

11281

2

**Caracterización de los sitios intracelulares de
procesamiento de
antígenos endógenos presentados por
moléculas clase II del MHC.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS
PRESENTA

Biomedicina

LAURA CECILIA BONIFAZ ALFONZO

Tutor Dr. José Moreno Rodríguez

México, D.F 2000

11281-37



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

LISTA DE ABREVIATURAS

MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
MHC-I	Moléculas clase I del MHC
MHC-II	Moléculas clase II del MHC
CPA	Célula presentadora de antígeno
RE	Reticulo endoplásmico
LG	Lisozima de gallina
TCR	Receptor de linfocitos T
TGN	Red del trans-Golgi
Ii	Cadena invariante
β 2M	Beta dos microglobulina
TAP1/TAP2	Transportadores asociados a procesamiento de antígeno uno y dos
LMP2/LMP7	Proteínas de bajo peso molecular dos y siete
AP-1/AP-2	Proteínas adaptadoras uno y dos
RM6P(CI)	Receptor de manosa 6 fosfato catión independiente
MHC	Compartimientos clase II
CIIV	Vasículas que contienen clase II
CLIP	Péptido de la cadena Ii unido a clase II
LIP	Péptido de la cadena Ii generado por leupeptina
SLIP	Péptido pequeño de la cadena Ii asociado a clase II
BFA	Brefeldina A
LLnL	N-acetil-leucil-leucil-norleucinal
MON	Monensina
CLQ	Cloroquina

INDICE

Resumen	5
Abstrac	6
Introducción	7
Antecedentes	10
1.-Moléculas del complejo principal de histocompatibilidad.	10
a) Moléculas clase I	10
Estructura y Funciones.	10
Biosíntesis, ensamble y transporte.	11
b) Moléculas clase II	13
Estructura y funciones.	13
Biosíntesis y ensamble.	15
Cadena Invariante.	16
Estructura	16
Funciones	17
Transporte de moléculas clase II-Cadena Ii a la vía endocítica.	17
Disociación de la cadena Ii.	19
Intercambio de péptido.	22
Compartimientos especializados en la unión de péptidos a moléculas clase II.	23
Importancia del péptido en la estabilidad del dímero clase II.	26
Transporte de MHC-II a la superficie celular	26
2.-Mecanismos de transporte intracelular mediado por vesículas.	27
3.-Proteínas exógenas:	32
Fagocitosis, pinocitosis y endocitosis mediada por receptores	32
4.-Proteínas endógenas:	33
Localización en la célula y señales de tráfico intracelular.	33
a) Proteínas sintetizadas en los ribosomas asociados a RE.	34
b) Proteínas residentes de RE.	35
c) Proteínas de secreción y residentes de la vía endocítica.	37
5.-Sistemas proteolíticos y generación de péptidos antigénicos.	38
a) Proteasas endosómicas-lisosómicas.	39

b) Complejo multicatalítico citosólico: Proteasoma.	43
c) Degradación asociada a retículo endoplásmico.	46
d) Autofagia y mecanismos de degradación de proteínas endógenas por lisosomas.	50
6.-Presentación de antígenos exógenos por moléculas clase II.	53
7.-Presentación de antígenos endógenos por moléculas clase II	56
a) Presentación de antígenos de membrana y de secreción.	57
b) Presentación de antígenos retenidos en el RE.	60
c) Presentación de antígenos citosólicos.	62
d) Estudios de presentación de antígenos con formas endógenas de lisozima de gallina.	65
Planteamiento del problema.	67
Hipótesis	68
Objetivos	68
Modelo experimental	69
Materiales y métodos	70
Resultados	75
Discusión	89
Conclusiones	97
Bibliografía	98

RESUMEN

Las moléculas clase II del MHC (MHC-II) se expresan en la superficie de células presentadoras de antígeno (CPA) presentando péptidos provenientes del interior de la célula a linfocitos T CD4+. Habitualmente, los péptidos que se unen a MHC-II son generados por proteasas presentes en compartimientos endocíticos, donde los péptidos se unen a MHC-II. Sin embargo, hay evidencias de antígenos sin acceso a compartimientos endocíticos que pueden ser presentados por MHC-II.

En este trabajo se estudió en detalle el procesamiento y presentación de dos antígenos endógenos para determinar los sitios intracelulares que participan, tanto en la generación de péptidos derivados de estos antígenos, como en su unión a MHC-II. Como CPA se utilizó el hibridoma B LK-35.2 transfectado con la secuencia que codifica la lisozima de gallina (LG) con o sin la secuencia de retención en el RE, KDEL. Los requerimientos de procesamiento y presentación de estos antígenos se compararon con la presentación de LG exógena. El sistema experimental consistió, principalmente, en evaluar la respuesta a estos antígenos por hibridomas T que reconocen distintos péptidos de LG bajo diferentes condiciones experimentales. Bajo estas mismas condiciones se realizó un seguimiento por inmunoprecipitación de las formas endógenas de LG.

Se encontraron diferencias en los requerimientos de procesamiento entre LG exógena y las formas endógenas. Además, no hubo unión de péptidos a MHC-II en el RE. Un hallazgo importante de este trabajo fue la demostración de la participación del mecanismo de degradación asociado a RE, mediado por proteasomas, en la generación de péptidos derivados de antígenos endógenos, capaces de presentarse por MHC-II. No obstante, este mecanismo no fue el único responsable de la generación de los péptidos ya que también se encontró que el transporte por la red del trans-Golgi (TGN) y llegada a compartimientos endocíticos de una porción del antígeno retenido en el RE, contribuye de manera importante a su presentación por MHC-II. La participación del mecanismo de degradación asociado a RE en la generación de péptidos presentados por MHC-II sugiere que la degradación de proteínas fuera de la vía endocítica puede contribuir al repertorio de los péptidos presentados por MHC-II.

ABSTRACT

MHC class II molecules (MHC-II) expressed on the surface of antigen presenting cells (APC) present peptides generated inside the cell to CD4+ T cells. MHC-II-associated peptides are usually generated in endocytic compartments. However, some studies suggest that certain antigens that do not enter the endocytic pathway can be also presented by MHC-II. In the present studies, we examined in detail the mechanisms of processing and presentation of two endogenous forms of the same antigen to determine the intracellular sites in which peptides derived from this antigen are generated, as well as their place of binding to MHC-II.

The APC employed was the B cell lymphoma LK-35.2, transfected or not with the coding sequences of hen egg-white lysozyme (HEL) either with or without the ER retention signal KDEL. The presentation requirements for endogenous HEL were compared to those for exogenous HEL. The main experimental system consisted of the analysis of presentation of endogenous or exogenous HEL to T cell hybridomas specific for different determinants of HEL, as well as the follow up of the endogenous forms of HEL by immunoprecipitation, in both cases under different experimental conditions.

There were differences in the processing requirements for endogenous and exogenous HEL in that most, but not all, determinants were presented better from exogenous than endogenous HEL. There was no peptide binding to MHC-II in the ER. Importantly, we could demonstrate a role for the recently described proteasome-mediated ER-associated protein degradation mechanism in the generation of endogenously-derived peptides presented by MHC II. However, this mechanism was not uniquely responsible for the generation of endogenously-derived HEL peptides, as it was also found that, at least part of the ER-retained had to be transported through the trans-Golgi network to endocytic compartments for presentation by MHC-II.

The participation of the ER-associated protein-degradation mechanism in MHC-II-restricted antigen presentation suggests that protein degradation in non-endocytic compartments can be the source of peptides presented by MHC-II.

INTRODUCCION

Las células responsables de la respuesta inmune específica son los linfocitos T y B, los cuales son capaces de interactuar con regiones de moléculas denominadas antígenos, a través de receptores específicos expresados en su membrana. Como consecuencia de esta interacción tanto los linfocitos T como B pueden ser eliminados o inactivados (tolerancia inmunológica) o bajo las condiciones adecuadas, activados para iniciar una respuesta inmune. El receptor de los linfocitos B, es una molécula de inmunoglobulina, mientras que en el linfocito T el receptor (TCR) es un heterodímero formado por una cadena α y una β unidas por un puente disulfuro ¹.

El TCR sólo puede reconocer antígenos (casi siempre derivados de proteínas) después de que éstos han sido procesados por una célula presentadora de antígenos (CPA), la cual los presenta en el contexto de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) ². El procesamiento de un antígeno consiste en la digestión intracelular de la proteína para la generación de péptidos capaces de unirse a moléculas del MHC ^{3,4}. Existen dos clases de moléculas del MHC que participan en la presentación de antígenos a los linfocitos T ^{5,6}. Las moléculas clase I (MHC-I) presentan péptidos a los linfocitos T CD8+ que son los principales mediadores de la citotoxicidad mediada por células⁷. Por otro lado, los péptidos unidos a las moléculas clase II del MHC (MHC-II) son reconocidos por linfocitos T CD4+, responsables de las funciones inductoras de la respuesta inmune ⁸.

En su forma madura, tanto MHC-I como MHC-II son complejos triméricos que adquieren una conformación estable solo en presencia de una cadena α una β y un péptido adecuado unido a ellas como parte de su estructura ^{9,10}. De esta manera, las moléculas del MHC solamente se expresan en la superficie de las distintas células del organismo, presentando péptidos que se generan en el interior de la célula.

De acuerdo a su origen, existen dos fuentes de antígenos que pueden ser procesados y presentados por moléculas del MHC. Los antígenos exógenos son originados fuera de la CPA y penetran a ésta por fagocitosis, pinocitosis o endocitosis mediada por receptores. Estos antígenos, después de ser internalizados, se localizan principalmente en la vía endocítica. Por otro lado, los antígenos que se sintetizan en el interior de la CPA son llamados endógenos y pueden ser proteínas propias de la célula sintetizadas ya sea en los ribosomas libres del citosol, o en los ribosomas asociados al retículo endoplásmico (RE). Estos antígenos pueden tener diversas localizaciones desde que son sintetizados hasta que llegan a su destino final en la célula.

Como parte de su metabolismo, todas las células del organismo degradan continuamente proteínas propias (endógenas) con distintas localizaciones intracelulares. Esto se lleva a cabo mediante dos sistemas proteolíticos principales que preceden en la evolución al sistema inmune: el proteasoma, localizado en el citosol; y una gran variedad de proteasas ácidas con diferentes actividades, localizadas en los compartimientos endosómicos-lisosómicos ^{11,12}. Las moléculas del MHC unen péptidos generados por cualquiera de estos sistemas proteolíticos y los presentan en la superficie de las distintas CPA ^{13,14}. Por otra parte, cuando una célula es infectada, las proteínas derivadas de los microorganismos son degradadas por estos sistemas proteolíticos y los péptidos generados se presentan también unidos a las moléculas del MHC. Tomando en cuenta que los sistemas de degradación intracelular son incapaces de distinguir entre proteínas propias y extrañas, cualquier péptido generado que pueda encontrarse con moléculas del MHC y que, además, cumpla con las características para unirse a ellas, puede ser presentado a los linfocitos T.

Para utilizar los péptidos generados por los sistemas proteolíticos, el sistema inmune ha adaptado una maquinaria molecular que le permite presentar tanto los péptidos derivados de proteínas propias como los derivados de agentes externas, para mantener la tolerancia inmunológica, o bajo las condiciones adecuadas, para iniciar una respuesta inmune.

La maquinaria molecular y las vías de transporte que utilizan las moléculas del MHC para presentar los péptidos generados por los sistemas proteolíticos, permite que MHC-I presente con alta eficiencia péptidos generados por el proteasoma y que MHC-II presente péptidos generados por las proteasas localizadas en los endosomas/lisosomas ^{15,16,17,18}. Esto limita la presentación de los diferentes antígenos, ya que dependiendo de su origen, localización y del sistema proteolítico por el que son degradadas, no todas las proteínas tienen la misma posibilidad de ser presentadas por MHC-I y por MHC-II o, si se presentan por ambos tipos de moléculas, no lo hacen con la misma eficiencia. Por otro lado, diversas evidencias ^{19,20} sugieren la existencia de otras rutas de transporte o de comunicación entre los distintos compartimientos intracelulares, aún no bien caracterizadas, que podrían participar en el procesamiento y presentación de antígenos por moléculas del MHC, permitiendo que algunas proteínas que no se localizan en el citosol sean presentadas por moléculas clase I y que otras proteínas que no llegan a los compartimientos endocíticos se presenten por moléculas clase II ^{21,22,23,24}.

La existencia de otras rutas de procesamiento de antígenos podría tener implicaciones importantes, tanto para mantener la tolerancia inmunológica a un mayor número de proteínas propias así como para que proteínas inmunogénicas (extrañas), que se localizan y degradan en distintos sitios de la célula tengan acceso a las rutas de presentación por ambas clases de moléculas del MHC. Esto podría tener también implicaciones importantes en la presentación de péptidos propios que podrían dar origen a una respuesta autoinmune.

Este trabajo de tesis se diseñó para identificar los compartimientos intracelulares que participan en la degradación y generación de péptidos presentados por MHC-II a partir de antígenos endógenos, con el fin de establecer si existen rutas alternas o si solamente cuando estos antígenos son transportados a los compartimientos endocíticos son presentados por moléculas clase II del MHC.

ANTECEDENTES

1.-Moléculas del complejo principal de histocompatibilidad

a) Moléculas clase I.

Estructura y Funciones.

Las moléculas clase I del MHC (HLA-A, B y C en el humano y H-2K, D y L en el ratón) son glicoproteínas formadas por una cadena α de 44 kDa, constituida por tres dominios extracelulares, una región transmembranal y una cola intracitoplásmica corta. Esta molécula es codificada por el MHC en el cromosoma 6 humano y el 17 murino y se asocia de manera no covalente a una cadena β 2-microglobulina (β 2M), de 12 kDa, que se codifica en el cromosoma 15 humano⁵. Las moléculas clase I (MHC-I) son altamente polimórficas y se expresan en la superficie de la mayoría de las células nucleadas como un complejo trimolecular formado por la cadena α , la β 2M y un péptido antigénico de 7 a 10 aminoácidos^{25,26}.

Los estudios cristalográficos de las moléculas clase I, realizados por los grupos de Wiley y Strominger en 1987, identificaron que la estructura de los dominios más distales a la membrana celular está constituida por dos α hélices apoyadas en ocho bandas β plegadas antiparalelas^{27,28} (figura 1A). Dentro de esta estructura se determinó una densidad electrónica que correspondía al péptido antigénico, que al ser eliminada daba lugar a una hendidura o nicho, que es el sitio en donde los péptidos generados a partir del procesamiento se unen a las moléculas clase I para ser presentados a los linfocitos T CD8+. En la base de esta hendidura, que es donde se encuentra el mayor polimorfismo, existen cavidades denominadas sáculos que son alelo específicas y que unen determinados aminoácidos, llamados “*motifs*” en los péptidos^{29,30}. Las interacciones entre estos *motifs* y los sáculos, explican las

bases de la selectividad de la unión péptido-molécula de histocompatibilidad. De esta manera, no todos los péptidos que se generan en la célula tienen la misma capacidad de unirse a todas las moléculas clase I del MHC.

Biosíntesis, Ensamble y Transporte.

Durante su biosíntesis, la cadena α de la molécula clase I y la β 2M, son traslocadas de manera cotraduccional al interior del RE, donde ocurre una serie de eventos necesarios para el ensamble del trímero α - β 2M-péptido³¹. Al ingresar al RE, a la cadena α se asocia una chaperona llamado calnexina^{32,33}. Posteriormente, la unión de la β 2M promueve la disociación de esta chaperona. Este dímero es inestable y que es indispensable la presencia de un péptido para completar el ensamble en RE^{9,34,35}.

La principal fuente de péptidos que se unen a las moléculas clase I son las proteínas citosólicas degradadas por el complejo multicatalítico denominado proteasoma¹⁵. Para lograr esto, es necesario el encuentro de los péptidos con las moléculas de histocompatibilidad. El análisis de DNA de células mutantes, que tienen menos moléculas clase I en la superficie y que tienen defectos en la presentación de antígenos, que son corregidos por la adición de péptidos, demostraron que el defecto en estas células radica en dos genes localizados en la región clase II del MHC que codifican para proteínas de la familia de los transportadores ABC (*ATP-binding cassettes*). Las proteínas codificadas por estos genes se asocian formando un heterodímero que se expresa en la membrana del RE. Este heterodímero transporta péptidos del citosol al interior del RE de una manera dependiente de ATP^{36,37,38}. Las proteínas que forman el transportador son denominadas TAP1 y TAP2. (transportadores 1 y 2 asociados al procesamiento de antígeno). Las células deficientes de estos transportadores acumulan cadenas α y β 2M en el RE³⁹.

Evidencias experimentales demuestran que la cadena α unida a la $\beta 2M$ se asocia transitoriamente a TAP1. Durante el proceso de ensamble de las moléculas clase I, cuando la $\beta 2M$ se une a la cadena α , se disocia la calnexina y se asocia un nuevo chaperón denominado calreticulina, posteriormente este complejo se une a una proteína denominada tapasina que funciona como un puente entre el complejo α - $\beta 2M$ -calreticulina y la subunidad TAP1⁴⁰. La unión de este complejo al transportador permite que los péptidos que entran al interior del RE tengan una mayor posibilidad de unirse al nicho de la molécula clase I de histocompatibilidad aumentando la eficiencia de esta vía de transporte^{41,42}. Finalmente, si al dímero α - $\beta 2M$ se une un péptido adecuado, el complejo resultante se disocia del heterodímero TAP1-TAP2 y la molécula totalmente ensamblada, con una estructura estable, sigue su viaje por la vía exocítica a la superficie celular³¹.

De acuerdo con su estructura, ensamble y transporte, la función de las moléculas clase I es presentar a los linfocitos T CD8+, péptidos derivados de proteínas con localización citosólica, cuya degradación es llevada a cabo por el complejo multicatalítico proteosoma. Sin embargo, diferentes péptidos eluidos de moléculas clase I, así como distintos trabajos experimentales, demuestran que algunos antígenos endógenos con otras localizaciones celulares, como proteínas de membrana, de secreción y relacionadas con moléculas del MHC e inclusive péptidos derivados de antígenos exógenos pueden ser presentados por moléculas clase I. Estos estudios demuestran la existencia de vías alternas para la presentación de antígenos exógenos por MHC-I^{21, 22,43,44,45}.

b) Moléculas clase II.

