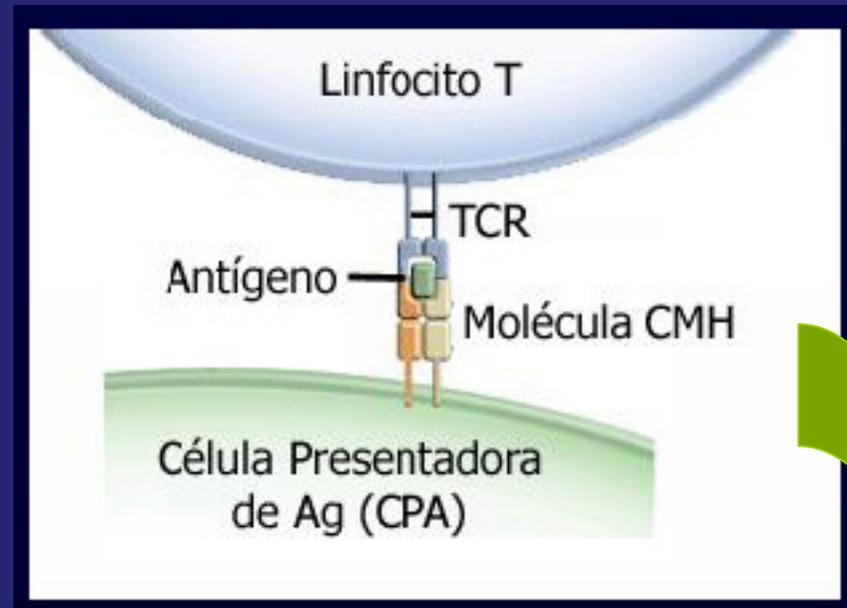
**RESTRICCIÓN DEL MHC**

La especificidad de un determinado receptor de antígeno de linfocitos T (TCR) esta dada por:

- la molécula de Clase I o II
- por el péptido que presenta



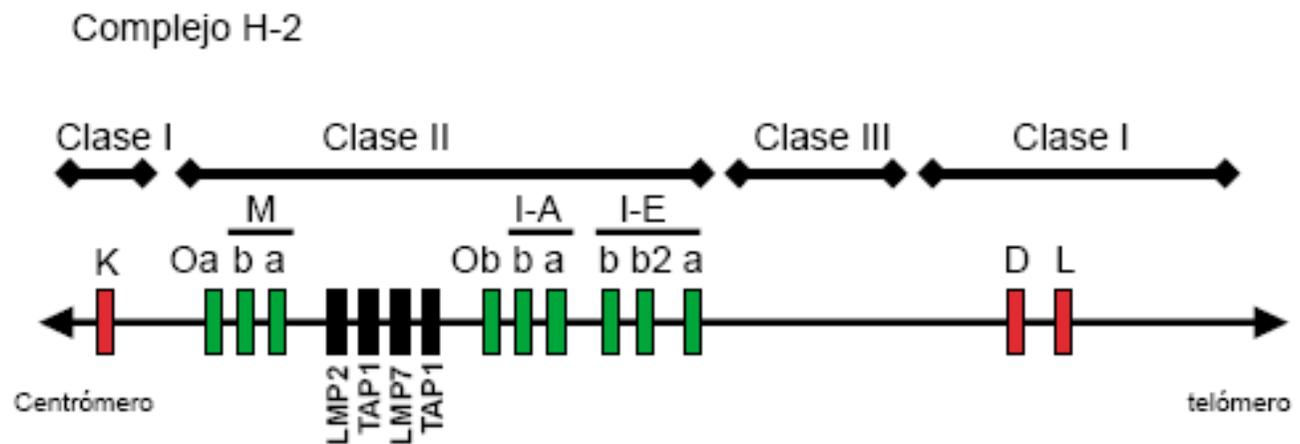
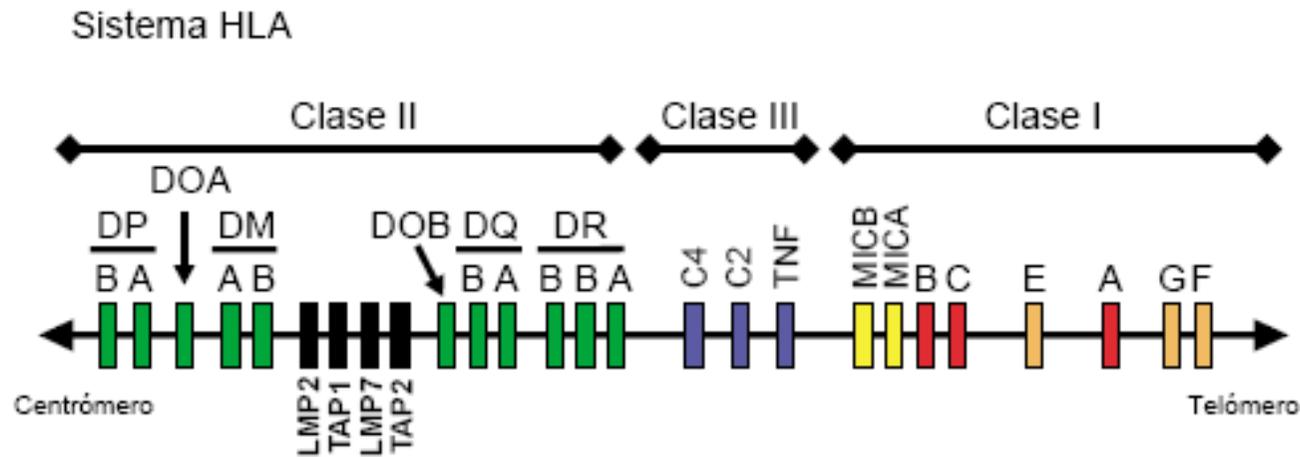
El complejo formado por péptido y la molécula MHC serán reconocidos por el linfocito T a través de su TCR



Estructura cristalográfica de HLA-DR1

*Nature 1993; 364*

# Organización de los genes del CMH humano (HLA) y murino (H-2)



Brazo corto  
del  
cromosoma 6

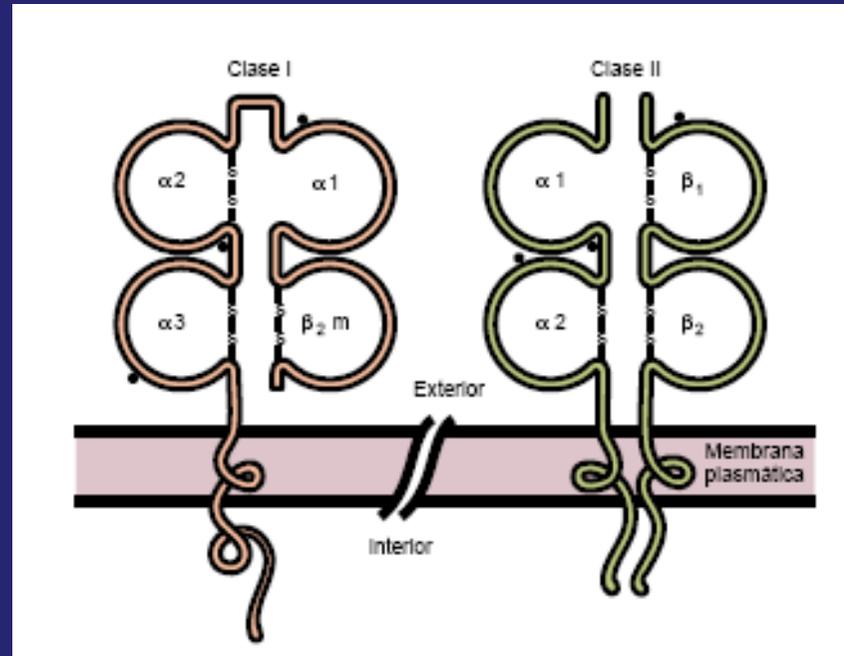
**Haplotipo HLA**  
conjunto de  
genes de origen  
materno o  
paterno

Cromosoma  
17

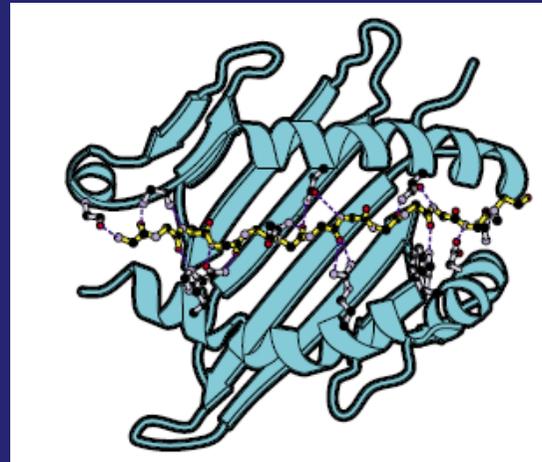
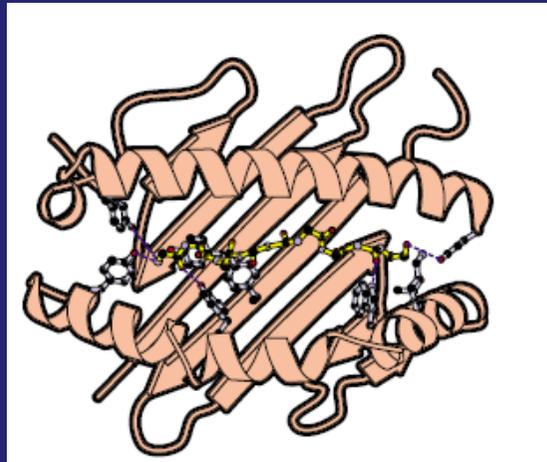
# Organización de los genes del CMH

- Genes de Clase I →
  - Genes de Clase II →
  - Genes de Clase III →
- Involucrados en los eventos de procesamiento y presentación antigénica**
- Participan en otros aspectos de la respuesta inmune**

# Características Generales de las moléculas de Clase I y II

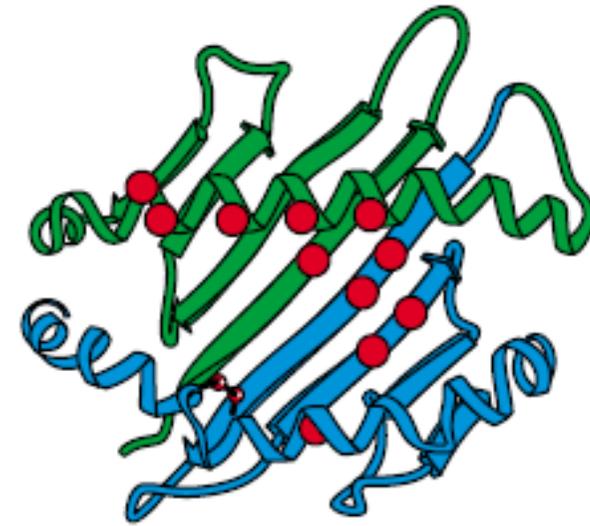
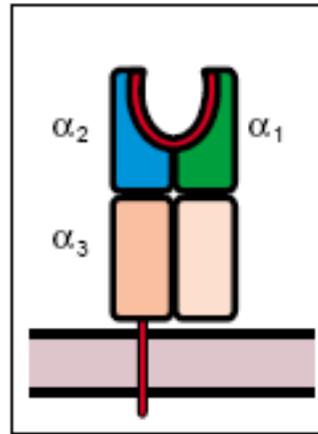


