

# **Localización cromosómica de genes de la familia de las integrinas por hibridación in situ con sondas fluorescentes**

Elena Fernández-Ruiz.

Servicio de Inmunología, Hospital de la Princesa,  
Universidad Autónoma de Madrid.

## **1.- Técnicas utilizadas para el mapeo de genes.**

Clásicamente se han utilizado dos aproximaciones para la asignación cromosómica de genes: la utilización de híbridos somáticos interespecíficos, humano x roedor, con una dotación cromosómica humana conocida y la hibridación in situ sobre metafases con sondas marcadas radiactivamente.

La utilidad de los híbridos radica en la gran pérdida de material genético humano que tiene lugar durante su periodo de estabilización, de forma que todos aquellos cromosomas provenientes de la línea humana que no sean imprescindibles para el mantenimiento del híbrido o de ciertas características ventajosas, van a ser eliminados. Así, los productos de los genes humanos retenidos en la célula híbrida pueden detectarse como marcadores (isoenzimas, antígenos de membrana, factores secretados) y correlacionar su expresión con la retención de cromosomas específicos (1).

Por otro lado, el DNA de estos híbridos somáticos digerido con enzimas de restricción, separado por electroforesis en un gel de agarosa y transferido a una membrana, puede ser hibridado con sondas específicas del gen que estamos

buscando. De esta manera, podemos encontrar un patrón de bandas diferente en el DNA de las células parentales que nos permita reconocer selectivamente la presencia de dicho gen humano en los híbridos. De la misma manera, se puede buscar la secuencia diana por PCR con los “primers” adecuados, de forma que habrá amplificación de las secuencias específicas únicamente en aquellos híbridos con el cromosoma portador del gen.

La hibridación in situ sobre metafases permite refinar la localización cromosómica del gen a una región, e incluso a una banda concreta, si se realiza secuencialmente alguna técnica diferencial de bandas.

Recientemente se ha desarrollado la incorporación enzimática al DNA de deoxinucleótidos modificados con biotina, digoxigenina o fluoresceína, método que facilita la posterior detección de la sonda marcada, bien con el sistema de la avidina-biotina, bien con anticuerpos anti-digoxigenina o anti-fluoresceína acoplados a fluorocromos (revisado en 2, 3).

Así, la hibridación in situ con sondas fluorescentes (FISH) permite visualizar los genes como puntos de fluorescencia, uno en cada cromátida homóloga.

La gran ventaja respecto a los marcajes con isótopos radiactivos es, además de la seguridad, su mayor sensibilidad, especificidad y rapidez.

## **2.- Consideraciones generales sobre la técnica de hibridación in situ con sondas fluorescentes (FISH) sobre cromosomas.**

El protocolo general de la FISH consiste en:

2.1.- Obtención de metafases y fijación al porta.

2.2.- Pretratamiento de los portas con RNasa A, para eliminar el RNA y evitar fondo, y con pepsina para hacer accesible la secuencia diana a la sonda (4).

2.3.- Desnaturalización de las secuencias diana del DNA cromosómico.

2.4.- Preparación y marcaje de la sonda. Según el tipo de sonda que se utilice hay que tener en cuenta una serie de parámetros como son: el tamaño de la sonda que debe ser mayor de 1 kb, la longitud de la secuencia diana en el cromosoma y la supresión de las secuencias repetidas. En general, es preferible trabajar con DNA genómico insertado en vectores que se marca por “nick

translation” con dUTP modificado enzimáticamente con digoxigenina o biotina, debido a la mayor longitud de la secuencia diana que reconoce en el cromosoma. El DNA genómico ha de ser sometido a un proceso de supresión de las secuencias repetidas que contenga, que están presentes con alta frecuencia a lo largo del genoma humano. Para ello, se desnaturaliza e incuba la sonda marcada con un exceso de DNA de placenta humano “frio”, con el fin de dejar libres solamente las secuencias únicas para que hibriden con sus homólogas en los cromosomas (5).