Estructura y funciones.

Las moléculas clase II del MHC (HLA-DP, DQ y DR en humanos y H-2A y H-2E en ratones), al igual que las moléculas clase I, son glicoproteínas altamente polimórficas, pero que están formadas por una cadena α de 32-34 kDa y una β de 26-28 kDa, ambas codificadas en el MHC ^{5,8}. Las dos cadenas tienen dos dominios extracelulares, un dominio transmembranal y uno intracitoplásmico. Las moléculas clase II son expresadas en la membrana de células presentadoras de antígeno profesionales como linfocitos B, macrófagos y células dendríticas, con un péptido de 13-26 residuos de aminoácidos unido a ellas ⁴⁶. Estas moléculas se expresan también en linfocitos T activados (en humanos), y en casi todas las células epiteliales.

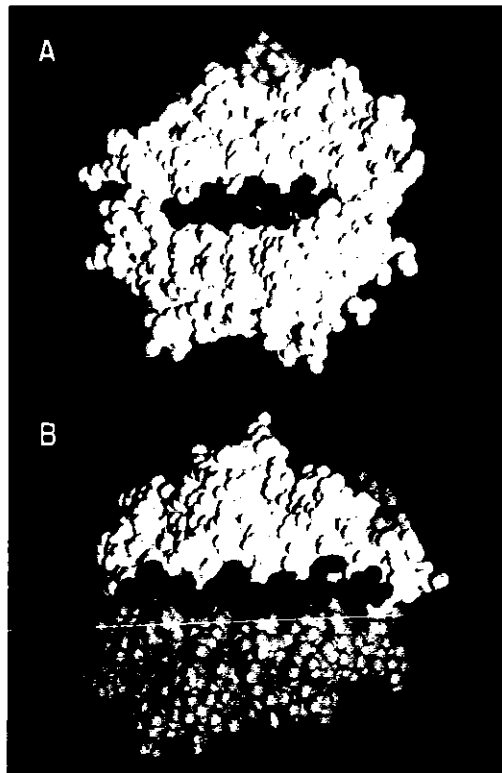


Figura 1. Estructura de las moléculas clases I (A) y II (B) del MHC ⁴⁶.

Estudios cristalográficos de la molécula HLA-DR1, realizados por Wiley y colaboradores, demostraron que los dominios $\alpha 1$ y $\beta 1$ forman una estructura similar a la descrita para las moléculas clase I (figura 1B) ⁴⁷. Las principales diferencias estructurales con MHC I, basadas en su cristalografía, radican en el dominio $\beta 2$ y en el sitio de unión a los péptidos (dominios $\alpha 1$ y $\beta 1$), en donde MHC-II tiene una estructura más abierta en los extremos, permitiendo que los péptidos se unan a ellas en conformación extendida, proyectándose en ambos extremos. Los péptidos que se unen a MHC-II son muy variados en tamaño (aún para un mismo determinante antigénico) y están formados por un núcleo central con prolongaciones o extensiones tanto en el amino, como en el carboxilo terminal ⁴⁸. En la base del sitio de unión de péptidos a MHC-II también hay cavidades que interactúan con las cadenas laterales de determinados aminoácidos del núcleo del péptido (*motifs*), dando también lugar a una interacción selectiva péptido-alelo clase II ^{49,50}. Esto da como resultado que no todos los péptidos que se generan en la célula tengan la misma capacidad de unirse a todos los alelos de moléculas clase II del MHC.

La principal función de MHC-II es presentar péptidos propios y extraños a los linfocitos T CD4+, lo cual es importante, tanto para iniciar una respuesta inmune como para mantener la tolerancia inmunológica. Los péptidos de proteínas extrañas que se presentan con mayor eficiencia por MHC-II son derivados de las proteínas exógenas que son internalizadas y degradadas por las distintas proteasas ácidas localizadas en los compartimientos endocíticos ^{17,18}. Por otra parte, los péptidos propios de la célula que son presentados eficientemente por MHC-II son derivados de proteínas residentes de compartimientos endocíticos o que tienen acceso a este tipo de vesículas y que, por lo tanto, son degradadas también por las proteasas localizadas en estos compartimientos ⁴⁸. De esta manera, MHC-II, después de su biosíntesis, sufren una serie de eventos que les permiten presentar con alta eficiencia péptidos derivados de proteínas con las localizaciones mencionadas. Sin embargo, como se describirá más adelante, las moléculas clase II del MHC

clase II del MHC presentan también péptidos derivados de proteínas con otras localizaciones intracelulares ^{48,51,52}.

Biosíntesis y Ensamble.

Las cadenas α y β de MHC-II, durante su biosíntesis, son translocadas en forma cotraduccional al interior del retículo endoplásmico (RE) ⁵³. Al ingresar en el RE, las cadenas clase II α y β , forman dímeros que se asocian con un homotrímero de una tercera proteína, conocida como la cadena invariante (Ii) para formar un nonámero ⁵⁴. Algunos trabajos demuestran la participación de chaperonas durante la formación de este nonámero, como la calnexina e IP90, las cuales se asocian a los dímeros $\alpha\beta$ libres en ausencia de cadena Ii ⁵⁵. La cadena Ii disocia las chaperonas del complejo $\alpha\beta$. Otras chaperonas, como BIP, pueden unirse también a trímeros de cadena Ii, así como con uno o dos heterotrímeros $\alpha\beta$ -Ii y retenerlos en el RE hasta que el ensamble del nonámero se complete ⁵⁶. Algunas formas libres de cadena invariante son retenidas también en el retículo endoplásmico.

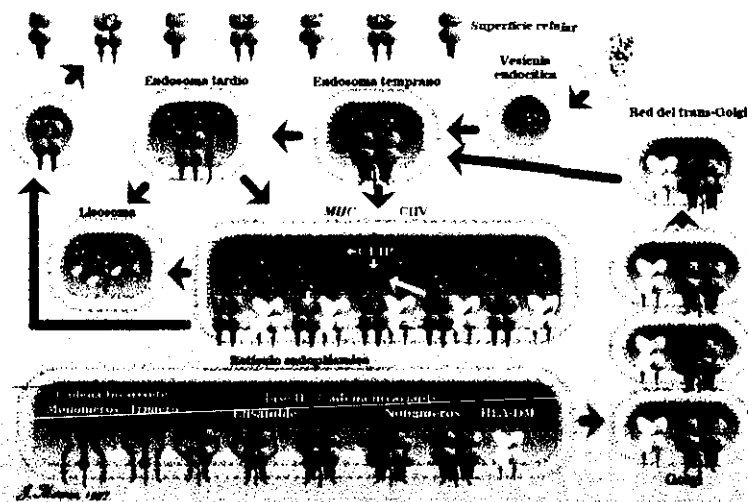


Figura 2. Ensamble y transporte de las moléculas clase II-Ii

Lo anterior sugiere fuertemente que no existen dímeros $\alpha\beta$ libres intermediarios en presencia de cadena Ii o, como una alternativa, que de

existir, su vida media es muy corta ⁵⁷. Por otra parte, diversos trabajos demuestran de manera contundente la participación de la cadena Ii en el ensamble de las moléculas clase II ⁵⁸. Distintas regiones en la cadena Ii interactúan con las moléculas clase II permitiendo el ensamble adecuado del heterotrímero ^{59,60}. Existe un segmento de la cadena Ii que se une al sitio de unión de péptidos de las moléculas clase II permitiendo que estas adquieran una estructura estable y por lo tanto puedan salir del RE ^{61,62}. En ausencia de cadena Ii, la expresión de moléculas clase II en la superficie celular es muy baja⁶³. No obstante, estudios realizados con sistemas de síntesis de proteínas *in vitro*, sugieren la posibilidad de que durante el ensamble de las moléculas clase II se formen dímeros $\alpha\beta$ libres, capaces de unir péptidos, lo cual previene la unión de la cadena Ii con los heterotrímeros $\alpha\beta$ -péptido⁶⁴. Los eventos de ensamble de las moléculas clase II se ilustran en la figura 2.

Cadena invariante

Estructura

La cadena invariante es una glicoproteína tipo II no polimórfica, codificada en el cromosoma 5 en el humano y en el cromosoma 18 en el ratón. Esta molécula se expresa de manera constitutiva por CPA profesionales. En el ratón existen dos isoformas (p31 y p41), mientras que en el humano hay cuatro isoformas de la proteína (p33, p35, p41 y p43) ^{65,66,67}.

La principal forma expresada en humano y en ratón es de 216 aminoácidos, con un dominio amino terminal citoplásmico de 30 aminoácidos, seguidos de 26 residuos de aminoácidos hidrofóbicos que constituyen la región transmembranal. Esta forma es referida como p33 en el humano y p31 en el ratón. La segunda forma de la cadena Ii, expresada solamente en humano resulta de un codón alternativo de iniciación de traducción y es conocida como p35 ⁶⁶.

La tercera isoforma de expresión de esta proteína, expresada en el humano y en el ratón, es resultante del empalme alternativo del mRNA y da como

resultado la adición de un dominio de 64 aminoácidos en la región extracelular, generando las proteínas denominadas p41 en el ratón y humano y p43 sólo en el humano por iniciación alterna de traducción ⁶⁷. Cualquiera de las isoformas mencionadas puede formar parte del trímero. Sin embargo, predominan p33 o p35 en el humano y p31 en el ratón.

Funciones.

La cadena invariante tiene por lo menos tres funciones importantes en el procesamiento de antígenos por moléculas clase II ⁶⁸. La primera, como se menciono anteriormente, es su participación en el ensamble para la formación de nonámeros clase II estables, condición necesaria para salir del RE ^{58,60}. En segundo lugar, la cadena Ii cubre el sitio de unión de péptidos de las moléculas clase II, impidiendo la unión de péptidos antes de alcanzar la vía endocítica ⁶². Esto se apoya en trabajos experimentales que demuestran que los trímeros $\alpha\beta$ -Ii son incapaces de unir péptidos *in vitro*, mientras que la eliminación de la cadena Ii, reestablece la capacidad del dímero clase II para unir péptidos ⁶⁹. Finalmente, la porción intracitoplásmica de la cadena invariante contiene una señal de tráfico intracelular que lleva las moléculas clase II a la vía endocítica ⁷⁰⁻⁷². En ausencia de la cadena invariante, pocos dímeros clase II pueden localizarse en la vía endocítica. El tráfico intracelular inducido por la cadena invariante varía de acuerdo al tipo celular ⁷³.

Transporte de moléculas clase II-cadena Ii a la vía endocítica.

Los nonámeros clase II-Ii que salen del RE viajan a través del aparato de Golgi hasta la red de trans-Golgi (TGN), de donde el complejo multimérico es desviado a compartimentos endocíticos ⁷⁴. Una de las primeras evidencias importantes de que las moléculas clase II son desviadas a la vía endocítica fue la demostración del tiempo que tardan en llegar a la superficie celular (1-3 horas), comparado con las moléculas clase I (30 minutos) ^{75,76}.

Estudios previos sugerían la presencia de MHC-II, en compartimientos de la vía endocítica, después de su biosíntesis ⁷⁷, lo cual fue confirmado por los estudios de microscopía electrónica de Guagliardi y Brodsky ⁷⁸. Simultáneamente, los estudios de Bakke y Doberstein⁷⁰ y subsecuentemente de Peterson y colaboradores,⁷¹ demostraron que la cadena invariante tenía en su estructura una secuencia de aminoácidos que constituye una señal de tráfico que desvía las moléculas clase II del TGN hacia compartimientos de la vía endocítica. En estos trabajos se generaron mutantes en distintas regiones del gen de p33, con las que se demostró que en la región amino terminal, alrededor del residuo 30, se localiza un *motif* de dos leucinas que son importantes, tanto para la salida de la cadena Ii del RE como para su transporte a la vía endocítica. A partir de entonces, múltiples trabajos han confirmado la participación de la cadena Ii en el tráfico de las moléculas clase II a la vía endocítica^{79,80}.

La señal de tráfico de la cadena invariante es similar a una región presente en el receptor de manosa 6-fosfato catión independiente (RM6P CI), que participa en el destino de proteínas del TGN a la vía endocítica en vesículas cubiertas de clatrina, con la participación de la proteína adaptadora 1 (AP-1). Además, el *motif* de leucinas de la cadena Ii, al igual que en otras proteínas que viajan a la vía endocítica, se une con regiones de la proteína adaptadora AP-1, lo que sugiere que este mecanismo de transporte es utilizado por MHC-II-cadena Ii para llegar a la vía endocítica. Sin embargo, tanto evidencias bioquímicas como estudios de microscopía inmuno-electrónica demostraron que una fracción importante de MHC-II de neosíntesis es incorporada a la vía endocítica en vesículas derivadas del TGN, sin clatrina ni AP-1⁸¹. Tomando en cuenta lo anterior, es posible que las moléculas clase II-Cadena Ii puedan entrar a la vía endocítica por más de una ruta.

En apoyo a lo anterior, los trabajos de Germain y colaboradores sugieren que la vía de llegada de MHC-II a la vía endocítica es a través del TGN hacia los endosomas tempranos⁸⁰, mientras que otros trabajos sugieren que las moléculas clase II son transportadas del TGN a compartimientos endocíticos

tardíos^{82,83}. Sin embargo, la mayoría de evidencias experimentales sugieren que la principal vía de entrada de las MHC-II a la vía endocítica es a través de endosomas tempranos^{74,79,80}. Los estudios de Mellman y colaboradores, en linfocitos B y células dendríticas, utilizando electroforesis en flujo libre después de fraccionamiento celular, proponen un modelo en el que la mayoría de las moléculas clase II-Ii son transportadas del TGN a endosomas tempranos⁷⁹. Por otro lado, los trabajos de Geuze y colaboradores demostraron también que la mayoría de los complejos $\alpha\beta$ -Ii llegan a la vía endocítica por compartimientos sin transferrina, que es un marcador de vesículas de reciclaje. Esto sugiere que la principal vía de acceso de estos complejos a la vía endocítica es por endosomas tempranos posteriores a las vesículas de reciclaje⁸³.

Dependiendo del tipo de célula, las moléculas clase II parecen dirigirse hacia distintos compartimientos y acumularse en ellos. Así, algunos trabajos han demostrado que en linfocitos B, MHC-II son más abundantes en compartimientos relacionados con los endosomas tempranos, pero también en compartimientos relacionados con endosomas tardíos denominados MIIC (compartimientos clase II), que morfológicamente son multilaminares, lo que los distingue de los endosomas tardíos y de los lisosomas clásicos⁸⁴. No obstante, en linfocitos B humanos y murinos, se han podido detectar moléculas clase II en toda la vía endocítica⁸⁵. En melanomas, células COS y otras células, las moléculas clase II se localizan a todo lo largo de la vía endocítica⁸⁶. En otras CPA profesionales, las moléculas clase II se acumulan predominantemente en los compartimientos denominados MIIC.

Además del transporte hacia la vía endocítica, la cadena invariante puede dirigir el tráfico de MHC-II dentro de los compartimientos endosómicos⁸⁷. Tomando en cuenta que, después de su llegada a la vía endocítica, la cadena Ii se degrada en forma secuencial, algunos trabajos demuestran que, dependiendo de los productos de degradación de la cadena Ii que permanecen unidos a MHC-II, éstas pueden transportarse y acumularse en diferentes compartimientos. Esto podría explicar las diferencias en la

localización de MHC-II en la vía endocítica de las distintas células así como en los diferentes estadios de desarrollo de una misma célula ⁸⁸.

Algunos trabajos han sugerido la existencia de señales de tráfico en la secuencia de las cadenas α y β de MHC-II. En el tallo citoplásmico de la cadena β se encuentran señales de internalización ^{89,90}. Así, en ausencia de cadena Ii, las pocas moléculas clase II que salen del RE viajan a la superficie celular, después de lo cual son transportadas a compartimientos endocíticos para su posterior reciclaje ⁹¹. Este mecanismo es utilizado también por una pequeña porción de MHC-II que son transportadas del TGN a la membrana celular, de donde son internalizadas vía el dominio de di-leucinas localizado en la cadena β , mediante vesículas recubiertas con clatrina ⁹².

Disociación de la Cadena Ii.

Para permitir la unión de péptidos a MHC-II, la cadena Ii se disocia del dímero clase II en forma gradual, a partir de su llegada a la vía endocítica. En esto participan proteasas lisosómicas y el pH ácido. En la vía endocítica, los complejos MHC-II-cadena Ii, sufren un procesamiento secuencial que inicia con la región carboxilo terminal luminal ⁹³. Los últimos eventos de degradación de cadena invariante parecen ocurrir en endosomas tardíos, relacionados con el compartimiento MIIC y participan enzimas de la familia de las cisteil proteasas ^{94,95}. De esta manera el inhibidor de cisteil proteasas, leupeptina, inhibe la degradación final de la cadena Ii. Las moléculas clase II obtenidas de células humanas tratadas con este inhibidor, contienen unido un polipéptido de 20-21 kDa denominado LIP (Péptido inducido por leupeptina asociado a las moléculas clase II) ⁹⁶. En células humanas tratadas con leupeptina es posible detectar también un polipéptido de 10 kDa denominado SLIP (péptido pequeño de la cadena Ii asociado a MHC-II). Dentro de este péptido (p10) se localiza el fragmento 81-104, que es el último fragmento de cadena invariante que permanece asociado a moléculas clase II denominado CLIP (péptido de cadena Ii unido a clase II) ^{97,98}.

