

# Sekvencioniranje i ekspresija gena za klasu i antigena glavnog sustava tkivne srodnosti placente štakora

---

**Radojčić-Badovinac, Anđelka**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**1990**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:188:529160>

*Rights / Prava:* [Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-18**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the University of Rijeka Library - SVKRI Repository](#)



I A U T O R

Ime i prezime: ANĐELKA RADOJČIĆ  
Datum i mjesto rođenja: 28. kolovoza 1958. Ogulin  
Naziv i mjesto završene srednje škole: Gimnazija Rijeka  
Naziv fakulteta i datum završetka: Medicinski fakultet Rijeka, 1983.  
Sadašnje zaposlenje: asistent Medicinskog fakulteta u Rijeci

II DISERTACIJA - MAGISTARSKI RAD

N a s l o v : SEKVENCIONIRANJE I EKSPRESIJA GENA ZA KLASU I ANTIGENA GLAVNOG SUSTAVA TKIVNE SRODNOSTI PLACENTE ŠTAKORA  
Ustanova ili mjesto gdje je izrađena: Zavod za patologiju Medicinskog fakulteta sveučilišta Pittsburgh  
Broj str., slika, literatura: 1212 str., 18. sl., 5 tab. 179 ref.  
Znanstvena disciplina: Medicina  
Fakultet na kojem je izvršena obrana: Medicinski fakultet Rijeka

III OCJENA I OBRANA

Datum prijave teme: 5. siječnja 1989.  
Datum predaje rada: 15. siječnja 1990.  
Datum sjednice Vijeća na kojoj je rad prihvaćen: 17. travnja 1990.  
Sastav Komisije koja je rad ocijenila: prof.dr. Daniel Rukavina, doc.dr. Milena Kružić, prof.dr. Draško Šerman, doc.dr. Nikola Matejčić  
Datum obrane rada: 27. travnja 1990.  
Sastav Komisije pred kojom je rad obranjen: I s t i

Rad je u cijelosti izrađen u zavodu za patologiju Medicinskog fakulteta sveučilišta Pittsburgh (Department of Pathology, School of Medicine, University of Pittsburgh, PA, USA)

Mentor: Prof. dr. Thomas J. Gill III

# PREDGOVOR

Najljepše hvala mojim prijateljima i učiteljima i svima onima koji su imali strpljenja čekajući me u Jugoslaviji. Posebna zahvala ide prof. dr. Danielu Rukavini koji je i omogućio da započnem ovaj rad.



# FOREWORD

I would like to express my appreciation and gratitude to my major advisor Dr. Thomas J. Gill III. I would like to thank Drs. Andrea Cortese Hassett and Heinz W. Kunz for the many hours of advice, encouragement and support. Thanks also to numerous individuals in the Department of Pathology, especially Dr. Joseph Locker for his guidance and Gregory Buzard.

Many thanks to Dorothy, Barbara, John, Maria, Kathleen, Linda and Cliff.



Mojim roditeljima

# SAŽETAK

Za istraživanja karakteristika, ekspresije i kontrole ekspresije gena klase I GSH u placenti štakora, kDNK klon pARI.5 je izoliran iz (WFxDA)F1 genske knjižnice. Sekvencioniranje je pokazalo da je pARI.5 insert dužine 1.6 kb od čega prvih 1131 nukleotida kodiraju antigen klase I. Protein, izveden iz pARI.5 nukleotidnih sekvencija se sastoji od signalnog peptida, tri ekstracelularne domene i membranskog-citoplazmatskog dijela. Signalni protein i transmembranski dio pokazuju tipičan hidrofoban karakter, dok ekstracelularne domene dijele visok stupanj homologije s antigenima klase I drugih sisavaca. Izvedeni protein analiziran je i s aspekta tercijarne strukture molekule klase I. Varijabilne aminokiseline nalaze se na istim pozicijama kao u antigenima drugih sisavaca s iznimkom pozicija 134-150.

U eksperimentima ekspresije pARI.5 insert je rekloniran u pcEXV3, vektor pogodan za ekspresiju u COS7 fibroblastima bubrega zelenog majmuna. Upotrebene su dvije metode: 1) prolazna transfekcija DEAE-dekstran metodom; 2) trajna transfekcija precipitacijom s kalcijevim fosfatom i kotransfekcijom genom za rezistenciju na neomicin. Stanice su potom bojane metodom indirektno imunofluorescencije različitim, štakorskim, monoklonskim i poliklonskim antitijelima. Rezultati pokazuju da je pARI.5 kodirajuća regija za Pa antigen.

Hibridizacija probama izoliranim iz pARI.5 inserta pokazuje da je Pa gen prisutan u svim ispitivanim štakorskim sojevima. Pa pozitivni sojevi (DA, ACP, R16 i BUF) u XbaI digestiji genomske DNK pokazuju specifičan hibridizacijski fragment veličine 1,8 kb, dok Pa negativni sojevi (LEW, WF i YO) imaju fragment veličine 1,7 kb. Southern blot hibridizacija također ukazuje da pARI.5 posjeduje sekvencije vrlo slične mnogim drugim genima klase I štakora. U uvjetima jake stringencije dobije se specifičan fragment dok u uvjetima umjerene stringencije, probe hibridiziraju mnoštvo restrikcijskih fragmenata.

## S U M M A R Y

In order to investigate MHC class I antigen expression in the rat placenta, a cDNA (WFxDA) (uxa) library was made. The most abundant class I clone, pARI.5, was sequenced by the chemical degradation and chain termination methods. The clone is 1612 bp long, and the first 1131 bp encode the translated portion of the class I antigen from the signal peptide through the carboxy-terminus.

In order to compare the important structural features of the class I antigens, the amino acid sequence derived from clone pARI.5 was aligned with representative mouse, rabbit, and human class I sequences, as well as with the previously published partial rat sequences. The amino acid sequences of all of the domains except the transmembrane-cytoplasmic region are highly conserved. The cysteine residues, which form disulfide bridges, and the glycosylation recognition sequence for N-linked glycans are also conserved in the pARI.5 deduced protein. The signal peptide and the transmembrane domain are highly hydrophobic. Analysis of the tertiary structure shows that the amino acids of the variable regions are clustered in the same positions as in the class I antigens of the other species with the exception of positions 134-150.

In the expression study, the pARI.5 insert was recloned into the mammalian expression vector pcEXV3. Two types of transfectants were generated by transfection of the COS7 green monkey kidney fibroblasts with the pcEXV3/pARI.5 construct: 1) the transient transfectants by the DEAE-dextran method; and 2) persistent transfectants by calcium phosphate precipitation, cotransfection with a gene encoding resistance to neomycin and growth in medium supplemented with Geneticin. The transient transfectants and the drug-resistant cells were analyzed with different rat monoclonal and polyclonal antibodies by the indirect immunofluorescence method for rat class I expression. The expression studies showed that pARI.5 codes for the Pa antigen.

Different rat genomic DNAs were hybridized with four different probes: two from the 5' region, which is known to be allele specific, and two from the 3' UR (untranslated region), which is known to be locus specific in the mouse and human class I genes. The 3' probes and 5' probes hybridize to many restriction fragments under moderate stringency conditions, and this observation suggests that Pa gene share sequences with many other rat class I genes. However, an XbaI restriction fragment unique to Pa was found with the 5' probe under high stringency conditions of hybridization. The fragment hybridizes a 1.8 kb band in Pa-positive rat strains (DA, ACP, R16 and BUF), and a 1.7 kb band in Pa-negative strains (WF, YO, LEW).

# LISTA SKRAĆENICA

GSH	glavni sustav histokompatibilnosti
Tla	T limfocitni antigen
RT1	glavni sustav histokompatibilnosti štakora
HLA	glavni sustav histokompatibilnost čovjeka
H-2	glavni sustav histokompatibilnost miša
DNK	deoksiribonukleinska kiselina
kDNK	komplementarna deoksiribonukleinska kiselina
RNK	ribonukleinska kiselina
gRNK	glasnička ribonukleinska kiselina
tRNK	transportna ribonukleinska kiselina
cM	centimorgan
grc	engl. growt and reproduction
Pa	engl. pregnancy associated
kb	kilo baza
pb	par baza
5'NR	5'neprovođena regija
3'NR	3'neprevođena regija
$\beta_2$ mg	$\beta_2$ mikroglobulin
CTL	citotoksični T limfocit
N	dušik; arginin; normalna otopina
T	trionin
S	serin
CRE	klasa I regulacijski element
ml	mililitar ( $10^{-3}$ l)
$\mu$ l	mikrolitar ( $10^{-6}$ l)
rpm	revolucija po minuti

M	. . . . .	molarna otopina
mM	. . . . .	milimolarna otopina
EDTA	. . . . .	etilen diamin tetra acetat
g	. . . . .	gram
ng	. . . . .	nanogram ( $10^{-12}$ g)
$\mu$ g	. . . . .	mikrogram ( $10^{-6}$ g)
mg	. . . . .	miligram ( $10^{-3}$ g)
kg	. . . . .	kilogram $10^3$ g)
V	. . . . .	volt
UV	. . . . .	ultraviolet
W	. . . . .	vat
$\mu$ Ci	. . . . .	mikroCiry
mmol	. . . . .	milimol
DMEM	. . . . .	Dulbeco Minimal Essential Medium
FCS	. . . . .	engl. fetal calf serum
BSA	. . . . .	engl. bovine serum albumine
mm	. . . . .	milimetar ( $10^{-3}$ m)
cm	. . . . .	centimetar ( $10^{-2}$ m)
nm	. . . . .	nanometar ( $10^{-12}$ m)
SDS	. . . . .	sodiumduodecil sulfat
SSC	. . . . .	natrijev klorid i natrijev citrat
U	. . . . .	jedinica
$^{\circ}$ C	. . . . .	stupanj Celzius
DEAE	. . . . .	dietilaminoetil
C	. . . . .	ugljik; citozin
PVP	. . . . .	polivinil pirolidon

# SADRŽAJ

	strana
PREDGOVOR	I
SAŽETAK	III
SUMMARY	IV
LISTA SKRAĆENICA	V
1.0 U V O D	1
1.1 Organizacija i struktura GSH štakora	1
1.2 Struktura gena i karakteristike gRNK klase I antigena stanične membrane	6
1.3 Karakteristike proteina klase I	8
1.4 Ekspresija antigena klase I	11
1.4.1 Regija ekspresije na nivou gena	11
1.4.2 Ekspresija antigena GSH u placenti	11
1.5 Cilj istraživanja	13
2.0 M A T E R I J A L	14
2.1 Životinje	14
2.2 kDNK knjižnica gena	14
2.3 Kemikalije i enzimi	14
2.4 Kromatografski materijal i nitrocelulozne membrane	16
2.5 Mediji i otopine	16
2.6 Radioizotopi	17
2.7 Prokariotske i eukariotske stanice domaćini	17
2.8 Hibridizacijske probe i vektori	18
2.9 Poliklonska i monoklonska antitijela	18
3.0 M E T O D E	21
3.1 Priprema plazmida	21
3.1.1 Rekloniranje inserta	21



3.1.2 Rast bakterija i umnožavanje plazmidne DNK . . . . .	21
3.1.3 Liza bakterija . . . . .	23
3.1.4 Izoliranje i pročišćavanje plazmidne DNK . . . . .	23
3.2 Analiza plazmidne DNK . . . . .	24
3.2.1 Digestija DNK restrikcijskim endonukleazama . . . . .	24
3.2.2 Elektroforeza DNK na agaroznom gelu . . . . .	24
3.3 Sekvencioniranje DNK . . . . .	24
3.3.1 Metoda degradacije lanca DNK . . . . .	25
3.3.2 Sekvencioniranje DNK metodom terminacije lanca . . . . .	26
3.3.3 Denaturacijski gel . . . . .	26
3.3.4 Kompjuterska analiza podataka . . . . .	27
3.4 Priprema probe . . . . .	30
3.4.1 Radioaktivno obilježavanje probe . . . . .	30
3.4.2 Odvajanje neugrađenih radionukleotida . . . . .	31
3.5 Ekspresija inserta u stanicama sisavaca . . . . .	32
3.5.1 Priprema inserta u odgovarajućem trans lacijskom kodu . . . . .	32
3.5.2 DEAE-dekstran metoda jednokratne trans fekcije . . . . .	32
3.5.3 Trajna transfekcija metodom precipitacije kalcijevim fosfatom . . . . .	33
3.5.4 Metoda indirektno imunofluorescencije . . . . .	33
3.6 Hibridizacija genomske DNK . . . . .	35
3.6.1 Izoliranje DNK iz tkiva i staničnih kultura . . . . .	35
3.6.2 Digestija genomske DNK restrikcijskim enzimima . . . . .	35
3.6.3 Transfer DNK na nitrocelulozne membrane . . . . .	36
3.6.4 Prehibridizacija . . . . .	36
3.6.5 Uvjeti hibridizacije . . . . .	36
3.6.6 Uvjeti pranja filtera . . . . .	37
3.6.7 Radiografija . . . . .	37



4.0	REZULTATI	38
4.1	Nukleotidne sekvencije klona klase I	38
4.1.1	Restriksijska mapa i strategija skvencio niranja	38
4.1.2	Hibridizacija klonova kDNK knjižnice gena i izoliranje pARI.5 inserta	38
4.1.3	Nukleotidne sekvencije pARI.5 inserta	38
4.2	Analiza pARI.5 sekvencija i izvedenog proteina	41
4.2.1	Analiza nukleotidnih sekvencija pARI.5 inserta	41
4.2.2	Karakteristike proteina dobivenog iz pARI.5 nukleotidnih sekvencija	41
4.2.3	Usporedba s parcijalnim štakorskim klonovima i antigenima klase I drugih sisavaca	45
4.3	Citometrijska analiza transformiranih COS7 stanica	48
4.4	Analiza hibridizacije DNK štakorskih sojeva probama dobivenim od pARI.5 inserta	52
4.5	Analiza hibridizacije genomske DNK stanica transformiranih in vitro	52
5.0	RASPRAVA	61
6.0	ZAKLJUČCI	72
7.0	LITERATURA	73
8.0	PRILOZI	91
	Lista skraćena od tri i jednog slova za esencijalne aminokiseline	91
	Biografija	92

# 1.0 U V O D

Geni glavnog sustava histokompatibilnosti (GSH) kontroliraju mnoge imunološke funkcije, kodirajući proteine koji učestvuju u imunološkom prepoznavanju i imunološkoj reaktivnosti. Produkt GSH su različite komponente komplementa i antigeni stanične membrane odgovorni za odbacivanje alografta, međustaničnu suradnju te imunološki odgovor na tumore i infekcije (76, 151, 178, 110, 154, 86).

Dosadašnja proučavanja GSH pokazuju važnu biološku ulogu sustava. Regulacija ekspresije gena GSH vjerojatno je uključena i u očuvanje trudnoće sisavaca.

## 1.1 ORGANIZACIJA I STRUKTURA GSH ŠTAKORA

Kao i u drugih sisavaca (137, 65, 172, 96, 111, 148), GSH štakora (RT1) kodira tri klase proteina: klasu I - transplantacijske antigene, klasu II - antigene imunološke reaktivnosti i klasu III - komponente komplementa (49). Uz mišji GSH (H-2) također se nalaze geni koji kodiraju diferencijacijske antigene limfoidnih stanica, Tla sustav (Qa i Tl antigeni) (37). Sličan sustav opisan je u štakora (165, 68), a novija istraživanja pokazuju da postoji i u čovjeka (85). Geni klase I kodiraju proteine stanične membrane ispoljene na većini somatskih stanica. To su u miša produkti lokusa K, D i L i obično ispoljavaju jak polimorfizam (78, 52). Lokusi klase I RT1 sustava su: RT1.A, RT1.E (118), RT1.E (93), RT1.G (68) i RT1.C (165). Lokusi klase II su RT1.B i RT1.D (15) i kodiraju antigene membrane građene od dva glikoproteinska lanca molekularne težine 32000 i 28000 daltona (173). Antigeni klase II prvenstveno su ispoljeni na membrani B limfocita (145) i makrofaga (57). Rad na identifikaciji trećeg lokusa klase II, RT1.H (174) još je u toku.

Do sada su opisana dva osnovna tipa organizacije GSH sisavaca. Primjeri su humani sustav (HLA) i H-2 sustav miša (81). U humanom tipu organizacije GSH, geni su poredani centromera -klasa II- klasa I gena, dok su u mišjem tipu organizacije geni klase II okruženi genima klase I. Ovakav raspored gena do sada je opisan samo u miša i štakora.

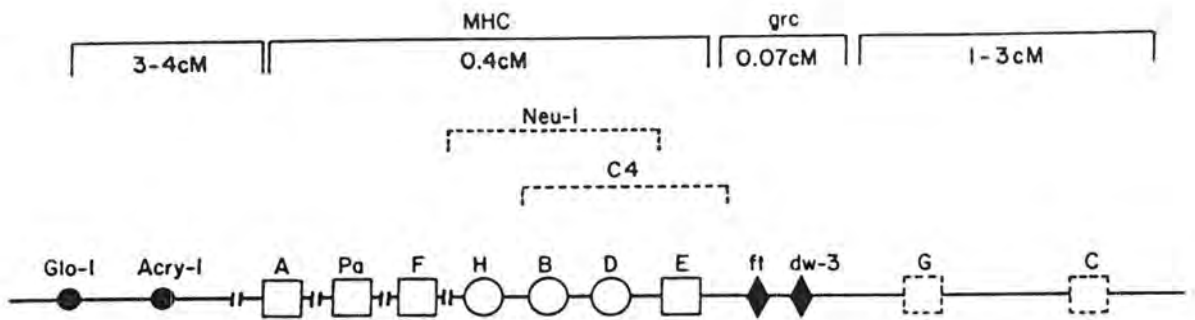
RT1 sustav sadrži najmanje šest lokusa utvrđenih klasičnim genetskim metodama: A, B, D, E, G, i C, poredani istim redoslijedom od centromere telomerno na kromosomu 14 (49, 127). RT1.A i RT1.E su lokusi koji kodiraju klasične transplan-

tacijske antigene i odgovaraju H-2K i H-2D lokusima miša ili HLA-A i HLA-B lokusima čovjeka. C i G lokusi kodiraju proteine slične Qa/Tl antigenima miša (165, 61, 68). B i D su geni klase II i odgovaraju H-2A i H-2E lokusima miša. Svaki ima najmanje dva gena, za  $\alpha$  i  $\beta$  lanac proteina.

Slika 1. pokazuje mapu GSH štakora na kojoj su sumirana dosadašnja saznanja o ovom genskom sustavu. Glo-1, gen za glikoksilazu 1 i RT1.A lokus su udaljeni 3,3 cM (centiMorgana). Udaljenost lokusa dobivena je izračunavanjem rekombinacije između ova dva lokusa iz sumiranih podataka Stolca i sur. i Samollova i sur. (166, 146). Laboratorijski dobiveni rekombinantni sojevi štakora R1 (20), R2 (161,83) i R10 (45) nesumljivo pokazuju da su lokusi A i B odvojeni i to za 0,1 cM (92, 46). Od do danas utvrđenih dvadeset rekombinantnih sojeva (49), kod osam se rekombinacijska točka nalazi između A i B lokusa, u jednom između B i D lokusa, a dvanaest rekombinanti je unutar E-grc-C regije.

Glavna razlika između H-2 i RT1 je u nivou polimorfizma koji pokazuju geni sustava. Dok je do sada objavljeno otprilike stotinjak H-2K i H-2D alela (164), serološki identificirani antigeni klase I štakora pokazuju slab polimorfizam. Utvrđeno je svega dvanaest različitih haplotipova, dvanaest alela RT1.A lokusa (46) i svega dva alela za lokuse RT1.E i RT1.F (118). RT1.E lokus otkriven je zahvaljujući otkriću grc (engl. growth and reproduction complex) lokusa (44), povezanog s RT1 sustavom i odgovornog za rast i fertilitet životinja. Segregacija grc i RT1.E lokusa je zajednička. RT1.E je dialelan sistem, u ili -, što onemogućuje utvrđivanje seroloških pokazatelja u mapiranju lokusa. Zato su iz različitih križanja izračunate rekombinacije između lokusa RT1.A koji omogućava serološku tipizaciju i grc lokusa koji se fenotipski ispoljava u maloj težini tijela životinja. Tako je utvrđena udaljenost od 0,4 cM između ova dva lokusa (44, 91, 45). Osim toga, dobivene su dvije rekombinantne životinje koje pokazuju da se grc sastoji od dva odvojena lokusa: ft (fertilitet) i dw-3 ( mala težina tijela ) koji su odvojeni 0,07 cM (91). Redosljed gena A - B -ft - dw-3 utvrđen je zahvaljujući rekombinantnim životinjama R10 i R11 (34). Iz ( R10 x ACP )F2 križanja dobivena je rekombinantna životinja R16 s genotipom RT1.A<sup>u</sup>E<sup>-</sup> i male tjelesne težine ( grc ) (67) što je pokazalo da se grc nalazi desno od E lokusa i da je redosljed gena RT1.ABEgrc.

Tla regija GSH miša kodira seriju molekula klase I ispoljenih na membranama hematopoetskih stanica (37). Ova je regija podijeljena u dvije subregije, Q i Tl koje kodiraju Qa i Tl antigene. Do sada nije utvrđena prava funkcija ovih molekula. Iako su po biokemijskim karakteristikama vrlo slični klasičnim transplantacijskim antigenima,



*Slika 1. GSH štakora*

Položaj lokusa klase I GSH su označeni praznim kvadratima, dok su lokusi klase II označeni praznim krugovima. Položaj lokusa pridruženih GSH štakora označeni su tamnim simbolima. Udaljenost lokusa je dobivena metodama klasične genetike i izražena je u centi morganima (cM).

Qa/Tl antigeni pokazuju nekoliko bitnih razlika: 1) manje su molekularne mase (37, 156); 2) pokazuju značajno manji polimorfizam (38, 37, 116, 170); 3) tkivna distribucija im je ograničena, za razliku od klasičnih taransplantacijskih antigena koji su prisutni na gotovo svim somatskim stanicama (37). U štakora su identificirana dva lokusa koja kodiraju antigene po karakteristikama slične Qa/Tl antigenima miša: RT1.C (83, 165, 61, 55) i RT1.G (67, 68). RT1.C lokus ima tri alela: a, l i u, nazvanih po haplotipovima sojeva kod kojih su identificirani. RT1.G ima dva alela (a i b) i negativnu varijantu (-). Serološki je otkriven u životinja s kroničnim odbacivanjem kožnog alografta. E, G i C lokusi mapirani su u istoj regiji GSH štakora (177).

Također je identificirano nekoliko drugih antigena klase I čiji se lokusi nalaze u RT1.A regiji GSH. RT1.E identificiran je monoklonskim antitijelom 39 (118) i mapiran lijevo od B lokusa u A regiji kod rekombinantnih životinja R10, R11 i R12, i životinja haplotipa a (118, Kunz W.H.-neobjavljeni podaci). Također je opisan Pa (pregnancy associated) antigen na membranama stanica bazalnog trofoblasta. Identificiran je aloantiserumom i monoklonskim antitijelima dobivenim iz alogenetskih trudnoća bez ikakve prethodne stimulacije (42, 43, 100, 64). Lokus koji kontrolira ekspresiju Pa antigena je dialelan. Pa lokus mapiran je u RT1.A regiji, a imunohistokemijske studije (64, 72) pokazuju da su Pa i A<sup>a</sup> različite molekule. Mapiranje lokusa A, E i Pa mora se uzeti s rezervom, jer do sada između njih nije utvrđena rekombinacija. Postojanje dva lokusa klase II u početku je utvrđeno serološkim metodama (90) i dokazano otkrićem i karakterizacijom rekombinantnog soja R12 (98). Pokazano je da se geni poredani redosljedom ABD. Daljna analiza rekombinante (14, 124) pokazala je da se mjesto rekombinacije nalazi između gena koji kodiraju alfa i beta lanac RT1.B lokusa, pa je redosljed klase II gena: B<sub>beta</sub><sup>n</sup>, B<sub>alfa</sub><sup>a</sup>, D<sup>a</sup> (α i β). Nedavna istraživanja (174) dokazala su postojanje trećeg lokusa klase II (RT1.H) homolognog humanom HLA-DP lokusu. Hibridizacijske analize rekombinantnih životinja R12 i R22 lociraju RT1.H između RT1.A i RT1.B lokusa. Geni za α i β lanac nalaze se oko "vruće" točke rekombinacije utvrđene kod R22 životinja. Nije potpuno jasno da li je RT1.H funkcionalni gen ili pseudogen, kao što je opisano za A<sub>beta</sub>eta gen miša (39).

Recesivni geni koji su vezani s GSH i utječu na rast i razvoj opisani su u miša (T/t sustav) (8, 77), štakora (grc) (44, 67), a predpostavlja se da postoje i u drugih sisavaca npr. konja, svinje i čovjeka (6, 136, 5). Najopsežnija istraživanja objavljena su o t sustavu, u kojem su dominantni i recesivni geni vezani za H-2 sustav i uzrokuju nepravilnu segregaciju t haplotipova te supresiju rekombinacije između divljeg tipa i t haplotipa. Također uzrokuju sterilnost mužjaka, embrionalnu i fetalnu smrt, te skeletne defekte (8, 9, 77, 155, 79, 41). Ovi su geni otkriveni zbog njihove interakcije s Brachyury



(T) mutantama rezultirajući bezrepm T/t životinjama. Drastično smanjenje frekvencije rekombinacije kromosoma 17 laboratorijskih miševa javlja se zbog t haplotipa koji često u homozigotetu nosi letalne mutacije (8, 77), a u heterozigotetu uzrokuje sterilnost. Do sada je otkriveno 16 različitih grupa t haplotipa (80) koje su gotovo uvijek udružene sa specifičnim H-2 haplotipom (57, 125, 51). Supresija rekombinacije primarno je uzrokovana razlikom u strukturi divljeg tipa kromosoma i t kromatina (4,3). Čitav H-2 sustav je uključen u jednostavnu inverziju (153), a ustanovljena je i sekundarna inverzija proksimalne polovice t-sustava (62).

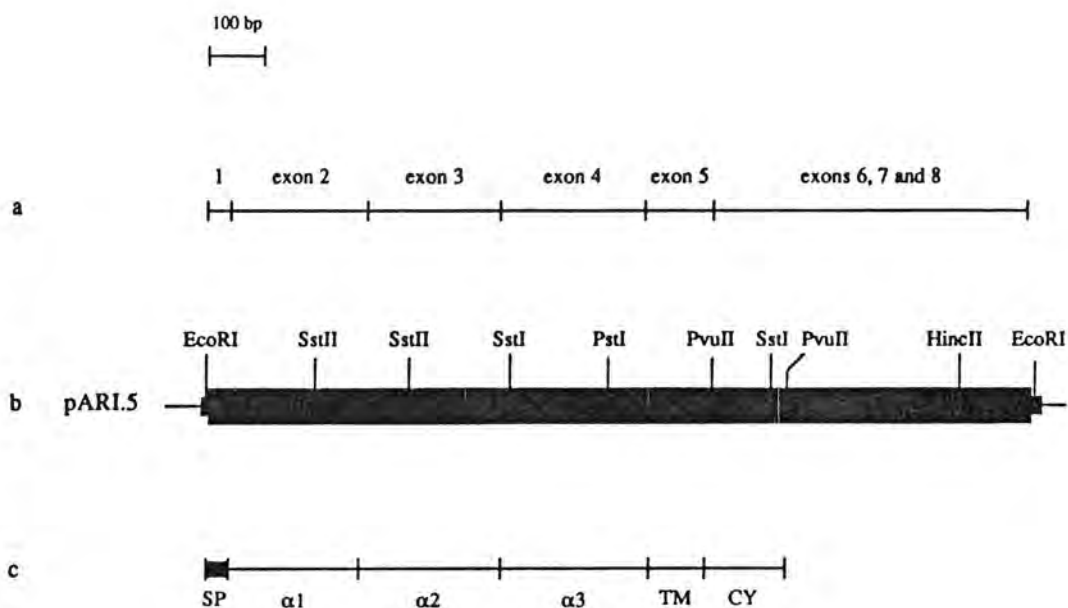
Geni vezani uz GSH koji utječu na rast i razvoj, do otkrića grc (44) smatrani su za karakteristiku mišjeg genoma. Grc ima karakteristike t-semiletalnog haplotipa miša i otkriven je u ispitivanju B-kolonije štakora (89) u kojoj su segregirani RT1<sup>l</sup> i RT1<sup>n</sup> haplotipovi. Mužjaci i ženke homozigoti za RT1<sup>l</sup> haplotip imaju proporcionalno malo tijelo i defekt fertiliteti. Nastavilo se križanje defektnih heterozigota s balansiranim letalnim haplotipom. grc/grc<sup>+</sup> haplotip je označen kao BIL/1 soj. Ovo je do sada jedini soj štakora u koga je pronađen grc. Kao i za t-haplotip, proteinski produkt kodiran ovom regijom GSH nije pronađen. Grc u homozigotetu uzrokuje sterilnost mužjaka radi jednakomjernog zastoja spermatogeneze u ranom pahitenu prve mejotičke diobe. Životinje imaju proporcionalno malo tijelo i testise (desetina normalne težine). Reducirana je fertilitet ženki, povećan embrionalni mortalitet, ali nije pronađen poremećaj segregacije (47). Razlika između grc i t gena opisana je i u gametogenezi: grc "utječe" na razvoj spermalne i jajne stanice (91). Ne postoje podaci da t-haplotip utječe na fertilitet ženki. Mehanizam djelovanja grc gena do sada nije rastumačen. G-pruganjem nije otkrivena veća kromosomska anomalija (31). Ne postoje promjene u nivou pituitarnih hormona (FSH, LH, GH). Regularan je metabolizam testosterona i somatomedina C (44, 54). Istraživanja štakorskih rekombinantnih sojeva R10 i R16, nosilaca grc, pokazala su značajno veću sklonost ovih životinja razvoju neoplazija (27). Zanimljiva je povezanost embriogeneze i karcinogeneze kao i utjecaj grc gena na rast i razvoj (48). Najnoviji rezultati molekularne analize (27) pokazuju da grc životinje imaju deleciju u RT1.E-grc regiji najmanje 18,5 kb (kilo baza) (Cortese Hassett A.-neobjavljeni podaci), a ne samo 3,1 kb. Stvarna veličina delecije i veza između manjka genetskog materijala i fenotipskih karakteristika koje pokazuju grc životinje, do sada nije utvrđena. GSH-vezani geni koji utječu na rast i razvoj miša (t), štakora (grc) i drugih vrsta (6, 136, 5), a možda i čovjeka (47), ukazuju da ovakva organizacija gena može biti opći fenomen u sisavaca.