2.5.– Hibridación in situ. Las condiciones pueden ser más o menos restrictivas. En general, se utiliza la sonda resuspendida en una solución de hibridación al 50% formamida, 2x SSC y 10% sulfato de dextrano a 37°C durante toda la noche.

2.6.– Lavados, con el fin de eliminar la hibridación no específica, que pueden ser más o menos astringentes.

2.7.– Detección inmunológica. Puede hacerse con un solo anticuerpo anti-digoxigenina acoplado a un fluorocromo, si la secuencia diana está altamente representada en el genoma (DNA satélite, familias multigénicas, etc). En el caso de las secuencias únicas, puede amplificarse la señal mediante tres incubaciones sucesivas: primero, un anticuerpo monoclonal de ratón anti-digoxigenina seguido de un anticuerpo anti-ratón digoxigeninado y por último un anticuerpo anti-digoxigenina acoplado a un fluorocromo.

Si el DNA se ha marcado con biotina, primero se utiliza avidina acoplada a un fluorocromo, seguido de un anticuerpo anti-avidina biotinilado y de nuevo la avidina utilizada en primer lugar.

2.8.– Tinción de los cromosomas con 4',6-diamino-2-pheylindol (DAPI) o yoduro de propidio según el fluorocromo utilizado en la detección de la sonda.

2.9.– Microscopía convencional de fluorescencia con filtros apropiados y fotografía.

2.10.– Bando. Si se quieren asignar los puntos de hibridación a una banda específica en el cromosoma hay que hacer una tinción diferencial de bandas, o bien incubando previamente las células con bromodeoxiuridina (BrdU) antes de obtener las metafases y poder ver simultáneamente por fluorescencia los puntos de hibridación sobre los cromosomas bandeados, o bien desteñir las preparaciones y hacer bandas G con tripsina sobre las mismas metafases y volver a fotografiarlas.

2.11.– Análisis cariotípico y recuento de los puntos de hibridación.

### **3.- Aplicaciones de la FISH según la sonda utilizada**

#### **3.1.- Sondas centroméricas**

Son aquellas sondas que pertenecen a familias heterogéneas de DNA satellite, conocidas como DNA alfoide, que se encuentran en la región centromérica de todos los cromosomas humanos. Aunque su organización básica está siempre caracterizada por monómeros de unos 170 pares de bases repetidos en tándem, la secuencia nucleotídica y la organización monomérica puede ser considerablemente divergente entre un cromosoma y otro (revisado en 6). Aún así, hibridadas en condiciones de alta astringencia pueden reconocer un solo cromosoma. Se han descrito sondas específicas para casi todos los cromosomas humanos (revisado en 7).

Estas sondas son de gran utilidad para la detección de polimorfismos y de aberraciones cromosómicas numéricas, aneuploidías y trisomías, tanto en cromosomas en metafase de leucemias o en células de líquido amniótico, como en núcleos interfásicos. La citogenética de núcleos interfásicos es de gran utilidad en el estudio de tumores sólidos como los de vejiga, mama y gliomas dada la dificultad de obtener buenas metafases (8, 9).

Las sondas de secuencias repetidas que se encuentran repartidas a lo largo del genoma producen distintos tipos de bandas en cromosomas metafásicos, y pueden ser utilizadas para obtener un patrón de bandas simultáneo a la detección de la señal de hibridación. Por ejemplo, utilizando secuencias Alu marcadas como sonda e hibridándolas, se origina un patrón de bandas R muy útil para la identificación de los cromosomas humanos (10).

#### **3.2.- Sondas complejas.**

Son las obtenidas a partir de genotecas de cromosomas aislados por citometría de flujo (11). Al hibridarlas sobre metafases van a colorear un cromosoma específico en su totalidad ("chromosome painting"), por lo que son ideales para detectar aberraciones cromosómicas estructurales. Pueden utilizarse para caracterizar el origen de pequeños trozos de material cromosómico reorganizado de difícil asignación por bandeado y conocer los puntos de rotura, para la detección de trisomías de cromosomas particulares (cromosoma 21 en el síndrome de Down) y para la identificación de translocaciones conocidas y de deleciones (12, 13).

