



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Caracterización, Diversidad y Evolución de los Receptores de Células “Natural Killer” de la Familia de las Inmunoglobulinas (KIR) en Primates Neotropicales

Diana Catalina Palacios

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Biología, Instituto de Genética

Bogotá, Colombia

2011

Caracterización, Diversidad y Evolución de los Receptores de Células “Natural Killer” de la Familia de las Inmunoglobulinas (KIR) en Primates Neotropicales

Diana Catalina Palacios

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias – Biología

Director:

Ph.D. Luis Fernando Cadavid

Línea de Investigación:

Evolución de Receptores de Células NK

Grupo de Investigación:

Inmunología Evolutiva e Inmunogenética

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Biología, Instituto de Genética

Bogotá, Colombia

2011

A Quino.

A los que galopan y a los que vuelan.

A Ursula, Noah y Dylan

Agradecimientos

A los que participaron en la construcción de esta tesis:

Las Instituciones:

A Colciencias quien me apoyó financieramente durante en el último año por medio del programa Jóvenes Investigadores e Innovadores “Virginia Gutiérrez de Pineda” 2009.

A la Universidad Nacional de Colombia, la Facultad de Ciencias y el Departamento de Biología, que brindaron todo el marco legal y administrativo de mi programa de Maestría.

Al Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia, donde realicé todo mi trabajo de laboratorio y mis actividades académicas durante mi programa de Maestría, y donde siempre encontré docentes y estudiantes dispuestos a colaborar en mi aprendizaje.

Al Grupo de Inmunología Evolutiva e Inmunogenética, espacio en el que crecí como profesional y como persona y donde siempre hubo una buena discusión de la que aprender.

Al Grupo de Neurociencias y al Grupo de Biodiversidad y Recursos Genéticos del Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia, cuyos integrantes me colaboraron más de una vez.

Al Servicio de secuenciación y análisis molecular del Instituto de Genética – SSiGMol de la Universidad Nacional, que surgió justo a tiempo y me brindó un servicio oportuno y de excelente calidad.

Las personas:

A mamá, a papá y a la hermanita, sin ellos, ni modo.

A los amigos, los cercanos y los lejanos, en especial a Javier López, Manuel Hoyos, Tania Pérez, Manuel Franco, y a los de Rol, sin ellos tampoco.

A los compañeros y amigos: Javier López, Marcela Fuquen, Henry Rodríguez, Alejandra Zárate, Rita Baldrich, Carlos Miguel del Valle, Gonzalo Jiménez y Juan Lugo.

A Carlos Eduardo Arboleda por su tiempo durante los análisis.

A los profesores Luis Fernando Cadavid, Paul Bloor, Úrsula Ramírez y Catalina Arévalo, por sus enseñanzas en Inmunología, Evolución, Diversidad, Microbiología, procedimientos y desempeño profesional.

Adicional a la formalidad anterior agradezco “desde el corazoncito”, por su apoyo emocional y sus enseñanzas cotidianas:

A Luis Fernando Cadavid, por la paciencia, las discusiones, las preguntas, los comentarios, el espacio, la sonrisa, las exposiciones, los congresos, los cumpleaños, el laboratorio, el Grupo, el artículo, y sobre todo, por la oportunidad de trabajar con él y por insistir en lo importante.

A Luis Fernando García, por su orientación en los primeros semestres de la maestría y por su comprensión y apoyo cuando cambié el rumbo de mi trabajo de tesis.

A Paul Bloor, por las conversaciones en el laboratorio, en el pasillo, en la calle, en la casa, durante el almuerzo, durante el té... y por compartir su visión y su energía conmigo, con el Instituto, con la Universidad y con el país.

A Úrsula Ramírez, por las conversaciones en el laboratorio, en el pasillo, en la calle, en la casa, durante el almuerzo... y por compartir conmigo su familia, su experiencia personal, su fortaleza y su ánimo.

A Catalina Arévalo, por estar pendiente, por su voz de aliento y por tener las palabras precisas en los momentos más adecuados.

A Indiana Bustos, por su cariño, por el juego, por su familia, por compartir conmigo su casa y sobre todo por compartir conmigo su conocimiento y su experiencia.

A Pedro Orostegui, por el aprendizaje en las discusiones semanales, por las sonrisas y por supuesto por las lágrimas.

Resumen

Las células Natural Killer (NK) son linfocitos citotóxicos que neutralizan y destruyen células propias alteradas. Estas células no reconocen el antígeno directamente sino que funcionan mediante un balance entre señalizaciones activadoras e inhibitorias controladas por los receptores de las células NK al interactuar con las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) clase I en la células blanco. En los primates los receptores de células Natural Killer de la familia de las inmunoglobulinas (KIR) son altamente diversos debido a su alto polimorfismo, diferencias en el contenido génico de los haplotipos, procesamiento alternativo del mRNA y diferencias en expresión. La mayoría de información sobre los KIR en primates proviene de los humanos y otros homínidos. La falta de información en otras especies de primates, incluyendo los del Nuevo Mundo, ha dificultado el entendimiento de las fuerzas y procesos que rigen la evolución de este sistema. En este trabajo se caracterizó el sistema KIR en 6 especies de primates del Nuevo Mundo. A partir de cDNA se identificaron 37 genes KIR en tres especies de la familia Atelidae, *A. hybridus*, *A. Belzebuth* y *L. lagotricha*. Adicionalmente, mediante aproximaciones genómicas se identificaron otros 35 genes KIR en las especies *Ateles goeffroyi*, *Saimiri boliviensis* y *Callicebus moloch*. Los genes KIR en primates del Nuevo Mundo son altamente variables y codifican para receptores con tres dominios de inmunoglobulina extracelulares con potenciales funciones inhibitorias y activadoras. Los haplotipos KIR en primates del Nuevo Mundo tienen una organización similar, en donde los genes del extremo 5' del haplotipo tienen un sentido de transcripción contrario al de los demás, e incluyen un pseudogen. Para entender el contexto evolutivo de los KIR en primates del Nuevo Mundo, se caracterizaron 25 genes KIR en tres especies de monos del Viejo Mundo pertenecientes a la familia Cercopithecidae: *Chlorocebus aethiops*, *Papio anubis* y *Colobus guereza*. Análisis filogenéticos muestran que los KIR de primates del Nuevo Mundo se han diversificado independientemente de aquellos de los primates del Viejo Mundo, formando un linaje evolutivo único. Dentro de este linaje, existe una tendencia de evolución género-específica, que sugiere una diversificación rápida de los KIR que ha coincidido con la radiación adaptativa de los distintos géneros de primates del Nuevo Mundo. A partir de la información generada en este trabajo se propone un modelo evolutivo general para el sistema KIR en los primates, caracterizado por la expansión diferencial de genes KIR en los distintos grupos de primates. Esta expansión diferencial de los KIR es una posible consecuencia de la diversificación sus ligandos naturales, las moléculas del MHC clase I.

Palabras clave: receptores de células Natural Killer de la familia de las inmunoglobulinas (KIR), primates neotropicales, primates del Viejo Mundo, familias génicas y diversidad.

Abstract

Natural Killer (NK) cells are cytotoxic lymphocytes which neutralize and destroy “self” altered cells. NK cells do not recognize antigens directly but instead work by regulating activation and inhibitory signals managed by NK cell receptors as they interact with the Major Histocompatibility Complex (MHC) class I molecules on target cells. In Primates, Killer immunoglobulin-like receptors (KIRs) are highly diverse due to their high levels of polymorphism, differences in haplotype gene content, mRNA splice variants and expression differences. Most of the information about primate KIRs comes from humans and other hominoids. A lack of information for other primate species, including the New World primates makes it difficult to understand the forces and processes that control evolution of this system. In this study the KIR system was characterized in six species of New World primates. From cDNA, 37 KIR genes were identified for three species from the family Atelidae; *A. hybridus*, *A. Belzebuth* and *L. lagotricha*. Using genomic approximations, another 35 KIR genes were identified from *Ateles goeffroyi*, *Saimiri boliviensis* and *Callicebus moloch*. New World primate KIR genes were highly variable and encoded receptors with 3 Ig domains with potential activation and inhibitory functions. Among the New World primates, KIR haplotypes exhibit similar organization in which transcription in the genes at the 5' extreme of the haplotype runs in the opposite direction, and includes a pseudogene. To understand the evolutionary context of New World primate KIRs, 25 KIR genes were characterized from three species of Old World primates from the family Cercopithecoidea; *Chlorocebus aethiops*, *Papio anubis* and *Colobus guereza*. Phylogenetic analyses showed that New World primate KIRs diversified independently from the Old World primate KIRs, forming a unique evolutionary lineage. Within this lineage there exists a tendency of genus-specific evolution consistent with a rapid diversification of KIRs which coincides with the adaptive radiation of New World primate genera. From the information generated in this study, a general evolutionary model for the primate KIR system is proposed characterized by a differential expansion of KIR genes in the distinct groups of primates. This differential expansion of KIR genes is a possible consequence of the diversification of their natural ligands, the MHC class I molecules.

Keywords: Killer immunoglobulin-like receptors (KIR), New World primates, Old World primates, gene families and diversity.

Contenido

Agradecimientos	vi
Resumen	viii
Abstract.....	ix
Contenido	x
Índice de figuras	xii
Índice de tablas	xiii
Símbolos y Abreviaturas	xiv
Introducción	4
Marco Teórico.....	6
Las Células NK	6
Estructura y Nomenclatura de los KIR	8
Arquitectura Génica Y Genómica de los <i>KIR</i>	9
La Diversidad en los KIR	10
Los Primates y la Evolución de los KIR.....	12
Objetivos.....	17
General	17
Específicos.....	17
Métodos	18
Toma de Muestras	18
Extracción de RNA y Retrotranscripción RT-PCR	18
Clonación y Secuenciación	19
Análisis de Secuencias Genómicas del Locus KIR en Primates del Nuevo y del Viejo Mundo	20
Análisis de Secuencias y Reconstrucción Filogenética	20
Resultados.....	22
Caracterización de Genes y Haplotipos KIR en Primates Neotropicales.....	22
Caracterización de KIR Transcritos en la Familia Atelidae	22

Organización Genómica del Locus KIR en Primates del Nuevo Mundo	25
Estructura del locus KIR en <i>A. geoffroyi</i>	26
Revisión de la Estructura del Locus KIR en <i>A. nancymae</i>	26
Estructura del Locus KIR en <i>S. boliviensis</i>	28
Estructura del Locus KIR en <i>C. moloch</i>	28
Caracterización de Genes y Haplotipos KIR en Cercopitécidos	33
Diversificación acelerada en los KIR de los Primates del Nuevo Mundo.....	35
Relaciones Evolutivas Entre los <i>KIR</i> de los Primates.....	39
Entre los KIR de los Primates del Nuevo y del Viejo Mundo	39
Entre los KIR de los Primates del Nuevo Mundo	41
Entre los KIR de los Primates del Viejo Mundo.....	42
Discusión	44
Diversificación Independiente de los KIR en los primates del Viejo y del Nuevo Mundo.	44
Relaciones de ortología entre los KIR de la familia Atélidae	46
Estructura Diferencial de los Haplotipos Entre los Primates del Nuevo y del Viejo Mundo	47
Mecanismos evolutivos que prevalecen en los KIR de los primates del Viejo y del Nuevo Mundo.	48
Conclusiones	51
Perspectivas	52
Referencias.....	53
Anexos.....	57
Alineamiento de aminoácidos para las secuencias KIR identificadas en el estudio	57
Peptido señal.....	57
Dominio D0.....	58
Dominio D1.....	59
Dominio D2.....	60
Dominios Tallo y Transmembrana.....	61
Dominio Citoplasmático	62

Índice de figuras

Figura 1. Modo de acción de las células NK, modelo del yo-faltante (missing-self).	7
Figura 2. Estructura génica y protéica un receptor KIR3DL.	8
Figura 3. Complejo de Receptores Leucocitarios LRC y locus KIR en los humanos.	9
Figura 4. Filogenia de los géneros de los Primates Platyrrinos (izquierda) y Catarrinos (derecha).	13
Figura 5. Filogenia del D0 de los KIR en los primates.	14
Figura 6. Esquema del locus KIR en diferentes primates.	15
Figura 7. Características estructurales de las secuencias KIR identificadas a partir de cDNA en los primates del Nuevo Mundo.	23
Figura 8. Variantes de procesamiento alternativo en las secuencias de primates del Nuevo Mundo identificadas a partir del cDNA.	25
Figura 9. Características estructurales de las secuencias KIR identificadas a partir de clones BAC en primates del Nuevo Mundo.	27
Figura 10. Haplotipo del locus KIR para Atge.	30
Figura 11. Haplotipo del locus KIR para Aona.	31
Figura 12. Haplotipo del locus KIR para Sabo y para Camo.	32
Figura 13. Organización de los genes KIR identificados en los clones BAC de los cercopitécidos.	33
Figura 14. Retroelementos en los genes tipo 2DL4 de los Primates del Viejo Mundo.	35
Figura 15. Evaluación por posición, de la divergencia Ka/Ks entre los grupos definidos. .	36
Figura 16. Ubicación en el gen y en la proteína de las regiones que presentan evidencia de selección positiva (en amarillo) y negativa (en rojo) en los KIR de los primates del Nuevo Mundo.	38
Figura 17. Filogenia de los genes <i>KIR</i> de los primates del Nuevo y del Viejo Mundo.	40
Figura 18. Filogenia de los genes <i>KIR</i> de los primates del Nuevo Mundo.	41
Figura 19. Filogenia de los genes <i>KIR</i> de los primates del Viejo Mundo.	42
Figura 20. Esquema del locus <i>KIR</i> en los primates del Viejo y del Nuevo Mundo.	48
Figura 21. Modelo evolutivo de los genes KIR en los primates.	50

Índice de tablas

Tabla 1. Características generales de los genes KIR identificados en los cercopitécidos.	34
Tabla 2. Distancia promedio entre los genes KIR de las especies de primates del Viejo y del Nuevo Mundo.	37
Tabla 3 Valores de divergencia entre las posiciones sinónimas Ks y no sinónimas Ka y de la razón entre estos para los diferentes grupos de comparación definidos (ver Métodos).	37

Símbolos y Abreviaturas

SI: sistema inmune.

NK: "Natural Killer" (células).

KIR: Receptores de células NK basados en inmunoglobulinas.

PS: péptido señal.

D0, D1 y D2: dominios Ig 0, 1 y 2 de los KIR.

S: tallo.

T: transmembrana.

C: citoplasmático.

MHC: complejo mayor de histocompatibilidad.

Ig: inmunoglobulina.

ITIM: motivos de receptores inmunes inhibitorios basados en tirosina.

ITAM: motivos de receptores inmunes activadores basados en tirosina.

LRC: complejo de receptores leucocitarios.

sv: variante de procesamiento alternativo.

Ma: millones de años

Atbe: *Ateles belzebuth*.

Athy: *Ateles hybridus*.

Lala: *Lagothrix lagotricha*.

Atge: *Ateles geoffroyi*.

Camo: *Callicebus Moloch*.

Sabo: *Saimiri boliviensis*.

Chae: *Chlorocebus aethiops*.

Paan: *Papio anubis*.

Cogu: *Colobus guereza*.

Hosa: *Homo sapiens*.

Patr: *Pan troglodytes*.

Papa: *Pan paniscus*.

Popy: *Pongo pygmeus*.

Gogo: *Gorilla gorilla*.

Mamu: *Macaca mulatta*.

Mafa: *Macaca fascicularis*.

Introducción

El sistema inmune (SI) es una compleja red de órganos, células y moléculas que contribuye a mantener la integridad de los organismos al reconocer, neutralizar y eliminar posibles agentes patógenos y restituir y reparar los tejidos dañados. Dichos agentes patógenos pueden ser exógenos como virus, bacterias, hongos y otros organismos, o endógenos como las células tumorales.

En los vertebrados, los linfocitos cumplen un papel fundamental en el reconocimiento inmune y en el desarrollo de las funciones efectoras. En general, se distinguen tres grandes grupos de linfocitos, los linfocitos T, los linfocitos B y las células Natural Killer (NK). Las células NK presentan funciones citotóxicas contra células propias alteradas, como lo son las células infectadas por virus, las células tumorales o las células alogénicas. A diferencia de los linfocitos T y B que expresan receptores antígeno-específicos, las NK expresan receptores activadores e inhibitorios que reconocen principalmente a las moléculas de Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) clase I en las células blanco. La expresión adecuada de moléculas MHC clase I en las células blanco conduce a la anergia de las células NK como consecuencia del predominio de las señales inhibitorias, mientras que la expresión inadecuada de las moléculas MHC clase I induce citotoxicidad mediante las señales activadoras en las NK. En los primates los principales receptores tanto activadores como inhibitorios de las células NK pertenecen a la familia de las inmunoglobulinas (Ig) y se conocen como KIR (Killer Ig-like receptors).

Los KIR típicamente presentan dos o tres dominios Ig extracelulares, un tallo que une los dominios Ig con la región transmembrana y un dominio citoplasmático largo o corto. Los KIR inhibitorios suelen presentar dominios citoplasmáticos largos con dos motivos de inmunoreceptores inhibitorios basados en tirosina (ITIMs). Los KIR activadores suelen presentar dominios citoplasmáticos cortos sin ITIMs, pero presentan un aminoácido (aa) cargado positivamente en la región transmembrana que les permite asociarse con correceptores de la familia de DAP10/DAP12 que contienen motivos de inmunoreceptores activadores basados en tirosina (ITAMs).

Los KIR son codificados por genes formados por 9 exones que corresponden aproximadamente a cada uno de los diferentes dominios de la proteína. Los exones 1 y 2 codifican el péptido señal, los exones 3, 4 y 5 los dominios Ig D0, D1 y D2 respectivamente, el exón 6 codifica el tallo, el exón 7 la región transmembrana y los exones 8 y 9 el dominio citoplasmático. Los humanos expresan un número variable de KIR localizados en una región cromosómica dentro del Complejo de Receptores Leucocitarios (LRC) en el brazo largo del cromosoma 19.

Una de las características más sobresalientes de los KIR es su alta variabilidad. Esta variación es generada por polimorfismo de los genes, diferencias en el número de dominios Ig, diferencias en el número y el contenido de genes entre haplotipos y por el procesamiento alternativo del mRNA. En los humanos 15 genes y 2 pseudogenes *KIR* generan más de 130 haplotipos únicos (1). En el mono Rhesus se han descrito 20 *KIR* distintos mientras que en el gibón de mejillas blancas se han encontrado solo 6 *KIR* (2). El estudio de los procesos evolutivos que han marcado la historia de los KIR en los primates se ha visto limitada por la ausencia de datos en la mayoría de los géneros. Ciertamente, ha habido un sesgo hacia el análisis de los primates hominoides donde se han caracterizado los *KIR* en 6 de los 8 géneros del grupo. En los monos del Viejo Mundo este sistema tan solo se ha estudiado en 3 especies, mientras que en primates del Nuevo Mundo se ha estudiado en solo una especie, *Aotus nancymae*.

En Colombia y en general en el trópico, las diversas poblaciones de primates han disminuido debido a procesos antrópicos asociados a la pérdida y degradación de su hábitat, la caza y el tráfico ilegal (3). Además, la alta incidencia de enfermedades infecciosas y cáncer, al menos en las poblaciones en cautiverio, sugiere que factores inmunológicos pueden estar contribuyendo a aumentar el riesgo de los primates neotropicales. El estudio de moléculas altamente variables como los receptores de la NK, pueden contribuir a diseñar estrategias de conservación más eficientes, que incluyan reintroducción, cría y cruce de individuos o mantenimiento de poblaciones en cautiverio como reservorio del material genético de los primates neotropicales. Del mismo modo, el estudio de la evolución de este sistema puede aportar elementos para entender aspectos centrales en la inmunobiología del cáncer y de las infecciones virales.

En este trabajo se caracterizaron los genes *KIR* expresados en *Ateles belzebuth*, *Ateles hybridus* y *Lagothrix lagotricha* y se caracterizó la organización genómica del locus KIR en *Ateles geoffroyi*, *Callicebus moloch* y *Saimiri boliviensis*. Adicionalmente se caracterizó el locus KIR en los monos del Viejo Mundo *Chlorocebus aethiops*, *Papio anubis* y *Colobus guereza* pertenecientes a la familia Cercophitecidae. A partir de estos datos y de otros ya existentes se reconstruyó la historia evolutiva de los *KIR* proponiendo un modelo evolutivo para los primates. Los resultados obtenidos muestran una acelerada diversificación de los KIR por mecanismos consistentes con un modelo de nacimiento y muerte génica que ha coincidido con la radiación adaptativa de los distintos grupos de primates. A diferencia de los primates del Viejo Mundo que comparten algunos de los linajes de los *KIR*, en los primates neotropicales la diversificación de estos genes es género-específica y probablemente es consecuencia de presiones selectivas que favorecen la unión con las altamente variables moléculas MHC clase I.

Marco Teórico

Las Células NK

El sistema inmune (SI) de los vertebrados clásicamente se ha dividido en dos grandes categorías el SI adaptativo y el SI innato. El SI adaptativo se centra en los linfocitos T y B con sus receptores de antígeno (inmunoglobulinas y receptores de células T) clonales altamente variables y específicos, con capacidad para generar memoria. Por el contrario, el SI innato agrupa una gama heterogénea de mecanismos inmunes que son ancestrales, inespecíficos, poco variables y no generan memoria inmunológica. A pesar de esta división, los diferentes componentes del SI interactúan de tal forma que el límite entre el SI adaptativo y el SI innato es difuso. Las células NK son un ejemplo prominente de mecanismos inmunes en la interfase entre lo innato y lo adaptativo. Estas células no expresan receptores de antígeno pero interactúan con la moléculas del MHC clase I que son propias del SI adaptativo.

La mayoría de las células de un organismo vertebrado expresan en su membrana moléculas del MHC clase I, cuya función es presentar antígenos endógenos (virales o tumorales) a los receptores de los linfocitos T citotóxicos (Tc). El reconocimiento de antígenos presentados por el MHC clase I activa los linfocitos Tc induciendo apoptosis en la célula blanco. Algunos tipos de tumores y virus han desarrollado la capacidad de disminuir o eliminar la expresión de moléculas del MHC clase I en las células afectadas como un mecanismo de evasión del reconocimiento inmune. Las células NK son fundamentales en el reconocimiento y eliminación de estas células tumorales o infectadas por virus que han evadido la respuesta inmune adaptativa de los linfocitos Tc (4, 5).

Las células NK expresan en su membrana receptores activadores cuyos ligandos son en su mayoría desconocidos, y receptores inhibitorios cuyos ligandos son las moléculas del MHC clase I (6-9). Cuando los receptores inhibitorios reconocen las moléculas del MHC clase I en las células blanco, generan señales que mantienen a las NK en un estado inactivo. Sin embargo, ante células que han disminuido o eliminado la expresión de moléculas MHC clase I, los receptores inhibitorios no generan señales, las señales generadas por los receptores activadores prevalecen, y las células NK se activan liberando sus gránulos citoplasmáticos que contienen perforinas monoméricas y granzimas (10). Las primeras se ensamblan en la membrana de las células blanco formando poros, y las segundas entran a la célula blanco por estos poros e inducen apoptosis por medio de la activación de la vía de las caspasas (10, 11). El balance entre señales activadoras e inhibitorias determina la actividad de las células NK. Este modelo de activación antígeno independiente se conoce como el yo-faltante (

Figura 1).

Además de generar apoptosis en las células blanco, los linfocitos NK participan de la amplificación de la respuesta inmune, esta función reguladora se lleva a cabo mediante la secreción de citoquinas como el interferón gamma y factores de necrosis tumoral, involucrados en la activación, proliferación y supervivencia de las células dendríticas (10, 11), y como la IL-10 que junto con el interferón gamma participan en la regulación de la actividad de los macrófagos y de los linfocitos T(10, 11).

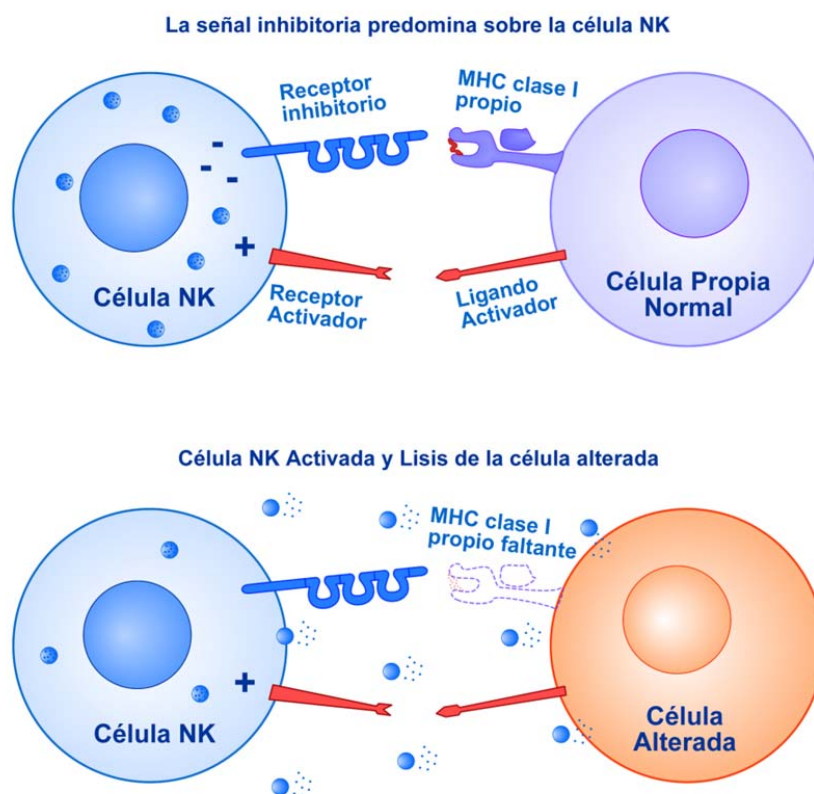


Figura 1. Modo de acción de las células NK, modelo del yo-faltante (missing-self).

Los receptores de las células NK de los mamíferos pertenecen a dos grandes familias estructurales, los receptores de tipo lectina y los receptores de tipo inmunoglobulina(1). En los humanos, los primeros están codificados en el Complejo Natural Killer (NKC) en el cromosoma 12, e incluyen los genes *CD94*, *NKG2A/B*, *NKG2C* y *NKG2E*. Estos genes codifican proteínas transmembranales que forman heterodímeros entre la molécula CD94 y una de las moléculas de NKG2 (A/B, C y E). Las diferentes combinaciones entre CD94 y NKG2 forman receptores tanto de tipo activador como inhibitor. Los receptores de células NK tipo inmunoglobulinas (KIR) están codificados en el Complejo de Receptores Leucocitarios en el cromosoma 19 y su número varía entre 6 y 15 genes por haplotipo.

