
SISTEMAS INMUNES ALTERNATIVOS

Alternative Immune Systems

LUIS F. CADAVID¹, M.D., Ph. D.

¹ Departamento de Biología e Instituto de Genética, Universidad Nacional de Colombia. Carrear 30 n.º 45-08, edificio 426, Bogotá, Colombia. lfcadavidg@unal.edu.co

Presentado 22 de febrero de 2011, aceptado 18 de septiembre de 2011, correcciones 28 de octubre de 2011.

RESUMEN

El sistema inmune en animales es una red compleja de moléculas, células y tejidos que de manera conjunta mantienen la integridad fisiológica y genética de los organismos. Convencionalmente se ha considerado la existencia de dos clases de inmunidad, la innata y la adaptativa. La primera es ancestral, con variabilidad limitada y baja discriminación, mientras que la segunda es altamente variable, específica y restringida a vertebrados mandibulados. La inmunidad adaptativa se basa en receptores de antígeno que se rearreglan somáticamente para generar una diversidad casi ilimitada de moléculas. Este mecanismo de recombinación somática muy probablemente emergió como consecuencia de un evento de transferencia horizontal de transposones y transposasas bacterianas en el ancestro de los vertebrados mandibulados. El reciente descubrimiento en vertebrados no mandibulados e invertebrados de mecanismos alternativos de inmunidad adaptativa, sugiere que en el transcurso de la evolución distintos grupos animales han encontrado soluciones alternativas al problema del reconocimiento inmunológico.

Palabras clave: sistema inmune, evolución, VLR, *Dscam*, alorreconocimiento.

ABSTRACT

The immune system in animals is a complex network of molecules, cells and tissues that coordinately maintain the physiological and genetic integrity of the organism. Traditionally, two classes of immunity have been considered, the innate immunity and the adaptive immunity. The former is ancestral, with limited variability and low discrimination. The latter is highly variable, specific and limited to jawed vertebrates. Adaptive immunity is based on antigen receptors that rearrange somatically to generate a nearly unlimited diversity of molecules. Likely, this mechanism of somatic recombination arose as a consequence of horizontal transfer of transposons and transposases from bacterial genomes in the ancestor of jawed vertebrates. The recent discovery in jawless vertebrates and invertebrates of alternative adaptive immune mechanisms, suggests that during evolution different animal groups have found alternative solutions to the problem of immune recognition.

INTRODUCCIÓN

El sistema inmunológico (SI) es una red compleja de moléculas, células, tejidos y órganos que mantiene la integridad fisiológica y genética de los organismos. Si bien un aspecto central en la función del SI es el reconocimiento, neutralización y eliminación de agentes bióticos o abióticos potencialmente nocivos, su papel trasciende el ámbito de la defensa contra microorganismos. Ciertamente, el SI es fundamental en procesos de organogénesis, remodelación de tejidos y eliminación de células propias senescentes y alteradas. Tradicionalmente, el SI se ha clasificado en dos grandes grupos, SI innato y SI adaptativo (Goldsby *et al.*, 2003). El primero comprende una gama amplia y heterogénea de mecanismos que van desde barreras fisiológicas y anatómicas, pasando por células fagocíticas, hasta receptores de reconocimiento de patrones moleculares y péptidos antimicrobianos. Los mecanismos de respuesta inmune innata representan la primera línea de defensa contra patógenos potenciales. El SI adaptativo se centra en el linfocito, célula especializada en el procesamiento y ejecución de información inmunológica. Estas células expresan receptores de reconocimiento de antígenos con una variabilidad casi ilimitada que permiten interacción específica con virtualmente todo el universo antigénico. Los linfocitos T (LT) y B (LB) son las dos poblaciones fundamentales de linfocitos, y tienen distintos tipos de receptores para el antígeno. Los LT expresan el receptor de células T (TcR) mientras que los LB expresan inmunoglobulinas (Ig), pero ambos generan su inmensa diversidad por mecanismos de recombinación somática mediada por moléculas RAG (*Recombination Activating Genes*). El SI adaptativo, definido por sus linfocitos y receptores para el antígeno, es altamente variable, discriminatorio y tiene la capacidad de generar memoria inmunológica. El SI adaptativo apareció súbitamente en el ancestro de los gnatostomos o vertebrados mandibulados muy probablemente como consecuencia de transferencia horizontal de genes bacterianos que codifican para transposasas, o enzimas con capacidad de cortar y pegar fragmentos de DNA (Du Pasquier y Flajnik, 1999). Ciertamente, la similitud a nivel de secuencia de DNA entre los genes RAG y genes de transposasas bacterianas apoyan esta hipótesis. Hasta hace relativamente poco se pensaba que los vertebrados mandibulados eran los únicos que poseían receptores de antígeno altamente variables y discriminatorios. Sin embargo, hallazgos recientes han evidenciado que tanto vertebrados no mandibulados como invertebrados tienen receptores inmunológicos muy variables que han evolucionado independientemente de Ig y TcRs, y que generan su variabilidad por mecanismos independientes de RAG. Estos otros mecanismos se conocen colectivamente como sistemas inmunes adaptativos alternativos.

