

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 27/07/2025.



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Viviane Aparecida de Oliveira Ciriaco

**DIVERSIDADE GENÉTICA DO GENE *MICA* EM
POPULAÇÕES MUNDIAIS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestra em Patologia.

Orientador: Prof. Dr. Erick da Cruz Castelli
Coorientadora: Profa. Dra. Camila Ferreira Bannwart Castro

**Botucatu
2023**

Viviane Aparecida de Oliveira Ciriaco

DIVERSIDADE GENÉTICA DO GENE *MICA* EM
POPULAÇÕES MUNDIAL

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de
Mestra em Patologia.

Orientador (a): Prof.Dr. Erick da Cruz Castelli
Coorientadora: Profa.Dra. Camila Ferreira Bannwart Castro

Botucatu
2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Ciriaco, Viviane Aparecida de Oliveira.

Diversidade genética do gene *Mica* em populações mundiais
/ Viviane Aparecida de Oliveira Ciriaco. - Botucatu, 2023

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Erick da Cruz Castelli

Coorientador: Camila Ferreira Bannwart Castro

Capes: 40105008

1. Variação genética. 2. Genes. 3. Polimorfismo genético.

Palavras-chave: Diversidade; *MICA*; *MICA**del; NGS.

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha Mãe, que sempre me apoiou e me incentivou a seguir meus sonhos, sempre acreditando em mim e me inspirando a ser uma pessoa melhor.

Agradecimientos

“It matters not what someone is born, but what they grow to be.”

-Alvo Dumbledore

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Erick C. Castelli, pela oportunidade e confiança em me aceitar como aluna de mestrado. Obrigada por todo apoio durante todo o mestrado, por todos os ensinamentos e por todo incentivo.

A minha coorientadora Camila Ferreira Bannwart Castro, por ter me apresentado ao GeMBio. Obrigada por ter me inspirado durante a faculdade a seguir a carreira da pesquisa e amar imunologia. Obrigada por todo carinho, dedicação, paciência e pela ajuda.

Agradeço a minha Mãe, uma mulher batalhadora que sempre fez de tudo por mim, obrigada por sempre me apoiar em tudo e me aceitar como eu sou, seu apoio foi essencial para que eu conseguisse levar a vida com mais leveza. Obrigada por além de ser minha mãe, ter uma relação de parceria e amizade. Sou muito grata a você por tudo. Te amo.

Ao meu padrasto, que sempre esteve ao meu lado e ao lado da minha mãe, muito obrigada pelo apoio.

A todos meus amigos, em especial as minhas amigas da escola Jéssica Oliveira, Raphaela Sales e Maria Eduarda, por todo apoio, companheirismo, por estarem presentes em todos os momentos da minha vida. Amo muito vocês.

As minhas amigas e “roommates”, Raphaela Neto Pereira e Gabriela Sato Paes, sou muito grata por ter conhecido vocês. Obrigada por toda paciência em me ouvir, por todas as risadas, conselhos, conversas aleatórias e filosóficas. Amo vocês, contem comigo para sempre, em todos os momentos.

Ao grupo MICA, especialmente a Amanda e Joyce por toda ajuda, conversas filosóficas sobre MICA e pela amizade e companheirismo de vocês. Contem comigo para tudo que precisarem, sou muito grata a vocês.

As minhas parceiras e parceiros de laboratório, Nayane Silva, Heloísa Andrade, Isabelle Silva, Lívia Ramos, Marcel Ferreira, Ícaro Scalisse, João Toloi, Ingrid Ferraz, Luise Tini, Nathaly Ogata, Brenda Tibúrcio, Douglas Nadur e Richard Ribeiro. Obrigada por toda a ajuda, pelas conversas e pela amizade de vocês.

Ao programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB-UNESP), pela oportunidade.

Aos membros da banca avaliadora, por aceitarem o convite e contribuírem com a minha formação.

À CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) 131710/2021-4, que possibilitou dedicação exclusiva ao trabalho desenvolvido através da bolsa de mestrado.

A todos, que contribuíram com os meus estudos e pesquisa, durante todos esses anos.