Estudios "*in vitro*" han demostrado la participación de distintas proteasas en la degradación de la cadena Ii ^{99,100,101}. Los trabajos de Blum y Cresswell demostraron degradación de la cadena Ii por catepsina B, con la generación de fragmentos de 27, 24, 10 y 15 kDa (similares al tamaño de los productos de degradación de cadena Ii *in vivo*). En estos estudios, la proteólisis de la cadena invariante es muy ineficiente, lo que sugiere la actividad conjunta de otras proteasas ⁹⁹. Otros trabajos realizados también *in vitro*, sugirieron la participación de la catepsina B en la degradación de Ii ¹⁰². Sin embargo, estudios con inhibidores de cisteil proteasas o con células provenientes de ratones deficientes de catepsinas D, B y L demostraron que ninguna de estas enzimas es esencial para la degradación de la cadena Ii, sugiriendo que otras proteasas están involucradas en el procesamiento de la cadena Ii ^{103,104}. Estudios recientes han demostrado que la catepsina S y en menor proporción catepsina L, pero no B y D, son capaces de hidrolizar el amino terminal del fragmento p10 y generar el péptido CLIP a partir de la isoforma P31 de la cadena Ii ^{105,106,107}. En linfocitos B humanos y murinos, la inhibición de catepsina S bloquea el procesamiento de la cadena Ii, evitando la generación del CLIP, lo cual confirma que esta enzima es la más importante para la degradación final de la cadena Ii. Ya que la catepsina S mantiene su actividad aún a pH neutro, esta enzima puede promover la degradación de la cadena Ii en cualquiera de los compartimientos endocíticos, incluyendo endosomas tempranos. La catepsina S se expresa en todas las células presentadoras de antígeno profesionales analizadas ¹⁰⁸.

Intercambio de péptido.

Después del procesamiento de la cadena invariante, el CLIP permanece unido al sitio de unión de péptidos de la molécula clase II. Por lo tanto, la unión del péptido antigénico que será presentado por MHC-II, requiere de la disociación de CLIP. El intercambio de CLIP con los péptidos presentes en los compartimientos endocíticos es indispensable ya que de no ocurrir esto, la mayoría de las moléculas clase II en la superficie celular presentarían CLIP.

En la liberación del CLIP no parecen participar proteasas intracelulares. La molécula clase II no clásica HLA-DM (H-2DM en ratones) tiene un papel importante en el intercambio del CLIP por otros péptidos ^{109,110,111}. En humanos, DM es codificada por los genes DMA y DMB de la región clase II del MHC ¹¹², su polimorfismo es limitado, no se expresa en la membrana celular y es abundante en compartimientos endocíticos similares a MIIC ¹¹³. Aparentemente, una señal de tráfico, distinta de la de la cadena Ii y de MHC-II clásicas, dirige el dímero DM a la vía endocítica ¹¹⁴.

Las moléculas DM humanas y murinas, tienen poca homología en secuencia con las moléculas clase II convencionales. Sin embargo, los estudios cristalográficos han mostrado una gran similitud en la estructura de DM, MHC-II y MHC-I clásicas ^{115,116}. La principal diferencia con las moléculas del MHC clásicas es que, tanto las moléculas DM humana y murina no tienen sitio de unión de péptido. Estudios *in vitro* con moléculas DM purificadas sugieren que, a pH 5.0, éstas promueven la disociación de péptidos unidos a HI.A-DR y no sólo del CLIP ¹¹⁷. Este proceso libera a las moléculas clase II de los péptidos endógenos de Ii y aumenta la eficiencia de unión de otros péptidos presentes en el sitio de liberación de CLIP ¹¹⁸. La función de DM en linfocitos B es regulada por otra molécula clase II no clásica, denominada DO, codificada también en el MHC. Se ha postulado que DO es un modulador negativo de la función de DM ¹¹⁹.

Las células deficientes en DM acumulan moléculas clase II con el péptido CLIP y son ineficientes en la presentación de antígenos exógenos ^{120,121}. La participación de DM en el procesamiento de antígeno es menor en el ratón que en el humano. Además, existen diferencias en el requerimiento de DM por los distintos alelos clase II ¹²². Esto ha llevado a postular la existencia de un mecanismo adicional para la disociación del CLIP. Así, los estudios de Hämmerling y colaboradores demuestran que, a pH ácido, los residuos 81-90 del segmento amino terminal de CLIP pueden autocatalizar la liberación de este péptido y de otros péptidos de II, permitiendo la carga de péptidos generados en la vía endocítica por un mecanismo de liberación alostérica ¹²³.

Compartimentos especializados en la unión de péptidos a MHC-II.

Lo descrito, demuestra la participación de los compartimentos endocíticos en el procesamiento y presentación de antígenos por MHC-II. Sin embargo ¿Existe un sitio especializado en la vía endocítica para la unión de péptidos derivados de procesamiento a las moléculas clase II?

En CPA no profesionales, con base en cinéticas de endocitosis y en la distribución diferencial de receptores, se han determinado cuatro tipos de vesículas endocíticas: primarias (de reciclaje) endosomas tempranos, endosomas tardíos y lisosomas. No obstante, como se mencionó, en las CPA profesionales se han descrito compartimentos endocíticos especializados, en los que abundan las moléculas clase II ^{124,125}. Estos compartimentos, que contienen un gran número de vesículas con membranas internas, se denominan MIIC y han sido identificados en linfocitos B y líneas de ellos, células dendríticas, células de Langerhans, monocitos y macrófagos ^{126,127}. En experimentos realizados en estos tipos celulares, se han obtenido evidencias que demuestran que estos compartimentos son los sitios de carga de péptidos a MHC-II ^{128,129}. De acuerdo con lo anterior, los compartimentos MIIC de células humanas y murinas son muy ricos en DM ^{130,131}. Estos compartimentos tienen marcadores tanto de endosomas tardíos, como de lisosomas, así como una gran variedad de enzimas proteolíticas, pero sus

características estructurales difieren de los compartimientos endocíticos clásicos.

En algunos estudios se han determinado, por morfología, subtipos de compartimientos MIIC, incluyendo algunos que contienen vesículas internas y capas de membranas denominados multivesiculares y multilaminares, respectivamente ¹³². En una línea de células B humanas se determinó un subtipo de MIIC con abundante cadena Ii y pocas vesículas que se denominó MIIC temprano. Estudios de fraccionamiento subcelular y microscopía electrónica sugieren que MIIC temprano es el principal sitio de acceso de las moléculas clase II a la vía endocítica ⁸¹. Se ha propuesto también que el MIIC temprano es el precursor del compartimiento MIIC multilaminar/multivesicular clásico ¹³². Por otra parte, al mismo tiempo que Pierre y colaboradores, Amigorena y colaboradores demostraron, mediante electroforesis en flujo libre, en el linfoma B murino A20, un segundo compartimiento de carga de MHC-II con péptidos que, al igual que MIIC, difiere de los endosomas clásicos. Este compartimiento fue denominado CIIV (vesículas que contienen MHC-II) ⁷⁸. Estudios recientes han sugerido que CIIV tiene características similares a las de MIIC temprano y que la principal diferencia entre ambos es la abundancia de cadena Ii en éste ⁸⁴.

A pesar de las evidencias experimentales, hasta hace poco no se sabía si los compartimientos MIIC/CIIV comprendían estructuras endocíticas únicas o pertenecían a compartimientos convencionales de la vía endocítica. Geuze y colaboradores hicieron una caracterización detallada de los compartimientos endocíticos en linfocitos B humanos y en el linfoma B murino A20, donde identificaron seis subcompartimientos distintos dentro de la vía endocítica. Así, MIIC equivale a los endosomas tempranos, tardíos y lisosomas presentes en las CPA no profesionales, proponiendo que los MIIC son compartimientos endocíticos clásicos que acumulan MHC-II ⁸⁴.

Recientemente se han extendido las evidencias experimentales de que los compartimientos MIIC son los principales sitios de la vía endocítica en donde

los péptidos se unen a MHC-II. En experimentos con anticuerpos dirigidos contra complejos MHC-péptido específico, se encontró que MIIC temprano es el primer sitio donde se pueden detectar estos complejos. Sin embargo, estos complejos MHC-péptido son más abundantes en los compartimientos MIIC multilaminares/multivesiculares maduros ¹³³.

Además de las evidencias que demuestran la gran abundancia de moléculas clase II en MIIC/CIIV y el papel de éstos compartimientos en la unión de péptidos, todo indica que la degradación final de la cadena Ii y la remoción del CLIP se llevan a cabo también en este tipo de compartimientos (refs). Finalmente, la existencia de enzimas proteolíticas en MIIC/CIIV, hace posible que en ellos se genere un gran número de péptidos. Los puntos anteriores sugieren que este tipo de estructuras endocíticas, formadas en CPA profesionales, aparentemente por la presencia de moléculas clase II clásicas y no clásicas (DM), son cruciales para el procesamiento y presentación de antígenos por MHC-II ^{95,134}.

Por otra parte, evidencias experimentales indican que, en el procesamiento y presentación de antígenos por moléculas clase II puede participar más de un compartimiento, dependiendo del antígeno, del péptido estudiado, del alelo del MHC, así como del tipo de CPA ^{79,135}. De acuerdo con esto, en linfocitos B los compartimientos MIIC tempranos (CIIV), parecen ser más importantes que en otras CPA profesionales. Finalmente, a pesar de que la mayoría de los péptidos que se generan en la célula se unen a MHC-II de neosíntesis, en los compartimientos MIIC/CIIV un pequeño grupo de péptidos se une a moléculas clase II maduras que son internalizadas de la membrana plasmática, principalmente a vesículas de reciclaje, por el *motif* di-leucina de la MHC-II β ⁹². Los péptidos que se unen a éstas moléculas tienden a estar expuestos en las proteínas y no requieren de actividad proteolítica agresiva; por lo tanto, podrían generarse en endosomas tempranos.

Importancia del Péptido en la estabilización del dímero clase II.

Al igual que para las moléculas clase I, diversos trabajos demuestran la participación del péptido en la estabilización del dímero clase II. La aparición, en presencia de un péptido adecuado, de una forma de dímeros clase II denominada compacta, resistente al SDS, y que en geles de poliacrilamida, después de inmunoprecipitación con anticuerpos monoclonales, permanece como un dímero de 55-60 kDa ($\alpha\beta$ -péptido), demuestra que el péptido induce un cambio conformacional en el heterodímero clase II, promoviendo una estructura estable ¹³⁶.

Los estudios de Shadegh-Nasseri y colaboradores demuestran que en la generación de complejos clase II-péptidos de vida media larga, hay dos estadios fundamentales. El primero ocurre en un pH ácido, que promueve la adquisición de una conformación óptima del heterodímero clase II para la captura del péptido. En el segundo estadio, después de la neutralización del pH, se estabiliza la unión del péptido, dando como resultado una interacción de alta afinidad con el péptido asociado ^{10,137}. Estos estudios sugieren que el pH ácido de los endosomas/lisosomas es crucial para la unión de péptidos a las moléculas clase II del MHC. Finalmente, la adición de péptidos exógenos a células con baja expresión de MHC-II aumenta la expresión de éstas en la superficie, confirmando nuevamente la importancia de los péptidos para que MHC-II adquieran una conformación estable y viajen a la superficie celular ¹³⁸. Es importante mencionar que no todos los péptidos que se unen a MHC-II son capaces de inducir la formación de dímeros estables.

Transporte de MHC-II a la superficie celular.

Una vez que, por la unión de un péptido antigénico, MHC-II adquieren una conformación estable, se expresan en la membrana celular para llevar a cabo su función de presentar antígeno. El mecanismo de transporte de MHC-II a la membrana celular no está bien definido. Se ha sugerido que las vesículas que contienen moléculas clase II-péptido pueden fusionarse con

vesículas derivadas del TGN para seguir la vía de exocitosis clásica. Sin embargo, no hay evidencias experimentales que apoyen la existencia de esta vía de transporte. Los trabajos realizados recientemente, en líneas de linfocitos B humanos, por Raposo y colaboradores demuestran los compartimentos MIIC formados por una membrana externa y vesículas internas pueden seguir una vía de exocitosis directa a la superficie celular. En estos experimentos se demostró que la membrana externa de los compartimentos MIIC que contienen complejos MHC-Péptido, se fusiona con la membrana plasmática y que las vesículas internas, en las que hay también una gran cantidad de moléculas clase II cargadas con péptido son liberadas al medio. Estas últimas vesículas son denominadas exosomas ¹³⁹.

Por otra parte, los trabajos de Wubbolts y colaboradores pusieron en evidencia, en una línea celular de melanoma, una ruta de transporte de compartimentos endocíticos tardíos con moléculas clase II-péptido a la membrana celular, que no involucra endosomas tempranos. Estos trabajos sugieren la fusión de compartimientos con características de MIIC con la membrana plasmática ¹⁴⁰. Finalmente, los trabajos de Pond y colaboradores, en linfocitos B humanos, confirman que el transporte de compartimentos MIIC a la membrana plasmática es independiente de endosomas tempranos y que puede ser bloqueado por BFA, sugiriendo un transporte vesicular ¹⁴¹. Todos estos trabajos apuntan hacia la existencia de un transporte directo de compartimentos endosómicos intermedios (MIIC) a la membrana plasmática, posiblemente mediado por vesículas. Sin embargo, los trabajos descritos no explican la forma en que los complejos MHC-péptidos llegan de compartimentos endosómicos diferentes a MIIC a la membrana celular.

2.-Mecanismos de transporte intracelular mediado por vesículas.

Muchos de los eventos que participan en el procesamiento y presentación de antígenos por moléculas clase II dependen de los mecanismos de transporte intracelular mediados por vesículas. Este tipo de transporte participa tanto

en la llegada de moléculas importantes a la vía endocítica como en el transporte de los antígenos que habrán de ser procesados.

La mayor parte del transporte vesicular en las células eucariontes, se lleva a cabo por la evaginación de las membranas existentes, que da lugar a la formación de nuevas vesículas. Inicialmente, en este proceso participan una membrana donadora y proteínas, cuya función principal es recubrir a la membrana donadora. Estas proteínas funcionan como un sostén para la formación de las vesículas y tienen un papel muy importante en definir la forma, el tamaño y probablemente en determinar el contenido y destino de las vesículas ^{142,143}.

Las proteínas que llevan a cabo estas funciones se ensamblan a partir de subunidades dispersas en el citosol, las cuales se polimerizan en la superficie de la membrana donadora para iniciar el proceso de evaginación. En el proceso de ensamble de las proteínas que recubren a la membrana donadora participan distintas familias de GTPasas ¹⁴⁴. Por otro lado, en el reconocimiento, por la membrana blanco, de la vesícula recién formada, participa un par de moléculas que funcionan como ligando receptor: v-SNARE, en la vesícula, y t-SNARE, en la membrana blanco ^{145,146}. Una vez que ocurre esta interacción, el complejo de SNAREs sirve como receptor de una proteína denominada SNAP. Finalmente, para la fusión de las membranas, la hidrólisis de ATP mediada por otra proteína denominada NSF, permite la disociación del complejo SNARE-SNAP ¹⁴⁷.

La especificidad del mecanismo de reconocimiento entre las vesículas recién formadas y la membrana blanco se debe a la expresión de distintas SNARES en cada organelo. Además de las proteínas antes mencionadas existe otra familia de proteínas que proporcionan un nivel adicional de especificidad al mecanismo de fusión. Estas son las proteínas denominadas Rab, las cuales se expresan también de manera específica en los distintos compartimentos y aumentan la selectividad de los mecanismos de transporte ¹⁴⁸. Las proteínas

Rab se han asociado principalmente en el acoplamiento de vesículas como reguladoras de SNARE.

Existen distintas vesículas que surgen de diferentes membranas celulares. Por ejemplo, en el transporte de proteínas en la vía exocítica temprana, participan principalmente dos tipos de vesículas que se distinguen por las proteínas que revisten a la membrana donadora. De esta manera, para el transporte de RE a Golgi y para el transporte entre las cisternas del Golgi, las vesículas que se forman están recubiertas por COPI y COPII ¹⁴⁹. Ambos tipos de vesículas participan de manera sinérgica. En la formación de vesículas COPI participan la GTPasa ARF y siete subunidades citosólicas denominadas α , β , β , δ , γ , ϵ y ζ . Para las vesículas COPII participan la GTPasa SAR y otras subunidades citosólicas. El antibiótico brefeldina A (BFA) bloquea el intercambio de nucleótidos en la proteína ARF y, por lo tanto, afecta la formación de vesículas COPI, impidiendo el transporte entre el RE y Golgi y entre las cisternas del Golgi ^{150,151}.

Para el transporte y clasificación de las proteínas sintetizadas en los ribosomas asociados a RE a los distintos destinos en la célula, existen varios tipos de vesículas que se originan de la red del trans-Golgi (TGN), que es una estación importante de almacenamiento en la vía biosintética. En estas vesículas, se incluyen las de la vía de secreción constitutiva, los gránulos de secreción almacenados y las vesículas que van a dirigirse a compartimientos endocíticos ¹⁵². Algunas de las vesículas originadas en el TGN están cubiertas con proteínas citosólicas desconocidas. Para el transporte de proteínas del TGN a la vía endocítica, uno de los ejemplos mejor estudiados es el de las proteínas con residuos de manosa fosforilados que son transportadas mediante el (RM6P CI) ¹⁵³. Existen dos tipos de RM6P que se unen a una gran variedad de enzimas recién sintetizadas en el TGN, después de lo cual, los complejos ligando-receptor son clasificados en proteínas que van la vía secretora o a la membrana plasmática, para ser transportadas de ahí a la vía endocítica. Este transporte se lleva a cabo en pequeñas vesículas cubiertas con clatrina que emergen del TGN, con la participación de la proteína

adaptadora 1 (AP-1)¹⁵⁴. Además de los efectos mencionados, la BFA inhibe la asociación de AP-1 con las membranas del TGN. Por otra parte, el ionóforo monensina, que intercambia iones Na⁺ por protones, inhibe el transporte del TGN a vesículas ácidas^{155,156}. Estudios recientes han demostrado que RM6P CI puede también mediar el transporte de la membrana plasmática a endosomas tempranos y a lisosomas.

Para la internalización de antígenos a la vía endocítica, la mayoría de las vesículas que se originan de la membrana plasmática también están cubiertas con clatrina, con la participación la proteína adaptadora AP-2¹⁵⁷. Tomando en cuenta que hay al menos cinco diferentes rutas de endocitosis, la formación de vesículas a partir de la membrana plasmática, depende de una gran variedad de proteínas. Además, algunas proteínas son internalizadas por vías independientes de clatrina. Finalmente, existe una proteína denominada caveolina que participa en la endocitosis de ciertas proteínas, por medio de vesículas denominadas caveolas¹⁵⁸.