EL SISTEMA INMUNE ADAPTATIVO DE VERTEBRADOS

El sistema inmune adaptativo de vertebrados mandibulados es autónomo y distribuido, y por lo tanto carece de un mando central. Los linfocitos reconocen antígenos mediante sus receptores variables y responden a ese reconocimiento activando una serie de eventos efectoros que van desde la inducción de muerte en células propias alteradas y la liberación de factores de comunicación celular, hasta la secreción de anticuerpos que se unen con alta afinidad a los más diversos antígenos. Los linfocitos se originan en los órganos hematopoyéticos a partir de un progenitor linfoide que se diferencia en dos

poblaciones principales, LB y LT. Los LB producen moléculas de Ig que sirven como receptores de antígeno. La interacción de inmunoglobulinas con el antígeno lleva a la activación y proliferación de LB y su diferenciación en células secretoras de anticuerpos, llamadas células plasmáticas. Los anticuerpos secretados unen y neutralizan una gran variedad de antígenos incluyendo proteínas solubles y microorganismos. Por su parte, los LT expresan receptores de antígeno llamados TcRs, los cuales son estructural y evolutivamente relacionados a las Ig. Sin embargo, a diferencia de las Ig, los TcRs no reconocen el antígeno directamente sino que requieren de moléculas presentadoras de antígeno, conocidas como moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Las moléculas del MHC están en la superficie de todas las células nucleadas y unen fragmentos peptídicos generados a partir del procesamiento de antígeno, para luego ser presentados a los TcRs de linfocitos T. La interacción trimolecular TcR-peptido-MHC induce la activación de linfocitos T, los cuales proliferan y diferencian en células citotóxicas o células productoras de moléculas de comunicación, colectivamente conocidas como citoquinas. Las citoquinas amplifican la respuesta inmune actuando sobre una gran variedad de células que llevan a la instauración de un proceso inflamatorio, el cual es en efecto el campo de batalla inmunológico. La activación de los linfocitos resulta también en la generación de células de memoria, las cuales permanecen en un estado quiescente hasta un segundo contacto con el mismo antígeno, produciendo una activación más rápida y una respuesta más intensa que la respuesta primaria.

Las Ig y TcRs tienen una diversidad casi ilimitada que les permite reconocer con alta afinidad virtualmente todo el universo antigénico. Los genes que codifican Igs y TcRs están realmente compuestos por centenares de fragmentos génicos, los cuales pertenecen a una de tres familias: V (variabilidad), D (diversidad) y J (unión). Durante la maduración de los linfocitos, se activan mecanismos de recombinación somática que ensamblan las regiones codificadoras de los receptores por medio de la unión de un fragmento V, un fragmento D y un fragmento J. Este sistema combinatorio tiene un alto componente de aleatoriedad, de tal forma que cada linfocito ensamblará un receptor diferente, dado que la diversidad de los receptores es una función del número de fragmentos génicos de cada familia. La variabilidad resultante aumenta aún más como consecuencia de la unión imperfecta de fragmentos génicos y de la adición aleatoria de nucleótidos en los sitios de unión entre fragmentos. Así, los linfocitos resultantes difieren en la especificidad por antígeno, lo cual se explica por diferencias en la secuencia de aminoácidos de sus receptores de antígeno. Cada linfocito tiene una única especificidad y el antígeno selecciona al linfocito con la especificidad adecuada induciendo su activación y expansión, en un fenómeno conocido como selección clonal. Dado que la generación de diversidad precede el contacto con antígeno, este es un sistema anticipatorio. Una consecuencia de esta altísima diversidad de receptores es que se genera una fracción alta de linfocitos que reconocen antígenos propios, los cuales podrían inducir autoinmunidad. Para prevenir estos eventos potencialmente fatales, los vertebrados han evolucionado mecanismos de control de calidad que eliminan linfocitos que portan receptores que reconocen antígenos propios.