Molekularna analiza RT1 gena uvelike je olakšana sistematskim i detaljnim istraživanjima pomoću metoda klasične genetike. Osim toga, ovaj sustav gena je

relativno konzerviran dio genoma sisavaca. Mišje i humane probe za klasu I gena pokazale su se vrlo korisnim jer kroshibridiziraju velik broj DNK fragmenata RT1 različitih sojeva pokazujući visok nivo polimorfizma dužine restrikcijskih fragmenata (engl. RFLP-restriction fragment length polymorphism ) (132, 56, 26). Molekularna analiza pokazuje da je RT1 sustav multigenska familija s jakim polimorfizmom, što se suprostavlja malom polimorfizmu serološki detektiranih antigena klase I (28, 46). Moguće je objašnjenje u ograničenom broju gena klase I koji se prepisuju, te ih većina nije aktivna i nije ispoljena u vidu proteinskog produkta. U miša (164) i u čovjeka (129) je dokazano Southern blot analizom i molekularnim kloniranjem da je po haplotipu broj gena klase I daleko veći od serološki detektiranih antigena. Postavlja se pitanje, da li su ti geni pseudogeni klase I (162, 69) ili geni koji su aktivni u različitim stadijima razvoja?

## **1.2 STRUKTURA GENA I KARAKTERISTIKE gRNK KLASI I ANTIGENA STANIČNE MEMBRANE**

Veličina tipičnog humanog i mišjeg gena klase I je 5-6 kb. Sastoji se od 8 eksona odjeljenih intronskim sekvencijama (101, 162). Prvi ekson kodira dvadesetak nukleotida 5'-neprevođene regije gRNK (5'NR = engl. 5'UN - 5'untranslated region) i signalni ili vodeći protein koji se sastoji od dvadesetak amino kiselina (94, 157). Signalni protein je hidrofoban i nakon prolaska kroz staničnu membranu odcijepi se od ostalog dijela molekule. Drugi i treći ekson jednaki su po veličini (270 pb) i kodiraju prve dvije ekstracelularne domene teškog lanca antigena. Treća domena je kodirana sekvencijama četvrtog eksona i predstavlja najjače konzerviranu regiju molekule. Također je opisana strukturna sličnost ove domene s  $\beta_2$  mikroglobulinom ( $\beta_2$ mg) i konstantnom regijom imunoglobulinskog gena (163). Peti ekson gena klase I kodira hidrofobnu transmembransku domenu kojom je antigen klase I pričvršćen za staničnu membranu. Solubilne molekule klase I nemaju ovaj dio proteina i smatra se da je ovakav "nedostatak" rezultat alternativnog dozrijevanja ili splajsinga (engl. splicing) gRNK (23, 87). Ista modifikacija je opisana za posljednja tri eksona gena klase I (109) koji kodiraju citoplazmatsku domenu i 3' regiju koja se ne prevodi u protein (3'NR; engl. 3'UN-3'untranslated region). Prepis klase I također može biti modificiran na svom 5'kraju (94), što je vjerojatno dodatni mehanizam u produkciji polimorfizma antigena klase I na nivou proteina. Zrela gRNK klase I i odgovarajuća kDNK (komplementarna DNK) obično je duga 1,6 kb i sastoji se od sekvencija svih osam eksona (Slika 2). Start kodon (AUG) lociran je poslije dvadesetak nukleotida 5'NR u prvom eksonu.



*Slika 2. Shematski prikaz eksona gena klase I, pARI.5 klon iz kDNK knjižnice gena i proteina klase I*

pARI.5 (b) kDNK insert (140) predstavlja nukleotidne sekvencije svih osam eksona (a) gena klase I. Dužina kDNK identična je dužini kodirajuće regije gena. Na slici je prikazan protein klase I (c) s ekstracelularnim domenama ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ), transmembranskim (TM) i citoplazmatskim (CY) dijelom. Signalni protein (SP) odvoji se od molekule nakon što antigen prođe kroz staničnu membranu.



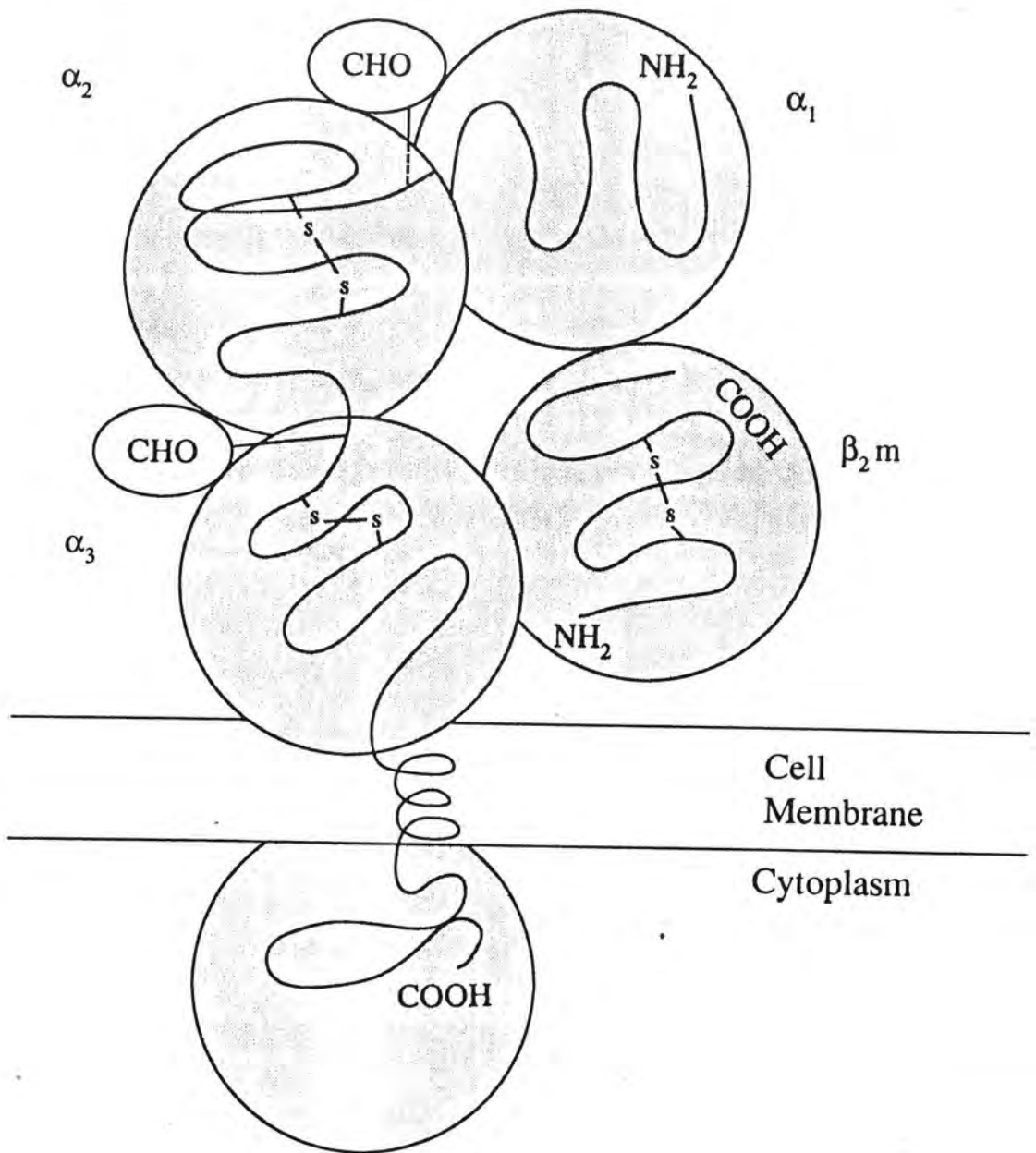
Osmi ekson je najduži (400 pb) i nekada na svom početku sadrži stop kodon (UGA), premda terminacijski kodon može biti uključen u kraj sedmog eksona. Poliadenilacijski signal 5'-AAUAAA-3' (36) obično je lociran 400 pb iza stop kodona u mišjoj gRNK klase I (122, 169).

### 1.3 KARAKTERISTIKE PROTEINA KLASI I

Antigeni GSH klase I su glikoproteini ispoljeni na membranama gotovo svih somatskih stanica. Teški,  $\alpha$  lanac antigena ima relativnu masu 42-46000 i kodiran je mnogobrojnim genima GSH (1.1). Svaka od tri ekstracelularne domene sastoji se od 90-tak amino kiselina. Laki lanac antigena mase 12000 je  $\beta_2$  mikroglobulin ( $\beta_2$ mg) kodiran genom na različitom kromosomu od GSH. Na Slici 3 shematski je prikazana građa antigena. Antigeni klase I su meta antitijela i citotoksičnih T limfocita (CTL) za vrijeme odbacivanja transplantata. Osim toga, T limfociti prepoznaju virusne antigene zajedno uz molekule klase I.  $\alpha_3$  domena teškog lanca nalazi se uz staničnu membranu i formira stabilnu nekovalentnu vezu s  $\beta_2$ mg. Laki lanac vrlo je važan u ekspresiji antigena klase I na staničnoj membrani (176).  $\beta_2$ mg posjeduje vrsta-specifične karakteristike iako je konzervirana molekula i vrlo sličan među različitim vrstama. Ekspresija humanog antigena klase I u mišjim mastocitima nekoliko je puta povećana, ako su stanice kotransfektane s humanim  $\beta_2$ mg (135). Ovaj efekt se pripisuje daleko boljom vezom između HLA teškog lanca i humanog, nego mišjeg  $\beta_2$ mg. Homologni  $\beta_2$ mg najvjerojatnije omogućava brži transport HLA molekule preko endoplazmatskog retikuluma do Golgijevog aparata. Osim toga, antigeni klase I nisu ispoljeni na Daudi stanicama jer ove ne produciraju  $\beta_2$ mg (150).

Nukleotidne i amino acidne sekvencije antigena klase I GSH pokazuju veliku sličnost među različitim vrstama (82). Iako se razlike mogu naći cijelom dužinom teškog lanca, većina različitih sekvencija locirana je N-terminalno. Tri vanjske domene mogu se podijeliti u varijabilne i konzervirane regije. Većina varijabilnih pozicija se nalazi u  $\alpha_1$  i  $\alpha_2$  domeni. Kraj prve domene (amino acidne pozicije 60-80) je najvarijabilnija regija molekule klase I koja ujedno predstavlja alel-specifične sekvencije (82). Konzervirane regije sekvencijskom homologijom vjerojatno čuvaju konzerviranost tercijarne strukture antigena.

Cistein konzerviran u humanim (84) i mišjim (122) antigenima na pozicijama 101, 164 u  $\alpha_2$  domeni, 203 i 259 u  $\alpha_3$  domeni, stabilizira strukturu unutar domene formirajući disulfidne veze. Također se pretpostavlja da disulfidni most u trećoj



*Slika 3. Shematski prikaz strukture antigene klase I na staničnoj membrani.*

Antigen klase I na staničnoj membrani je glikoprotein građen od  $\alpha$  lanca i  $\beta_2$  mikroglobulina ( $\beta_2m$ ). Teški lanac je podijeljen u tri vanstanične domene ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  i  $\alpha_3$ ), koje nose molekule šećera (CHO), kratkog dijela koji prolazi kroz staničnu membranu, te citoplazmatskog dijela na -COOH kraju lanca.

ekstracelularnoj domeni predstavlja strukturu neophodnu za intracelularni transport posredstvom receptora. Raskidanje ovih veza sprečava transport molekule do stanične membrane (120).

Antigeni klase I su N-vezani glikani i sadrže jednu, dvije ili tri šećerne molekule (119). Specifična glikozilacijska sekvencija na koju je vezan šećer je Asparagin-X-Trionin ili Serin (N-X-T/S). Ovaj triplet amino kiselina također je konzerviran na nekoliko pozicija u antigenima klase I: N86 u prvoj domeni humanog i mišjeg antigena (84, 157, 94, 144, 102); N176 u  $\alpha_2$  (94, 102, 144) i na poziciji N256 u  $\alpha_3$  domeni mišjeg antigena (94, 102, 144, 29). Uloga glikozilacije antigena klase I u ekspresiji na staničnoj membrani nije potpuno razjašnjena, premda se pretpostavlja da ne utječe na antigenost (133, 119). Eksperimenti pokazuju da tunikamicin koji zaustavlja glikozilaciju, iako znatno smanjuje (121) ne sprečava i ekspresiju na staničnoj membrani (97), što ukazuje da ugljikohidrati također mogu imati ulogu u intracelularnom transportu antigena. Smatra se da antigen bez glikozilacije u  $\alpha_1$  i  $\alpha_2$  domeni, teško može biti transportiran do stanične membrane (40).

Nedavne radiološko-kristalografske studije pokazuju da humani antigen klase I (HLA-A2) ima dvostruku rotacijsku simetriju (12, 13).  $\alpha_1$  i  $\alpha_2$  domene simetrično su postavljene u prostoru dok je  $\alpha_3$  domena simetrična s  $\beta_2$  mg.  $\alpha_1$  i  $\alpha_2$  domene formiraju dva antiparalelna alfa heliksa koji leže na osam beta lanaca, te tako formiraju dug žljeb. Gotovo sve polimorfne pozicije nalaze se na rubovima ove brazde. Autori smatraju da je žljeb mjesto veze s antigenom (12), te mutacija određenih amino kiselinskih pozicija utječe na vezivanje stranog antigena, dok neke amino kiseline imaju utjecaj na vezivanje s T staničnim receptorom (13). Neke molekule HLA-A2 s točkastim mutacijama vežu sintetski virusni antigen, ali ih autologni citotoksični T limfociti (CTL) ne prepoznaju (114). Amino kiseline na pozicijama 43 i 107 koje se nalaze izvan antigenog žljeba, nemaju utjecaja na funkciju CTL (114). Nekoliko radova ukazuje da na površini T limfocita, pored T staničnog receptora mnoge druge molekule olakšavaju spajanje s antigenom klase I virusom zaražene stanice. Točkasta mutacija u trećoj ekstracelularnoj domeni također može smanjiti reaktivnost s CTL (138).  $\alpha_3$  domena je uključena u Lyt-2 (25) i CD8 prepoznavanje (126).

Molekule klase I jaki su transplantacijski antigeni. Nije posve jasno da li su isti polimorfni segmenti važni kao aloantigena mjesta za antitijela i CTL. Uočeno je da antitijela protiv epitopa u  $\alpha_1/\alpha_2$  i  $\alpha_3$  domeni rezultiraju prodeženim preživljavanjem kožnog alografta, dok odvojena blokada  $\alpha_1/\alpha_2$  i  $\alpha_3$  epitopa neznatno produžuje preživljavanje kožnog transplantata (25). Amino kiselinske pozicije 63 i 73 u  $\alpha_1$  i 152,

155, 156 u  $\alpha_2$  domeni su imunodominantne u citotoksičnom prepoznavanju T limfocita (104). Također je sugerirano da aloreaktivni CTL prepoznavaju molekule klase I zajedno s antigenom koji se nalazi u brazdi (13) te molekula klase I i antigen zajedno predstavljaju strani antigen za CTL.

## 1.4 EKSPRESIJA ANTIGENA KLASI I

Antigeni klase I ispoljeni su na membranama gotovo svih somatskih stanica, osim stanica centralnog nervnog sistema (59). Prepisivanje H-2 gena počinje vrlo rano u stadiju somita mišje embriogeneze (131). U fetalnom razvoju antigeni su slabo ispoljeni, zatim se u prva dva postnatalna tjedna ekspresija naglo pojačava (73). Ispoljavanje antigena može biti inducirano limfokinima, interferonima (INF) (34) i tumor nekroza faktorom (TNF) (24). Osobe s teškom formom sindroma "golih limfocita" čije krvne stanice ne ispoljavaju antigene klase I, imaju kombiniranu imunodeficijenciju i umiru mladi usljed učestalih infekcija (149, 171). Tako saznanja o kontroli ekspresije antigena klase I svakako imaju veliku biološku i medicinsku važnost.

### 1.4.1 *Regulacija ekspresije antigena klase I na nivou gena*

Geni klase I podložni su univerzalnoj regulaciji ekspresije eukariotskih gena, npr. metilaciji (1) koja ima ulogu u inaktivaciji gena. Modifikacije ekspresije također se dešavaju u citoplazmi usljed glikozilacije molekule (121) ili vezivanja s  $\beta_2$ mg (135, 176, 150). Najvažniju ulogu u ekspresiji vjerojatno imaju regulacijske sekvencije u cis položaju (75, 7) opisane kao CRE (engl. class I regulatory element - klasa I regulacijski element). CRE se nalazi na poziciji -161 do -203 od 5'kraja gena (75) i sastoji se od regija I, II i III koje različito vezuju nuklearne proteine u staničnim kulturama (7). CRE je također odgovoran za regulaciju ekspresije u različitim stadijima razvoja (19). Ako se usporede geni klase I s drugim genskim sistemima, CRE najvjerojatnije regulira ekspresiju u suradnji s elementima u trans položaju (60, 140). U nekim staničnim kulturama ekspresija ovisi o trans regulaciji (152, 19). Lokus odgovoran za trans regulaciju humanih gena klase I se nalazi između grupe gena koji kodiraju komponente komplementa i gena klase II GSH.

### 1.4.2 *Ekspresija antigena GSH u placenti*

Fetus se može smatrati prirodnom transplantatom i odavno se postavlja pitanje



kojim mehanizmima placenta izbjegava imunodestruktivni odgovor majčinog organizma. Jedna od prvih razlika između transplantiranih organa i placente je u ekspresiji antigena GSH. Antigeni klase II nisu ispoljeni u mišjoj (141, 22), humanoj (168,18) i štakorskoj placenti (72). Klasa I antigena placente paternalnog je porijekla (72, 10) i u placenti štakora ograničena je u ekspresiji na stanice bazalnog trofoblasta (100). Paternalni antigen Pa (engl. pregnancy associated) koji ne posjeduje specifične antigene determinante, ispoljen je na staničnoj membrani, dok klasični transplantacijski antigen klase I s paternalnim alospecifičnim determinantama ostaje unutar citoplazme (72), te tako nije prezentiran majčinim imunokompetentnim stanicama. Pa antigen ne izaziva citotoksični imunološki odgovor, ali može izazvati produkciju necitotoksičnih aloantitijela (42, 43). Opisan je u a, d, f, b i m haplotipovima štakora i ima karakteristike proteina klase I: teški lanac izoliran iz limfocita ima relativnu masu 46000 i nekovalentno je vezan s  $\beta_2$ mg. Sličan antigen sa zajedničkim determinantama opisan je u humanoj placenti (112, 113, 66). Nedavno je utvrđeno da se u humanom trofoblastu ispoljava antigen relativne mase 40000 udružen s  $\beta_2$ mg (33) koji je možda ekvivalentan mišjim Qa/TI antigenima. Humani gen klase I, HLA-B27 nije ispoljen u trofoblastu transgenetskog miša što sugerira da je kontrola ekspresije GSH antigena klase I u ekstraembrionalnom tkivu konzervirana u vidu selektivne supresije koja je čak očuvana između različitih vrsta (130, 32).

## 1.5 CILJ ISTRAŽIVANJA

Mogući mehanizmi preživljavanja fetalnog alografta u imunološki kompetentnoj majci, proučavani su s aspekta antigeno nezrelog konceptusa, placentе kao imunološke barijere između majke i fetusa, te kvantitativno i kvalitativno promijenjenog imunološkog sustava trudnice. Niti jedna od hipoteza nije u potpunosti isključena niti daje sve odgovore na fenomene koji se dešavaju u trudnoći. U jednoj od mogućih teorija razlozi očuvanja fetalnog alografta mogu se naći u genskoj regulaciji ekspresije antigena GSH na membrani stanica trofoblasta.

Ovim se istraživanjem želi utvrditi struktura genskog prepisa za klasu I antigena stanične membrane u (WFxDA)F1 placenti štakora. Iz komplementarne knjižnice gena potrebno je izdvojiti i sekvencionirati klon koji sadrži kompletne sekvencije kodirajuće regije gena klase I GSH. Time bi se ujedno po prvi put opisale sekvencije štakorskog gena klase I, te je potrebno utvrditi koliko sličnosti štakorski antigen pokazuje s antigenima drugih sisavaca.

U cilju istraživanja kontrole ekspresije gena, važno je utvrditi parentalno porijeklo ispoljenog gena. Za to je potrebno, uz pomoć poliklonskih i monoklonskih antitijela i ekspresijom *in vitro* u stanicama sisavaca, utvrditi alelnu specifičnost klona dobivenog iz komplementarne knjižnice gena placentе.

Također je važno ustanoviti da li gen, ispoljen u (WFxDA)F1 placenti štakora, ima lokus ili alel specifične karakteristike ili je pak konzerviran u genomu drugih sojeva. Podrobnija saznanja o antigenima klase I, osobito na nivou DNK i ekspresije gena GSH placentе, svakako je veliki doprinos u razjašnjavanju transplantacijskih reakcija odbacivanja, te fenomena u imunologiji reprodukcije.

## 2.0 MATERIJAL

### 2.1. ŽIVOTINJE

Čisti, rekombinantni i srodni štakorski sojevi upotrebljeni u ovom istraživanju potječu iz kolonije Sveučilista u Pittsburghu, Medicinskog fakulteta, Zavoda za patologiju, Pittsburgh, Pennsylvania, USA. RT1 haplotipovi ovih životinja prezentirani su na Tablici 1.

Čisti sojevi su: BIL/1, YO 38366 (Yoshida), ACP 9935, LEW (Lewis), DA, WF, BUF (Buffalo), BDV, BN, BI, MR, WKA. Rekombinantni soj: R16; te srodni soj: DA.1D.

### 2.2 kDNK KNJIŽNICA GENA

Komplementarna knjižnica gena konstruirana je od gRNK (WFxDA)F1 posteljica starih osamnaest dana(167). Na uzorku gRNK uz pomoć reverzne transkriptaze, sintetiziran je prvi lanac DNK. Razgrađen lanac gRNK i sintetiziran drugi lanac DNK uz pomoć Klenow enzima. Ovim se postupkom dobije komplementarna DNK (kDNK; engl. cDNA) koja po redosljedu nukleotida u potpunosti odgovara zreloj glasničkoj RNK.  $\lambda$ gt11 DNK korištena je kao vektor u konstrukciji kDNK knjižnice gena. Hibridizacijom s mišjom pAG64C probom izdvojena su 22 klona klase I različite dužine.

### 2.3 KEMIKALIJE I ENZIMI

Najčešće korištene kemikalije poručivane su od Fisher Scientific Company, Pittsburgh, PA. Posebne kemikalije i nabavljane su od sljedećih proizvođača: saharoza (Sucrose-Ultra Pure) i akrilamid -Schwarz/Mann, Cambridge, MA; Triton X-100 - International Biotechnologies Incorporated, New Haven, CN; TRIS Enzyme Grade i CsCl - US Biochemicals, Cleveland, OH; N'N'-metilen bisakrilamid (BIS) i N,N,N'-Tetrametil etilen diamin (TEMED) - Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis, IN; agaroz (Agarose LE Pure Electrophoresis Grade) Marine Colloids, Rocklin, ME; dekstran sulfat - Pharmacia, Uppsala, Švedska; BSA (engl. bovine serum albumin) - Sigma, St Louis, MO; SDS (engl. sodium duodecil sulfat) - BDH Chemicals, Pool, Engleska. Također je korištena RNK E.Coli soja B (Calbiochem, La Jolla, CA), DNK sperme lososa u natrijevoj soli (Sigma), ksilen cianol (Eastman Kodak Co., Rochester, NY).

*RT 1 aluli*

soj	haplotip	A	Pa	F	B/D	E	G	C
DA	av1	a	a	a	a	-	-	a
ACP	av1	a	a	u	u	-	-	a
R16	r16	a			a	-		
BUF	b	b	a	-	b	-	-	
BIL/1	lv5	l	-	a	l	-	-	
LEW	1	l	-	a	l	-	a	l
WF	u	u	-	-	u	u	-	u
YO	u	u	-	-	u	u	-	u
BDV (DA.1D)		d	d	a	a	d	-	
BN	n	n	-	-	n	-	-	
BI	i	n	-	a	a	u	-	
MR	o	d	a	a	a	-	b	
WKA	k	k	-	-	k	-	-	

(-) testiran bez reaktivnosti

( ) lokus nije ispitivan

Tablica 1. RT1 specifičnosti različitih štakorskih sojeva

Na tablici su prikazane alelne specifičnosti (49) štakorskih sojeva korištenih u produkciji antitijela i pripremi DNK za Southern blot analizu. WF i DA sojevi korišteni su u konstrukciji kDNK placentarne knjižnice gena.



Lizozim (engl. lysozyme), korišten u pročišćavanju molekula DNK velike molekularne težine i plazmidne DNK potječe iz Sigmee. Također su korištene sljedeće endonukleaze: BamHI, Aval, BglII, BstXI, ClaI, EcoRI, HindIII, HincII, HpaI, KpnI, NotI, PstI, PvuI, PvuII, SstI, SstII, Sall, SmaI, XbaI (Bethesda Research Laboratories-BRL, Gaithersburg, MD i Stratagene, San Diego, CA). Mung Bean Nuclease (eksonukleaza mung graška), Exo III i Klenow enzimi korišteni su u kloniranju i pripremi klonova za sekvencioniranje (Stratagene, San Diego, CA). Proteinaza K i Ribonukleaza A goveđeg pankreasa poručivane su iz Sigmee (St. Louis, MO); CIP (engl. calf intestinal phosphatase) i T4 DNK ligaza, te DNK polimeraza I su također korištene u kloniranju (BRL, Gaithersburg, MD). U radu su upotrebljavani kitovi za radioaktivno označavanje probe i sekvencioniranje (Pharmacia, Piscataway, NJ; USB, Cleveland, OH).

$\lambda$ HindIII i  $\Phi$ -X174 HaeIII (BRL) su korišteni kao standardi za određivanje veličine fragmenta DNK, a pročišćena DNK  $\lambda$  faga (BRL) upotrebljavana je za određivanje koncentracije izoliranih fragmenata, kontrolu kvaliteta enzima i određivanje uvjeta cjepanja DNK restrikcijskim enzimima.

## **2.4 KROMATOGRAFSKI MATERIJAL I NITROCELULOZNE MEMBRANE**

Za pročišćavanje DNK i separaciju nesparenih radioaktivnih nukleotida korištena su zrna smole Sephadex G-50 i G-100 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Švedska). U Southern blot tehnici (158) koriste se nitrocelulozne membrane ili filteri Bio Rad Laboratories (Rockville Center, NY).

## **2.5 MEDIJI I OTOPINE**

Za pripremu tekućih medija (LB-Luria Bertani i SOB) i čvrstih hranilišta za uzgoj *E. Coli* bakterija domaćina korišteni su tripton (engl. Tryptone Base) i ekstrakt kvasca (engl. Yeast Extract) Gibco, Grand Island, NY, te agar (Sigma) koji je dodavan u čvrsta hranilišta. Upotrebljavani su antibiotici: ampicilin, tetraciklin, kloramfenikol i G418 Geneticin (IBI, New Haven, CN i Sigma, St Louis, MO) u selekciji stanica domaćina koje su korištene u produkciji i ekspresiji kDNK.

## 2.6 RADIOIZOTOPI

Radioaktivni oligonukleotidi ( $P^{32}$ )dCTP (E.I du Pont de Nemours and Co, Boston, MA) su korišteni za nasumce obilježavanje probe (engl. oligolabeling by the random primer), a u sekvencioniranju kDNK korišteni su ( $P^{32}$ )dATP i ( $S^{35}$ )dATP. Oba tipa radionukleotida su  $\beta$  transmiteri s poluživotom 14 i 87 dana.