Como un ejemplo de la complejidad de las rutas de endocitosis, en la endocitosis mediada por receptores, además de las proteínas mencionadas participan una serie de proteínas entre las que se encuentran la proteína Eps-15, localizada en la superficie de vesículas cubiertas por clatrina. Eps-15 se une a otra proteína denominada α -adaptina¹⁵⁹. Otra proteína de gran importancia es la sinajaptonina, que interactúa también con la proteína Eps-15 para controlar la endocitosis mediada por clatrina y para conectar con el citoesqueleto las vesículas ya formadas¹⁶⁰. Otros elementos que participan en el tránsito intracelular son proteínas que unen GTP, como la dinamina, que actúa como una enzima mecánico-química ya que trabaja ensamblándose en estructuras parecidas a anillos que constriñen las invaginaciones iniciales de la superficie celular para dar lugar a vesículas recubiertas de clatrina^{161,162}. Una vez formada la vesícula, la clatrina se pierde rápidamente y las vesículas recién formadas se fusionan con los endosomas.

A pesar de lo mencionado, los mecanismos de transporte vesicular entre los diferentes compartimientos intracelulares no están bien definidos, además de que continuamente se descubren más participantes. Recientemente se describió otra proteína adaptadora denominada AP-3, que participa en el transporte entre el TGN y los endosomas por una vía independiente de clatrina ¹⁶³.

Por otra parte, se han descrito una serie de proteínas de la familia Rab que están involucradas en distintos tipos de transporte. En mamíferos se han identificado alrededor de 40 proteínas Rab, incluyendo isoformas de algunas de ellas ¹⁶⁴. La complejidad de la familia de proteínas Rab en las células de mamífero se correlaciona con la diversidad de rutas de transporte de vesículas encontradas en la gran variedad de tipos celulares, tanto en exocitosis como endocitosis.

De las proteínas Rab descritas hasta el momento, algunas podrían participar en el tránsito entre los sitios o compartimientos relevantes para el transporte de MHC-II y de antígenos presentados por estas moléculas. Por ejemplo, Rab5 participa en el transporte de la superficie celular a endosomas tempranos ¹⁶⁵; Rab4, en el transporte homotípico entre endosomas tempranos ¹⁶⁶; Rab7, transporta vesículas de endosomas tempranos a tardíos y de endosomas tardíos a lisosomas ^{167,168}; Rab9, transporta entre endosomas tardíos y TGN y Rab11 se localiza en el TGN, gránulos de secreción y endosomas y aparentemente funciona en el reciclaje entre endosomas y la superficie celular¹⁶⁹. Finalmente, Rab24 se ha encontrado en endosomas tardíos, pero también se ha localizado en el RE y se ha sugerido que participa en procesos de autofagia.

De acuerdo a lo mencionado, es posible que existan múltiples rutas de transporte, aún no caracterizadas, implicadas en el transporte no solo de moléculas relevantes en el procesamiento de antígenos sino también de antígenos exógenos y endógenos para su procesamiento y presentación por MHC-II.

3.-Proteínas exógenas: fagocitosis, pinocitosis y endocitosis mediada por receptores.

Como se mencionó, existen distintas rutas de endocitosis, mediante las cuales las proteínas exógenas pueden penetrar a la célula para ser presentadas por MHC-II. Por otro lado, la endocitosis de los antígenos varía en los distintos tipos de CPA ¹⁷⁰.

Muchos microorganismos penetran a las CPA mediante un proceso denominado fagocitosis. La fagocitosis (células comiendo) se inicia por la unión de complejos antígeno-anticuerpo o de otros complejos ligando-receptor que se unen a los distintos receptores expresados en la superficie celular, lo que resulta en polimerización de actina y formación de pseudópodos que toman las partículas dando como resultado la formación de fagosomas ¹⁷¹.

Por otro lado, los diferentes tipos de CPA pueden internalizar una gran cantidad de moléculas del medio externo mediante pinocitosis en fase fluida ¹⁷². Este proceso se inicia con la formación de pequeñas hendiduras en la membrana plasmática, con frecuencia recubiertas por clatrina, las cuales atrapan, en forma inespecífica, líquidos y proteínas del medio extracelular a la célula. Los linfocitos B, al igual que las células dendríticas, pueden internalizar antígeno por este mecanismo. Sin embargo, en muchas ocasiones esta vía es ineficiente. Las células dendríticas internalizan grandes cantidades de material extracelular mediante un proceso denominado macropinocitosis ¹⁷³.

Por otra parte, las CPA poseen un gran número de receptores que permiten la internalización de moléculas de manera específica. Este proceso es denominado endocitosis mediada por receptores y en él participan entre otros, los receptores para la porción Fc de los anticuerpos, receptores de manosa y en linfocitos B, la inmunoglobulina de superficie ^{174,175}. Esta vía de

internalización es altamente eficiente. La internalización del antígeno por receptores se lleva a cabo, como se mencionó, mediante invaginaciones que dan lugar a las vesículas cubiertas con clatrina. En la internalización de receptores, participan señales de tirosinas o di-leucinas, capaces de reclutar a la proteína adaptadora 2 (AP-2)^{176,177}. Dependiendo de la secuencia señal en los receptores y de la interacción con diversas proteínas citosólicas, los complejos ligando-receptor pueden ser transportados a distintos subcompartimientos de la vía endocítica¹⁷⁸.

Los antígenos internalizados por cualquiera de las rutas mencionadas son presentados eficientemente por moléculas clase II del MHC, ya que después de ser endocitados tienen acceso a las distintas enzimas proteolíticas y a los compartimientos especializados para el procesamiento de antígeno¹⁷⁹. Sin embargo, como veremos más adelante, hay evidencias de que las distintas vías de internalización de antígenos pueden conducir a diferentes compartimientos endocíticos y, por lo tanto, a distintos sitios de procesamiento y presentación de antígenos por moléculas clase II.

4.-Proteínas endógenas: localización en la célula y señales de tráfico intracelular.

Tanto en los ribosomas libres, como en los ribosomas asociados al RE, todas las células del organismo sintetizan continuamente proteínas que, desde su biosíntesis hasta su destino final en la célula, siguen distintas rutas de transporte intracelular. Las proteínas sintetizadas en los ribosomas libres del citosol, son las citosólicas, mitocondriales o nucleares. Por otro lado, entre las proteínas sintetizadas en los ribosomas asociados al RE se encuentran las proteínas de membrana, de secreción, residentes del RE y Golgi y proteínas residentes de los compartimientos endocíticos.

En células eucariontes, el destino de una proteína depende de señales contenidas en su secuencia de aminoácidos. Las proteínas sin una secuencia señal que permita el anclaje de los ribosomas al retículo endoplásmico, se

sintetizan en los ribosomas libres del citosol, de donde son liberadas hacia su destino final. Las proteínas citosólicas pueden ser libres o asociadas a la cara intracelular de la membrana. Las primeras pueden permanecer solubles, polimerizarse para formar redes o unirse a otras proteínas. Otras proteínas sintetizadas en los ribosomas libres del citosol son las nucleares, que son importadas al núcleo mediante secuencias específicas en la proteína. Por otra parte, a pesar de que algunas proteínas mitocondriales son codificadas y sintetizadas en las mismas mitocondrias, muchas proteínas residentes de este organelo son codificadas por el DNA cromosómico y sintetizadas en los ribosomas libres en el citosol, después de lo cual son transportadas a las mitocondrias.

a) Proteínas sintetizadas en los ribosomas asociados a retículo endoplásmico.

Las proteínas de esta vía son denominadas también de la vía exocítica o de secreción descrita por Palade en 1975¹⁸⁰. Estas proteínas se sintetizan en los ribosomas asociados a RE y, en forma cotraduccional, son translocadas al interior del RE o integradas a la membrana de este compartimiento. Este proceso se lleva a cabo por una maquinaria macromolecular denominada traslocón^{181,182}. La traslocación cotraduccional se inicia en el citosol con la síntesis de un segmento hidrofóbico, generalmente en el extremo amino terminal de la proteína naciente, denominado secuencia o péptido señal. Esta secuencia es reconocida por una ribonucleoproteína denominada SRP (partícula de reconocimiento de señal), de la cual depende la dirección del complejo ribosoma-proteína naciente-SRP a la membrana del RE de una manera dependiente de GTP¹⁸³. Una vez que el complejo se une a la membrana del RE, la proteína es transferida a un canal acuoso de traslocación, el cual es aislado del microambiente citosólico por una unión estrecha membrana-ribosoma¹⁸⁴. El componente mejor caracterizado del traslocón es el complejo heterotrimérico Sec61¹⁸⁵. Para las proteínas de secreción, el principal papel del traslocón es facilitar el movimiento de todo el polipéptido a través de la membrana impermeable del RE. Sin embargo,

para las proteínas de membrana, además de la traslocación de algunos dominios de la proteína, el traslocón debe ser capaz de reconocer dominios potenciales de membrana y facilitar su integración a la bicapa lipídica.

El viaje de las proteínas de la vía exocítica a su destino final en la célula inicia en el RE. Así, las proteínas de esta vía, con excepción de las proteínas residentes de RE, permanecen en este sitio muy brevemente para dar inicio al proceso de transporte vesicular, a través del Golgi, hacia los distintos destinos en la célula. Como se mencionó, una característica importante de las proteínas de la vía exocítica, que determina su clasificación y destino final, son las señales de tráfico o de permanencia en los distintos compartimentos. Estas señales son secuencias de 4 a 25 residuos en la secuencia pero también pueden ser estructuras dependientes de conformación¹⁸⁶. Una proteína puede tener múltiples señales de tránsito que colectivamente determinan su itinerario.

Una proteína con una señal de transporte se concentra en una vesícula en formación por el resultado, ya sea de la interacción de la secuencia de tráfico con las proteínas que recubren la membrana que dará origen a la vesícula o con un receptor de carga que, a la vez que mantiene unida a la proteína y que también interactúa con las proteínas que recubren la membrana donadora. Por el contrario, las proteínas con secuencias de retención o recuperación no se concentran en la región de la membrana que da origen a la vesícula y cuando llegan a ser transportadas, son recuperadas desde un compartimento intermedio en la ruta de transporte. Finalmente, cuando las proteínas carecen de ambas señales, pueden viajar por los compartimentos de la vía exocítica mediante un mecanismo de transporte masivo no selectivo

^{187,188}.

b) Proteínas residentes del retículo endoplásmico.

Una de las principales funciones del RE es promover que las proteínas adquieran una conformación adecuada. Algunas de las proteínas residentes

en la luz del RE, interactúan con las proteínas recién sintetizadas. Estas proteínas, llamadas chaperonas, son esenciales para la función y maduración adecuada de las proteínas de la vía exocítica. Para llevar a cabo su función, las proteínas residentes del RE deben de permanecer en este compartimiento por tiempos prolongados antes de sufrir un recambio fisiológico.

La señal de retención mejor caracterizada para proteínas luminales del RE es la que contiene la secuencia KDEL ¹⁸⁹. La secuenciación de múltiples proteínas residentes en la luz del RE ha demostrado que en su extremo C-terminal contienen la secuencia KDEL o secuencias relacionadas, como HDEL, RDEL o KEEL ¹⁹⁰. La eliminación de esta región resulta en su salida del RE, lo que demuestra la necesidad de las secuencias mencionadas para la permanencia de las proteínas en este compartimiento. Sin embargo, estas proteínas truncadas no se secretan por completo, lo que sugiere la existencia de señales adicionales para la retención de las proteínas en el RE.

Por otro lado, cuando se inserta la secuencia KDEL en el extremo C-terminal de proteínas que no son residentes del RE, estas permanecen en el RE ^{191,192}. Sin embargo, cuando una proteína con secuencia KDEL es expresada en forma abundante, puede salir del RE por saturación de sus receptores ¹⁹³. Por otra parte, el cambio de la secuencia KDEL por KDAS o KDELGL en proteínas que no son residentes naturales de RE resulta en su secreción en una proporción mayor que la de proteínas residentes del RE a las que se les elimina la secuencia KDEL. Esto sugiere, nuevamente, la existencia de mecanismos adicionales de retención para este tipo de proteínas en el RE.

El hallazgo de proteínas KDEL en el aparato de Golgi y la identificación de un receptor para KDEL ¹⁹⁴, que se distribuye entre el RE y TGN ¹⁹⁵, indican que la retención de proteínas por la secuencia KDEL en el RE depende de la recuperación de estas proteínas del Golgi al RE mediante un mecanismo de transporte vesicular inverso denominado "retrogrado". Este mecanismo permite una recuperación selectiva de proteínas localizadas en cualquiera de

las cisternas del Golgi hacia el RE, mediante un receptor de carga para la secuencia KDEL. Se ha propuesto que las vesículas COP I que median el transporte de RE a Golgi y las responsables del transporte inverso del Golgi a RE son distintas ¹⁹⁶.

Los resultados de los estudios descritos sugieren fuertemente la existencia de dos mecanismos para la permanencia de proteínas en el RE: la retención por señales que evitan la entrada a vesículas transportadoras y la recuperación a través de la secuencia KDEL y su receptor expresado en el RE y en las cisternas del Golgi ^{197,198}. Para las proteínas de membrana, la señal de retención en el RE es la secuencia KKXX, que aparentemente funciona tanto como señal de retención, como de recuperación ¹⁹⁹.

Por otra parte, las proteínas con estructura terciaria anormal o mal ensambladas son retenidas en el RE. Se ha propuesto que esto se debe principalmente a que la ausencia de conformación normal no les permite exponer las señales de tráfico, además de la interacción con otras proteínas residentes que tienen señales de retención y/o recuperación.

c) Proteínas de secreción y residentes de la vía endocítica.

Las señales que determinan el egreso de proteínas maduras de la vía exocítica del RE no están bien establecidas. Los estudios realizados no han logrado identificar una señal específica de alta afinidad que se una a un receptor. Se ha propuesto que el egreso del RE de una proteína no es mediado por una sola señal, sino por una combinación de señales menos eficientes que deben actuar en conjunto al unirse simultáneamente a varios receptores de baja afinidad ²⁰⁰. Esta suma de señales puede ser adquirida sólo por proteínas totalmente ensambladas. De esta manera, se mantiene el control de calidad en el egreso del RE. Alternativamente, las proteínas sin señal de retención y/o recuperación podrían salir del RE mediante el

mecanismo de transporte vesicular masivo. De acuerdo con lo anterior, una vez ensambladas, las proteínas de secreción y las que tienen como destino final la vía endocítica, una vez ensambladas, salen del RE al Golgi y se transportan a través de vesículas a partir del TGN hacia los distintos destinos en la célula.

Durante su paso por las cisternas del Golgi, las proteínas sufren modificaciones adicionales (postraduccionales) que influyen también en su destino hacia los distintos compartimientos. Así, algunas proteínas se dirigen a la vía endocítica tanto por señales en su secuencia como por modificaciones como manosas fosforiladas. Las señales basadas en *motifs* de di-leucinas son importantes para la dirección de las proteínas a la vía endocítica ²⁰¹. Además de lo anterior, para la dirección de las proteínas a la vía endocítica existen también mecanismos de transporte independientes de esos aminoácidos ²⁰². Por otra parte, no se han determinado secuencias específicas en las proteínas de secreción, por lo que se piensa que éstas son transportadas por el mecanismo de transporte vesicular masivo.

De las distintas proteínas mencionadas, las que se presentan de manera más eficiente por moléculas clase II del MHC son aquellas que entran a la vía exocítica y que de alguna manera tienen acceso a los compartimientos endocíticos. Sin embargo, algunas proteínas potencialmente retenidas en el RE o sintetizadas en los ribosomas libres en el citosol pueden presentarse también en el contexto de moléculas clase II ²⁰³.

5.- Sistemas proteolíticos y generación de péptidos antigénicos.

Para que cualquiera de las proteínas mencionadas puedan ser presentadas por moléculas del MHC, es necesario que sean degradadas por los distintos sistemas proteolíticos para generar péptidos capaces de unirse a las moléculas del MHC. La actividad proteolítica de una célula eucarionte se lleva a cabo por dos grupos de proteasas. Las proteasas endosómicas/lisosómicas hidrolizan las proteínas presentes en los

compartimientos endocíticos, incluyendo a las proteínas capturadas por endocitosis, residentes de dichos compartimientos o dirigidas a éstos desde otros sitios de la célula ²⁰⁴. Por otra parte, el sistema multicatalítico citosólico regula el recambio de la mayoría de proteínas celulares localizadas en el citosol y el núcleo ²⁰⁵. Ambos sistemas proteolíticos son indispensables para la supervivencia de la célula y preceden en la evolución al sistema inmune ²⁰⁶. Sin embargo, como se mencionó, los péptidos generados por estos sistemas proteolíticos son utilizados por el sistema inmune, tanto para mantener la tolerancia inmunológica como para inducir una respuesta inmune ²⁰⁷.

a) Proteasas endosómicas-lisosómicas.

El sistema proteolítico endosómico-lisosómico está compuesto por una gran cantidad de endopéptidasas y exopéptidasas, localizadas en las distintas vacuolas endocíticas. La actividad óptima de estas proteasas ocurre a pH ácido; por lo tanto, su actividad puede ser bloqueada por inhibidores de la acidificación de vesículas, como cloroquina y cloruro de amonio ^{208,209}. La gran variedad de enzimas proteolíticas localizadas en estos compartimientos correlaciona con la heterogeneidad de péptidos que pueden generarse en ellos ⁴⁸.

Las endopeptidasas hidrolizan uniones amidas internas en las proteínas, mientras que las exopéptidasas hidrolizan uno o dos aminoácidos de los extremos amino y carboxilo terminal de una proteína. Estas enzimas se clasifican de acuerdo al aminoácido en su sitio activo que utilizan para llevar a cabo la reacción de hidrólisis. Así, por ejemplo, las cisteíl-proteasas utilizan a la cisteína como grupo de reacción con el sustrato ²¹⁰.

Dentro de las principales familias de proteasas ácidas se encuentran las seríl, cisteíl, aspartíl y metalo-proteasas. Entre las proteasas endosómico-lisosómicas mejor caracterizadas están las catepsinas. Estas pertenecen principalmente a dos familias de enzimas: las cisteil y aspartil proteasas. Inicialmente se sugirió que entre las aspartil proteasas, las catepsinas D y E

son las implicadas principalmente en el procesamiento de antígenos, en especial la primera ^{211,212}. Estas enzimas son endopeptidasas que actúan a pH de 2.8 a 4. Entre las cisteil-proteasas se encuentran las catepsinas A, B, H, L y S, que están en alta concentración y tienen actividad de exoproteasas principalmente, pero pueden actuar también como endoproteasas. La catepsina S, tiene exclusivamente actividad de endoproteasa. Estas enzimas actúan a un pH menos ácido (entre 5 y 6) y se inactivan a pH neutro, con excepción de la catepsina S, la cual retiene la mayor parte de su actividad aún a pH 8.0 ¹⁰⁸.