La presencia de Igs, TcRs y moléculas del MHC está restringida filogenéticamente a vertebrados mandibulados (gnatostomos), es decir, peces cartilagosos, peces óseos y pulmonados, anfibios, reptiles, aves y mamíferos (Du Pasquier y Flajnik, 1999). Adicio-

nalmente, la maquinaria enzimática responsable de la recombinación somática V-D-J en linfocitos, el sistema RAG, está también restringida a gnatostomos. Esta maquinaria está compuesta por dos proteínas específicas de linfocitos, RAG-1 y RAG-2, que cortan y pegan fragmentos génicos VDJ para formar las regiones variables de los receptores. El registro fósil indica que peces cartilaginosos y vertebrados no mandibulados (agnatos) están separados por cerca de 100 millones de años, una ventana temporal relativamente corta para la emergencia de todo el espectro del sistema inmune linfocitario. Hace tres décadas se observó una curiosa similitud entre la estructura en la línea germinal de los fragmentos génicos que codifican receptores de antígeno y la estructura de elementos genéticos móviles (transposones) en procariones. En ambos casos la recombinación ocurre entre secuencias repetidas que flanquean el fragmento movilizado. Adicionalmente, se ha demostrado que las RAG tienen actividad de transposasa *in vitro* (Agrawal *et al.*, 1998). Estas observaciones han sugerido que las RAG en vertebrados mandibulados se adquirieron por transferencia horizontal y transposición de genes bacterianos. La adquisición de genes RAG por vertebrados ancestrales como parte de un transposón de origen bacteriano pudo haber generado los fragmentos génicos originales a partir de los cuales los segmentos VDJ se originaron. Así mismo, la introducción de transposasa RAG pudo haber permitido la ocurrencia de recombinación somática de estos fragmentos génicos en receptores de membrana preexistentes.

SISTEMAS INMUNES ALTERNATIVOS

VLRs en vertebrados no mandibulados. Lampreas y mixínidos son los únicos representantes contemporáneos de agnatos o vertebrados no mandibulados. Por décadas se ha intentado identificar en estos animales Igs, TcRs o moléculas del MHC, pero no se han encontrado. Sin embargo, se sabe que estos animales tienen células linfoides que producen aglutininas específicas de antígeno. Estudios recientes han mostrado que los agnatos han evolucionado receptores de antígeno altamente variables que no están relacionados estructuralmente con las inmunoglobulinas. Estos receptores se conocen como VLRs (*variable lymphocyte receptors*) y estructuralmente están compuestos por varias repeticiones ricas en leucina (LRRs) y una región invariable proximal a la membrana (Pancer *et al.*, 2004). Una de las observaciones asombrosas sobre los VLRs es que se expanden clonalmente, es decir, cada linfocito lleva un único receptor específico para un antígeno, como es el caso para las Ig y los TcRs. La generación de la diversidad de los VLRs es independiente de RAG, aunque también involucra un mecanismo de recombinación somática. En la línea germinal de agnatos hay dos loci incompletos, llamados VLRA y VLRB, que solo tienen las secuencias codificadoras para las regiones N-terminal y C-terminal de la molécula madura. Sin embargo, cada locus está flanqueado por cientos de regiones codificadoras para LRRs individuales que sirven para llenar de manera aleatoria el locus incompleto de VLRs y así formar loci maduros. La manera como se ensamblan estos genes en los linfocitos de agnatos es por un mecanismo de recombinación conocido como conversión génica, en donde aleatoriamente casetes de LRRs individuales se van insertando en la región codificadora de VLRs (Alder *et al.*, 2005). Lo que es aún más sorprendente es que VLRA y VLRB se expresan en poblaciones distintas de linfocitos que funcionalmente, al menos *in vitro*, se comportan como linfocitos T y B (Guo *et al.*, 2009). Así, dos trayectorias evolutivas independientes convergieron

en la generación de receptores de antígeno altamente variables, con mecanismos de generación de variación basados en recombinación somática y que se expresan en poblaciones de linfocitos con funciones distintas y complementarias. Estas trayectorias evolutivas paralelas han usado bloques de construcción distintos, por un lado dominios de Ig, y por el otro, LRRs.