Sumário

Lista de Figuras	11
Lista de Tabelas	11
RESUMO	15
Capítulo I – Revisão de Literatura	17
INTRODUÇÃO	18
Estrutura e função das moléculas MICA e MICB	19
Expressão das proteínas MICA e MICB	22
Polimorfismos dos genes <i>MICA</i> e <i>MICB</i>	23
MICA/B em infecções, câncer e no transplante	27
JUSTIFICATIVA	29
OBJETIVOS	30
Objetivo Geral	30
Objetivos Específicos.....	30
REFERÊNCIAS	31
Capítulo II – Artigo.....	37
Introduction	40
Methods	41
Samples included in this study, sequencing strategy, and read alignment	41
Calling <i>MICA</i> and <i>MICB</i> copy numbers	41
Calling <i>MICA</i> , <i>MICB</i> , and <i>HLA-B</i> alleles.....	41

Results	42
<i>Detecting MICA*del</i>	42
<i>Other MICA null alleles</i>	43
The frequency of <i>MICA</i> null alleles in different biogeographical regions....	44
Linkage disequilibrium between <i>MICA*del</i> and <i>MICB</i> , <i>HLA-B</i> , and <i>HLA-C</i>	45
Discussion	47
References	50
Supplementary	53

Lista de Figuras

Figura 1. Família dos genes <i>MIC</i> . Os genes em azul são pseudogenes, os verdes são genes funcionais e em vermelho o gene <i>HLA-B</i>	18
Figura 2. Diferentes vias de indução da expressão de MICA/B: ligação de LPS no receptor TLR-4 e ATM/ATR.....	23

Lista de Figuras do Artigo

Figure 1: <i>MICA</i> copy number estimation by comparing read depth in two references.....	43
Figure 2: Frequency of MICA null alleles in different biogeographic regions.....	44
Figure 3: Frequency of MICA null alleles in different population samples.....	45

Lista de Figuras do Artigo - Material Suplementar

Figure S1: An overview of the sequencing coverage across the MICA and MICB loci.....	53
Figure S2: An overview of the sequencing coverage at the upstream border of the MICA deleted region.....	54
Figure S3: An overview of the sequencing coverage at the downstream border of the MICA deleted region.....	55

Lista de Tabelas

Lista de Tabelas - Capítulo I

Tabela 1: Classificação dos alelos de MICA de acordo com a região de microsatélite presente no éxon 5.....	24
--	----

Lista de Tabelas do Artigo

Table 1: The frequency of different haplotypes observed for chromosomes 6 carrying MICA*del or MICA*partial.....	46
--	----

Lista de Tabelas do Artigo - Material Suplementar

Table S1: Frequency of MICA*del, <i>MICB</i> , <i>HLA-B</i> and <i>HLA-C</i> haplotypes.....	56
Table S2: Frequency of <i>MICA</i> , <i>MICB</i> and <i>HLA-B</i> haplotype distribution in different biogeographical populations.....	58

Lista de Abreviaturas e Siglas

ADAM	Desintegrina e Metaloproteínase (do inglês, A Disintegrin and Metalloproteinase)
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutada
ATR	Ataxia Telangiectasia Rad-3relacionada
BWA MEM	Burrows-Wheeler Alignment Tool
COVID-19	Coronavirus Disease of 2019
DAP10	DNAX-Activating Protein of 10KDa
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (do inglês, Deoxyribonucleic Acid)
ERp5	Proteína 5 do retículo endoplasmático (do inglês, Endoplasmic Reticulum Protein 5)
GPI	Glicosilfosfatidilinositol (do inglês, Glycosylphosphatidylinositol)
GrB2	Growth Factor Receptor-bound protein 2
HCMV	Citomegalovírus Humano (do inglês, Human Cytomegalovirus)
HGDP	Projeto de Diversidade do Genoma Humano (do inglês, Human Genome Diversity Project)
HLA	Antígeno Leucocitário Humano (do inglês, Human Leukocyte Antigens)
HSP70	Proteína do choque térmico (do inglês, 70-kDa Heat Shock Protein)
IFN-α	Interferon Alfa
IFN-β1	Interferon beta-1
IFNγ	Interferon gamma
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina (do inglês, Interleukin)
IMGT	International Immunogenetics Database
LD	Desequilíbrio de ligação (do inglês, Linkage Disequilibrium)
LPS	Lipopolissacarídeo
LTA	Linfotoxina alfa (do inglês, Lymphotoxin Alpha)
Met	Metionina
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade (do inglês, Major Histocompatibility Complex)
MICA	Major Histocompatibility Complex Class I-Chain Related A
MICA-TM	Região transmembrana da proteína MICA

MICB Major Histocompatibility Complex Class I-Chain Related B

MICA*del Deleção de MICA

miRNA microRNA

mMICA MICA de membrana (do inglês, Membrane MICA)

MMP Metaloproteinases de Matriz (Matrix Metalloproteinase)

mRNA RNA Mensageiro (do inglês, Messenger RNA)