Estudios iniciales realizados *in vitro* indicaron que las catepsinas B, D y E participan en el procesamiento de antígenos presentados por MHC II ^{211,212,213,214}. Experimentos con inhibidores de cisteil o aspartil proteasas y sustratos sintéticos como competidores han sugerido que los miembros de estas dos familias participan de manera importante en la generación de péptidos derivados de diferentes antígenos ^{215,216,217}. Sin embargo, es importante tener en cuenta que los estudios realizados con inhibidores, son difíciles de interpretar ya que ninguno de ellos es específico para una enzima dada. Además, los inhibidores de proteasas pueden afectar otros procesos en la celulares, algunos de los cuales están relacionados con la presentación de antígeno como la degradación de la cadena Ii ²⁰⁹.

Recientemente, el uso de células presentadoras de antígeno provenientes de ratones deficientes en catepsinas B, D y L, que colocalizan en la vía endocítica con MHC II, demostraron que ninguna estas enzimas son indispensables en la generación de los péptidos derivados de cuatro antígenos diferentes ¹⁰³. Esto sugiere nuevamente que en la generación del mismo determinante o determinantes similares pueden participar múltiples proteasas. Fue de interés el hallazgo, en estos estudios, que la generación de algunos determinantes fue reducida y la de otros incrementada, lo que indica que para la generación de ciertos determinantes, varias enzimas participan de manera conjunta, mientras que otros determinantes podrían ser destruidos por algunas de estas enzimas.

Aunque las catepsinas son las enzimas más abundantes de los compartimientos endosómicos-lisosómicos, a la fecha no se conocen todas las enzimas capaces de participar en el procesamiento de antígenos. Se han identificado, por lo menos, seis nuevos cDNAs de cisteíl-proteasas humanas y algunas secuencias existentes en los bancos de datos tienen homología con las catepsinas. Lo anterior es apoyado por un estudio reciente que demostró la participación de una cisteíl-endopeptidasa específica de asparagina en la degradación inicial del toxoide tetánico ²¹⁸. Este estudio, además de sugerir la participación de proteasas aún no identificadas en la generación de péptidos antigénicos, sugiere la existencia de actividad selectiva de ciertas proteasas en la degradación de un antígeno determinado. Es importante mencionar que de la gran variedad de hidrolasas presentes en los endosomas/lisosomas aparentemente no todas son importantes en el procesamiento de antígeno.

Las catepsinas, como otras hidrolasas ácidas, son transportadas a la vía endocítica por medio del receptor de manosa 6-fosfato. La ruta primaria de transporte de estas enzimas hacia la vía endocítica es la red del TGN a endosomas tardíos. De esta manera, las catepsinas se encuentran localizadas principalmente en endosomas tardíos, lisosomas y en compartimientos relacionados con MIIC, pero pueden localizarse a lo largo de toda la vía endocítica. En un estudio realizado en linfocitos B deficientes en RM6P CI, se demostró que la catepsina D aún puede transportarse a endosomas tempranos, a través de una vía independiente de clatrina y AP-1, lo que sugiere que estas enzimas pueden seguir más de una ruta de transporte ²¹⁹. Tomando en cuenta que las catepsinas actúan a diferentes pH, es posible que algunas enzimas actúen predominantemente en ciertos organelos. Por otra parte, múltiples proteasas endosómicas, con actividades enzimáticas diferentes, se localizan en distintos compartimientos endocíticos, constituyendo unidades catalíticas. Sin embargo, el contenido enzimático en cada uno de los compartimientos endocíticos no está definido. Las proteasas y su concentración son variables de célula a célula.

Tomando en cuenta lo mencionado, el material endocitado puede ser procesado en distintos microambientes, desde endosomas tempranos hasta compartimentos con distintas actividades proteolíticas. Estudios realizados con lisozima de gallina (LG) han demostrado que el determinante 46-61 requiere de actividad proteolítica de enzimas localizadas en endosomas tardíos. Por el contrario, los determinantes 116-129 y 34-45, aparentemente son generados en endosomas tempranos²²⁰. Como veremos más adelante, la vía de internalización del antígeno es importante también para la generación de los péptidos, ya que dependiendo del receptor involucrado en la endocitosis del antígeno, éste puede ser dirigido a compartimentos endocíticos con actividades proteolíticas diversas. Por otra parte, los antígenos sintetizados en el interior de la célula, que llegan a la vía endocítica por diferentes rutas, podrían tener acceso a otros compartimientos con diferente contenido de hidrolasas.

Finalmente, es importante mencionar que algunas de las enzimas como las catepsinas B, S y L, implicadas en la generación de los péptidos presentados por MHC-II son inducibles con interferón (INF) γ ²²¹. Esto sugiere un cambio en la capacidad de generación de péptidos durante una respuesta inmune. Por lo tanto, aunque el sistema inmune utiliza los mecanismos de degradación fisiológicos de la célula, es también capaz de modificar estas funciones para la generación de determinantes antigénicos adicionales y/o para aumentar la degradación de la cadena Ii.

Aún queda mucho por saber con relación a las proteasas que participan en la generación de péptidos dentro de los compartimientos endosómicos-lisosómicos así como la localización y función precisa de estas enzimas en la generación de péptidos antigénicos.

b) Complejo multicatalítico citosólico: Proteasoma.

A diferencia de las proteasas descritas anteriormente, que pueden ser monoméricas o diméricas y que llevan a cabo su actividad en compartimientos rodeados por membranas, existe un grupo de enzimas proteolíticas pertenecientes a otras familias de proteasas. Por su manera de agruparse, sin que estén contenidas en un organelo rodeado por membranas, estas enzimas dan lugar a una especie de compartimientos en los que se lleva a cabo la hidrólisis de proteínas de manera controlada. Estas agrupaciones enzimáticas se conocen como complejos multicatalíticos ²⁰⁵.

El mejor estudiado de estos complejos es el proteasoma que localiza en el citosol, libre o asociado a la membrana del RE, y en el núcleo ²²². El proteasoma degrada proteínas para mantener la homeostasis de la célula. Sin embargo, como sucede con los péptidos generados por las proteasas endosómicas-lisosómicas, que son utilizados por el sistema inmune para unirse a MHC-II, algunos péptidos generados por el proteasoma son transportados por TAP 1 y TAP 2 al interior del RE, donde los que cumplen con las características adecuadas se unen a las moléculas clase I del MHC ²²³. Para ser degradadas por el proteasoma, muchas proteínas necesitan ser marcadas por un polipéptido de una proteína denominada ubiquitina ²²⁴.

Los proteasomas se encuentran como una estructura conservada en todos los reinos, desde arqueobacterias hasta mamíferos. La purificación y cristalización del proteasoma de *Thermoplasma acidophilum*, permitió visualizar la estructura cilíndrica de este complejo multienzimático ²²⁶. En células eucariontes existen proteasomas 20S y 26S. La partícula 20S consta de siete subunidades α y siete β agrupadas en una estructura cilíndrica con un canal interno, donde se lleva a cabo la hidrólisis de las proteínas ²²⁵. A esta partícula central se puede asociar una partícula reguladora, que puede ser intercambiable, formando el proteasoma 26S.

El proteasoma 20s tiene diversas actividades proteolíticas. Una de ellas es semejante a quimotripsina, que corta después de residuos hidrofóbicos; otra actividad es semejante a tripsina, que corta después de lisina y arginina; una actividad más es de peptidil-glutamil hidrolasa, la cual corta después de residuos ácidos. Además, los proteasomas de mamíferos tienen dos actividades proteolíticas adicionales que cortan después de residuos marcados con ubiquitina y entre pequeños aminoácidos neutros ²²⁷. La actividad proteolítica del proteasoma 20S puede ser inhibida por drogas capaces de modificar la subunidad β del proteasoma y, de esta manera, bloquear su actividad, la más específica es la lactacistina ^{228,229}, aunque los di péptidos aldehídos, como el N-acetil-leucil-leucil-norleucinal (LLnL), también inhibe la actividad del proteasoma ^{230,231}. Sin embargo, LLnL también bloquea la actividad de algunas cisteil proteasas, calpaína y de las enzimas involucradas en el corte de péptidos líder en el RE ²³².

Dentro de las partículas reguladoras que se asocian a ambos extremos del proteasoma 20S se encuentra la partícula 19S ²³³. Esta partícula está formada por una serie de ATPasas que parecen participar en la interacción inicial con los sustratos ubiquitinados para que subsecuentemente sean translocados al interior del cilindro. Algunas funciones de las ATPasas son el desdoblamiento de las proteínas y la selección de sustratos marcados con ubiquitina. La partícula reguladora 19S tiene dos subregiones denominadas base y tapa. Estudios recientes demostraron que la base es suficiente para la degradación de proteínas no marcadas con ubiquitina y péptidos cortos, pero que para la degradación de polipéptidos ubiquitinados es necesaria la presencia de ambas regiones ²³⁴.

Existen diversas señales que hacen a una proteína susceptible a la degradación por el proteasoma 20S. Una de las mejor caracterizadas es el residuo amino terminal de la proteína. Esta señal es denominada regla N-fin. Así, la vida media de una proteína en el citosol depende de su residuo amino terminal y de la presencia de una o más lisinas internas que llevan acabo la reacción de conjugación con la ubiquitina. Aunque se ha demostrado que

proteínas marcadas con ubiquitina pueden ser degradadas también por las enzimas lisosómicas, existen otras señales que no dependen de ubiquitina.

Al igual que en el caso del sistema proteolítico endosómico-lisosómico, el sistema inmune posee la capacidad de especializar al sistema proteolítico del proteasoma para generar péptidos óptimos capaces de unirse a MHC-I. Las subunidades LMP2 y LMP7 (Proteínas de bajo peso moléculas 2 y 7, que son inducibles por $\text{INF}\gamma$, son codificadas en el MHC ²³⁵. Estas son capaces de sustituir a subunidades correspondientes del proteasoma 20S y de generar péptidos de 8-9 aminoácidos que pueden ser transportados al interior de RE, donde se unen a MHC-I. Estas subunidades no son indispensables para la generación de determinantes presentados por MHC-I ²³⁶. Además de la partícula reguladora 19S, hay otra partícula reguladora o activadora del proteasoma 20S denominada 11S o PA28, que también es inducible por $\text{INF}\gamma$. Esta partícula actúa de manera independiente de ATP y puede incrementar la capacidad proteolítica del proteasoma y así optimizar su capacidad de generar péptidos inmunogénicos ²³⁷. El proteasoma 20S puede estar asociado tanto a la partícula 19S (26S) como a la partícula 11S .

El proteasoma 26S se encuentra principalmente en el citosol, mientras que el proteasoma 20S puede encontrarse asociado a la membrana de RE. Algunos estudios sugieren que estas dos formas de proteasomas podrían tener funciones distintas, aunque ambos participan en la generación de péptidos capaces de unirse a MHC-I ²³⁸.

Aunque se ha sugerido que los proteasomas generan péptidos homogéneos de 7-9 (regla molecular), en trabajos realizados con proteasomas 26S y 20S aislados de *archeobacterae* y de músculo de conejo, se demostró que los péptidos generados pueden tener desde 3 hasta 22 residuos de longitud y que menos del 15% de los péptidos tienen la longitud requerida para unirse a MHC-I ^{239,240}. El hallazgo de que dos terceras partes de los péptidos sean cortos, sugiere que la degradación en el interior del cilindro debe continuar

hasta que su tamaño sea lo suficientemente pequeño para difundir del proteasoma.

Una vez que los péptidos salen del proteasoma, necesitan ser protegidos de otras actividades proteolíticas citosólicas para evitar su degradación hasta aminoácidos. Se ha propuesto que algunos chaperones como Hsp70/90, que se asocian normalmente a proteínas recién sintetizadas en el citosol, podrían acompañar a los péptidos generados por el proteasoma hasta la membrana del RE, para posteriormente ser trasladados al interior de éste ²⁴¹. Por otra parte, se ha establecido que TAP 1 y TAP 2 transportan preferentemente péptidos de 9 a 15 aa ²⁴². En la actualidad no se sabe si todos los péptidos generados por los proteasomas son transportados por TAP1 y TAP2 al interior de RE ni cual es el destino de los péptidos de mayor tamaño que son generados pero que no son transportados al interior de RE o que se transportan al interior del RE y no se unen a las moléculas clase I.

c) Degradación asociada a retículo endoplásmico.

Como se mencionó, el RE ha sido descrito como el compartimiento en el que se realiza el control de calidad de las proteínas. Las proteínas multiméricas no ensambladas correctamente, además de algunas proteínas residentes de este compartimiento y proteínas normalmente retenidas en este sitio por su asociación con chaperones, son finalmente degradadas. Este sistema de control de calidad es necesario para la identificación y degradación de las proteínas con conformación inadecuada y para el recambio de las proteínas residentes.

La degradación de proteínas en compartimientos tempranos de la vía exocítica ha sido estudiada con un gran número de complejos multiméricos que se ensamblan en el RE. Los modelos más estudiados incluyen las subunidades del receptor de linfocitos T (TCR) ^{243,244,245}, de MHC-I ^{246,247}, MHC-II ^{248,249}, las cadenas pesadas (H) y ligeras (L) de inmunoglobulinas ^{250,251} y el receptor de asialoglicoproteína ²⁵², entre otros. Los primeros estudios

realizados en estos modelos demostraron que la degradación de proteínas retenidas en el retículo endoplásmico era independiente de la actividad lisosómica, que se mantenía en presencia de BFA y que era inhibida a temperaturas menores a los 15° C.

Por otro lado, los estudios iniciales con la cadena α del TCR, demostraron que la degradación de esta cadena en células permeabilizadas con estreptolisina O (sin citosol), se lleva a cabo en vesículas derivadas de RE sin requerimiento de ATP ²⁵³. Estos resultados, además de sugerir que la degradación de estas proteínas es independiente de proteasas endosómicas-lisosómicas, sugirieron que en el RE se encuentran los componentes requeridos para la proteólisis de al menos algunas proteínas, incluyendo a la cadena α del TCR ²⁵⁴. Estudios en levaduras, con una forma mutada de la proteína reguladora de la conducción de fibrosis quística (CFRT), demostraron la participación del proteasoma en la degradación de esta proteína, aparentemente retenida en el RE ^{255,256}. Por otro lado, estudios realizados *in vitro*, también en levaduras, con el factor pro-alfa, utilizando vesículas derivadas del RE, demostraron que para la degradación de esta proteína se requería citosol y ATP ²⁵⁷. Estos estudios fueron los primeros en sugerir la participación del proteasoma en la degradación de proteínas retenidas en el RE.

Recientemente se han ampliado los estudios que demuestran la participación de los proteasomas en la degradación de diversas proteínas retenidas en el RE en mamíferos ^{258,259,260,261}. Huppa y Ploegh demostraron que la degradación de la cadena α del TCR requería de citosol y ATP ²⁵⁸. También se demostró la participación de proteasomas en la degradación de la cadena α de MHC-I ²⁶⁰. Las cadenas α de las moléculas clase I, sin $\beta 2M$ ²⁵⁹, o en presencia de las proteínas del citomegalovirus humano US11 y US2, que impiden un ensamble adecuado, son liberadas del traslocón inmediatamente después de su biosíntesis, desglucosiladas y transportadas al citosol para ser degradadas por el proteasoma ²⁶⁰.

Para la degradación de la cadena α del TCR no es necesario el marcaje con ubiquitina, mientras que las mutantes de CFTR son poliubiquitinadas antes de ser degradadas por el proteasoma, sugiriendo que existen diferencias en los mecanismos de degradación para las distintas proteínas retenidas en el RE ^{256,258}.

Algunas enzimas capaces de conjugar ubiquitina a sustratos, como Ubc6p y Cue1p/Ubc7p, se expresan en la membrana del RE ²⁶². Por otra parte, se ha demostrado que algunos componentes del traslocón como Sec 61p participan en el transporte del RE al citosol ^{263,264}. Otros componentes del traslocón, así como chaperones luminales y proteínas residentes del RE, participan en transporte al citosol de las proteínas que serán degradadas ^{265,266}. Algunas subunidades del componente Sec61p son degradadas también por proteasomas ²⁶⁷.

Los estudios realizados con las cadenas β de MHC-II proponen un mecanismo adicional para la degradación de proteínas residentes del RE. La degradación de cadenas β libres, retenidas en el RE, es sensible a inhibidores de proteasomas y es aumentada por BFA. Sin embargo, dichas cadenas no son desglucosiladas ni traslocadas al citosol. En dicho estudio, la mayoría de cadenas β se localizaron en el RE y una pequeña fracción en el cis-Golgi y no fue posible detectarlas en el citosol, aún en presencia del inhibidor de proteasomas. Por otro lado, mediante fraccionamiento subcelular, se detectó, como en otros trabajos, la presencia de una pequeña porción de proteasomas que cofraccionan con el RE y se demostró también asociación de proteasomas a vesículas microsómicas ²⁶⁸. Lo anterior sugiere la existencia de un sistema de degradación asociado al RE que es dependiente de proteasomas, posiblemente asociados al RE. Se ha propuesto también la participación de proteasomas asociados al RE en la degradación de la cadena δ del TCR ²⁶⁹.

Ya que a la fecha no se ha demostrado la presencia de otras proteasas luminales en el RE, adicionales a la señal peptidasa y algunas otras proteasas

capaces de degradar proteínas en el RE, actualmente se acepta que el principal mecanismo de degradación de proteínas residentes del RE es asociado al RE y es dependiente de proteasomas libres en el citosol o asociados a este compartimiento. Esto ocurre con proteínas transmembranales ^{253,256,257,260} intraluminales sin conformación o mal ensambladas ^{270,271} y residentes del RE ²⁷². Sin embargo, es posible que algunas proteasas del RE participen en la degradación de proteínas residentes o actúen en conjunto con los proteasomas ²⁷³⁻²⁷⁷.