Moléculas Dscam en *Drosophila*. La molécula *Dscam* (*Down syndrome cell adhesion molecule*) se caracterizó inicialmente como responsable, en parte, de la guía axonal en el desarrollo del sistema nervioso en la mosca de la fruta (*Drosophila*) y posteriormente se observó que funciona como un receptor de antígeno (Watson *et al.*, 2005). El mecanismo de generación de variabilidad por *Dscam*, no obstante, no involucra rearreglos de DNA sino de RNA, en un mecanismo conocido como *splicing* o procesamiento alternativo de RNA. Los genes *Dscam* están compuestos por 15 exones que codifican para dominios de inmunoglobulina, una región transmembranal y una región citoplasmática. Tres de los exones que codifican para dominios de inmunoglobulina, están realmente compuestos por docenas de casetes, cada uno de los cuales codifica para un único dominio de inmunoglobulina. Después de la transcripción de DNA y durante el proceso de maduración de RNA mensajero, cada molécula escoge aleatoriamente un solo casete de cada uno de los tres exones variables (Kurtz y Armitage, 2006). Así, por un mecanismo combinatorio a nivel de procesamiento de RNA, potencialmente se generan más de 31.000 moléculas *Dscam* distintas. Adicionalmente, se ha visto que ciertas moléculas están sobre o subrepresentadas dependiendo del tipo de patógeno al que se exponen las células. El caso de *Dscam* es otro ejemplo de que la evolución ha seguido rutas diferentes para generar un repertorio de receptores de antígeno suficientemente diverso para discriminar entre una amplísima gama de antígenos.

Moléculas de alorreconocimiento en Cnidarios. El vasto universo antigénico incluye no solo patógenos potenciales sino también tejidos de individuos de la misma especie. Si bien en organismos solitarios como nosotros el reconocimiento de tejidos provenientes de individuos de la misma especie ocurre solo en situaciones artificiales como transplantes, existe una gran variedad de animales en los cuales estos fenómenos de alorreconocimiento son cotidianos. Estos animales son típicamente coloniales y sésiles, que crecen como incrustaciones de superficie en sustratos duros, como es el caso de corales y esponjas. Mientras la colonia crece bidimensionalmente, la probabilidad de entrar en contacto célula-célula con miembros de su misma especie aumenta. Estos contactos pueden resultar en fusión entre colonias, formando una colonia quimérica más grande y por lo tanto con mayor capacidad para adquirir recursos energéticos. La mayoría de los contactos entre colonias, no obstante, resultan en rechazo (Buss, 1982). Este proceso es mediado por diversos mecanismos efectores que inducen una respuesta inflamatoria en el sitio de contacto previniendo fusión. La razón por la cual existen estos fenómenos de fusión/rechazo en organismos coloniales se puede explicar desde la biología de sus ciclos de vida. Estos organismos, a diferencia de la mayoría de organismos solitarios, no secuestran la línea germinal en etapas tempranas de desarrollo. Por el contrario, son capaces de generar células germinales en cualquier momento de sus vidas a partir de células madre pluripotenciales que circulan constantemente en la colonia. Estas células además de diferenciarse en gametos, también lo pueden hacer en los varios tipos de células somáticas que componen la colonia. Cuando dos colonias se fusionan,

es posible que las células madre de una colonia migren hacia la otra, y si las dos colonias difieren en el régimen con el cual se diferencian en células germinales versus somáticas, una colonia puede generar una fracción desproporcionada de gametos con respecto a la otra (Stoner y Weissman, 1996). Así, la colonia más propensa a diferenciar sus células madre en células germinales “parasitará” a la colonia más propensa a generar primordialmente células somáticas. Cuando la quimera se reproduzca, el genoma de la colonia que genere más gametos estará mayoritariamente representada en la siguiente generación. Es por esto también que la probabilidad de fusión es directamente proporcional a la similitud genética entre colonias. Este parasitismo de células germinales ha sido la principal fuerza selectiva para promover evolución de mecanismos de alorreconocimiento en invertebrados coloniales.