Los dos dominios más alejados de la membrana plasmática se pliegan de tal manera que generan un surco dentro del cual se aloja un único péptido

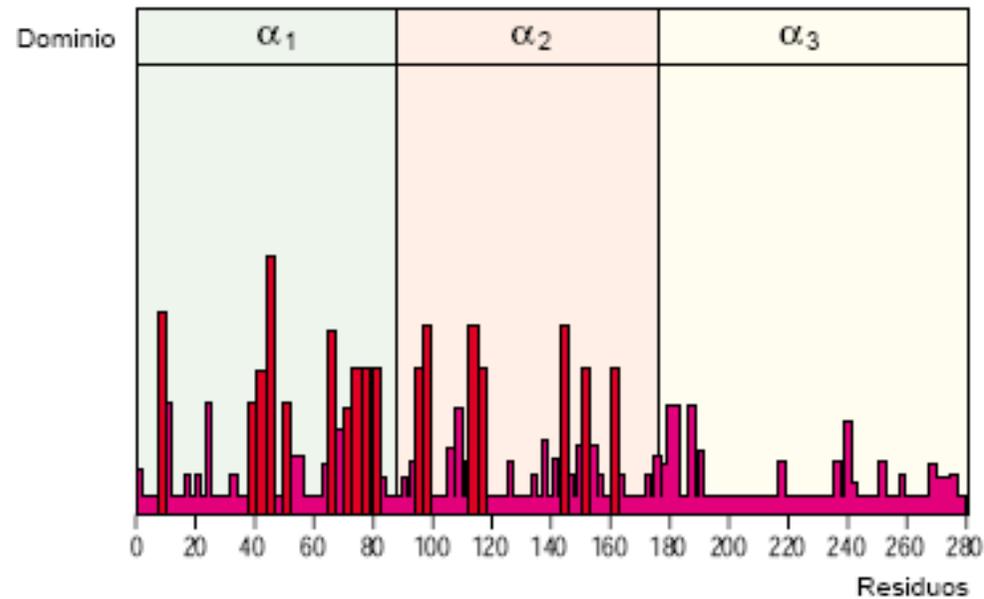


# MHC de Clase I:

Son glucoproteínas de membrana constituidas por 2 cadenas polipeptídicas que se asocian en forma no covalente



Variabilidad de las moléculas de clase I del CMH



# MCH Clase I

- **Estructura:** Son glucoproteínas de membrana constituidas por 2 cadenas polipeptídicas que se asocian en forma no covalente
- **Productos de los Genes de Clase I:**
  - HLA clase I clásicas: HLA-A, HLA-B, HLA-C  
Expresadas en la superficie de todas las células nucleadas (salvo GR, sinciciotrofoblasto y neuronas)
  - HLA clase I no clásicas: HLA-E, HLA-F, HLA-G, MICA y MICB  
Expresión restringida

# MCH Clase I Clásicas

- **Polimorfismo y Nomenclatura:**
- **Productos de los Genes de Clase I:**

- HLA-A: 733 alelos
- HLA-B: 1115 alelos
- HLA-C: 383 alelos

Nomenclatura serológica:

Ej. HLA-A02, HLA-B27

Nomenclatura Actual:

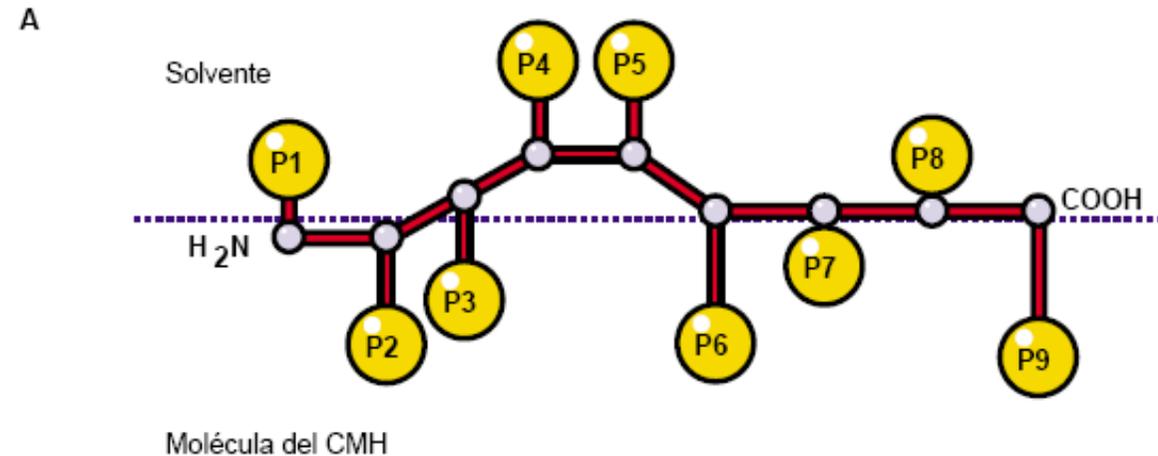
Ej. HLA-A\*0201, HLA-A\*0272

HLA-Cw\*0304, HLA-Cw0402

Asignados por  
especificidad  
serológica

Variante alélica

# Esquema de la orientación de un nonapéptido unido a una molécula de clase I



B

H <sub>2</sub> N	T	Y	Q	R	T	R	A	L	V	COOH
H <sub>2</sub> N	S	Y	F	P	E	I	T	H	I	COOH
H <sub>2</sub> N	K	Y	Q	A	V	T	T	T	L	COOH
H <sub>2</sub> N	S	Y	I	P	S	A	E	K	I	COOH

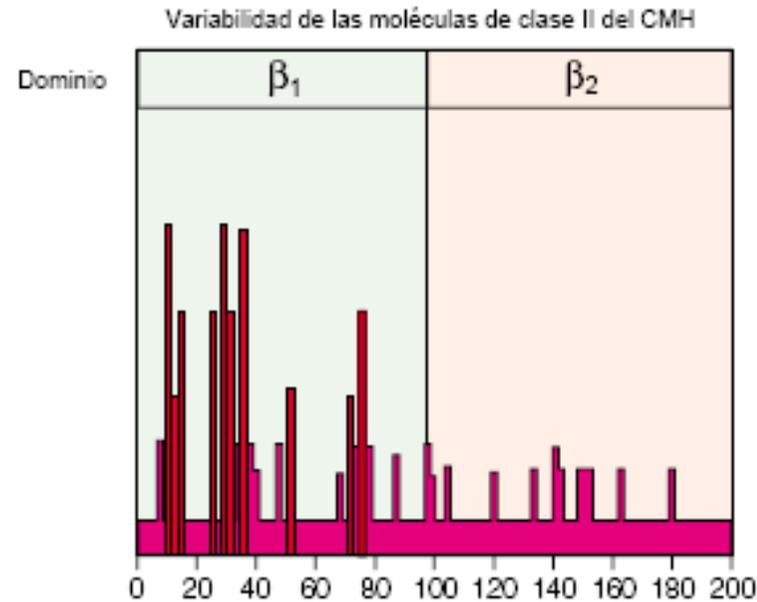
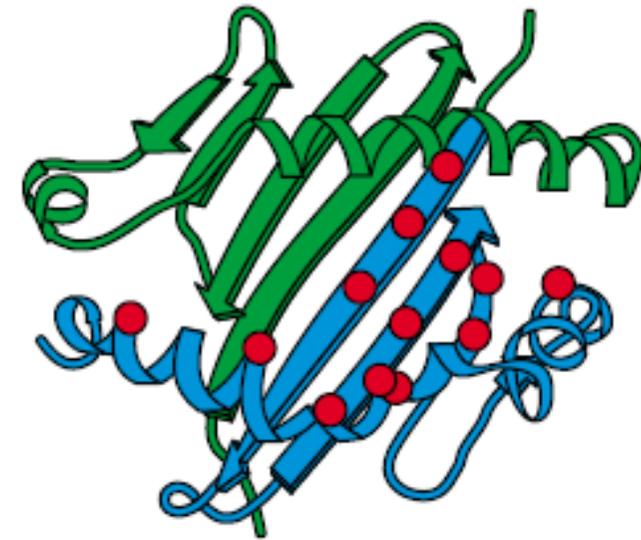
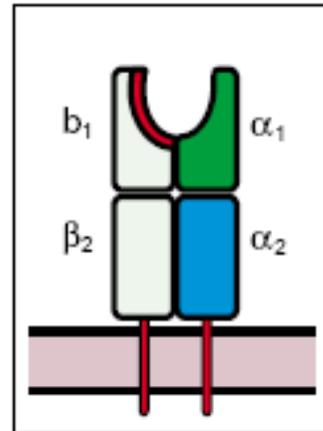
Flexibilidad  
de la  
unión

# MCH Clase I No clásicas

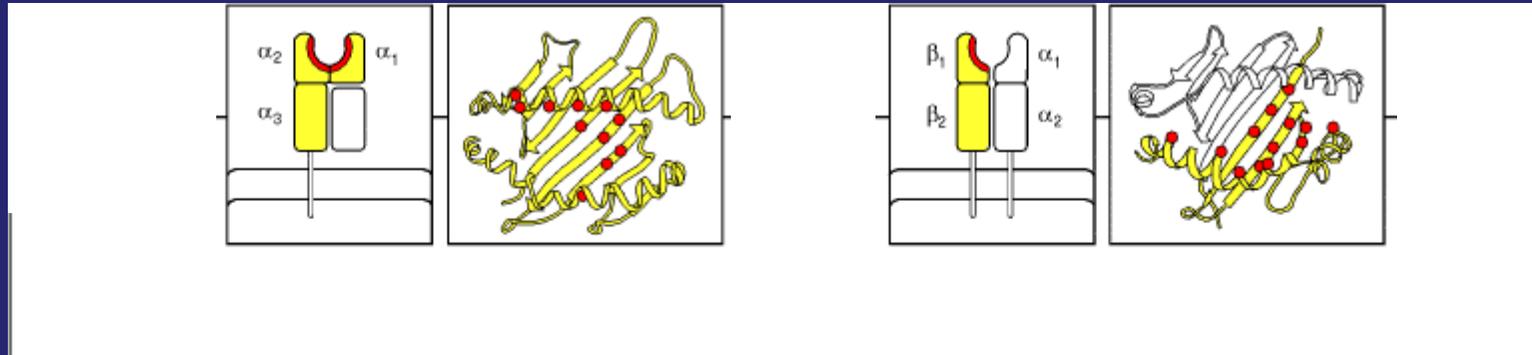
- **HLA-E:** se expresa en todos los tejidos y células, es poco polimórfico, una secuencia del péptido líder (HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-G) modula la respuesta citotóxica de células NK.
- **HLA-F:** no se expresa en la superficie celular, en determinadas condiciones puede expresarse en la superficie y modular la activación de células NK).
- **HLA-G:** poca polimórfica y su expresión está restringida al trofoblasto. Tiene 7 isoformas de las cuales HLAG-5, HLAG6 y HLAG-7 son solubles).
- **HLA-H:** codifica para la proteína HFE, con estructura similar a las MCH clásicas pero no es presentadora de antígeno. Participa en el metabolismo del hierro.
- **Familia de genes MIC (MHC class I related Chains):** MICA y MICB son polimórficos, no son moléculas presentadoras, actúan como detectores de estrés y su expresión aumentada constituye una señal de alarma para el sistema inmune.