Estructura y Nomenclatura de los KIR

Los KIR son proteínas integrales de membrana que presentan típicamente dos o tres dominios extracelulares de inmunoglobulina, una región tallo que conecta los dominios Ig con la región transmembrana, y luego de esta, una región o cola citoplasmática que puede ser larga o corta (12, 13). Los KIR inhibitorios presentan dominios citoplasmáticos largos con uno o dos motivos de inmunoreceptores inhibitorios basados en tirosina (ITIMs, del inglés Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif) (12, 14, 15). Los KIR activadores presentan dominios citoplasmáticos cortos sin motivos funcionales, sin embargo tienen un amino ácido cargado positivamente en la región transmembrana que les permite asociarse a moléculas adaptadoras de la familia DAP10/DAP12, las cuales contienen motivos de inmunoreceptores activadores basados en tirosina (ITAMs) que se asocian a quinasas para iniciar la cascada de transducción de la señal activadora (15, 16). El amino ácido cargado positivamente de los KIR activadores puede ser lisina (K) o arginina (R) en la novena y la cuarta posición del dominio transmembrana, respectivamente. Los dominios Ig de los KIR se nombran como D0, D1 y D2 desde el más distal hasta el más proximal a la región transmembrana. Los dominios tallo, transmembrana y citoplasmático son conocidos como la región de señalización y se abrevian como STC (S del inglés stem, transmembrane and cytoplasmic) (**Figura 2**).

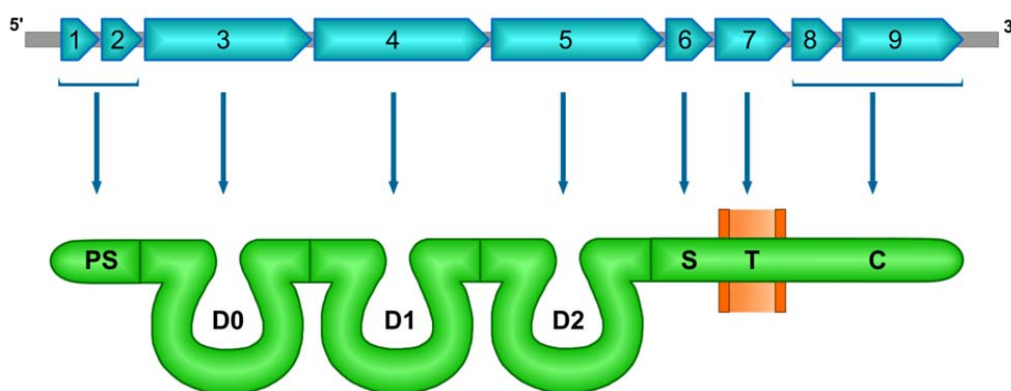


Figura 2. Estructura génica y proteica un receptor KIR3DL.

Se muestra la correspondencia entre los dominios de la proteína y los exones en el gen. PS, péptido señal; D0, D1 y D2, dominios Ig 0, 1 y 2; S, tallo; T, transmembrana; C, región citoplasmática.

Los KIR se nombran de acuerdo a sus características estructurales, así por ejemplo receptores que presentan tres dominios Ig y cola citoplasmática larga se denominan KIR3DL y receptores con dos dominios Ig y cola citoplasmática corta se denominan KIR2DS. Para diferenciar KIR que comparten las mismas características se agrega un número que representa el orden en que fueron descritos, por ejemplo KIR3DL2 y

KIR3DL3; en algunos casos este número también representa la posición del *KIR* en el haplotipo.

Los KIR humanos se nombran sin emplear un término que se refiera a la especie, pero para otros organismos se agrega un prefijo que permite identificarla, por ejemplo Mm-KIR2DL5 se refiere al KIR2DL5 de *Macaca mulatta*, y Ow-KIR3DL2 se refiere al KIR3DL2 de *Aotus nancymae* (por su nombre común en inglés Owl monkey). Otras particularidades como las variantes de procesamiento alternativo suelen indicarse en el nombre de los KIR, agregando sv (del inglés *splicing variant*) y un número consecutivo al final del nombre del receptor, por ejemplo Mm-KIR3DLsv2.

Arquitectura Génica Y Genómica de los *KIR*

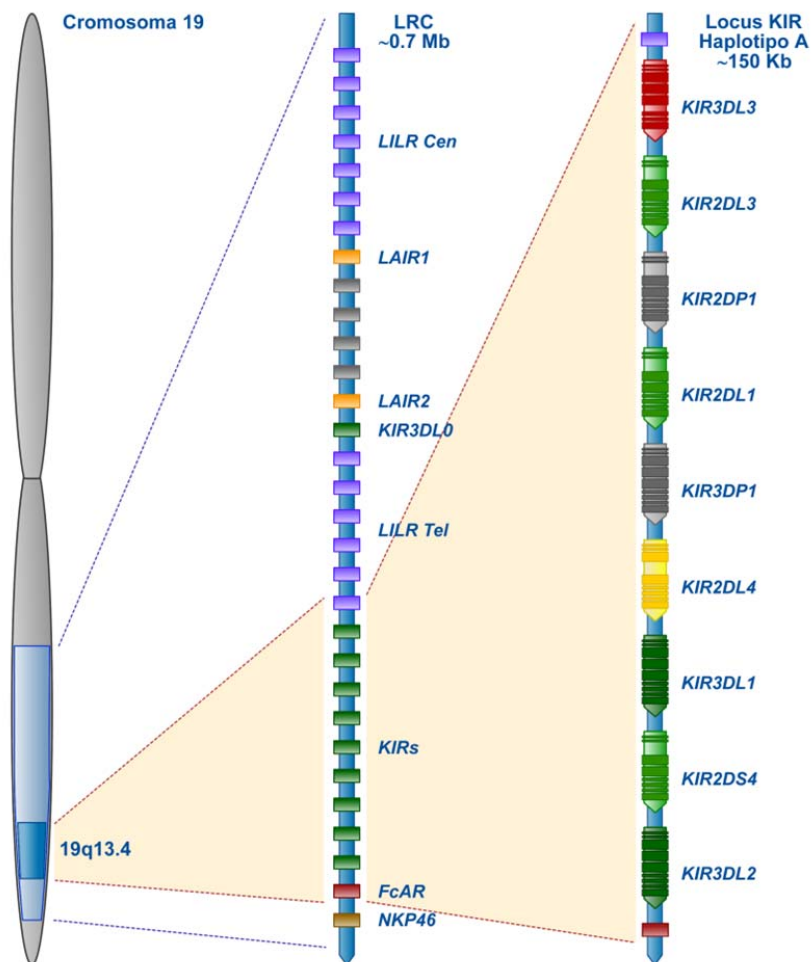


Figura 3. Complejo de Receptores Leucocitarios LRC y locus KIR en los humanos.

Los genes que codifican para los receptores KIR están formados por 9 exones que corresponden aproximadamente a cada una de las regiones de la proteína, (**Figura 2**). Los exones 1 y 2 codifican el péptido señal, los exones 3, 4 y 5 codifican los dominios Ig D0, D1 y D2 respectivamente, el exón 6 codifica casi todo el tallo, el exón 7 la parte final del tallo y toda la región transmembrana y los exones 8 y 9 la región citoplasmática. En el genoma, la longitud de un *KIR* varía aproximadamente entre 10 y 15 kpb, siendo los intrones los que más varían en longitud.

En los humanos, los *KIR* se encuentran agrupados en la región telomérica del Complejo de Receptores Leucocitarios (LRC, del inglés Leukocyte Receptor Complex) ubicado en el brazo largo del cromosoma diecinueve (19q13.4). Tanto en humanos como en los demás primates estudiados, el locus KIR se encuentra flanqueado por los genes *LILR* (*Leukocyte Immunoglobulin-Like Receptors*) hacia el centrómero y por el gen *FcAR* (Receptor para la fracción cristalizable de la IgA) hacia el telómero, (**Figura 3**). Las regiones genómicas entre los *KIR* varían en longitud entre 2 y 5 kpb aproximadamente.

La Diversidad en los KIR

Los KIR se caracterizan por su amplia diversidad, que se ha generado mediante variados mecanismos actuando a diferentes niveles (1). Los KIR varían en secuencia, en estructura exónica, en organización haplotípica, en el procesamiento del mRNA, en la combinación de dominios Ig que presentan, en los motivos funcionales que les confieren su función activadora o inhibitoria, e incluso en los niveles de expresión de los diferentes genes. Esta variación se da entre especies tanto como al interior de las especies.

Los genes *KIR* son altamente polimórficos. Para el *KIR3DL3* humano se han descrito 107 alelos, siendo el *KIR* más polimórfico en esta especie, mientras que el *KIR2D3*, con 14 variantes es el menos polimórfico (<http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/>). Los KIR también varían en secuencia en cuanto al lugar donde se presenta el codón de parada, dando lugar a KIR con dominios citoplasmáticos cortos (activadores) o KIR con dominios citoplasmáticos largos (inhibitorios). Además dentro de los KIR con regiones citoplasmáticas largas existen los que tienen dos motivos ITIMs funcionales, mientras hay otros que solo presentan el primer ITIM funcional y el segundo modificado, o el primero modificado y el segundo funcional (7, 17). En los KIR con regiones citoplasmáticas cortas hay variación en cuanto al tipo y posición del residuo cargado positivamente en la región transmembrana. Algunos tienen lisina en la novena posición mientras que otros tienen arginina en la cuarta posición de dicho dominio. Algunos KIR como el KIR2DL4, presentan características tanto inhibitorias como activadoras, es decir, presentan una región citoplasmática larga con motivos ITIM funcionales y también un aminoácido cargado en la región transmembrana.

Un segundo nivel de variación está dado por la estructura exónica. Existen dos tipos de KIR que tienen dos dominios Ig. Los tipo KIR2DL4 no presentan el exón 4 y codifican receptores cuya configuración es D0 + D2, y los tipo KIR2DS presentan un pseudoexón tres que es excluido durante la maduración del mRNA, y por tanto codifican receptores cuya configuración es D1 + D2. Además, hay *KIR* como el *KIR3DL3* que carecen del exón 6 y por tanto de parte de la región tallo. Aunque la mayoría de los KIR tienen dos o tres dominios Ig, en los cercopitécidos se conocen transcritos que codifican para receptores con un solo dominio Ig (*Mm-KIR1D* o *Mf-KIR1D*) (17), y en *Aotus nancymae* hay KIR con cuatro dominios Ig (*Ow-KIR4DL5*, *Ow-KIR4DL6* y *Ow-KIR4D7*) (18).

Otro nivel de variación está dado por la organización haplotípica de los *KIR*. Entre individuos de una misma especie el locus KIR varía en el número y el contenido génico. En los humanos los 17 genes *KIR* conocidos (15 genes y 2 pseudogenes) son capaces de generar hasta 130 combinaciones génicas diferentes (1), que se agrupan en dos haplotipos básicos reconocidos, el A o el B. Estos dos grupos de haplotipos se diferencian por el contenido de genes activadores e inhibitorios. A pesar de sus diferencias, todos los haplotipos KIR que se han estudiado hasta ahora en humanos comparten tres genes conocidos como genes marco. El *KIR3DL3* que es el gen más centromérico en el locus, el *KIR2DL4* que se ubica hacia la zona media, y el *KIR3DL2* que es el gen más telomérico en el locus. Así, la variación haplotípica del locus se concentra en dos regiones, una ubicada entre el *KIR3DL3* y el *KIR2DL4* y la segunda entre el *KIR2DL4* y el *KIR3DL2*(19).

Estos genes marco se conservan en los hominoides. Sin embargo, en las tres especies de cercopitécidos estudiados hasta ahora, solo se conserva el gen *KIR2DL4* en la región media del locus (17, 20, 21). Aún más, los *KIR* del mono nocturno *Aotus nancymae*, no son ortólogos (*sensu stricto*) a ninguno de los *KIR* de los hominoides o de los cercopitécidos, indicando una alta tasa de recambio génico en esta familia génica durante la evolución de los primates.

El procesamiento alternativo del mRNA es un nivel más de variación entre los KIR. En los humanos se han descrito variantes en las que se excluyen de los transcritos los exones 3 y 4 completos, un tercio del exón 3, dos tercios del exón 4 y parte del exón que codifica para el dominio tallo (22).

En el mono Rhesus se han caracterizado un gran número de variantes debidas al procesamiento alternativo del mRNA para los genes *Mm-KIR3DL*, *Mm-KIR1D* y *Mm-KIR3DH* (17). En los genes *Mm-KIR3DL* se identificaron siete variantes, que codifican para receptores en uno o dos dominios Ig completos, la falta de 12 o 72 aa al inicio del D1 y la falta de 50 aa al inicio del dominio D2. Una de estas variantes produce un cambio en el marco de lectura generando un codón de parada previo a la región transmembrana. En los *Mm-KIR1D* se identificaron nueve variantes por procesamiento alternativo, que incluyen la delección de todo el dominio D2 y de dos partes diferentes de este, la falta de 12 aa al inicio del D1, la delección de los dominios tallo, transmembrana y parte del

citoplasmático, y diferentes combinaciones de estas variantes en una misma molécula. En los genes *Mm-KIR3DH* se describieron variantes similares a las de los *KIR3DL3* y adicionalmente una con la delección de 14 aa en el tallo (similar a la descrita para humanos), una larga delección que incluye desde el D2 hasta parte de la región citoplasmática, la delección de 27 aa al interior del D1 y de Nuevo, la combinación de varias de estas formas en un mismo receptor. La funcionalidad de estas variantes aún está por establecerse.

Finalmente, los KIR varían en cuanto a sus niveles de expresión. Si bien hay pocos estudios al respecto, se sabe que por ejemplo en los humanos la expresión del KIR3DL3 en la membrana de las células NK es mucho menor que la expresión de los otros KIR (23), y también hay evidencia de que diferentes poblaciones de células NK presentan distintos niveles de expresión de sus KIR. Aunque la mayoría de los datos respecto a la variación de esta familia génica proviene de los humanos, la información que se ha generado a partir de otras especies ha permitido entender mucho mejor la evolución y la función de la diversidad de los KIR.

Los Primates y la Evolución de los KIR

El orden Primates incluye cuatro grupos: Strepsirrhini (lémures, gálagos y loris), Tarsii (tarceros), Catarrhini (humanos, simios, gibones y monos del Viejo Mundo); y Platyrrhini (monos del Nuevo Mundo). Sin embargo, en esta tesis se usa el término primates para referirnos solo a los catarrinos (Catarrhini) o primates del Viejo Mundo (PVM), y a los platirrinos (Platyrrhini) o primates del Nuevo Mundo (PNM) también llamados primates neotropicales. Platirrinos y catarrinos divergieron hace aproximadamente 43 Ma (24-28)

Dos superfamilias conforman el grupo de los catarrinos, Hominoidea (homínidos) y Cercopithecoidea (cercopitécidos) que divergieron hace aproximadamente 30 Ma, **Figura 4** (24-28). Hominoidea incluye las dos familias, Hominidae (homínidos) con cuatro géneros (Pongo: orangutanes, Pan: chimpancés, Gorilla: gorilas y Homo: humanos), e Hylobatidae (gibones) también con cuatro géneros. Cercopithecoidea contiene solo a la familia Cercopithecidae y agrupa entre 13 y 22 géneros. Los cercopitécidos son conocidos también como monos del Viejo Mundo.

Los platirrinos se clasifican en cuatro familias: Cebidae con ocho géneros, Aotidae con un género, Pitheciidae con cuatro géneros y Atelidae con cuatro géneros, **Figura 4** (3). Aunque las relaciones evolutivas entre estas familias no son del todo claras, se piensa que las cuatro familias divergieron hace 10 – 20 Ma. La familia Pitheciidae fue la primera en separarse hace aproximadamente 20 Ma, mientras que el tiempo de divergencia de las otras es aún controversial (24-29).

La evolución de los genes *KIR* en los primates se ha estudiado en los hominoides pero muy poco en cercopitécidos y en primates del Nuevo Mundo. En hominoides, se han identificado *KIR* para las especies *Homo sapiens*, *Pan paniscus* (Papa), *Pan troglodytes* (Patr), *Gorilla gorilla* (Gogo) y *Pongo pygmaeus* (Popy), representando a todos los géneros de la familia Hominidae (12, 30-33). Recientemente los *KIR* se caracterizaron en *Nomascus leucogenys* y *Hoolock hoolock*, representando a dos de los cuatro géneros de la familia Hylobatidae (2). En los monos del Viejo Mundo los *KIR* se han caracterizado en tres especies *Macaca mulatta* (Mamu), *Macaca fascicularis* (Mafa) y *Chlorocebus sabaeus* (Chsa), representando solo dos de los aproximadamente veintidós géneros de la familia (17, 20, 21, 34).

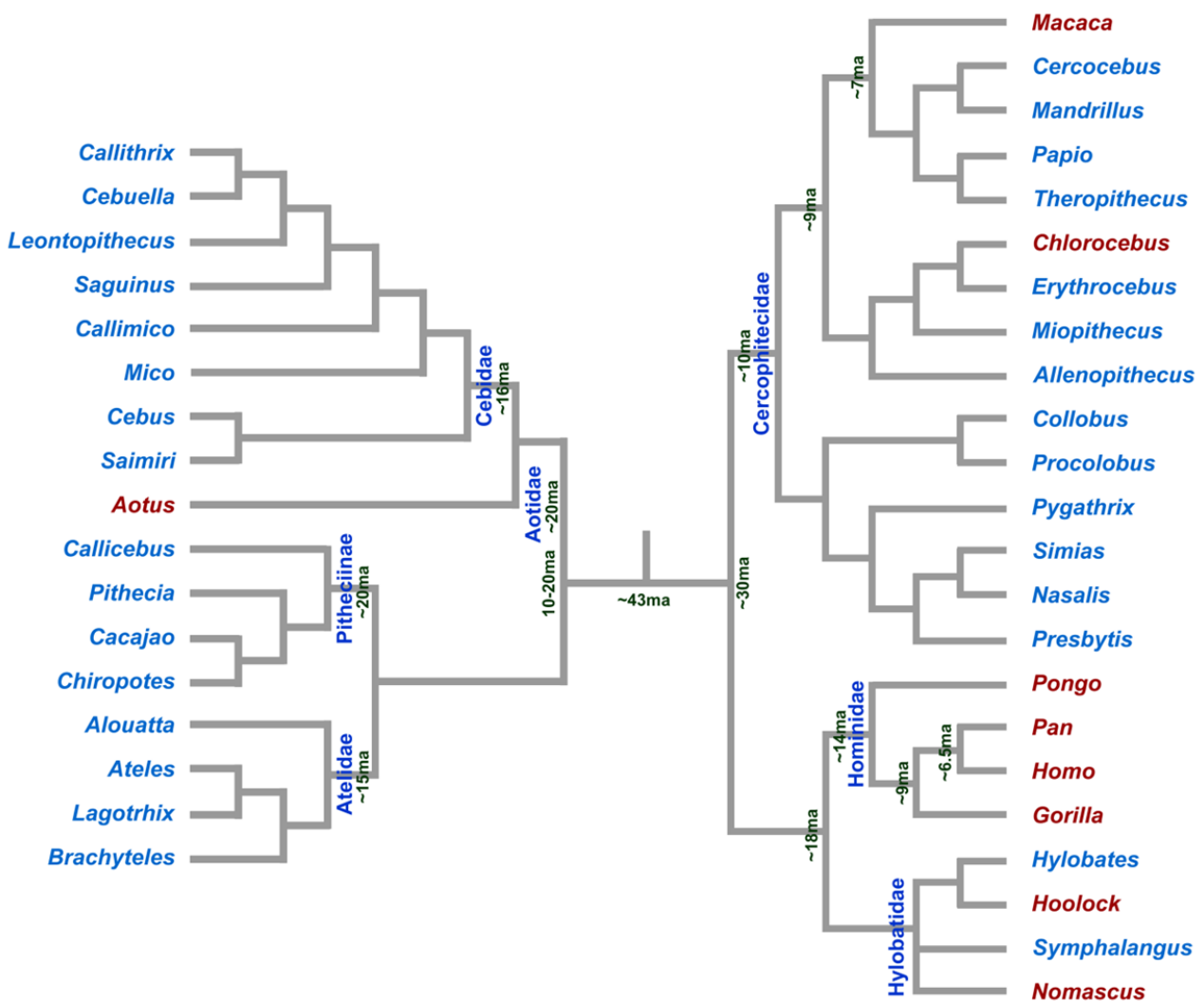


Figura 4. Filogenia de los géneros de los Primates Platyrrinos (izquierda) y Catarrinos (derecha). Se muestran los tiempos de divergencia aproximados y las familias de cada grupo. En rojo aparecen los géneros para los cuales hay especies caracterizadas para los genes *KIR* (imagen construida a partir de la información de www.tolweb.org, (3, 24-29, 35).

Existe aún menos información sobre los *KIR* en los primates del Nuevo Mundo. De los aproximadamente 16 géneros que conforman el grupo solo se han caracterizado en la especie *Aotus nancymae*. Con esta información se han realizado reconstrucciones filogenéticas en las que se observa que los *KIR* de los platirrininos y los catarrinos se agrupan en seis linajes evolutivos (**Figura 5**) (18, 32).

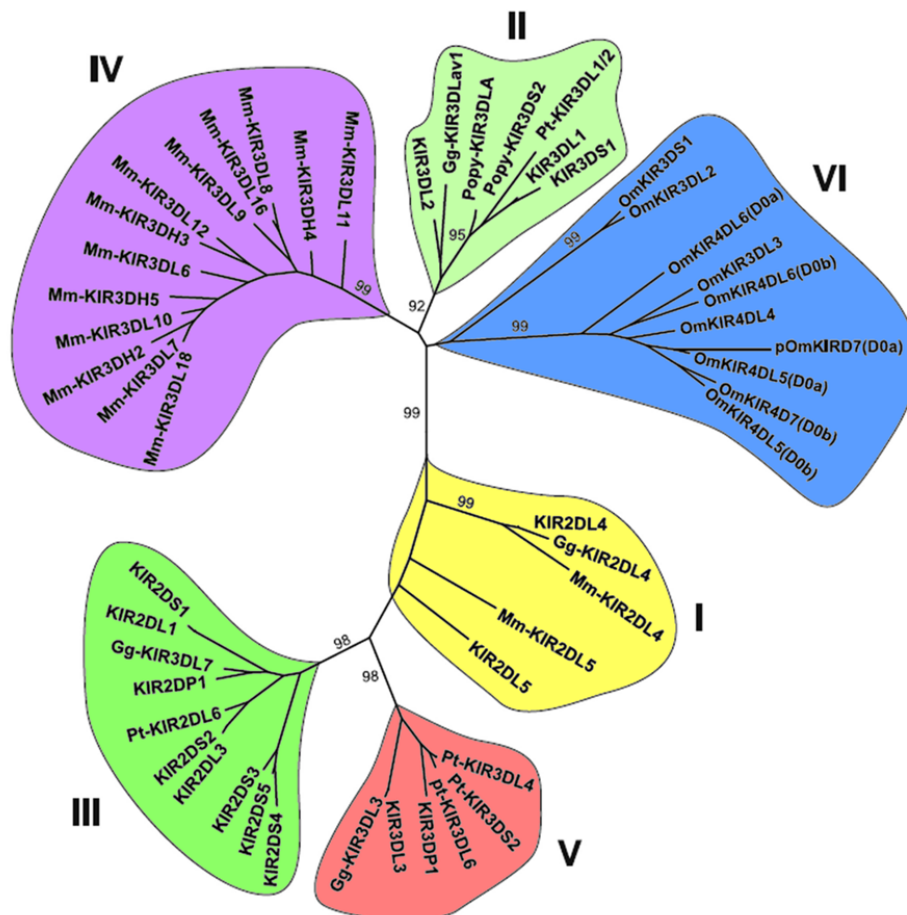


Figura 5. Filogenia del D0 de los KIR en los primates. Se muestran los diferentes linajes reconocidos. (Modificada de (18))

El linaje I (uno) se organiza en dos grupos, el Ia que agrupa a los genes del tipo *KIR2DL4* y el Ib que agrupa a los genes del tipo *KIR2DL5*. Los linajes II y III están caracterizados por los genes *KIR3DL2* y *KIR2DL3* respectivamente e incluyen a la mayoría de los genes de tres y dos dominios Ig de los hominoides. El linaje V incluye los genes del tipo *KIR3DL3* hominoides. El linaje IV es propio de los cercopitécidos y agrupa los genes del tipo *KIR3DL* y *KIR3DH*. Estos últimos se nombran así por su carácter híbrido pues a pesar de ser de tres dominios Ig su región STC presenta mayor similitud con la de los genes del tipo *KIR2DL4* (17). Finalmente el linaje VI incluye a todos los genes KIR de *Aotus nancymae*.

Existe una relación entre la historia evolutiva y la organización de los KIR en el genoma. Cada uno de los genes marco de los haplotipos hominoides representan un linaje evolutivo diferente. El *KIR3DL3* es el más centromérico y representa al linaje V, el *KIR2DL4* hacia la zona media del locus caracteriza al linaje Ia, y el *KIR3DL2* hacia el telómero caracteriza al linaje II (**Figura 6**). Esta relación entre la estructura haplotípica y la evolución de los KIR se asocia a procesos de duplicación génica y resultan en la expansión de linajes evolutivos en distintos grupos de primates, como el linaje III en los hominoides o el IV en los cercopitécidos (17).