NF-Y Fator de Transcrição Nuclear Y (do inglês, Nuclear Transcription Factor Y)

NK Natural Killer

NKG2 Natural Killer Group 2

NKG2D Natural Killer Group 2 molécula D

PI3K Fosfatidilinositol-3-Cinase (do inglês, Phosphatidylinositol 3-Kinase)

RNA Ácido Ribonucleico (do inglês, Ribonucleic Acid)

SARS-CoV-2 Coronavirus 2 da Síndrome Respiratória Aguda Grave (do inglês, Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2)

sMICA MICA solúvel (do inglês, Soluble MICA)

SNP Polimorfismo de base única (do inglês, Single Nucleotide Polymorphism)

Sp1 Transcription Factor Specificity Protein 1

Sp3 Transcription Factor Specificity Protein 3

Sp4 Transcription Factor Specificity Protein 4

TAP Transportador associado ao processamento de antígeno (do inglês, Transporter Associated with Antigen Processing)

TAPBP TAP binding protein

TGFβ Fator de Crescimento Transformante Beta (do inglês, Transforming Growth Factor Beta)

TLR4 Receptor do tipo Toll 4 (do inglês, Toll-like receptor 4)

TM Região Transmembrana (do inglês, Transmembrane)

TNF Fator de Necrose Tumoral (do inglês, Tumor Necrosis Factor)

UTR Região não traduzida (do inglês, Untranslated region)

UV Radiação Ultravioleta

Val Valina

Vav1 Vav Guanine Nucleotide Exchange Factor 1

WGS Whole-Genome Sequencing

Impacto científico esperado: O desenvolvimento de uma ferramenta computacional que permite analisar genes de interesse para transplantes e imunoterapia tumoral na população mundial.

Impacto social: Os achados poderão servir de base para estudos futuros de associação com transplantes e doenças de acordo com as diferentes frequências encontradas, permitindo maiores chances de sucesso nos tratamentos.

Impacto econômico: os dados disponíveis nos bancos de dados mundiais poderão auxiliar no desenvolvimento de métodos de diagnósticos e tratamentos mais efetivos.

RESUMO

O gene *MICA* codifica glicoproteínas expressas em situações de estresse celular, como no caso de infecções, câncer e estresse oxidativo. Quando *MICA* é expresso na membrana, a molécula interage com o receptor ativador NKG2D presente na superfície de células Natural Killer (NK), linfócitos T $\alpha\beta$ CD8 e linfócitos T $\gamma\delta$, levando a morte das células-alvo. Porém, essa proteína pode ser liberada na forma solúvel, quando isso acontece, ela interage com o mesmo receptor ativador NKG2D, mas leva a regulação negativa das células NK. O gene *MICA* é altamente polimórfico, com mais 531 alelos descritos até o momento, alguns desses polimorfismos apresentam impacto funcional descritos. *MICA* também pode estar ausente em alguns indivíduos, devido a uma deleção de 100pb que acontece entre os genes *HLA-B* e *MICB*, deletando toda a região de *MICA*, dessa forma, não há produção da molécula de *MICA*. Assim, este trabalho utilizou um pipeline de bioinformática utilizando o hla-mapper para trabalhar com os polimorfismos dos genes *MICA* e criamos uma estratégia específica para analisar a deleção do gene. Analisamos a diversidade de *MICA* em mais de 5.000 amostras de populações do mundo todo, incluindo amostras brasileiras, população altamente miscigenada. Encontramos *MICA**del em todas as populações analisadas, exceto na Oceania, com maior frequência na população asiática e americana, especialmente em amostras com ancestralidade nativo americanas. A maioria das amostras com a deleção de *MICA*, são heterozigotas e apresentam ao menos uma cópia funcional da molécula de MIC, porém encontramos duas amostras com a deleção completa de *MICA* e *MICB* nulo, sugerindo que outros mecanismos devem compensar a ausência das moléculas MIC.

Palavras-chave: *MICA*, *MICA**del, Diversidade, NGS.