Dentro de este grupo se incluyen las colecciones ordenadas de cósmidos, portadores de insertos de genotecas específicas de cromosomas, que permiten obtener mapas de alta resolución del orden de los genes sobre los cromosomas (10). También proveen marcadores que flanquean sitios de rotura por lo que pueden utilizarse tanto para detectar aquellos con importancia diagnóstica, como para caracterizarlos a nivel molecular (3, 14).

También pueden generarse colecciones de cósmidos con DNA genómico humano total y utilizarse como sonda para detectar cromosomas humanos en híbridos interespecíficos.

### **3.3.– Sondas de secuencias únicas**

Son utilizadas para la asignación cromosómica de genes y en combinación, haciendo dobles marcajes, permiten ordenar la posición de los genes entre sí y respecto al centrómero o telómero. También han sido utilizadas para la determinación de zonas de replicación temprana y tardía en núcleos interfásicos (15).

Estas sondas se utilizan insertadas en plásmidos, bacteriófagos o cromosomas de levaduras (“yeast artificial chromosomes” o YACs). Pueden ser tanto cDNAs como DNA genómico.

## **4.– Localización cromosómica de genes de la familia de las Integrinas.**

### **4.1.– Integrinas: generalidades.**

Las Integrinas constituyen una familia de receptores implicados en adhesión celular y unión a proteínas de la matriz extracelular (MEC) (revisado en 16, 17, 18). Comprende al menos 22 moléculas diferentes, cada una de las cuales está formada por la asociación no covalente de una cadena  $\alpha$  y una  $\beta$ . Hasta el momento se han descrito 15 cadenas  $\alpha$  y 10 cadenas  $\beta$ . Las primeras evidencias indicaban que cada cadena  $\beta$  podía asociarse a diferentes cadenas  $\alpha$ , pero que cada  $\alpha$  se asociaba sólo a una  $\beta$ . Esto llevó a dividir las integrinas en tres subfamilias según la cadena  $\beta$  expresada (19): las proteínas VLA ( $\beta 1$ :  $\alpha 1$ - $\alpha 8$ ), los receptores de adhesión leucocitarios ( $\beta 2$ :  $\alpha L$ ,  $\alpha X$  y  $\alpha M$ ) y las citoadhesinas ( $\beta 3$ :  $\alpha IIb$  y  $\alpha V$ ). Sin embargo, se han identificado nuevas cadenas  $\beta$  ( $\beta 4$ ,  $\beta 5$ ,  $\beta 6$

y  $\beta$ 7) y nuevas asociaciones entre heterodímeros ampliando inmensamente el repertorio molecular y funcional de las integrinas.

#### 4.1.1.- Estructura de las integrinas.

Tanto las cadenas  $\alpha$  como las  $\beta$  son glicoproteínas de membrana que presentan un patrón estructural común. Las cadenas  $\alpha$  tienen de 1.000 a 1.400 aminoácidos y la homología general entre todas ellas oscila entre un 25-35%. A nivel de su región N terminal existen 7 zonas de alta homología denominadas de I a VII de unos 60 residuos. Se dividen en dos tipos según su procesamiento proteolítico y el número de cationes divalentes en cadenas  $\alpha$  de tipo A y de tipo B.

Las cadenas  $\alpha$  de tipo A ( $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\alpha$ L,  $\alpha$ M y  $\alpha$ X) presentan un dominio extra llamado dominio I que presenta alta homología con la encontrada en otras proteínas implicadas en la unión al colágeno. En las regiones V, VI y VII existen secuencias similares a las encontradas en proteínas que unen calcio.

Las cadenas  $\alpha$  de tipo B ( $\alpha$ v,  $\alpha$ Ib,  $\alpha$ 3,  $\alpha$ 5,  $\alpha$ 6) sufren cerca del extremo C terminal una ruptura proteolítica que genera dos fragmentos unidos por puentes disulfuro.

La cadena  $\alpha$ 4 presenta una estructura particular, con un ruptura proteolítica a nivel central y sin existencia de enlaces disulfuro entre los fragmentos.