## 2.7 PROKARIOTSKE I EUKARIOTSKE STANICE DOMAĆINI

Za umnožavanje inserta klase I u plazmidu korišteni su sojevi E.Coli HB101, JM109 i DH $\alpha$ . Ovi sojevi bakterija imaju genotip recA(+) što svodi mogućnost mutacija na minimum te predstavlja opću rekombinaciju koja bakteriji omogućava popravak DNK oštećene radioaktivnim zračenjem ili indukcijom  $\lambda$  faga. Također je smanjena mogućnost rekombinacije između endogene i egzogene DNK unesene u bakterijsku stanicu u obliku vektora: plazmida, kozmida ili faga. Ovi bakterijski sojevi su također lacZ(+), posjeduju gen za  $\beta$ -D galaktozidazu, što im omogućava utilizaciju laktoze. Lac Z mutacija uzrokuje plavu boju bakterijskih kolonija divljeg tipa uz prisustvo X-gal (5-bromo-4-kloro-3-indol- $\beta$ -D-galaktopiranozid) u hranilištu, dok su bakterijske kolonije koje sadrže vektor s insertom bijele boje. DH $\alpha$  bakterijski soj također je dmc(-), te bakterije ne mogu metilirati DNK. Ovo je često vrlo važno u radu s restrikcijским enzimima koji su osjetljivi na metilaciju, te ne mogu razgraditi DNK na mjestima gdje je citozin metiliran.

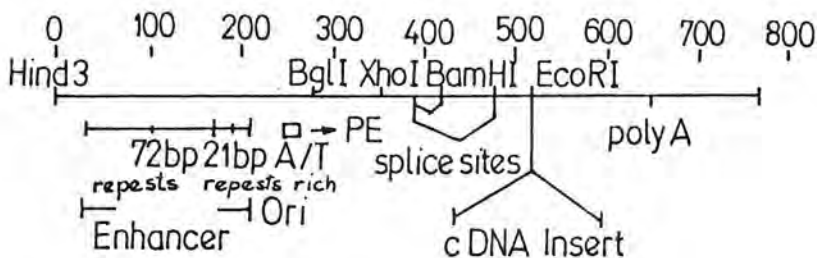
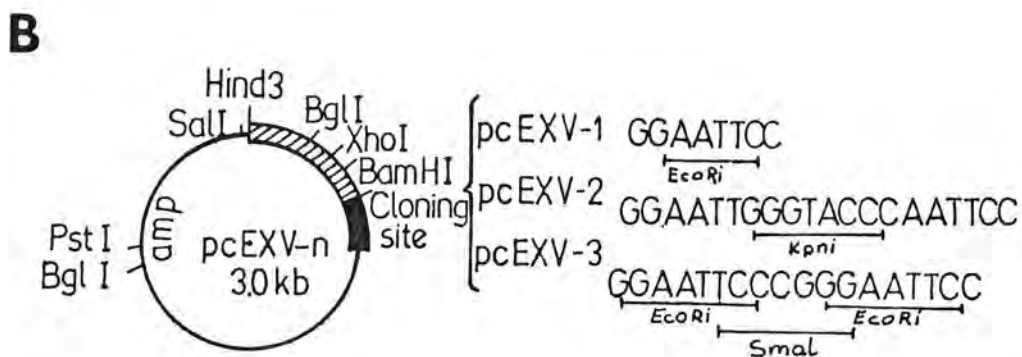
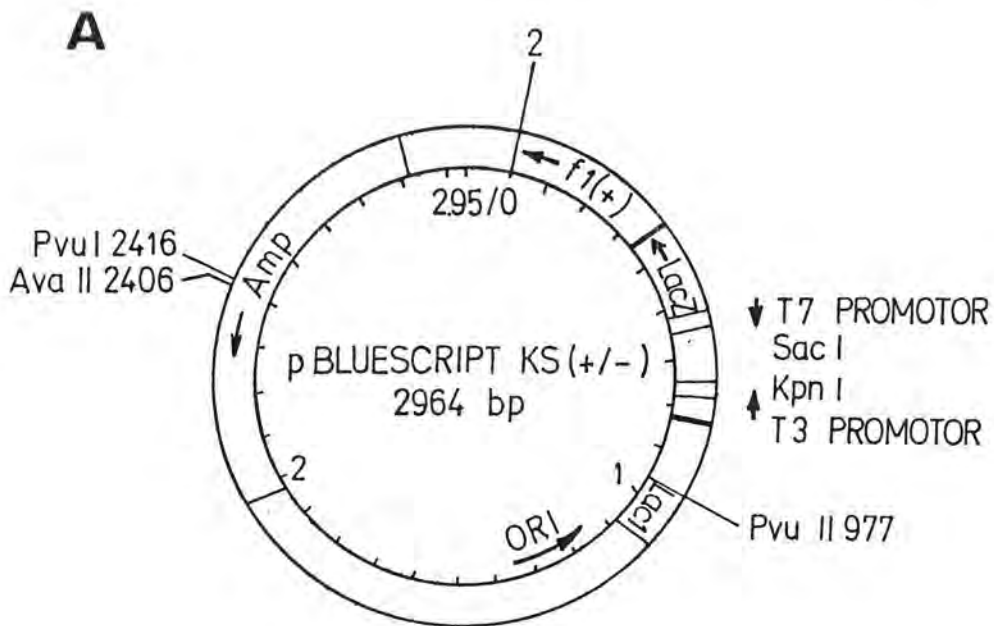
Za studije ekspresije gena, insert klase I je rekloniran u ekspresijski vektor koji omogućava transfekciju eukariotskih stanica tipa COS7 (fibroblasti bubrega zelenog majmuna ATCC, Rockville, MD ) (50). COS7 stanice već su transformirane s SV40 virusom, te produciraju proteine potrebne za prepisivanje i umnožavanje DNK SV40 virusa. Tako je olakšana naknadna transfekcija i ekspresija gena vektorom koji nosi regulacijske elemente SV40 virusa.

## 2.8 HIBRIDIZACIJSKE PROBE I VEKTORI

Za izolaciju gena klase I korišten je klon pH-2III (163), kDNK dobivena iz H-2<sup>d</sup> knjižnice gena. pH-2III je kloniran u pBR322 plazmidu, a kao proba je korišten PstI fragment veličine 310 parova baza. Prvobitno su inserti klase I kDNK knjižnice gena reklonirani iz  $\lambda$ gt11 faga u Bluescript SK M13+ (Stratagene, San Diego, CA), vektor koji nosi gen za rezistenciju na ampicilin i koji je pogodan za sekvencioniranje. Nakon sekvencioniranja, za studije ekspresije insert je kloniran u ekspresijski vektor pcEXV<sub>3</sub> (117,128) deriviran od pBR322 plazmida i SV40 virusa. Vektor je konstruiran za korištenje u ekspresiji u stanicama sisavaca. Detaljna mapa vektora prikazana je na Slici 4. Za eksperimente kotransfekcije korišten je pSV2neo vektor (ATCC, Rockville, MD) (159) koji u svom genomu nosi gen za rezistenciju na derivat neomicina Geneticin G418 (Sigma, ST Louis, MO). Geneticin je aminoglikozid često korišten za selekciju u eksperimentima molekularne genetike (71,63). Toksičan je za bakterije, kvasce, više biljke, helminte, protozoe i stanice sisavaca. Gen za rezistenciju je dominantan.

## 2.9 POLIKLONSKA I MONOKLONSKA ANTITIJELA

U identifikaciji ekspresije gena korištena su štakorska monoklonska i poliklonska antitijela. (WFxDA) (a x u) kombinacija sojeva u kojoj je utvrđen najjači odgovor na paternalne antigene u trudnoći, bez ikakve predhodne senzibilizacije (42), korištena je u produkciji anti-Pa antitijela (monoklonsko antitijelo mAt381, serum DA ženki nakon šeste trudnoće s WF mužjakom). U kontroli je korišteno poliklonsko antitijelo pAt42 (anti-A<sup>n</sup>) dobiveno iz BN.(WF) x BN.(DA)-anti BI kombinacije sojeva. Anti-A<sup>a</sup>, mAt211 i pAt211 dobiveni su iz (MR x WKA)F1 anti-DA kombinaciji sojeva. Također su korišteni aloserumi WF anti-DA (u anti-a) i DA anti-WF (a anti-u). RT1 haplotipovi i lokus specifičnosti pokazane na Tablici 1. Kao sekundarno antitijelo u metodi indirektno imunoflorescencije upotrebljavan je kozji F(ab)<sub>2</sub>IgG obilježen floresceinom (FITC).



Slika 4. Mapa Bluescript i pcEXV<sub>3</sub> vektora

Opis Slike 4. Na slici je prikazana mapa Bluescript (A) i pcEXV3 (B) vektora. Bluescript je upotrebljen kao vektor u mapiranju i sekvencioniranju pARI.5 inserta, a pcEXV3 kao vektor u eksperimentima ekspresije za isti insert. Na slici se vide važnija restrikcijska mjesta, mjesta početka replikacije, restrikcijska mjesta na kojima se klonira insert u vektor, te položaj gena za rezistenciju na ampicilin.



## 3.0 M E T O D E

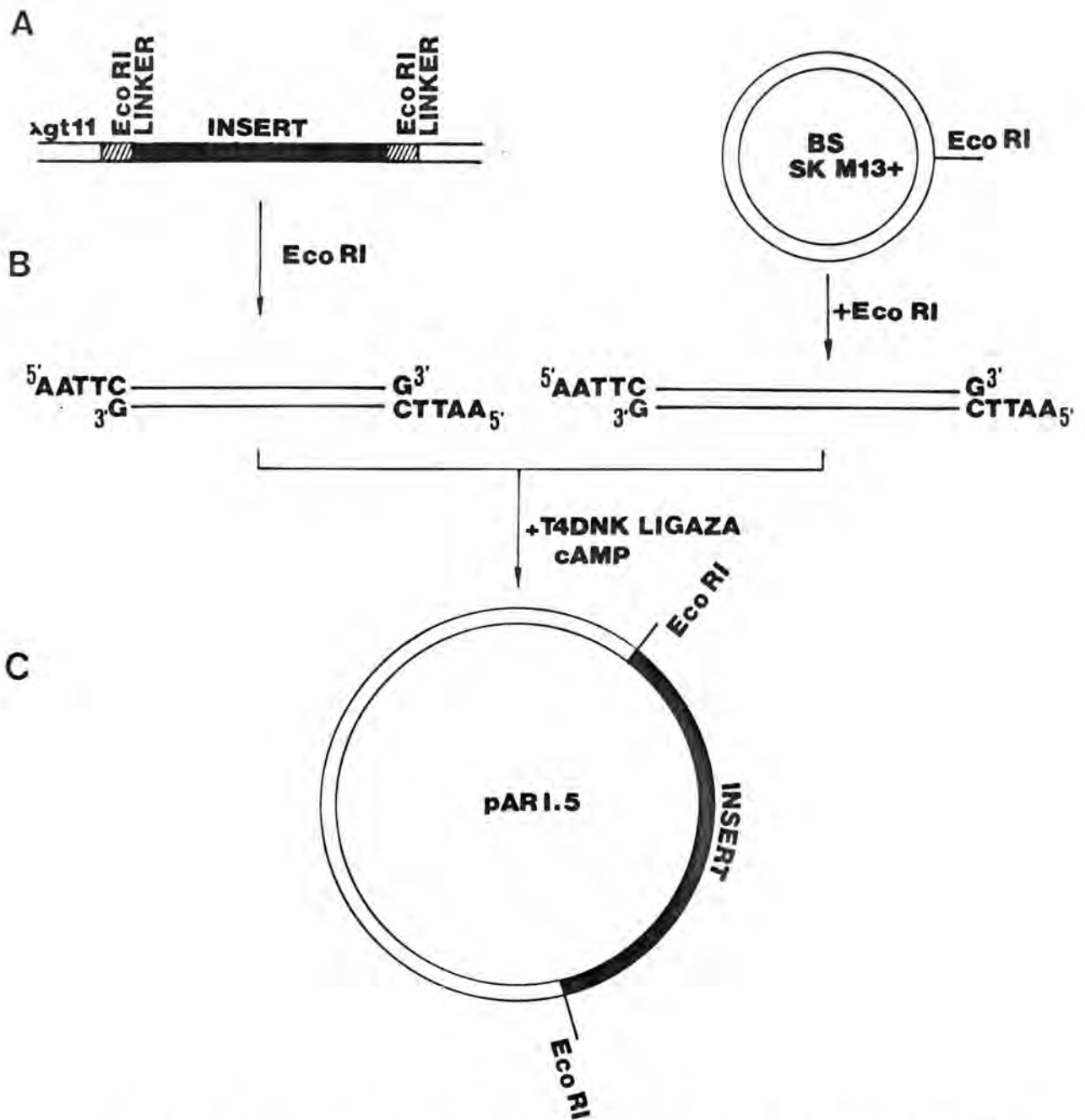
### 3.1 PRIPREMA PLAZMIDA

#### 3.1.1 Rekloniranje inserta

U konstrukciji kDNK knjižnice korišteni su EcoRI vezni nukleotidi - linkeri (engl. linkers), pa su klasa I pozitivni inserti dobiveni digestijom EcoRI endonukleazom i izolaciom na 0,4% agarozu gelu (103). Istovremeno je novi vektor Bluescript također pripremljen digestijom s EcoRI i defosforilacijom s CIP (engl. Calf Intestinal Phosphatase). Time je prsten plazmida permanentno otvoren - linearan, jer nedostatak fosforne grupe na 5'kraju ne dozvoljava ponovno sparivanje EcoRI ljepljivih krajeva plazmida. Zatim su DNK inserta i vektora pomiješane u odgovarajućem omjeru i uz pomoć T4 DNK ligaze spojeni u novu molekulu. Bakterijski soj JM109 transformiran je s novim vektorom (58,103) i uzgojen na hranilištu s ampicilinom i X-gal (2.7). Zatim su testirane kolonije bijele boje koje sadrže vektor s insertom, za razliku od plavih koje sadrže "prazan" vektor. Selekcija transformiranih bakterijskih kolonija dobije se ampicilinom. Na Slici 5. shematski je prikazan postupak rakloniranja inserta.

#### 3.1.2 Rast bakterija i umnožavanje plazmidne DNK

Plazmidna DNK izolirana je metodom alkalne lize (103) s malim modifikacijama. U 5 ml LB medija s 100  $\mu\text{g/ml}$  ampicilina, inokulirana je jedna bijela bakterijska kolonija i inkubirana preko noći na 37°C. Jedan mililitar (ml) kulture izdvojen je za kontrolnu analizu (11) kojom se brzom procedurom izdvoji plazmidna DNK te je rastrikcijskim enzimima i na 1% agarozu gelu provjerena veličina inserta. Iz iste kulture inokuliran je 1 ml u 250 ml medija s ampicilinom. Bakterijska kultura je zatim inkubirana na 37°C sljedećih 12-16 sati. Bluescript sadrži M13 replikacijske sekvencije pa ne iziskuje amplifikaciju nego se poput faga replicira unutar jedne bakterijske stanice u velikom broju kopija. U rast pcEXV<sub>3</sub> vektora korištena je metoda amplifikacije uz pomoć kloramfenikola. Nakon inkubacije u 250 ml LB medija s ampicilinom, bakterije su uz intezivno rotiranje inkubirane 3-4 sata na 37°C do 120-130 Klett OD jedinica (engl. optical density). Ovaj nivo jedinica odgovara  $1,25 \times 10^9$  bakterijskih stanica u ml kulture na 37°C. Tada je dodano 170  $\mu\text{g/ml}$  kloramfenikola (1,25 ml otopine kloramfenikola koncentracije 34 mg u mililitru etanola). Zatim su inkubirane još 12-16 sati.



Slika 5. Shematski prikaz postupka rekloniranja inserta klase I iz  $\lambda$ gt11 faga u Bluescript plazmid.

pARI.5 insert u knjižnici gena kloniran je u  $\lambda$ gt11 vektoru pomoću EcoRI linkera. Insert je izdvojen iz vektora digestijom EcoRI enzimom. Bluescript plazmid je također digestijom EcoRI enzimom otvoren i iz prstenaste forme dobivena je linearna molekula (B). pARI.5 insert i linearna forma Bluescripta su uz pomoć T4 DNK ligaze sljepljeni u novu molekulu (C).

Kloramfenikol zaustavlja replikaciju genomske DNK i time diobu bakterijske stanice, dok se plazmidna DNK i dalje umnožava što rezultira znatno većim brojem kopija plazmidne DNK u odnosu na bakterijsku DNK.

### 3.1.3 *Liza bakterija*

Nakon uzgoja, bakterijske stanice su centrifugirane na 4°C, 400 rpm (revolucija po minuti), 10 minuta u Sorvall RC-5B centrifugi (Du Pont Instruments, Boston, MA) u GSA rotoru. Bakterijski sediment je zatim rastopljen u 30 ml TE pufera (10 mM TRIS.Cl pH7,6 i 1 mM EDTA), ponovo centrifugiran na 6000 rpm 5 minuta (SS34 rotor, Sorvall) i ponovo otopljen u 2,5 ml 25% saharoze, 50 mM TRIS.HCl (pH8,0). Stanice su potom dražane na ledu, te je dodano 0,8 ml otopine lizozima ( 5 mg u ml 0,25 M TRIS.HCl pH8,0). Stanice su ponovo inkubirane na ledu 5 minuta i dodano je 1,5 ml 0,25 M EDTA (pH8,0). Potpuna liza dobije se dodavanjem kap po kap otopine Triton X-100 (50 mM TRIS.Cl pH8,0; 10% Triton X-100; 62,5 mM EDTA) i inkubacijom 10 minuta na ledu. Razgrađene komponente bakterijskih stanica izdvoje se centrifugiranjem 30 minuta, 19000 rpm u Sorvall SS34 rotoru. Supernatant izdvojen centrifugiranjem sadrži bakterijsku kromosomsku DNK i plazmidnu DNK.

### 3.1.4 *Izoliranje i pročišćavanje plazmidne DNK*

Po mililitru supernatanta dobivenog lizom bakterija (3.1.3) se doda 1 g CsCl i 0,4 ml etidium bromida koncentracije 15 mg/ml. Plazmidna DNK je izolirana iz dvije uzastopne vrtnje u Ti.50 rotoru ultracentrifuge (Beckman, Beckman Instruments Inc., Fullerton, CA). Svaka vrtnja je imala dvostruki program: 18 sati na 46000 okretaja i 2 sata na 40000 okretaja u minuti. Nakon centrifugiranja, na ultravioletnom svjetlu izdvojen je prsten plazmidne DNK. Ekstrakcijom s isoamil alkoholom odvoji se etidium bromid, a višak soli, dijalizom u TE puferu. Iz 250 ml bakterijske kulture dobiveno je 250-400 µg plazmidne DNK.



## 3.2 ANALIZA PLAZMIDNE DNK

Prije svake pripreme veće količine, plazmidna DNK cijepana je restrikcijским enzimima i provjeravana za veličine fragmenata na 1% agarozu gelu. Vektori koji su upotrebljavani u radu imaju poznate sekvencije i restrikcijска mjesta gdje će endonukleaze presjeći lanac DNK, pa su na temelju poznatih restrikcijских mjesta vektora određeni veličina fragmenata i restrikcijска mjesta inserta klase I.

### 3.2.1 Digestija DNK restrikcijским endonukleazama

Mikrogramu plazmidne DNK dodan je restrikcijски pufer, BSA (engl. bovine serum albumine) i  $\beta$ -merkaptoetanol (3.6.2) u određenoj koncentraciji. Upotrebljavane su dvije do tri jedinice enzima po mikrogramu DNK i solucija je inkubirana 2 sata na određenoj temperaturi. Nakon toga je dodan L-pufer (30% saharoza, 50 mM EDTA, 0,1% Na azid i 0,45% bromfenol plavilo) koji zaustavlja reakciju i pomaže ulaganju otopine DNK u pripremljena mjesta u gelu.

### 3.2.2 Elektroforeza DNK na agaroznom gelu

Restrikcijским enzimima pocijepana DNK potom je izložena migraciji horizontalnom elektroforezom visoke rezolucije (88) na 1% agarozu gelu pripremljenom u 0,04 M (1X) TRIS acetatu kao migracijskom i elektroforetskom puferu. Gel je izložen konstantnom naponu od 40 V 16-24 sata. Ovom se tehnikom mogu odvojiti fragmenti koji se razlikuju u veličini svega stotinjak nukleotida. Razdvojeni fragmenti DNK su bojani 30-60 minuta u 0,5 ug/ml otopine etidium bromida. Gelovi su slikani Polaroid kamerom na izvoru UV zraka. U slikanju pozitiva korišteni su tip 57 Polaroid filmovi. Također su pripremani negativni na Kodak Plus-X filmu kojim se dobije bolja rezolucija bojanih fragmenata DNK.

## 3.3 SEKVENCIONIRANJE DNK

Prvi klon izoliran iz komplementarne knjižnice gena (pARI.3) sekvencioniran je metodom Maxama i Gilberta (107,106) još nazvanom metoda kemijske degradacije lanca. Prvih 400 nukleotida pARI.5 klona sekvencionirano je Sangerovom metodom (147) ili tzv. enzimatskom metodom terminacije lanca DNK.

### 3.3.1 Metoda degradacije lanca DNK

Ovom metodom sekvencioniranja dobiju se četiri različita seta nukleotida iz denaturiranog, pročišćenog i radioaktivnim fosforom označenog fragmenta. Denaturacija se dobije specifičnim kemikalijama za pojedine baze koje nasumce cijepaju DNK na mjestu jednog ili dva nukleotida. Kemijska metoda je bazirana na djelovanju hidrazina i dimetilsulfata koji specifično modificiraju baze DNK molekula. Piperidin zatim katalizira lom lanca na modificiranom nukleotidu. Specifičnost se odražava u prvoj kemijskoj reakciji s hidrazinom, dimetilsulfatom ili mravljom kiselinom koji reagiraju tek s malim postotkom baza, dok druga reakcija mora biti kvantitativna (107,106). Nakon utvrđivanja restrikcijske mape pARI.3 inserta, DNK je pocijepana restrikcijskim endonukleazama na odgovarajuće fragmente koji su zatim defosforilirani sa CIP (engl. *calf intestinal phosphatase*) što omogućava bolje vezivanje radioaktivnog fosfora. Radioaktivno označeni fragmenti su zatim drugi put pocijepani restrikcijskim enzimom i izolirani na 5% akrilamid gelu. Tako su dobiveni fragmenti koji su označeni radioaktivnim  $^{32}\text{P}$  samo na jednom kraju. U slučaju kada nije bilo moguće naći restrikcijsko mjesto i pogodan enzim između označenih krajeva DNK lanca, išlo se na separaciju lanaca. DNK je denaturirana uz pomoć alkalija (pH 12), a zatim su lanci separirani na 5% akrilamid gelu. Željeni fragmenti su isječeni iz gela, pročišćeni od akrilamida, te izloženi prvoj kemijskoj reakciji u postupku sekvencioniranja.

Za svaki fragment DNK urađene su četiri odvojene reakcije: G, G+A,T+C i C. Kemijski mehanizmi su ukratko sljedeći: 1) G reakcija: dimetilsulfat (DMS) metilira dušik na poziciji 7 gvanidinskog prstena koji se tada otvara između C8 i N9; zatim piperidin odstranjuje modificirani gvanidin od šećera. 2) G+A reakcija: mravlja kiselina slabi A-G glikozidne veze ispupčujući dušikove atome purinskog prstena; purin se zatim odstrani piperidinom. 3) T+C reakcija: hidrazin otvara prsten timina ili citozina; fragmenti ovih baza mogu biti odvojeni piperidinom. 4) C reakcija: uz prisustvo NaCl samo citozin reagira s hidrazinom; modificirani citozin se zatim odstranjuje piperidinom.

Prije elektroforeze na 6 ili 8% urea-akrilamid gelu uzorci su denaturirani dvije minute na 90°C i odmah prebačeni na led. Ponekad je za očitavanje prvih dvadesetak nukleotida korišten i 25% urea-akrilamid gel.

### 3.3.2 Sekvencioniranje DNK metodom terminacije lanca

Ovu metodu sekvencioniranja prvi put je opisao Sanger sa suradnicima 1977. god. (147). Princip postupka je da se uz pomoć enzima Klenow, Sequenase, Taq polymerase ili reverzne transkriptaze na uzorku jednog lanca DNK koja se želi sekvencionirati sintetizira novi lanac. Iako se u reakciji dodaju deoksinukleozidi dGTP, dATP, dTTP i dCTP, enzim ne može započeti reakciju sinteze novog lanca bez oligonukleotida - prajmera (engl. primer). Prajmer predstavlja sekvencije 14-40 nukleotida komplementarnih sekvencijama vektora koje se nalaze na samom početku ili kraju inserta. Kad se prajmer priljubi uz komplementarne nukleotide, enzim može započeti sintezu novog lanca. Reakcijama se zatim dodaje stop solucija u kojoj se nalazi jedan od ddNTP (2',3'-dideoksinukleozid 5' trifosfat; ddGTP, ddATP, ddCTP ili ddTTP). Ovako modificiranom deoksinukleozidu nedostaje 3'OH grupa, te je nemoguće nadovezati sljedeći nukleozid. Elongacija lanca prestaje u momentu kada se ugradi jedan od ddNTP (terminacija lanca).

U ovoj metodi korišten je enzim Sequenase i protokol koji predlaže proizvođač (USB, United States Biochemical Corporation, Cleveland, Ohio) uz male preinake. Kao uzorak korištena je dvolančana DNK (pARI.5 insert kloniran u Bluescript). 2-3  $\mu$ g DNK su denaturirana sa 1N NaOH da bi se odvojili lanci. Potom je dodan reverzni ili univerzalni prajmer i uzorci su inkubirani pet minuta na 65°C. Iza toga tube se postepeno hlade do ispod 35°C, dodaje se dGTP, dCTP, dTTP, dATP označen radioaktivnim sumporom (deoksiadenozin 5'- $\alpha$ -tio trifosfat, <sup>35</sup>S), 0,1 M DTT (ditiotrietol) te enzim Sequenase. Ovaj enzim ima karakteristike T7 DNK polimeraze velike procesivnosti i brzine, te slabe 3'-5' eksonukleazne aktivnosti. Sastojci su pažljivo pomješani i inkubirani 5 minuta na sobnoj temperaturi. Posebno su pripremljene tube s dideoksinukleozidima i označene kao G,A,T ili C reakcija ovisno da li sadrže ddGTP, ddATP, ddTTP ili ddCTP. U reakciji terminacije lanca, u svaku je dodana određena količina radioaktivno označene DNK iz predhodne reakcije, te su tube inkubirane 5 minuta na 37°C prije dodavanja stop solucije (95% formamid, 20 mM EDTA, 0,05% bromfenol plavilo i 0,05 % ksilen cijanol). Ovako pripremljeni uzorci mogu se čuvati na -20°C nekoliko dana.

### 3.3.3 Denaturacijski gel

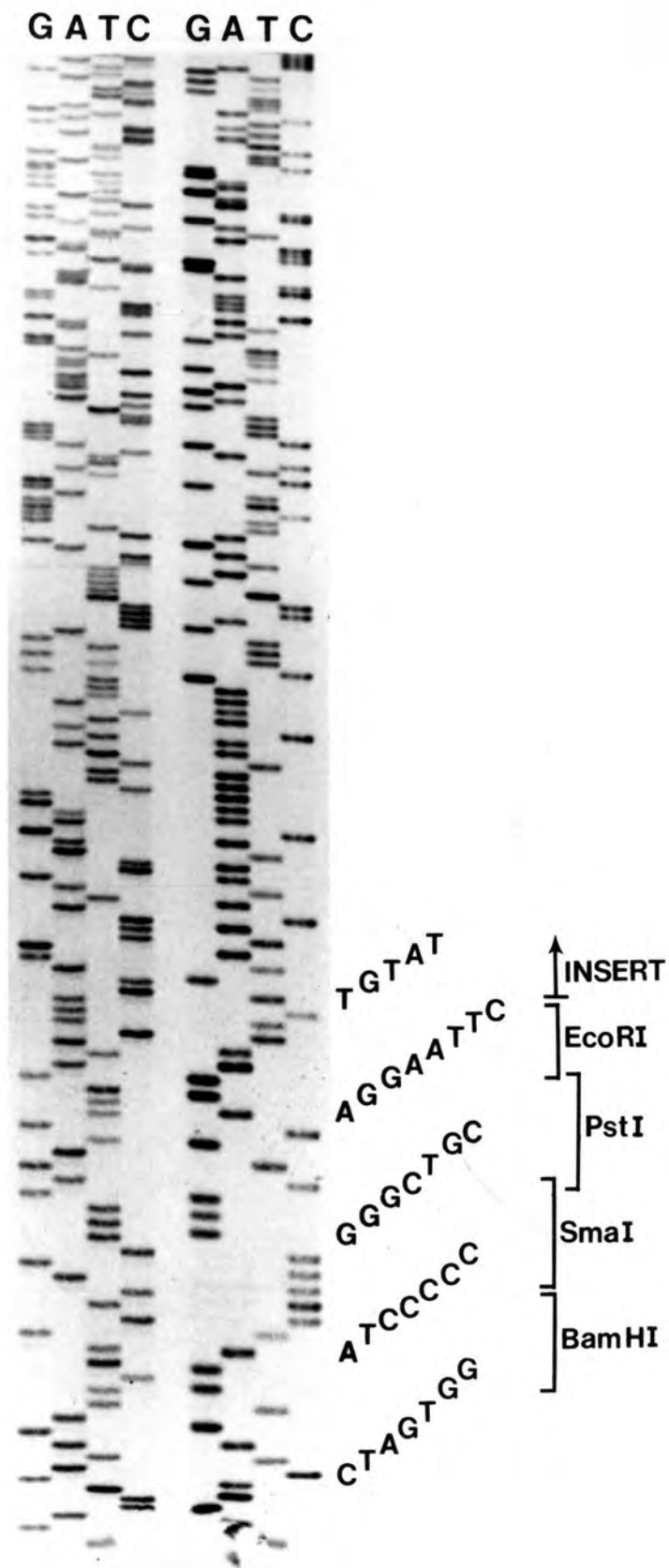
Nakon sekvencijskih reakcija nukleotidi su separirani uz pomoć denaturacijskog ili urea-akrilamid gela. Najčešće je pripremano 100 ml 6% gela (5,7 g akrilamida, 0,3 g bisakrilamida, 50 g uree, 0,07g amonijum persulfata i 10-20 $\mu$ l TEMED -

N,N,N',N'-tetrametilendiamin). Nakon što se akrilamid i urea otope u 1X TBE puferu (50 mM TRIS, 50 mM boratna kiselina i 0,1 mM EDTA), gel se filtrira, uz pomoć vakuma oslobodi mjehurića zraka i odmah nakon dodavanja TEMED-a i amonijumpersulfata ulijeva u prostor od 0,2 ili 0,4 mm između dva stakla. Nakon 10 minuta do pola sata mora doći do polimerizacije. Isto tako debljina gela mora biti jednakomjerna radi bolje rezolucije i čitljivosti radiograma. Uzorci su zatim izloženi vertikalnoj elektroforezi konstantne snage od 60 W (vata) s promjenjivim naponom 800 - 2000 V u najmanje tri vremena elektroforeze: 2, 4 i 6 sati. Ponekad je za očitavanje između 300-400 baza elektroforeza rađena i 6-8 sati. Gelovi s uzorcima označenim radioaktivnim fosforom se zatim suše pod vakuumom na 60-80°C, a potom izlože Kodak X-AR filmu na -70°C. Gelovi s uzorcima označenim <sup>35</sup>S prije sušenja namakani su u 10% octenoj kiselini i 12% metanolu da bi se otopila urea koja može ometati radioaktivni signal i utjecati da sekvencije budu nečitke. Potrebna je ekspozicija gela radiološkom filmu od 16 sati do tri dana. Na -70°C radioaktivni signal je puno snažniji što smanjuje vrijeme ekspozicije za desetak puta. Slika 6. prikazuje sekvencije jednog fragmenta DNK urađene Sangerovom metodom.