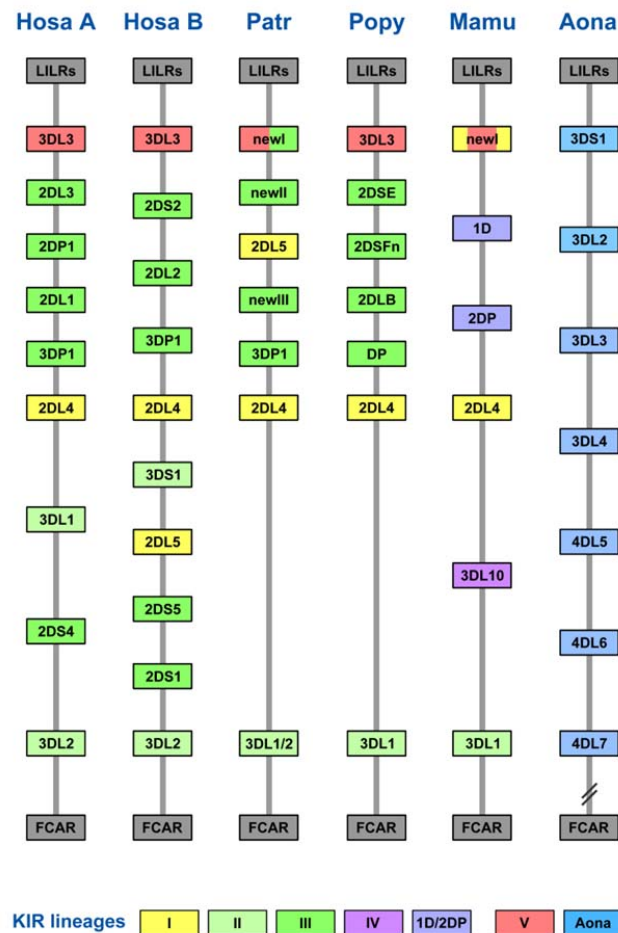


Figura 6. Esquema del locus KIR en diferentes primates. Codificado por colores se muestra el linaje al que pertenece cada uno de los genes. Hosa A, *Homo sapiens* haplotipo A; Hosa B, *Homo sapiens* haplotipo B, Patr, *Pan troglodytes*; Popy, *Pongo pygmeus*; Mamu, *Macaca mulatta*; Aona, *Aotus nancymae* (Modificada de (7)).

Una de las mayores presiones selectivas considerada en la generación de variabilidad en los KIR es su interacción con las altamente variables moléculas del MHC clase I. Las

moléculas del MHC clase I están sujetas a fuertes presiones selectivas en su sitio de reconocimiento del antígeno, lo que ha llevado a una extensa diversificación de estos genes (36). Para mantener la interacción funcional con estas moléculas, los KIR han evolucionado en paralelo mediante mecanismos de variación que incluyen duplicación y delección de genes, duplicación y delección de exones, sustituciones nucleotídicas, procesos de recombinación no homóloga y de intercambio de exones y procesos postranscripcionales como el procesamiento alternativo del mRNA. Estos procesos parecen actuar muy rápidamente como lo evidencia el hecho de que en 6.5 Ma los chimpancés y los humanos han generado una gran diferencia en el número de genes KIR, con 7 y 17 *KIR*, respectivamente.

La alta diversidad de los KIR, como resultado de diferentes mecanismos evolutivos actuando en conjunto para conservar su función de reconocer la variedad de moléculas MHC clase I, hace de este sistema un importante modelo de estudio de la evolución de las familias génicas y de las respuestas inmunes en los primates. Si bien el sistema KIR ha sido ampliamente estudiado en humanos y en menor medida en otros homínidos, para los demás grupos de primates se conoce muy poco. Actualmente solo se han caracterizado tres especies de monos del Viejo Mundo y solo una de primates del Nuevo Mundo. Considerando este vacío en el conocimiento y el valor de los KIR como modelo de estudio, se hace necesaria la caracterización del sistema KIR en otras especies de primates, como se ha hecho en este trabajo para las especies *Ateles belzebuth*, *Ateles hybridus*, *Lagothrix lagotricha*, *Ateles geoffroyi*, *Callicebus moloch* y *Saimiri boliviensis* de primates del Nuevo Mundo, y las especies de la familia Cercopithecidae de primates del Viejo Mundo *Chlorocebus aethiops*, *Papio anubis* y *Colobus guereza*.

Objetivos

General

Caracterizar molecularmente y determinar los mecanismos evolutivos de los genes de receptores de células “Natural Killer” de la superfamilia de las inmunoglobulinas específicos para el CMH clase I (KIR) en las cuatro especies de primates *Ateles hybridus*, *Ateles belzebuth*, *Ateles geoffroy* y *Lagothrix lagotricha*.

Específicos

1. Colectar muestras de sangre periférica de las especies de primates del Nuevo Mundo *Ateles hybridus*, *Ateles belzebuth* y *Lagothrix lagotricha*, provenientes de centros de rescate y rehabilitación.
2. Secuenciar los genes que codifican KIR en estas especies de primates neotropicales.
3. Inferir las homologías entre los KIR de los primates del Viejo Mundo y los primates del Nuevo Mundo usando algoritmos de reconstrucción filogenética basados en secuencias nucleotídicas y de aminoácidos.
4. Determinar los mecanismos de generación de diversidad en los KIR por medio de análisis de evolución molecular.

Métodos

Toma de Muestras

Se muestrearon seis individuos de tres especies de la familia Atelidae provenientes de dos centros de rescate y rehabilitación de corporaciones autónomas regionales del país. Cinco de los individuos provienen del Centro de rescate y rehabilitación de la Corporación Autónoma Regional de Norte de Santander – Corponor, ubicado en el municipio de Zulia. El otro individuo proviene del centro de rescate y rehabilitación de la Corporación Autónoma Regional del Alto Magdalena – CAM. Se tomó ~1.0 mL de sangre periférica de tres individuos de la especie *Ateles hybridus* (Athy11, Athy18 y Athy19), un individuo de la especie *Ateles belzebuth* (Atbe17) y dos individuos de la especie *Lagothrix lagotricha* (Lala30 y Lala66).

De cada individuo se realizó un registro fotográfico y se tomó otra información que estuviese disponible. El individuo Lala66 estaba marcado con chip, cuyo número corresponde a 009105237254. La sangre se mezcló con 1mL de agua ultrapura y 3 mL de Trizol (Invitrogen) previamente preparados en tubos Falcon de 15 mL y estos se conservaron en neveras de icopor con geles refrigerantes durante su transporte hasta el Instituto de Genética de la Universidad Nacional, donde fueron almacenados a -70°C.

Extracción de RNA y Retrotranscripción RT-PCR

A partir de las muestras de sangre se realizó la extracción de RNA total utilizando Trizol (Invitrogen) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. El RNA obtenido se resuspendió en 30µL de agua tratada con dietilpircarbonato (DEPC).

La síntesis de la primera cadena de cDNA se realizó con el KIT RevertAid™ (Fermentas), de acuerdo al protocolo recomendado por el fabricante. Para la preparación de la Mezcla1: 4,0µL de RNA, 1,0µL de OligodT18 y 7,0µL de AguaDEPC y se incubó a 65°C por 5 minutos y luego en hielo por 1 minuto. La Mezcla1 se adicionó a la Mezcla2 que contenía: 4,0µL de Buffer5x, 1,0µL de Ribolock, 2,0µL de dNTPmix y 1,0µL de EnzimaRT. El producto se incubó a 45°C por 60 minutos y luego a 70°C por 5 minutos. El cDNA se almaceno a -20°C.

La RT-PCR se realizó con el primer sentido AteKIRPS-F 5'-ATGTCGCTCATGGTCRTCAGCATG-3' que se hibrida en el exón 1 de los genes KIR y los primers antisentido NWPKIRLong-R2 5'-CTAGAGGACCCCTCAAGG-3' y NWPKIRL1-R 5'-CTAGAGGACCCCTCAGGG-3' ubicados en el exón 9 luego de la posición de los ITIMS, diseñados a partir de las secuencias génicas identificadas en las bases de datos. Las reacciones de PCR se corrieron por 35 ciclos a 95°C por 30 s, 60°C por 60 s y 72°C por 90 s en los termocicladores MaxyGen Axygen y Eppendorff Vapo-protect.

Los productos de PCR se corrieron en geles de agarosa al 1,5% en TAE y se tiñeron con SYBR® Safe (Invitrogen) para su visualización. Los productos se extrajeron del gel usando el KIT UltraClean™ 15 (MoBio 12100-300), se resuspendieron en 15,0µL de AguaDEPC y se visualizaron en geles de agarosa al 1,5% en TAE /SYBR® Safe.

Clonación y Secuenciación

Los productos de PCR purificados se clonaron usando el KIT PGEM® T-Easy Vector System I (Promega A1360) de acuerdo al protocolo sugerido por el fabricante con las siguientes especificaciones: 5,0µL de Buffer, 1,0µL T-vector, 3,0µL de los productos de PCR y 1,0µL de T4 DNA ligasa. La relación inserto:vector usada fue 3:1, preparando previamente a la ligación los 3,0µL de productos purificados de acuerdo a la cantidad aproximada de DNA presente calculada a partir del gel, comparando con el marcador HyperLadder™ II (Bioline). Los productos ligados se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora y luego a 4°C 18 horas, y se conservaron a -20°C hasta la transformación.

La transformación se realizó en células *E.coli* TOP10 con choque térmico por 2 minutos. Luego de la incubación a 37°C por 90 minutos, se centrifugaron las células a 1000g durante 10 minutos y el pellet se resuspendió en 200µL de medio LB. El total de este volumen se plaqueó en agar LB con ampicilina a 100µg/mL y con 40,0µL de XGal al 2% plaqueada sobre el medio. Las placas se incubaron a 37°C por 18 horas. Entre 25 y 30 colonias recombinantes por individuo se seleccionaron aleatoriamente para validación por PCR. En las PCR de colonia se usaron los primers del vector T7 y SP6, y se corrieron por 30 ciclos a 95°C por 30 s, 47°C por 30 s y 72°C por 105 s en los termocicladores MaxyGen Axygen y Eppendorff Vapo-protect.

Los productos de amplificación de tamaños esperados (~1500pb) se purificaron en platos de 96 pozos usando acetato de amonio y etanol al 70%. Los productos purificados se secuenciaron en ambas direcciones empleando los primers T7 y SP6, en el secuenciador capilar ABI 3500 en el Servicio de Secuenciación y Análisis Molecular del Instituto de Genética de la Universidad Nacional (SSiGMol). En los análisis se consideraron solo las secuencias que provienen de clones con al menos dos copias secuenciadas en ambas direcciones. Las secuencias se nombraron con la sigla de la especie, el número de

identificación del individuo y un número de cuatro cifras que indica el clon del que provienen (por ejemplo Athy100146). Las variantes de procesamiento alternativo identificadas se nombraron agregando al nombre de la secuencia las letras sv y los cuatro dígitos que indican el clon del cual son variante (por ejemplo Athy100142sv0143).

Análisis de Secuencias Genómicas del Locus KIR en Primates del Nuevo y del Viejo Mundo

Secuencias de DNA genómico del locus KIR se obtuvieron de bases de datos públicas de los primates del Nuevo Mundo *Ateles geoffroyi* (Atge Clon UC1-11A1 AC234015), *Saimiri boliviensis* (Sabo clon CH254-38J22 AC209136 y clon CH254-336F20 AC226622) y *Callicebus moloch* (Camo clon LB5-391K23 AC187443). Y de los primates del Viejo Mundo *Chlorocebus aethiops* (Chae clon CH252-40H18 AC212539), *Papio anubis* (Paan clon RP41-226P18 AC149449 y clon RP41-326E7 AC150233) y *Colobus guereza* (Cogu clon CH272-160C21 AC195028). Estas son secuencias incompletas de clones de cromosomas artificiales bacterianos (BACs) generados en el marco de la iniciativa de Secuenciación de Vertebrados del Centro Intramural de Secuenciación del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos (www.nisc.nih.gov). Las secuencias borrador de los clones BAC contienen gaps de tamaño desconocido separando contigs ordenados. Estas secuencias se analizaron con el programa Genscan (<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>) para identificar modelos génicos, su localización en la secuencia BAC y su estructura intrón – exón. Utilizando los péptidos predichos por Genscan se identificó la localización aproximada del locus KIR en los clones. El locus KIR se delimitó empleando el gen *LILRB2* predicho para *Callithrix jacchus* a partir del genoma (NW_003187383), y el exón 3 del gen *FcAR* de *Saimiri boliviensis* (EF077236). Los modelos génicos se compararon con bases de datos mediante BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para identificar genes KIR y los genes flanqueantes del locus. Los modelos génicos KIR se nombraron empleando las primeras dos letras del género y de la especie, un guión, las características estructurales y un número consecutivo que indica el orden en que aparecen en el locus desde el extremo 5' hacia el 3', por ejemplo Atge-KIR3DL6 o Camo-KIRDP1.

Análisis de Secuencias y Reconstrucción Filogenética

Las secuencias de cDNA y DNA genómico se alinearon con el programa ClustalW y se editaron manualmente con el programa Bioedit (37). En el alineamiento se incluyeron secuencias de KIR de primates previamente reportadas.

El análisis filogenético se realizó a partir de secuencias de nucleótidos y de aminoácidos con las secuencias completas y con los dominios D0, D1, D2 y STC por separado. Para definir el modelo de sustitución a emplear se usó el programa Jmodeltest utilizando los criterios de búsqueda Akaike y Bayesiano, el modelo sugerido fue GTR (Generalized time-reversible) y considerando proporción de sitios invariables (I) y distribución gamma (G) para la tasa de variación entre sitios. Las reconstrucciones filogenéticas se realizaron por inferencia Bayesiana y por Máxima verosimilitud. Para inferencia bayesiana se usó el programa MrBayes (38, 39) utilizando los parámetros para el modelo GTR+I+G en el caso de la reconstrucción con nucleótidos y utilizando el modelo Poisson para la reconstrucción con aminoácidos. Para Máxima verosimilitud se usó el programa Mega5 (40) utilizando el test de filogenia bootstrap con 1000 replicas y el modelo GTR+I+G. Como grupo externo se incluyeron secuencias de *KIR* de foca (números de acceso FJ190095 y FJ190086). Se realizaron análisis de selección natural comparando la razón entre la divergencia de sitios sinónimos y la divergencia de sitios no sinónimos (Ka/Ks) con el programa DnaSP (41) utilizando la opción Sliding Window con una longitud de ventana de 50 nucleótidos y un tamaño de escalón de 10 nucleótidos. Este análisis se realizó con diferentes grupos organizados por especie (Athy, Atbe, Atge, Lala, Sabo y Aona), género (*Ateles* y *Lagothrix*), familia (Atelidae) y suborden (Platyrrhini). Finalmente, en las secuencias obtenidas a partir de los clones BAC se identificaron los retroelementos presentes en los intrones y las regiones intergénicas del locus KIR con el programa RepeatMasker (<http://www.repeatmasker.org/>).

Resultados

Caracterización de Genes y Haplotipos KIR en Primates Neotropicales

Caracterización de KIR Transcritos en la Familia Atelidae

Se identificaron un total de 37 cDNAs de KIR en las tres especies *A. hybridus*, *A. belzebuth* y *L. lagotricha*. De estas secuencias 25 corresponden a KIR con tres dominios Ig cuyas principales características estructurales se muestran en la **Figura 7**. Las 12 secuencias restantes corresponden a variantes de procesamiento alternativo.

En los 3 individuos de *A. hybridus* se obtuvieron 17 secuencias completas y 6 variantes de procesamiento alternativo. De las 17 secuencias completas 6 codifican para dominios citoplasmáticos cortos con el codón de parada en la posición 34 del dominio y el aminoácido cargado arginina en la cuarta posición de la región transmembrana sugiriendo que corresponden a receptores activadores. Las 11 secuencias restantes codifican para KIR con dominios citoplasmáticos largos característicos de receptores inhibitorios. Dos de estas secuencias, Athy110124 y Athy190173 carecen del exón 6 y por tanto no codifican los primeros 17aa de los 23 que conforman la región tallo (**Figura 7**). Además, ambas secuencias codifican para dos motivos ITIM conservados y no presentan codón de parada, por lo que es posible que parte de la región 3' de estas moléculas no se haya amplificado con los primers usados. La delección del exón 6 es típica del gen *KIR3DL3* de los humanos (23). Las secuencias Athy110130, Athy180141 y Athy190162 carecen del exón 7 por lo que no codifican los 7 últimos aminoácidos de la región tallo, toda la región transmembrana y los 8 primeros aminoácidos de la región citoplasmática. Además, estas tres secuencias tienen el ITIM proximal no canónico, mientras que el segundo se conserva. Las otras 6 secuencias que codifican para receptores con dominios citoplasmáticos largos presentan los dos ITIMs conservados. Tres de ellas presentan el codón de parada en la posición 85 del dominio, mientras que en las otras tres no se alcanzó en la secuencia, pero parece coincidir con el de las secuencias de *KIR3DL3-6* de *A. geoffroyi*.

Cinco secuencias se obtuvieron en el único individuo estudiado de la especie *A. belzebuth*, 3 completas y 2 correspondientes a variantes de procesamiento alternativo. De las 3 secuencias completas, Atbe170185 codifica para un KIR con dominio citoplasmático corto con el codón de parada en la posición 34 de este dominio, y con el aminoácido cargado arginina en la cuarta posición de la región transmembrana, sugiriendo que corresponde a un receptor activador. Atbe170178 codifica un KIR con dominio citoplasmático largo y los dos ITIMs conservados y Atbe170263 es un pseudogen pues codifica un codón de parada prematuro en la posición 85 del dominio D2 (**Figura 7**).

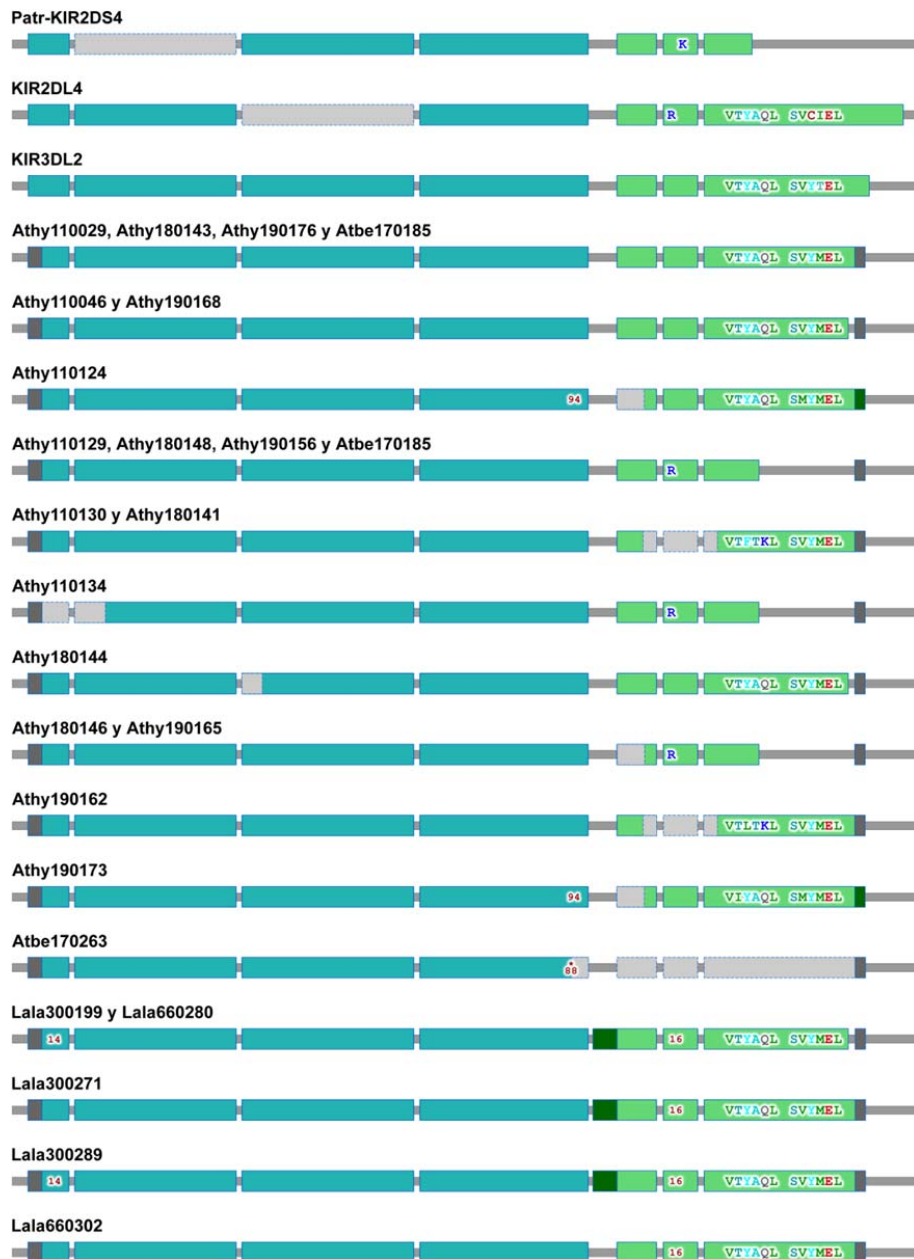


Figura 7. Características estructurales de las secuencias KIR identificadas a partir de cDNA en las 3 especies de primates del Nuevo Mundo.

Gris oscuro, primers de amplificación; gris claro, regiones ausentes en el cDNA o en las proteínas por codones de parada prematuros; azules, dominios PS (24aa), D0 (95aa), D1 (100aa) y D2 (98aa); verde claro, dominios S (23aa), T (20aa) y C (36, 84 y 87aa); verde oscuro, región adicional (14aa) en el S de las secuencias de *Lagothrix*. Números en los dominios, posición de aa faltantes; con asterisco, codones de parada prematuros; R (arginina) y K (lisina), aa positivos en T; VTYAQL y SVYMEL y variantes, secuencia de los ITIMs en C. Patr-KIR2DS4, KIR2DL4 y KIR3DL2 se usan como referencia.

De los 9 cDNAs secuenciados en los 2 individuos de *L. lagotricha*, 5 corresponden a secuencias completas y 4 a variantes de procesamiento alternativo. Las 4 secuencias completas Lala300199, Lala300271, Lala0289 y Lala660280 codifican 14 aminoácidos adicionales entre los dominios D2 y tallo que no parecen provenir del intrón ubicado entre los exones 5 y 6, y no es posible determinar si pertenece al extremo 3' del exón 5 o al extremo 5' del exón 6. Esto parece ser una característica predominante entre los KIR de esta especie (**Figura 7**). La secuencia completa restante, Lala660302, no presenta esta inserción. Todos los cDNAs secuenciados en *L. lagotricha* presentan la delección de tres nucleótidos que corresponden al aminoácido 16 de la región transmembrana y codifican para KIR con dominios citoplasmáticos largos con los dos ITIMs conservados. En esta especie no se identificaron cDNAs con dominios citoplasmáticos cortos o con aminoácidos cargados positivamente en la región transmembrana. Las secuencias Lala300199 y Lala660280 presentan el codón de parada en la posición 85 del dominio citoplasmático mientras que para las otras tres no se alcanzó en la secuencia, pero parece coincidir con el de las secuencias de KIR3DL3-6 de *A. geoffroyi*.

Las secuencias de cDNA identificadas en las tres especies de atélidos codifican para receptores inhibitorios o activadores, y no se identificó ninguna con una posible función dual (dominios citoplasmáticos largos con ITIMs conservados y un aminoácido cargado en la región transmembrana) como ocurre en los KIR2DL4 de las especies homínoides. Tampoco se encontraron secuencias con la delección del exón 4 que caracteriza a los genes del linaje I, pero sí se identificaron transcritos con la delección del exón 6 como ocurre en el KIR3DL3 del linaje V.

En las tres especies analizadas se identificaron variantes de procesamiento alternativo. En *A. hybridus* de las 6 secuencias de cDNA que corresponden a variantes de procesamiento alternativo, Athy110001, Athy180142 y Athy190172 no presentaron los últimos 67 aminoácidos del dominio D0, mientras que Athy110137, Athy110138 y Athy190118 no codifican los primeros 12 aminoácidos del dominio D1 (**Figura 8**). De las variantes de procesamiento alternativo identificadas en *A. belzebuth*, Atbe170189 corresponde a una variante de Atbe170178 en la que faltan los primeros 12 aminoácidos del D1, y Atbe170192 corresponde a una variante de Atbe170185 que carece de todo el dominio D0. Por su parte, las variantes de procesamiento alternativo identificadas en *L. lagotricha*, Lala300204 y Lala660212 carecen de los 14 aminoácidos adicionales entre los dominios D2 y tallo. En Lala300296 faltan los primeros 72 aminoácidos del dominio D2, y en Lala660209 faltan los primeros 12 del dominio D1.

Las variantes de procesamiento alternativo identificadas en Atélidos pueden resumirse en cinco tipos de acuerdo a los dominios que afectan (**Figura 8**). Los dos primeros tipos en el dominio D0 corresponden a la exclusión de 67 aminoácidos hacia el extremo 3' y la exclusión completa del dominio. Dos también en el dominio D1 corresponden a la exclusión de los primeros 12 y de los primeros 72 aminoácidos. El quinto tipo es exclusivo de *Lagotrix* y corresponde a la exclusión de la región adicional que se presenta entre los

dominios D2 y tallo en las secuencias de esta especie. De las variantes de procesamiento alternativo identificadas la exclusión de 12 aminoácidos al inicio del dominio D1 ya se había reportado en secuencias KIR de humanos y de cercopitécidos (17, 22), además esta variante es la más recurrente entre los cDNA de los atélidos.

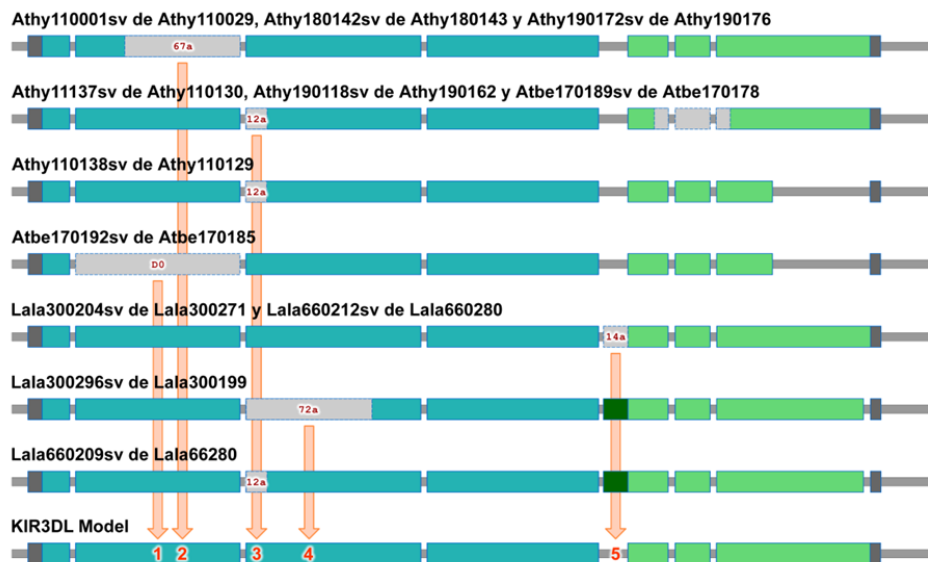


Figura 8. Variantes de procesamiento alternativo en las secuencias de las 3 especies de primates del Nuevo Mundo identificadas a partir del cDNA.