Se ha descrito la existencia de procesamiento alternativo en algunas de ellas. Todo este tipo de mecanismos genera una gran diversidad tanto en el reconocimiento de ligandos como en la interacción con las proteínas del citoesqueleto.

Las cadenas  $\beta$  poseen secuencias de alrededor de 800 aminoácidos con una corta región intracelular de unos 50 residuos, excepto para el caso de  $\beta$ 4 que posee un tallo citoplasmático de 1.100 aminoácidos. La homología entre cadenas  $\beta$  está entre el 35 y 45%. Hay varias zonas consenso a lo largo de su secuencia con homología cercana al 90 %, entre las cadenas  $\beta$  hasta ahora clonadas. La zona N terminal posee una secuencia de aminoácidos que se encuentra altamente conservada en diferentes cadenas  $\beta$ , por lo que podría representar una zona de unión común a ligandos. Las cadenas  $\beta$  presentan entre 48 y 56 cisteínas a lo largo de su secuencia, la mayor parte agrupadas en cuatro regiones. Se han descrito secuencias consenso para fosforilación en tirosina o serina en el tallo citoplasmático de la mayoría de las cadenas  $\beta$  y se ha demostrado la existencia de procesamiento alternativo a este nivel.

La asociación de cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  determina una estructura tipo herradura en la que las regiones amino terminales de ambas cadenas formarían una región globular a través de la cual la integrina se uniría al ligando. El extremo N-terminal de la cadena  $\beta$  se pliega formando un bucle que es estabilizado por puentes disulfuro. Las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  se mantendrían unidas a través de los cationes calcio situados entre las zonas ricas en cisteínas de las cadenas  $\beta$  y las regiones V, VI, y VII de las cadenas  $\alpha$ . A este nivel se formaría un receptáculo que podría también estar implicado en la unión a los ligandos.

#### **4.1.2.- Proteínas VLA (subfamilia $\beta 1$ ).**

Constituyen el grupo de integrinas con una distribución más amplia, desde células epiteliales a células de origen hematopoyético. Clásicamente llamadas VLA (“very late antigens”) por la expresión tardía de algunas de ellas tras la activación celular, este nombre carece de vigencia desde que se ha demostrado la expresión constitutiva de algunas de ellas en multitud de tejidos, así como la inducción tardía de otras integrinas que no se asocian a  $\beta 1$  (revisado en 20).

Actúan fundamentalmente como receptores de la MEC (fibronectina, colágeno y laminina), en la mayoría de los casos a través del tripéptido Arg-Gly-Asp (RGD). Hasta el momento se han descrito 10 cadenas  $\alpha$  asociadas a  $\beta 1$ .

##### **4.1.2.1.- VLA-4 ( $\alpha 4$ - $\beta 1$ ).**

Es la única integrina  $\beta 1$  que además de tener un ligando de MEC (región CS-1 de la fibronectina), posee un ligando celular identificado (VCAM-1) que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas y se expresa en células endoteliales activadas por citoquinas, en macrófagos y sinoviocitos. VLA-4 se expresa constitutivamente en linfocitos T de sangre periférica, monocitos, timocitos, células de melanoma y eosinófilos, así como en la mayoría de las líneas linfoides y mieloides. Está implicada en la adhesión al endotelio, a células dendríticas y células estromales de la médula ósea y también juega un papel en la citólisis y agregación homotípica.

#### **4.1.3.- Citoadhesinas (Subfamilia $\beta 3$ ).**

Las citoadhesinas están formadas por receptores multiespecíficos: la glicoproteína de plaquetas GpIIa-IIIb ( $\alpha 2$ - $\beta 3$ ) que constituye el receptor de fibrinógeno y fibronectina de plaquetas estimuladas y el receptor de vitronectina (VNR) ( $\alpha v$ - $\beta 3$ ) de expresión mucho más amplia, en endotelio, células tumorales y en algunos linfocitos T de ratón. El VNR media adhesión tanto a factores solubles, fi-

brinógeno y factor de von Willebrand (vWF), como a proteínas de la MEC, vitronectina, colágeno tipo I desnaturalizado y fibronectina, fundamentalmente de manera RGD-dependiente. Ambas citoadhesinas juegan un papel importante en la coagulación y cicatrización, ya que ambos procesos requieren agregación plaquetaria y adhesión celular del endotelio a fibrinógeno, fibrina y vWF.