Las señales que determinan la vida media de los polipéptidos mal ensamblados retenidos y de otras proteínas del RE apenas empiezan a ser definidas. Bonifacino y colaboradores demostraron que los residuos cargados de las regiones transmembranales de las cadenas α y δ del TCR influyen en su degradación ²⁷⁸. Los N-glicanos, presentes en moléculas retenidas en el RE, pueden también afectar su vida media ²⁷⁹. En este contexto, se han identificado secuencias en el COOH terminal que parecen ser importantes en la degradación de algunas proteínas. En el caso de la cadena α de MHC-II, se encontró que tanto el amino como el carboxilo terminal son importantes en su degradación. Esto indica la existencia de diversos mecanismos de degradación y rutas de transporte y que distintas proteínas pueden utilizar específicamente alguna de ellas de para su degradación.

A diferencia de la degradación citosólica y lisosómica en levaduras, el mecanismo de degradación asociado al RE en levaduras, no es esencial para su sobrevivencia. Esto podría deberse a que estos microorganismos cuentan con un transporte de autofagocitosis de material del RE a lisosomas. En mamíferos no se ha determinado la relevancia de la degradación asociada al RE, aunque algunos trabajos sugieren que este mecanismo podría ser utilizado como un sistema fisiológico continuo, tanto para la degradación de proteínas retenidas en el RE, como para proteínas sin conformación adecuada. Tampoco se ha examinado cual es el destino final de los péptidos generados por este mecanismo de degradación. Algunos trabajos han demostrado que péptidos derivados de proteínas residentes del RE

degradadas por proteasomas son utilizados por el sistema inmune para presentarlos unidos a MHC-I ²⁸⁰.

d) Autofagia y degradación de proteínas endógenas por lisosomas.

Además de su capacidad para la degradación de proteínas, ya sean exógenas endocitadas, y de proteínas endógenas residentes de la vía endocítica o dirigidas a ésta, los lisosomas participan en la degradación de otras proteínas endógenas por diversos mecanismos. Así, las proteínas citosólicas que no son degradadas por los mecanismos descritos anteriormente entran al sistema proteolítico endosómico-lisosómico para su degradación. Por otro lado, algunas hidrolasas residentes de vacuolas endocíticas son sintetizadas en el citosol y directamente transportadas a vacuolas endocíticas. Por lo tanto, una pregunta fundamental es cuales son los mecanismos de transporte a las vacuolas endocíticas de las proteínas citosólicas, y de proteínas residentes del RE o de la vía exocítica sin señales de tráfico, ya sea para su degradación o para cumplir una función en este tipo de vesículas.

En mamíferos, este proceso ocurre por un mecanismo denominado autofagia²⁸¹. Este mecanismo implica la invaginación de una membrana que aparentemente puede tener diversos orígenes y que recluta una porción de citosol, formando una vesícula inicial denominada autofagosoma que esta rodeado por una doble membrana ²⁸². Algunos trabajos han encontrado que la membrana que da origen al autofagosoma proviene de RE libre de ribosomas, ya que se han encontrado marcadores de RE en este tipo de vacuolas, sin embargo, este punto es aún controversial²⁸³. Una vez formado el autofagosoma, éste madura en pasos ordenados para dar origen a una vesícula que adquiere marcadores de lisosomas y contiene ATPasas ácidas. Finalmente, la vesícula llega a convertirse en una vacuola con gran capacidad proteolítica que pierde la membrana interna por hidrólisis o por fusión con la membrana externa ²⁸⁴.

Existen pequeñas vesículas apendiculares o anulares dentro de las vacuolas lisosómicas, además de que los lisosomas aislados son capaces de incorporar componentes del medio *in vitro*. Esto ha llevado a proponer que, además de la macroautofagia, en la que grandes cantidades de citosol son rodeadas por membranas, existe un proceso denominado microautofagia en el que pequeñas cantidades de citosol son englobadas por vacuolas endosómicas/lisosómicas²⁸⁵. Estos mecanismos de reclutamiento del citosol o de otros organelos para formar vacuolas con alta capacidad degradativa, son regulados principalmente por condiciones externas, como falta de nutrientes y de otros factores, lo que conduce a la célula a un estado en el que necesita regeneración de sus constituyentes.

Además de las vías descritas anteriormente en las que se recluta material citoplásmico, se han propuesto otros mecanismos de transporte directo a lisosomas de proteínas del RE o de secreción por fusión directa del RE y de vesículas de secreción, respectivamente, con vacuolas lisosómicas. Estos mecanismos son muy activos en el hígado y han sido poco estudiados²⁸⁶.

Los mecanismos arriba descritos parecen inducirse principalmente en condiciones de escasez de nutrientes. Sin embargo, también bajo condiciones normales, algunas proteínas multiméricas que son retenidas en el RE por ausencia de algún componente, pueden ser transportadas directamente a vesículas lisosómicas, aparentemente por el mecanismo de autofagia. Un ejemplo de esto, es la cadena Ii libre de moléculas clase II²⁸⁷.

Recientemente, en estudios realizados en levaduras, se identificaron dos vías de transporte de la hidrolasa vacuolar API del citosol a vacuolas. La primera vía de transporte ocurre en condiciones de crecimiento normales y se caracteriza por el aislamiento de la hidrolasa API en una región restringida del citosol, que colocaliza con un complejo de partículas esféricas que posteriormente es rodeado por una doble membrana. La segunda vía ocurre cuando las células son sometidas a falta de nutrientes, en las que el complejo citosólico formado por las partículas esféricas es tomado por un

autofagosoma de mayor tamaño que contiene, además de la hidrolasa API, otros componentes citosólicos. Así, el mismo mecanismo utilizado por la célula para aislar ciertas proteínas y transportarlas a vacuolas en condiciones normales, es magnificado cuando las condiciones son extremas. Este es el primer reporte en que, en condiciones normales, puede ocurrir un mecanismo similar a la autofagia para transportar hidrolasas recién sintetizadas a vacuolas. Los evidencias mencionadas sugieren la existencia de dos procesos relacionados, semejantes a la autofagia, que pudieran participar en la biogénesis y degradación de proteínas ²⁸⁸.

Además de los mecanismos descritos, que no son selectivos y que generalmente son inducidos en condiciones de escasez de nutrientes, existen trabajos que demuestran la existencia de un sistema selectivo de transporte de citosol a vacuolas dependiente de ATP con la participación de proteínas de choque térmico como HsP73 y HsP70 ²⁸⁹. Este mecanismo se ha observado con polipéptidos que tienen la secuencia KFERQ en el COOH terminal. En este caso de transporte, se ha demostrado la participación de la glucoproteína LGP 96, que se expresa en la membrana de los lisosomas y que funciona como receptor de los polipéptidos que serán transportados del citosol a lisosomas ²⁹⁰. Un ejemplo de proteínas citosólicas que utilizan este mecanismo de transporte para su degradación en lisosomas es el inhibidor del factor nuclear kappa B (I κ B), el cual puede ser detectado en lisosomas en donde se degrada rápidamente²⁹¹. Este mecanismo también se incrementa notablemente en condiciones de falta de nutrientes.

La autofagia es un mecanismo muy activo en levaduras, en donde se ha estudiado ampliamente. A la fecha se han caracterizado 15 genes implicados en mecanismos de autofagia y recientemente se caracterizó el gen AUT 1 como indispensable para la autofagia en estos organismos ²⁹². La existencia de diferentes formas para inducir autofagia ha dificultado la caracterización de los mecanismos implicados en ella. Así, en levaduras, cuando se induce autofagia por falta de glucosa y posteriormente adición de esta, la enzima (FBP asa), que es clave en la gluconeogénesis, es transportada del citosol a

vesículas por vesículas distintas a las descritas para otros mecanismos de autotofagia ²⁹³. Existen, además, reportes que sugieren un mecanismo de degradación compartido entre proteasoma y proteasas endosómicas/lisosómicas para la degradación de la FBPasa, el cual se ha descrito también para otras proteínas en levaduras ²⁹⁴.

En la actualidad no hay reportes que demuestren que los péptidos derivados de proteínas transportadas por autofagia y degradadas en vesículas endosómicas/lisosómicas contribuyan al repertorio de péptidos endógenos presentados por MHC-II. Sin embargo, dado que la vía autofágica se comunica con la vía endocítica ²⁹⁵ y que las estructuras formadas durante la macroautofagia y la microautofagia son similares a los compartimientos MIIC, es muy factible que algunos péptidos generados por estas vías puedan unirse a MHC-II.

6.- Presentación de antígenos exógenos por moléculas clase II.

Los antígenos exógenos que son accesibles a las enzimas endosómicas-lisosómicas proporcionan una parte importante de los péptidos presentados por MHC-II. Los péptidos derivados de estos antígenos representan aproximadamente un 15% de los péptidos eluidos de MHC-II ^{24,48}. Este dato es resultado de un promedio realizado con los datos publicados de péptidos eluidos de múltiples alelos de MHC-II humanas y murinas purificadas. Los antígenos exógenos son adquiridos por la CPA por las distintas rutas de endocitosis y degradados por la gran variedad de enzimas proteolíticas presentes en los compartimientos endocíticos. La presentación de la mayoría de antígenos exógenos requiere de la expresión de la cadena Ii y de la molécula clase II no clásica DM. Sin embargo, dependiendo del antígeno, de la vía de endocitosis y del alelo de MHC-II, algunos determinantes se presentan independientemente de DM y/o de la cadena Ii ²⁹⁶. La mayoría de los antígenos exógenos son procesados en compartimientos relacionados con MIIC/CIIV y los péptidos derivados de ellos se unen a MHC-II también en este tipo de compartimientos. Sin embargo, dependiendo de la vía de

endocitosis implicada en el procesamiento de los antígenos y en la unión de péptidos a MHC-II pueden participar distintas vacuolas endocíticas.

La forma más efectiva para capturar antígenos es a través de receptores específicos expresados en la membrana de las distintas CPA. De estos receptores, los que han sido mejor caracterizados son las inmunoglobulinas de superficie expresadas por los linfocitos B y los receptores para la porción Fc de los anticuerpos expresados en la superficie de células dendríticas y macrófagos. Sin embargo, como se mencionó, las diferentes CPA pueden capturar antígenos mediante pinocitosis en fase fluida.

Diversos estudios sugieren la participación de diferentes mecanismos en la generación y presentación de los péptidos derivados de un antígeno exógeno, dependiendo de su vía de endocitosis. Así por ejemplo, los péptidos derivados de antígenos internalizados por pinocitosis en fase fluida pueden presentarse tanto por MHC-II maduras que reciclan de la membrana plasmática como por MHC-II de neosíntesis, que se localizan principalmente en los compartimientos MIIC. Por otra parte, los antígenos endocitados mediante la inmunoglobulina de superficie por linfocitos B, son presentados exclusivamente por MHC-II de neosíntesis²⁹⁷. Esto sugiere que, dependiendo de su interacción con un receptor, el antígeno es transportado a distintos compartimientos endocíticos. El tráfico dirigido por el receptor puede llevar el antígeno a vesículas endosómicas con distintos contenidos de hidrolasas. Así, se ha comparado la presentación del antígeno LG, adquirido por pinocitosis en fase fluida o por endocitosis mediada por receptores en linfocitos B. A partir de la primera, los determinantes 34-45 y 25-43 son presentados por moléculas clase II maduras, indicando que estos determinantes pueden generarse en endosomas tempranos. Sin embargo, si el antígeno se adquiere por endocitosis mediada por la inmunoglobulina de superficie, los mismos determinantes se presentan por moléculas clase II de neosíntesis, lo que indica que el antígeno adquirido por esta segunda vía llega directamente a endosomas tardíos²⁹⁷. El determinante 46-61 de LG es presentado en ambos casos por moléculas clase II de neosíntesis. La

explicación más probable es que para la generación de este determinante el antígeno tiene que ser transportado a endosomas tardíos relacionados con MIIC. Aparentemente, este transporte es favorecido por el entrecruzamiento de la inmunoglobulina de superficie ²⁹⁸. De acuerdo con lo anterior, los trabajos del grupo de Mellman y colaboradores demostraron que el receptor de linfocitos B es capaz de dirigir el antígeno a endosomas intermedios (CIIV) y a compartimientos MIIC. Por otra parte, los trabajos de otros dos grupos independientes demostraron que las regiones citoplásmicas de las inmunoglobulinas de membrana son importantes en el tráfico de complejos antígeno-anticuerpo a los endosomas especializados ^{299, 300, 301}. Además de su localización, la internalización del antígeno mediante la inmunoglobulina de superficie promueve la acumulación de MHC-II en los compartimientos endocíticos ³⁰². Esto sugiere que, además de la señal de tráfico dependiente del receptor, después de la interacción de éste con el antígeno, se pueden asociar otras moléculas que desencadenan cascadas de señalización.

Recientemente se han extendido los estudios que sugieren que los sitios a los cuales se dirige un antígeno después de ser internalizado pueden variar dependiendo de su interacción con un receptor ^{303, 304}. El mismo grupo de Mellman y colaboradores, utilizando células que expresan distintos receptores Fc para la IgG, demostraron diferencias en la presentación de distintos determinantes dependiendo del tipo de receptor utilizado ³⁰³. En estos trabajos, las células que expresan el receptor Fc γ RII solo generan ciertos determinantes de los antígenos LG y represor λ . Por otra parte las células que expresan el receptor Fc γ RIII generan todos los determinantes estudiados de estos mismos antígenos ³⁰⁴. En ese mismo trabajo se demostró que el receptor Fc γ RIII recluta la proteína SYK, lo cual está relacionado con su habilidad para presentar un mayor número de determinantes antigénicos. Esto sugiere nuevamente que, además de las señales de tráfico en el receptor, la capacidad de reclutar otras proteínas implicadas en la señalización intracelular aumenta la eficiencia de presentación de algunos determinantes por ciertos receptores.

Lo anterior demuestra que, dependiendo de la vía de endocitosis o del receptor responsable de la internalización del antígeno, en el procesamiento y presentación de antígenos exógenos por MHC-II pueden participar distintos compartimientos endocíticos. Además, de acuerdo a dichos estudios, la presentación de antígenos exógenos mediada por la interacción con diversos receptores puede ser muy eficiente debido a su capacidad de llevar el antígeno a los sitios especializados de procesamiento y unión a MHC-II.

7.- Presentación de antígenos endógenos por moléculas clase II.

Las evidencias descritas sugieren que el transporte de los antígenos a los compartimientos especializados de la vía endocítica es crucial para su presentación por moléculas MHC-II. De acuerdo con esto, para que un antígeno sintetizado en el interior de la célula tenga la posibilidad de presentarse por MHC-II sería necesario su transporte a los compartimientos endocíticos para ser procesado y para que los péptidos generados se encuentren con las moléculas clase II libres de CLIP. Apoyando lo anterior, una gran proporción de los péptidos presentados por MHC-II corresponden a proteínas, que siendo sintetizadas en el interior de la célula están dirigidas a o son residentes de los compartimientos endocíticos ^{24,48}. Un 80% de los péptidos eluidos de MHC-II de distintos haplotipos corresponden a proteínas relacionadas con las propias moléculas del MHC (50%) y el otro 30% corresponde a otras proteínas de membrana y de secreción. Sin embargo, una proporción mucho menor pero importante de los péptidos presentados por MHC-II, aproximadamente el 5%, se deriva de antígenos con localizaciones distintas a la vía endocítica. Este último punto, así como requerimientos particulares para la presentación de los diferentes antígenos endógenos por MHC-II, sugieren que, por lo menos algunos de estos antígenos, podrían ser procesados en otros sitios en la célula.

La presentación de antígenos endógenos por MHC-II se ha estudiado en diversos modelos experimentales. De acuerdo a su comportamiento, estos

antígenos pueden dividirse en tres grupos fundamentales: 1. Antígenos de membrana y de secreción. 2. Antígenos retenidos en el RE 3. Antígenos citosólicos. El primer grupo corresponde a proteínas de la vía exocítica que pueden tener acceso a vesículas endocíticas, el segundo grupo corresponde a antígenos de la vía exocítica teóricamente sin acceso a la vía endocítica y el último a proteínas que en condiciones normales aparentemente no tienen acceso a esta vía.

a) Presentación de antígenos de membrana y de secreción.

Como se ha mencionado, las proteínas de este grupo son presentadas de manera muy eficiente por MHC-II. A pesar de ser sintetizadas en el interior de la célula, estas proteínas podrían considerarse como exógenas, ya que pueden llegar a la superficie celular y/o al medio extracelular para posteriormente ser internalizadas por las vías de endocitosis descritas para los antígenos exógenos. Esto correlaciona con la alta eficiencia y frecuencia con la que este tipo de proteínas se presentan por MHC-II³⁰⁵. Sin embargo, es importante mencionar que el procesamiento de este tipo de antígenos, en los distintos modelos experimentales, es a partir del antígeno que permanece dentro de la célula y no es debido a exocitosis e internalización del antígeno. En algunos sistemas experimentales se ha demostrado que la eficiencia de presentación de este tipo de antígenos es mayor cuando se compara con la presentación del mismo antígeno adicionado al medio (antígeno exógeno). Además, hay diferencias en los determinantes generados a partir de formas de membrana y de secreción sintetizadas en el interior de la célula y los determinantes derivados del mismo antígeno adicionado al medio, sugiriendo también distintos sitios de procesamiento³⁰⁶. Este hallazgo no es sorprendente considerando la gran diversidad de proteasas presentes en las distintas vesículas y compartimientos dentro de la vía endocítica, a los que puede dirigirse un antígeno dependiendo de las señales de tráfico en su secuencia.

Los mecanismos de presentación de distintas proteínas de membrana que se presentan por MHC-II han sido estudiados ampliamente. Entre las proteínas mejor estudiadas están la hemaglutinina y la neuraminidasa del virus de la influenza (HA), las moléculas clase I del MHC, la $\beta 2M$, las cadenas ligeras de inmunoglobulinas y la proteína de envoltura del VIH ³⁰⁷⁻³¹⁰. Los estudios realizados con esta última han demostrado la importancia que tiene una secuencia de anclaje a membrana en esta proteína para sea presentada eficientemente por MHC-II ³¹⁰. Estos estudios demuestran también la importancia de que una proteína sea trasladada al interior del RE para que se presente eficientemente por MHC-II. Además, dos requisitos son importantes para la presentación de estas proteínas por MHC-II: su salida del RE y su expresión en la membrana plasmática. La presentación de péptidos derivados de proteínas de la envoltura de VIH es amplificada por su asociación con LAMP 1, proteína residente de los endosomas tardíos ³¹¹. Lo anterior sugiere que para la presentación de proteínas de membrana por MHC-II es importante su expresión en la membrana plasmática y su internalización a compartimientos endocíticos. De acuerdo con esto, existen diversos reportes que demuestran que la presentación de proteínas de membrana por MHC-II es favorecida considerablemente por ligandos que favorecen la internalización de las proteínas ³¹².