Los números en rojo indican la longitud en aa que se excluyen de la proteína, los números en el modelo indican los 5 tipos de variantes identificadas en los KIR de los primates del Nuevo Mundo.

Organización Genómica del Locus KIR en Primates del Nuevo Mundo

Los clones BAC de *Ateles geoffroyi* (Atge), *Saimiri boliviensis* (Sabo) y *Callicebus moloch* (Camo) obtenidos de la base de datos del Centro Intramural de Secuenciación del NIH, contenían el locus KIR flanqueado por los genes LILRs al extremo 5' y el gen FcAR al extremo 3'.

Se identificaron 16 genes KIR en estas especies, 6 en *A. geoffroyi*, 7 en *S. boliviensis*, y 3 en *C. moloch*. Como comparación se utilizó el haplotipo KIR de *Aotus nancymae* previamente reportado (18), en el que además de los 8 modelos KIR descritos se identificó 1 nueva secuencia correspondiente a un pseudogen. Las características estructurales más relevantes de estas secuencias se muestran en la **Figura 9 (Anexos)**. Se identificaron cuatro secuencias parciales, *Sabo-KIR3DL5P*, *Sabo-KIR3DL6P*, *Camo-KIR3DL2P* y *Camo-KIR3DL3P* interrumpidas por gaps entre los contigs de los clones BAC. En cada una de las especies estudiadas se identificó un pseudogen, caracterizado por la presencia de codones de parada prematuros en los exones que codifican los dominios Ig y por la ausencia de exones. Los pseudogenes *Atge-KIR3DP1*, *Camo-KIRDP1* y *Aona-KIR3DP1* presentan un codón de parada prematuro en el D0 en las

posiciones 21, 53 y 53, respectivamente. El pseudogen *Sabo-KIRDP3* presenta un codón de parada prematuro en el aa 75 del D1. Exceptuando los pseudogenes y las secuencias parciales, los KIR caracterizados a partir de clones BAC corresponden a receptores de tres dominios Ig con dominios citoplasmáticos largos, sin embargo algunos de ellos presentan el aminoácido cargado arginina en la cuarta posición del dominio transmembrana.

Estructura del locus KIR en *A. geoffroyi*

En esta especie tres clones BAC contenían distintos genes KIR, sin embargo solo uno de ellos, el clon BAC UC1-11A1 (AC234015) contiene el locus KIR completo. La secuencia borrador de este clon BAC está conformada por 11 fragmentos separados por gaps de tamaño desconocido (**Figura 10**). El gen flanqueante *LILRB2* está en el primer fragmento del clon BAC, mientras que el primer *KIR* aparece en el fragmento 4. Los 6 genes *KIR* identificados en este clon BAC, así como el gen flanqueante *FcAR* se ubican en el fragmento 4. Este haplotipo es el más completo descrito para primates del Nuevo Mundo hasta el momento. A excepción del pseudogen *Atge-KIR3DP1*, los genes son de aproximadamente 10 kpb, separados por regiones intergénicas de aproximadamente 2.4 kpb. Tanto los intrones como las regiones intergénicas son similares en secuencia y comparte varios retroelementos. Los dos primeros genes en el extremo 5' del haplotipo, *Atge-KIR3DP1* y *Atge-KIR3DL2*, se transcriben en dirección opuesta a los otros 4 KIR. *Atge-KIR3DL2* carece del exon 6 y por tanto de 17 de los 23 aminoácidos que conforman el tallo en la proteína (**Figura 9**). Además, esta secuencia presenta dos ITIMs conservados en una región citoplasmática inusualmente larga, con el codón de parada en la posición 116 del dominio. Esta configuración es idéntica a la descrita para los cDNAs de *A. hybridus* *Athy110124* y *Athy110173* y caracteriza a los KIR del linaje I de primates. Los modelos génicos *Atge-KIR3DL3*, *Atge-KIR3DL4* y *Atge-KIR3DL5* codifican para el residuo arginina en la cuarta posición de la región transmembrana y para un ITIM proximal no canónico (VTFTKL) y un ITIM distal conservado. Estas características se han visto en el *KIR2DL4* de Rhesus (33) y puede indicar que los productos de estos genes tienen una función dual en activación e inhibición. Finalmente, el modelo génico más 3', *Atge-KIR3DL6*, codifica para receptores sin aminoácidos cargados en la región transmembrana y con dos motivos ITIMs conservados.

Revisión de la Estructura del Locus KIR en *A. nancymae*

El locus KIR en *A. nancymae* ha sido analizado previamente (18), a partir de la secuencia parcial del clon BAC CH258-187H8 (AC193069). Este análisis mostró la presencia de 8 modelos KIR, 4 de los cuales son completos y otros cuatro parcialmente secuenciados. El haplotipo KIR de *A. nancymae* se caracteriza por la presencia de tres modelos génicos que codifican para receptores con 4 dominios Ig. En este estudio se revisó la arquitectura de este haplotipo incorporando el clon BAC CH258-69P6 (AC234076), el cual también contiene información del haplotipo. Esta revisión resultó en el cierre de dos gaps verificando por un lado que los KIR *Aona-KIR4DL5* y *Aona-KIR4DL6* son contiguos, y que

dos modelos KIR reportados como parciales, *Aona-KIR4D7* y *Aona-KIRDL8*, son en realidad parte de un solo KIR ahora nombrado como *Aona-KIR4DL78*.

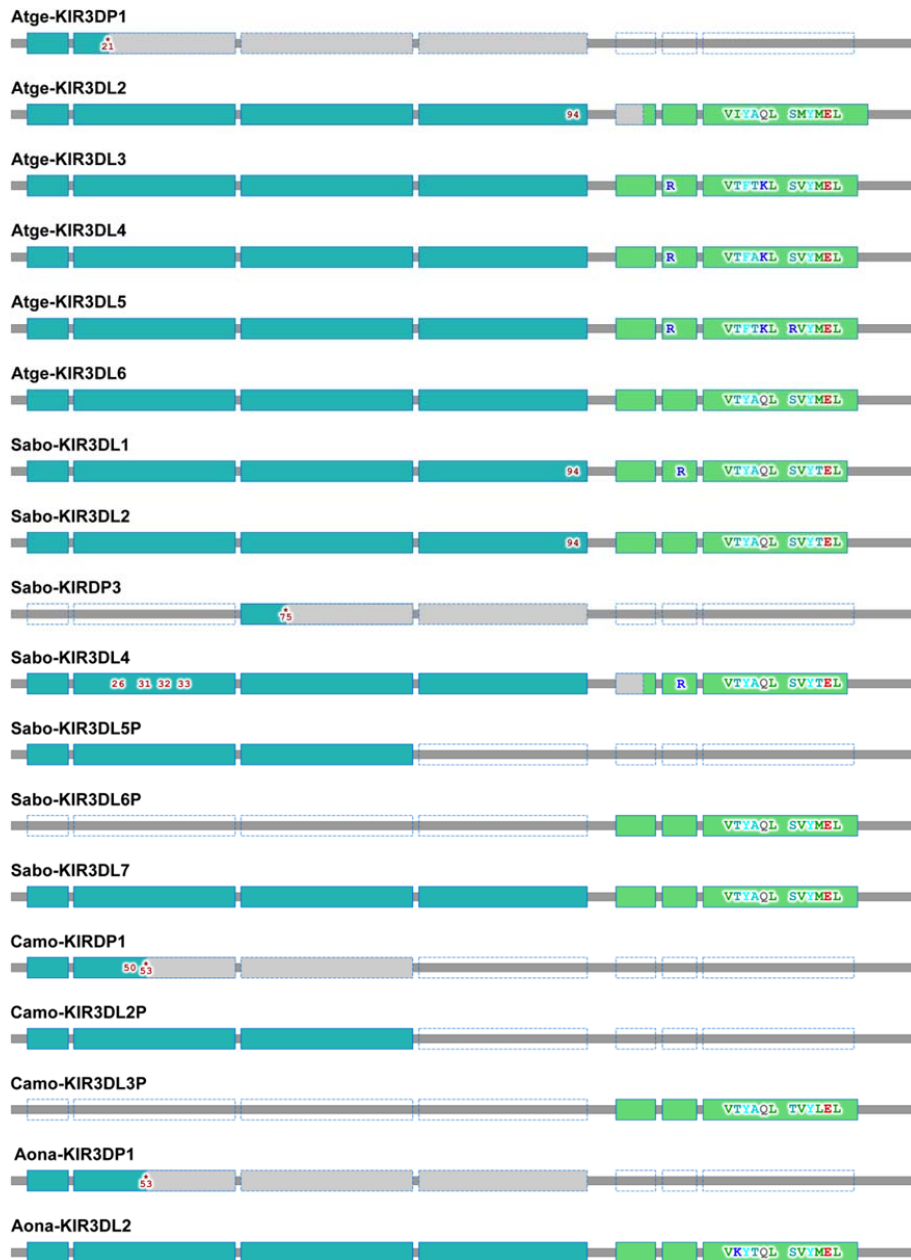


Figura 9. Características estructurales de las secuencias KIR identificadas a partir de clones BAC en primates del Nuevo Mundo.

Gris claro, regiones faltantes en las proteínas; Sin color: regiones faltantes en el DNA. Lo demás como en la Figura 7.

Además se identificaron secuencias correspondientes a los exones 1 en los fragmentos adyacentes 5' a los genes *Aona-KIR3DL4* y *Aona-KIR4DL5*, los cuales fueron reportados como parciales por la ausencia del exón 1 y parte del intrón 1. Por lo tanto, es probable que las secuencias de los exones 1 completen estos dos modelos génicos. El análisis también resultó en la identificación del pseudogen *Aona-KIR3DP1*, que se localiza en el extremo 5' del haplotipo (**Figura 11**), tiene solo los exones 1-5 y presenta un codón de parada prematuro en el exón 3 (**Figura 9**). Este pseudogen y los dos modelos génicos que le siguen, *Aona-KIR3DL2* y *Aona-KIR3DS1*, se transcriben en dirección opuesta al resto de los modelos, como es el caso para los dos primeros modelos del haplotipo de *A. geoffroyi* (**Figura 10**). La última revisión del haplotipo consiste en la inversión en el orden de los modelos *Aona-KIR3DL2* y *Aona-KIR3DS1*. La longitud de los genes que codifican receptores de 3 dominios Ig es de aproximadamente 11 kpb, mientras que la de aquellos que codifican receptores de 4 dominios Ig es de aproximadamente 13 kpb. La longitud de las regiones intergencias es de 2.4 kpb, exceptuando aquellas entre los genes *Aona-KIR3DL2-3DS1* y *Aona-KIR3DS1-3DL3* que son de 5.9 y 4.7 kpb respectivamente. Las regiones intergénicas comparten retroelementos entre si y son similares a los presentes en el haplotipo de *A. geoffroyi*, los mismo ocurre con las regiones intrónicas (**Figura 10** y **Figura 11**).

Estructura del Locus KIR en *S. boliviensis*

En *S. boliviensis* dos clones BAC contienen secuencias del locus KIR, CH254-38J22 (AC209136) y CH254-336F20 (AC226622). El primero de ellos abarca el locus KIR completo, y el alineamiento entre los dos permite resolver un gap en la secuencia del clon BAC CH254-38J22 entre los fragmentos 5 y 6 (**Figura 12**). En este haplotipo se identificaron 7 modelos génicos, de los cuales 4 son completos, 3 son parciales y 1 es un pseudogen. El haplotipo se organiza con los genes *Sabo-KIR3DL1* y *Sabo-KIR3DL2* en el extremo 5' antes del pseudogen *Sabo-KIRDP3*, seguidos de los genes *Sabo-KIR3DL4*, *Sabo-KIR3DL5P*, *Sabo-KIR3DL6P* y *Sabo-KIR3DL7*. Todos los modelos exceptuando el pseudogen codifican para receptores con 3 dominios Ig, dos motivos ITIMs conservados y el codón de parada en la posición 85 del dominio citoplásmico (**Figura 9**). *Sabo-KIR3DL1* y *Sabo-KIR3DL4* codifican además para el aminoácido cargado arginina en la cuarta posición del dominio transmembrana lo que sugiere funciones tanto activadoras como inhibitorias. *Sabo-KIR3DL4* carece del exón 6 como ocurre en *Atge-KIR3DL2*, codificando receptores con un tallo más corto. La longitud de los modelos génicos es aproximadamente 11 kpb, a excepción de *Sabo-KIR3DL4* que careciendo del exón 6 tiene un tamaño de 8.9 kpb. Como en los otros haplotipos analizados, los retroelementos en las regiones intergénicas y en los intrones son compartidos y similares a los identificados en *A. geoffroyi* y *A. nancymae*.

Estructura del Locus KIR en *C. moloch*

En *C. moloch* el BAC LB5-391K23 (AC187443) contiene el locus KIR y los dos genes flanqueantes, *LILR2B* y *FcAR*. Sin embargo, en la secuencia parcial del clon BAC solo se identificaron tres modelos génicos, uno corresponde al pseudogen *Camo-KIR3DP1* que

tiene un codón de parada prematuro en el exón 3, y los otros dos corresponden a los modelos parciales *Camo-KIR3DL2P* y *Camo-KIR3DL3P* (**Figura 12**). *Camo-KIR3DP1* está separado del gen flanqueante *LILR2B* por un gap entre los fragmentos 4 y 5. El pseudogen y *Camo-KIR3DL2P* están separados de *Camo-KIR3DL3P* por un gap entre los fragmentos 5 y 6; y *Camo-KIR3DL3P* es contiguo al gen flanqueante *FcAR* sobre el fragmento 6. *Camo-KIR3DLP* tiene los exones que codifican el dominio citoplasmático con dos motivos ITIMs conservados. Los retroelementos identificados en los intrones y las regiones intergénicas son similares a los presentes en los haplotipos de las otras especies de primates del Nuevo Mundo.

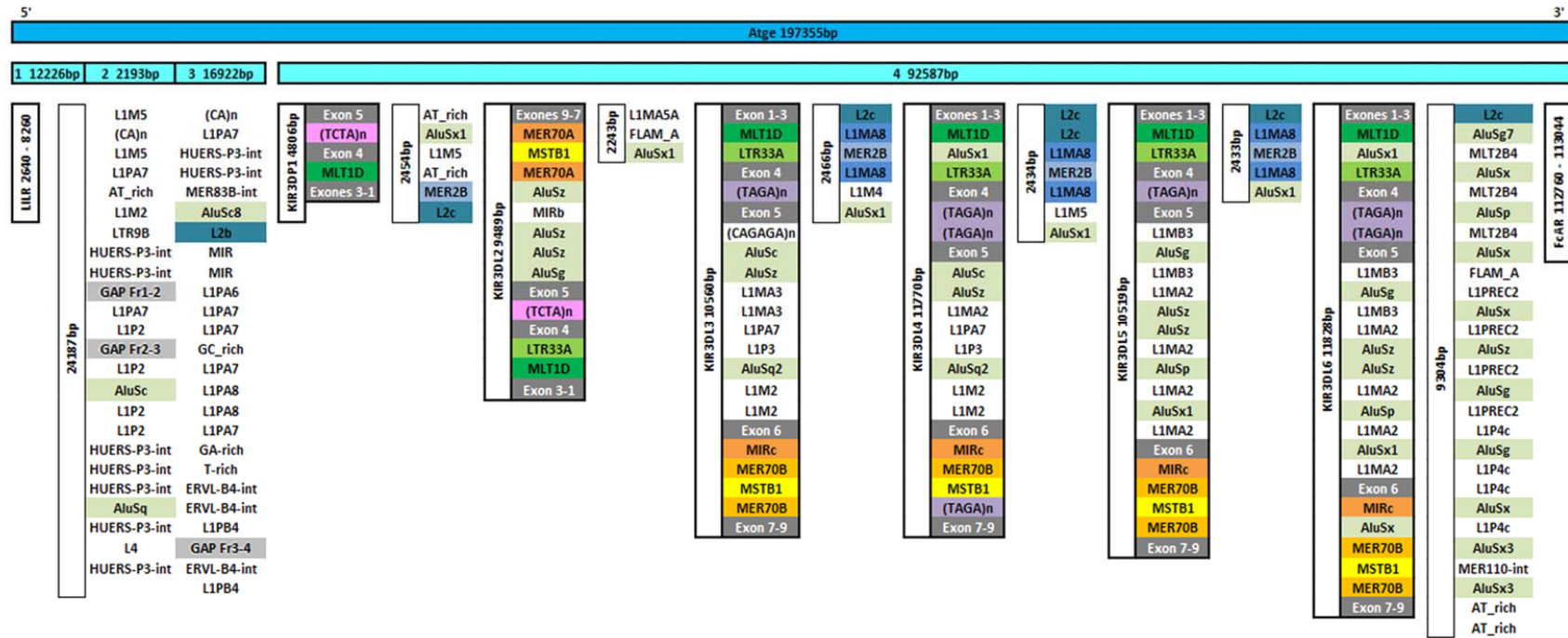


Figura 10. Haplotipo del locus KIR para Atge.

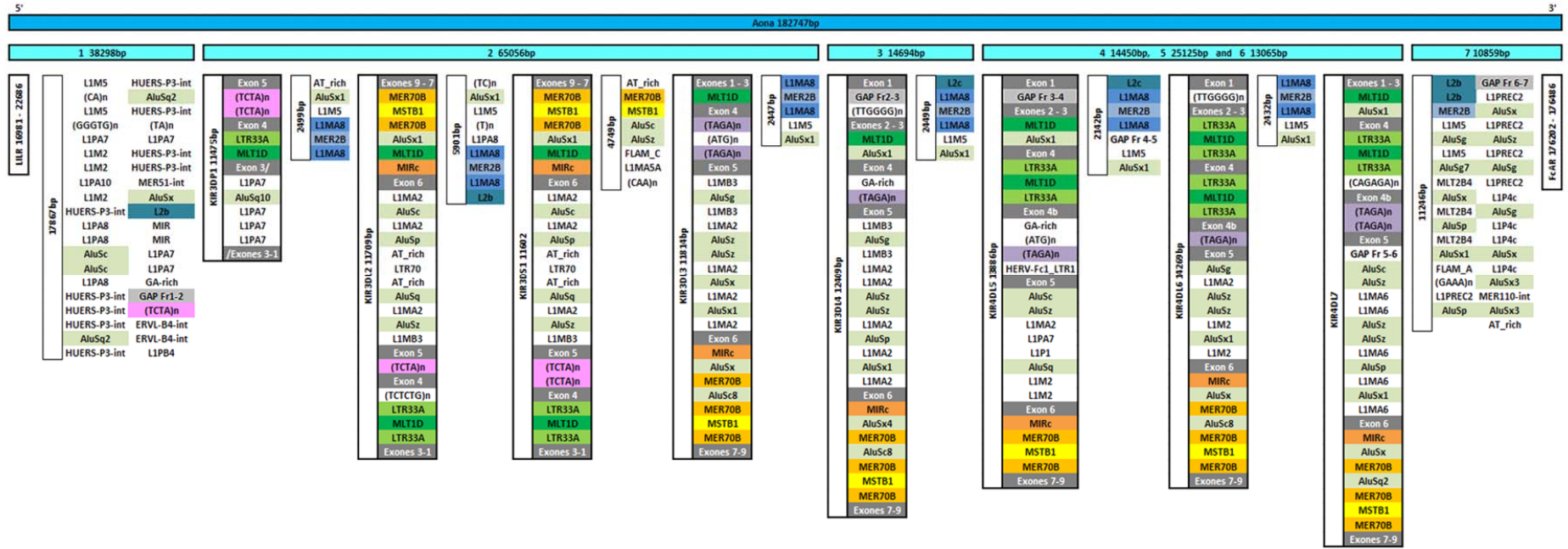


Figura 11. Haplotipo del locus KIR para Aona

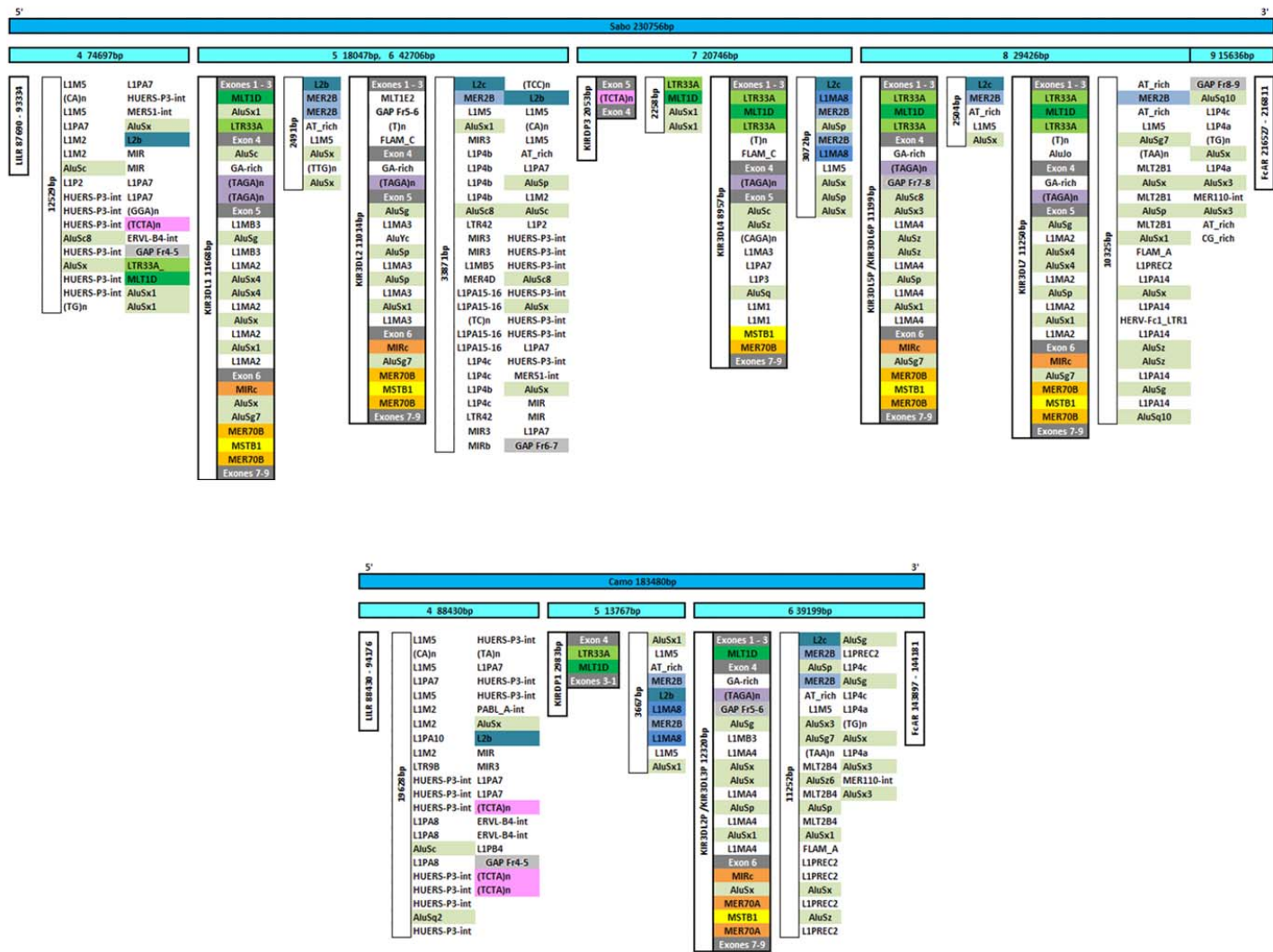
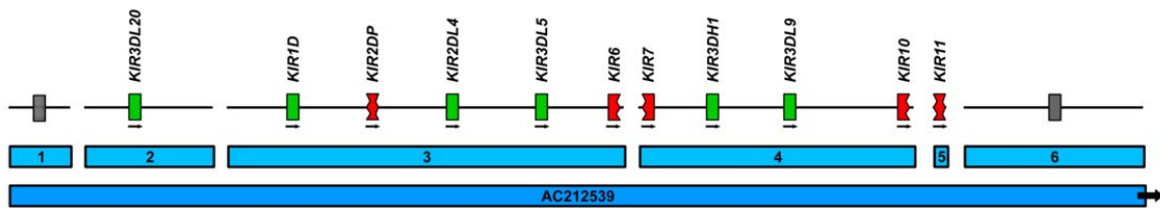


Figura 12. Haplotipo del locus KIR para Sabo y para Camo.

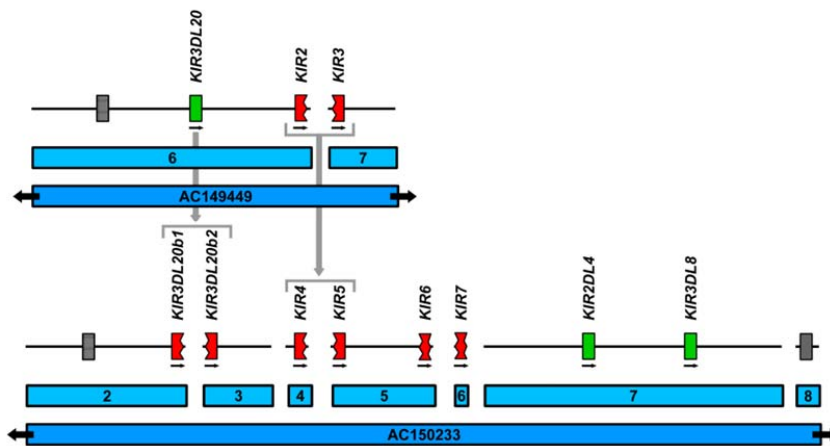
Caracterización de Genes y Haplotipos KIR en Cercopitécidos

Para analizar la estructura y evolución de los KIR de los primates del Nuevo Mundo en el contexto de los demás grupos de primates, se caracterizaron los haplotipos KIR en las tres especies de cercopitécidos *Chlorocebus aethiops*, *Papio anubis* y *Colobus guereza*

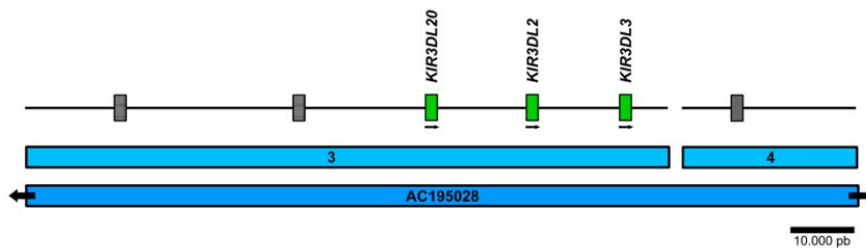
Chlorocebus aethiops



Papio anubis



Colobus guereza



(Figura 13).