# MHC de Clase II:

Son glucoproteínas de membrana constituidas por un heterodímero compuesto por 2 cadenas ( $\alpha$  y  $\beta$ ) unidas en forma no covalente



# Naturaleza del péptido



N Péptido C

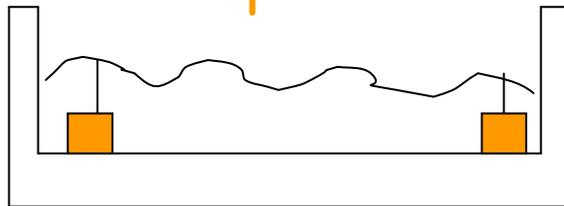


Lámina  $\beta$  de MCH CI

Péptido

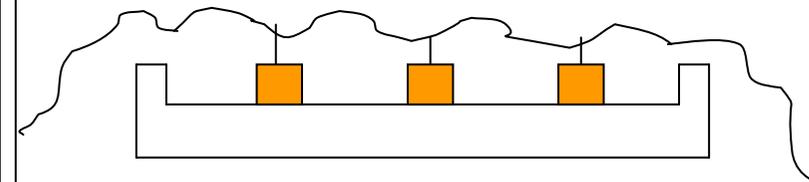


Lámina  $\beta$  de MCH CII

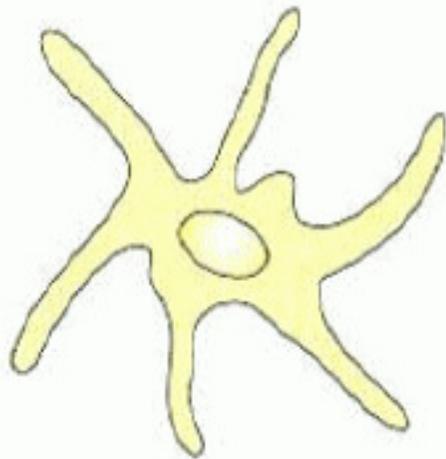
# MCH Clase II

- **Productos de los Genes de Clase II:**
  - HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ

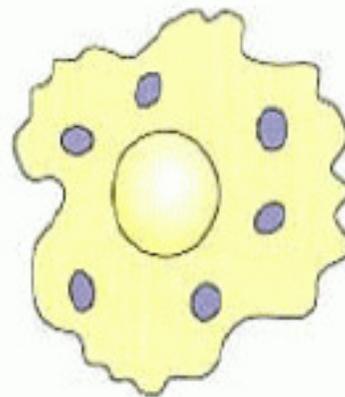
Expresadas constitutivamente en la superficie de:  
LB, Monocitos, células Dendríticas, precursores eritroides, células de Langerhans, epitelio tímico, células de Kupffer, LT activados.

# Células Presentadoras de Antígenos profesionales

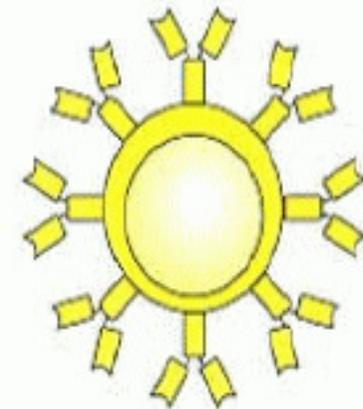
**Células dendríticas**



**Macrófagos**



**Linfocitos B**



# MCH Clase II

- **Polimorfismo y Nomenclatura:**
- **Productos de los Genes de Clase II:**
  - HLA-DR: cadena  $\alpha$  +  $\beta$  (genes DRA+DRB1)
  - HLA-DP: cadena  $\alpha$  +  $\beta$  (genes DPA1+DPB1)
  - HLA-DQ: cadena  $\alpha$  +  $\beta$  (genes DQA1+DQB1)

Nomenclatura Actual:

Ej. HLA-DR\*0101,

HLA-DQ\*0202,

Asignados por  
especificidad  
serológica

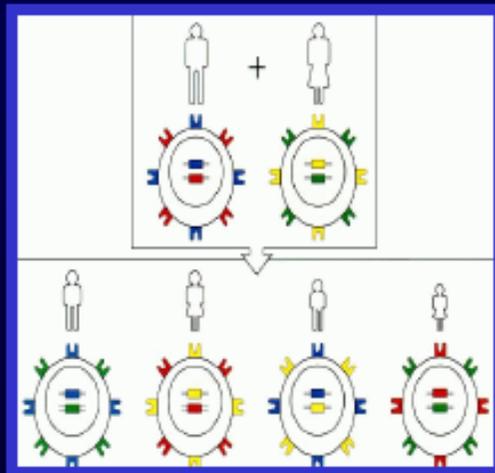
Variante alélica

# para calcular.....

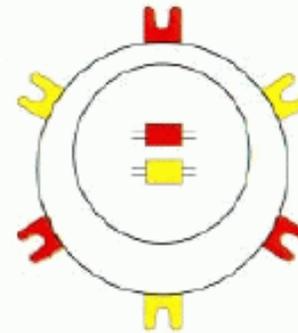
- Considerando el número de alelos de clase II descritos hasta la fecha y que las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  se asocian en forma combinatoria, a nivel poblacional existen
- 2.091 moléculas HLA-DR
- 3.230 moléculas HLA-DQ
- 3.564 moléculas HLA-DP diferentes.
- La combinatoria de estos alelos da una idea de la cantidad de haplotipos DR,DQ,DP : 24.071 millones
- Si se tiene en cuenta que pueden existir 333 millones de haplotipos de clase I
- el número de haplotipos diferentes en todo el CMH supera, teóricamente los 7,5 trillones!!!!!!!!!!

# Propiedades de las moléculas MHC clase I y II

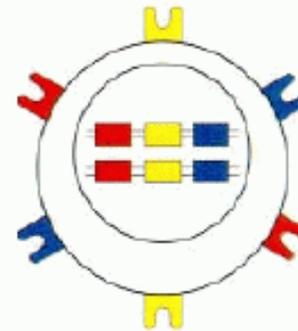
## CODOMINANCIA



## POLIFORMISMO



## POLIGENISMO

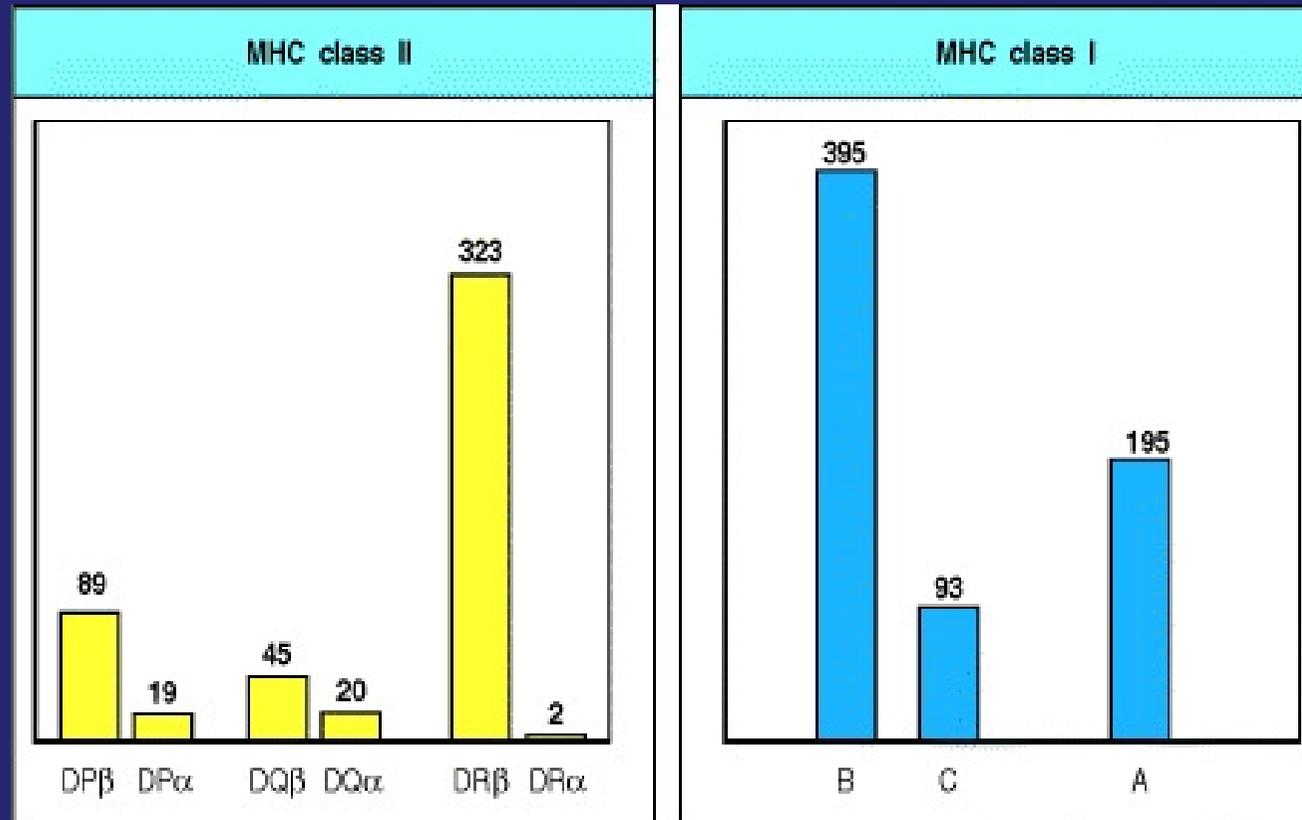


**Cada individuo expresa:**

-6 productos de Clase I (2 HLA-A, 2 HLA-B y 2 HLA-C)

- 12 productos de Clase II (2 HLA-DR, 2 HLA-DP, 2 HLA-DQ) + trans-asociación (cadenas  $\alpha$  maternas asociadas con  $\beta$  paternas y viceversa)