#### 3.3.4 *Kompjuterska analiza podataka*

U analizi podataka korišten je čitač gela i programska podrška (engl. software) Pastell DNA Sequence Program (IBI, New Haven, CT, USA) i BIONET (Mountain View, CA, USA). Pomoću ovih programa dobivena su restrikcijska mjesta svih komercijalno dostupnih enzima što je olakšalo strategiju kloniranja i sekvencioniranja. Uz to su nukleotidne sekvencije prevedene u aminoacidne, insert je uspoređen s nukleotidnim i amino kiselinskim sekvencijama drugih antigena (4.2.2- Slika 7.), te je dobiven hidropatski plot koji ukazuje na hidrofobne i hidrofilne dijelove izvedenog proteina (4.2.3 - Slika 10.).





Slika 6. Sekvencije DNK inserta urađene Sangerovom metodom

Opis slike 6. Na slici je prikazan uzorak DNK sekvencioniran metodom terminacije lanca (147). Desni dio slike prikazuje početne sekvencije inserta kloniranog u Bluescript vektor. U desnom donjem uglu vide se sekvencije vektora s mnoštvom restrikcijskih mjesta. Lijevi dio pokazuje isti uzorak DNK, ali su sekvencije izložene dužoj migraciji na denaturacijskom gelu. Kombinacijom vremena migracije moguće je očitati više od 400 nukleotidnih sekvencija istog uzorka DNK.

## 3.4 PRIPREMA PROBE

Hibridizacijske probe pripremljene su od mišjeg klona klase I (2.7) ili štakorskog klona izoliranog i opisanog u ovom radu. pH-2III je mišja proba za gene klase I. Hibridizacijski insert dobiven je rastom bakterija (3.1.2) i izoliranjem (3.1.4) plazmidne DNK. Insert klase I kloniran je u PstI restriksijske krajeve DNK vektora pa je za izoliranje probe dovoljna digestija s PstI enzimom. Iz klona pARI.5 dobivene su četiri probe. 5'pARI.5a proba je duga svega 190 pb i dobivena je digestijom SstII enzimom. SstII fragment predstavlja kodirajuće sekvencije zadnjih četrdesetak amino kiselina prve domene i početak druge domene teškog lanca antigena klase I (vidi Rezultati). Amino kiseline na kraju  $\alpha_1$  domene poznate su kao alel specifične (134). Slična proba, 5'pARI.5b, dužine 270 nukleotida, dobivena je duplom digestijom Aval i BamHI enzimima. 3'pARI.5a proba dobivena je duplom digestijom EcoRI-PvuII enzimima. Ovim se endonukleazama izdvoji fragment koji predstavlja 3'NR regiju iza stop kodona koja se ne prevodi u protein. Taj dio transkripta je lokus specifičan za gene klase I (134). Četvrta je proba također izdvojena iz iste regije duplom digestijom PvuII i HincII enzimima.

Nakon digestije endonukleazama željeni fragmenti separirani su na 0,4% ili 0,7% agarozu gelu, bojani s 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  etidium bromidom i fotografirani. Inserti su zatim izrezani žiletom iz gela, zgnječeni u 400  $\mu\text{l}$  TE pufera i rotirani 2 dana na  $4^\circ\text{C}$  da bi se DNK izdvojila iz agaroze. Zatim su uzorci centrifugirani u mikrocentrifugi na 14000 rpm i supernatant s DNK je precipitiran s 3 volumena absolutnog alkohola i 1/10 volumena 2M kalium acetata. 50  $\text{ng}/\mu\text{l}$  DNK je pripremljeno za radioaktivno označavanje s  $\text{P}^{32}$ .

### 3.4.1 Radioaktivno obilježavanje probe

U radioaktivnom obilježavanju probe korišten je Oligolabeling Kit (Pharmacia Molecular Biology Division, Piscataway, NJ) uz male modifikacije protokola koga sugerira proizvođač. Ukratko, DNK insert pomješan je s destiliranom vodom u 1,5 ml tubi i denaturiran na  $100^\circ\text{C}$  5 minuta. Totalni volumen reakcije je 50  $\mu\text{l}$  za 100 ng DNK, a za veće količine DNK korišten je volumen od 100  $\mu\text{l}$ . Denaturirana DNK je inkubirana 10 minuta na ledu i 10 minuta na sobnoj temperaturi. U volumen od 50  $\mu\text{l}$  dodano je 10  $\mu\text{l}$  reakcijske mješavine sastavljene od različitih nukleotida otopljenih u soli. Također je dodano 2  $\mu\text{l}$  BSA (koncentracije 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), 5  $\mu\text{l}$  50 uCi  $-\text{P}^{32}\text{dCTP}$ -800 Ci/mmol) i 2  $\mu\text{l}$  Klenow enzima. Klenow je tvornički modificirana DNK polimeraza I od koje su



sačuvane dvije funkcionalne karakteristike: 5'-3' polimeraza i 3'-5' eksonukleazna aktivnost, a nedostaje 5'-3' eksonukleaza, tj. razgradnja lanca s 5'kraja. Reakcija obilježavanja radioaktivnim  $P^{32}$  je zatim inkubirana na sobnoj temperaturi preko noći. Reakcija je prekinuta dodavanjem 8  $\mu$ l stop bufera i destilirane vode do 100  $\mu$ l.

### 3.4.2 Odvajanje neugrađenih radionukleotida

Radioaktivni nukleotidi koji nisu ugrađeni u lanac DNK u reakciji radioaktivnog označavanja probe (3.4.1) i koji mogu kontaminirati i nespecifično hibridizirati ispitivanu DNK, pročišćeni su i odvojeni G-100 Sephadex kolonom (Pharmacia, Uppsala, Švedska). G-100 Sephadex je priređen u 1X STE otopini (100 mM NaCl, 10 mM TRIS-HCl pH8,0 i 1 mM EDTA) i taložen u 5 ml pipeti sa staklenom vunom na užem kraju. Kroz kolonu Sephadexa propušteno je nekoliko volumena 1X STE otopine. Kolona se ne smije osušiti, jer bi molekule DNK ostale zaljepljene za Sephadex i nebi se odvojio fragment DNK i neugrađene nukleotide na principu molekularne težine. U radioaktivno obilježen DNK insert (3.4.1) dodano je 10  $\mu$ l boje (0,25% bromfenol plavilo, 0,25% xilen cianol, 15% ficol-tipa 400 u destiliranoj  $H_2O$ ). Otopina DNK pažljivo je ispipetirana na vrh kolone i po vrhu otopine DNK dodano je nekoliko volumena 1X STE pufera. Separacija radioaktivno obilježene DNK i  $P^{32}$ dCTP nukleotida praćena je ručnim monitorom. Radioaktivno obilježen fragment DNK brže prolazi kroz kolonu i tekućina s prvim snažnim radioaktivnim signalom se skuplja u 1,5 ml tubu, dok  $P^{32}$ dCTP nukleotidi zaostaju na vrhu kolone. Radioaktivnost je mjerena Cerenkovim otkučajima u scintilacijskom brojaču (70).

## 3.5 EKSPRESIJA INSERTA U STANICAMA SISAVACA

Za utvrđivanje alelne specifičnosti insert je kloniran u vektor (2.8) pogodan za ekspresiju u stanicama sisavaca (117). Predpostavlja se da će stanice domaćini (2.7; 50) sintetizirati i ispoljiti protein klase I štakorskog porijekla na staničnoj membrani.

### 3.5.1 Priprema inserta u odgovarajućem translacijskom kodu

Komplementarna DNK mora biti spojena u ekspresijskom vektoru na 5'kraju u odgovarajućem translacijskom kodu da triplet baza odgovara broju i redosljedu amino kiselina, te da se stop (TGA) kodon ne pojavi prije vremena. Tada bi došlo do sinteze kraće molekule koja ne bi sačuvala karakteristike proteina stanične membrane. Zato je izračunat broj nukleotida od start kodona (ATG) vektora (128,117) do Smal restrikcijskog mjesta. Insert klase I izdvojen je iz prethodnog vektora digestiom EcoRI endonukleazom. Uz pomoć S1 enzima, egzonukleaze koja specifično denaturira jednolančanu DNK, na krajevima inserta razgrađeni su AATT nukleotidi. Na taj su način formirani slijepi krajevi inserta (engl. *bland ends*), te su sada oba lanca DNK su jednake dužine. Oni su T4 DNK ligazom spojeni sa Smal slijepim krajevima pcEXV3 vektora. Ovako konstruirana hibridna DNK ima neprekinuti translacijski kod od vektorskog start kodona, do stop kodona pARI.5 inserta klase I.

### 3.5.2 DEAE-dekstran metoda jednokratne transfekcije

U jednokratnoj transfekciji COS7 stanica korištena je DEAE-dekstran metoda (99). COS7 stanice su inkubirane na 37°C s 10% CO<sub>2</sub> u DMEM-u (Dulbecco Minimal Essential Medium) sa suplementima: 2 mM L-glutamin, 1X neesencijalne aminokiseline, antibiotik i 10% FCS (fetal calf serum) (DMEM-10). Dan prije transfekcije stanice su uz pomoć 0,05% tripsina i 0,53 mM EDTA odljepljene od podloge i podijeljene na 0,25-0,5 x 10<sup>6</sup> stanica u 60 mm posudi za staničnu kulturu. Na dan transfekcije sterilizirano je za jednu staničnu kulturu 5 µg pcEXV3/pARI.5 DNK u dva volumena apsolutnog alkohola. DNK je pomiješana s 1,25 ml DMEM-HEPES otopine (DMEM, 2 mM L-glutamin, 10 mM HEPES, bez FCS) i 0,25 ml 2 mg/ml DEAE-dekstrana (Sigma; kloridna forma molekularne težine 500 000) otopljenog u DMEM-HEPES-u. Stanice su dva puta oprane u otopina DMEM-HEPES-a, zatim je dodana DEAE:DNK otopina i kulture su inkubirane na 37°C 3-4 sata. Otopina DEAE:DNK je aspirirana i dodano je 2 ml 20% glicerola otopljenog u DMEM-HEPES-u. Kulture se izlože glicerinskom šoku

svega 1-2 minute na sobnoj temperaturi. Duže izlaganje stanica glicerinu je toksično. Stanice su zatim ponovo oprane dva puta u DMEM-HEPES-u, dodano je 15 ml DMEM-10 hranilišta i inkubirane su sljedećih 48-72 sata na 37°C s 10% CO<sub>2</sub>.

Ovom metodom dobije se jednokratna transfekcija stanica. Ukoliko bi se stanice duže inkubirale, transficirana virusna DNK, koja se nakon 72 sata umnoži u velikom broju kopija, razorila bi stanicu.

### *3.5.3. Trajna transfekcija metodom precipitacije kalcijevim fosfatom*

U eksperimentima trajne ili stabilne transfekcije, COS7 stanice su transficirane metodom precipitacije kalcijevim fosfatom (170, 160, 53). Ovim metodom strana DNK ugradi se u kromosom stanice koja tako trajno postaje nosilac ispitivanog gena. Dan prije transfekcije, u posude za stanične kulture podijeljeno je  $3\text{-}5 \times 10^5$  stanica, a 3 sata prije transfekcije stanicama je promijenjeno hranilište (DMEM-10). 10 µg pcEXV3/pARI.5 DNK je pomiješano s 250 ng pSV2neo vektora (2.8), sterilizirano precipitaciom u apsolutnom alkoholu i otopljeno u 250 µl TE pufera (10 mM TRIS.HCl, 0,1 mM EDTA). DNK otopini dodano je 250 µl sterilnog 0,5 M CaPO<sub>4</sub> i zatim je otopina kap po kap dodana u 500 ul 2x HBS otopine (280 mM NaCl, 50 mM HEPES, 1,5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·xH<sub>2</sub>O, pH 7,1), sterilizirane kroz filter. Otopina se pri tom zamuti, pa se ostavi na sobnoj temperaturi 30-60 minuta da se istaloži. Ponovo se izmješa i doda kap po kap u kuturu stanica. Sljedećeg dana stanice se mogu izložiti glicerinskom šoku (3.5.2) kako bi se povećala propustljivost stanične membrane ili im se samo izmijeni hranilište. Od trećeg ili četvrtog dana nakon transfekcije, stanice se inkubiraju u selektivnom hranilištu (DMEM-10 s 500 µg/ml Geneticina). Nakon 7-10 dana stanice se mogu održavati u mediju s 250 µg/ml Geneticina.

### *3.5.4 Metoda indirektne imunoflorescencije*

Poslije transfekcije jednokratnom ili trajnom metodom, COS7 stanice su bojane metodom indirektne imunoflorescencije. Stanice su pažljivo tripsinizirane i odijeljene od podloge i inkubirane u otopini primarnog antitijela 1 sat na ledu. Nakon dva pranja u PBS-u (engl. phosphat buffer saline) i 1% FCS, stanice su inkubirane 1 sat na ledu s kozjim anti-štakorskim F(ab)<sub>2</sub> IgG označenim floresceinom. Stanice su zatim ponovo oprane u PBS-u s 1%-tnim FCS i mikrocitometrijski analizirane na EPICS V Profile (Colter, CA).

U kontroli su uvijek bojane COS7 stanice te DA, WF, BN i DA.1D limfociti. Bojanjem lifocita su se također kontrolirali absorbirani serumi. Primarno antitijelo je običo korišteno u razređenju 1:50, 1:100, dok je sekundarno antitijelo uvijek priređivano u razređenju 1:50.

## 3.6 HIBRIDIZACIJA GENOMSKE DNK

### 3.6.1 Izoliranje DNK iz tkiva i staničnih kultura

DNK velike molekularne težine iz jetre štakora izolirana je metodom Blina i Stafforda, 1976. (16) uz male modifikacije(88). Tkivo je izmiješano i rastvoreno u 20 ml/g homogenizacijskog pufera (100 mM NaCl, 10 mM EDTA, pH 7,6). Jezgre stanica su izcentrifugirane na 3000 rpm, 10 minuta u Sorvall RC-5B centrifugi (DuPont Instruments, Boston, MA) i ponovo rastvorene u 20 ml homogenizacijskog pufera. Zatim je dodan 10% SDS do konačne koncentracije od 1% i proteinaza K do 100  $\mu\text{g/ml}$ . Rastopina je inkubirana na 37°C jedan sat uz povremeno miješanje. Viskozna solucija je zatim ekstrahirana dva puta s jednakim volumenom pufera ekvilibriranog, redestiliranog fenola i faze su odvojene na 9000 rpm za 10 minuta vrtnje. Otopina DNK dijalizirana je 24 - 48 sati u TE puferu (10 mM TRIS.HCl pH 7,6 i 1 mM EDTA pH 8,0) koji je nekoliko puta promijenjen. Pankreasna ribonukleaza A dodana je u finalnoj koncentraciji od 50  $\mu\text{g/ml}$  i otopina DNK je inkubirana 2 sata na 37°C. Ovim se enzimom kompletno denaturira RNK u otopini. Dodana je proteinaza K u koncentraciji 100  $\mu\text{g/ml}$  i otopina je ponovo inkubirana 2 sata na 37°C. Proteinazom i ponovnom ekstrakcijom fenolom, kako je prije opisano, uklanjaju se preostali proteini iz otopine. DNK je zatim precipitirana u dva volumena apsolutnog alkohola na -20°C preko noći. Precipitat je opran nekoliko puta u 70% etanolu da se ukloni višak soli, zatim osušen na zraku i sljedeća 2 - 3 dana otapan u TE puferu na 37°C. Ista metoda je korištena u izoliranju kromosomske DNK iz kultura COS7 stanica. 10<sup>9</sup> stanica odgovara gramu tkiva. Koncentracija dobivene DNK utvrđena je uz pomoć LKB spektrofotometra (Bromma, Švedska) na zrakama valne dužine 260 i 280 nm.

### 3.6.2 Digestija genomske DNK restriktivnim enzimima

Digestija kromosomske DNK velike molekularne težine urađena je sljedećim enzimima: EcoRI, XbaI i PvuII. Proizvođač predlaže protokol i uz enzime isporučuje i reakcijske puferne s određenom koncentracijom soli u kojoj testirani enzim najefikasnije cijepa molekulu DNK. Tipična reakcija sadrži 7 - 10  $\mu\text{g}$  DNK u ukupnom volumenu od 30  $\mu\text{l}$ . Dodano je 3  $\mu\text{l}$  reakcijskog pufera (10 X koncentracije),  $\beta$ -merkaptoetanol i BSA čija je konačna koncentracija u reakciji 10 mM i 100  $\mu\text{g/ml}$ . Dodana je destilirana voda do konačnog volumena reakcije. Obično su upotrebljavane 2 - 3 U (jedinice) enzima po mikrogramu DNK i otopina je inkubirana 4 sata na 37°C. Reakcije su zaustavljane



dodavanjem 5  $\mu$ l 5X L pufera (30% saharoza, 50 mM EDTA, 0,1% Na azid i 0,45% bromfenol plavilo). Jedan  $\mu$ g DNK upotrebljavan je za kontrolu da se ustanovi da li je digestija kompletna.

### 3.6.3 Transfer DNK na nitrocelulozne membrane

Transfer DNK na nitrocelulozne membrane je urađen po Southern-ovom (1975.) originalnom protokolu (158), nazvanom po autoru Southern blot. Nakon elektroforeze, bojanja i fotografiranja (3.2.2), od agaroznog gela izrezan je dio koji sadrži ispitivanu DNK. Gel je zatim inkubiran na sobnoj temperaturi u denaturacijskom puferu (1,5 M NaCl i 0,5 M NaOH), uz laganu trešnju dok se ne postigne pH 12. Denaturacijom se odvoje lanci DNK. Potom se gel inkubira u neutralizacijskom puferu (1 M TRIS.HCl, pH 8,0 i 1,5 M NaCl). Kapilarnim silama DNK iz gela prelazi na nitrocelulozne membrane, 10X SSC pufer (1,5 M NaCl; 0,15 M Na citrat) prolazi redom kroz filter papir, gel, nitroceluloznu membranu koja je pokrivena hrpom filter papira i pritisnuta težinama od 2 - 3 kg. Blot se ostavi na 4°C preko noći. DNK je ovim postupkom trajno vezana za nitroceluloznu membranu. Filteri su pečeni na 80°C tri sata i čuvani na sobnoj temperaturi do upotrebe.

### 3.6.4 Prehibridizacija

Nitrocelulozne membrane su uložene u plastične vrećice koje se naknadno mogu zavariti. Upotrebjeno je 0,2 ml prehibridizacijske tekućine po  $\text{cm}^2$  membrane. Prehibridizacijska otopina sadrži sljedeće komponente: 50% formamid, 5X SSC (0,75M NaCl, 75 mM Na citrat), PVP (polivinilpirolidon), 0,02% fikor (molekularne težine 400 000), 50 mM  $\text{NaPO}_4$  (pH 6,5), 0,1% SDS (engl. sodium Duodecil sulfat), 100  $\mu$ g/ml tRNK, 100  $\mu$ g/ml denaturirane DNK sperme lososa i 5% dekstran sulfat. DNK sperme lososa denaturira se 10 minuta na 100°C. Sastojci se pomiješaju i kuhaju dok se dekstran potpuno ne otopi. Prehibridizacijska tekućina se dodaje u vrećice s nitroceluloznim membranama, odstrane se mjehurići zraka i vrećice se potom zavare. Prehibridizacija genomske DNK je urađena preko noći na 37 - 42°C uz laganu trešnju membrana.

### 3.6.5. Uvjeti hibridizacije

Uvjeti po kojima se hibridiziraju nitrocelulozni filteri nešto se razlikuju od originalnog protokola Alwine i suradnika (1977.) (2). O,15 ml hibridizacijske otopine po



cm<sup>2</sup> membrane pripremljeno je od sljedećih sastojaka: 50% formamid, 5XSSC, 0,004% BSA, 0,004% PVP, 0,004% fikor, 20 mM NaPO<sub>4</sub> (pH6,5), 0,1% SDS, 100 μg/ml tRNK, 100 μg/ml denaturirane DNK sperme lososa i 10% dekstran sulfat. Dodano je također 7,5 - 15 x 10<sup>5</sup> cpm (engl. count per minute) probe - DNK označene <sup>32</sup>P (3.4.1). Proba i DNK sperme lososa predhodno su denaturirane 10 minuta na 100°C, a otopina je kuhana u plastičnoj tubi u čaši vode dok se dekstran potpuno nije otopio. Prehibridizacijska tekućina je odstranjena, a u vrećice s nitroceluloznim membranama dodana je hibridizacijska tekućina. Inkubacija je nastavljena sljedećih 24 - 72 sata na 37-42°C. Za određivanje uvijeta hibridizacije potrebno je poznavati sljedeće odnose:

$$T_m = 81,5 + 0,41 (G+C) + 16,6 \log(\text{Na}^+) - 0,63 (\% \text{ formamid} - 650/L)$$

gdje je:

T<sub>m</sub> = temperatura razdvajanja lanaca dvolančane DNK

L = dužina probe u nukleotidima

Temperatura na kojoj se hibridizira ovisi o broju gvanidin-citozin veza, koncentraciji Na iona i formamida, te svakako o dužini probe kojom se želi hibridizirati ispitivana DNK (108, 17, 21, 105, 30).

### 3.6.6 Uvjeti pranja filtera

Filteri su nakon hibridizacije izvađeni iz vrećica i uronjeni u posudu s 2X SSC (0,3 M NaCl, 0,03 M Na citrat, pH 7,0) i 0,1% SDS i inkubirani u ovoj otopini na 42 - 47°C tri puta po pola sata. Iza toga sljede tri pranja u 0.1 X SSC (15 mM NaCl, 1,5 mM Na citrat, pH 7,0) i 0,1% SDS po sat vremenana 50 - 52°C. To su tzv. uvjeti pranja umjerene stringencije. U uvjetima jake stringencije filteri su prani u prvoj otopini 15 minuta na sobnoj temperaturi, a zatim po sat vremena tri puta na 65°C. Ovakva nagla promjena koncentracije soli i temperature uvjetuje da se DNK probe na mjestima slabije homologije odvoji od DNK na nitroceluloznim filterima. Samo hibrid DNK: proba visoke homologije ostaje intaktan. Time se dobije veća specifičnost hibridizacije. Membrane su zatim umetnute između dva lista 3 mm Whattman kromatografskog papira i još uvijek mokre, pokrivene tankom plastičnom folijom.

### 3.6.7 Radiografija

Odmah nakon pranja, filteri su izloženi Kodak XAR-5 filmu u radiografskim kazetama na -70°C 16 sati do 7 dana.

## 4.0 REZULTATI

### 4.1 NUKLEOTIDNE SEKVENCIJE KLONA KLASI I

#### 4.1.1 Restriksijska mapa i strategija sekvencioniranja

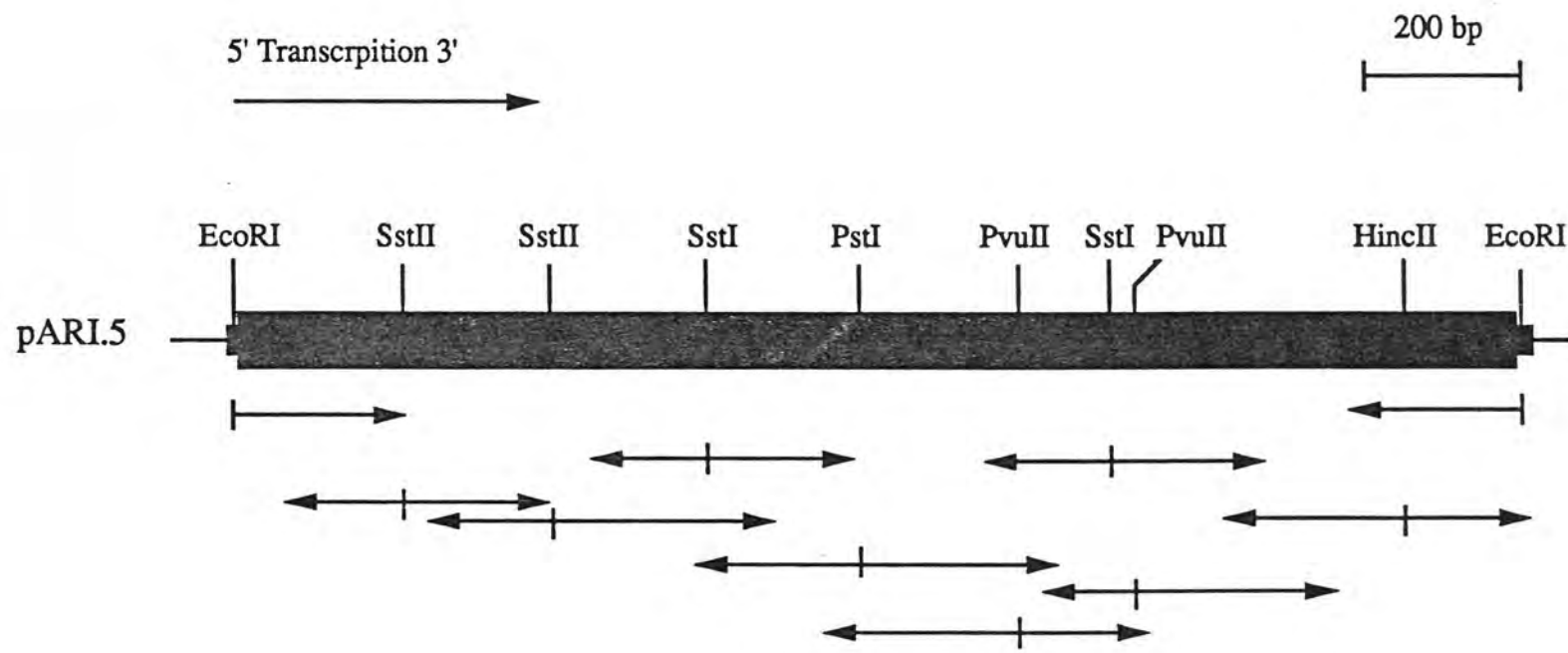
Klonovi kDNK knjižnice gena grupirani su po sličnosti restriksijskih fragmenata. Iz najbrojnije grupe odabran je klon pARI.3, veličine oko 1.3 kb što može biti dužina kodirajuće regije za kompletan teški lanac. Naknadno se uspostavilo da klon započinje kodirajućim sekvencijama za drugu ekstracelularnu domenu, te da je na 5' kraju kraći od potpunog prepisa gene klase I (139). Na Slici 7, prikazana je strategija sekvencioniranja pARI.5 inserta čija restriksijska mapa u potpunosti odgovara mapi pARI.3 u 5'-SstII-EcoRI-3' regiji. pARI.3 insert sekvencioniran je Gilbert-Maxam metodom (107, 106). Restriksijski fragmenti izolirani su na 5% urea-akrilamid gelu. U sljedećem koraku restriksijsko mjesto premošteno je novim fragmentom, da bi se dobilo preklapanje sekvencija i izbjegla greška ukoliko isti enzim ima dva vrlo bliska restriksijska mjesta.