Figura 13. Organización de los genes KIR identificados en los clones BAC de los cercopitécidos. Verde, genes completos; rojo, genes parciales incompletos hacia el borde acerrado; gris, genes flanqueantes LILR y FcAR; flecha bajo los genes, sentido de transcripción.

Dicha caracterización se hizo a partir de datos de secuencias de clones BAC generados en el Centro Intramural de Secuenciación del NIH. En *C. aethiops* el locus KIR fue identificado en el clon BAC CH252-40H18 (AC212539), en *P. anubis* en los dos clones BAC RP41-226P18 (AC149449) y RP41-326E7 (AC150233) y en *C. guereza* en el clon BAC CH272-160C21 (AC195028) (**Figura 13**).

En las tres especies de cercopitécidos se identificaron 25 modelos génicos KIR, 11 en *C. aethiops*, 11 en *P. anubis* y 3 *C. guereza*. 12 de estos modelos codifican para receptores con dominios citoplasmáticos largos con dos ITIMs conservados, de estos modelos tres tienen el aminoácido cargado positivamente arginina en la cuarta posición de la región transmembrana. 5 modelos presentan codones de parada prematuros y los 8 restantes son secuencias parciales debido a la secuenciación incompleta de los clones BAC. Las características de los modelos KIR de cercopitécidos se describen en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Características generales de los genes KIR identificados en los cercopitécidos.

Especie	BAC y Frag	Nombre del KIR	Dominios Ig			Dominios STC			
<i>Chlorocebus aethiops</i>	AC211841	2	Chae-KIR3DL20	D0	D1	D2	S	T	L - ITIMs
			Chae-KIR1D2	D0*	D1	D2	S*		
			Chae-KIR2DP3	-	D1*	D2	-	-	-
		3	Chae-KIR2DL4	D0	-	D2	S	aaR	L - ITIMs
			Chae-KIR3DL5	D0	D1	D2	S	T	L - ITIMs
			Chae-KIR6	D0	--	--	--	--	--
			Chae-KIR7	--	--	D2	S	T	L - ITIMs
		4	Chae-KIR3DH1	D0	D1	D2	S	aaR	L - ITIMs
			Chae-KIR3DL9	D0	D1	D2	S	T	L - ITIMs
			Chae-KIR10	D0	D1	--	--	--	--
			5	Chae-KIR11	--	--	D2	--	--
<i>Papio anubis</i>	AC149449	6	Paan-KIR3DL20a	D0	D1	D2	S	T	L - ITIMs
			Paan-KIR2	D0*	--	--	--	--	--
		7	Paan-KIR3	--	--	D2*			
	AC150233	2	Paan-KIR1b1	D0	--	--	--	--	--
		3	Paan-KIR1b2	--	--D1	D2	S	T	L - ITIMs
		4	Paan-KIR4	--	--	--	--	--	--
		5	Paan-KIR5	--	D1	D2*			
6	Paan-KIR6	-	D1	--	--	--	--		
7	Paan-KIR7	--	--	D2	--	--	--		
<i>Colobus guereza</i>	AC195028	3	Cogu-KIR2DL4	D0	-	D2	S	aaR	L - ITIMs
			Paan-KIR3DL8	D0	D1	D2	S	T	L - ITIMs
			Cogu-KIR3DL20	D0	D1	D2	S	T	L - ITIMs
		Cogu-KIR3DL2	D0	D1	D2	S	T	L - ITIMs	
		Cogu-KIR3DL3	D0	D1	D2	S	T	L - ITIMs	

* : dominios con codones de parada. - : dominios ausentes en la secuencia génica. -- : dominios ausentes debido a gaps entre los fragmentos del BAC. Espacios en blanco: dominios no considerados por codones de parada presentes en dominios anteriores. aaR: aminoácido positivo R en la región transmembrana. L- ITIMs: colas citoplasmáticas largas con dos motivos ITIMs presentes. En verde se marcan las secuencias completas y en azul las parciales.

Como en los los haplotipos KIR de los primates del Nuevo Mundo, la mayoría de los retroelementos identificados en los intrones se conservan entre los KIR. Algunos de estos retroelementos sustentan relaciones de homología con genes hominoides, por ejemplo los genes Chae-KIR2DL4 y Paan-KIR2DL4 comparten con el KIR2DL4 (humano) el retroelemento MIR en el intrón ubicado entre los exones 6 y 7, mientras que los demás genes de los otros linajes de los primates del Viejo Mundo no lo presentan (**Figura 14**). Otro ejemplo es el retroelemento L2a entre dos AluSz en el intrón 3-7, cuya presencia comparten las secuencias tipo 2DL5/3DL20.

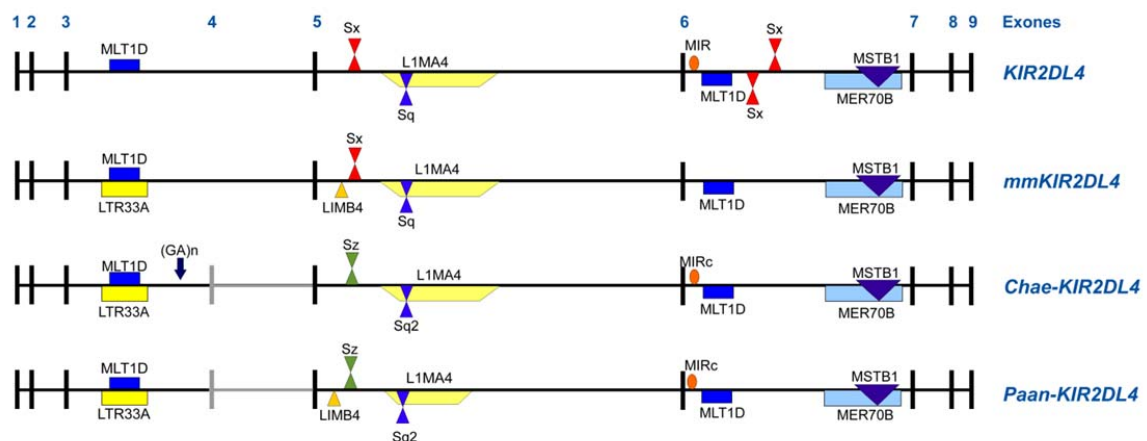


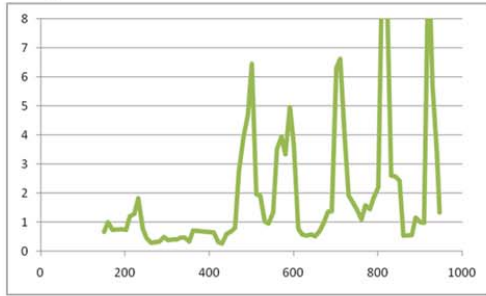
Figura 14. Retroelementos en los genes tipo 2DL4 de los Primates del Viejo Mundo.

Diversificación acelerada en los KIR de los Primates del Nuevo Mundo

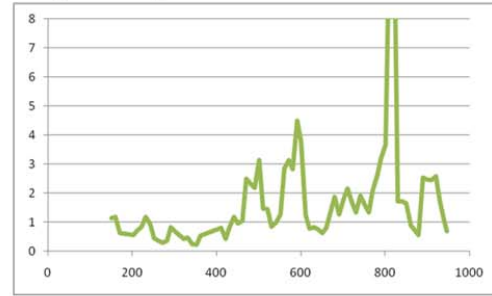
Las secuencias de genes KIR de las diferentes especies de primates del Viejo Mundo presentan, entre sí, distancias promedio mayores que las de los KIR de los primates del Nuevo Mundo (**Tabla 2**). La diferencia en distancia entre las secuencias de estos dos grupos es mayor que al interior de ellos. Las especies *C. guereza* y *S. bolibiensis* son las que presentan mayores valores de distancia en el grupo de primates del Viejo y del Nuevo Mundo respectivamente. Estos valores indican una tendencia de diversificación diferencial.

Las comparaciones hechas de la razón Ka/Ks entre las secuencias KIR de primates del Nuevo Mundo para el gen completo muestran valores Ka/Ks diferentes de 1, sugiriendo que estos genes no están evolucionando de manera neutral (**Tabla 3**). La evaluación de la razón Ka/Ks por posiciones permitió identificar regiones del gen que parecen estar sometidas a mayores presiones de selección (**Figura 15**).

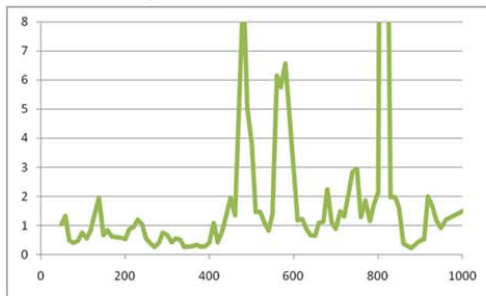
Athy vs. Atbe



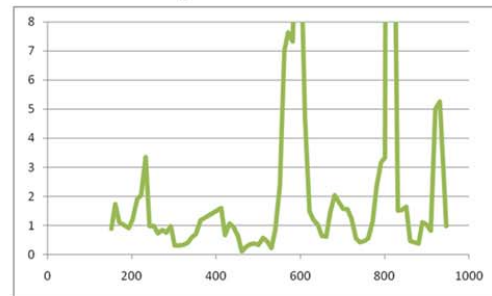
Athy vs. Atge



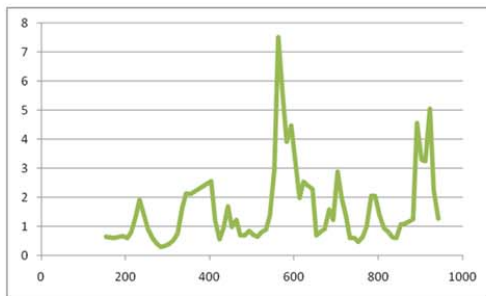
Atbe vs. Atge



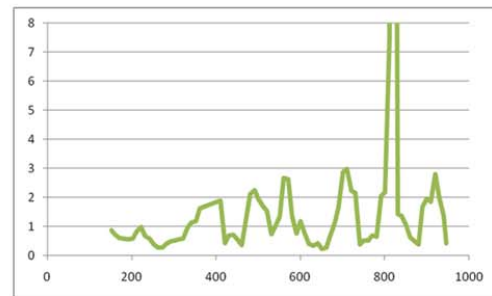
Ateles vs. Lagotrix



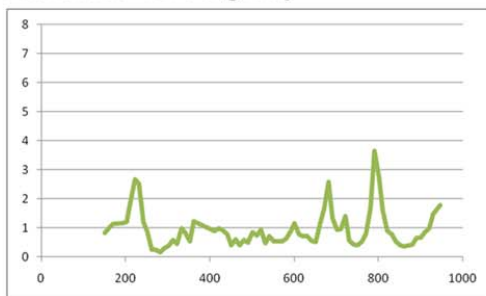
Atelelidos vs. Sabo



Atelelidos vs. Aona



Atelelidos vs. outgroup



NWP vs. outgroup

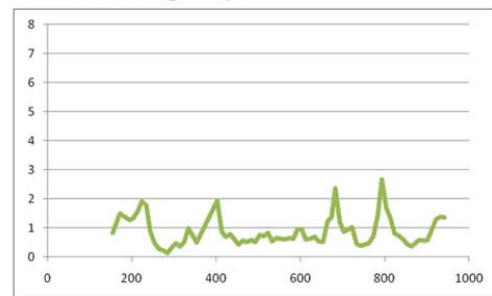


Figura 15. Evaluación por posición, de la divergencia Ka/Ks entre los grupos definidos. Se utilizó una ventana de 50pb y un tamaño de peldaño de 10pb. El eje horizontal representa la posición en los nucleótidos, y el eje vertical el valor de la razón Ka/Ks.

Algunos de los valores Ka/Ks son extremadamente altos y no son confiables, estos valores pueden explicarse por tres escenarios, el primero es que se están comparando genes cuya ortología no está definida, por lo que se incluye un primer margen de error asociado al asumir que la evolución de estos diferentes genes es comparable. El segundo escenario es que en la ventana de análisis considerada no se presenten sustituciones sinónimas y al no ser posible dividir por cero el programa asigna un valor extremo relacionado con el número de sustituciones no sinónimas. Y el tercero es que las secuencias comparadas ya hayan sufrido procesos de saturación que generan la sobre estimación de la razón Ka/Ks.

Tabla 2. Distancia promedio entre los genes KIR de las especies de primates del Viejo y del Nuevo Mundo.

	GExt	Hosa	Patr	Papa	Gogo	Popy	Mamu	Mafa	Chae	Cogu	Paan	Athy	Atbe	Lala	Atge	Sabo
Hosa	0,31															
Patr	0,32	0,10														
Papa	0,32	0,11	0,09													
Gogo	0,31	0,11	0,10	0,09												
Popy	0,32	0,11	0,10	0,10	0,10											
Mamu	0,29	0,13	0,13	0,14	0,13	0,13										
Mafa	0,28	0,13	0,12	0,14	0,13	0,13	0,10									
Chae	0,29	0,13	0,13	0,14	0,13	0,13	0,11	0,10								
Cogu	0,30	0,15	0,15	0,17	0,16	0,15	0,12	0,10	0,12							
Paan	0,29	0,13	0,13	0,15	0,14	0,13	0,11	0,09	0,11	0,12						
Athy	0,30	0,15	0,15	0,16	0,15	0,16	0,15	0,15	0,14	0,16	0,15					
Atbe	0,29	0,16	0,15	0,16	0,15	0,16	0,16	0,15	0,15	0,18	0,16	0,08				
Lala	0,30	0,15	0,14	0,15	0,14	0,15	0,15	0,15	0,14	0,16	0,15	0,07	0,06			
Atge	0,29	0,16	0,15	0,16	0,16	0,16	0,16	0,15	0,15	0,17	0,16	0,10	0,09	0,10		
Sabo	0,30	0,17	0,16	0,18	0,17	0,17	0,15	0,15	0,15	0,17	0,16	0,13	0,15	0,14	0,14	
Aona	0,30	0,13	0,13	0,14	0,14	0,13	0,13	0,13	0,12	0,14	0,13	0,11	0,11	0,11	0,12	0,12

Los valores en el recuadro verde señalan las distancias genéticas entre los primates el Nuevo y del Viejo Mundo.

Tabla 3 Valores de divergencia entre las posiciones sinónimas Ks y no sinónimas Ka y de la razón entre estos para los diferentes grupos de comparación definidos (ver Métodos).

Grupos Comparados	Ks	Ka	Ka/Ks
Athy vs Atbe	0,07016	0,07561	1,078
Athy vs Atge	0,07449	0,08236	1,106
Atbe vs Atge	0,07612	0,07360	0,967
<i>Ateles</i> vs <i>Lagothrix</i>	0,08392	0,08900	1,003
Atélidos vs Sabo	0,14040	0,15517	1,105
Atélidos vs Aona	0,13614	0,12146	0,892
Atélidos vs outgroup	0,38207	0,29999	0,785
NWP vs outgroup	0,39529	0,29632	0,750

Azul, valores Ka/Ks mayores a 1; verde, valores Ka/Ks menores a 1.

A pesar de los valores extremos mencionados, en los genes *KIR* de los primates del Nuevo Mundo hay seis regiones que presentan evidencia de procesos de selección positiva con valores Ka/Ks mayores a 1 en al menos 7 de los 8 grupos de comparación establecidos. Y hay dos regiones que presentan evidencia de selección negativa con valores Ka/Ks menores a 0,3 en al menos 7 de los 8 grupos de comparación establecidos (**Figura 16**). Es probable que las regiones que presentan selección que se han identificado estén estrechamente relacionadas con la función de los genes *KIR*, en el caso de la selección positiva estas regiones posiblemente entren en contacto con regiones variables en los ligandos, mientras que las regiones sometidas a selección negativa deben ser cruciales en el mantenimiento de la estructura de los *KIR*.

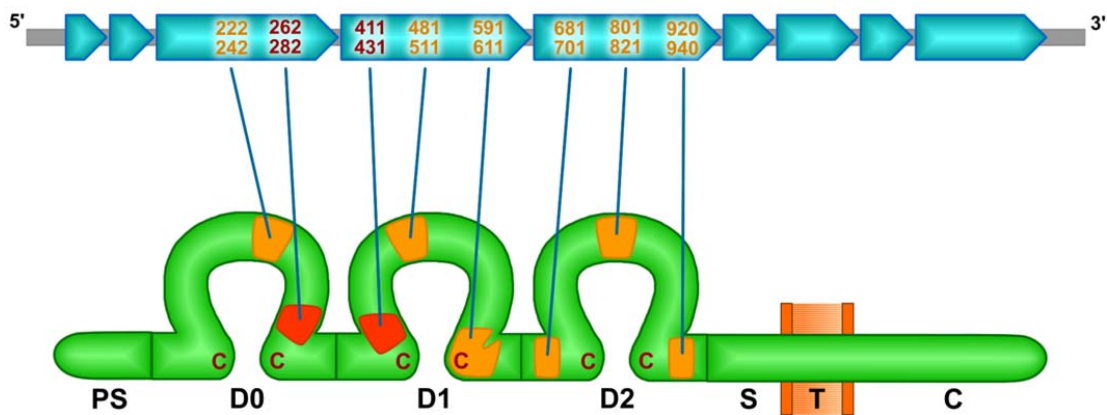


Figura 16. Ubicación en el gen y en la proteína de las regiones que presentan evidencia de selección positiva (en amarillo) y negativa (en rojo) en los *KIR* de los primates del Nuevo Mundo.

Finalmente, realizando filogenias con las posiciones sinónimas y no sinónimas de las secuencias de los genes *KIR*, fue posible evidenciar que en general en los primates del Nuevo Mundo son las sustituciones no sinónimas las que prevalecen y por tanto están generando una diversificación acelerada de estos genes, mientras que en las secuencias de los primates del Viejo Mundo prevalecen las sustituciones sinónimas. En particular la rama que agrupa los primates del Viejo Mundo es significativamente más larga en la filogénia generada con sustituciones sinónimas que la generada con sustituciones no sinónimas. Por el contrario, para la familia Atelidae, la rama en la filogénia generada con las posiciones no sinónimas es significativamente más larga que la generada a partir de las sustituciones sinónimas.

Relaciones Evolutivas Entre los *KIR* de los Primates

Entre los *KIR* de los Primates del Nuevo y del Viejo Mundo

La agrupación de los genes *KIR* de los primates es consistente, separándose de las secuencias *KIR* de otras especies de mamíferos. Al interior del grupo, los *KIR* de los primates forman una politomía que incluye 6 grupos distintos de genes, tres de ellos agrupan a las secuencias de los primates del Viejo Mundo y corresponden a los linajes previamente descritos, y los otros tres agrupan a las secuencias de los primates del Nuevo Mundo y corresponden a un clado de los pseudogenes, un clado formado solo por tres secuencias que incluye *Atge-KIR3DL2* y a un clado principal que incluye todas las demás secuencias *KIR* de primates del Nuevo Mundo (**Figura 17**).

Los grupos formados por los *KIR* de primates del Viejo Mundo muestran una separación por los linajes Ia, II/V y Ib/V, en cada uno de ellos hay secuencias de los diferentes géneros. Sin embargo, al interior de cada grupo–linaje, hay una diferenciación entre las secuencias de los cercopitécidos y las secuencias de los homínidos. En contraste, en el clado principal de los *KIR* de los primates del Nuevo Mundo las secuencias se agrupan género–específicamente, reflejando la filogenia de los géneros. En el único grupo en que genes de diferentes géneros de primates del Nuevo Mundo aparecen juntos es en el correspondiente a los pseudogenes que es independiente del clado principal.

En las reconstrucciones realizadas por los dominios D0, D1, D2 y STC, las agrupaciones principales se mantienen, pero surgen algunas particularidades. Para el dominio D0 el grupo de los linajes II/ IV se relaciona más con las secuencias de los primates del Nuevo Mundo, y los dos grupos menores de *KIR* de primates del Nuevo Mundo (pseudogenes y *AtgeKIR3DL2*) se relacionan con las secuencias de los primates del Viejo Mundo, entre el grupo basal de los *KIR2DL4* y los demás.

Para el dominio D1 una gran politomía basal reúne a los diferentes grupos de *KIR* de los primates. Varias agrupaciones pequeñas que parten de esta politomía incluyen a las secuencias de *Aotus*, tres grandes grupos incluyen todas las secuencias de los primates del Viejo Mundo, y dos grandes grupos incluyen todas las secuencias de los Atélidos y de de *Saimiri* (excepto el pseudogen).

Para el dominio D2 las relaciones internas del clado de los Atélidos se pierden, y las secuencias de *Lagothrix* se mezclan con las de *Ateles*. Tres grupos incluyen todos los *KIR* de primates del Viejo Mundo y otros tres todos los de los primates del Nuevo Mundo.

Y finalmente para el dominio STC, dos grupos incluyen todas las secuencias de primates del Nuevo Mundo, el primero relacionado con las secuencias *Sabo-KIR3DL2*, *Atge-KIR3DL2* y *Atge-KIR3DL6* y el segundo con las secuencias *Atge-KIR3DL3*, *Atge-KIR3DL4* y *Atge-KIR3DL5*. Y una politomía de tres linajes incluye todas las secuencias *KIR* de primates del Viejo Mundo.

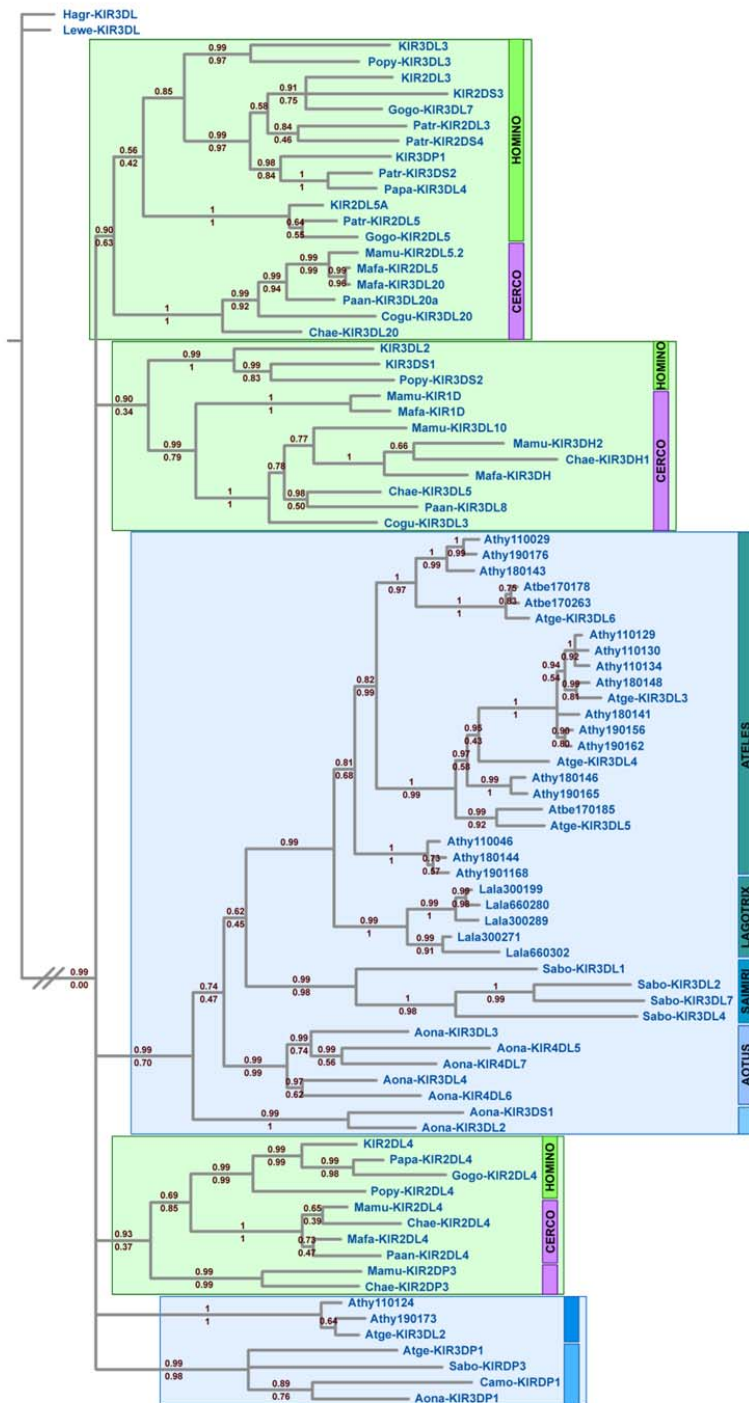


Figura 17. Filogenia de los genes *KIR* de los primates del Nuevo y del Viejo Mundo. Reconstruida con el gen completo, los números en las ramas indican el soporte de las mismas, los números sobre las ramas corresponden a la probabilidad a posteriori del análisis bayesiano y los números bajo las ramas corresponden a los valores de bootstrap del análisis de máxima verosimilitud.

Entre los KIR de los Primates del Nuevo Mundo

Para los *KIR* de los primates del Nuevo Mundo las agrupaciones generales descritas en la sección anterior se mantienen. Un grupo que incluye los pseudogenes de las diferentes especies y otro que incluye las secuencias *Atge-KIR3DL2*, *Athy190173* y *Athy110124*, se relacionan con la secuencia *KIR2DL4* considerada como grupo externo en este caso (**Figura 18**). En el clado principal de los primates del Nuevo Mundo se diferencian dos grupos correspondientes a *Aotus*, el primero incluye a *Aona-KIR3DS1* y *Aona-KIR3DL2* que son las que se codifican en sentido opuesto a las demás en el haplotipo, y el segundo agrupa a las demás secuencias del género. Otro grupo incluye todas las secuencias de *Saimiri*, y finalmente el clado de los Atélidos incluye un grupo correspondiente al género *Lagothrix* y otro correspondiente a los *Ateles*. Las agrupaciones específicas al interior del clado de los *Ateles* se se discuten con claridad en la sección de **Discusión**.