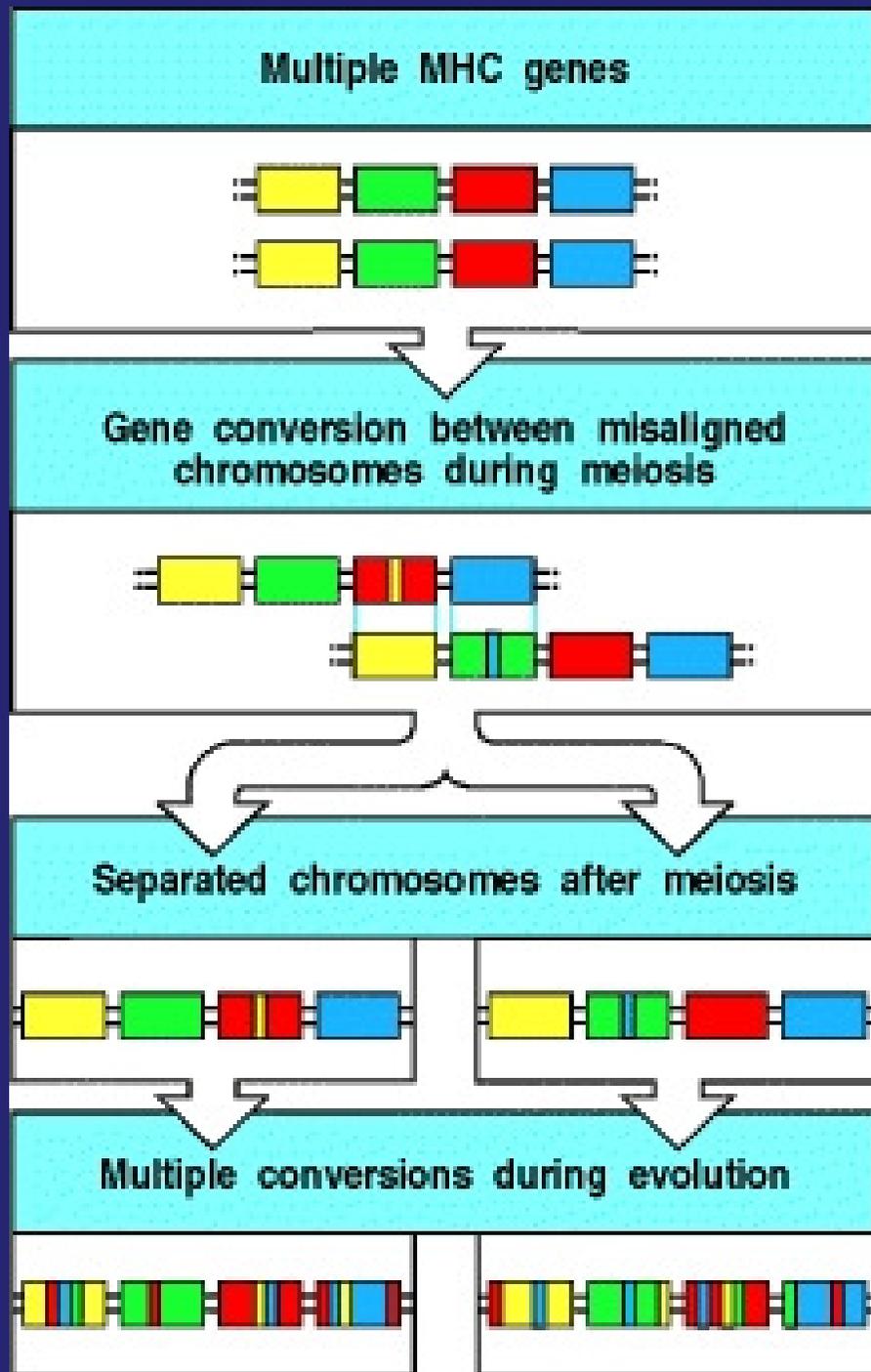
# Los genes MHC en Humanos son extremadamente polimórficos



Números de alelos del Sistema HLA

# Múltiples mecanismos génicos generan el polimorfismo del MHC

- 1- **Mutaciones puntuales:** sustituciones, reemplazos que pueden o no generar un cambio de aa.
- 2- **Conversión génica:** una secuencia es reemplazada en parte, por otra de un gen diferente (intercambio unidireccional).
- 3- **Recombinación génica:** se intercambia un segmento de AND en los 2 cromosomas homólogos durante la meiosis (intercambio bidireccional)

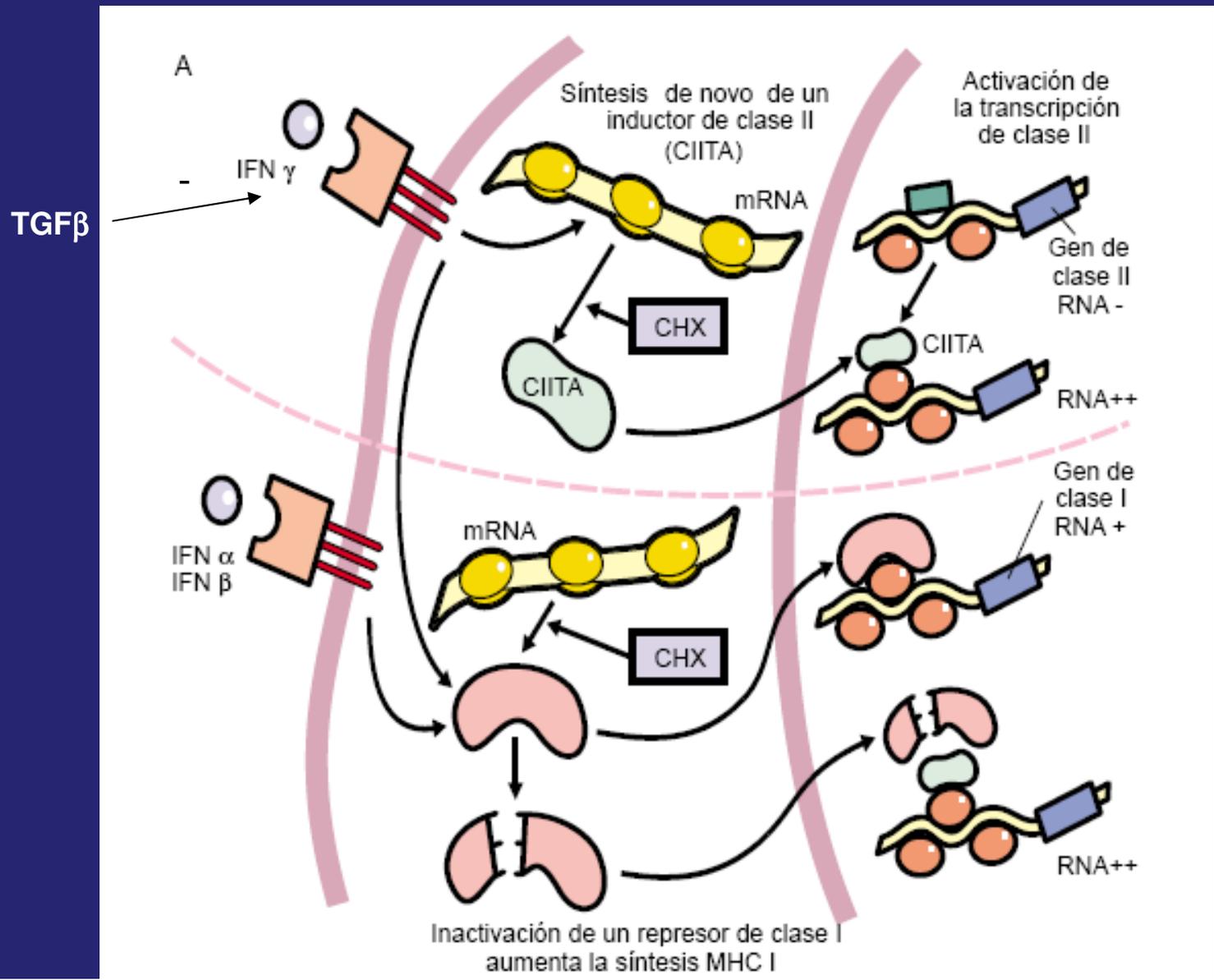


La Conversión génica genera nuevos alelos copiando secuencias desde un gene MHC a otro.

# Genes homólogos a CMH: Familia CD1

- Moléculas no polimórficas. En humanos el locus CD1 contiene 5 genes:
- CD1A, CD1B, CD1C, CD1D, CD1E
- Están compuestas por una cadena  $\alpha$  que se asocia a  $\beta$ 2-microglobulina
- Se expresan en CD, MO, timocitos y participan en la presentación antigénica a determinadas subpoblaciones de LT.
- Son moléculas presentadoras de glucolípidos (ej. Derivados de micobacterias como Ac. Micólico, fosfoinositolmanósido, manósidos, etc)

# Regulación de la expresión de los genes del CMH por factores que no unen DNA



CIITA (class II transactivator)



Se expresa solo en células que expresan clase II

- Induce la expresión de genes de clase II sin unirse al DNA
- se une a factores que interactúan con el elemento X

# Regulación de la expresión de los genes del CMH por regiones promotoras

**Clase I: regiones promotoras críticas**

1- enhancer A: dividido en kB1 y kB2

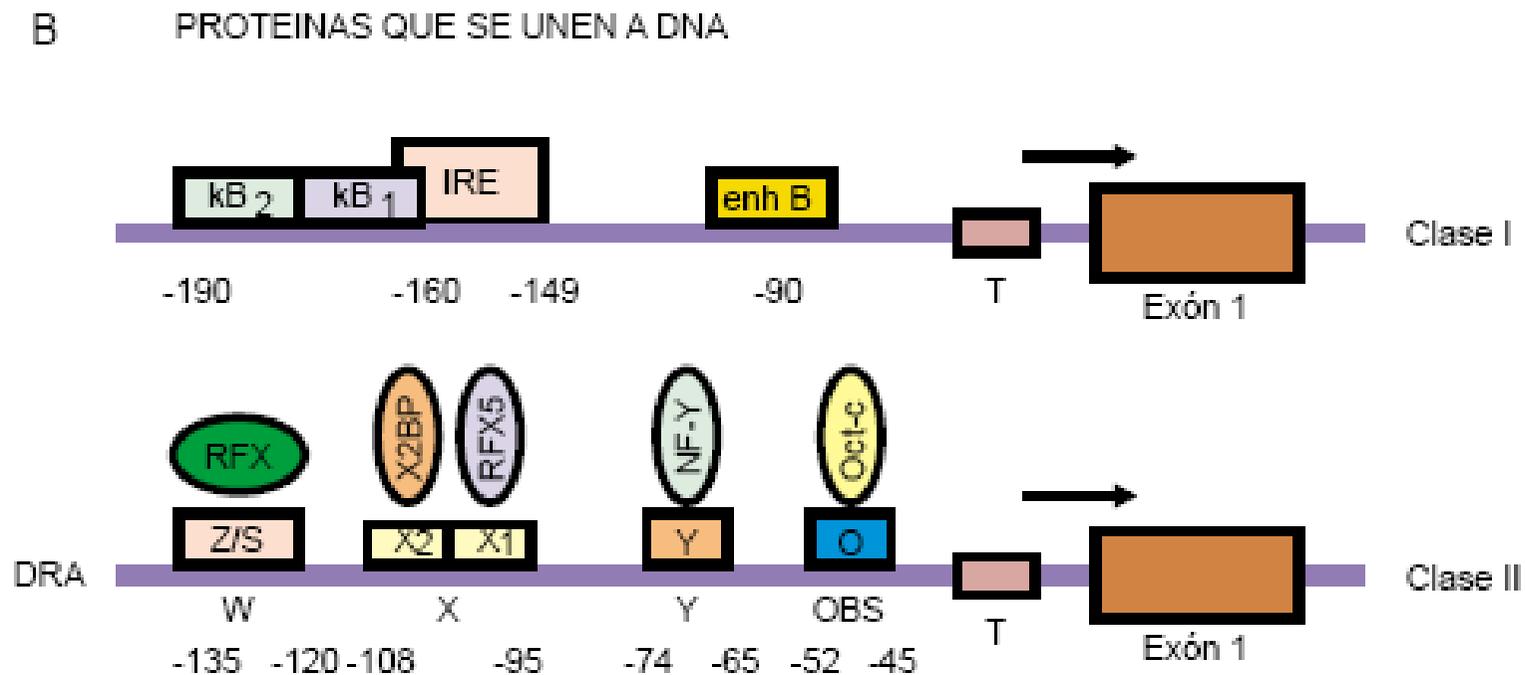
2- IRE (interferon responsive element)