Los fenotipos de alorreconocimiento en metazoarios basales se han estudiado en el ascidio *Botryllus* y en el hydrozoario *Hydractinia*. En este último, las respuestas están controlados por el complejo génico ARC (*Allorecognition Complex*) que contiene dos loci principales, *alr1* y *alr2* (Cadavid *et al.*, 2004). Las colonias se fusionan si comparten uno o dos alelos en ambos loci, se rechazan si no comparten alelos en ninguno de los dos loci y muestran fusión transitoria como un efecto de dosis de alelos (por ejemplo, si comparte solo un alelo en un solo locus). *Arl1* codifica para una proteína transmembranal tipo I de 537 amino ácidos que tiene dos dominios extracelulares tipo inmunoglobulina (Ig) y un dominio intracitoplasmático con un motivo de inmunoreceptor activador basado en tirosina (ITAM; Rosa *et al.*, 2010). Por su parte, *arl2* codifica para una proteína transmembranal con tres dominios Ig extracelulares y un dominio intracitoplasmático que contiene un motivo de inmunoreceptor inhibidor basado en tirosina (ITIM; Nicotra *et al.*, 2009). Estos dos genes candidatos de alorreconocimiento comparten similitudes estructurales con loci del Complejo de Receptores Leucocitarios (LRC) en mamíferos, incluyendo LILRs y KIRs (Trowsdale *et al.*, 2001). Un análisis detallado de la región cromosómica alrededor de *arl1* ha mostrado la presencia de al menos 10 genes adicionales que codifican proteínas transmembranales con dominios extracelulares Ig no-canónicos similares a *arl2* (Rosa *et al.*, 2010). La región cromosómica entre *arl1* y *arl2* no ha sido secuenciada por completo y es posible que albergue genes adicionales que en conjunto participen en la determinación y control de fenotipos de alorreconocimiento.

Genes candidatos de alorreconocimiento también se han caracterizado en el ascidio *Botryllus schlosseri* (De tomaso *et al.*, 2005). En este protocordado colonial el locus *FuHc* (*Fusibility/Histocompatibility*) controla las reacciones de alorreconocimiento y codifica para una proteína transmembranal altamente polimórfica con dominios extracitoplasmáticos pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas. Las colonias de *Botryllus* se fusionan si comparten uno o dos alelos de *FuHc* y se rechazan si no comparten alelos (De tomaso *et al.*, 2005). Un segundo locus ligado a *FuHc* llamado *Fester* codifica para una proteína transmembranal con dominios extracelulares SCR (*Short Consensus Repeat*) y parece participar también en alorreconocimiento dado que la inhibición de su expresión por iRNA o su bloqueo directo con anticuerpos monoclonales produce pérdida de los fenotipos de fusibilidad predichos (Nyholm *et al.*, 2006).

CONCLUSIÓN

Desde que Elie Metchnikoff en la segunda mitad del siglo XIX describió la función inmunológica de células fagocíticas en larvas de estrellas de mar, ha habido interés por establecer las relaciones evolutivas entre los mecanismos de respuesta inmune de vertebrados e invertebrados. Hasta no hace mucho tiempo, se consideraba que todos los animales poseían un sistema inmune innato con variabilidad y especificidad limitadas y que solo los vertebrados tenían un sistema inmune adaptativo. Ciertamente, este sistema apareció casi súbitamente, confiriéndole a los vertebrados mandibulados una nueva manera de reconocer el universo antigénico y responder apropiadamente contra este. Esta innovación proporcionó la posibilidad de anticipar el reto inmune mediante la generación de incontables clones de células inmunes con especificidades diferentes contra el antígeno. Los nuevos descubrimientos en inmunología comparativa han mostrado que la evolución de receptores de antígeno altamente variables no está restringida a vertebrados mandibulados. En el transcurso de la evolución distintos grupos animales han encontrado soluciones alternativas al problema de reconocimiento inmunológico. Conceptualmente, podemos considerar la evolución del sistema inmune como el cambio, integración e innovación de módulos inmunológicos. Los módulos son conjuntos de elementos altamente integrados y cuasiindependientes. La arquitectura modular de los organismos vivos les confiere mayor robustez ante perturbaciones y les permite mayor plasticidad evolutiva, pues los módulos pueden actuar como unidades de selección natural, proveyendo que estos cumplan la máxima darwiniana de descendencia con modificación. Los módulos pueden originarse de otros módulos preexistentes mediante adquisición de nuevas funciones. Tal es el caso de las moléculas *Dscam* que inicialmente evolucionaron como moléculas importantes en la guía axonal y que luego fueron cooptadas por amebocitos de artrópodos para actuar en el reconocimiento de antígenos. En el contexto inmune podemos pensar varios módulos: el sistema inmune linfocitario, el sistema de reconocimiento inmune mediado por *Dscam* o *VLR*, el sistema complemento, etc. El sistema inmune, así como los organismos mismos, tienen arquitectura modular. Pero estos módulos se pueden organizar para formar una red jerárquica. Un ejemplo relevante sería la integración de módulos de citoquinas, la inmunidad celular y la inmunidad humoral en el módulo del sistema inmune linfocitario o adaptativo de vertebrados.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a los integrantes del grupo de Inmunología Evolutiva de la Universidad Nacional de Colombia por proporcionarme un ambiente estimulante para el pensamiento y la discusión. Agradezco también a la Dra. Nubia Matta por su invitación a participar en la Cátedra de Sede José Celestino Mutis: "Todo lo que quiso saber sobre genética y no se atrevió a preguntar".