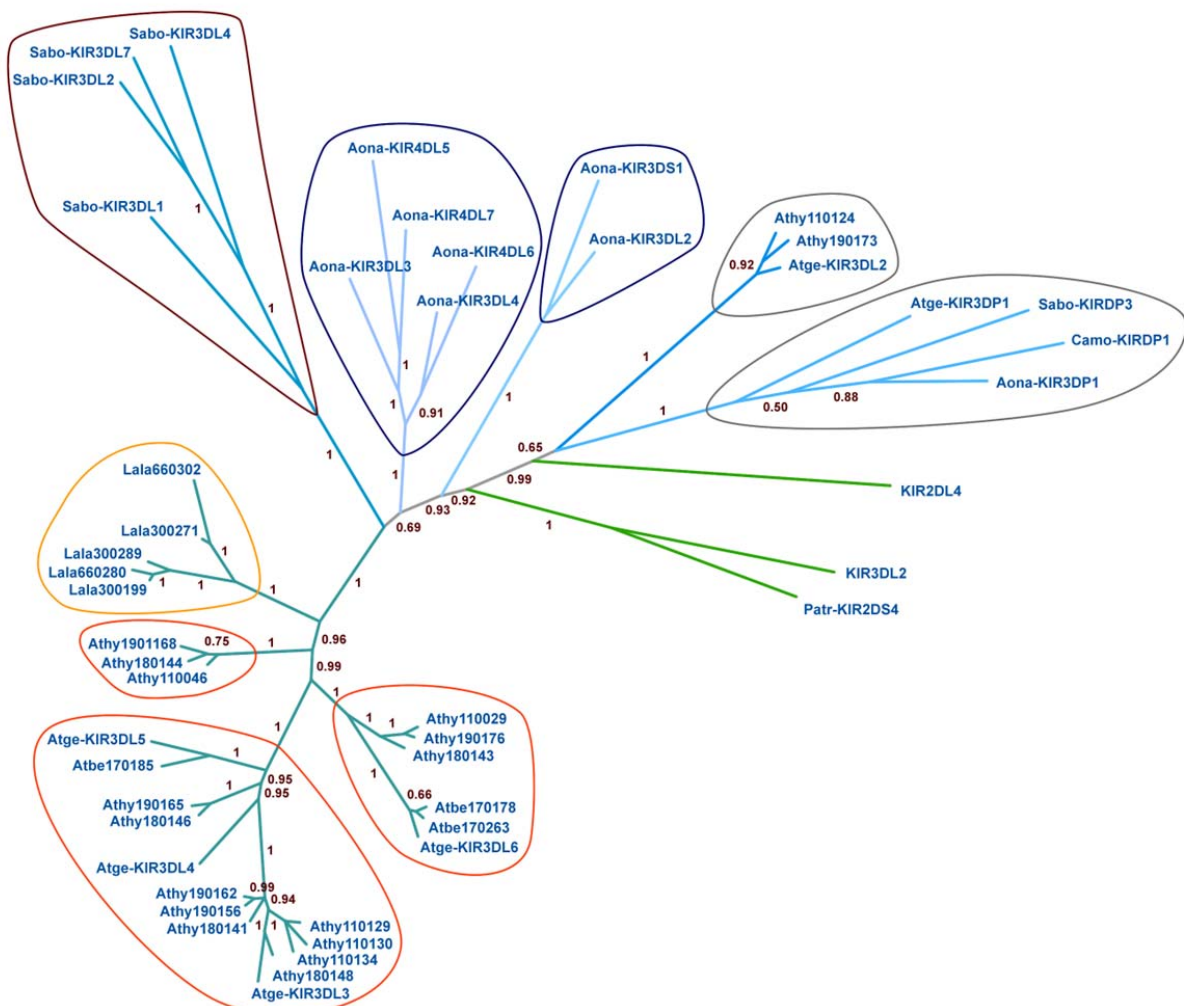


Figura 18. Filogenia de los genes *KIR* de los primates del Nuevo Mundo.

En cuanto a la relación entre los grupos de genes y la ubicación de estos en los haplotipos, el grupo de los pseudogenes corresponde al locus más centromérico en los primates del Nuevo Mundo. Para los demás genes que son género-específicos, el no poder determinar con claridad su ortología respecto a las de las especies caracterizadas a partir de clones BAC, dificulta determinar su ubicación, es posible que los genes asociados a *Atge-KIR3DL2* y *Atge-KIR3DL6* compartan con estos su ubicación en el haplotipo, para los demás no es posible determinarlo.

Entre los KIR de los Primates del Viejo Mundo

Los *KIR* de los primates del Viejo Mundo se agrupan independientes de los *KIR* de *Aotus*, considerado como grupo externo en este caso (**Figura 19**).

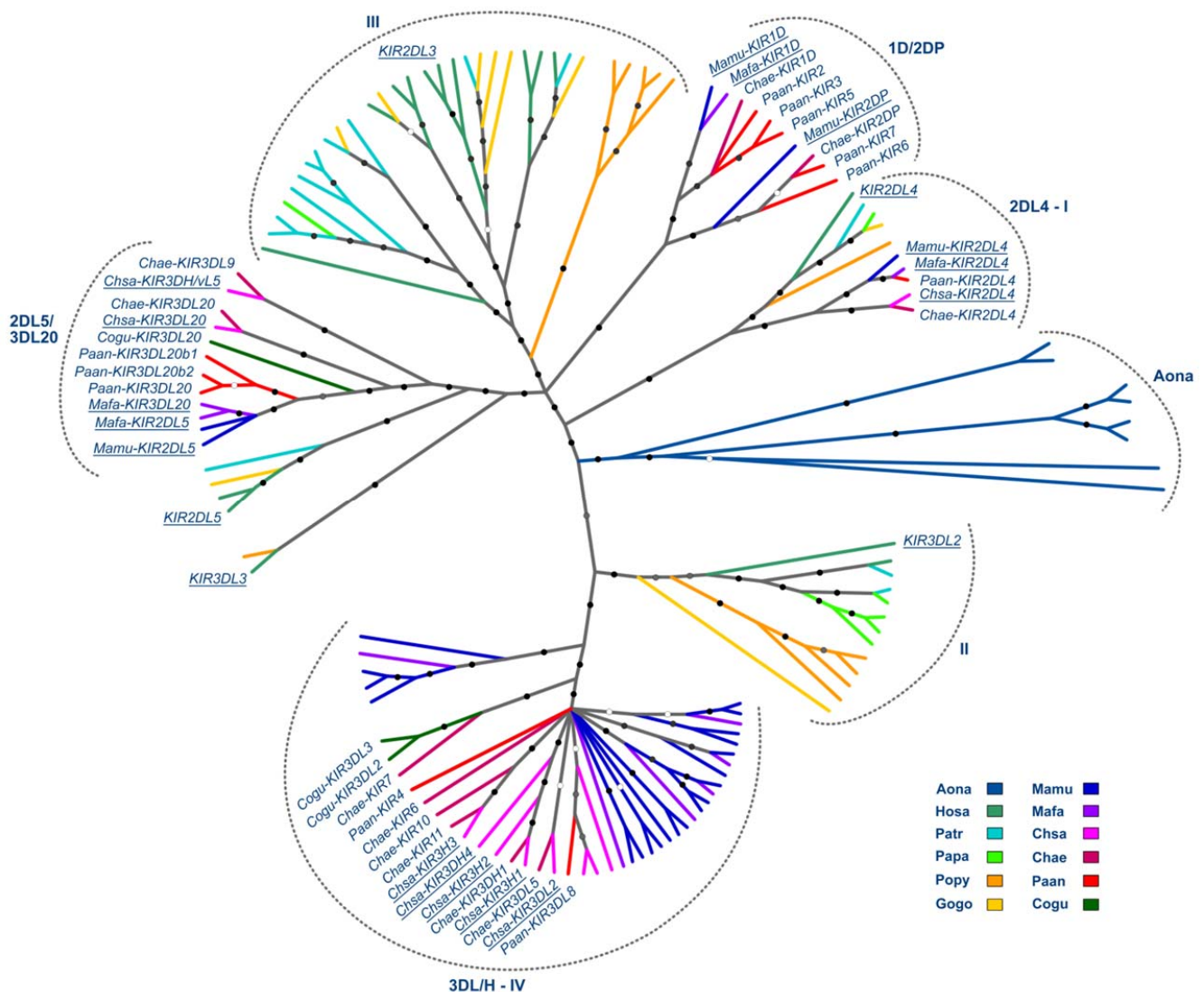


Figura 19. Filogenia de los genes *KIR* de los primates del Viejo Mundo.

Las agrupaciones por linajes entre las secuencias de los primates del Nuevo Mundo se mantienen. El linaje Ia con los genes *KIR2DL4* se conserva, permanece basal y se divide en dos grupos, los *KIR2DL4* cercopitécidos y hominoides. Un linaje exclusivo de los cercopitécidos que incluye a los pseudogenes de esta familia y a los *KIR* tipo *KIR1D*, se relaciona con el grupo del linaje III exclusivo de los hominoides, y el grupo del linaje 2DL5/3DL20 que incluye todos los *KIR* cercopitécidos tipo 3DL20 y los *KIR* hominoides tipo 2DL5 y 3DL3. Finalmente, el linaje IV, que es exclusivo de los cercopitécidos e incluye los genes tipo 3DL y 3DH de esta familia, se relaciona con el grupo del linaje II que es exclusivo de los hominoides.

En cuanto a la relación entre los linajes evolutivos y la ubicación de los genes en el locus, en los cercopitécidos los *KIR* más centroméricos corresponden al linaje 2DL5/3DL20, como los hominoides la zona media del locus está ocupada por el *KIR2DL4* a excepción de *C. guereza* que parece haberlo perdido. En la zona entre los *KIR2DL4* y los *KIR* tipo 2DL5/3DL20 la mayoría de secuencias de los cercopitécidos corresponden a pseudogenes o a *KIR* tipo *KIR1D*. En cambio, hacia el telómero, luego del *KIR2DL4*, se han diversificado los genes *KIR3DL* y 3DH de este grupo.

Discusión

Las células NK son fundamentales en la inmunidad contra infecciones virales y células tumorales. Su mecanismo de acción no depende del reconocimiento directo de antígenos, sino del balance entre señalizaciones activadoras e inhibitorias iniciadas por la interacción entre receptores de células NK y las moléculas del MHC clase I en las células blanco. Una expresión apropiada del MHC clase I en la célula blanco conduce a anérgia de la células NK debido al predominio de la señalización inhibitoria, mientras que la expresión deficiente o modificada del MHC clase I resulta en citotoxicidad por predominio de la señalización activadora. Los KIR son los receptores de células NK más importantes en los primates y se caracterizan por su alta variabilidad, tanto estructural y alélica, como haplotípica. Los KIR han sido ampliamente estudiados en humanos y otros homínidos, sin embargo en otros grupos de primates el sistema ha sido relativamente inexplorado. En este estudio se caracterizó el sistema KIR a nivel transcricional y genómico en varias especies de primates del Nuevo Mundo, enfatizando en la familia Atelidae. Estos datos, junto con el análisis del locus KIR en tres especies de monos del Viejo Mundo de la familia Cercopithecidae, permiten postular un modelo evolutivo del sistema KIR en primates.

Diversificación Independiente de los KIR en los primates del Viejo y del Nuevo Mundo.

Aunque pareciera una contradicción, los genes *KIR* son muy diversos y al mismo tiempo se han mantenido altamente conservados. A pesar de las diferencias particulares entre las distintas secuencias *KIR*, la similitud entre estas es clara y se evidencia en el solo hecho de que sea posible alinear genes de organismos distantes como las focas y los primates, además, en los primates la longitud de los *KIR* y de las regiones intergénicas entre ellos se conserva, así como la mayoría de los retroelementos presentes tanto en intrones como en regiones intergénicas. Pareciera que los *KIR* se comportan modularmente, donde los módulos, que corresponden a los exones y por ende a los dominios o en el caso de los haplotipos a los genes, se mantienen conservados o se diferencian poco formando algunos linajes claros. Es a partir de las combinaciones de los módulos (exones o genes), o a partir de diferencias específicas al interior de cada linaje, que se genera una amplia diversidad en los *KIR*. Esta familia de genes ha evolucionado manteniendo un balance entre diversidad y conservación, debido probablemente al hecho de relacionarse con la moléculas MHC clase I que son en si mismas muy diversas. Los *KIR* parecen haber respondido a la variabilidad de sus ligandos siendo ellos mismos muy diversos, y al mismo tiempo han permanecido suficientemente conservados para mantener su función.

Es probable que precisamente este balance dinámico entre diversidad y conservación explique las diferencias entre los patrones de agrupación de las secuencias de los *KIR* entre los primates del Nuevo y del Viejo Mundo. Por un lado, los primates del Viejo Mundo comparten genes que corresponden al mismo linaje, como es el caso de los *KIR2DL4* del linaje Ia en todos los catarrinos, o el caso de los *KIR3DL3* entre los homínidos y de los *KIR2DL5/3DL20* de los cercopitécidos. Y también presentan *KIR* que son exclusivos de grupos específicos como los correspondientes a los linajes II y III presentes en los homínidos, el linaje IV de los cercopitécidos, o los pseudogenes de cada uno de estos grupos. El *KIR2DL4* tiene como ligando a las moléculas MHC clase I tipo HLA-G que están presentes en todos los primates del Viejo Mundo, mientras que los *KIR* de los linajes II y III se relacionan con la expansión de las moléculas MHC clase I tipo HLA-A y C en los homínidos.

Por otro lado, los primates del Nuevo Mundo los *KIR* se han diversificado de manera género-específica. Respecto a las moléculas MHC de los primates del Nuevo Mundo hay poca información, sin embargo se sabe que están más relacionadas con las MHC clase I tipo HLA-G y que al menos en la familia Callithichinae tienden a agruparse de manera género específica como ocurre en general con los *KIR*.

La diversidad y conservación de los genes *KIR* dificultan la posibilidad de identificar con claridad las relaciones de ortología entre las secuencias, incluyendo la posibilidad de identificar si secuencias de una misma especie corresponden a diferentes alelos de un mismo gen o a diferentes loci. Se sabe que el *KIR* ancestral de los mamíferos consiste en un receptor con tres dominios Ig que en los Primates se relaciona con el *KIR3DL0* ubicado en el LRC entre los genes *LAIR* y los genes *LILR*. Sin embargo, no es posible definir si fue un solo *KIR* o fueron varios los que posteriormente se duplican a la región entre los genes *LILR* y el *FcAR*. La evidencia que se tiene sugiere que antes de que se diversificaran los primates ya había ocurrido esta duplicación de los *KIR*, y que los genes ancestrales eran pocos si no uno solo. A partir de allí, se sugiere que las sucesivas duplicaciones y diferenciaciones de los genes *KIR* ocurren independientemente en los primates del Viejo y del Nuevo Mundo, ya que no se encuentran *KIR* compartidos por estos dos grupos. Los pseudogenes de los primates del Nuevo Mundo, el locus correspondiente a *Atge-KIR3DL2*, y los linajes V y Ia/b de los primates del Viejo Mundo parecen retener características ancestrales lo que se evidencia en que aparecen basales en las reconstrucciones filogenéticas y en que son grupos poco diversos. Por el contrario, los genes de los linajes II y IV de homínidos y cercopitécidos respectivamente, así como los linajes género-específicos de los primates del Nuevo Mundo parecen ser mucho más recientes y son dinámicos en cuanto a su diversificación (**Figura 21**). Solo dos características parecen relacionar las secuencias *KIR* de los primates del Viejo y del Nuevo Mundo, por un lado los *KIR2DL4* conservan el retroelemento MIRc en el intron ubicado entre los exones 6 y siete, y esto mismo ocurre en los *KIR* de tres dominios de los primates neotropicales, mientras que los demás *KIR* de los primates del Viejo Mundo no lo presentan. La otra característica no está relacionada con la secuencia sino con el

procesamiento alternativo del mRNA, ya que tanto en secuencias *KIR* de primates del Viejo Mundo como en las de primates del Nuevo Mundo se da una misma variante que corresponde a la falta de los 12 primeros aminoácidos del dominio D1.

En los primates del Nuevo Mundo, los Atélidos reflejan muy bien la agrupación género–específica de los *KIR*, sin embargo para los demás grupos de primates del Nuevo Mundo no es tan clara, posiblemente porque el número de especies y géneros representados es aún muy limitado. Sin embargo es de notar que las relaciones sistemáticas entre estos grupos (*Aotus*, *Callicebus* y *Saimiri*) tampoco son del todo claras, en algunos casos *Callicebus* se relaciona más con la familia Pitheciidae, mientras que en otros aparece como grupo hermano de *Aotus*, y las relaciones entre estos dos géneros y la familia Cebidae a la que pertenece *Saimiri* tampoco han sido resueltas. En este sentido, es interesante que entre los pseudogenes, el pseudogen de *Aotus* se agrupa consistentemente con el de *Callicebus*. Además, las relaciones filogenéticas de los *Aotus* respecto a los demás grupos son poco claras, y de manera similar, los genes *KIR* de *Aotus* varían considerablemente entre las diferentes reconstrucciones filogenéticas, manteniéndose en general basales a las de los otros grupos y ocasionando varias politomías. Por otro lado las secuencias de cuatro dominios de *Aotus* no se agrupan consistentemente, sino que se mezclan con las otras dos secuencias de 3 dominios de esta especie. Es de esperarse que la inserción del cuarto dominio en los atélidos fuese un evento único y que posteriormente por duplicación surgieran los tres genes que presentan estas características, por tanto deberían estar más relacionadas entre ellas que con otras secuencias, pero este no es el caso, lo que indica que los procesos evolutivos en los *KIR* están ocurriendo rápidamente y promueven la diversidad entre ellos asociada de nuevo a su función. Estas características sumadas a información de tipo ecológico respecto a los Atélidos muestran que la evolución de este grupo es bastante particular comparada con la de los demás primates del Nuevo Mundo.

Relaciones de ortología entre los *KIR* de la familia Atélidae

La agrupación género–específica de los *KIR* en los primates del Nuevo Mundo es muy clara en los atélidos, donde las secuencias de *Lagotrix* forman un clado independiente al de los *Ateles*. Si bien las cinco secuencias de *L. lagotricha* no permiten inferir relaciones de ortología, la información disponible para los Atélidos permite sugerir algunas de ellas. La agrupación consistente de las secuencias Athy190168, Athy180144 y Athy110046, que provienen cada una de un individuo diferente, indica que probablemente correspondan a un mismo locus compartido entre los *Ateles*, sin embargo al no agruparse con ninguna de las secuencias de *A. geoffroyi* es posible que o bien corresponden a un gen exclusivo de la especie *A. hybridus* o que la variabilidad haplotípica de este género sea alta (como ocurre en los primates del Viejo Mundo) y en el haplotipo caracterizado por *A. geoffroyi*

no presente este gen. Las secuencias *Atge-KIR3DL2*, Athy110124 y Athy190173, también se agrupan juntas consistentemente, por lo que es posible que correspondan a un mismo locus compartido entre los *Ateles*, y de acuerdo a la ubicación de *Atge-KIR3DL2* representan el primer gen funcional en el haplotipo (extremo 5'). El gen más telomérico del haplotipo de *A. geoffroyi* se agrupa consistentemente con las secuencias de *A. belzebuth* Atbe170178 y Atbe170263, y con las secuencias de *A. hybridus* Athy110029, Athy190176 y Athy180143, siendo este el locus mejor representado entre las especies estudiadas. Las relaciones entre los demás genes de los *Ateles* que se agrupan con las secuencias de *A. geoffroyi* *AtgeKIR3DL3 - KIR3DL4* y *KIR3DL5* no son del todo claras. Es posible que los loci que corresponden a estas secuencias e hayan duplicado previamente a la diversificación de las especies por lo que su diferenciación es baja.

Estructura Diferencial de los Haplotipos Entre los Primates del Nuevo y del Viejo Mundo

La estructura típica de los haplotipos *KIR* de hominoides, en la que dos zonas de alta variabilidad son delimitadas por los tres genes marco *KIR3DL3* del linaje V hacia el centrómero, *KIR2DL4* del linaje Ia en la zona media y *KIR3DL2* del linaje II hacia el telómero, no se conserva entre los primates. En los cercopitécidos el *KIR2DL4* está presente y se mantiene hacia la zona media del locus, hacia el centrómero se reconoce también un gen marco pero no corresponde al linaje V sino al linaje *KIR2DL5/3DL20* que es producto de exón shuffling entre los linajes Ib y V, y hacia el telómero no hay un gen conservado (**Figura 20**).

En los primates del Nuevo Mundo que no comparten linajes con los primates del Viejo Mundo, solo se reconoce un gen marco y corresponde al pseudogen que es el más centromérico en el haplotipo. Los pseudogenes, así como los dos genes de *A. nancymae* que le siguen, *Aona-KIR3DL2* y *Aona-KIR3DS1*, y el siguiente gen de *A. geoffroyi*, *Atge-KIR3DL2*, se codifican en sentido contrario a los demás genes *KIR*, sugiriendo que esta región invertida en el extremo centromérico del haplotipo es compartida por los primates del Nuevo Mundo y por tanto la inversión debió darse antes de la especiación (**Figura 20**). Sin embargo, la independencia filogenética de las dos secuencias funcionales e invertidas de *A. nancymae* respecto a la secuencia de *A. geoffroyi* sugieren que corresponden a duplicaciones posteriores a la diversificación entre estas especies. Finalmente, los haplotipos de los primates parecen compartir solamente el hecho de que los pseudogenes se ubiquen hacia la región centromérica mientras que los genes funcionales y la expansión de linajes específicos se da hacia la zona telomérica, lo que sugiere que los distintos mecanismos evolutivos que remodelan el genoma actúan diferencialmente en las regiones que conforman el locus *KIR*.

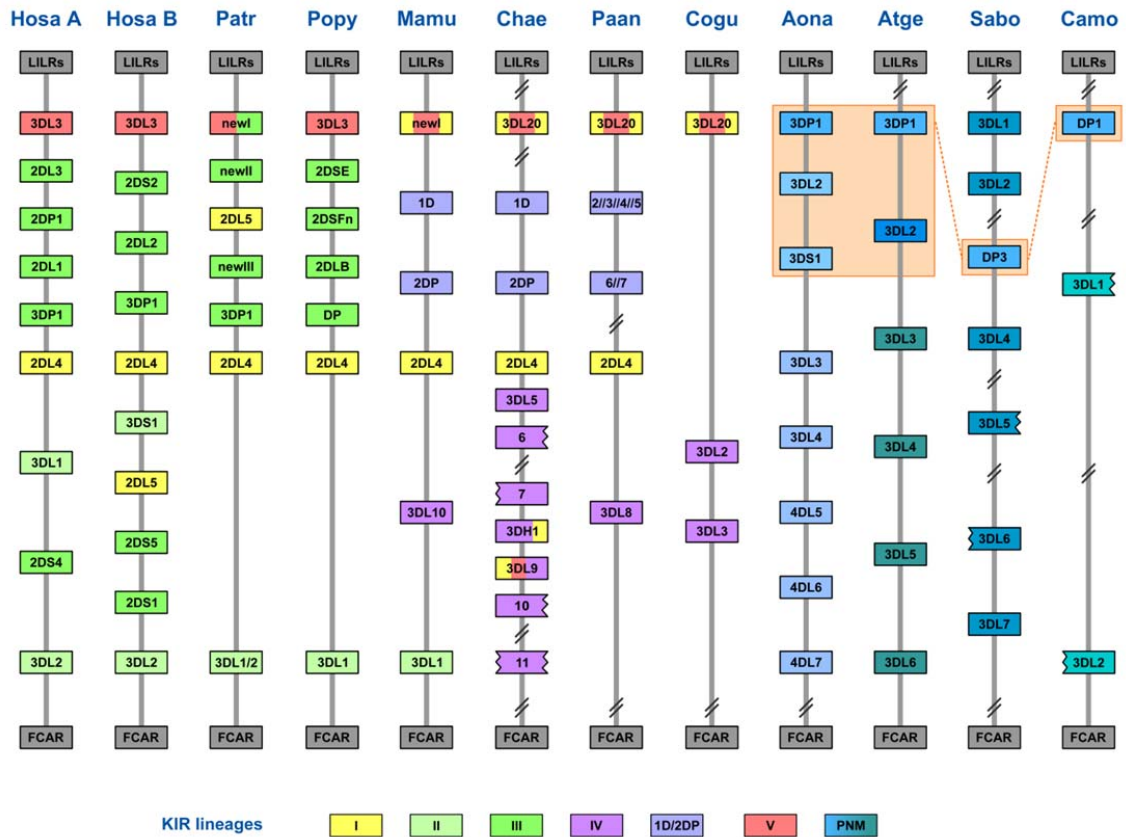


Figura 20. Esquema del locus *KIR* en los primates del Viejo y del Nuevo Mundo. Codificado por colores se muestra el linaje al que pertenece cada uno de los genes de los primates del Viejo Mundo. Hosa A, *Homo sapiens* haplotipo A; Hosa B, *Homo sapiens* haplotipo B, Patr, *Pan troglodytes*; Popy, *Pongo pygmeus*; Mamu, *Macaca mulatta*. Los diferentes azules corresponden a los genes de los primates del Nuevo Mundo Aona, *Aotus nancymae*; Atge, *Ateles geoffroyi*; Sabo, *Saimiri boliviensis*; y Camo, *Callicebus moloch*. Los recuadros anaranjados señalan la homología entre los genes codificados antisentido.

Mecanismos evolutivos que prevalecen en los KIR de los primates del Viejo y del Nuevo Mundo.

La diversidad de los KIR en los primates se ha generado por diferentes mecanismos evolutivos. Tanto en primates del Nuevo como del Viejo Mundo, el procesamiento alternativo del mRNA parece jugar un papel predominante. A nivel genómico parece ser la recombinación no homóloga el mecanismo fundamental, evidenciado en la conformación de los haplotipos, donde la longitud de los genes es altamente conservada y donde el tamaño de las regiones intergénicas es muy pequeño comparado con el de los genes (2.4 kpb vs. 10 kpb) haciendo que alineamientos no homólogos entre los cromosomas durante

la meiosis sean altamente probables. Además, mecanismos como duplicación y delección tanto de genes como de exones son compartidos entre primates del Viejo y del Nuevo Mundo (**Figura 21**). En cuanto a los exones, se evidencia en el dominio adicional de los Aotidos, o en la falta del exon 6 en el *KIR3DL2* de *A. geoffroyi* y en el *KIR3DL4* de *S. boliviensis* tal como ocurre en el *KIR3DL3* humano. En cuanto a los genes se evidencia en la similaridad entre *Aona-KIR3DL2* y de *Aona-KIR3DS1* sugiriendo sugiere que estas secuencias son resultado de una duplicación génica reciente, o en la amplia expansión de los linajes II y IV en los primates del Viejo Mundo.