#### 4.1.2 Hibridizacija klonova kDNK knjižnice gena i izoliranje pARI.5 inserta

Nakon što je završeno sekvencioniranje klona pARI.3 i utvrđeno da nedostaju sekvencije prvog i drugog eksona, tj. sekvencije kodirajuće regije za signalni protein i prvu ekstracelularnu domenu molekule klase I (139), pripremljena je pH-2III mišja proba i filteri s insertima klase I kDNK knjižnice ponovo su hibridizirani. pH-2III proba nešto je duža na 5' kraju od pAG64c probe koja je korištena u konstrukciji knjižnice gena i time pokazuje više specifičnosti za sekvencije prve ekstracelularne domene. Ovim postupkom utvrđeno je da pARI.5 klon pokazuje različit signal u hibridizaciji s dvije probe te da je duži za oko 400 nukleotida od pARI.3 klona što predstavlja veliku mogućnost da sadrži kompletnu kodirajuću regiju teškog lanca antigena klase I placente štakora.

#### 4.1.3 Nukleotidne sekvencije pARI.5 inserta

pARI.5 klon sekvencioniran je Sangerovom metodom (147). Nakon prvih stotinjak sekvencija 3' kraja je utvrđeno da su pARI.3 i pARI.5 inserti prepisi istog gena samo što je pARI.3 kraći na 5' kraju što predstavlja čest tehnički problem u konstrukciji komplementarne DNK. Sekvencijama pARI.3 dodane su sekvencije 5' kraja pARI.5 in-



Slika 7. Restrikcijaska mapa i strategija sekvencioniranja pARI.5 inserta

serta nakon što je utvrđeno da oba klona imaju potpuno iste sekvencije početnog dijela trećeg eksona tj. kodirajuće nukleotide druge ekstracelularne domene. Nukleotidne sekvencije pARI.5 inserta prikazane su na Slici 8.

## 4.2 ANALIZA pARI.5 SEKVENCIJA I IZVEDENOG PROTEINA

### 4.2.1 Analiza nukleotidnih sekvencija pARI.5 inserta

pARI.5 insert dug je 1612 pb i sadrži sekvencije svih osam eksona gena klase I (Slika 2). Sekvencije završavaju s 49 nukleotida dugim poliadenilnim repom, što je karakteristika gRNK i dokazuje porijeklo ove kDNK (140). Stop kodon (TGA) nalazi se 1132 nukleotida od 5' kraja. Ovaj dio kDNK predstavlja kodirajuću regiju i na Slici 8. prikazan je kao odvojeni tripleti baza. Iza toga se nalazi 3'NR (neprevođena regija) čije se nukleotidne sekvencije na Slici 8. nadovezuju jedna na drugu. 400 nukleotida iza stop kodona slijedi poliadenilacijski signal 5'-AAATAAA-3'(96), koji je također jedna od karakteristika glasničke RNK.

### 4.2.2 Karakteristike proteina dobivenog iz pARI.5 nukleotidnih sekvencija

Iz nukleotidne sekvencije pARI.5 inserta kompjuterski su dobivene aminokiselinske sekvencije koje se lako mogu usporediti sa sekvencijama antigena klase I drugih sisavaca (Slika 9.). Prva aminokiselina u pARI.5 klonu nalazi se na samom početku signalnog proteina koji se kod većine molekula klase I sastoji od 21 aminokiseline (94, 29). U tom slučaju kodirajućoj regiji inserta nedostaje samo prva aminokiselina - metionin, koju kodira start triplet - AUG. Prva vanstanična domena građena od 90 aminokiseline i sadrži tipične glikozilacijske sekvencije na poziciji N86 kao i u svim drugim antigenima klase I (Slika 9.; 94, 144, 102, 157, 172, 29, 35). Druga vanstanična domena molekule sastoji se od 92 aminokiseline. Cisteinske pozicije koje formiraju disulfidne mostove također su konzervirane i u pARI.5 molekuli (94, 84, 144, 157, 172, 29, 115, 35). Treća ekstracelularna domena štakorskog antigena klase I također je vrlo slična po strukturi bilo kojoj drugoj molekuli klase I: građena je od 92 aminokiseline, cistein se nalazi na pozicijama 203 i 259, druga glikozilacijska sekvencija je na poziciji N256 (94, 144, 74, 29). Transmembranska i citoplazmatska domena molekule brojem i sekvencijom uvelike se razlikuju od uspoređivanih antigena klase I.

GCA CCG CGC ACG CTG CTC CTG CTG TTG GCG GCC GCC CTG GCC CCG ACC CAG ATT CAC GCG 60  
GGC TCA CAC TCG CTG CCG TAT TTC GAC ATC ACC GTG TCC CCG CCC GGC CTC GGG GAG CCG 120  
CGG TTC ATC TCT GTG GGC TAC CTG GAC CAC ACG GAG TTC GTG CGE TAC GAC ACC GAC GCA 180  
GAG AAT CCG AGA TTC AAG CCG CCG GTC CCG TGG ATG GAG CCG GAG GGG CCG GAG TAT TGG 240  
GAG CCG ATC ACA CCG ATC GCC AAG GAA AGC GAG CAG ATT TAC CGA GTG GGC CTG AGG ACC 300  
CTG CGC GGT TAC TAC AAC CAG AGC GAG GGC GGC TCT CAC ACC ATC CAG AGA TTG TCT GGC 360  
TGT GAG GTG GGG TCG GAC GGG ATC CTC CTC CCG GGG TAT GAG CAG TTC GCC TAC GAC GGC 420  
CGC GAT TAC ATC GCC CTG AAC GAA GAC CTG AAA ACG TGG GCG GCG GCG GAC TTT GCA GCA 480  
GGG ATC ACC CCG AAC AAG TTG GAG CCG GAT GGT GAG GCA GAG AGA CTC AGG GCC TAC CTT 540  
GAA GGC GGG ACC GTG GAG TGG CTC CCG AGA TAC TTG GAG CTC AGG AAG GAG ACG CTG CTG 600  
CGC TCA GAA CCC CCA AAG GCA CAT GTG ACC CTT CAC TCC AGA CCT GAA GGT GAT GTG ACC 660  
CTG AGG TGC TGG GCC TTG GGC TTC TAC CCT GCT GAC ATA TTC CTG ACC TGG CTG TTG AAT 720  
GGG GAG GAC CTG ACC CAG GAC ATG GAA CTT GTG GAG ACC AGG CCT GCA GGG GAT GGA ACC 780  
TTC CAG AAC TGG GCA TCT GTG GTG GTG CCT CTT GGG AAG GAG CAG AAT TAC ACA TGC CAT 840  
GTG GAG CAT GAG GGG CTG CCT GAG CCG CTC ACC CTG AGA TGG GAG GGT CCT CCC TCC GCC 900  
AAC TCC AAC ACC GGA ATG TCT GTT ATT CTT GGA ACT GTG GCC ATC ATT GCA GTT ATG GCC 960  
ATC ATT GCA GCT GTG GCC TTC ATT GGA CCT GTT GTG AGG AAG AGG TGG ATA AAA ACA GCT 1020  
TTT CTT CTC ACA AGT GGA AAA GGA GGA GAC TAC ACC CCT GCT CCA GGC AGG GAC AGC TCC 1080  
CAG AGC TCT GAT GTG TCT CTC CCA GAT TGT AAA GCC ATG AAG ACA GCT GCT TGA GGTGAAC 1141  
TGGATGCCGGCCGATGTGTTTCAGGCTCTCTCTGTGACATCCGGAGCCCTCGGTTCTCTTTGGACACCCATGCCCTGGGAT 1220  
TCCGTATGATCCTATGACTTCGGTATAGGGGACTATGGGACCCGCCCAACCCTACACACCCGGGACCCCTATCCCTGCAC 1299  
TGTITGTGTTTCCTTTCACAGCCAACTTGCTGGTTCAGCCTGGGTGGGGCCIGGACATCTGCATCCTATCACTCAGT 1378  
GGTGCTTTGAACTGCAACTCCTCACTTCTACACTGAGAATAAGAATCTGAGTGTGAACITGACTGTTTACATCCTTGAC 1457  
ACAGTCTGACTGCTTTTTAAAITACIGGATGAGAATACTTAGAGGTTGTTTTTGTITTTTGTITTTTGTITTTTAA 1536  
ATAAATGCCAGGTGGAGAAGCTTCCAGAA 1612

**Slika 8. Nukleotidne sekvencije pARI.5 inserta**

(slika je opisana u tekstu)



Signal Peptide

pARI.5 1 APRTLLLLLAAALAPTQINA  
 E-2K<sup>a</sup> 2 C.....TR.  
 HLA-B7 5 V...LSGPHL.ETH.  
 Q8<sup>b</sup> 2 LTM...V...TLIETR.  
 T1a<sup>c</sup> 7 V.S...I...SQVQ..TCP

First (=1) domain

30 60 90  
 pARI.5 GSESLATPDIIVSRPQLGEPFISVGYVDDTEFVRYDSDAENFAPKFAVYHMEREGPEYHRRITRIAKESEQIYRVGLRLTLAGYYNQSEG  
 E-2K<sup>a</sup> 1 VTA.....A.....Q...F...D...E...AP...Q.....EQ.QR..SD..NF..S...AQR.....K.  
 E-2D<sup>b</sup> 1 P..M...ETA...E...Y.....HK...F.....YE...AP...Q.....E.QK..QQ..NF..S...N.L.....A.  
 HLA-B7 25 M...YTS...MA.....Q...F...AS...EE...AP...I...Q.....D.N.Q.Y.AQA.TD.ES..N.....A  
 RLA(11/11) 1 M...YTS...I.....Q...F...AS...HEQ.AP...QQVE...DQQ.Q...DTA.TF..W.N.ALA.....AA  
 Q8<sup>b</sup> 1 P...ETA...E...V...I.....Q...F...HE...AP...Q.....E.QK..QH.ESF..S...AQR.....K.  
 T1a<sup>c</sup> 1 YTAL...AIS..RY.A...L...Q.A.F..AG.TGTY.LSAPRV.Q.....A.E.E.VYSNA.FF.KM.Q.MLD...L.QM

Second (=2) domain

120 150 180  
 pARI.5 GSSTIQELSGQEVGSDGILLRQYEQPAYDGRDYIALHEDLETHAAADFAAGITANKLERDGEARLRATLEGEQVENLRRLYLSLREKTLRS  
 E-2K<sup>a</sup> 91 F..HF..D...RR...Q.....T...T...L...R.H.QA.D..YI.....GN...T  
 E-2D<sup>b</sup> 91 L.QM...DL...RR...L...E.....T...M...Q...R.H.QS.A..NYK.....E...KQNA...T  
 HLA-B7 115 L.SMT...D...F...R...E.D.Y...K.....RS.T...T...Q...QR.H.AAR..QR.....NG.DK.E.A  
 RLA(11/11) 90 P..THP...NA..RFFH..R.Y...A.....RS.T...T...QH.QR.H.AA...E...R.....NG...Q.A  
 RT1.1 1 .....F.....P.....C.....  
 Q8<sup>b</sup> 91 L.HNY..D...ER...L...E.....T...H...Q...LH.H.QA.I...D...A.QS...Q.....Q...A  
 T1a<sup>c</sup> 91 VMT...EFP.SLP.A...EG...Q.....T...M...E...S.H.QA.YT.LR.T...P.E.S.L...H...E.QECT

Third (=3) domain

210 240 270  
 pARI.5 EPPEKAVTLNSRFEGDVTLRCHALGFYPADIFLTHLLHGSDLTQDMLVETRPAGDGTQENASVYVPLGKEQNYTCVYHNEGLPEPLLRH  
 E-2K<sup>a</sup> 183 DS.....Y.P.SQV.....T...Q.....A.....E.K.....180  
 E-2D<sup>b</sup> 183 DS.....E.P.SE.E.....T...Q...E.....R.Y.....180  
 HLA-B7 207 D...T...E.PISDNEA...E.T...QRD...Q...T.....R...S.A...S.E.R...Q...E...G.  
 RLA(11/11) 182 D.....E.PASDREA...E.S...QRD...Q...T.....G...A...S.E.R...R.Q...T.  
 RT1.1 6 D.....F.....T...Q.....EA.....L.....180  
 RT1.2 1 .....L.....Q.....180  
 Q8<sup>b</sup> 183 D.....E.P.SY.A.....T...Q...E.....N.....180  
 T1a<sup>c</sup> 183 D...T...E.A...E.T...Q...ELI...T.....A...S.E.K...Y.....180

Transmembrane-cytoplasmic domain

300 330  
 pARI.5 EGPPSANSNTQMSVILQTVVAIIAVMAIIAAVAFIQPVYKRNIEKTAFLLTSGEGODYTFAPGRDSSQSSDYSLPDCKANKETAA  
 E-2K<sup>a</sup> 275 EL..PTV...---I.AVLVVLGA...VTG...VVAF.HKM.R-H---G...VM.AL...---T.L...G.V.  
 E-2D<sup>b</sup> 275 P...TD.Y---VAVLQVLGA...Q...V-AP.H.R-RNT---G...AL...---EM..R...  
 HLA-B7 298 ---SQ...-VPIV-.I..RP..L.VVVIQ.VVAA.HCR--SS---G...S.SQ.ACS..A.Q...  
 RLA(11/11) 274 ---QP-AL-IV--I-VAG.LGVLLIGAVVA...RE--NS---SD...R...A.GRRD.G.D...  
 RT1.2 38 PS..TD..METY..YVILQAV.II.AVII...-VVA..H..R-RNT---G...V.V.A...S...E...S...RQ  
 Q8<sup>b</sup> 275 P...TV..HANYA...-V.LV-.RPSLELNRIL

Slika 9. Usporedba aminokiselinskih sekvencija pARI.5 klon sa sekvencijama antigena klase I drugih sisavaca



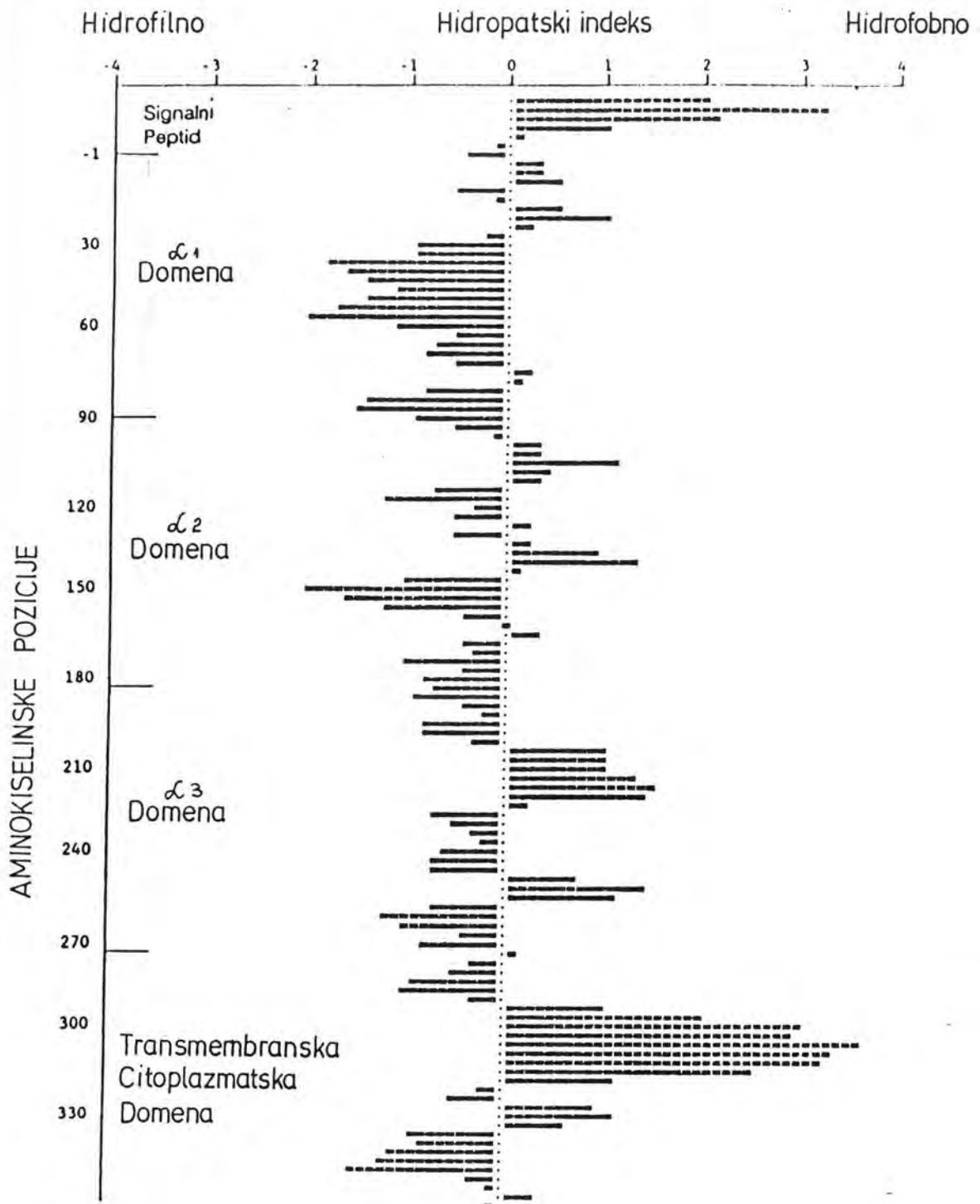
Opis slike 9. Aminokiselinske sekvencije pARI.5 proteina (140) uspoređene su po domenama s klasičnim transplantacijskim antigenima klase I miša H-2K<sup>d</sup> i H-2D<sup>b</sup> (94, 104, 102), čovjeka HLA-B7 (157) i zeca RLA 11/11 (172). Također su uspoređene sekvencije parcijalnih klonova štakora RT1.1 i RT1.2 (74) te Q8<sup>b</sup> i T1a<sup>c</sup> (29, 35) antigena. Svaka aminokiselina označena je jednim slovom. Točka (.) predstavlja identičnu aminokiselinu u uspoređivanim antigenima, dok crta (-) predstavlja višak aminokiselinske pozicije u pARI.5 antigenu. Na slici se može uočiti jaka konzerviranost  $\alpha_1$  i  $\alpha_2$  domena. Transmembranski-citoplazmatski dio pokazuje veliku šarolikost u broju i položaju aminokiselinskih sekvencija.

Ranije usporedbe (82) pokazale su da je u transmembranskom dijelu molekule više očuvan hidrofoban karakter nego aminokiselinska sekvencija. Tako su kompjuterskim programom baziranim na analizi Kyte i Doolittle 1981. (179) provjerene sekvencije pARI.5 molekule (Slika 10.). Jak hidrofoban karakter pokazuje signalni protein i transmembranski dio molekule kako se i očekivalo (35).

#### *4.2.3 Usporedba s parcijalnim štakorskim klonovima i antigenima klase I drugih sisavaca*

Sekvencije pARI.5 klona uspoređivane su na nivou nukleotidnih i aminokiselinskih sekvencija s antigenima klase I drugih sisavaca (Slika 9. i Tablica 2.). Molekule su uspoređene po domenama. Najveću homologiju pokazuje treća ekstracelularna domena: 89-93% na nivou nukleotidnih sekvencija i 85-87% na nivou aminokiselinskih sekvencija s mišjim antigenima (94, 144, 102, 35, 115, 29), 72-80% s humanim (157) i 74-82% s zečjim (172) antigenom klase I. Prva i druga domena pokazuju gotovo istovjetan postotak homologije s drugim antigenima. pARI.5 ne pokazuje razliku, bilo da se usporedi s mišjim klasičnim transplantacijskim antigenima ili Qa molekulama. Usporedba s mišjim Tla<sup>o</sup> antigenom (35) pokazuje nešto niži nivo homologije. Transmembranski i citoplazmatski dio teškog lanca ne posjeduju konzerviranu homologiju sekvencija, te se razlikuje 44-66% među uspoređivanim molekulama.

Homologija pARI.5 nukleotidnih i aminokiselinskih sekvencija, s do sada objavljenim štakorskim parcijalnim klonovima ne pokazuje bitnu razliku od mišjih antigena, čak je i razlika u transmembranskom - citoplazmatskom dijelu i dalje velika kao i u usporedbi s antigenima drugih sisavaca.



Slika 10. Hidropatska analiza pARI.5 izvedenog proteina

Opis slike 10. pARI.5 izvedeni proteini je analiziran programskom podrškom koja specificira hidrofobnost odnosno hidrofilnost pojedine aminokiseline proteina (179). Hidropatski indeks -4 predstavlja izrazito hidrofilne, a +4 izrazito hidrofobne aminokiseline. Na slici se vidi da signalni protein i transmembranska domena imaju hidrofobne sekvencije. Početak transmembranskog dijela je umjereno hidrofilan, ali ovaj dio pARI.5 je homologan s drugim antigenima klase I stanične membrane.

Tablica 2. Postotak homologije pARI.5 klona i različitih antigena klase I na nivou nukleotidnih i aminokiselinskih sekvencija

GSH klasa I sekvencije	Signalni peptid		1 Domena		2 Domena		3 Domena		Transmembranski citoplazmatski dio	
	Nuc	AA	Nuc	AA	Nuc	AA	Nuc	AA	Nuc	AA
H-2kd	88	85	83	73	85	78	92	87	54	38
H-2Db				71	83	71	93	87	54	46
HLA-B7	47	50	80	68	77	67	80	72	54	40
RLA (11/11)			78	62	77	67	82	74	52	34
RT1.1							95	92	48	
RT1.2							96		56	45
Q10b	88	90	83	72	83	74	93	89		
Q8b	73	50	83	70	83	74	93	89		
T1a <sup>c</sup>	63	50	71	51	74	61	89	85		

Nuc, homologija bazirana na nivou nukleotidnih sekvencija

AA, homologija bazirana na nivou amino acidnih sekvencija

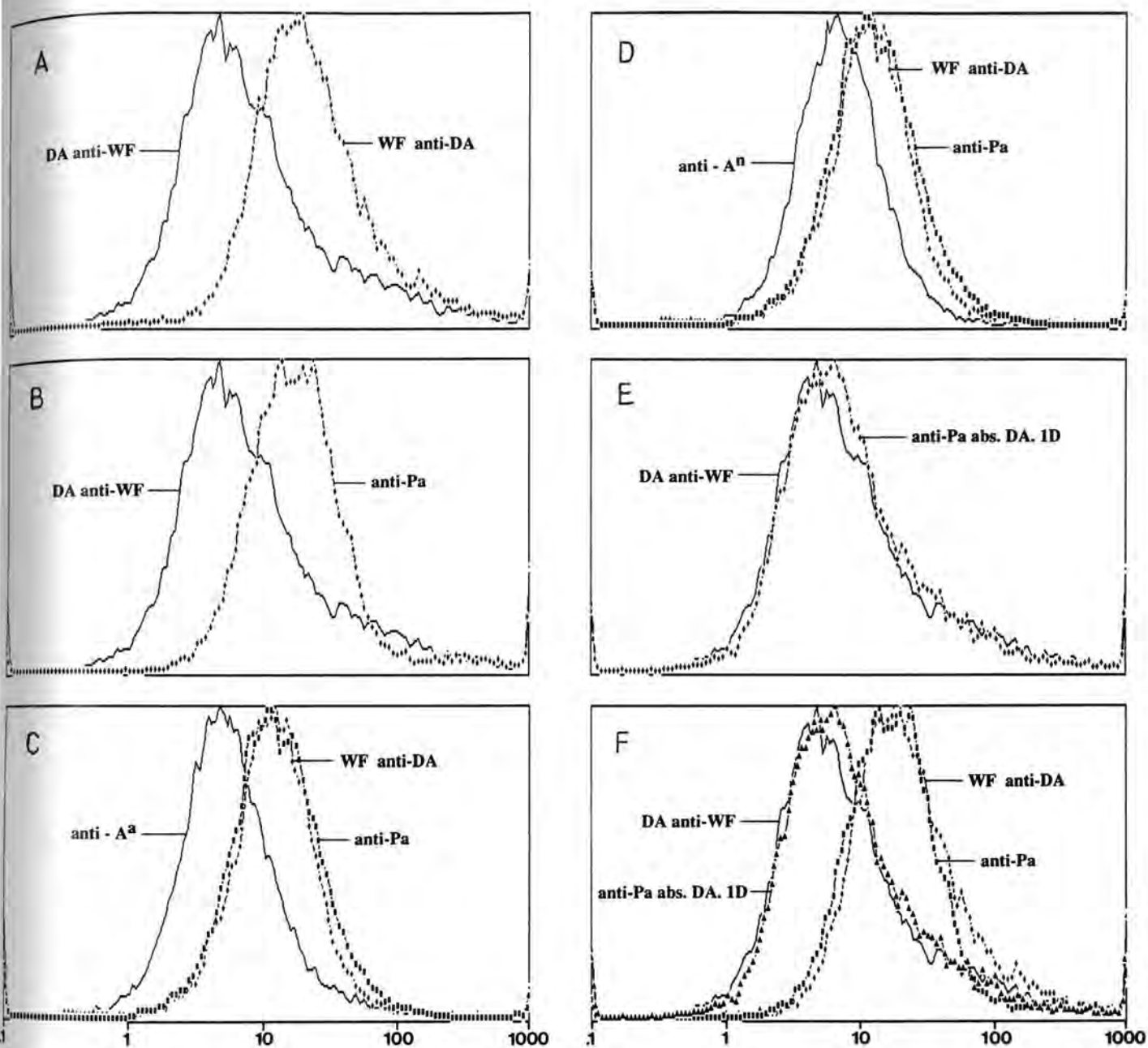
Podaci za izračunavanje postotka homologije su prikupljeni iz sljedeće literature: 94, 144, 157, 172, 115, 29 i 35. Q10<sup>b</sup> i Q8<sup>b</sup> te T1a<sup>c</sup> molekule nisu uspoređene u transmembranskom-citoplazmatskom dijelu, jer se radi o solubilnim molekulama, a ne antigenima stanične membrane. Objavljene sekvencije štakorskih klonova nisu potpune (74), pa ih je nemoguće usporediti u ekstracelularnim domenama.

## 4.3 CITOMETRIJSKA ANALIZA TRANSFORMIRANIH COS7 STANICA

Slika 11. pokazuje sažetak rezultata dobivenih bojanjem trajno transficiranih stanica pARI.5 insertom i pSV2neo virusom (3.5.3). Stanice su bojane metodom indirektno imunoflorescencije (3.5.4), te analizirane citometrijski. Ovom se metodom dobije 30 - 67 % COS7 stanica koje ispoljavaju štakorski antigen klase I na membrani. Monoklonska i poliklonska antitijela korištena u ovom radu, opisana su ranije (2.9). Transformirane stanice bojane anti-u aloserumom koji je u (WF x DA)F1 placenti maternalnog porijekla, pokazuje nivo florescencije kao i stanice bojane samo sekundarnim antitijelom, te 67% manje nego stanice bojane anti-a (Slika 11A) aloserumom. Slični se rezultati dobiju kada se stanice boje anti-Pa serumom (Slika 11B). Bojanje transformiranih stanica monospecifičnim pAt211 (anti-A<sup>a</sup>) i pAt42 (anti-A<sup>n</sup>) koje je upotrebjeno kao kontrolno poliklonsko antitijelo, pokazuju nizak nivo florescencije transformiranih stanica (Slika 11C i D).

Anti-Pa serum potom je absorbiran s limfocitima slezene DA.1D soja. Ovaj štakorski soj je Pa pozitivan i RT1.A<sup>d</sup> lokus specifičnosti (Tablica 1). Bojanje stanica absorbiranim anti-Pa serumom daje jednak bazični nivo florescencije kao i bojanje anti-u aloserumom (Slika 11E i F). Rezultati sličnog pokusa absorpcije prikazani su na Slici 12. Da bi se utvrdilo da li kotransficirane stanice reagiraju s anti-Pa specifičnim antitijelima u anti-a serumu, WF anti-DA serum absorbiran je s DA.1D limfocitima. Bojanje ovim serumom pokazuje i nivo bazižne florescencije.

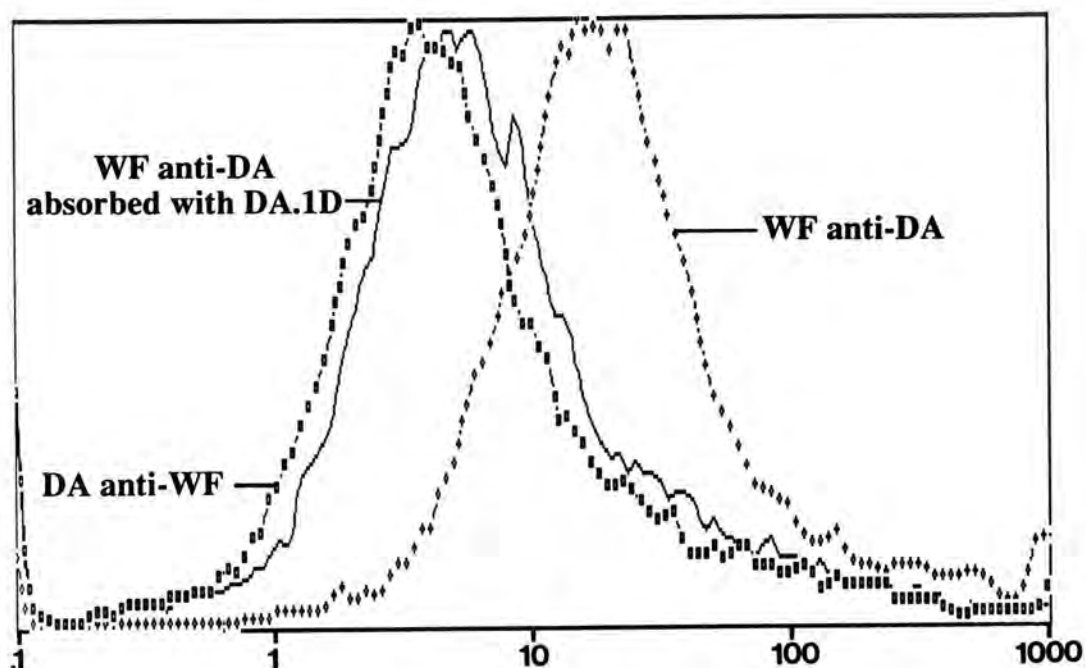
Metodom prolazne transfekcije dobije se znatno niži postotak pozitivnih stanica (11-30%)(95) u odnosu na negativnu kontrolu. Rezultati su prikazani na Tablici 3. Bojanje antitijelima: anti-u, pAt anti-A<sup>a</sup>, mAt211 (anti-A<sup>a</sup>) i pAt42 (anti-A<sup>n</sup>) je negativno i ne razlikuje se bitno od prirodne florescencije stanica ili bojanja samo sa sekundarnim antitijelom (kozji anti-štakorski F(ab)<sub>2</sub> označen floresceinom). Bojanjem stanica anti-a, anti-Pa i mAt381 (anti-Pa) dobije se znatno povećanje ukupne florescencije stanica.