Además de unirse a  $\beta 3$ ,  $\alpha v$  es capaz de interactuar con  $\beta 5$  en adenocarcinomas, fibroblastos y células endoteliales y con  $\beta 1$  en la cresta neural y en fibroblastos. Ambos heterodímeros son capaces de producir adhesión celular a vitronectina y fibronectina.

#### **4.2.- Mapeo de los genes VLA-4 $\alpha$ (CD49D) y VNR $\alpha$ (VNRA) al cromosoma 2q31-q32 por hibridación in situ con sondas fluorescentes.**

Aunque los genes que codifican para los miembros de la familia de las integrinas están muy dispersos en el genoma, existen algunas asociaciones interesantes de distribución en clusters: 1) los genes de las cadenas  $\beta 3$  y  $\alpha II$  de la glicoproteína GpIIb/IIIa de plaquetas, están asignados al cromosoma 17q21-q23 y han sido ligados en un fragmento de 260 kb mediante electroferesis de campo pulsante (21, 22). En este mismo cromosoma también han sido localizadas las cadenas  $\alpha 3$  (1) y  $\beta 4$ , esta última en el brazo largo (23). 2) Las tres subunidades  $\alpha$  de los receptores leucocitarios ( $\alpha L$ ,  $\alpha X$  y  $\alpha M$ ) relacionadas estructuralmente (cadenas  $\alpha$  tipo A), están localizadas en el cromosoma 16 p11-p13.1. (24). 3) En la familia VLA,  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  que reconocen un set común de componentes de la MEC (laminina y colágeno), están ambas codificadas en el cromosoma 5 (1). 4)  $\beta 7$  y  $\beta 5$  en el cromosoma 12, esta última en la banda 12q1-q13 (25, 21).

Se ha descrito la localización cromosómica de otros miembros de la familia de las integrinas como son: la cadena  $\beta 2$  en el cromosoma 21q22 (24); la cadena  $\alpha v$  del receptor de vitronectina en el cromosoma 2 (21); la cadena  $\beta 1$ , común en las proteínas VLA, en el cromosoma 10 (26).

Muchas de estas localizaciones se han hecho por análisis de Southern blot sobre paneles de híbridos, y por tanto, la asignación regional permanece sin determinar.

Para determinar la asignación de los genes VLA-4 $\alpha$  (CD49D) y VNR $\alpha$  (VNRA) se utilizó la técnica de FISH sobre metafases humanas. Se utilizaron



como sondas un plásmido pBS conteniendo un fragmento de DNA genómico parcial de 15 kb del gen VLA-4 $\alpha$  y un plásmido pUC13 cuyo inserto era un cDNA de la región extracelular de la subunidad VNR $\alpha$ . Ambos se marcaron con digoxigenina, fueron hibridados al DNA cromosómico y visualizados utilizando anticuerpos acoplados a rodamina (27, 28).

En el caso de VLA-4 $\alpha$  se analizaron un total de 56 metafases y se vio que la señal fluorescente era específica y se encontraba sistemáticamente en el brazo largo del cromosoma 2: el 78% de las metafases mostraban señal de hibridación en una o ambas cromátidas. De hecho, el 70% de las señales fluorescentes, de un total de 115 puntos contabilizados, se encontraron en el cromosoma 2.

Para determinar la localización precisa de la señal de hibridación, se hicieron bandas GTG (bandas G con tripsina y giemsa). El 76.5% de los puntos fluorescentes hallados sobre el cromosoma 2 fueron localizados en las bandas 2q31-q32.