Otros estudios han demostrado la presentación, por MHC-II, de péptidos derivados de antígenos de membrana que no se expresan en la membrana plasmática. Por ejemplo, las moléculas MHC-I no necesitan ser expresadas en la membrana plasmática para presentarse por MHC-II ³⁰⁸. Lo anterior ocurre también en la presentación de cadenas ligeras de inmunoglobulinas por MHC-II y con la hemaglutinina de influenza sin secuencia transmembranal ^{304,309}. En el último caso, se ha sugerido que la proteína llega a la vía endocítica, debido a que es sensible a cloroquina.

A diferencia de lo anterior, la presentación por MHC-II de otras proteínas con secuencia transmembranal que tampoco se expresan en la membrana plasmática, ocurre sin la participación de compartimientos endocíticos. Por ejemplo, los estudios realizados con las moléculas clase I H-2L^d y HLA-B7

demuestran que la presentación de determinantes derivados de ellas por MHC-II es independiente de la actividad de proteasas ácidas ³⁰⁸. Se ha sugerido que estos antígenos podrían ser procesados en compartimientos exocíticos tempranos. Finalmente, diversos trabajos, tanto *in vitro*, como en ratones deficientes en cadena Ii demuestran que algunas proteínas de membrana pueden presentarse mejor en ausencia de cadena Ii sugiriendo nuevamente la participación de compartimientos exocíticos tempranos en el procesamiento y unión de péptidos a MHC-II ³⁰⁶.

La presentación de proteínas de secreción por MHC-II, como se mencionó, es independiente de exocitosis e internalización de la proteína. Algunos trabajos sugieren que a mayor secreción de la proteína, menor posibilidad de presentación por MHC-II. La eficiencia de presentación de proteínas de secreción por MHC-II es generalmente menor que la presentación de la misma proteína con una secuencia de anclaje a membrana, lo que sugiere que la permanencia de una proteína dentro de la célula favorece su presentación por MHC-II.

Debido a que la presentación de las proteínas de secreción es esencialmente a partir de la poza intracelular de la proteína, se ha sugerido la existencia de una ruta intracelular de transporte directa a la vía endocítica desde el TGN, posiblemente como parte del control de calidad para capturar proteínas mal conformadas. Por otro lado, algunos estudios sugieren la participación de compartimientos exocíticos tempranos en el procesamiento y presentación de este tipo de proteínas ³¹³.

La llegada a la vía endocítica, de proteínas de secreción modificadas ya sea por la adición de secuencias de tráfico a compartimientos endocíticos en la propia proteína o mediante fusión con otras proteínas, aumenta considerablemente su presentación por MHC-II. Esto que sugiere, que la vía endocítica es la ruta más importante de presentación de estos antígenos por MHC-II. Esto ha sido demostrado para los antígenos LG y ovoalbumina (OVA) fusionados con la cadena invariante ^{314,315}.

Los estudios descritos hasta aquí sugieren que, en algunos casos, tanto los antígenos de membrana como los de secreción, intersectan con los compartimientos de la vía endocítica para ser procesados y presentados por MHC-II. Sin embargo, en ambos casos, hay evidencias experimentales que sugieren la posible existencia de otras vías de procesamiento, aún no caracterizadas.

b) Presentación de antígenos retenidos en el RE.

La presentación de este tipo de antígenos por moléculas clase II es de especial interés por que son un ejemplo de antígenos endógenos que no tienen acceso directo a la vía endocítica y que podrían, por lo tanto, seguir una ruta de procesamiento y presentación diferente a los antígenos que se presentan normalmente en el contexto de moléculas clase II.

Diversos trabajos han demostrado que la entrada de las proteínas al RE es indispensable para su presentación por moléculas clase II ^{310,316}. Por otra parte en distintos modelos se ha sugerido la participación del RE en el procesamiento y unión de péptidos a moléculas clase II ^{317,318}.

La presentación de antígenos potencialmente retenidos en el RE por moléculas clase II ha sido demostrada tanto por estudios de elución de péptidos asociados a estas moléculas así como en otros modelos experimentales ^{48,317,318}. Una gran parte de los estudios se han realizado por la adición de la secuencia KDEL en el extremo COOH-terminal de distintas proteínas ¹⁹².

Los estudios de presentación de la hemaglutinina de influenza con secuencia de retención en el RE por MHC-II, demostraron que la eficiencia de presentación de esta proteína está relacionada con su capacidad de salir del RE ³¹⁷. Aunque en dicho estudio se encontró que la proteína debe salir del RE para ser presentada eficientemente por MHC-II, no es indispensable su

llegada a las cisternas del Golgi, demostrada mediante resistencia a la enzima endoglicosidasa H, (endo-H). Por otra parte, cuando la misma proteína es totalmente retenida en el RE, esta se degrada rápidamente y la presentación de péptidos derivados de esta por MHC-II es muy ineficiente. Esto sugiere que las proteínas con señales de retención en el RE deben salir de este compartimiento a algún sitio distinto del Golgi para ser presentados por MHC-II.

Por otra parte, algunos trabajos han sugerido que el transporte fuera del RE no es necesario para que los antígenos retenidos en este compartimiento sean presentados por MHC-II. De esta manera, algunos trabajos sugieren que los antígenos retenidos en el RE pueden ser degradados en este sitio por proteasas que a la fecha no han podido ser caracterizadas ³¹⁹. Además, tomando en cuenta que el RE es el sitio de ensamble de MHC-II, se ha sugerido que los péptidos presentes en el RE podrían competir con la cadena invariante y unirse a las moléculas clase II en este mismo sitio ⁶⁴. Los estudios realizados con cadenas ligeras de inmunoglobulina con la secuencia de retención KDEL han sugerido que, tanto la generación de péptidos derivados de esta proteína, como su unión a MHC-II ocurre en el RE ³⁰⁹. En este mismo contexto, los trabajos del grupo de Parham y colaboradores demostraron que la presentación de por MHC-II de péptidos derivados de la molécula clase I HLA-B27 retenida en el RE, es resistente a cloroquina, sugiriendo una vía de presentación independiente de vesículas ácidas ³⁰⁸.

En estudios realizados con fibroblastos transfectados con HLA-DR e infectados con el virus de influenza, se demostró que la cadena Ii inhibe la presentación de péptidos derivados de la proteína M1 de influenza, sugiriendo nuevamente la participación del RE en la presentación de antígenos endógenos por MHC-II en células que no expresan cadena Ii ³²⁰. Apoyando lo anterior, los trabajos del grupo de Hide Ploegh en un sistema de traducción *in vitro* para ensamblar cadenas α y β de MHC-II y la cadena Ii, observaron que las cadenas $\alpha\beta$ intermedias en el ensamble son capaces de unir péptidos. Estos trabajos, además de otros, sugieren la posibilidad de

que el RE fuera un sitio de generación y unión de péptidos derivados de ciertos antígenos endógenos que son presentados por MHC-II. Sin embargo, en 1994 el grupo de Neefjes y colaboradores estudiaron el ensamble *in vivo* de las moléculas clase II y no pudieron encontrar la presencia de formas intermedias de cadenas $\alpha\beta$ clase II, lo que hace poco probable la unión de péptidos a MHC-II en el RE ⁵⁷. En apoyo a lo anterior, Hammerling y colaboradores utilizando células sin cadena invariante observaron que la unión de péptidos en el RE a partir de péptidos cortos es ineficiente ³²¹. Este último punto también es apoyado por otros trabajos ³²².

Finalmente, algunas proteínas completas podrían competir con la cadena Ii y asociarse con las moléculas clase II en el RE. De esta manera dichas proteínas asociadas MHC-II serían transportadas a la vía endocítica para ser procesadas y para unirse con las moléculas clase II ³²³. Ante la ausencia de evidencias adicionales, esto podría considerarse como una excepción.

Tomando en cuenta lo descrito se propone que para algunas proteínas potencialmente retenidas en el RE, es importante su salida de este compartimiento para ser presentadas por MHC-II. Así, aún cuando hay evidencias de que el RE podría ser un sitio de generación y de unión de péptidos a moléculas clase II, a la fecha el mecanismo por el que estos antígenos son presentados por moléculas clase II es aún motivo de controversia.

c) Presentación de antígenos citosólicos.

Como se puede observar en los estudios de elución de los péptidos unidos MHC-II, los antígenos citosólicos son los menos frecuentes ⁴⁸. Además, la presentación de este tipo de antígenos por MHC-II es ineficiente cuando se compara con la presentación de antígenos exógenos o de antígenos endógenos de la vía exocítica ³²⁴. A pesar de que los antígenos citosólicos son presentados eficientemente sólo por MHC-I, existen múltiples evidencias de su presentación por MHC-II ³²⁵.

La mayoría de estudios de presentación de antígenos citosólicos por MHC-II han sido realizados por el grupo de Eric Long. En 1988, con fibroblastos doblemente transfectados con HLA-DR y con proteínas citosólicas de nucleocápside o de matriz de sarampión, se demostró la presentación de péptidos derivados de estas proteínas por MHC-II con la misma eficiencia que linfocitos B infectados con el virus de sarampión ³²⁶. En 1990, los mismos autores demostraron la presentación, por MHC-I y MHC-II, de péptidos derivados de la proteína citosólica M1 del virus de influenza, utilizando linfocitos B humanos infectados con virus recombinante de vaccinia ³²⁷. Sin embargo, al igual que en otros estudios, la presentación por MHC-II fue menos eficiente que por MHC-I. Por otra parte, la presentación de péptidos derivados de la proteína M1 de influenza por MHC-II fue inhibida por cloroquina y débilmente por BFA, a diferencia de la presentación por moléculas clase I que no fue inhibida por cloroquina y sí por BFA. Lo anterior sugiere fuertemente los antígenos citosólicos presentados por MHC-II son procesados en una vía diferente que cuando son presentados por MHC-I y sugieren, además, que en la vía de presentación de antígenos citosólicos por moléculas clase II intervienen proteasas ácidas.

En 1992, este mismo grupo, pero ahora con una forma citosólica de la proteína H3 de hemaglutinina de influenza en el virus de vaccinia (Vac-cyto-H3) demostró, utilizando como CPA una célula deficiente en TAP1, que la presentación de esta proteína por MHC-II fue independiente de TAP1, sugiriendo nuevamente que la presentación de antígenos citosólicos por MHC-II es diferente a la presentación de este tipo de antígenos por MHC-I ³²⁸. En el mismo estudio se observó que la presentación de un epítipo de H3 expresado como un mini gen en el citosol fue presentado por moléculas clase II de manera dependiente de TAP 1. Posteriormente, este mismo grupo demostró la inhibición de la presentación de este epítipo citosólico por la cadena II ³²⁹. Esto sugiere la posible unión de péptidos citosólicos cortos a MHC-II en el RE. En 1993, en células transfectadas con HLA-DR con una mutación que abarca toda la región clase II, se encontró que la proteína de

matriz de influenza podía ser presentada por MHC-II, independientemente de TAP1 y TAP2 y de LMP2 y LMP7, pero demostraron la necesidad de un gen codificado dentro de la región clase II del MHC (presumiblemente DM)³³⁰. Estos resultados reafirman el concepto de que la presentación de antígenos citosólicos por moléculas clase II es por una vía distinta a la de la presentación de estos antígenos por moléculas clase I.

En 1996, nuevamente el grupo de Long y colaboradores, utilizando linfocitos B como CPA con la proteína M1 de matriz de influenza, demostraron que las proteínas degradadas rápidamente por los proteasomas, por la adición de una secuencia de ubiquitinación, no se presentan por MHC-II³³¹. Sin embargo, la misma proteína sin señal de degradación, que tiene una vida media larga, (mas de 5 horas) es capaz de generar péptidos presentados por MHC-II. Este estudio sugiere que los péptidos generados por proteasomas en el citosol no tienen acceso a la vía de presentación por MHC-II. Sin embargo, demuestran que una proteína de vida media larga puede generar péptidos que se presentan por MHC-II. En conjunto, los resultados derivados de los estudios de este grupo sugieren que la presentación de antígenos citosólicos por MHC-II es dependiente del transporte del antígeno a compartimientos endocíticos para su procesamiento y unión a MHC-II, posiblemente por algún mecanismo relacionado con la autofagia.

Por otra parte, otros estudios proponen que la presentación de antígenos citosólicos por MHC-II no ocurre en condiciones normales. Así los estudios realizados por Hengartner y colaboradores, utilizando células de bazo como CPA y el virus de coriomeningitis linfocítica que es un virus no citopático, a diferencia de vaccinia, influenza y sarampión utilizados en los otros trabajos, no pudieron demostrar la presentación por MHC-II de péptidos derivados de la nucleoproteína localizada en el citosol³³².

Los resultados descritos sugieren que los antígenos citosólicos que se presentan por MHC-II son transportados a compartimientos endocíticos. Sin embargo, considerando la baja eficiencia de esta vía, además de que la

presentación de antígenos citosólicos no ha sido observada en todos los sistemas estudiados, aún existe controversia acerca del mecanismo que siguen estos antígenos para presentarse por MHC- II.

d) Estudios de presentación de antígeno con formas endógenas de lisozima de gallina (LG).

En diversos estudios realizados *in vitro*, se han utilizado formas endógenas de la proteína lisozima de gallina (LG) para determinar los mecanismos que participan en el procesamiento y presentación de antígenos endógenos por MHC-II.

En 1991, el grupo de Brooks y colaboradores, demostraron la presentación de epítomos derivados de formas endógenas de LG a hibridomas T restringidos por clase II. En este trabajo, con linfomas B murinos transfectados con LG de secreción, LG transmembranal y LG con señal de retención en el RE, se demostró la presentación de péptidos derivados de este antígeno por MHC-II³³³. En estos y en otros estudios se demostró que la eficiencia de generación de los péptidos esta en relación con la señal de tráfico intracelular del antígeno. De esta manera, la CPA que expresa LG transmembranal es la más eficiente en activar hibridomas T restringidos por MHC-II. La segunda CPA con mayor capacidad para activar a los linfocitos T es la que expresa la LG de secreción y la CPA que expresa LG con señal de retención en el RE es la menos eficiente es activar a los linfocitos T.

Calin-Laurens y colaboradores, con fibroblastos como CPA, confirmaron la presentación con alta eficiencia de péptidos derivados de LG endógena de secreción tanto por MHC-I, como por MHC-II³³⁴. En este mismo trabajo una forma citosólica de LG de vida media corta (menor de 5 min) sólo pudo ser presentada por MHC-I y no por MHC-II. En 1993 nuevamente Brooks y McCluskey, utilizando células B con LG retenida en el RE y LG sin secuencia señal (citosólica) e hibridomas que reconocen distintos epítomos de LG, demostraron la presentación del epítomo inmunodominante de LG 34-45 por

ambas transfectantes. Sin embargo, la presentación de otros determinantes reconocidos por hibridomas T menos sensibles o que reconocen otros determinantes no fue detectada ³³⁵. Estos estudios sugieren que tanto la LG retenida en el RE como la de citosol se presentan ineficientemente por MHC-II. Apoyando lo anterior, en este mismo estudio se demostró que para la presentación de la LG citosólica se requiere de alta expresión del antígeno, lo que depende del promotor utilizado para su expresión. Finalmente en dicho estudio se demostró que la presentación de péptidos derivados de LG con señal de retención en el RE y de LG citoplásmica LG es sensible a cloroquina y cloruro de amonio. En 1993 los estudios realizados por Bertolino y colaboradores, utilizando fibroblastos deficientes en cadena invariante, demostraron que, al igual que la LG exógena, la presentación de LG de secreción, LG retenida en el RE y LG citosólica es dependiente de la presencia de la cadena invariante y, además, confirmaron la sensibilidad de la presentación de determinantes derivados de estos antígenos a cloroquina como evidencia de la participación de compartimientos endocíticos en el procesamiento y presentación de estos antígenos ³³⁶.

Estudios realizados en ese mismo año por Adorini y colaboradores, con células B transfectadas con LG de secreción o retenida en el RE, observaron que la LG de secreción es capaz de generar un patrón de péptidos muy similar al de LG exógena pero la forma retenida en el RE es incapaz de generar el epítipo 112-124. Por otro lado la generación de ciertos péptidos fue inhibida por leupeptina sugiriendo nuevamente procesamiento endosómico ³³⁷. Finalmente en 1997 los estudios de Parra-López y colaboradores demuestran, al igual que para otros antígenos, que la eficiencia de presentación de LG endógena por MHC-II es aumentada por la fusión de la LG con proteínas que tienen señales de tráfico que las dirigen a la vía endocítica ³³⁸. En estos trabajos se sugieren rutas alternas de procesamiento de antígeno dependiendo de la ruta de entrada a la vía endocítica. Es importante recalcar que en todos estos trabajos el procesamiento de las formas endógenas del antígeno no es debido a liberación y endocitosis de antígeno.

En 1991, los estudios de Moreno y colaboradores, con fibroblastos de rata y un linfoma B murino que expresan una forma transmembranal de LG que codifica los aminoácidos 1-80, se demostró que, en los fibroblastos, el epítipo 25-43 no puede ser generado a partir de formas exógenas pero si de formas endógenas de la proteína, sugiriendo distintos sitios de generación de péptidos derivados de antígenos endógenos ³³⁹. Finalmente, en un estudio realizado en nuestro laboratorio, se observo inhibición por cloroquina en la presentación de formas endógenas de LG, pero se observó que esta inhibición es dependiente del epítipo y de la sensibilidad de hibridoma utilizado en el estudio ³⁴⁰.