3- enhancer B

**Clase II: regiones promotoras críticas**

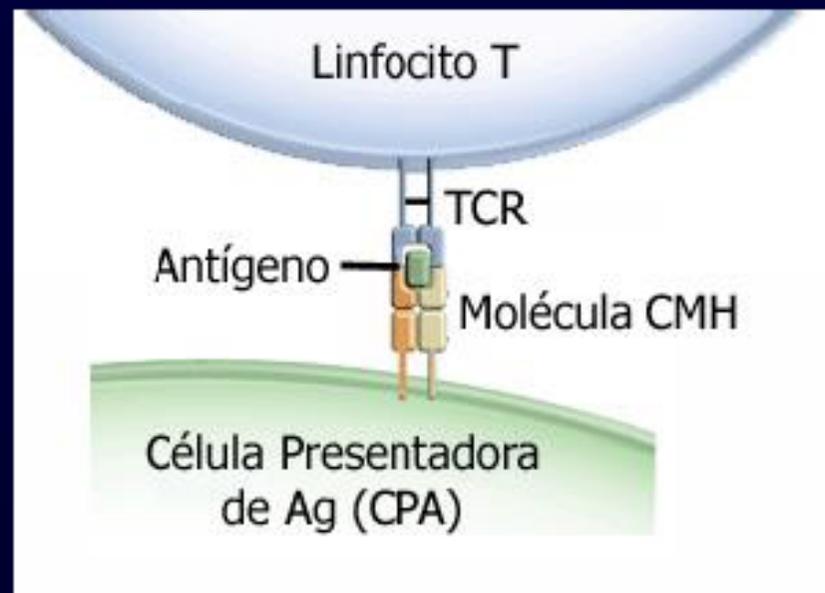
1- Regiones promotoras (W,X,Y)

2- Proteínas reguladoras que se unen a W,X,Y

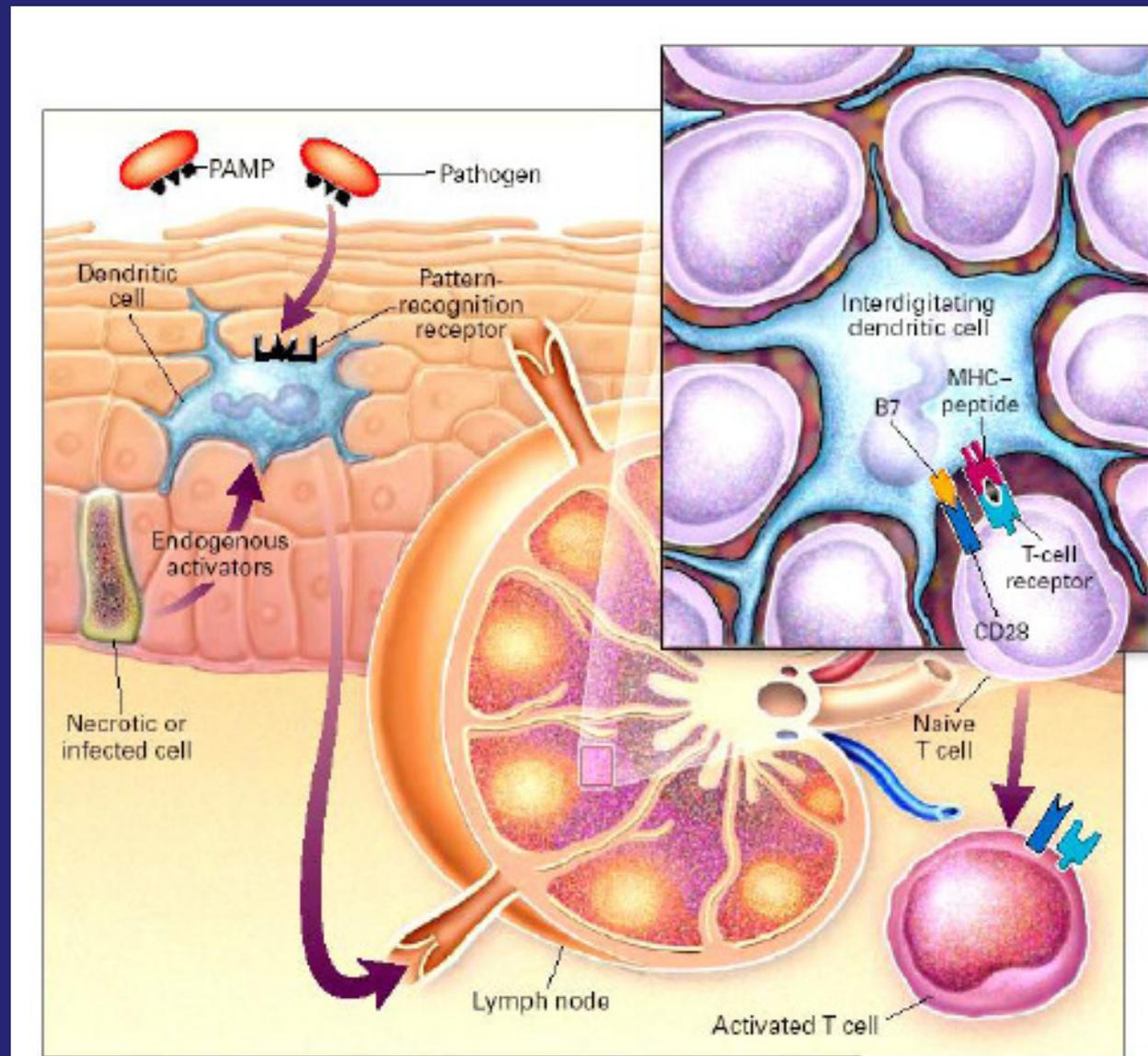


# Funciones de las moléculas de sistema HLA

El linfocito T sólo puede reconocer antígenos que sean presentados en asociación con una molécula CMH en la superficie de una CPA

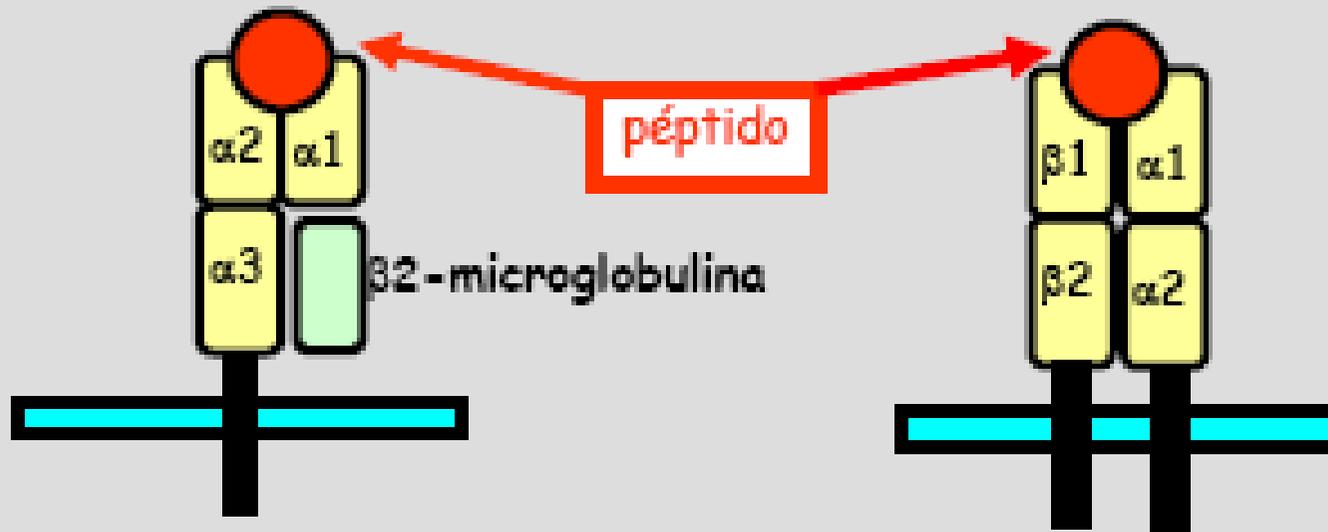


# 1- Reconocimiento antigénico: Inicio de la respuesta inmune adaptativa



CMH clase I

CMH clase II

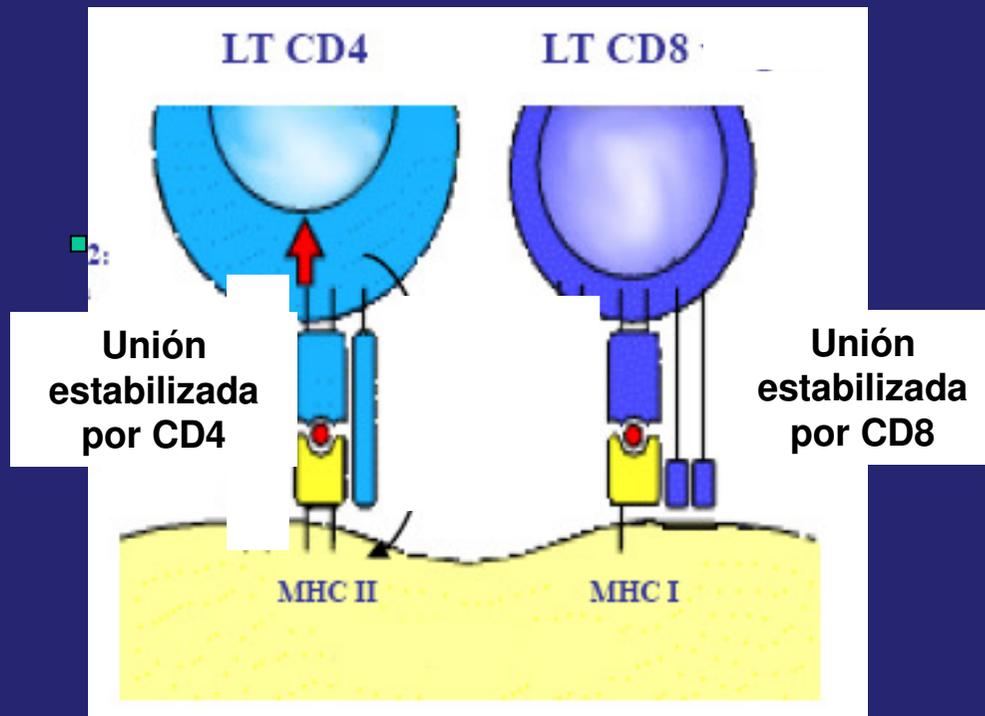


Péptidos (propios y  
provenientes patógenos  
citosólicos) presentados a  
los LTCD8+