Slika 11. Citometrijska analiza imunofluorescencije trajno transficiranih stanica

Kotransficirane COS7 stanice metodom indirektna imunofluorescencije bojane su različitim štakorskim antitjelima. Na apcisi je prikazan intenzitet fluorescencije (logaritamska skala) dok je na ordinati prikazan broj analiziranih stanica.





Slika 12. Citometrijska analiza trajno transficiranih stanica bojanih metodom indirektno imunofluorescencije WF anti-DA serumom absorbiranim s DA.1D limfocitima

Slika prikazuje rezultate bojanja kotransficiranih COS7 stanica WF anti-DA ( $\mu$  anti- $\alpha$ ) serumom, istim serumom absorbiranim DA.1D limfocitima i DA anti-WF ( $\alpha$  anti- $\mu$  serumom). Na apscisi je prikazan intenzitet fluorescencije (logaritamska skala), a na ordinati broj analiziranih stanica. Nakon absorpcije  $\mu$  anti- $\alpha$  seruma stanice pokazuju daleko niži intenzitet fluorescencije, gotovo identičan bojanju anti- $\mu$  serumom.

Tablica 3. Sumirani rezultati prolazne transfekcije COS7 stanica pARI.5:pcEXV3 hibridnom DNK

Antitijelo	RT1 specifičnost	Reaktivnost COS7:pARI.5
DA anti-WF	u	-
Wf anti-DA	a	+
(WFxDA)F1 anti-BN	A <sup>n</sup>	-
(MRxWKA)F1 anti-DA	A <sup>a</sup>	-
mAt211	A <sup>a</sup>	-
WfxDA serum trudnih ženki	Pa	+
mAt381	Pa	+

COS7 stanice su transficirane pARI.5 insertom kloniranim u pcEXV3 vektoru i metodom indirektno imunofluorescencije bojane različitim štakorskim antitijelima, a zatim analizirane citometrijski. Pozitivna fluorescencija dobije se u slučaju bojanja anti-Pa i anti-a antitijelima.

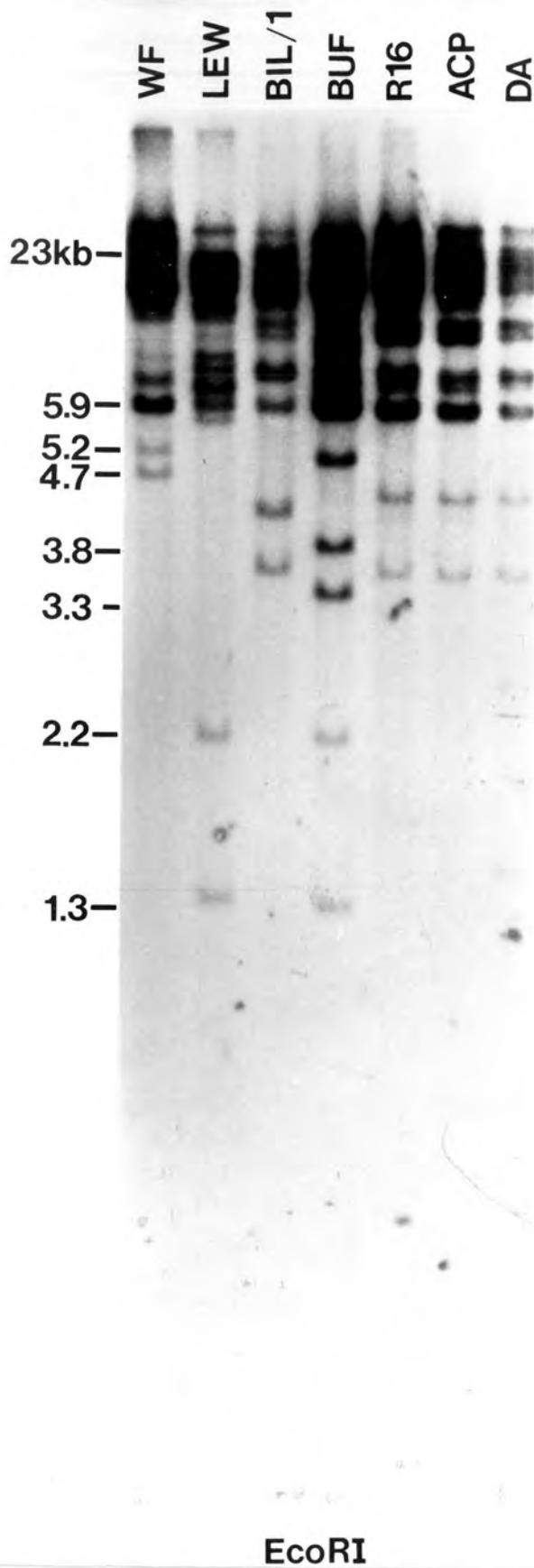
## 4.4 ANALIZA HIBRIDIZACIJE DNK ŠTAKORSKIH SOJEVA PROBAMA DOBIVENIM OD pARI.5 INSERTA

Genomska DNK štakorskih sojeva: DA, ACP, R16, BIL/1, BUF, LEW, YO i WF izložena je djelovanju restrikcijskih enzima EcoRI i XbaI. RT1 specifičnosti ovih sojeva prikazane su na Tablici 1. DNK restrikcijski fragmenti su separirani horizontalnom elektroforezom na 1% agarozu gelu i potom Southern blot tehnikom (158) transferirani na nitrocelulozne membrane. Membrane su hibridizirane probama 5'pARI.5a i 3'pARI.5a označenim radioaktivnim fosforom. Na Slikama 13. i 14. prikazani su rezultati hibridizacije pod uvjetima umjerene stringencije. Obje probe daju mnoštvo fragmenata i ne pokazuju ožekivanu lokus ili alel specifičnost. Polimorfizam dužine restrikcijskih fragmenata pokazuje sličnost DA, ACP, R16 i BIL/1 sojeva, te WF i YO sojeva štakora.

U radu s probama 5'pARI.5b i 3'pARI.5b korišteni su štakorski sojevi DA i WF. Hibridizacija i pranje filtera urađeno je po uvjetima jake stringencije (3.6.6). U ovoj hibridizaciji 5'pARI.5b probom dobije se jedinstven fragment visoke homologije u oba štakorska soja veličine 1.7 i 1.8 kb (Slika 15.). Isti fragment u ostalim sojevima može se vidjeti na Slici 14.

## 4.5 ANALIZA HIBRIDIZACIJE GENOMSKE DNK STANICA TRANSFORMIRANIH IN VITRO

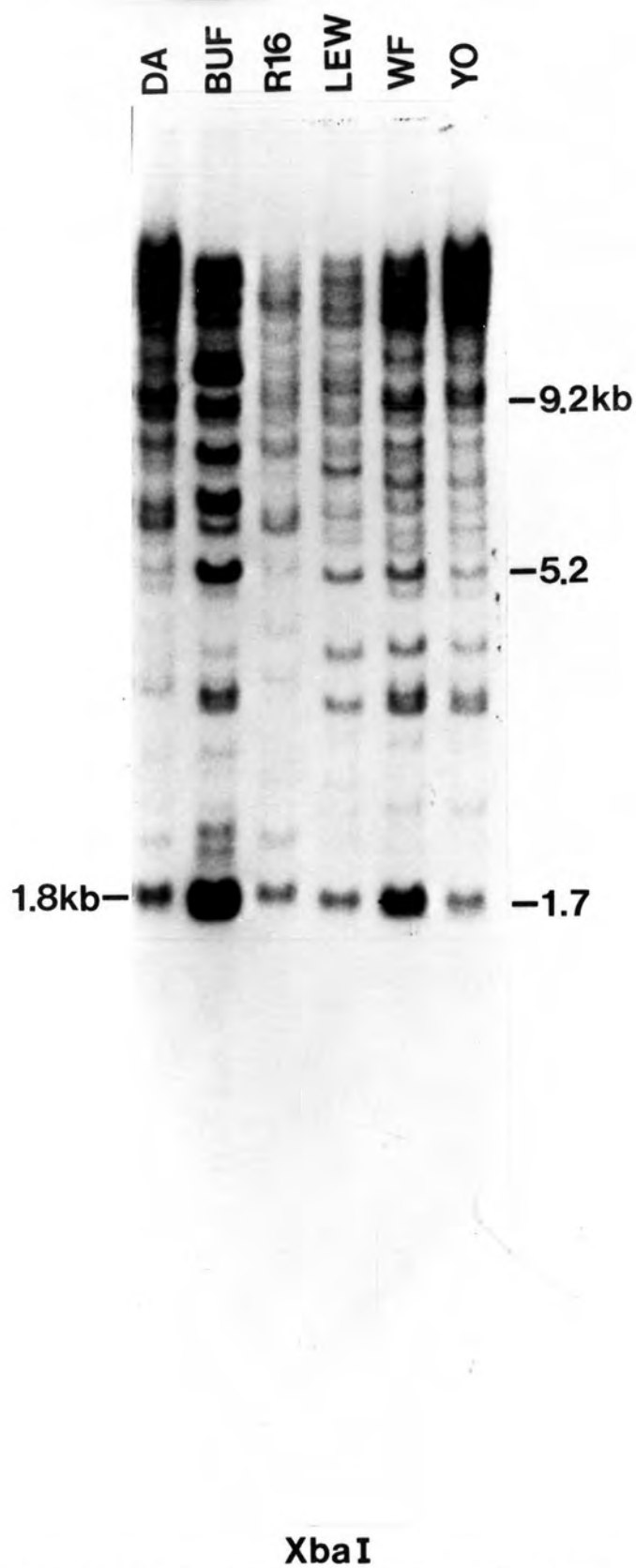
Genomska DNK izolirana je iz COS7 stanica kulture in vitro, transformiranih pARI.5:pCEXV3 hibridom i kotransficiranih s pSV2neo virusom. Hibridizacijski se signal dobije ukoliko je DNK kotransficiranih stanica tretirana XbaI endonukleazom (Slika 16.). Genomska DNK COS7 stanica koje su samo uzgajane u staničnoj kulturi upotrebljena je kao kontrolni uzorak i ne pokazuje specifičan signal hibridizacije (Slika 16.).



Slika 13. Hibridizacija *Eco*RI endonukleazom tretirane genomske DNK različitih štakorskih sojeva 3'pARI.5a probom

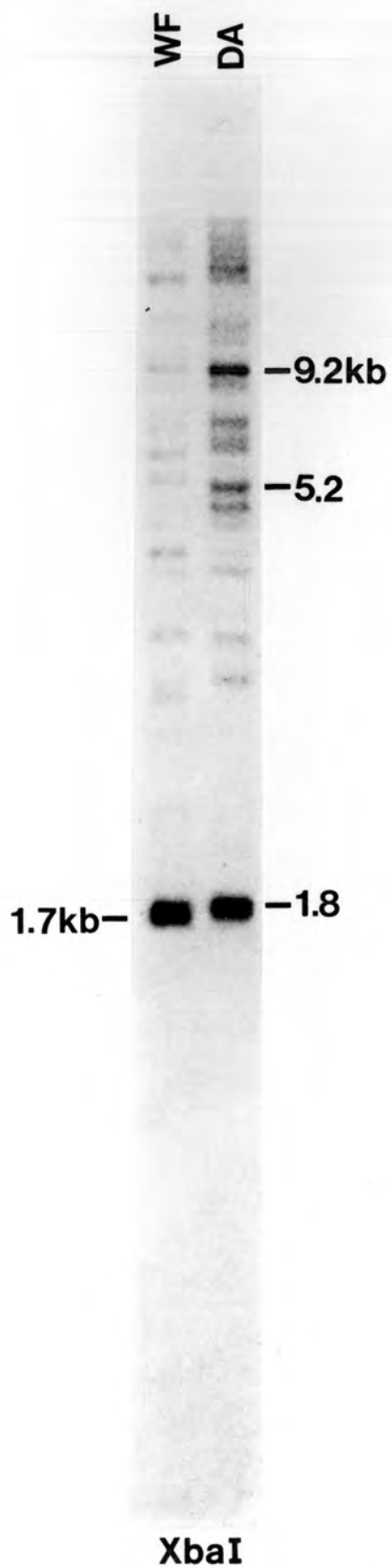
Opis slike 13. Sedam  $\mu\text{g}$  genomske DNK razgrađeno je EcoRI restrikcijskim enzimom. Upotrebljena je DNK sljedećih štakorskih sojeva: WF, LEW, BIL/1, BUF, R16, ACP i DA. Fragmenti su separirani na 1% agarozu gelu na 40 V 20 sati, te iza toga Southern blot tehnikom prebačeni na nitroceluloznu membranu. Membrana je hibridizirana 3'pARI.5a probom. Utvrđene su veličine hibridiziranih fragmenata u kilobazama. Proba hibridizira mnoštvo restrikcijskih fragmenata.





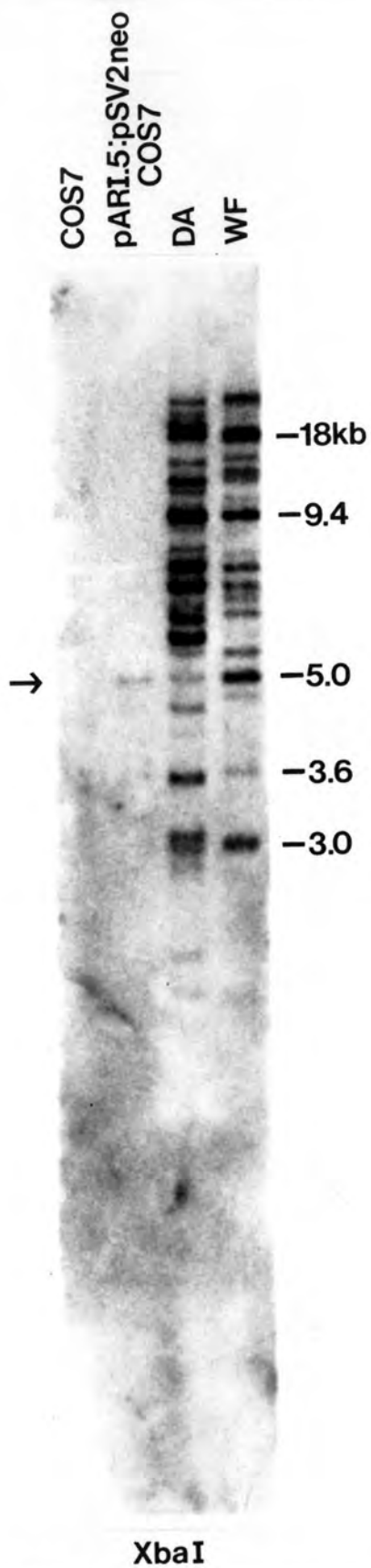
Slika 14. Hibridizacija XbaI endonukleazom tretirane genomske DNK različitih štakorskih sojeva 5'pARI.5a probom

Opis slike 14. Genomska DNK štakorskih sojeva: DA, BUF, R16, LEW, WF i YO razgrađena je XbaI restrikcijskom endonukleazom. Fragmenti su separirani na 1% agarozu gelu, Southern blotom fiksirani na nitroceluloznoj membrani koja je hibridizirana 5'pARI.5a probom. Utvrđene su veličine hibridiziranih restrikcijskih fragmenata prikazane na slici u kilobazama. Hibridizacija je urađena u uvjetima umjerene stringencije.



*Slika 15. XbaI digestija genomske DNK WF i DA štakorskih sojeva hibridizirana po uvjetima jake stringencije 5'pARI.5b probom*

Opis slike 15. Sedam  $\mu\text{g}$  genomske DNK, WF i DA štakorskih sojeva izložeo je djelovanju XbaI restriksijske endonukleaze. Fragmenti su separirani na 1% agarozu gelu. Urađen je transfer fragmenata na nitroceluloznu membranu koja je hibridizirana probom pARI.5b u uvjetima jake stringencije. Utvrđena je veličina specifičnih hibridizacijskih fragmenata u kilobazama.



**XbaI**

*Slika 16. Hibridizacija XbaI endonukleazom tretiranih genomskih DNK COS7 stanica, kotransficiranih stanica, WF i DA štakorskih sojeva 3'pARI.5b probom*



Opis slike 16. Sedam  $\mu\text{g}$  genomske DNK COS7 fibroblasta, COS7 stanica transficiranih metodom trajne transfekcije pARI.5 insertom, te DA i WF štakorskih sojeva razgrađeno je XbaI enzimom. Fragmenti su separirani na 1% agarozu gelu, te transferirani Southern blot tehnikom na nitroceluloznu membranu koja je hibridizirana 3'pARI.5b probom u uvjetima jake stringencije. Utvrđena je veličina hibridiziranih restrikcijskih fragmenata. Strelica pokazuje specifičan hibridizacijski fragment prisutan u DNK transficiranih stanica, WF i DA sojeva, a odsutan u COS7 stanicama koje nisu transficirane pARI.5:pcEXV3 hibridnom DNK.

## 5.0 RASPRAVA

Očuvanje trudnoće i preživljavanje fetalnog alografta još je uvijek enigma u imunologiji. Placenta se pridaje osnovna uloga, ali ostaje pitanje kako organ u kome dolazi do bliskog kontakta majčinih imunokompetentnih stanica sa semialogenim tkivom, ne pdliježe reakcijama odbacivanja. Zagonetka se čini još kompliciranijom u kontekstu opće prihvaćenih, pa i dokazanih saznanja da placenta ispoljava transplatacijske antigene paternalnog porijekla (72, 10), koji su potpuno strani majci i trebali bi izazvati jaku transplantacijsku reakciju odbacivanja. Karakter, ekspresija i kontrola ekspresije GSH antigena najvjerojatnije je vrlo važan faktor u očuvanju trudnoće.

U svrhu proučavanja ekspresije i strukture antigena klase I placente, klonovi kDNK knjižnice gena (aktivni geni placente) analizirani su mapiranjem restrikcijskih mjesta. Sekvencionirana su dva klona. pARI.3 insert sadrži kodirajuće regije za drugu i treću ekstracelularnu domenu te transmembranski-citoplazmatski dio antigena klase I. kDNK sintetizirana je u smjeru 3'-5' pomoću reverzne transkriptaze, od poli(A<sup>+</sup>) repa gRNK, a o dužini reakcije *in vitro*, zavisi koliko će biti sintetizirano prvog lanca kDNK na uzorku gRNK i do kuda će sinteza ići u 5' smjeru. Zbog toga kraći insert u knjižnici gena predstavlja uobičajnu tehničku teškoću i malo je vjerojatno da je pARI.3 splajsingom (engl. splicing) skraćen prepis gena klase I GSH u placenti. Postojale su indicacije u predhodnim radovima (167) da je placentarni prepis kraći od gRNK u jetri, ali je vrlo teško ponoviti ovakve rezultate. Također postoje indicacije da je protein klase I placente nešto manje relativne mase (33, 143). Relativna masa dvije molekule šećera iznosi 6000, što može biti pripisano razlici molekularne težine antigena membrane limfocita (44-46000 daltona) i molekula izoliranih iz placente (40-42000 daltona). Obrazloženje se također može naći u činjenici da ovakve molekule mogu pripadati grupi Qa/II antigena za koje se zna da su manje relativne mase (37, 156).

pARI.5 izoliran je iz najveće grupe kDNK knjižnice gena (140), što govori u prilog da je u placenti prisutno mnoštvo kopija gRNK i da (WFxDA)F1 u relativno većem obimu ispoljava ovaj gen od bilo kojeg drugog gena klase I. Imunohistokemijska bojanja su pokazala da su u ovoj placenti uglavnom prisutni Pa i A<sup>a</sup> antigeni (64, 72). pARI.5 insert predstavlja kompletnu kodirajuću regiju gena klase GSH. Insert počinje kodirajućim sekvencijama za aminokiselunu na poziciji -20 signalnog proteina antigena. Vodeći protein, u većini slučajeva sastoji se od dvadesetak aminokiselina (94, 157) pa je najvjerojatnije pARI.5 insert kraći za dvadesetak nukleotida 5'NR i start kodon ili kodon za aminokiselinu Metionin (AUG). Čitava molekula, bilo na nivou nuk-

leotidnih ili aminokiselinskih sekvencija, pokazuje veliku konzerviranost i sličnost s molekulama klase I drugih sisavaca (Slika 9. i Tablica 2.). Na temelju ranijih analiza i usporedbi među različitim vrstama (82), ovako visok stupanj homologije se i očekivao. Konzerviranost pozicija disulfidnih mostova i glikozilacijskih sekvencija (172, 154, 144, 102, 157) govori u prilog konzerviranosti tercijarne strukture antigena membrane za razliku o solubilnih molekula klase I.

pARI.5 izvedeni protein ima 357 aminokiselina i izračunatu relativnu masu 40054 bez signalnog proteina. Ukoliko se doda relativna masa dvije šećerne molekule, masa pARI.5 proteina odgovara masi klasičnog transplantacijskog antigena klase I. Izrazito hidrofoban transmembranski dio koji drži molekulu pričvršćenu za lipidnu membranu stanice također je karakteristika prisutna u pARI.5 izvedenom proteinu (Slika 10.).

Klasični transplantacijski antigeni miša uvijek imaju tri šećerne molekule (94, 144, 102) dok Qa antigeni imaju samo dva glikozilacijska mjesta. U štakora izgleda da to nije pravilo. pARI.5 ima dva glikozilacijska mjesta, a poznato je da klasični antigeni (npr. A<sup>d</sup>) imaju dvije šećerne molekule (119).

Sve ove karakteristike govore u prilog da pARI.5 kodira antigen stanične membrane. Iz tog razloga se išlo na ekspresiju gena u COS7 fibroblastima bubrega zelenog majmuna. Željelo se utvrditi da li je moguće ispoljiti protein na membrani, uz pomoć poliklonskih i monoklonskih antitijela utvrditi haplotip, odnosno alelnu specifičnost pARI.5 inserta. Ideja da se klon ispolji u obliku fuzionog proteina u bakterijskoj stanici odbačena je odmah na početku iz razloga što antigenost i detekcija molekule klase I antitijelima može uvelike ovisiti o posttranslacijskim procesima eukariotskih stanica, u ovom slučaju glikozilaciji (133, 119), vezivanju s drugim lancem  $\beta$  - 2mg (176, 150) i tercijarnoj strukturi (40).

U eksperimentima trajne i jednokratne ekspresije utvrđeno je da COS7 stanice transficirane s pARI.5 insertom specifično reagiraju s u anti-a serumom, Pa serumom i mAt381 (anti-Pa). Aloserum u anti-a uvijek sadrži anti-Pa antitijela. U isto vrijeme pAt211 i mAt211 (anti-A<sup>a</sup>) niti u jednom bojanju ne pokazuju porast florescencije.

U sljedećem eksperimentu, Pa serum je absorbiran s DA.1D (BDV) limfocitima s namjerom da se absorbiraju Pa antitijela, a u serumu da ostane samo anti-A<sup>a</sup> specifičnost ukoliko postoji. DA.1D limfociti su RT1.A<sup>d</sup> lokus specifični i ne reagiraju s monospecifičnim anti-A<sup>a</sup> antitijelima (49). Ovako absorbiran serum ne reagira s COS7 stanicama transformiranim pARI.5 insertom (Slika 11E.). Eksperiment absorpcije urađen je i u recipročnom smjeru: Pa serum absorbiran je s transficiranim COS7

stanicama, zatim je isti serum i u istom razređenju, prije absorpcije i poslije absorpcije korišten u bojanju DA limfocita. Ove stanice ne pokazuju specifičnu fluorescenciju kad su bojane s absorbiranim serumom. Stanice su također bojane absorbiranim anti- $\alpha$  serumom (Slika 12.). Ovime se izdvojila anti-Pa specifičnost iz seruma. Intenzitet fluorescencije odgovara intenzitetu bojanja negativnim serumima.

Eksperimentom absorpcije i pozitivnim bojanjem s mAt381 utvrđeno je da je pARI.5 insert kodirajuća regija za Pa antigen membrane stanica placente. Postotak pozitivnih stanica dobiven tehnikama jednokratne i trajne transfekcije je očekivan (10-30% za jednokratno i 30-70% za trajno transficirane stanice)(95). Same metode ne dozvoljavaju ispoljavanje transformiranog gena u svim stanicama. Iako su stanice u eksperimentima trajne transfekcije transformirane s 40 puta većom količinom vektora s pARI.5 insertom nego pSV2neo virusom, još uvijek dio stanica sadrži pSV2neo s genom rezistencije na Geneticin bez vektora sa štakorskim genom za antigen klase I. U selekcijskom mediju stanice "čuvaju" gen koji im omogućava preživljavanje, ali često, nakon dužeg rasta u kulturi, izbacuju gen koji nije neophodan za rast i diobu.

pARI.5 insert kloniran je u pcEXV3 vektor koji sadrži genetske elemente SV40 virusa i pBR322 plazmida (128, 117). Porijeklo pBR322 plazmida ima gen za rezistenciju na ampicilin, a dio SV40 virusa je promotor (engl. promotor), pojačivački element (engl. enhancer) i sekvencije neophodne u splajingu (engl. splicing). SV40 ima vrlo snažan promotor i pojačivač ekspresije, pa bi najvjerojatnije bilo koji gen pod kontrolom ovih elemenata morao imati vrlo velik broj kopija gRNK u stanici. Ekspresija pARI.5 gena u ovom slučaju ne bi trebala ovisiti o cis i trans kontrolnim sekvencijama odgovornim za ekspresiju gena klase I u sklopu GSH (75, 7, 60, 32). Osim toga, kDNK za razliku od genomske DNK, ne posjeduje vlastite elemente potrebne za ekspresiju ili splajsing, a također ni introne koji bi mogli sadržavati supresijske sekvencije.

Translacija, unutarstanični transport i glikozilacija donekle su univerzalni procesi u stanicama sisavaca, ali nivo ekspresije može uvelike ovisiti o vezivanju  $\alpha$  teškog lanca za laki lanac (150, 135, 176).  $\beta_2$ mg također je konzervirana molekula u sisavaca, slična u sekvencijama imunoglobulinu i trećoj ekstracelularnoj domeni proteina klase I s kojom se i vezuje u antigenima stanične membrane (40). Postoje indikacije da vrsta specifični  $\beta_2$ mg pomaže boljem transportu i ekspresiji antigena na staničnoj membrani (135). U eksperimentima ekspresije pokušalo se dodavati 1% normalnog štakorskog seruma u hranilišta stanicama u kulturi, pa se na taj način stanicama dodaje štakorski  $\beta_2$ mg. Nije se dobila bolja ekspresija štakorskog antigena klase I od uzoraka gdje su stanice uzgajane samo sa 10% fetalnog telećeg seruma (DMEM-10). Majmunski  $\beta_2$ mg



koji je ispoljen u COS7 stanicama, vezuje se za teški lanac štakorsog antigena klase I i omogućuje ekspresiju na površini stanica. Jednolančana molekula najvjerojatnije ne bi bila ispoljena na staničnoj membrani (100). Osim toga, vezivanje lanca za  $\beta_2$ mg daje antigenu klase I stabilnu strukturu (12, 13, 40) i "prepoznatljive" antigene determinante, koje u drugačijoj konfiguraciji molekule vjerojatno ne postoje.

5'pARI.5 proba je restrikcijski fragment dužine 270 nukleotida, dobiven duplom digestijom Aval i BamHI enzimima. Ova proba predstavlja dio kodirajuće regije kraja  $\alpha_1$  i početka  $\alpha_2$  domene. Ove sekvencije su hipervarijabilne i daju alelnu specifičnost transplantacijskim antigenima (82, 134). U uvjetima jake stringencije s probom se dobije specifičan hibridizacijski signal u Pa "+" sojevima (DA, ACP, R16, BUF) dužine 1,8 kb, a u Pa "-" (WF, YO, LEW) sojevima dužine 1,7 kb. Ovime je potvrđena korelacija pARI.5 inserta s Pa pozitivnim haplotipom (Slika 14. i 15.) i podacima dobivenim serološkim metodama (42, 43). Korelacija se ne može utvrditi niti sa jednim drugim do sada poznatim lokusom klase I. Sojevi odabrani za analizu, imaju različite lokuse klase I (Tablica 1.). Rekombinantni soj R16 je odabran jer se od DA soja razlikuje u grc-G/C regiji. Sojevi BUF (RT1.A<sup>b</sup>Pa<sup>a</sup>E) i LEW (RT1.A<sup>b</sup>Pa<sup>a</sup>F<sup>a</sup>) su odabrani da bi se hibridizacijskim polimorfizmom odijelili E i Pa lokusi i C/G regija. Restrikcijski fragment kod BUF soja isti je kao u Pa pozitivnim sojevima, dok LEW ima manji XbaI restrikcijski fragment kao i Pa negativni sojevi.