El mismo análisis se llevó a cabo para el gen del VNR $\alpha$  puesto que se había descrito previamente su localización en el brazo largo del cromosoma 2 (21) pero se desconocía la región. De las 107 metafases en las que se vio señal de hibridación, en el 79.8% de ellas estaba localizada en el cromosoma 2. Se analizaron en detalle 55 metafases en las que se contabilizaron 238 puntos fluorescentes, de los cuales, el 57.1% estaban localizados en el brazo largo del cromosoma 2. El análisis de bandas GTG reveló que el 76% de éstos se hallaba en las bandas 2q31-q32. La distribución de los puntos de hibridación sugería una localización telomérica de VNR $\alpha$  respecto de VLA-4 $\alpha$ , que posteriormente fue revelada por doble marcaje (resultados no publicados).

Las cadenas  $\alpha$  del VNR y de VLA-4 están relacionadas funcionalmente puesto que ambas pueden asociarse con la cadena  $\beta$ 1 y funcionar como receptores de fibronectina. La asignación de ambos locus (VNRA y CD49D) a la banda 2q31-q32 demuestra la existencia de un cluster de integrinas en el brazo largo del cromosoma 2. Recientemente, otros genes de la subfamilia VLA como  $\alpha$ 6 y  $\beta$ 6 que forman el receptor de laminina (VLA-6) han sido asignados al cromosoma 2, aunque su localización regional todavía no ha sido descrita, por lo que no se sabe si forman parte del mismo cluster. Si esto fuera así, podría ser el primer paso para establecer un mapa físico de estos genes.

## REFERENCIAS

- 1.- Rettig W. J., Dracopoli N. C., Goetzger T. A., Spengler B. A., Biedler J. L., Oettgen H. F., Old L. J.: Somatic cell genetic analysis of human cell surface antigens: chromosomal assignments and regulation of expression in rodent-human hybrid cells. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA.* 81: 6437 (1984).
- 2.- Litcher P., Boyle A. L., Cremer T., Ward D. C. : Analysis of genes and chromosomes by non isotopic in situ hybridization. *Genet. Anal. Techn. Appl.* 1: 24 (1991).
- 3.- Litcher P., Ward D. C.: *Nature.* 345: 93 (1990).
- 4.- Wiegant J., Galjart N. J., Raap A. K. D'Azzo A: The gene encoding human protective protein (PPGB) is on chromosome 20. *Genomics* 10: 345 (1991).
- 5.- Litcher P., Cremer T., Borden J., Manuelidis L. y Ward D. C.: Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ suppression hybridization using recombinant DNA libraries. *Hum. Genet.* 80: 224 (1988).
- 6.- Willard H. F. y Wayne J. S.: Hierarchical order in chromosome-specific human alpha satellite DNA. *Trends. Genet.* 3: 192 (1987).
- 7.- Vogt P.: Potential genetic functions of tandem repeated DNA sequence blocks in the human genome are based on a highly conserved "chromatin foldin code". *Human. Genet.* 84: 301. (1990).
- 8.- Hopman A. H. N., Ramaekers F. C. S., Raap A. K., Beck J. L., Devilee P., Van der Ploeg M. y Vooijs G. P.: In situ hybridization as a tool for study numerical chromosome aberrations in solid bladder tumors. *Histochemistry.* 89: 307 (1988).
- 9.- Cremer T., Tesin D., Hopman A. H. N. y Manuelidis L.: Rapid interphase and metaphase assessment of specific chromosomal changes in neuroectodermal tumor cells by in situ hybridization with chemically modified DNA probes. *Exp. Cell. Research.* 176: 199 (1988).
- 10.- Litcher P., Tang C. J. C., Call K., Hermanson G., Evans G. A., Housman D. y Ward D. C.. High-resolution mapping of human chromosome 11 by in situ hibridation with colmid clones. *Science.* 247: 64 (1990).