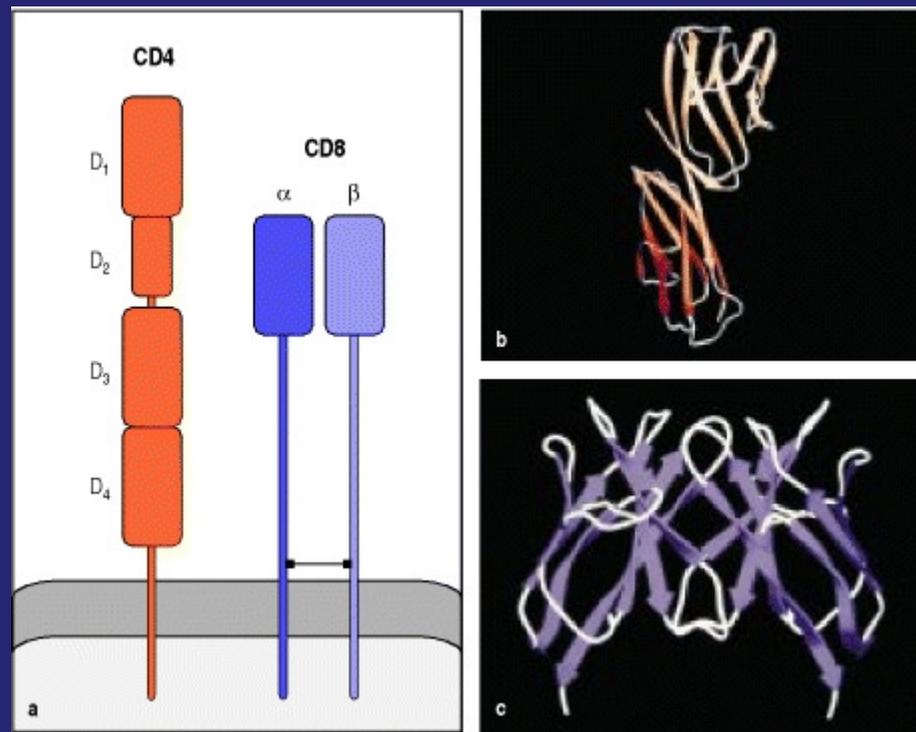
Péptidos (propios y  
provenientes de los  
patógenos exógenos  
o intravesiculares)  
presentados a los  
LTCD4

**Linfocitos T CD4 reconocen MHC de Clase II y estabilizan la unión a través del co-receptor CD4**

**Linfocitos T CD8 reconocen MHC de Clase I y estabilizan la unión a través del co-receptor CD8**



# Estructura de los co receptores CD4 y CD8

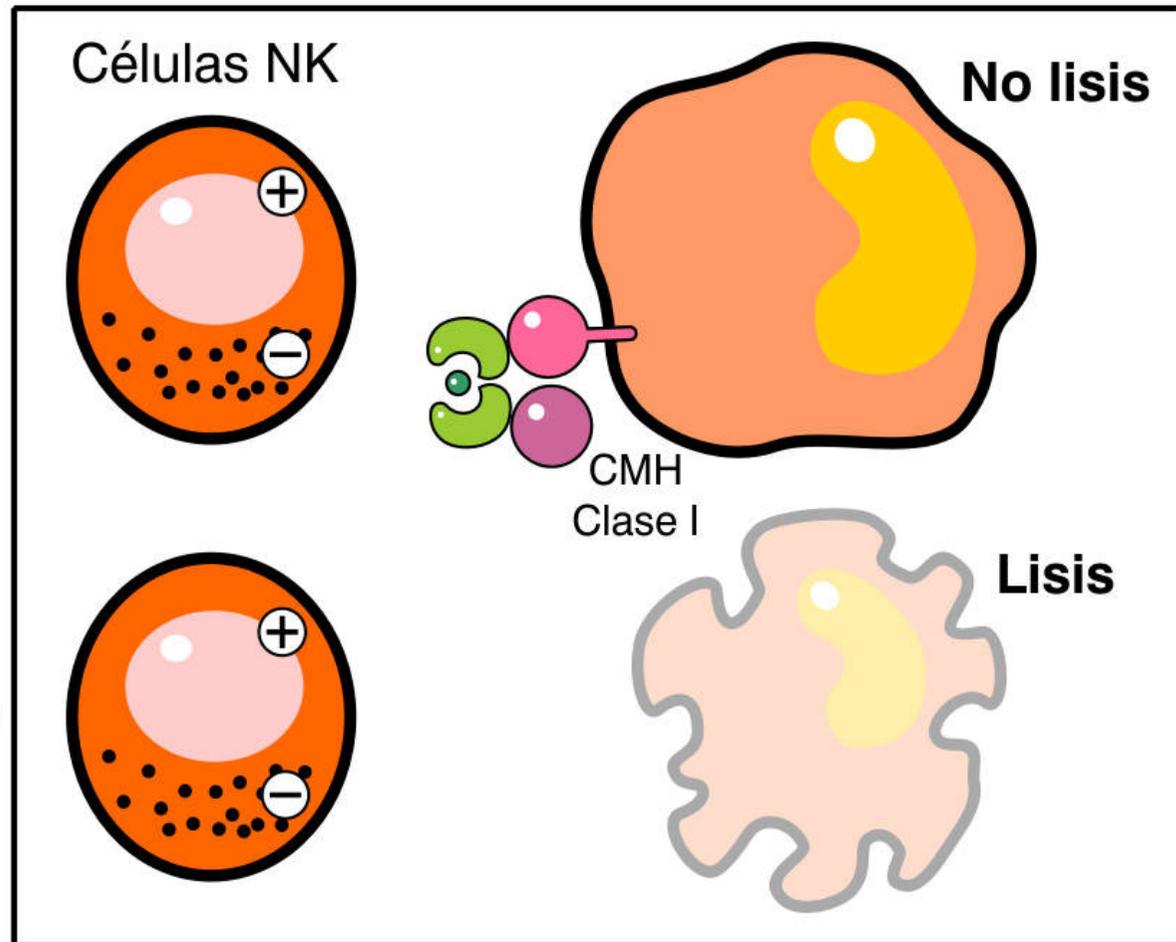


## 2- Las moléculas MHC de Clase I modulan la actividad citotóxica de las células NK

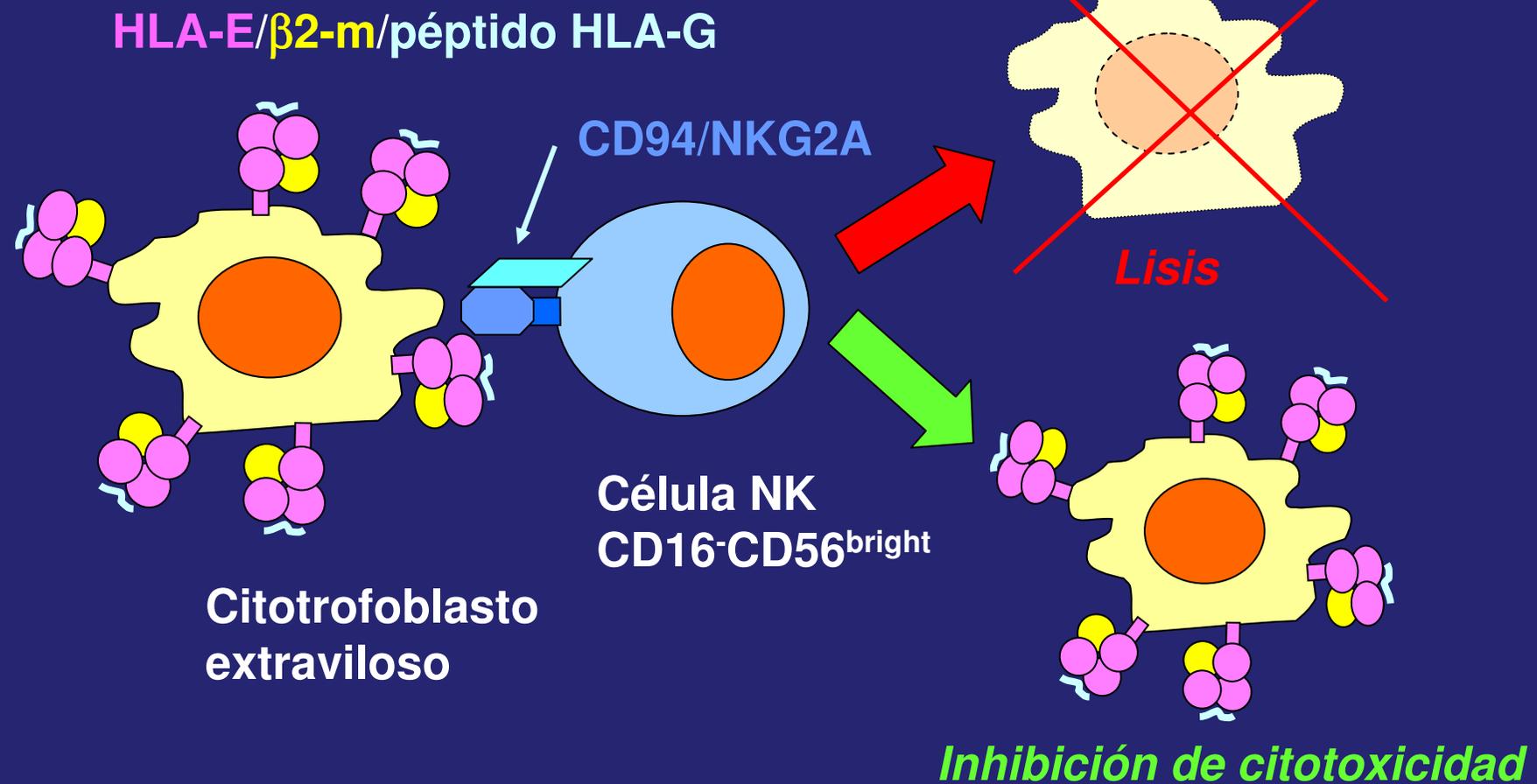
"Missing self hypothesis"  
Klas Kärre



Monitoreo de los niveles  
de expresión de moléculas  
de clase I del CMH



### 3- La expresión selectiva de HLA-E y HLA-G en el trofoblasto modulan la actividad citotóxica de las células NK uterinas (uNK)



# HLA y Genética poblacional

## Frecuencia de los alelos HLA-Bw53 en diferentes poblaciones

Países donde el paludismo es endémico			Países donde el paludismo no es endémico					
Gambia			Nigeria	Zambia	Zimbawe	Sudáfrica	Caucásicos y orientales	Amerindios
Paludismo								
Severa	Leve	Sanos						
15%	24%	25%	40%	21%	16%	2%	0-1%	0%

### Conceptos:

1- ventaja del heterocigota: permite que individuos heterocigotas presenten un universo mayor de péptidos si se los compara con individuos homocigotas.

2-la frecuencia del alelo señala la ventaja evolutiva que confiere dicho alelo a un determinado grupo étnico para defenderse de determinados microorganismos del entorno.