BIBLIOGRAFÍA

AGRAWAL A, EASTMAN QM, SCHATZ DG. Transposition Mediated by RAG-1 and RAG-2 and its Implications for the Evolution of the Immune System. *Nature*. 1998;394:744-751.

ALDER MN, ROGOZIN IB, IYER LM, GLAZKO GV, COOPER MD, PANCER Z. Diversity and Function of Adaptive Immune Receptors in a Jawless Vertebrate. *Science*. 2005;310:1970-1973.

BUSS LW. Somatic Cell Parasitism and the Evolution of Somatic Tissue Compatibility. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982;79:5337-5341.

CADAVID LF, POWELL AE, NICOTRA ML, MORENO M, BUSSE LW. An invertebrate Histocompatibility Complex. *Genetics*. 2004;167:357-365.

DE TOMASO AW, NYHOLM SV, PALMERI KJ, ISHIZUKA KJ, LUDINGTON WB, MITCHEL K, WEISSMAN IL. Isolation and Characterization of a Protochordate Histocompatibility Locus. *Nature*. 2005;438:454-459.

DU PASQUIER L, FLAJNIK MF. Origin and Evolution of the Immune System, in *Fundamental Immunology*. W.E. Paul. Editor. Raven Press: New York. 1999; p. 605-650.

GODLDSBY RA, KINDT TJ, OSBORNE BA, KUBY J. *Immunology*. 5th Ed. Freeman. New York; 2003.

GUO P, HIRANO M, HERRIN BR, LI J, YU C, SADLONOVA A, COOPER MD. Dual Nature of the Adaptive Immune System In Lampreys. *Nature*. 2009;459:796-802.

KURTZ J, ARMITAGE SOA. Alternative adaptive immunity in invertebrates. *Trends Immunol*. 2006;27:493-496.

NICOTRA ML, POWELL AE, ROSENGARTEN RD, MORENO M, GRIMWOOD J, LAKKIS FG, DELLAPORTA SL, BUSSE LW. A Hypervariable Invertebrate Allodeterminant. *Curr Biol*. 2009;19:583-589.

NYHOLM SV, PASSEGUE E, LUDINGTON WB, VOSKOBOYNIK A, MITCHEL K, WEISSMAN IL, DE TOMASO AW. Fester, a Candidate Allorecognition Receptor from a Primitive Chordate. *Immunity*. 2006;25:163-173.

PANCER Z, AMEMIYA CT, EHRHARDT GRA, CEITLIN J, GARTLAND GL, COOPER MD. Somatic Diversification of Variable Lymphocyte Receptors in the Agnathan Sea Lamprey. *Nature*. 2004;430:174-180.

ROSA SF, POWELL AE, ROSENGARTEN RD, NICOTRA ML, MORENO MA, GRIMWOOD J, LAKKIS FG, DELLAPORTA SL, BUSSE LW. Hydractinia Allodeterminant *alr1* Resides in an Immunoglobulin Superfamily-like Gene Complex. *Curr Biol*. 2010;20:1122-1127.

STONER DS, WEISSMAN IL. Somatic and Germ Cell Parasitism in a Colonial Ascidian: Possible Role for a Highly Polymorphic Allorecognition System. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:15254-15259.

TROWSDALE J, BARTEN R, HAUDE A, STEWART CA, BECK S, WILSON MJ. The genomic Context of Natural Killer Receptor Extended Gene Families. *Immunol Rev*. 2001;181:0-38.

WATSON FL, PUTTMANN-HOLGADO R, THOMAS F, LAMAR DL, HUGHES M, KONDO M, REBEL VI, SCHMUCKER D. Extensive Diversity of Ig-superfamily Proteins in the Immune System of Insects. *Science*. 2005;309:1874-1878.