U uvjetima umjerene stringencije Pa probama (5'pARI.5a, 5'pARI.5b, 3'pARI.5a i 3'pARI.5b) dobije se mnoštvo hibridizacijskih fragmenata (Slika 13. i 14.), što govori u prilog da su Pa gen i antigen vrlo slični klasičnim transplantacijskim genima i antigenima klase I. U serološkim studijama utvrđeno je da je Pa antigen prisutan u mnogim štakorskim sojevima i ima zajedničke determinante s mnogim drugim antigenima klase I (42, 64), te ne može izazvati destruktivni imunološki odgovor s citotoksičnom reakcijom. Time je lako objasniti mnoštvo hibridiziranih restrikcijskih fragmenata dobivenih probama koje se u antigenima klase I čovjeka i miša smatraju alel (82) ili lokus specifične (143).

Vrlo važan zaključak koji se također može izvesti iz hibridizacijskog uzorka, je činjenica da Pa negativni sojevi također posjeduju Pa gen. Na Slici 15. može se vidjeti specifičan 5'pARI.5b probom hibridiziran restrikcijski fragment veličine 1,7 kb. Pa gen je u ovom slučaju neaktivan i ne posjeduje proteinski produkt, dok Pa pozitivni sojevi posjeduju aktivan gen. Aktivan gen daje specifičan XbaI restrikcijski fragment veličine 1,8 kb. Ovo ukazuje da je možda regulacija transkripcije odgovorna za različitu ekspresiju Pa antigena u placenti štakora.



Zahvaljujući konzerviranosti cisteinskih pozicija 101, 161, 203 i 259, glikozilacijskih mjesta na položaju Asparagin 86 i 256, te konzerviranosti broja i dužine domena, možemo također zaključiti da je tercijarna struktura proteina izvedenog iz pARI.5 sekvencija kDNK klona vrlo slična, ako ne istovjetna molekulama klase I drugih vrsta. Bazirajući tercijarnu strukturu antigena klase I GSH na strukturi HLA-A2 antigena (12, 13), rubovi žljeba štakorskog placentarnog antigena, dijelovi su molekule koja se uvelike razlikuje od ostalih antigena klase I (Slika 17.). Neke su aminokiseline ovog dijela molekule važne za vezivanje stranog antigena i/ili vezivanje s T staničnim receptorom (Tablica 4. i 5.) i većina različitih sekvencija nalazi se na mjestu navedenog vezivanja s antigenim proteinom sa smjerom prema udubini žljeba ili brazde. Većina specifičnih sekvencija pARI.5 proteina poklapa se s pozicijama aminokiselina koje se za sada smatraju važnim u citotoksičnom odgovoru (12, 13). HLA-A2 mutantne molekule s različitim amino-kiselinama na pozicijama 66, 152 i 156 u stanju su vezati sintetski virusni antigen, ali ne budu prepoznate od strane kompetentnih autolognih citotoksičnih T limfocita (114). Različite su aminokiseline na poziciji 9, koja se nalazi u dnu brazde, te na pozicijama 70 i 74 manje su važne za prepoznavanje od strane CTL.

Premda još uvijek nije potpuno jasno koje su sve aminokiselinske pozicije važne za spajanje s T staničnim receptorom i antigenim peptidom, promjene na pozicijama koje su u tercijarnoj strukturi orijentirane u smjeru gore i na stranu od žljeba, mogu utjecati na vezivanje s T staničnim receptorom, dok aminokiselinske pozicije u zljebu  $\alpha_1$  i  $\alpha_2$  domene, mogu utjecati na vezivanje antigena (12, 13). Promjene aminokiselina npr. na pozicijama 43 i 107, izvan brazde nemaju utjecaja na funkciju citotoksičnih T limfocita (114).

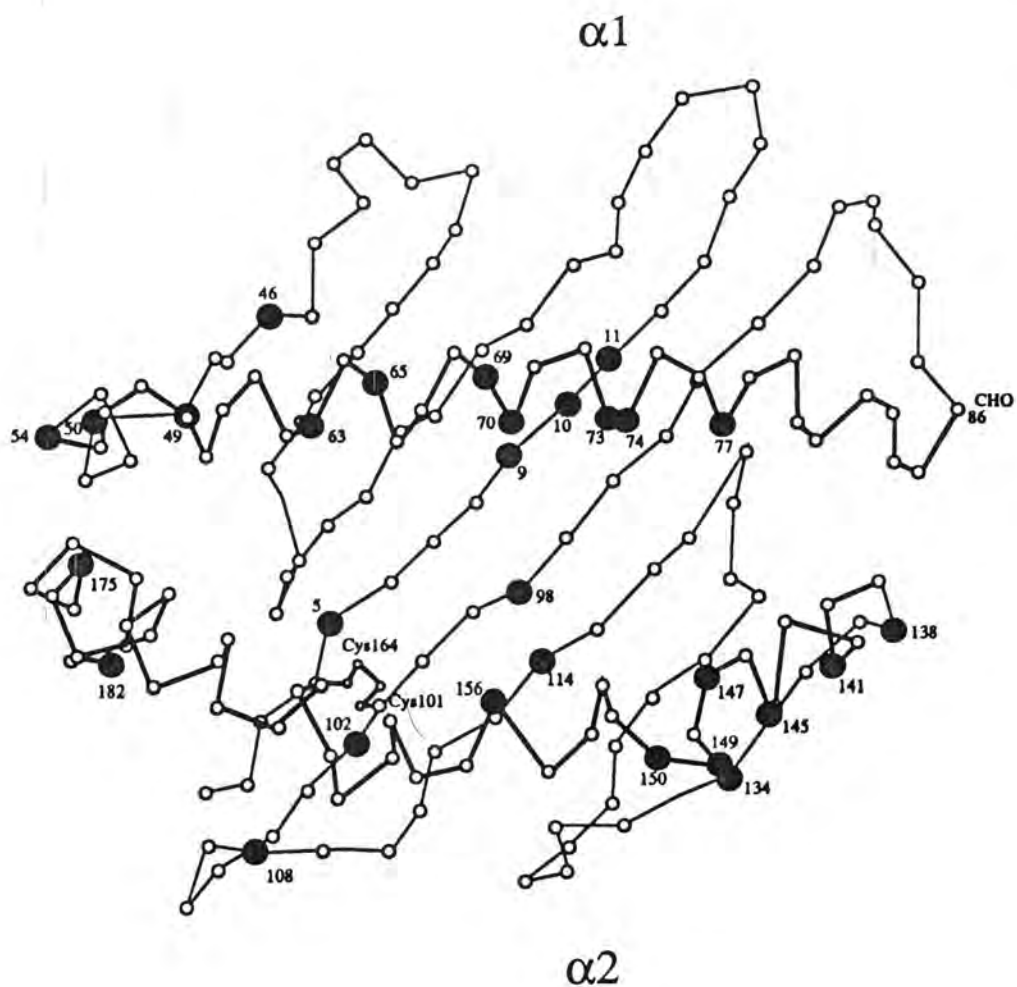
Treća vanstanična domena također igra ulogu u prepoznavanju i reaktivnosti CTL. Točkaste mutacije u  $\alpha_3$  domeni mogu smanjiti reaktivnost CTL (138). Postoje indikacije da i druge molekule, osim T staničnog receptora olak-šavaju kontakt s antigenom klase I ciljne stanice. CD8 molekula direktno vezuje HLA antigen klase I (126), dok je  $\alpha_3$  domena također uključena u Lyt-2 prepoznavanje u primarnom *in vitro* imunološkom odgovoru (25).

U  $\alpha_3$  domeni pARI.5 izvedenog proteina nalaze se četiri aminokiseline na pozicijama 183, 193, 214 i 218 specifične za ovaj protein. Iste pozicije zauzimaju gotovo istovjetne aminokiseline u transplantacijskim antigenima klase I miša (94, 144, 102), čovjeka (157) i zeca (172), Q8<sup>b</sup> i T1<sup>c</sup> molekulama (29, 35) (Slika 9.). Važno jer istaći da je ova razlika prisutna i u usporedbi sa štakorskom molekulom klase I koju je bilo moguće usporediti u ovoj regiji (74), te tako ove aminokiseline mogu biti karakteristika

placentarnog antigena.

Glavnina različitih aminokiselinskih pozicija u  $\alpha_1$  i  $\alpha_2$  domeni smještena je u varijabilnim regijama gdje se i očekuju razlike među alelima (82). Karakteristike antigenih determinanti koje prepoznaju aloreaktivne, visoko specifične T stanice i mehanizam kojim se postiže ova visoka specifičnost, su slabo razjašnjeni. Nije posve jasno koje dijelove molekule klase I GSH prepoznaju CTL i antitijela kao antigene determinante. Moguće je da su sve tri vanstanične domene uključene u specifično prepoznavanje citotoksičnih stanica (25), premda je već neosporno da su neke aminokiselinske pozicije imunodominantne u citotoksičnom prepoznavanju, kao npr. pozicije 63, 73 u  $\alpha_1$  i 152, 155, 156 u  $\alpha_2$  domeni (104). Ukratko, neke promjene aminokiselinskih pozicija ne izazivaju citotoksični odgovor jer su ukopane u središtu molekule ili ne mogu vezati T stanični receptor ili druge važne molekule na površini T limfocita. Istovremeno mutantne molekule klase I mogu izazvati produkciju antitijela.

Aminokiseline specifične za štakorski placentarni antigen klase I, po poziciji u terciarnoj strukturi, mogu biti podijeljene u tri grupe: 1) aminokiseline 5, 9, 10, 11, 98, 102 i 114 smještene u dnu  $\alpha_1/\alpha_2$  brazde; 2) aminokiseline 63, 65, 69, 70, 73, 74, 77 i 156 koje se nalaze na grebenima brazde; i 3) aminokiseline 46, 49, 50, 54, 108, 134, 138, 141, 145, 147, 149, 150, 175 i 182 smještene izvan mjesta prepoznavanja stranog antigena (Slika 17.). Neke od ovih pozicija već su opisane u HLA-A2 molekuli kao vrlo važne (pozicije 63, 156) ili manje važne (pozicije 9, 70) za vezivanje sa stranim antigenom (114). U štakorskom antigenu klase I specifične aminokiseline prve grupe najvjerojatnije nemaju utjecaja na citotoksičnost. Aminokiseline u drugoj grupi mogu biti odgo-vorne za lokus, a ne alelnu specifičnost Pa antigena. Hibridizacijom 5'pARI.5b probom dobije se jedinstven specifičan hibridizacijski fragment prisutan u svim ispitivanim sojevima što govori u prilog lokus specifičnosti ove regije. Kad se usporede molekule klase I različitih sisavaca, aminokiseline druge grupe predstavljaju regiju s najjačim polimorfizmom (82). U trećoj grupi većina različitih aminokiselina nalazi se na boku  $\alpha_2$  domene (pozicije: 134, 138, 141, 145, 147, 149 150), usmjerene suprotno od centra molekule prema otopini. Ove aminokiseline štakorskog proteina ne razlikuju se samo po sekvenciji od antigena drugih vrsta, već i po lokalizaciji polimorfizma u terciarnoj strukturi molekula klase I. Također je važno zamjetiti da imaju iste hidrofobne karakteristike kao i aminokiseline poda brazde gdje se veže antigeni peptid (Slika 18.) što sugerira da se radi o jednom drugom mjestu rezerviranom za vezivanje s proteinom, možda T staničnim receptorom ili bilo kojom drugom molekulom koja učestvuje u T limfocitnoj citotoksičnosti.



*Slika 17. Položaj aminokiselina specifičnih za pARI.5 antigen u tercijarnoj strukturi  $\alpha_1$  i  $\alpha_2$  domene molekule klase I*

Na slici je shematski prikazana tercijarna struktura  $\alpha_1$  i  $\alpha_2$  domena antigena klase I (12, 13). Punim točkama istaknute su specifične aminokiselinske pozicije u pARI.5 izvedenom proteinu.

Tablica 4. Aminokiselinske pozicije  $\alpha_1$  domene važne za vezivanje sa stranim antigenom i/ili T staničnim receptorom

Klasa I antigen	pARI.5	H2-K <sup>d</sup>	H2-D <sup>b</sup>	HLA-B7	Q10
5	L	M	M	M	M
7	Y	.	.	.	.
9	D	E	E	Y	E
22	F	.	Y	.	F
24	S	.	.	.	I
26	G	.	.	.	.
57	P	.	.	.	.
58	E	.	.	.	.
59	Y	.	.	.	.
61	E	.	.	D	.
62	R	E	.	.	.
63	I	Q	E	N	E
64	T	.	.	.	.
65	R	Q	Q	Q	Q
66	I	R	K	.	R
67	A	R	K	.	R
68	K	.	.	.	.
69	E	S	G	A	G
70	D	Q	Q	N	.
71	E	.	.	A	.
72	Q	.	.	.	.
73	I	W	W	T	S
74	Y	F	F	D	F
75	R	.	.	.	.
76	V	.	.	E	.
77	G	S	S	S	S
80	T	.	N	N	.
81	L	A	.	.	.
82	R	Q	L	.	.
84	Y	.	.	.	H

pARI.5 aminokiselinske sekvencije uspoređene su s istim pozicijama različitih antigena klase I (94, 144, 102, 157, 115) važnim za vezivanje stranog antigena i T staničnog receptora (12, 13). Aminokiseline su označene skraćenicom od jednog slova. Pozicije identične pARI.5 antigenu su označene točkom.

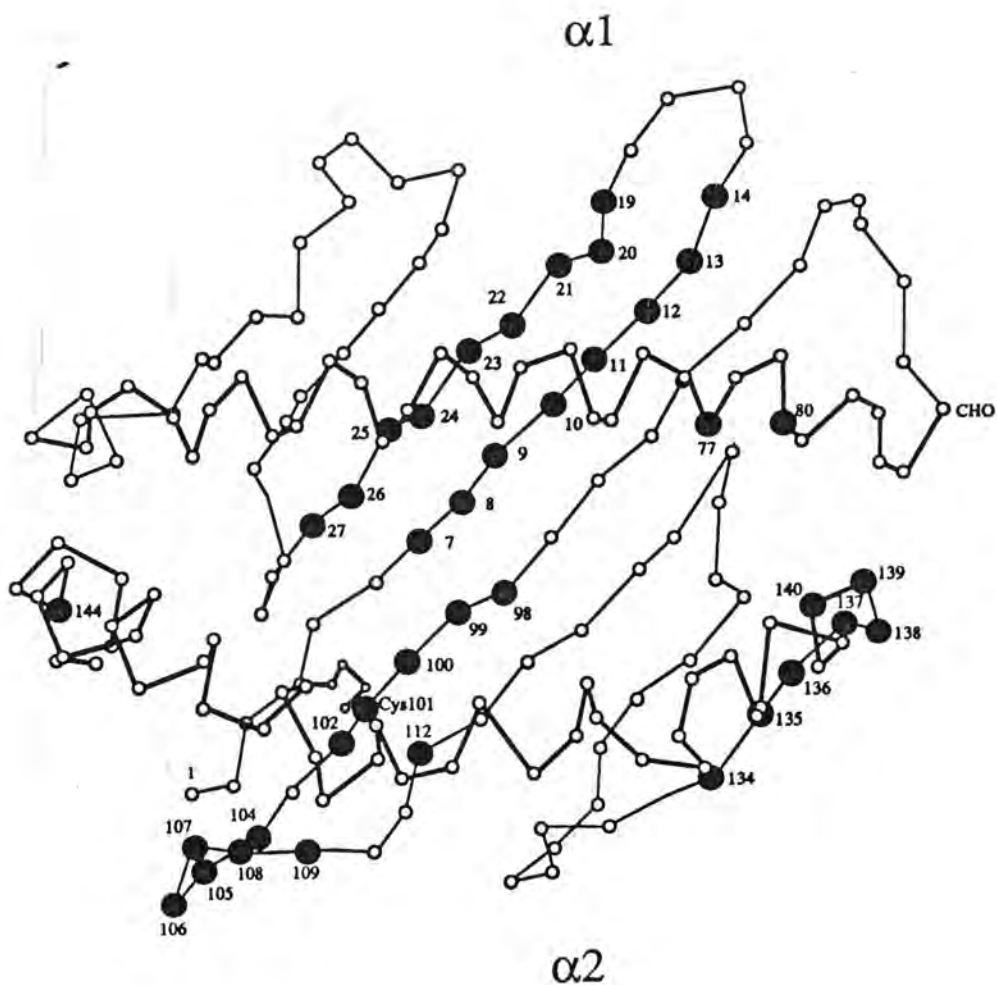
Tablica 5. Aminokiselinske pozicije  $\alpha_2$  domene važne za vezivanje sa stranim antigenom i/ili T staničnim receptorom

Klasa I antigen	pARI.5	H2-K <sup>d</sup>	H2-D <sup>b</sup>	HLA-B7	Q10
95	I	F	L	L	.
97	R	.	Q	S	W
99	S	F	.	Y	Y
114	E	L	Q	D	L
116	F	.	.	Y	Y
143	T	.	.	.	.
145	N	R	R	R	R
146	K	.	.	.	.
147	L	W	W	W	W
149	R	Q	Q	A	Q
150	D	A	S	A	A
151	G	.	.	R	.
152	E	D	A	.	A
154	E	.	.	.	.
155	R	Y	H	Q	Y
156	L	Y	Y	R	Y
157	R	.	K	.	.
158	A	.	.	.	.
159	Y	.	.	.	.
161	E	.	.	.	.
162	G	.	.	.	A
163	E	.	.	.	.
165	V	.	.	.	.
166	E	.	.	.	.
167	W	.	.	.	.
169	R	.	H	.	L
171	Y	.	.	.	.

pARI.5 aminokiselinske sekvencije usporedene su s istim pozicijama različitim antigena klase I (94, 144, 102, 157, 115) važnim za vezivanje stranog antigena i T staničnog receptora (12, 13). Aminokiseline su označene skraćunicom od jednog slova. Pozicije identične pARI.5 antigenu su označene točkom.



Radovi o analizi tercijarne strukture molekule klase I (12, 13, 114, 138) pokazali su da je dovoljno promijeniti jednu aminokiselinu na ključnoj poziciji pa da ne dođe do citotoksičnog odgovora. Možda razlike u strukturi jednog općeg placentarnog antigena i klasičnih transplantacijskih antigena klase I treba tražiti u točkastim mutacijama. Šteta što se zbog nedostatka objavljenih podataka sekvencije pARI.5 klona ne mogu usporediti s drugim štakorskim antigenima klase I poznate lokus i alel specifičnosti. Nedavno objavljene sekvencije parcijalnih klonova u haplotipa (123) pokazuju homologiju s pARI.5 insertom u 3' NR. Najveća homologija s već uspoređivanim parcijalnim štakorskim sekvencijama (74) pronađena je u istoj regiji, te je malo vjerojatno da je 3'NR lokus specifična regija za antigene klase I štakora. Hibridizacija 3'pARI.5a (Slika 13.) i 3'pARI.5b probama koje daju mnoštvo hibridizacijskih fragmenata samo potvrđuju ove zaključke. Čak se i u uvjetima jake stringencije 3'pARI.5b probom dobije mnoštvo hibridiziranih fragmenata što dokazuje da najmanje desetak gena ima gotovo istovjetne sekvencije ove regije kao i Pa gen.



*Slika 18. Položaj hidrofobnih aminokiselina pARI.5 antigena u terijarnoj strukturi  $\alpha_1$  i  $\alpha_2$  domene molekule klase I*

Na slici je shematski prikazana tercijarna struktura  $\alpha_1$  i  $\alpha_2$  domena antigena klase I (12, 13). Tamnim točkama istaknute su hidrofobne aminokiselinske pozicije pARI.5 proteina.

## 6.0 ZAKLJUČCI

1. pARI.5 insert je kodirajuća regija za Pa antigen u (WFXDA)F1 placenti.
2. pARI.5 pokazuje sve karakteristike prepisa gena klase I GSH.
3. Protein dobiven dedukcijom iz pARI.5 nukleotidnih sekvencija ima karakteristike membranskih antigena klase I u molekularnoj težini, broju glikozilacijskih mjesta, te cisteinskim pozicijama.
4. Nukleotidne i aminokiselinske sekvencije pARI.5 inserta pokazuju visoku homologiju s antigenima stanične membrane drugih sisavaca.
5. pARI.5 sekvencije pokazuju visok stupanj homologije s genima klase I različitih lokusa i različitih štakorskih sojeva.
6. Pa lokus prisutan je u svim ispitivanim štakorskim sojevima.
7. Pa pozitivni sojevi posjeduju XbaI restrikcijski fragment dužine 1,8 kb, dok Pa negativni sojevi pokazuju fragment dužine 1,7 kb u hibridizaciji 5'pARI.5b probom.

## 7.0 LITERATURA

1. ALBERTI S, and HERZENBERG L A 1988 DNA methylation prevents transfection of genes for specific surface antigens Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 : 839-8394.
2. ALWINE J C, KEMP D J, and STARK G R 1977 Method for deflection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl paper and hybridization with DNA probes Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5350-5354.
3. ARTZT K, McCORMIK P, and BENNETT D 1982a Gene mapping within the T/t complex of the mouse. I. t-Lethal genes are not allelic Cell 28: 463-470.
4. ARTZT K, SHIN H-S, and BENNETT D 1982a Gene mapping within the T/t complex of the mouse.II.Anomalous position of the H-2 complex in t-haplotypes Cell 28:471-76.
5. AWDEH Z L , RAUM D, YUNIS E J, and ALPER C A 1983 Extended HLA/complement allele haplotypes:Evidence for T/t-like complex in man Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 259-263.
6. BAILEY E 1986 Segregation distortion within the equine MHC; analogy to a mouse T/t complex trait Immunogenet. 24: 225-229.
7. BALDWIN A, and SHARP P 1986 Binding of a nuclear factor to a regulatory sequence in the promoter of the mouse H-2Kb class I major histocompatibility gene Mol. Cell Bio. 7: 305- 312.
8. BENNETT D 1975 The T-locus of the mouse Cell 6:441-454.
9. BENNETT D 1981 T/t locus, its role in embryogenesis and its relation to classical histocompatibility systems Prog. Allergy 29: 35-42.
10. BILLINGTON W D, and BURROWS F J 1986 The rat placenta expresses paternal class I major histocompatibility antigens J. of Reprod. Immunol. 9: 155-160.

11. BIRNBOIM H C, and DOLY J 1979 A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA Nucl. Aci. Res. 7:1513- 1523.
12. BJORKMAN P J, SAPER M A, SAMRANI B, BENNETT W S, STROMINGER J L, and WILEY D C 1987a Structure of the human class I histocompatibility antigen HLA-A2 Nature 329: 506- 512.
13. BJORKMAN P J, SAPER M A, SAMRANI B, BENNETT W S, STROMINGER J L, and WILEY D C 1987b the foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens Nature 329:512-518.
14. BLANKENHORN E P, and CRAMER D V 1985 Orientation of the loci encoding RT1.B polypeptides in the major histocompatibility complex of the rat Immunogenetics 21: 135-142.
15. BLANKENHORN E P, SYMINGTON F W, and CRAMER D V 1983 Biochemical characterization of Ia antigens encoded by the RT1.B and RT1.D loci in the rat MHC Immunogenetics 17: 475-484.
16. BLIN N, and STAFFORD D W 1976 Isolation of high-molecular-weight DNA Nucl. Aci. Res. 3: 2303-2308.
17. BONNER T I, BRENNER D J, NEUFELD B R, and BRITTEN R J 1973 Reduction in rate of DNA reassociation by sequence divergence J. Mol. Biol. 81: 123-135.
18. BRAMI C J, SANYAL M K, DWYER J M, JOHNSON C C, KOHORN E I, and NSFTOLIN F 1983 HLA-DR antigen on human trophoblast Am. J. Reprod. Immunol. 3: 165-169.
19. BURKE P A, HIRSCHFELD S, SHIRAYOSHI Y, KASIK J W, HAMADA K, APPELLA E, and OZATO K 1989 Developmental and tissue-specific expression of nuclear proteins that bind the regulatory element of the major histocompatibility complex class I gene J. Exp. Med. 169: 1309-1321.
20. BUCHER G W, and HOWARD J C 1977 A recombinant in the major histocompatibility complex of the rat Nature 266:362- 364.

21. CASEY J, and DAVISON N 1977 Rates of formation and thermal stabilities of RNA:DNA and DNA:DNA duplexes at high concentration of formamide Nucl.Acids Res. 4: 1539-1552.
22. CHATTERFEE-HASRUINI S, and LALA P K 1981 MHC antigens on mouse trophoblast cells: paucity of Ia antigens despite the presence of H-2K and D J. Immunol. 127: 2070-2073.
23. CIANETTI L, TESTA U, SCOTTO L, LaVALLE R, SIMONE A, BOCCOLI G, GIANNELLA G, PESCHLE C, and BONICINELLI E 1989 Three new class I HLA alleles: structure of mRNAs and alternative mechanisms of processing Immunogenetics 29: 80-91.
24. COLLINS T, LAPIERRE L A, FIERS W, STROMINGER J L, and POBER J S 1986 Recombinant human tumor necrosis factor increases mRNA levels and surface expression of HLA.A.B antigens in vascular endothelial cells and dermal fibroblasts in vitro Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 446-450.
25. CONNOLLY J M, POTTER T A, WORMSTALL E M, and HANSEN T H 1988 The Lyt-2 molecule recognizes residues in the class I  $\alpha 3$  domain in allogeneic cytotoxic T cell responses J. Exp. Med. 168: 325-341.
26. CORTESE HASSETT A L, STRANICK K S, LOCKER J, KUNZ H W, and GILL T J III 1986 Molecular analysis of the rat MHC: I. Delineation of the major regions in the MHC and in the grc J. Immunol. 137: 373-378.
27. CORTESE HASSETT A L, LOCKER J, RUPP G, KUNZ H W, and GILL T J III 1989 Molecular analysis of the rat MHC: II. Isolation of genes that map to RT1.E-grc region J. Immunol. 142: 2089-2096.
28. CRAMER D V, DAVIS B K, SHONNARD J W, STARK O, GILL T J III 1978 Phenotypes of the major histocompatibility complex in wild rats of different geographic origins J. Immunol. 120: 179-187.
29. DEVLIN J J, WEISS E H, PAULSON M, and FLAVELL R A 1985 Duplicated gene pairs and alleles of class I genes in the Qa2 region of the murine major histocompatibility complex: a comparison EMBO J. 4: 3203-3207.
30. DOVE W F, and DAVIDSON N 1962 Cation effects on the denaturation of DNA J. Mol. Biol. 5:467- 471.



31. DRESCHER C K, JARGRELLO P, GILL T J III, and KUNZ H W 1980 Analysis of the giemsa-banding patterns of the chromosomes from rats carrying the genes of the growth and reproduction complex (grc) *J. Immunogenet.* 7: 427-430.
32. EHRICH R, SHARROW S O, MAGUIRE J E, and SINGER S D 1989 Expression of a class I MHC transgene: effects of in vitro  $\alpha/\beta$ -interferon treatment *Immunogenetics* 30: 18-26.
33. ELLIS S A, SARGENT I L, REDMAN C W G, and McMICHAEL 1986 Evidence for a novel HLA antigen found on human extravillous trophoblast and choriocarcinoma cell line *Immunology* 59: 595-601.
34. FELLOUS M, NIR U, WALLACK D, MERLIN D, RUBINSTEIN M, and REVEL M 1982 Interferon-dependent induction of mRNA for the major histocompatibility antigens in human fibroblast and lymphoid cells *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 3082-3086.
35. FISHER D A, HUNT S W III, and HOOD L 1985 Structure of a gene encoding a murine thymus leukemia antigen and organization of the genes in BALB/c mouse *J. Exp. Med.* 162: 528-545.
36. FITZGERALD M, and SHENK T 1981 The sequence 5'-AAUAAA-3' forms part of the recognition site for polyadenylation of late SV40 mRNAs *Cell* 24: 251-260.
37. FLAHERTY L 1981 The I-E region antigens. U: The role of the major histocompatibility complex in immunology. M.E. Dor ed. Garland STPM Press, New York 33-57.
38. FLAHERTY L, DIBIASE K, LYNES M, SEIDMAN J G, WEINBERGER O, T and RINCHIK E M 1986 Characterization of a Q subregion gene in the murine major histocompatibility complex *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 1502-1507.
39. FLAVELL R A, ALLEN H, BURKY L C, SHERMAN D H, WANECK G L, and WIDERA G 1984 Molecular biology of the H-2 histocompatibility complex *Science* 221: 437-445.