# HLA y Enfermedad

Determinados alelos del HLA podrían conferir susceptibilidad a ciertas enfermedades

Riesgo Relativo (RR): cuantas veces más riesgo de padecer la enfermedad poseen los portadores del alelo respecto de los que lo portan en un determinado grupo étnico.

$$RR = \frac{a/c}{b/d}$$

	Frecuencia del alelo HLA	
	Presente	ausente
Pacientes enfermos	a	b
Población sana	c	d

Mecanismos Postulados:

1- la enfermedad se debe realmente a genes ligados dentro del complejo HLA

2-Determinados alelos permitirían la sobrevida de clones autoreactivos durante la selección tímica

3-Mimetismo molecular

# Tipos de transplantes

---

Órganos sólidos vascularizados	→	TX de endotelio y APCs
Médula ósea	→	TX de un sistema inmune completo

---

## Tipos de reacciones de rechazo:

clasificación por criterios histopatológicos y tiempo de presentación  
Mecanismos efectores: linfocitos T CD4, CD8 y aloanticuerpos

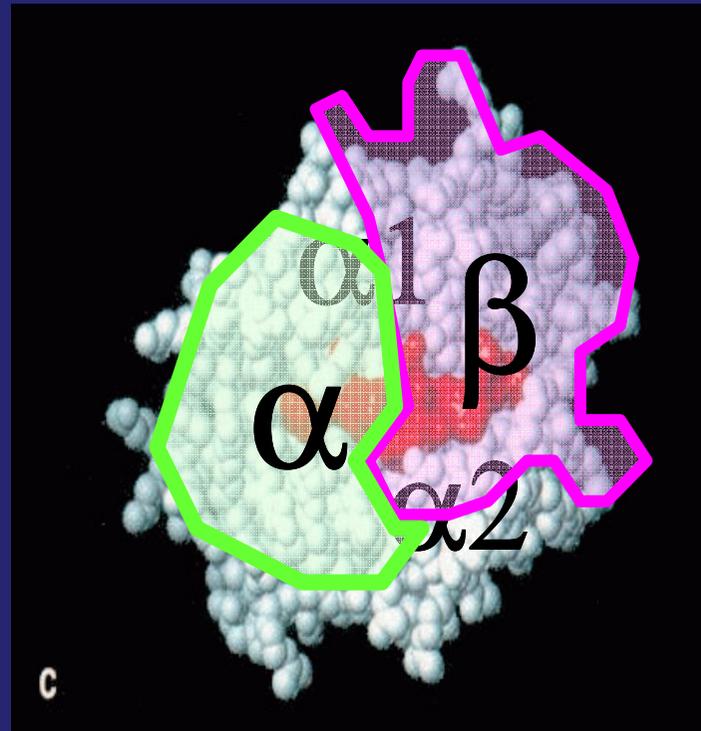
Órganos sólidos vascularizados

hiperagudo  
acelerado  
agudo  
crónico

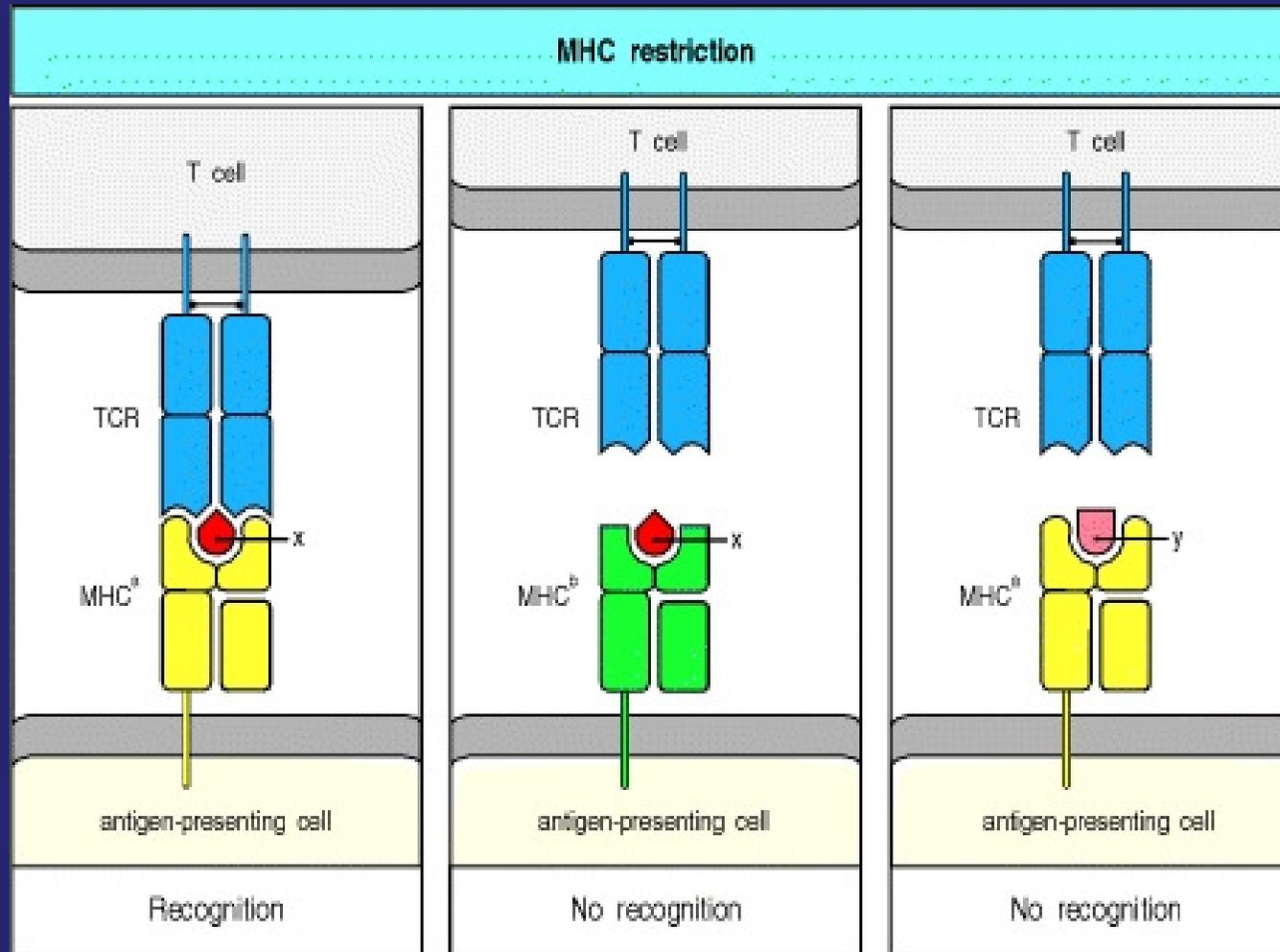
Médula ósea

GVHD

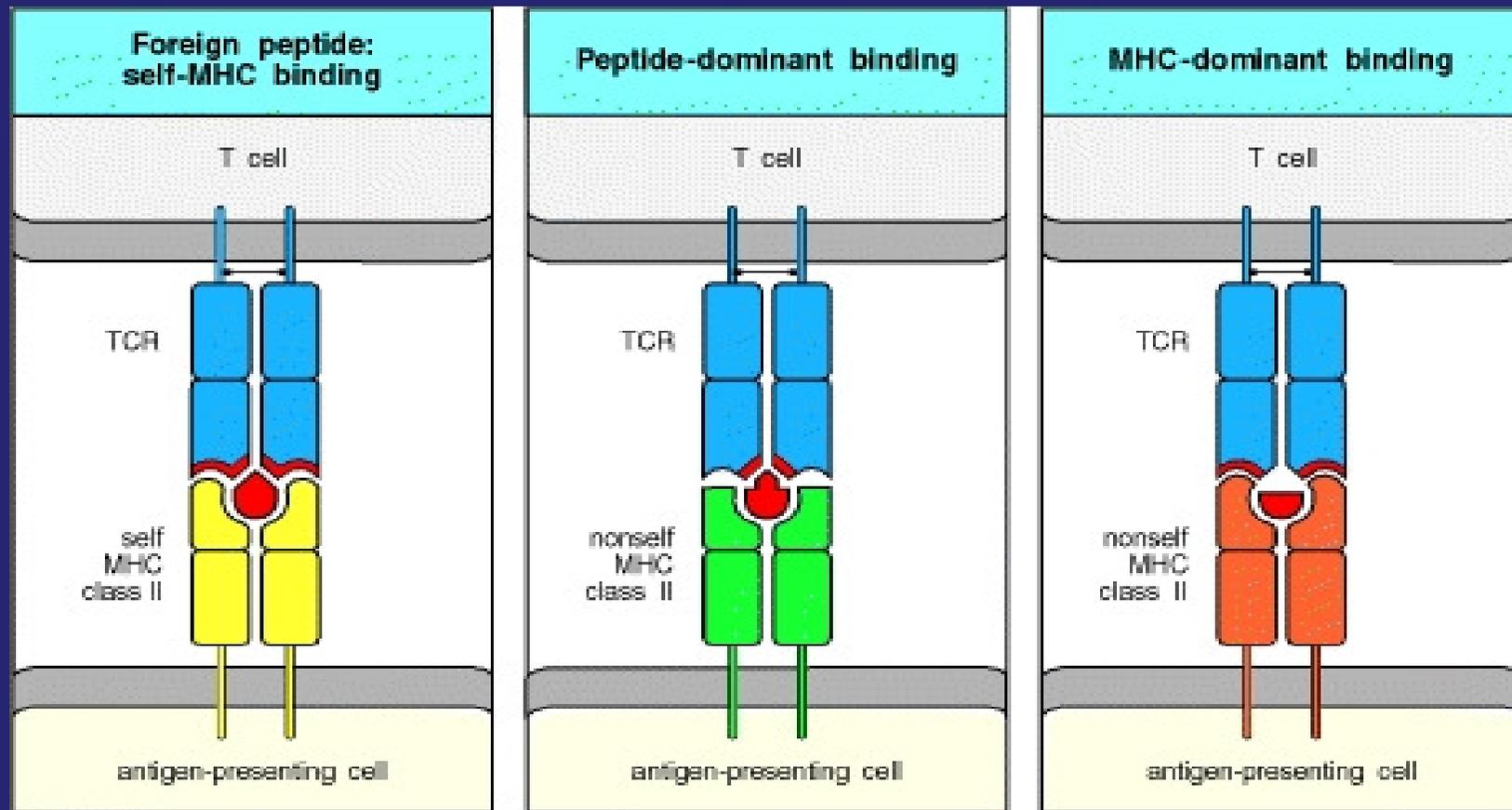
# Bases moleculares del alorreconocimiento