- 11.– Young B. D., Jeanpierre M, Goyns M. H., Krumlauf R., Stewart G. D. y Elliot T: Construction and characterization of chromosomes DNA libraries. En *Chromosomes and Cancer*, Academic Press Inc. Capítulo 12, pag. 211 (1983).
- 12.– Cremer T., Litcher P., Borden J., Ward D. C. y Manuelidis L.: Detection of chromosome aberrations in metaphase and interphase tumor cells by in situ hybridization using chromosome-specific library probes. *Human. Genet.* 80:235 (1988).
- 13.– Arnoldus E. P. J., Wiegant J, Noordermeer I. A., Wessels J. W., Beverstock G. C., Grosveld G. C., van der Ploeg M. y Raap A. K.: Detection of the Philadelphia chromosome in interphase nuclei. *Cytogen. Cell. Genet.* 54: 108 (1990).
- 14.– Selleri L., Hermanson G. G., Eubanks J. H., Lewis K. A. y Evans G. A: Molecular localization of the t(11; 22) (q24; q12) translocation of Ewing sarcoma by suppression in situ hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 887 (1991).
- 15.– Selig S., Okumura K., Ward D. C. y Cedar H.: Delineation of DNA replication time zones by fluorescence in situ hybridization. *EMBO J.* 11: 1217 (1992).
- 16.– Springer T. A.: Adhesion receptors in the immune system. *Nature* 346:425 (1990).
- 17.– Hemler, M. E.: VLA proteins in the integrin family: structures, functions and their role in leucocytes. *Annu. Rev. Immunol.* 8: 365 (1990).
- 18.– Roushlati E.: Integrins. *J. Clin. Invest.* 87: 1 (1991)
- 19.– Hynes, R. O.: Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell* 48: 549 (1987).
- 20.– Sánchez-Madrid F. y Corbí A. L.: Leukocyte integrins: structure, function and regulation of their activity. *Sem. Cell. Biol.* 3: 199 (1992)
- 21.– Sosnoski, D. M., Emanuel B. S., Hawkins A. L., van Tuinen P., Ledbetter D. H., Nussbaum R. L., Kaos F-T., Schwartz E., Phillips D., Bennett J. S., Fitzgerald L. A., Poncz, M.: Chromosomal localization of the genes for the vitronectin and fibronectin receptors subunits and for platelet glycoproteins IIb and IIIa. *J. Clin. Invest.* 81: 1983 (1988).

- 22.– Bray P. F., Barsh G., Rosa J-P., Luo X. Y., Magenis E., Shuman M. A.: Physical linkage of the genes for platelet membrane glycoproteins IIb and IIIa. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 85:8683 (1988).
- 23.– Hogervorst F., Kuikman I., Van Kessel A. G., Sonnenberg A.: Molecular cloning of the human  $\alpha 6$  integrin subunit. Alternative splicing of  $\alpha 6$  mRNA and chromosomal localization of the  $\alpha 6$  and  $\beta 4$  genes. *Eur. J. Biochem.* 199:425 (1991).
- 24.– Corbí A. L., Larson R. S., Kishimoto T. K., Springer T. A., Morton, C. C.: Chromosomal location of the genes encoding the leukocyte adhesion receptors LFA-1, Mac-1 and p150,95. *J. Exp. Med.* 167:1597 (1988).
- 25.– Krissansen G. W., Yuan Q., Jenkins D., Jiang W-E., Rooke L., Spurr N. K., Eccles M., Leung E., Watson J. D.: Chromosomal locations of the genes coding for the integrin  $\beta 6$  and  $\beta 7$  subunits. *Immunogenetics* 35:58 (1992).
- 26.– Peters, P. M., Kamarck M. E., Hemler M. E., Strominger J. L., Ruddle F. H.: Genetic and biochemical characterization of human lymphocyte cell surface antigens. The A-1A5 and A-3A4 determinants. *J. Exp. Med.* 159:1441 (1984).
- 27.– Fernández-Ruiz E., Pardo-Manuel de Villena F., Rubio M. A., Corbí A. L., Rodríguez de Córdoba S., Sánchez-Madrid F.: Mapping of the VLA-4 $\alpha$  gene to chromosome 2q31-q32. *Eur. J. Immunol.* 22: 587 (1992).
- 28.– Fernández-Ruiz E., Pardo-Manuel de Villena F., Rodríguez de Córdoba S. y Sánchez-Madrid F.: Regional localization of the human vitronectin receptor  $\alpha$  subunit gen (VNRA) to chromosome 2q31-q32. *Cytogen. Cell. Genet.* (1992, en prensa).