40. FRASER J D, ALLEN H, FLAVELL R A, and STROMINGER J L 1987 Cell-surface expression of H-2<sup>b</sup> requires N-linked glycans *Immunogenetics* 26:31-35.
41. FRISCHAUF A-M 1985 The T/t complex of the mouse *Trends Genet.* 1: 100-112.
42. GHANI A M, GILL T J III, KUNZ H W, and MISRA D N 1984a Elicitation of the maternal antibody response to the fetus by a broadly shared MHC class I antigenic determinant *Transplantation* 37: 187-194.
43. GHANI A M, KUNZ H W, and GILL T J III 1984b Pregnancy-induced monoclonal antibody response to a unique fetal antigen *Transplantation* 37: 503-506.
44. GILL T J III, and KUNZ H W 1979 Gene complex controlling growth and fertility linked to the major histocompatibility complex of the rat *Am. J. Path.* 96: 185-206.
45. GILL T J III, KUNZ H W, SCHAID D J, VADERBERG J L, and STOLC V 1982 orientation of loci in the major histocompatibility complex of the rat and its comparison to man and the mouse *J. Immunogenet* 9: 281-293.
46. GILL T J III, CRAMER D V, KUNZ H W, and MISRA D N 1983a Structure and function of the major histocompatibility complex of the rat *J. Immunogenet.* 10: 261- 273.
47. GILL T J III, SIEW S, and KUNZ H W 1983b Major histocompatibility complex (MHC)-linked genes affecting development *J. Exp. Zool.* 228: 325- 345.
48. GILL TJ III 1984 The borderland of embryogenesis and carcinogenesis. Major histocompatibility complex-linked genes affecting development and their relationship to the development of cancer *B.B.A* 738, 93.
49. GILL T J III, KUNZ H W, MISRA D N, and CORTESE HASSETT A L 1987 The major histocompatibility complex of the rat *Transplantation* 43: 773-785.
50. GLUZMAN Y 1981 SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants *Cell* 23: 175-182.

51. GOLUBIC M, FIGUEROA F, TOSI M, and KLEIN J 1984 Restriction fragment length polymorphism of C4 genes in mice with t chromosomes Immunogenetics 21: 247-256.
52. GOTZE D, NADEAU J, WAKELAND E K, BERRY R J, BONHOMME F, EGOROV I K, HJORTH J P, HOOSTRAAL H, VIVES J, WINKING H, and KLEIN J 1980 Histocompatibility-2 system in wild mice. X. Frequencies of H-2 and Ia antigens in wild mice from Europe and Africa J. Immunol. 124: 2675-2681.
53. GRAHAM F L, and VAN DER EB A J, 1973 A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA Virology 52:456- 466.
54. GREINER D L, GILL T J III, KUNZ H W, and GAY V L 1980 Reproductive endocrine profile of a strain of rats which exhibits aspermatogenesis and reduced growth Biol. Reprod. 23: 564-569.
55. GUNTHER E, and WURST W 1984 Cytotoxic T lymphocytes of the rat are predominantly restricted by RT1.C determined major histocompatibility class I antigens Immunogenetics. 20: 1-12.
56. GUNTHER E, WURST W, WONIGEIT K, and EPPLEN J T 1985 Analysis of the rat major histocompatibility system by Southern blot hybridization J. Immunol. 134:1257- 1261.
57. HAMMERLING G J, MAUVE G, GOLDBERG E, and McDEVITT H O 1975 Tissue distribution of Ia antigens: Ia on spermatozoa, macrophages, and epidermal cells Immunogenetics 1:428- 437.
58. HANAHAN D, and MESELSON M 1983 U: Methodes in Enzymology 100: Wu et al. eds. Academic Press NY 333-363.
59. HARRIS H W, and GILL T J III 1986 Expression of class I transplant antigens Transplantation 42: 109-117.
60. HARRIS H W, KUNZ H W, and GILL T J III 1987 Trans-acting regulatory genes influence class I antigen expression Transpl. Proc. 19:222.

61. HAUSTEIN D, STOCK W, and GUNTHER E 1982 Rat major histocompatibility RT1.C antigens of restricted tissue distribution consist of two polypeptide chains with molecular weights of about 42,000 and 12,500 Immunogenetics 15: 271- 277.
62. HERRMANN B, BUCAN M, MAINS P E, FRISCHAUF A-M, SILVER L M, and LEHRACH H 1986 Genetic analysis of the proximal portion of the t complex: evidence for a second inversion within t haplotypes Cell 44: 469-474.
63. HIRTH K, EDWARDS C A, and FIRTEL R A 1982 A DNA-mediated transformation system for Dictyostelium Discoideum Proc. Natl. Acad. Sci.USA 79: 7356-7359.
64. HO N H, MACPHERSON T A, KUNZ H W, and GILL T J III 1987 Ontogeny of expression of the Pa and A<sup>a</sup> antigens on the rat placenta and on fetal tissues Am. J. Reprod. Immunol. 13: 51-61.
65. HOOD L, STEINMETZ M, and MALISSEN B 1983 Genes of the major histocompatibility complex of the mouse Ann. Rev. immunol. 1: 529 - 534.
66. HUNT J S, FISHBACK J L, ANDREWS G K, and WOOD G W 1988 Expression of class I HLA genes by trophoblast cells. Analysis by in situ hybridization J. Immunol. 140: 1293- 1299.
67. INOMATA T, KUNZ H W, and GILL T J III 1986 Immunogenetics analysis of rat strains with recombinations in different regions of the MHC Immunogenetics 23:133- 136.
68. INOMATA T, KUNZ H W, and GILL T J III 1987 The rat Tla-region alloantigens (RT1.G) Transpl. Proc. 19: 2993-2994.
69. JEFFREYS A J, and HARRIS S 1984 Pseudogenes Bio. Essays. 1: 253-263.
70. JELLEY J V 1958 Cerenkov radiation and its applications U: London, Pergamon Press 304.
71. JIMENEZ A, and DAVIES J 1980 Expression of a transposable antibiotic resistance element in Saccharomyces Nature 287: 869-871.

72. KANBOUR A, HO N H, MISRA D N, MACPHERSON T A, KUNZ H W, and GILL T J III 1987 Differential expression of MHC class I antigens on the placenta of the rat. A mechanism for the survival of the fetal allograft J. Exp. Med 166: 1861-1882.
73. KASIK J, WAN Y, and OZATO K 1987 A burst of c-fos gene expression in the mouse occurs at birth Mol. Cell Bio. 9: 3349 - 3352.
74. KASTERN W 1985 Characterization of two class I major histocompatibility rat cDNA clones, one of wich contains a premature termination codon Gene 34: 227-233.
75. KIMURA A, ISRAEL A, LE BAIL O, and KOURILSKY P 1985 Detailed analysis of the mouse H-2K<sup>b</sup> promoter. Enhancer-like sequences and their role in the regulation of class I gene expression Cell 44: 261-263.
76. KLEIN J 1975 Biology of the mouse histocompatibility complex Berlin Springer Verlag.
77. KLEIN J, and HAMMERBERG C, 1977 The control of differentiation by the T complex Immunol. Rev. 33: 70-93.
78. KLEIN J 1979 The major histocompatibility complex of the mouse Science 203: 516-523.
79. KLEIN J ,FIGUEROA F, and KLEIN D 1982 H-2 haplotypes, genes, and antigen: second listing. I.Non H-2 loci on chromosome 17 Immu nogenetics 16: 285-317.
80. KLEIN J, SIPOS P, and FIGUEROA F 1984 Polymorphism of t-complex genes in European wild mice Genet. Res. 44: 39-46.
81. KLEIN J, and FIGUEROA F 1986a Evolution of the major histocompatibility complex CRC Crit. Rev. Immunol. 6: 295-231.
82. KLEIN J, FIGUEROA F 1986b The evolution of class I MHC genes Immunol-ogy today 7: 41-44.



83. KOHUTOVA M, GUNTHER E, and STARK O 1980 Genetic definition of a further gene region and identification of at least three different histocompatibility genes in the rat major histocompatibility system *Immunogenetics* 11: 483-490.
84. KOLLER B H, and ORR H T 1985 Cloning and complete sequence of an HLA-A2 gene: Analysis of two HLA-A alleles at the nucleotide level *J. Immunol.* 134: 2727-2733.
85. KOLLER B H, GERATHY D E, DEMARS R, DUVICK L, RICH S S, and ORR H T 1989 Chromosomal organization of the human major histocompatibility complex class I gene family *J. Exp. Med.* 169:469-480.
86. KORMAN A J, BOSS J M, SPIES T, SORRENTINO R, OKADA K, and STROMINGER J L 1985 Genetic complexity and expression of human class II histocompatibility antigens *Immunol. Rev.* 85: 45-48.
87. KRANGEL M S 1986 Secretion of HLA-A and HLA-B antigens via an alternative RNA splicing pathway *J. Exp. Med.* 163:1173-1190.
88. KUNNATH L, and LOCKER J 1982 Variable methylation of the ribosomal RNA genes of the rat *Nucleic Acids Res.* 10:3877-3892.
89. KUNZ H W, GILL T J III, DIXON B, SHONNARD J W, DAVIS B K, and HANSEN C T 1977 Genetic and immunological characterization of naturally occurring recombinant B3 rats *Immunogenetics* 5: 271-283.
90. KUNZ H W, CRAMER D V, GILL T J III, COFFMAN K P, DAVIS B K, SHONNARD J W 1979 Studies on the RT1, RT1 and RT1 haplotypes of the major histocompatibility complex in the rat *Transplant. Proc.* 11: 1557-1562.
91. KUNZ H W, GILL T J III, DIXON B D, TAYLOR F H, and GREINER D L 1980 Growth and reproduction complex in the rat: genes linked to the major histocompatibility complex that affect development *J. Exp. Med.* 152:1506-1518.
92. KUNZ H W, GILL T J III, LIEBERT M, and KATZ S 1981 Gene order in the major histocompatibility complex in the rat *Immunogenetics* 13: 371-379.



93. KUNZ H W, GILL T J III, and MISRA D N 1982 The identification and mapping of a second class I locus in the major histocompatibility complex of the rat. *J. Immunol.* 128: 402-408.
94. LALANNE J-L, COCHET M, KUMMER A-M, GACHELIN G, and KOURILSKY P 1983 Different exon-intron organization at the 5' part of a mouse class I gene is used to generate a novel H-2KCD\*related mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 7561-7565.
95. LECHLER R, NORCROSS M, and GERMAIN R 1985 Qualitative and quantitative studies of antigen-presenting cell function using I-A-expressing L cells. *J. Immunol.* 135:2914- 2922.
96. LE GUERN C, MARCHE P N, and KINDT T J 1985 Molecular evidence for five distinct MHC class II genes in the rabbit. *Immunogenetics* 22:141-148.
97. LINDOLFI N F, RICH R R, and COOK R 1985 Differential glycosylation requirements for the cell surface expression of class I molecules. *J. Immunol.* 134: 423-430.
98. LOBEL S A, and CRAMER D V 1981 Demonstration of a new genetic locus in the major histocompatibility system of the rat. *Immunogenetics* 13: 465-473.
99. LOPATA M, CLEVELAND D, and SOLLNER W 1984 High level transient expression of a chloramphenicol acetyl transferase gene by DEAE-dextran mediated DNA transfection coupled with dimethyl sulfoxide or glycerol shock treatment. *Nucleic Acids Res.* 12: 5707-5717.
100. MACPHERSON T A, HO N H, KUNZ H W, and GILL T J III 1986 Localization of the Pa antigen on the placenta of the rat. *Transplantation* 41: 392-394.
101. MALISSEN M, MALISSEN B, and JORDAN B R 1982 Exon/intron organization and complete nucleotide sequence of an HLA gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:893- 897.

102. MALOY W L, and COLIGAN J E 1982 Primary structure of the H- 2D alloantigen II. Additional amino acid sequence information localization of a third site of glycosylation and evidence for K and D region specific sequence *Immunogenetics* 16: 11-22.
103. MANIATIS T, FRITSCH E F, and SAMBROOK J 1982 *Molecular cloning: laboratory manual* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
104. MANN D W, McLAUGHLIN\* TAYLOR E, WALLANCE R B, and FORMAN J 1988 An immunodominant epitope present in multiple class I MHC molecules and recognized by cytotoxic T lymphocytes *J. Exp. Med.* 168: 307-324.
105. MARMUR J, and DOTY P 1962 Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature *J. Mol. Biol.* 5: 109-114.
106. MAXAM A M, and GILBERT W 1977 A new method for sequencing DNA *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:560- 564.
107. MAXAM A M, and GILBERT W 1980 Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages *U: Methodes in enzymology* L. Grossman and K. Moldave eds. 65: 499-559.
108. McCONAUGHY B L, LAIRD C D, and McCARTY B J 1969 Nucleic acid reassociation in formamide *Biochemistry* 3: 3289-3295.
109. McCLUSKEY J, BOYD L F, MALOY W L, COLIGAN J E, and MARGULIES D H 1986 Alternative processing of H-2<sup>d</sup> pre-mRNAs results in membrane expression of differentially phosphorylated protein products *EMBO J.* 5: 2477-2483.
110. McDEVITT H O 1981 The role of H-2 I-region genes in the regulation of the immune response *J. Immunogenet.* 8: 287-295.

111. McGUIRE K L, DUNCAN W R, and TUCKER P W 1985 Syrian hamster DNA shows limited polymorphism at class I-like loci *Immunogenetics* 22:257-268.
112. McINTYRE J A , and FAULK W P 1982 Allotypic trophoblast-lymphocyte reactive (TLX) cell surface antigens *Hum. Immunol.* 4: 27- 30.
113. McINTYRE J A , FAULK W P, VERHULST S J, and COLLIVER J A 1983 Human trophoblast-lymphocyte cross-reactive (TLX) antigens define a new alloantigenic system *Science* 222: 1135-1137.
114. McMICHAEL A J, GOTCH F M, SNTOS-AGUADO J, and STROMINGER J L 1988 Effect of mutation and variations of HLA-A2 on recognition of a virus peptide epitope by cytotoxic T lymphocyte *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 9194-9198.
115. MELLOR A L, WEIS E H, KRESS M, JAY G, and FLAVELL R A 1984 A nonpolymorphic class I gene in the murine major histocompatibility complex *Cell* 36: 139-144.
116. MICHAELSON J, FLAHERTY L, HUTCHINSON B, and YUDKOWITZ H 1982 Qa-2 does not display structural genetic polymorphism detectable on isoelectric-focusing gels *Immunogenetics* 16: 363-366.
117. MILLER J, and GERMAIN R N 1986 Efficient cell surface expression of class II MHC molecules in the absence of associated invariant chain *J. Exp. Med.* 164: 1478-1489.
118. MISRA D N, KUNZ H W, and GILL T J III 1985 Analysis of class I MHC antigens in the rat by monoclonal antibodies *J. Immunol.* 134: 2520-2528.
119. MISRA D N, KUNZ H W, and GILL T J III 1987 Carbohydrate moieties of rat MHC class I antigens *Immunogenetics* 26:204- 210.
120. MIYAZAKI J T, APPELLA E, and OZATO K 1986a Intracellular transport blockage caused by disruption of the disulfide bridge in the third external domain of the major histocompatibility complex class I antigen *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:757- 761.

121. MIYAZAKI J T, APPELLA E, ZHAO H, FORMAN J, and OZATO K 1986b Expression and function of a nonglycosylated major histocompatibility class I antigen J. Exp. Med. 163: 856-871.
122. MORITA T, DELABRE, KRESS M, KOURILSKY P, and GACHELIN G 1985 An H-2K gene of the t<sup>w32</sup> mutant at the T/t complex is a parent of an H-2C gene Immunogenetics 21: 367-385.
123. MAUXION F, SABCZAK J, and KRESS M 1989 Characterization of five distinct cDNA clones encoding for class I RT1 antigens Immunogenetics 29:397-401.
124. NATORI T, FUJIMOTO Y, IKEDA H, ISHIIAWA N, ISHIKURA, MATSUNO Y, TSUCHIMOTO S, MIZUNO K, NIIYAMA T, CRAMER D, and AIZAWZ M 1985 The RT1.B/D-region product defined by rat monoclonal alloantibodies Immunogenetics 22:511-516.
125. NIZETIC D, FIGUEROA F, and KLEIN J 1984 Evolutionary relation ships between the t and H-2 haplotypes in the house mouse Immunogenetics 19:311-320.
126. NORMET A M, SALTER R D, PARHAM P, ENGELHARD V H, and LITTMAN D R 1988 Cell-cell adhesion mediated by CD8 and MHC class I molecules Nature 336:79-81.
127. OIKAWA T, YOSHIDA M C, SATOH H, YAMASHINA K, SASAKI M, and KABA YASHI H 1983 Provisional chromosome assignment of the rat major histocompatibility complex Jap. J. Genet. 11:127-132.
128. OKAYAMA H, and BERG P 1983 A cDNA cloning vector that permits expression of cDNA insert in mammalian cells Mol. Cell Biol. 3:280-289.
129. ORR H T, BACH F H, PLEOGH H L, STROMINGER J L, KARATHOS P, and DEMARS R 1982 Use of HLA loss mutants to analyze the structure of the human major histocompatibility complex Nature 296: 453-456.
130. OUDEJANS C B M, KRIMPENFORT P, PLOEGH H L, and MEYER C J L M 1989 Lack of expression of HLA-B27 gene in transgenic mouse trophoblast. Conservd genetic pressures underlying extra- embryonic development J. Exp. Med. 169:447-456.

131. OZATO K, WAN Y, and ORRISON B 1985 Mouse major histocompatibility class I expression begins at midsomite stage and is inducible in earlier stage embryos by interferon Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 2427-2431.
132. PALMER J, WETTSTEIN P J, and FRELINGER J A 1983 Evidence for extensive polymorphism of class I genes in the rat major histocompatibility complex (RT1) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:7616-7620.
133. PARHAM P, ALPERT B N, ORR H T, and STROMINGER J L 1977 Carbohydrate moiety of HLA antigens: antigenic properties and amino acid sequences around the site of glycosylation J. Biol. Chem. 252:7555-7567.
134. PARHAM P, LAWLOR D A, LOMER C E, and ENNIS P D 1989 Diversity and diversification of HLA-A,B,C alleles J. Immunol. 142:3937-3950.
135. PERARNAU B M, GILLET A C, HAKEM R, BARAD M, and LEMONNIER F A 1988 Human  $\beta_2$ -microglobulin specifically enhances cell-surface expression of HLA class I molecules in transfected murine cells J. Immunol. 141: 1383-1389.
136. PHILIPSEN M, and KRISTENSEN B 1985 Preliminary evidence of segregation distortion in SLA system Anim. Blood Groups Biochem. Genet. 16: 125-129.
137. PLOEGH H L, ORR H T, and STROMINGER J L 1981 Major histocompatibility antigens: the human (HLA-A,-B,-C) and murine (H-2K, H-2D) class I molecules Cell 24:287-299.
138. POTTER T A, BLUESTONE J A, and RAJAN T V 1987 A simple amino acid substitution in the  $\alpha_3$  domain of an H-2 class I molecules abrogates reactivity with CTL J. Exp. Med. 166:956-966.
139. RADOJČIĆ A, STRANICK K, KUNZ H W, and GILL T J III 1989a DNA sequence analysis of a class I clone from a rat cDNA placental library Transpl. Proc. 21:557-558.
140. RADOJČIĆ A, STRANICK K S, LOCKER J, KUNZ H W, and GILL T J III 1989b Nucleotide sequence of a rat class I cDNA clone Immunogenetics 29:134-137.



141. RAGHUPATHY R, SINGH B, LEIGH J B, and WEGMANN T G 1981 The ontogeny and turnover kinetics of paternal H-2K antigenic determinants on the allogeneic murine placentas *J. Immunol.* 127: 2074-2079.
142. RAO K N, SHINOZUKA H, KUNZ H W, and GILL T J III 1984 Enhanced susceptibility to a chemical carcinogen in rats carrying MHC-linked genes influencing development (*grc*) *Int. J. Cancer* 34: 113-118.
143. REDMAN C W G, TING A, McMICHAEL A, STIRRAL G M, SUNDERLAND C A, and TING A 1984 Class I major histocompatibility complex antigens on human extravillous trophoblast *Immunology* 52: 457-468.
144. REYES A A, SCHOLD M, and WALLACE R B 1982 The complete amino acid sequence of the murine transplantation antigen H-2D<sup>b</sup> as deduced by molecular cloning *Immunogenetics* 16: 1-9.
145. SACHS D J, and CONE J L 1975 Ir-associated murine alloantigens: demonstration of multiple Ia specificities in H-2 alloantisera after selective absorptions *J. Immunol.* 114: 165-169.
146. SAMOLLO P B, VANDE BERG J L, FORD A L, KUNZ H W, GILL T J III 1986 Genetic analysis of liver neuraminidase isozymes in *Rattus norvegicus*: independent control of Neu-1 and Neu-2 phenotypes *Genetics* 114: 247-258.
147. SANGER F, NICKLEN S, AND COULSON A R 1977 DNA sequencing with chain-terminating inhibitors *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.
148. SATZ M L, WANG L-C, SINGER D S, and RUDIHOFF S 1985 Structure and expression of two porcine genomic clones encoding class I MHC antigens *J. Immunol.* 135:2167-2175.
149. SCHUNRMAN R K, VAN ROOD J J, VOSSSEN J M, SCHELLEKENS P T A, KELTKANY-VROOM T M, DOYER E, GMELING-MEYLING F, and VISSER H K A 1979 Failure of lymphocyte-membrane HLA-A and -B expression in two siblings with combined immunodeficiency *Clin. Immunol. Immunopathol.* 14: 418-434.
150. SEGE K, RASK L, and PETERSON P A 1981 Role of  $\beta_2$ -microglobulin in the intracellular processing of HLA antigens *Biochemistry* 20: 4523-4530.



151. SHEARER G M, d SCHMITT-VERHULST A M 1977 Major histocompatibility complex restricted cell-mediated immunity *Adv. Immunol.* 25: 55-57.
152. SHIMIZU Y, KOLLER B, GERGHTY D, ORR H, SHAW S, KAVATHAS P, and DEMARS R 1986 Transfer of cloned human class I major histocompatibility complex genes into HLA mutant human lymphoblastoid cells *Molecular and Cellular Biology* 6: 1074-1087.
153. SHIN H-S, FLAHERTY L, ARTZT K, BENNETT D, and RAVETCH J 1984 Inversion in the H-2 complex of t-haplotype in mice *Nature* 306: 380-383.
154. SHREFFLER D 1982 Histocompatibility antigens, structure and function: receptors on recognition eds. Parham P, and Strominger J. Chapman and Hall, New York Ser. B 14-187.
155. SILVER L M 1981 Genetic organization of the mouse t complex *Cell* 27:239-240.
156. SOLOSKI M J, VERNACHIO J, EINHORN G, and LATTIMORE A 1986 Biosynthesis and secretion of Qa-2 molecules in activated cells *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 2949-2953.
157. SSOD A K, PAN J, BIRO P A, PEREIRA D, SRIVASTAVA R, REDDY V B, DUCEMAN B W, and WEISSMAN S M 1985 Structure and polymorphism of class I MHC antigen mRNA *Immunogenetics* 22: 101-121.
158. SOUTHERN E 1975 Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.
159. SOUTHERN P J, and BERG P 1982 Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter *J. Mol. Appl. Gene.* 1: 327-341.
160. SPANDIDOS D A, and WILKIE N M 1984 Expression of exogenous DNA in mammalian cells. *Transcription and translation* IRL Press 1-38.
161. STARK O, GUNTER E, KOHOUTOVA M, and VOJCIK L 1977 Genetic recombination in the major histocompatibility complex (H-I, Ag-B) of the rat *Immunogenetics* 5: 183-187.

162. STEINMETZ M, MOORE K W, FRELINGER J G, SHER B T, SHEN F-W, BOYSE E A, and HOOD L 1981a A pseudogene homologous to mouse transplantation antigens: Transplantation antigens are encoded by eight exons that correlate with protein domains *Cell* 25:683-692.
163. STEINMETZ M, FRELINGER J G, FISHER D, HUNKAPILLAR T, PEREIRA D, WEISSMAN S M, UEHARA H, NATHENSON S, and HOOD L 1981b Three cDNA clones encoding mouse transplantation antigens: homology to immunoglobulin genes *Cell* 24: 125-134.
164. STEINMETZ M, WINOTO A, MINARD K, and HOOD L 1982 Clusters of genes encoding mouse transplantation antigens *Cell* 28:489-498.
165. STOCK W, and GUNTHER E 1982 Serologic and cellular characterization of products of a new major histocompatibility gene region, RT1.C of the rat: possible homology to mouse H-2 Qa *J. Immunol.* 128:1923-1928.
166. STOLC V, KUNZ H W, and GILL T J III 1980 The linkage of glyoxy lase-I to the major histocompatibility complex in the rat *J. Immunol.* 125:1167-1170.
167. STRANICK K S, HO N-H, MACPHERSON T A, LOCKER J, KUNZ H W, and GILL T J III 1986 Regulation of the maternal-fetal response by trophoblast antigen expression U: *Reproductive Immunol.* D. A. Clark and B. A. Croy eds. Elsevier pub.: 45-52.
168. SUDERLAND C A, NAIEM N, MASON D Y, REDMAN C W G, and STIRRAT G 1981 The expression of major histocompatibility antigens by human chorionic villi *J. Reprod. Immunol.* 3:323-326.
169. TAYLOR SHER B, NAIRN R, COLIGAN J E, and HOOD L E 1985 DNA sequence of the mouse H-2D<sup>d</sup> transplantation antigen gene *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:1175-1179.
170. TEWARSON S, ZALESKA-RUTCZYNSKA Z, FIRUEROA F, and KLEIN J 1983 Polymorphism of Qa and Tla loci of the mouse *Tissue Antigens* 22:204-214.
171. TOURAINE J L, and BETHUEL H 1981 Immunodeficiency disease and expression of HLA antigens *Hum. Immunol.* 2:147-153.

172. TYKOCINSKI M L, MARCHE P N, MAX E E, and KINDT T J 1984 Rabbit class I MHC genes: cDNA clones define full-length transcripts of an expressed gene and a putative pseudogene *J. Immunol.* 133: 2261-2265.
173. UHR J W, CAPRA J D, VITETTA E S, and COOK R G 1979 Organization of the immune response genes *Science* 206: 292-310.
174. WATTERS J W F, LOCKER J D, KUNZ H W, and GILL T J III 1987 Polymorphism and mapping of the class II genes in the rat: RT1.B, RT1.D, and RT1.H a new DP-like region *Immunogenetics* 26: 220-229.
175. WIGLER M, PELLICER A, SILVERSTEIN S, T AXEL R, URLAUB G, and CHASIN L 1979 DNA mediated transfer of the adenine phosphoribosyl transferase locus into mammalian cells *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:1373-1378.
176. WILLIAMS D B, BARBER B H, FLAVELL R A, and ALLEN H 1989 Role of  $\beta_2$ -microglobulin in the intracellular transport and surface expression of murine class I histocompatibility molecules *J. Immunol.* 142: 2796-2806.
177. WONIGEIT K, SCHWINZER R, INOMATA T, KUNZ H W, and GILL T J III 1987 Reactivity of a monoclonal antibody directed against RT1.E<sup>u</sup> with recombinations defining the RT1.C<sup>u</sup> region *Trans plant. Proc.* 19: 3006-3007.
178. ZINKERNAGEL R M, and DOHERTY P C 1980 MHC-restricted cytotoxic T cells: studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigens determining T-cell restriction-specificity, function and responsiveness *Adv. Immunol.* 27:51-56.
179. KYTE J, and DOOLITTLE R F 1982 A simple method of displaying hydrophobic character of protein *J. Mol. Biol.* 157: 105-132.

# PRILOZI

*LISTA SKRAĆENICA OD TRI I JEDNOG SLOVA ZA ESENCIJALNE AMINO KISELINE*

Ala, A - alanin  
arg, R - arginin  
Asn, N - asparagin  
Asp, D - aspartična kiselina  
Cys, C - cistein  
Gln, Q - glutamin  
Glu, E - glutaminska kiselina  
Gly, G - glicin  
His, H - histidin  
Ile, I - isoleucin  
Leu, L - leucin  
Lys, K - lizin  
Met, M - metionin  
Phe, F - fenilalanin  
Pro, P - prolin  
Ser, S - serin  
Thr, t - treonin  
Trp, W - triptofan  
Tyr, Y - tirozin  
Val, V - valin



# BIOGRAFIJA

Rođena sam u Ogulinu 28. kolovoza 1958. godine. Osnovnu školu i gimnaziju završila sam u Rijeci i u lipnju 1983. godine diplomirala studij Opće medicine na Medicinskom fakultetu u Rijeci. 1983 - 1984. sam radila kao liječnik stažista u Kliničkom bolničkom centru u Rijeci, a 1984 - 1985. kao asistent pripravnik u Zavodu za Biologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci. Od 1985. do aprila 1987. godinu radila sam kao liječnik - stručni suradnik u nastavi u istom Zavodu. Od maja 1987. godinu radim u Zavodu za patologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta Pittsburgh, USA kao znanstveni suradnik.

1984. godine upisala sam postdiplomski studij na Medicinskom fakultetu u Rijeci iz Opće kliničke patofiziologije, smjer Klinička Imunologija, a 1986 drugi postdiplomski studij iz Medicinske genetike na Medicinskom fakultetu u Zagrebu.

Magistarski rad "Citogenetska i imunološka analiza obitelji s Robertsonovom translokacijom" obranila sam u travnju 1987.godine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta "Vladimir Bakarić" u Rijeci.

Do sada sam aktivno učestvovala na kongresima u zemlji, u SAD, te internacionalnim kongresima humane genetike (Berlin, 1986.), imunologije (Berlin, 1989), te američkog i Internacionalnog udruženja imunologa reprodukcije (Portland, Main, USA 1988.; Banff, Canada, 1989.).

Član sam Zbora liječnika i Internacionalnog udruženja imunologa reprodukcije.

Andulka Radojčić