# Restricción del MHC



# Modelos de reconocimiento cruzado que explican la aloreactividad

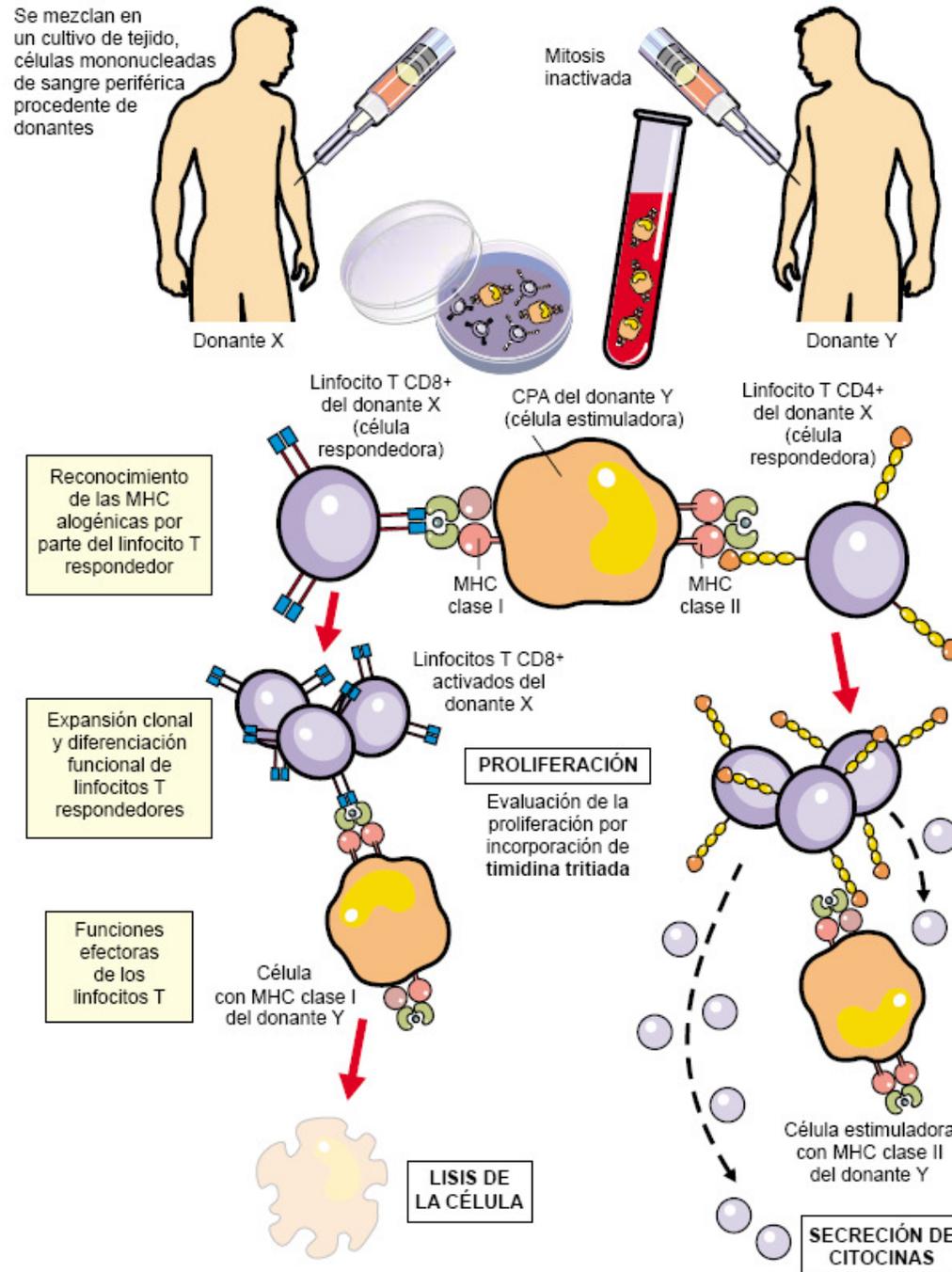


# Técnicas de tipificación de alelos del complejo mayor de histocompatibilidad humano (HLA)

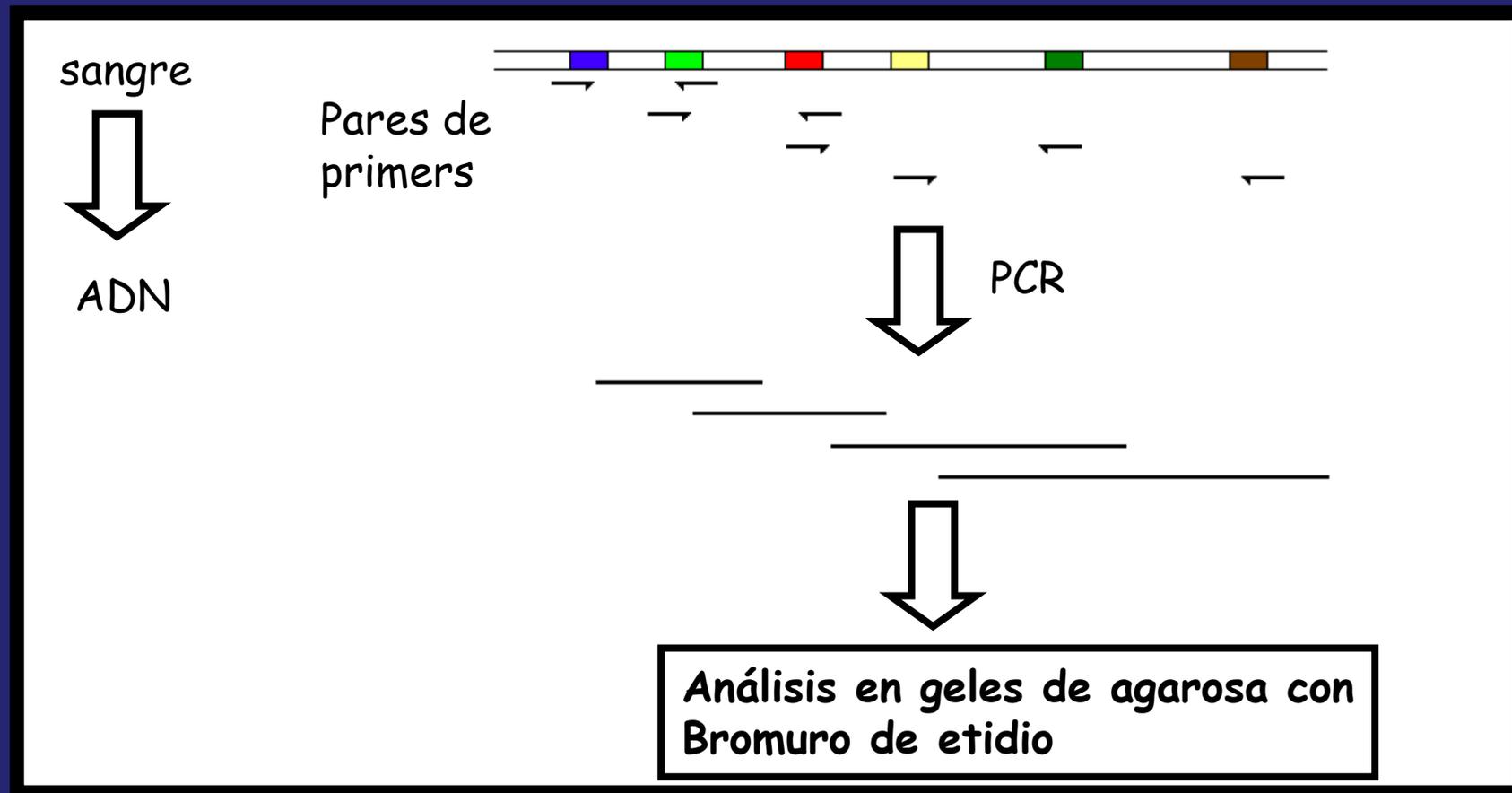
## Objetivos:

- \* Estudios de histocompatibilidad para transplante de órganos vascularizados
- \* Estudios de histocompatibilidad para transplante de médula ósea
- \* Estudios de paternidad
- \* Estudios de asociación de alelos del HLA con enfermedades (susceptibilidad)
- \* Estudios antropológicos para establecer posibles relaciones entre distintas poblaciones o grupos étnicos.

# Cultivo Mixto Linfocitario



# Técnicas moleculares: PCR con cebadores específicos de secuencia (SSP)



# PCR con cebadores específicos de secuencia (SSP)

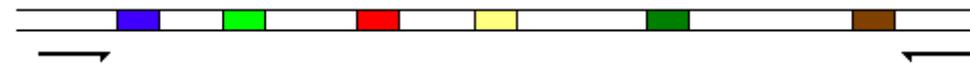
## Ventajas:

- Técnica sencilla, poco equipamiento sofisticado (máquina para PCR).
- No requiere el aislamiento de células (se trabaja con sangre entera).
- Resolución mayor que las técnicas serológicas ("Resolución intermedia").
- Costo relativamente bajo
- Se puede interrumpir la técnica en diversos pasos.
- Permite la detección de alelos "nulos".
- Es adecuado para tipificación de donantes cadavéricos

## Desventajas:

- No es adecuado para tipificación de donantes de médula ósea no relacionados.
- Presenta ambigüedades.
- Cada par de "primers" amplifica unos pocos alelos del HLA, por lo que será necesario el empleo de un gran número de pares de "primers" con el fin de obtener una resolución aceptable en la asignación de alelos a la muestra.
- De esta manera el método no resulta práctico para análisis simultáneo de un gran número de muestras (batch mode).
- No se detecta homocigosis.

# Técnicas moleculares: PCR con primers específicos de locus e hibridación con sondas marcadas, específicas de alelos (SSOP)



PCR con primers locus-específicos



Análisis den geles de agarosa; inmovilización en membranas



Hibridación con sondas alelo-específicas, marcadas  
Con  $^{32}\text{P}$  o digoxigenina (detección quimioluminiscente)



autorradiografía

# PCR con cebadores específicos de locus e hibridación con sondas marcadas, específicas de alelos (SSOP)

## Ventajas:

No requiere el aislamiento de células (sangre entera).

Alta resolución.

Se puede interrumpir la técnica en diversos pasos.

Es posible detectar homocigosis y alelos "nulos".

Adecuado para tipificación de donantes cadavéricos.

Permite el análisis simultáneo de un número grande de muestras.

## Desventajas:

Interpretación compleja (reactividad cruzada entre sondas, detección de determinadas combinaciones de alelos producen patrones similares).

Las condiciones de lavado de las diferentes sondas pueden ser diferentes, lo que complica en procesamiento simultáneo de muchas muestras.

A pesar de su elevada resolución, siguen existiendo ambigüedades.

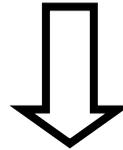
Técnica compleja y costosa que requiere equipamiento algo más sofisticado (máquina para PCR, horno para hibridaciones, infraestructura para manipulación de radioisótopos).

Generación de desechos radiactivos.

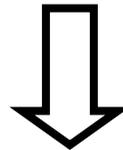
# Técnicas moleculares: Secuenciación directa (SBT)



PCR con primers monomórficos



Reacción de secuenciación con primers marcados con fluorocromos



**Secuenciación automática en secuenciador de ADN  
Interpretación (gene librarian)**

# Secuenciación directa (SBT)

## Ventajas:

No requiere el aislamiento de células (se trabaja con sangre entera).

Alta resolución (se alcanza el máximo de resolución posible).

Se puede interrumpir la técnica en diversos pasos.

Ideal para la detección de homocigosis.

Óptimo para tipificación de donantes cadavéricos..

Interpretación automatizada.

Permite la detección de alelos "nulos".

## Desventajas:

Técnica sofisticada que requiere equipamiento complejo y altamente costoso (secuenciador automático de ADN).

Elevado costo (todavía).

Se puede analizar un número reducido de muestras simultáneamente (dependiendo esto del tipo de detector que posee el secuenciador)

# Bibliografía

- Introducción a la Inmunología Humana  
Fainboim y Geffner (Editorial Panamericana, 2004)
- Immunobiology, Janeway 5ta. Edición 2001
- Guía de Técnicas Inmunológicas -Departamento de Microbiología,  
Parasitología e Inmunología- Facultad de Medicina UBA, 2009