ABSTRACT

The *MICA* gene encode glycoproteins expressed in situations of cellular stress, such as in the case of infections, tumor cells, oxidative stress, among others. *MICA* is expressed on the membrane, the molecule interacts with the activating receptor NKG2D present on the surface of NK cells, T $\alpha\beta$ CD8 cells and T $\gamma\delta$ cells, leading to the death of the target cells. However, this protein can be released in soluble isoform, when this happens, it interacts with the same activating receptor NKG2D, but leads to negative regulation of NK cells. The *MICA* gene is highly polymorphic, with over 531 alleles described to date, some of these polymorphisms have described functional impact. *MICA* may also be absent in some individuals, due to a 100pb deletion that occurs between the *HLA-B* and *MICB* genes, deleting the entire *MICA* region, thus, there is no production of the *MICA* molecule. Thus, this study used a specific methodology to work with *MICA* gene polymorphisms and we created a specific strategy to analyze gene deletion. We analyzed *MICA* diversity in more than 5,000 samples from populations around the world, including Brazilian samples (highly mixed population). We found *MICA**del in all analyzed populations, except in Oceania, more frequently in the Asian and American population, especially in samples with Native American ancestry. Most samples with *MICA* deletion are heterozygous and have at least one functional copy of the MIC molecule, but we found two samples with complete *MICA* deletion and null *MICB*, suggesting that another mechanism must compensate for the absence of MIC molecules.

Keywords: *MICA*, *MICA**del, Diversity, NGS.

References

1. Bahram S, Bresnahan M, Geraghty DE, Spies T. A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. *Proc Natl Acad Sci* 1994;91(14):6259–6263.
2. Raulet DH, Gasser S, Gowen BG, Deng W, Jung H. Regulation of Ligands for the NKG2D Activating Receptor. *Annu Rev Immunol* 2013;31(1):413–441.
3. Zwirner NW, Dole K, Stastny P. Differential surface expression of MICA by endothelial cells, fibroblasts, keratinocytes, and monocytes. *Hum Immunol* 1999;60(4):323–330.
4. BAHRAM S. MIC genes: from genetics to biology. *MIC Genes Genet Biol* 2000;76:1–60.
5. Tian W, Boggs DA, Ding W-Z, Chen D-F, Fraser PA. MICA genetic polymorphism and linkage disequilibrium with HLA-B in 29 African-American families. *Immunogenetics* 2001;53(9):724–728.
6. Ando H, Mizuki N, Ota M, et al. Allelic variants of the human MHC class I chain-related B gene (MICB). *Immunogenetics* 1997;46(6):499–508.
7. Yamamoto K, Fujiyama Y, Andoh A, Bamba T, Okabe H. Oxidative stress increases MICA and MICB gene expression in the human colon carcinoma cell line (CaCo-2). *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj* 2001;1526(1):10–12.
8. García G, Puerto F del, Pérez AB, et al. Association of MICA and MICB alleles with symptomatic dengue infection. *Hum Immunol* 2011;72(10):904–907.
9. Luangtrakool P, Vejbaesya S, Luangtrakool K, et al. Major Histocompatibility Complex Class I Chain–Related A and B (MICA and MICB) Gene, Allele, and Haplotype Associations With Dengue Infections in Ethnic Thais. *J Infect Dis* 2020;222(5):840–846.
10. Chen E, Chen C, Chen F, Yu P, Lin L. Positive association between MIC gene polymorphism and tuberculosis in Chinese population. *Immunol Lett* 2019;213:62–69.
11. Castelli EC et al. Immunogenetics of resistance to SARS-CoV-2 infection in discordant couples. *medRxiv* 2021.
12. Groh V, Rhinehart R, Secrist H, Bauer S, Grabstein KH, Spies T. Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived $\gamma\delta$ T cells of MICA and MICB. *Proc Natl Acad Sci* 1999;96(12):6879–6884.
13. Groh V, Wu J, Yee C, Spies T. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* 2002;419(6908):734–738.
14. Mizuki N, Ota M, Kimura M, et al. Triplet repeat polymorphism in the transmembrane region of the MICA gene: A strong association of six GCT repetitions with Behçet disease. *Proc Natl Acad Sci* 1997;94(4):1298–1303.
15. Zou Y, Han M, Wang Z, Stastny P. MICA Allele-Level Typing by Sequence-based Typing with Computerized Assignment of Polymorphic Sites and Short Tandem Repeats within the Transmembrane Region. *Hum Immunol* 2006;67(3):145–151.
16. Salih HR, Rammensee H-G, Steinle A. Cutting Edge: Down-Regulation of