En cuanto a mecanismos evolutivos que actúen diferencialmente entre los primates del Nuevo y del Viejo Mundo. No se encontró evidencia de exon shuffling en las secuencias de los primates del Nuevo Mundo, mientras que este mecanismo se ha identificado en las *KIR* de primates del Viejo Mundo tipo 2DL5/3DL20 y tipo DH en los cercopitécidos. Por otro lado, las secuencias de los primates del Nuevo Mundo sugieren que actúan sobre ellas fuertes presiones selectivas tanto purificadoras como positivas, siendo este el mecanismo más importante en la generación de la diversidad y expansión específica de los *KIR* en los primates neotropicales. Mientras tanto, en los primates del Viejo Mundo, la selección no se considera un mecanismo prevalente en la generación de la diversidad de los genes *KIR*.

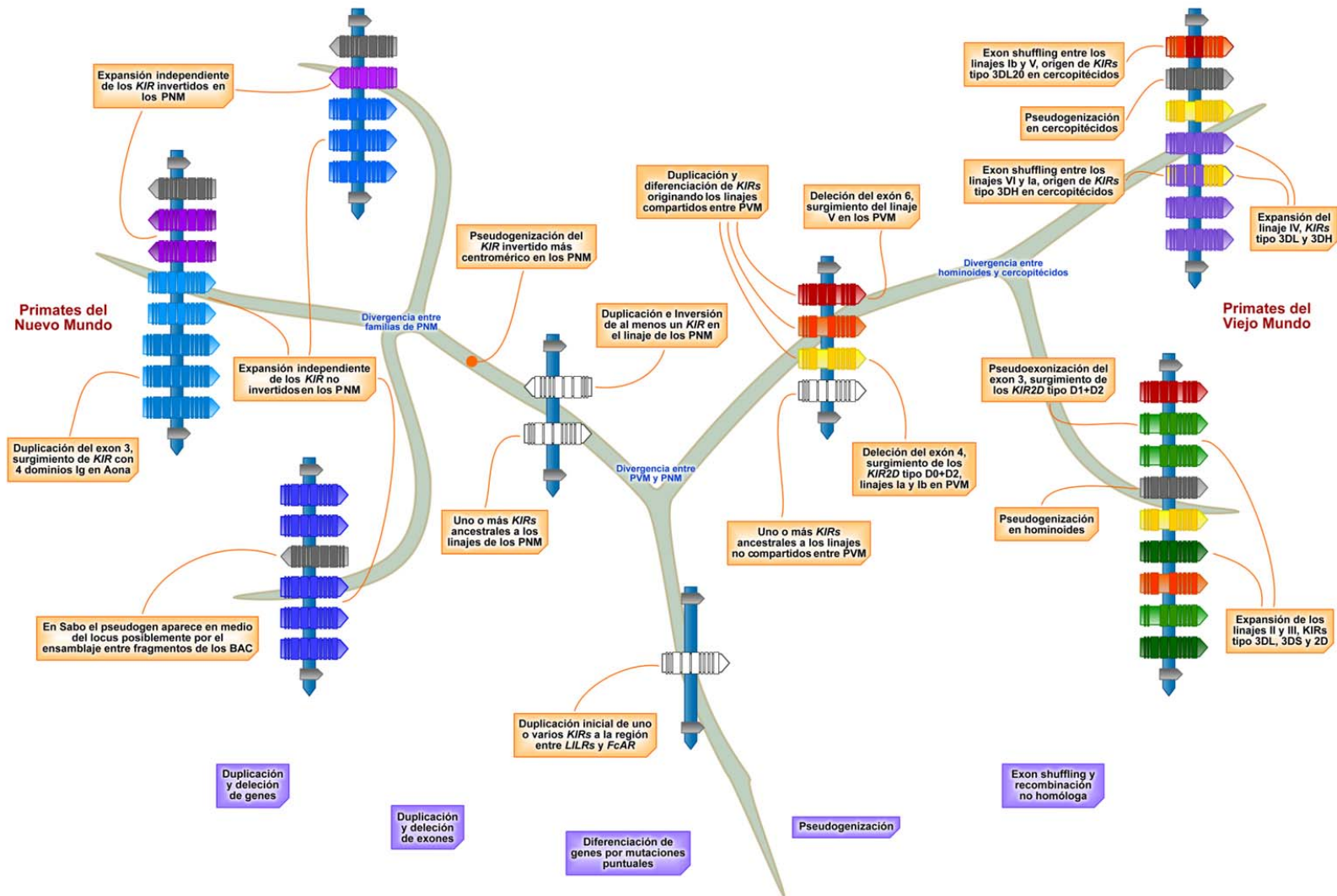


Figura 21. Modelo evolutivo de los genes KIR en los primates.

Conclusiones

La información generada en este estudio tiene, al menos, tres implicaciones importantes:

Conservación: El estado de vulnerabilidad en que se encuentran las poblaciones de primates neotropicales en nuestro país es causado principalmente por procesos antrópicos como la pérdida y degradación de su hábitat, la cacería y el tráfico ilegal. Los esfuerzos para generar programas de reintroducción y reproducción para estos organismos se han visto afectados por la alta incidencia de enfermedades infecciosas de animales en cautiverio. Este estudio contribuye a entender algunas particularidades del sistema inmune de los primates del Nuevo Mundo que pueden insinuar sobre el diseño de medidas de prevención de infecciones virales en animales en cautiverio.

Modelos Biomédicos: El reconocimiento y eliminación de células propias alteradas por parte de las células NK son procesos comunes a todos los vertebrados. La generación de nueva información respecto a la respuesta inmune en los primates es importante para ampliar el conocimiento y diseñar tratamientos orientados a combatir enfermedades en humanos. Además, diferencias en la estructura de los KIR en las distintas especies de primates podrían explicar las diferencias observadas en cuanto a la susceptibilidad a ciertos virus o tipos tumorales.

Evolución del sistema inmune y de las familias génicas: La expansión diferencial de los KIR en los mamíferos como parte de un proceso coevolutivo con el MHC, hacen de este sistema un modelo de estudio ideal para entender la coevolución de los diferentes componentes del sistema inmune y el comportamiento evolutivo de familias génicas complejas de vertebrados.

Perspectivas

Es necesario realizar análisis evolutivos más detallados como análisis de selección y de recombinación que aporten más información sobre la generación de la diversidad en la familia génica de los KIR. También es necesario realizar otros análisis como la asociación de los KIR de los primates del Nuevo Mundo con sus posibles ligandos, lo que permitiría evaluar si en realidad KIR y MHC clase I están coevolucionando. O también análisis de la estructura tridimensional de los receptores, que permitan predecir cuales regiones de la molécula permiten cambios más fácilmente y cuales estas sometidas a restricción funcional.

También es necesario incluir información para los genes KIR de otros primates neotropicales, cuya historia es aún desconocida, muy poco sabemos de lo que ocurre con estas moléculas en la familia Cebidae o en la familia Pitheciidae, estudiarlas permitiría en realidad completar el panorama de la evolución de estos receptores en los Primates.

Otros trabajos que están aun por hacer incluso para primates del Viejo Mundo, son estudios poblacionales, que solo se han realizado para los humanos y algunos grupos específicos de otros primates del Viejo Mundo, este tipo de análisis permitiría conocer en realidad el grado de variabilidad intraespecíficos de los genes KIR y evaluar si dicho grado es comparable entre especies.

También para evaluar la diversidad real de los KIR, se hacen necesarios análisis de expresividad, en humanos se sabe que genes como el KIR3DL3 se expresan en una proporción muy baja en la NK respecto a la expresión de otros KIR, lo que limita la función de este receptor, es posible que en los otros primates ocurran procesos similares. Y aún más es necesario realizar análisis funcionales que permitan la identificación de los ligandos específicos de estos receptores, pues para muchos de ellos, sobre todo para los activadores, las moléculas ligando son desconocidas.

En cuanto a los linajes para los KIR en los primates, hay que reconsiderar su definición, pues los descritos hasta ahora no reflejan el panorama evolutivo general de estos genes.

Referencias

1. Yoder, J. a, and G. W. Litman. 2011. The phylogenetic origins of natural killer receptors and recognition: relationships, possibilities, and realities. *Immunogenetics* 63: 123-41.
2. Abi-Rached, L., H. Kuhl, C. Roos, B. ten Hallers, B. Zhu, L. Carbone, P. J. de Jong, A. R. Mootnick, F. Knaust, R. Reinhardt, P. Parham, and L. Walter. 2010. A small, variable, and irregular killer cell Ig-like receptor locus accompanies the absence of MHC-C and MHC-G in gibbons. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 184: 1379-91.
3. HISTORIA NATURAL DE LOS PRIMATES COLOMBIANOS Thomas Richard Defler. .
4. Connor, G. M. O., M. Hart, and C. M. Gardiner. 2005. Putting the natural killer cell in its place. *Aids* 1-10.
5. Gardiner, C. M. 2008. Killer cell immunoglobulin-like receptors on NK cells: the how, where and why. *International journal of immunogenetics* 35: 1-8.
6. Yawata, M., N. Yawata, M. Draghi, F. Partheniou, A.-M. Little, and P. Parham. 2008. MHC class I-specific inhibitory receptors and their ligands structure diverse human NK-cell repertoires toward a balance of missing self-response. *Blood* 112: 2369-80.
7. Guethlein, L. A., A. M. O. Aguilar, L. Abi-rached, and P. Parham. 2007. Evolution of Killer Cell Ig-Like Receptor (KIR) Genes : of Lineage III KIR Associated with the Emergence of MHC-C 1. *The Journal of Immunology* 2.
8. Deng, L., and R. a Mariuzza. 2006. Structural basis for recognition of MHC and MHC-like ligands by natural killer cell receptors. *Seminars in immunology* 18: 159-66.
9. Sawicki, M. W., N. Dimasi, K. Natarajan, J. Wang, D. H. Margulies, and R. a Mariuzza. 2001. Structural basis of MHC class I recognition by natural killer cell receptors. *Immunological reviews* 181: 52-65.
10. Waldhauer, I., and a Steinle. 2008. NK cells and cancer immunosurveillance. *Oncogene* 27: 5932-43.
11. Ljunggren, H. G., and K. Kärre. 1990. In search of the "missing self": MHC molecules and NK cell recognition. *Immunology today* 11: 237-44.
12. Selvakumar, a, U. Steffens, and B. Dupont. 1997. Polymorphism and domain variability of human killer cell inhibitory receptors. *Immunological reviews* 155: 183-96.

13. Yokoyama, W. 1998. Natural killer cell receptors. *Current Opinion in Immunology* 10: 298-305.
14. López-Botet, M., T. Bellón, M. Llano, F. Navarro, P. García, and M. de Miguel. 2000. Paired inhibitory and triggering NK cell receptors for HLA class I molecules. *Human immunology* 61: 7-17.
15. Pegram, H. J., D. M. Andrews, M. J. Smyth, P. K. Darcy, and M. H. Kershaw. 2010. Activating and inhibitory receptors of natural killer cells. *Immunology and cell biology* 1-9.
16. Snyder, M. R., T. Nakajima, P. J. Leibson, C. M. Weyand, and J. J. Goronzy. 2004. Stimulatory killer Ig-like receptors modulate T cell activation through DAP12-dependent and DAP12-independent mechanisms. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 173: 3725-31.
17. Hershberger, K. L., R. Shyam, a Miura, and N. L. Letvin. 2001. Diversity of the killer cell Ig-like receptors of rhesus monkeys. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 166: 4380-90.
18. Cadavid, L. F., and C.-M. Lun. 2009. Lineage-specific diversification of killer cell Ig-like receptors in the owl monkey, a New World primate. *Immunogenetics* 61: 27-41.
19. Sambrook, J. G., and S. Beck. 2007. Evolutionary vignettes of natural killer cell receptors. *Current opinion in immunology* 19: 553-60.
20. Karl, J. a, R. W. Wiseman, K. J. Campbell, A. J. Blasky, A. L. Hughes, B. Ferguson, D. S. Read, and D. H. O' Connor. 2008. Identification of MHC class I sequences in Chinese-origin rhesus macaques. *Immunogenetics* 60: 37-46.
21. Andersen, H., J. L. Rossio, V. Coalter, B. Poore, M. P. Martin, M. Carrington, and J. D. Lifson. 2005. Characterization of rhesus macaque natural killer activity against a rhesus-derived target cell line at the single-cell level. *Cellular immunology* 231: 85-95.
22. Döhning, C., J. Samaridis, and M. Colonna. 1996. Alternatively spliced forms of human killer inhibitory receptors. *Immunogenetics* 44: 227-30.
23. Trundley, A. E., S. E. Hiby, C. Chang, A. M. Sharkey, S. Santourlidis, M. Uhrberg, J. Trowsdale, and A. Moffett. 2006. Molecular characterization of KIR3DL3. *Immunogenetics* 57: 904-16.
24. Wilkinson, R. D., M. E. Steiper, C. Soligo, R. D. Martin, Z. Yang, and S. Tavaré. 2011. Dating Primate Divergences through an Integrated Analysis of Palaeontological and Molecular Data. *Systematic biology* 60: 16-31.
25. Steiper, M. E., and N. M. Young. 2006. Primate molecular divergence dates. *Molecular phylogenetics and evolution* 41: 384-94.

26. Fabre, P.-H., a Rodrigues, and E. J. P. Douzery. 2009. Patterns of macroevolution among Primates inferred from a supermatrix of mitochondrial and nuclear DNA. *Molecular phylogenetics and evolution* 53: 808-25.
27. Chatterjee, H. J., S. Y. W. Ho, I. Barnes, and C. Groves. 2009. Estimating the phylogeny and divergence times of primates using a supermatrix approach. *BMC evolutionary biology* 9: 259.
28. Hodgson, J. a, K. N. Sterner, L. J. Matthews, A. S. Burrell, R. a Jani, R. L. Raaum, C.-B. Stewart, and T. R. Disotell. 2009. Successive radiations, not stasis, in the South American primate fauna. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 5534-9.
29. Opazo, J. C., D. E. Wildman, T. Prychitko, R. M. Johnson, and M. Goodman. 2006. Phylogenetic relationships and divergence times among New World monkeys (Platyrrhini, Primates). *Molecular phylogenetics and evolution* 40: 274-80.
30. Vilches, C., M. J. Pando, and P. Parham. 2000. Genes encoding human killer-cell Ig-like receptors with D1 and D2 extracellular domains all contain untranslated pseudoexons encoding a third Ig-like domain. *Immunogenetics* 51: 639-46.
31. Moretta, L., and A. Moretta. 2004. Killer immunoglobulin-like receptors. *Current opinion in immunology* 16: 626-33.
32. Rajalingam, R., P. Parham, and L. Abi-Rached. 2004. Domain shuffling has been the main mechanism forming new hominoid killer cell Ig-like receptors. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 172: 356-69.
33. Sambrook, J. G., A. Bashirova, S. Palmer, S. Sims, J. Trowsdale, L. Abi-rached, P. Parham, M. Carrington, and S. Beck. 2005. Single haplotype analysis demonstrates rapid evolution of the killer immunoglobulin-like receptor (KIR) loci in primates. *Genome research* 15: 25-35.
34. Hershberger, K. L., J. Kurian, B. T. Korber, and N. L. Letvin. 2005. Killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR) of the African-origin *Macaca sabaeus* monkey: evidence for recombination events in the evolution of KIR. *European journal of immunology* 35: 922-35.
35. Schrago, C. G. 2007. On the Time Scale of New World Primate Diversification. 354: 344-354.
36. Martinez-Borra, J., and S. I. Khakoo. 2008. Speed and selection in the evolution of killer-cell immunoglobulin-like receptors. *International journal of immunogenetics* 35: 89-96.
37. Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. 95-98.

38. Ronquist, F. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.
39. Huelsenbeck, J. P., and F. Ronquist. Bayesian Analysis of Molecular Evolution Using MrBayes. *Evolution* .
40. Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, and S. Kumar. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology* .
41. Librado, P., and J. Rozas. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics (Oxford, England)* 25: 1451-2.

Alineamiento de aminoácidos para las secuencias KIR identificadas en el estudio

Peptido señal

```

                10      20
    KIR2DL4      MSPTVILACLGFFLDQSVWAHV
    KIR3DL2      -----
    KIR3DL3      MSLMVVSMA CVGFFLLEGGPWPV
    PatrKIR2DS4  MSLMVVSMA CVGFFLLQGAWPHEG
    Athy110029   -----ACVGFFLVQGAWPHEG
    Athy110046   -----ACVGSFLVQGAWPHEG
    Athy110124   -----ACVRFLLVQRAWPLV
    Athy110129   -----ACVGFFLVQGAWPHEG
    Athy110130   -----ACVGFFLVQGAWPHEG
    Athy110134   -----
    Athy180141   -----ARVGFFLVQGAWPHEG
    Athy180143   -----ACVGFFLVQGAWPHEG
    Athy180144   -----ACVGFFLVQGAWTHEG
    Athy180146   -----ACVGFFLVQGAWPHEG
    Athy180148   -----ACVGFFLVQGAWTHEG
    Athy190156   -----ACVGFFLVQGAWPHEG
    Athy190162   -----ACVGFFLVQGAWPHEG
    Athy190165   -----ACVGFFLVQGAWPHEG
    Athy190168   -----ACVGFFLVQGAWPHEG
    Athy190173   -----ACVRLFLVQRAWPLV
    Athy190176   -----ACVGFFLVQGAWPHEG
    Atbe170178   -----ACVGFFLVQGAWPHEG
    Atbe170185   -----ACVRFLLVQGAWPHEG
    Atbe170263   -----ACVGFFLVQGAWPHEG
    Lala300199   -----ACVGF-LVQGAWPHEG
    Lala300271   -----ACVGFFLVQGAWPHEG
    Lala300289   -----ACVGF-LVQGAWPHEG
    Lala660280   -----ACVGF-LVQGAWPHEG
    Lala660302   -----ACVGFFLVQGAWPHEG
    Atge-KIR3DP1  MSLMVIVSACVGFSLVQRAWTHD
    Atge-KIR3DL2  MSLMVVSMA CVGFFLVQRAWPLV
    Atge-KIR3DL3  MSLMVVSMA CVGFFLVQGAWTHEG
    Atge-KIR3DL4  MSLMVVSMA CVGFFLVQGAWPHEG
    Atge-KIR3DL5  MSLMVVSMA CVGFFLVQGAWTHEG
    Atge-KIR3DL6  MSLMVVSMA CVGFFLVQGAWPHEG
    Sabo-KIR3DL1  MALTVVSMAYVGFFLVQGAWTQK
    Sabo-KIR3DL2  MALTVVSMACVGFFLVHGVTQK
    Sabo-KIRDP3   -----
    Sabo-KIR3DL4  MALTVVSMACVGFFLVHGVTQK
    Sabo-KIR3DL5P MALTVVSMACVEFFLVHGVTQK
    Sabo-KIR3DL6P -----
    Sabo-KIR3DL7  MALTVVSMACVEFFLVQGAWPHD
    Camo-KIRDP1   MSPMVVSMV CVGFSLVQRAWPHEG
    Camo-KIR3DL2P MSLMVVSVACVGFFLVQRAWPHEG
    Camo-KIR3DL3P -----
    Aona-KIR3DP1  MSLMVVSMA CVGFFSLVQRAWTHEG
    Aona-KIR3DS1  MSLMVVSMA CVGYFLVQRAWTHEG
    Aona-KIR3DL2  MSPMVVSMACVGFFLVQRAWTHEG
    Aona-KIR3DL3  MSLMVVSMA CVGFFLVQRAWPLM
    Aona-KIR3DL4  MSLMVVSMA CVGFFLVQRAWPHEG
    Aona-KIR4DL5  MSLMVVSMA CVGFFLGQRAWPHK
    Aona-KIR4DL6  MALMAVSMV CVGFFLAQRAWSR
    Aona-KIR4DL78 MSPMVVSMACVGFFLVQRSWPHEG
  