- MICA on Human Tumors by Proteolytic Shedding. *J Immunol* 2002;169(8):4098–4102.
17. Waldhauer I, Goehlsdorf D, Gieseke F, et al. Tumor-Associated MICA Is Shed by ADAM Proteases. *Cancer Res* 2008;68(15):6368–6376.
 18. Salih HR, Goehlsdorf D, Steinle A. Release of MICB Molecules by Tumor Cells: Mechanism and Soluble MICB in Sera of Cancer Patients. *Hum Immunol* 2006;67(3):188–195.
 19. Li P, Morris DL, Willcox BE, Steinle A, Spies T, Strong RK. Complex structure of the activating immunoreceptor NKG2D and its MHC class I-like ligand MICA. *Nat Immunol* 2001;2(5):443–451.
 20. Chitadze G, Bhat J, Lettau M, Janssen O, Kabelitz D. Generation of Soluble NKG2D Ligands: Proteolytic Cleavage, Exosome Secretion and Functional Implications. *Scand J Immunol* 2013;78(2):120–129.
 21. Zwirner NW, Fernández-Viña MA, Stastny P. MICA, a new polymorphic HLA-related antigen, is expressed mainly by keratinocytes, endothelial cells, and monocytes. *Immunogenetics* 1997;47(2):139–148.
 22. Komatsu-Wakui M, Tokunaga K, Ishikawa Y, et al. Wide distribution of the MICA-MICB null haplotype in East Asians. *Tissue Antigens* 2001;57(1):1–8.
 23. Komatsu-Wakui M, Tokunaga K, Ishikawa Y, et al. MIC-A polymorphism in Japanese and a MIC-A-MIC-B null haplotype. *Immunogenetics* 1999;49(7):620–628.
 24. Tse K-P, Su W-H, Yang M, et al. A gender-specific association of CNV at 6p21.3 with NPC susceptibility†. *Hum Mol Genet* 2011;20(14):2889–2896.
 25. Wang W, Tian W, Zhu F, et al. *MICA* Gene Deletion in 3411 DNA Samples from Five Distinct Populations in Mainland China and Lack of Association with Nasopharyngeal Carcinoma (NPC) in a Southern Chinese Han population: MICA Gene Deletion in 3411 DNA Samples. *Ann Hum Genet* 2016;80(6):319–326.
 26. Komatsu-Wakui M, Tokunaga K, Ishikawa Y, et al. Wide distribution of the *MICA-MICB* null haplotype in East Asians: The *MICA-MICB* null haplotype in East Asians. *Tissue Antigens* 2001;57(1):1–8.
 27. Ota M, Bahram S, Katsuyama Y, et al. On the MICA deleted-MICB null, HLA-B*4801 haplotype. *Tissue Antigens* 2000;56(3):268–271.
 28. 1000 GENOMES PROJECT CONSORTIUM et al. A global reference for human genetic variation. *Nature* 2015; 526 (7571):68.
 29. Cann HM, Toma C de, Cazes L, et al. A Human Genome Diversity Cell Line Panel. *Science* 2002;296(5566):261–262.
 30. NASLAVSKY, Michel S. et al. Whole-genome sequencing of 1,171 elderly admixed individuals from the largest Latin American metropolis (São Paulo, Brazil). *BioRxiv* 2020.
 31. Castelli EC, Paz MA, Souza AS, Ramalho J, Mendes-Junior CT. Hla-mapper: An application to optimize the mapping of HLA sequences produced by massively parallel sequencing procedures. *Hum Immunol* 2018;79(9):678–684.
 32. Silva N dos SB, Souza A da S, Andrade H de S, et al. Immunogenetics of HLA-B: SNP, allele, and haplotype diversity in populations from different continents and ancestry backgrounds. *HLA* 2023;101(6):634–646.
 33. Naslavsky MS, Scliar MO, Yamamoto GL, et al. Whole-genome sequencing of 1,171 elderly admixed individuals from Brazil. *Nat Commun* 2022;13(1):1004.

34. Solberg OD, Mack SJ, Lancaster AK, et al. Balancing selection and heterogeneity across the classical human leukocyte antigen loci: A meta-analytic review of 497 population studies. *Hum Immunol* 2008;69(7):443–464.
35. Cosman D, Müllberg J, Sutherland CL, et al. ULBPs, Novel MHC Class I–Related Molecules, Bind to CMV Glycoprotein UL16 and Stimulate NK Cytotoxicity through the NKG2D Receptor. *Immunity* 2001;14(2):123–133.
36. Wang WY, Tian W, Zhu F m., Liu XX, Li LX, Wang F. MICA, MICB Polymorphisms and Linkage Disequilibrium with HLA-B in a Chinese Mongolian Population. *Scand J Immunol* 2016;83(6):456–462.
37. A global reference for human genetic variation. *Nature* 2015;526(7571):68–74.
38. Liu X, Tian W, Li L, Cai J. Characterization of the major histocompatibility complex class I chain-related gene B (MICB) polymorphism in a northern Chinese Han population: The identification of a new MICB allele, MICB*023. *Hum Immunol* 2011;72(9):727–732.