```

Dominio D0

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90
KIR2DL4  GQDKPFCSAWPSAVVPQGGHVTLRCHYRRGFNIFTLYKDGVPVPELYNRIFWNSFLISPVTPAHAGTYRCRQGFPHPSPTGWSAPSNPLVIMVTG
KIR3DL2  GQDKPFLSARPSAVVPQGGHVTLRCHYRRGFNFMFLYKEDRSHVPIFHGRIFQESFIMGPVTPAHAGTYRCRQGFPHPSPTGWSAPSNPLVIMVTG
KIR3DL3  GQDKPFLSAWPGTVVSBGGHVTLRCHYRRGFNFMFLYKEDRSHVPIFHGRIFQESFIMGPVTPAHAGTYRCRQGFPHPSPTGWSAPSNPLVIMVTG
PatrKIR2DS4 -----
Athy110029 GQDKPFLSAWPSAVVPQGGHVTLRCHYGGGFNFTLYKEDRVHVPNLQGRIFQESFLMGPVTAAGAGTYRCRQGFPHPSPTGWTAPSINALVIRVTA
Athy110046 GQDKPFLSAWPSAVVPQGGHVTLRCHYGGGFNFTLYKEDTIDIPILQGRIFQESFLMGPVTAAGAGTYRCQSFPHPSPTGWTAPSINALVIRVTG
Athy110124 GQDKPFLSAWPSALVPQGGHVTLRCHYRRGFNFMFLYKEYGVVPELHNRIFWNSFLMGPVTPAHAGTYRCQGFPHPSPTGWTAPSINALVIRVTG
Athy110129 GQDKPFLSAWPSALVPQGGHVTLRCHYGGGFNFTLYKEDRVHVPNLQGRIFQESFLMGPVTAAGAGTYRCRQGFPHPSPTGWTAPSINALVIRVTG
Athy110130 GQDKPFLSAWPSALVPQGGHVTLRCHYGGGFNFTLYKEDRVHVPNLQGRIFQESFLMGPVTAAGAGTYRCRQGFPHPSPTGWTAPSINALVIRVTG
Athy110134 -----GHVTLWCNYGGGFNFTLYKEDRVHVPNLQGRIFQESFLMGPVTAAGAGTYRCRQGFPHPSPTGWTAPGNALVIRVTG
Athy180141 GQDKPFLSAWPSALVPQGGHVTLRCHYGGGFNFTLYKEDRVHVPNLQGRIFQESFLMGPVTAAGAGTYRCRQGFPHPSPTGWTAPSINALVIRVTG
Athy180143 GQDKPFLSAWPSAVVPQGGHVTLRCHYGGGFNFTLYKEDRVHVPNLQGRIFQESFLMGPVTAAGAGTYRCRQGFPHPSPTGWTAPSINALVIRVTG
Athy180144 GQDKPFLSAWPSAVVPQGGHVTLRCHYGGGFNFTLYKEDTIDIPILQGRIFQESFLMGPVTAAGAGTYRCQGFPHPSPTGWTAPSINALVIRVTG
Athy180146 GQDKPFLSAWPSAVVPQGGHVTLRCHYGGGFNFTLYKEDRVHVPILQGRIFQESFLMGPVTAAGAGTYRCRQGFPHPSPTGWTAPSINALVIRVTG
Athy180148 GQDKPFLSAWPSALVPQGGHVTLRCHYGGGFNFTLYKEDRVHVPNLQGRIFQESFLMGPVTAAGAGTYRCRQGFPHPSPTGWTAPSINALVIRVTG
Athy190156 GQDKPFLSAWPSALVPQGGHVTLRCHYGGGFNFTLYKEDRVHVPNLQGRIFQESFLMGPVTAAGAGTYRCRQGFPHPSPTGWTAPSINALVIRVTG
Athy190162 GQDKPFLSAWPSALVPQGGHVTLRCHYGGGFNFTLYKEDRVHVPNLQGRIFQESFLMGPVTAAGAGTYRCRQGFPHPSPTGWTAPSINALVIRVTG
Athy190165 GQDKPFLSAWPSAVVPQGGHVTLRCHYGGGFNFTLYKEDRIDIPILQGRIFQESFLMGPVTAAGAGTYRCRQGFPHPSPTGWTAPSINALVIRVTG
Athy190168 GQDKPFLSAWPSAVVPQGGHVTLRCHYGGGFNFTLYKEDTIDIPILQGRIFQESFLMGPVTAAGAGTYRCRQGFPHPSPTGWTAPSINALVIRVTG
Athy190173 GQDKPFLSAWPSALVPQGGHVTLRCHYRRGFNFMFLYKEYGVVPELHNRIFWNSFLMGPVTPAHAGTYRCQGFPHPSPTGWTAPSINALVIRVTG
Athy190176 GQDKPFLSAWPSAVVPQGGHVTLRCHYGGGFNFTLYKEDRVHVPNLQGRIFQESFLMGPVTAAGAGTYRCRQGFPHPSPTGWTAPSINALVIRVTG
Atbel170178 GQHKPFLSARPSAVVPQGGHVTLRCHYGGGFNFTLYKEDRIDIPILQGRIFQESFLMGPMATAAGAGTYRCRQGFPHPSPTGWTAPSINALVIRVTG
Atbel170185 GQDKPFLSAWPSALVPQGGHVTLRCHYGGGFNFTLYKEDRVHVPNLQGRIFQESFLMGPVTAAGAGTYRCRQGFPHPSPTGWTAPSINALVIRVTG
Atbel170263 GQHKPFLSARPSAVVPQGGHVTLRCHYGGGFNFTLYKEDRIDIPILQGRIFQESFLMGPMATAAGAGTYRCRQGFPHPSPTGWTAPSINALVIRVTG
Lala300199 GQDKAFLSAWPSAVVPQGGNVTLRCHYGGGFNFTLYKEDRVHVPILQGRIFQESFVMGPVTPENAGTYRCRQGFPHPSPTGWTAPSINALVIRVTG
Lala300271 GQDKPFLSAWPSAVVPQGGNVTLRCHYGGGFNFTLYKEDRIDIPILQGRIFQESFVMGPVTPENAGTYRCRQGFPHPSPTGWTAPSINALVIRVTG
Lala300289 GQDKPFLSAWPSAVVPQGGNVTLRCHYGGGFNFTLYKEDRIDIPILQGRIFQESFVMGPVTPENAGTYRCRQGFPHPSPTGWTAPSINALVIRVTG
Lala660280 GQDKAFLSAWPSAVVPQGGNVTLRCHYGGGFNFTLYKEDRVHVPILQGRIFQESFVMGPVTPENAGTYRCRQGFPHPSPTGWTAPSINALVIRVTG
Lala660302 GQDKPFLSAWPSAVVPQGGNVTLRCHYGGGFNFTLYKEDRIDIPILQGRIFQESFVMGPVTPENAGTYRCRQGFPHPSPTGWTAPSINALVIRVTG
Atge-KIR3DP1 GQDESSLVWPSAVVPQGGHVTLRCHYGGGFNFTLYKEDRIDIPILQGRIFQESFVMGPVTPENAGTYRCRQGFPHPSPTGWTAPSINALVIRVTG
Atge-KIR3DL2 GQDKPFLSAWPSALVPQGGHVTLRCHYRRGFNFMFLYKEYGVVPELHNRIFWNSFLMGPVTPAHAGTYRCQGFPHPSPTGWTAPSINALVIRVTG
Atge-KIR3DL3 GQDKPFLSAWPSALVPQGGHVTLRCHYGGGFNFTLYKEDRIDIPILQGRIFQESFVMGPVTPENAGTYRCRQGFPHPSPTGWTAPSINALVIRVTG
Atge-KIR3DL4 GQDKPFLSAWPSAVVPQGGHVTLRCHYGGGFNFTLYKEDRIDIPILQGRIFQESFVMGPVTPENAGTYRCRQGFPHPSPTGWTAPSINALVIRVTG
Atge-KIR3DL5 GQDKPFLSAWPSAVVPQGGHVTLRCHYGGGFNFTLYKEDRVHVPNLQGRIFQESFLMGPVTAAGAGTYRCRQGFPHPSPTGWTAPSINALVIRVTG
Atge-KIR3DL6 GQHKPFLSARPSAVVPQGGHVTLRCHYGGGFNFTLYKEDRIDIPILQGRIFQESFLMGPMATAAGAGTYRCRQGFPHPSPTGWTAPSINALVIRVTG
Atge-KIR3DL7 GQDKPFLSAWPSAVVPQGGHVTLRCHYGGGFNFTLYKEDRVHVPNLQGRIFQESFLMGPVTAAGAGTYRCRQGFPHPSPTGWTAPSINALVIRVTG
Sabo-KIR3DL1 GQDKPFLSAWPSAVVPQGGHVTLRCHYGGGFNFTLYKEDRVHVPNLQGRIFQESFLMGPVTAAGAGTYRCRQGFPHPSPTGWTAPSINALVIRVTG
Sabo-KIR3DL2 GRDNVFLSAWPSAVVPQGGHVTLRCHYRRGFNFMFLYKEYGVVPELHNRIFWNSFLMGPVTPAHAGTYRCRQGFPHPSPTGWTAPSINALVIRVTG
Sabo-KIR3DL3 -----
Sabo-KIR3DL4 GQEKPIFLSAWPSALVPQGGNVTLRCHYRRGFNFMFLYKEYGVVPELHNRIFWNSFLMGPVTPAHAGTYRCQGFPHPSPTGWTAPSINALVIRVTG
Sabo-KIR3DL5 GRDSPFLSAWPSAVVPQGGHVTLRCHYGGGFNFTLYKEDRIDIPILQGRIFQESFVMGPVTPENAGTYRCRQGFPHPSPTGWTAPSINALVIRVTG
Sabo-KIR3DL6 -----
Sabo-KIR3DL7 GRDTPFLSAWPSAVVPQGGHVTLRCHYRRGFNFMFLYKEYGVVPELHNRIFWNSFLMGPVTPAHAGTYRCRQGFPHPSPTGWTAPSINALVIRVTG
Camo-KIR3DL1 GRDKPFLSAWPSAVVPQGGHVTLRCHYGGGFNFTLYKEDRIDIPILQGRIFQESFVMGPVTPENAGTYRCRQGFPHPSPTGWTAPSINALVIRVTG
Camo-KIR3DL2 GRDKPFLSAWPSAVVPQGGHVTLRCHYGGGFNFTLYKEDRIDIPILQGRIFQESFVMGPVTPENAGTYRCRQGFPHPSPTGWTAPSINALVIRVTG
Camo-KIR3DL3 -----
Aona-KIR3DP1 GQDEPFLSAWPSAVVPQGGHVTLRCHYGGGFNFTLYKEDRIDIPILQGRIFQESFVMGPVTPENAGTYRCRQGFPHPSPTGWTAPSINALVIRVTG
Aona-KIR3DS1 GRDKPFLSAWPSAVVPQGGHVTLRCHYGGGFNFTLYKEDRIDIPILQGRIFQESFVMGPVTPENAGTYRCRQGFPHPSPTGWTAPSINALVIRVTG
Aona-KIR3DL2 GRDKPFLSAWPSAVVPQGGHVTLRCHYGGGFNFTLYKEDRIDIPILQGRIFQESFVMGPVTPENAGTYRCRQGFPHPSPTGWTAPSINALVIRVTG
Aona-KIR3DL3 GQDEPFLSAWPSAVVPQGGHVTLRCHYGGGFNFTLYKENRPHVPIILYIIFQESFLMGPVTAAGAGTYRCRQGFPHPSPTGWTAPSINALVIRVTG
Aona-KIR3DL4 GQDEPFLSAWPSAVVPQGGHVTLRCHYGGGFNFTLYKEDRVHVPILQGRIFQESFVMGPVTPENAGTYRCRQGFPHPSPTGWTAPSINALVIRVTG
Aona-KIR4DL5 GQDEPFLSAWPSAVVPQGGHVTLRCHYGGGFNFTLYKEDRVHVPILQGRIFQESFVMGPVTPENAGTYRCRQGFPHPSPTGWTAPSINALVIRVTG
Aona-KIR4DL6 DQDKPFLSAWPSAVVPQGGHVTLRCHYGGGFNFTLYKEDRVHVPILQGRIFQESFVMGPVTPENAGTYRCRQGFPHPSPTGWTAPSINALVIRVTG
Aona-KIR4DL78 GQDEPFLSAWPSAVVPQGGHVTLRCHYGGGFNFTLYKEDRVHVPILQGRIFQESFVMGPVTPENAGTYRCRQGFPHPSPTGWTAPSINALVIRVTG

```


Dominio D2

10 20 30 40 50 60 70 80 90

KIR2DL4 LYEKPSLTARPGPTVTRGENVTLSGSSQSSFDIYHLSREGEAEHELRLPAVPSINGTFQADFPLGPATHGGTYRCFGSFHGSPIEWSASDPLPVSVTG

KIR3DL2 LYEKPSLSAQPGPTVQAGENVTLSCSSWSSYDIYHLSREGEAEHERRLRPAVKVNRFTQADFPLGPATHGGTYRCFGSFRALPCVWSNSSDPLLVSVTG

KIR3DL3 LYGKPSLSAQPGPTVQAGENVTLSCSSRSRSLFDIYHLSREAEAGELRLTAVLRVNGTFQANFPLGPVTHGGNYRCFGSFRALPHAWSDPSDPLPVSVTG

PatrKIR2DS4 LYEKPSLSAQPGPTVQAGENVTLSCSSRSYDYMVHLSREGEVHERRLPAVRSIKGTFQADFPLGPATHGGTYRCFGSFRDAPYEWSSDPLLVSVTG

Athy110029 RYGKPSLSAQPGPRVQAGENVTLSCSSRSYDYMVHLSKAGEAPDLRLPAVPSVNGTFQAEFPLGPATHGGTYRCFGSYNDSPYHWSAPSDPSPSVVTG

Athy110046 RYGKPSLSAQPGPRVQAGENVTLSCSSRSYDYMVHLSKAGEAPDLRLPAVPSVNGTFQAEFPLGPATHGGTYRCFGSYNDSPYHWSAPSDPSPSVVTG

Athy110124 LYEKPSLSAQPGPSVRAGENMTLSCSSRSYDYMVHLSREGEAEHLRLPAVPSIRGTFQAHFPLGPATHGGTYRCFGSFRDTPYQWSVPSDPYP-SPTG

Athy110129 QYWKPSLSAQLGPRVWAGEKVTLSGSSRTWFDYHLSREGEAPDLRLPAVPSVNGTFQAHFPLGPATHGGTYRCFGSFRDTPYHWSAPSDPLSVSVTG

Athy110130 QYWKPSLSAQLGPRVWAGEKVTLSGSSRTWFDYHLSREGEAPDLRLPAVPSVNGTFQAHFPLGPATHGGTYRCFGSFRDTPYHWSAPSDPLSVSVTG

Athy110134 QYWKPSLSAQLGPRVWAGEKVTLSGSSRTWFDYHLSREGEAPDLRLPAVPSVNGTFQAHFPLGPATHGGTYRCFGSFRDTPYHWSAPSDPLSVSVTG

Athy180141 QYWKPSLSAQLGPRVWAGEKVTLSGSSRTWFDYHLSREGEAPDLRLPAVPSVNGTFQAEFPLGPATHGGTYRCFGSFRDTPYHWSAPSDPLSVSVTG

Athy180143 RYGKPSLSAQPGPRVQAGENVTLSCSSQSSFDYHLSKAGEAPDLRLPAVPSVNGTFQAEFPLGPATHGGTYRCFGSYNDSPYHWSAPSDPSPSVVTG

Athy180144 RYGKPSLSAQPGPRVQAGENVTLSCSSRSYDYMVHLSKAGEAPDLRLPAVPSVNGTFQAEFPLGPATHGGTYRCFGSFRDAPYEWSSDPLLVSVTG

Athy180146 RYGKPSLSAQPGPRVQAGENVTLSCSSRSYDYMVHLSKAGEAPDLRLPAVPSVNGTFQAEFPLGPATHGGTYRCFGSFRDAPYEWSSDPLLVSVTG

Athy180148 QYWKPSLSAQLGPRVWAGEKVTLSGSSRTWFDYHLSRKGAPDLRLPAVPSVNGTFQAHFPLGPAHGGTYRCFGSFRDTPYHWSAPSDPLSVSVTG

Athy190156 QYWTPSLSAQLGPRVWAGEKVTLSGSSRTWFDYHLSREGEAPDLRLPAVPSVNGTFQAEFPLGPATHGGTYRCFGSFRDTPYHWSAPSDPSPSVVTG

Athy190162 QYWKPSLSAQLGPRVWAGEKVTLSGSSRTWFDYHLSREGEAPDLRLPAVPSVNGTFQAEFPLGPATHGGTYRCFGSFRDTPYHWSAPSDPSPSVVTG

Athy190165 RYGKPSLSAQPGPRVQAGENVTLSCSSRSYDYMVHLSKAGEAPDLRLPAVPSVNGTFQAEFPLGPATHGGTYRCFGSFRDAPYEWSSDPLLVSVTG

Athy190168 RYGKPSLSAQPGPRVQAGENVTLSCSSWSSYDYMVHLSKAGEAPDLRLPAVPSVNGTFQAEFPLGPATHGGTYRCFGSFRDAPYEWSSDPLLVSVTG

Athy190173 LYEKPSLSAQPGPSVRAGENMTLSCSSRSYDYMVHLSREGEAEHLRLPAVPSIRGTFQAHFPLGPATHGGTYRCFGSFRDTPYQWSAPSDPYP-SPTG

Athy190176 RYGKPSLSAQPGPRVQAGENVTLSCSSRSYDYMVHLSKAGEAPDLRLPAVPSVNGTFQAEFPLGPATHGGTYRCFGSFRDTPYHWSAPSDPSPSVVTG

Atbe170178 LYEKPSLSAQPGPRVWAGEKVTLSGSSRSLFDYHLSRKGAPDLRLPAVPSVNGTFQAEFPLGPATHGGTYRCFGSFRDTPYHWSAPSDPSPSVVTG

Atbe170185 LYEKPSLSAQPGPRVWAGEKVTLSGSSRSLFDYHLSRKGAPDLRLPAVPSIKGTFQAEFPLGPATHGGTYRCFGSFRDTPYHWSAPSDPSPSVVTG

Atbe170263 LYEKPSLSAQPGPRVWAGEKVTLSGSSRSLFDYHLSRKGAPDLRLPAVPSVNGTFQAEFPLGPATHGGTYRCFGSFRDTPYHWSAPSDPSPSVVTG

Lala300199 RYGKPSLSAQPGPRVQAGENVTLSCSSRSYDYMVHLSKAGEAPDLRLPAVPSVNGTFQAEFPLGPATHGGTYRCFGSFRDAPYEWSSDPLLVSVTG

Lala300271 RYGKPSLSAQPGPRVWAGEKVTLSGSSRSLFDYHLSRKGAPDLRLPAVPSVNGTFQAEFPLGPATHGGTYRCFGSFRDTPYHWSAPSDPSPSVVTG

Lala300289 QHGKPSLSAQPGPRVQAGENVTLSCSSRSYDYMVHLSKAGEAPDLRLPAVPSVNGTFQAEFPLGPATHGGTYRCFGSFRDTPYHWSAPSDPSPSVVTG

Lala660280 RYGRPSLSAQPGPRVQAGENVTLSCSSRSYDYMVHLSKAGEAPDLRLPAVPSVNGTFQAEFPLGPATHGGTYRCFGSFRDTPYHWSAPSDPSPSVVTG

Lala660302 RYGKPSLSAQPGPRVWAGEKVTLSGSSRSYDYMVHLSKAGEAPDLRLPAVPSVNGTFQAEFPLGPATHGGTYRCFGSFRDTPYHWSAPSDPSPSVVTG

Atge-KIR3DP1

Atge-KIR3DL2 LYEKPSLSAQPGPSVRAGENMTLSCSSRSYDYMVHLSREGEAEHLRLPAVPSIHGTFQAHFPLGPATHGGTYRCFGSFRDTPYQWSVPSDPYP-SPTG

Atge-KIR3DL3 QYWKPSLSAQLGPRVWAGEKVTLSGSSQTFWFDYHLSREGEAPDLRLPAVPSVNGTFQAHFPLGPATHGGTYRCFGSFRDTPYHWSAPSDPSPSVVTG

Atge-KIR3DL4 QYWKPSLSAQLGPRVQAGENVTLSCSSWSSYDYMVHLSRDGEAPDLRLPAVPSVNGTFQAHFPLGPATHGGTYRCFGSFRDTPYHWSAPSDPSPSVVTG

Atge-KIR3DL5 LYEKPSLSAQPGPRVWAGEKVTLSGSSRSYDYMVHLSRKGAPDLRLPAVPSVNGTFQAEFPLGPATHGGTYRCFGSFRDTPYHWSAPSDPSPSVVTG

Atge-KIR3DL6 LYEKPSLSAQPGPRVWAGEKVTLSGSSRSLFDYHLSRKGAPDLRLPAVPSVNGTFQAEFPLGPATHGGTYRCFGSFRDTPYHWSAPSDPSPSVVTG

Sabo-KIR3DL1 QYWKPSLSAQPGPTVQAGENVTLSCSSWSSYDYMVHLSREGEAEHLRLPAVPSIKGTFQAHFPLGPATHGGTYRCFGSFRDTPYHWSAPSDPSPSVVTG

Sabo-KIR3DL2 QYWKPSLSAQPGPTVQAGENVTLSCSSRSLFDYHLSRKGAPDLRLPAVPSVNGTFQAEFPLGPATHGGTYRCFGSFRDTPYHWSAPSDPSPSVVTG

Sabo-KIRDP3

Sabo-KIR3DL4 RYGKPSLSAQPGPRVQAGENVTLSCSSWSSYDYMVHLSRDGEAEHLRLPAVPSVNGTFQAHFPLGPATHGGTYRCFGSFRDTPYHWSAPSDPSPSVVTG

Sabo-KIR3DL5P

Sabo-KIR3DL6P

Sabo-KIR3DL7 RYGKPSLSAQPGPTVQAGENVTLSCSSSTWFDYHLSRDGEAEHLRLPAVPSIKGTFQAHFPLGPATHGGTYRCFGSFRDTPYHWSAPSDPSPSVVTG

Camo-KIRDP1

Camo-KIR3DL2P

Camo-KIR3DL3P

Aona-KIR3DP1

Aona-KIR3DS1 LYEKPSLSAQPGPTVQAGENVTLSCSSWSSYDYMVHLSREGEAEHLRLPAVPSIKGTFQAHFPLGPATHGGTYRCFGSFRDTPYHWSAPSDPSPSVVTG

Aona-KIR3DL2 LYDKPSLSAQPGPTLQAGENVTLSCSSWSSYDYMVHLSREGEAEHLRLPAVPSIKGTFQAHFPLGPATHGGTYRCFGSFRDTPYHWSAPSDPSPSVVTG

Aona-KIR3DL3 RYGKPSLSAQPGPTLQAGENVTLSCSSRTWFDYHLSRKGAPDLRLPAVPSIKGTFQAHFPLGPATHGGTYRCFGSFRDTPYHWSAPSDPSPSVVTG

Aona-KIR3DL4 LYEKPSLSAQPGPTVQAGENVTLSCSSRSYDYMVHLSREGEAEHLRLPAVPSIKGTFQAHFPLGPATHGGTYRCFGSFRDTPYHWSAPSDPSPSVVTG

Aona-KIR4DL5 LYEKPSLSVQPGPTVQAGENVTLSCSSRTWFDYHLSRKGAPDLRLPAVPSIKGTFQAHFPLGPATHGGTYRCFGSFRDTPYHWSAPSDPSPSVVTG

Aona-KIR4DL6 LYDKPSLSARPGPTVQAGENVTLSCSSRTWFDYHLSREGEAEHLRLPAVPSIKGTFQAHFPLGPATHGGTYRCFGSFRDTPYHWSAPSDPSPSVVTG

Aona-KIR4DL78 LYDKPSLSAQPGPTVQAGENVTLSCSSRSYDYMVHLSREGEAEHLRLPAVPSIKGTFQAHFPLGPATHGGTYRCFGSFRDTPYHWSAPSDPSPSVVTG

Dominio Citoplasmático

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
KIR2DL4										
KIR3DL2	CSKKKNAAVMNDQEPAGHRTVNREDSDEQDPQEVTYAQLDHCIFTQRKITGPSQRKRPSTDTSCVIELPNAEPRRALSFAHEHHSQALMGSSRETTALSQTQLASSNVPAAGI*										
KIR3DL3	CSNKKNAAVMDQEPAGDRTVNRESDGQDPQEVTYAQLDHCVFTQRKISRPSQRPKPTPTDTSVYTELPNAEPRSKVVSQPRAPQSGLEGVF*										
PatrKIR2DS4	CANKKNAAVMDQEPAGNRTVNREDSDEQDPQEVTYAQLNHCVFTQRKITRPSQRPKPTPTDTSV*-----										
Athy110029	CSNKKKCCRNQPRACREQNSEPQGF*-----										
Athy110046	WSKKKNAAVMDQEPGADRTVNRENSDQVVPQEVTYAQLDHSFAFTQRKIASPSQRPKRAPIETSVYMELPKADPELKTVMSTIDR--										
Athy110124	WSKKKNAAVMDQEPGTDRTVYRENSDQVVPQEVTYAQLDHCVFTQRKITSLSKRPKRPPETTSVYMELPKADPELKTVMSTIDR--										
Athy110129	CSDKRI SLTKQSPETSQPCAKAGWSTQMLQ*										
Athy110130	-----DAAVKDQEPGADRTVNREDSHEQDPQEVFTFKLDYCVFTQRKITHPSQRPKRAPETTSVYMELPKADPELKTVMSTIDR--										
Athy110134	CSDKRI SLTKQSPETSQPCAKAGWSTQMLQ*										
Athy180141	-----DAAVKDQEPGADRTVNREDSHEQDPQEVFTFKLDYCVFTQRKITHPSQRPKRAPETTSVYMELPKADPELKTVMSTIDR--										
Athy180143	WSNKKNAAVMDQEPGADRTVNRENSDQVVPQEVTYAQLDHSFAFTQRKITHPSQRPKRAPIETSVYMELPKADPELKTVMSTIDR--										
Athy180144	WSKKKNAAVMDQEPGTDRTVYRENSDQVVPQEVTYAQLDHCVFTQRKITSLSKRPKRPPETTSVYMELPKADPELKTVMSTIDR--										
Athy180146	CSDKRI SLTKKSPETSQPCAKAGWSTQMLQ*										
Athy180148	CPDKRI SLTKQSPETSQPCAKAGWSTQMLQ*										
Athy190156	CSDKRI SLTKQSPETSQPCAKAGWSTQMLQ*										
Athy190162	-----DAAVKDQEPGADRTVNREDSHEQDPQEVFTFKLDYCVFTQRKITHPSQRPKRAPETTSVYMELPKADPELKTVMSTIDR--										
Athy190165	CSDKRI SLTKQSPETSQPCAKAGWSTQMLQ*										
Athy190168	WSKKKNAAVMDQEPGTDRTVYRENSDQVVPQEVTYAQLDHCVFTQRKITSLSKRPKRPPETTSVYMELPKADPELKTVMSTIDR--										
Athy190173	WSKKKNAAVMDQEPGADRTVNRESDGQDPQEVTYAQLNHCVFTQRKITHPSQRPKRPPETTSVYMELPNAERGFSLSPVPEHHRQ--										
Athy190176	WSKKKNAAVMDQEPGADRTVNRENSDQVVPQEVTYAQLDHSFAFTQRKITSPSQRPKRAPIETSVYMELPKADPELKTVMSTIDR--										
Atbel170178	WSNKKNAAVMDQEPGADRTVNRENSDQVVPQEVTYAQLDHCVFTQRKITHPSQRPKRAPIETSVYMELPKADPELKTVMSTIDR--										
Atbel170185	CSDKRI SLTKQSPETSQPCAKAGWSTQMLQ*										
Atbel170263	-----										
Lala300199	WSKKKNAAVMDQEPGADRTVNRENSDQVVPQEVTYAQLDHCVFTQRKITHPSQRPKRAPETTSVYMELPKADPELKTVMSTIDR--										
Lala300271	WSKKKNAAVMDQEPGADRTVNRENSDQVVPQEVTYAQLDHCVFTQRKITHPSQRPKRAPETTSVYMELPKADPELKTVMSTIDR--										
Lala300289	WSKKKNAAVMDQEPGADRTVNRENSDQVVPQEVTYAQLDHCVFTQRKITHPSQRPKRAPETTSVYMELPKADPELKTVMSTIDR--										
Lala660280	WSNKKNAAVMDQEPGADRTVNRENSDQVVPQEVTYAQLDHCVFTQRKITHPSQRPKRAPETTSVYMELPKADPELKTVMSTIDR--										
Lala660302	WSKKKNAAVMDQEPGADRTVNRENSDQVVPQEVTYAQLDHCVFTQRKIAHPSQRPKTAPETTSVYMELPKADPELKTVMSTIDR--										
Atge-KIR3DP1	-----										
Atge-KIR3DL2	WSKKKSAVIMDQEPGADRTVNRENSDQVVPQEVTYAQLNHCVFTQRKITHPSQRPKRPPETTSVYMELPNAERGFSLSPVPEHHRQPLRGSSRETTALSQTRLASSNGTAPGT*										
Atge-KIR3DL3	CSDKRI AAVKDQEPGADRTVNREVSHEQDPQEVFTFKLDYCVFTQRKITHPSQRPKRAPETTSVYMELPKADPELKTVMSTIDR*										
Atge-KIR3DL4	CSDKRI AAVKDQEPGADRTVNREVSHEQDPQEVFTFKLDYCVFTQRKITHPSQRPKRAPETTSVYMELPKADPELKTVMSTIDR*										
Atge-KIR3DL5	CSDKRI AEVKDQEPGADRTVNREVSHEQDPQEVFTFKLDYCVFTQRKITHPSQRPKRPPETTSVYMELPKADPELKTVMSTIDR*										
Atge-KIR3DL6	WSNKKSAAVMDQEPGADRTVNRENSDQVVPQEVTYAQLDHSFAFTQRKITHPSQRPKRAPIETSVYMELPKADPELKTVMSTIDR*										
Sabo-KIR3DL1	CSHKRVAAVKDQEPAVDRTVNREVSDEQDPQEVTYAQLDHCVFTQRKITHPSQRPKRPPETTSVYTELPNAEPGLKVDVFL*										
Sabo-KIR3DL2	WSRKNNSAAVVDQEPAVDRTVNREVSDEQDPQEVTYAQLDHCVFTQRKITHPSQRPKRPPETTSVYTELPNAEPGLKVDVFL*										
Sabo-KIRDP3	-----										
Sabo-KIR3DL4	YSHKRVAAVKDQEPAVDRTVNREVSDEQDPQEVTYAQLDHCVFTQRKATSPSRPRRPPETTSVYTELPNAEPGLKVDVFL*										
Sabo-KIR3DL5P	-----										
Sabo-KIR3DL6P	WSRKNNSAAVVDQEPAVDRTVNREVSDEQDPQEVTYAQLDHCVFTQRKITHPSQRPKRPPETTSVYTELPNAEPGLKVDVFL*										
Sabo-KIR3DL7	WSTKKSAAVVDQEPAVDRTVNREVSDEQDPQEVTYAQLDHCVFTQRKNARPSQRPKRPPETTSVYTELPNAEPGLKVDVFL*										
Camo-KIRD1	-----										
Camo-KIR3DL2P	-----										
Camo-KIR3DL3P	WAKKKSAAVMDQEPGADRTVNREVSDEQDPQEVTYAQLDHCVFTQRKITHPSQRPKRPPETTSVYTELPNAEPGLKVDVFL*										
Aona-KIR3DP1	-----										
Aona-KIR3DS1	WSNKRNAAVMNDQEPGVDRTVNREDSDEQDPQEVTYAQLDHCVFTQRKITHPSQRPKRPPETTSVYTELPNAEPGLKVDVFL*										
Aona-KIR3DL2	WSNKKNAAVMDQEPGADRTVNRENSDQVVPQEVTYAQLDHCVFTQRKITHPSQRPKRPPETTSVYTELPNAEPGLKVDVFL*										
Aona-KIR3DL3	WSNKKNAAVMDQEPGVDRTVNREDSDEQDPQEVTYAQLDHCVFTQRKITHPSQRPKRPPETTSVYTELPNAEPGLKVDVFL*										
Aona-KIR3DL4	WSNKKNAAVMNDQEPGVDRTVNREDSDEQDPQEVTYAQLDHCVFTQRKITHPSQRPKRPPETTSVYTELPNAEPGLKVDVFL*										
Aona-KIR4DL5	CSDKRDAAVVDQEPGADRTVNREDSDEQDPQEVTYAQLDHCVFTQRKITHPSQRPKRPPETTSVYTELPNAEPGLKVDVFL*										
Aona-KIR4DL6	WSNKKNAAVMNDQEPGVDRTVNREDSDEQDPQEVTYAQLDHCVFTQRKITHPSQRPKRPPETTSVYTELPNAEPGLKVDVFL*										
Aona-KIR4DL78	WSNKKDAAVTQEPGVDRTVNREDSDEQDPQEVTYAQLDHCVFTQRKITHPSQRPKRAPETTSVYTELPNAEPGLKVDVFL*										