En conclusión, al igual que los estudios con otros antígenos, los estudios realizados con formas endógenas de LG demuestran la participación de compartimientos endocíticos en el procesamiento de antígenos endógenos por MHC-II. Sin embargo, tanto la generación de distintos determinantes como la eficiencia de presentación dependiendo de la localización del antígeno sugieren la existencia de otras vías de procesamiento sobre todo para antígenos que no tienen acceso a compartimientos endocíticos.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

¿Existe una vía diferente para que los antígenos endógenos que no tienen acceso directo a la vía endocítica sean presentados por moléculas clase II del MHC?

De ser así ¿Cuál es la vía que siguen los antígenos endógenos que no tienen acceso directo a la vía endocítica para ser presentados por moléculas clase II del MHC?

En 1991, los estudios de Moreno y colaboradores, con fibroblastos de rata y un linfoma B murino que expresan una forma transmembranal de LG que codifica los aminoácidos 1-80, se demostró que, en los fibroblastos, el epítipo 25-43 no puede ser generado a partir de formas exógenas pero si de formas endógenas de la proteína, sugiriendo distintos sitios de generación de péptidos derivados de antígenos endógenos ³³⁹. Finalmente, en un estudio realizado en nuestro laboratorio, se observo inhibición por cloroquina en la presentación de formas endógenas de LG, pero se observó que esta inhibición es dependiente del epítipo y de la sensibilidad de hibridoma utilizado en el estudio ³⁴⁰.

En conclusión, al igual que los estudios con otros antígenos, los estudios realizados con formas endógenas de LG demuestran la participación de compartimientos endocíticos en el procesamiento de antígenos endógenos por MHC-II. Sin embargo, tanto la generación de distintos determinantes como la eficiencia de presentación dependiendo de la localización del antígeno sugieren la existencia de otras vías de procesamiento sobre todo para antígenos que no tienen acceso a compartimientos endocíticos.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

¿Existe una vía diferente para que los antígenos endógenos que no tienen acceso directo a la vía endocítica sean presentados por moléculas clase II del MHC?

De ser así ¿Cuál es la vía que siguen los antígenos endógenos que no tienen acceso directo a la vía endocítica para ser presentados por moléculas clase II del MHC?

HIPOTESIS

1. Existen diferencias en los determinantes generados a partir de un antígeno sintetizado en el interior de la célula y en los derivados del mismo antígeno internalizado por pinocitosis en fase fluida.
2. Los antígenos endógenos de la vía exocítica son degradados en compartimientos tempranos de esta vía y se unen a las moléculas clase II en este mismo tipo de compartimientos.
3. Los antígenos endógenos de la vía exocítica pueden ser degradados por proteasomas para posteriormente ser presentados por moléculas clase II del MHC.
4. Alternativamente, los antígenos endógenos de la vía exocítica son transportados a la vía endocítica para ser procesados y presentados por moléculas clase II del MHC.

OBJETIVOS

1. Determinar si existen diferencias entre los determinantes generados a partir de antígenos sintetizados en el interior de la célula y determinantes derivados del mismo antígeno, internalizado por pinocitosis en fase fluida.
2. Estudiar la participación de compartimientos tempranos de la vía exocítica en el procesamiento de antígenos que ingresan a esta vía y en la unión de péptidos derivados de estos antígenos para su presentación por moléculas clase II del MHC.
3. Determinar si los proteosomas participan en el procesamiento de antígenos endógenos de la vía exocítica para su presentación por moléculas clase II del MHC.

HIPOTESIS

1. Existen diferencias en los determinantes generados a partir de un antígeno sintetizado en el interior de la célula y en los derivados del mismo antígeno internalizado por pinocitosis en fase fluida.
2. Los antígenos endógenos de la vía exocítica son degradados en compartimientos tempranos de esta vía y se unen a las moléculas clase II en este mismo tipo de compartimientos.
3. Los antígenos endógenos de la vía exocítica pueden ser degradados por proteasomas para posteriormente ser presentados por moléculas clase II del MHC.
4. Alternativamente, los antígenos endógenos de la vía exocítica son transportados a la vía endocítica para ser procesados y presentados por moléculas clase II del MHC.

OBJETIVOS

1. Determinar si existen diferencias entre los determinantes generados a partir de antígenos sintetizados en el interior de la célula y determinantes derivados del mismo antígeno, internalizado por pinocitosis en fase fluida.
2. Estudiar la participación de compartimientos tempranos de la vía exocítica en el procesamiento de antígenos que ingresan a esta vía y en la unión de péptidos derivados de estos antígenos para su presentación por moléculas clase II del MHC.
3. Determinar si los proteosomas participan en el procesamiento de antígenos endógenos de la vía exocítica para su presentación por moléculas clase II del MHC.

4. Determinar si los antígenos endógenos de la vía exocítica son transportados a partir del TGN a compartimientos endocíticos para ser procesados y presentados por moléculas clase II del MHC.

MODELO EXPERIMENTAL

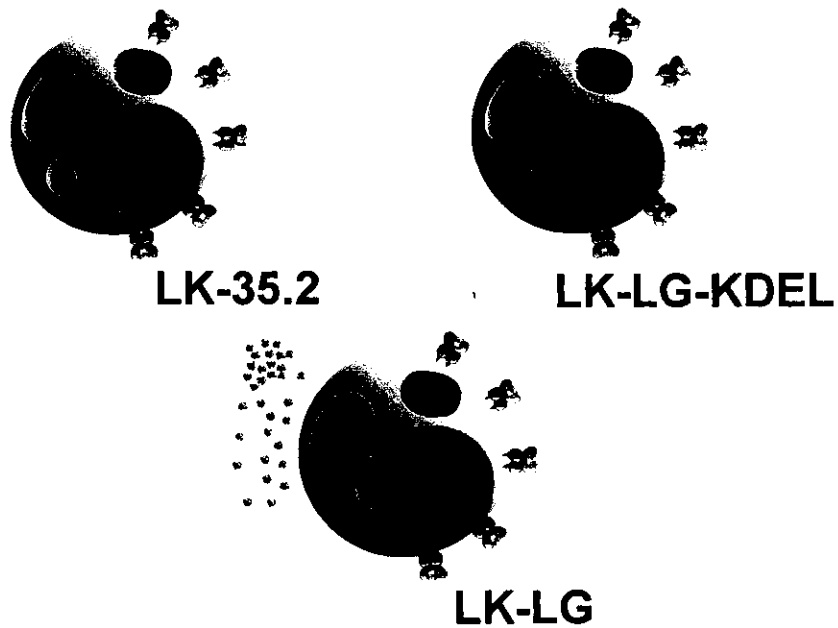


Figura 3. Representación esquemática de la distribución intracelular de las distintas formas de lisozima (LG) en las CPA utilizadas en estos estudios. La localización del antígeno es ejemplificada en rojo. LK35.2 (células sin LG) LK-LG-KDEL (LG retenida en RE) LK-LG (LG en la vía de secreción y en el medio extracelular).

4. Determinar si los antígenos endógenos de la vía exocítica son transportados a partir del TGN a compartimientos endocíticos para ser procesados y presentados por moléculas clase II del MHC.

MODELO EXPERIMENTAL

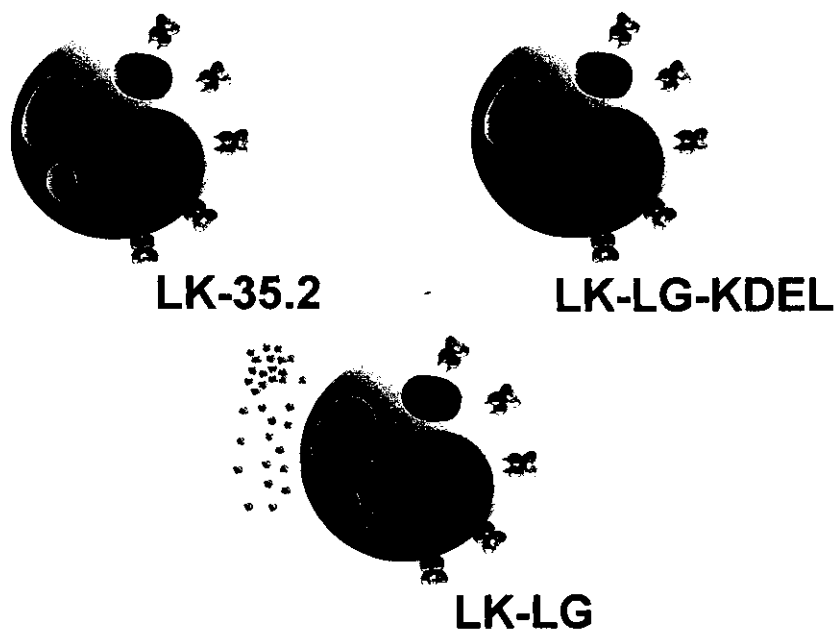


Figura 3. Representación esquemática de la distribución intracelular de las distintas formas de lisozima (LG) en las CPA utilizadas en estos estudios. La localización del antígeno es ejemplificada en rojo. LK35.2 (células sin LG) LK-LG-KDEL (LG retenida en RE) LK-LG (LG en la vía de secreción y en el medio extracelular).

MATERIALES Y METODOS

Reactivos. La LG utilizada fue de Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, EU), el medio de cultivo fue RPMI-1640 (GIBCO, Gaithersburg, MD, EU) suplementado con HEPES 25 mM, Glutamina 2 mM, piruvato de sodio, ciprofloxacina 10 μ g/ml. y suero fetal bovino (Hy-Clone, SALT Lake City, UT, EU) al 10% (medio completo). Los inhibidores de proteasas fueron leupeptina, E-64, aprotinina, PMSF, pepstatina A, 1,10-fenantrolina y LLnL, todos obtenidos de Sigma. Se utilizó, además, brefeldina A (obsequio de Luciano Adorini, Roche Milano, Italia), Lactacistina (David Corey Universidad de Harvard), cloroquina y monensina, ambas de Sigma. La enzima endoglucosidasa H (endoH) se obtuvo de United States Biochemical, sepharosa 4B-Proteína G, y Sepharosa 4B-Proteína A de Pharmacia.

Anticuerpos. El anticuerpo monoclonal (mAb) H116-32 (IgG2b anti-IA β^k , ³⁴¹) fue obtenido del hibridoma del mismo nombre (obsequio del Dr. Günter Hämmerling, DKFZ, Heidelberg, Alemania). Este anticuerpo se purificó utilizando una columna de Sepharosa 4B-proteína A. El anticuerpo monoclonal 2XF8 (IgG1 anti lisozima de gallina) se obtuvo en nuestro laboratorio y se utilizó como líquido de ascitis. Los anticuerpos IgG1 anti LG D1115 y F1066 se obtuvieron de los hibridomas del mismo nombre y fueron obsequio del Dr. Roy Mariuza ³⁴². (Frederick, MD) Estos anticuerpos se purificaron en columnas de Sepharosa 4B-proteína G. El anticuerpo IgG2b de rata C4H3, que reconoce la molécula clase II IA k con un péptido relacionado con el determinante 52-61 unido, fue obsequio del Dr. Ronald N. Germain (NIH) este anticuerpo fue utilizado como sobrenadante de cultivo ³⁴³.

Líneas celulares. Como CPA se utilizó el hibridoma murino LK-35.2 (H-2 $^{k.d.}$) ³⁴⁴. Se utilizaron además, células LK35.2 transfectadas con diferentes formas de LG. La línea LK-LG que está transfectada con un plásmido que contiene el DNA complementario (cDNA) de LG soluble (secreción) y la línea LK-

LG-KDEL que está transfectada con un plásmido que contiene el cDNA de LG que en su extremo 5' (carboxilo terminal) tiene los nucleótidos que codifican para el tetrapéptido KDEL (lys-asp-glu-leu) que aporta una señal de retención en RE las célula ³³⁷. Estas células fueron donadas por el Dr. Frank Momburg (DKFZ, Heidelberg, Alemania). Se utilizó también la línea CTLL-2 dependiente de IL-2 (ATCC ²⁰⁸). Se utilizaron, además, distintos hibridomas anti-LG restringidos por IA^k. Los hibridomas C10 y A2.2B2 que reconocen el determinante 48-62 y el hibridoma A6B3 que reconoce el determinante 34-45 fueron donados por la Dra. Laurie Glimcher (Harvard University, ³⁴⁵); el hibridoma E907, que reconoce el determinante 33-47 fue generado por el Dr. José Moreno ³⁴⁶. los hibridomas 2B6.3 que reconocen los determinante 25-43 y el hibridoma 2D4.1 que reconoce el determinante 114-129 fueron donados por el Dr. Luciano Adorini (Roche Milán, Italia, ³⁴⁷). Todas las líneas celulares se mantuvieron en cultivo a 37°C en atmósfera de 5% CO₂ y 90% de humedad en medio completo, en botellas de cultivo.

Inmunoprecipitación. Se utilizó el método descrito por Laemli³⁴⁸ con algunas modificaciones. Las células LK-35.2 fueron cultivadas en condiciones variables (ver sección de resultados), después de lo cual se lavaron e incubaron en RPMI-1640 sin metionina durante 10 a 20 min en presencia de 200 µCi de metionina marcada con ³⁵S. Al final de la incubación, las células se lavaron extensamente y se lisaron en una solución a base de Nonidet P40 (NP40) 1%, tris 0.05 M pH 7.5, EDTA, NaCl 0.15 M y un cocktail de inhibidores de proteasas (leupeptina 25µg/ml, E-64 10µg, aprotinina 2µg/ml, PMSF 10mM, pepstatina A 0.1ng/ml y 1,10-fenantrolina 10mM). Para los experimentos de pulso y seguimiento, antes de lisar, se lavaron las CPA y se añadió metionina fría (10 veces en exceso) y se cultivaron así durante períodos variables hasta que se lavaron y se lisaron como se describió arriba. Los lisados se centrifugaron a 13,000 rpm, se desechó el botón de núcleos y se colectó el sobrenadante. Para determinar la cantidad de radiactividad en los sobrenadantes, se tomaron 10µl que se mezclaron con liquido de centelleo y se leyeron en un contador beta. Basándose en esta medida, se preadsorbieron cantidades equivalentes de radiactividad de cada

sobrenadante con proteína G, proteína G y un anticuerpo irrelevante del mismo isotipo que los anticuerpos anti-LG o anti-MHC-II, y finalmente los lisados se mezclaron con proteína G y los anticuerpos purificados anti LG (2XF8, D115 y F1066) o anti-IA^k (H116.32). Se incubaron a 4°C en agitación constante durante 12 horas. Después de este tiempo las esferas de proteína G se lavaron 5 veces con buffer de lavado (buffer de lisis sin inhibidores de proteasas y NP40 al 0.1%) y una vez más con buffer de tris 0.01 M, pH 7.4). A estas muestras se les agregó buffer de Laemli. Algunas muestras se trataron con endo-H durante 12 horas y después se corrieron en geles de poliacrilamida.

Electroforesis en geles de poliacrilamida en dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) Se utilizaron geles al 12 ó 15% poliacrilamida (Bio-Rad) y 4% SDS, que se corrieron bajo corriente constante de 10 mAmp en cámaras Bio-Rad. Al final del corrimiento, los geles se fijaron en buffer de metanol/acético, se sumergieron en solución amplificadora (Amplify, Amersham. Beckenham, UK), se secaron y se expusieron a película de rayos X, a -70°C durante uno a cuatro días para las autorradiografías. Para identificar el tamaño de las bandas, en forma simultánea, se corrieron indicadores de peso molecular marcados con ¹⁴C (Rainbow LMW, Amersham) en uno de los carriles.

Elución ácida de péptidos unidos a moléculas clase II. Para estos experimentos, se cultivaron 5×10^7 CPA a una densidad máxima de 5×10^3 /ml en botellas de cultivo en medio RPMI carente de 15 aminoácidos (ala, arg, asp, glu, gly, his, ile, leu, lys, phe, pro, ser, thr, tyr, val), que se sustituyeron con 5 mCi de los mismos 15 aminoácidos marcados con ³H. Estos experimentos se realizaron en ausencia o en presencia de 10 µg/ml de brefeldina A. Después de 10 horas en cultivo, las células se lisaron con buffer de lisis NP40 y se trataron de la misma forma que en los estudios de inmunoprecipitación hasta llegar a la adsorción a proteína A-Sepharosa 4B. El gel con las moléculas clase II unidas fue lavado exhaustivamente con buffer de lavado y después con 0.01 M tris pH 7.4. A continuación, se añadió una solución de ácido acético a una concentración final del 10%, las muestras

se calentaron a 95°C y se centrifugaron durante 20 min a 3000 g en tubos centrífuga con membrana con "cut-off" de 10 kDa. Las muestras fueron eluidas dos veces más con ácido acético al 10% y el material menor a 10 kDa recuperado debajo de la membrana se analizó por HPLC. Se cuantificaron tanto los materiales mayor y menor de 10 kDa y el primero se trató o no con la enzima endo-H y se analizó en geles de SDS-PAGE al 12%.

Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Esta se realizó en un cromatógrafo Waters con una bomba Waters 626 con líneas no metálicas (peek) y un controlador Waters 600S. Se utilizó una columna de fase reversa Waters Delta-Pak HPLC C18, con poro de 300 Å, de 2.0 x 150 mm. Se utilizó un gradiente continuo de 0% a 60% de solución B en 60 min en donde la solución A fue agua con 0.1% ácido trifluoroacético y la solución B acetonitrilo al 100 %. El líquido se pasó por un detector de arreglo de fotodiodos Waters 996 y se registró la absorbancia a 220 nm cada 2 seg. Se colectaron fracciones manualmente, cambiando los tubos cada dos minutos. El material colectado fue analizado en un contador de centelleo.

Estudios de presentación de antígeno. Se cultivaron 5×10^4 células de hibridomas de linfocitos T con las CPA en presencia o en ausencia de distintas concentraciones de LG exógena, o con CPA transfectadas con las distintas formas de LG endógena en placas de 96 pozos en triplicado, en un volumen final de 200 μ l. Después de 24 horas de cultivo se colectaron 100 μ l del sobrenadante, que se cultivaron por 36 horas más con 10^4 células CTLL-2. Durante las últimas 16 horas de cultivo se adicionó un 1 μ C por pozo de 3 H timidina. Las células se cosecharon en un cosechador semiautomático y la síntesis de DNA de las células CTLL-2 se determinó en un contador beta. En algunos experimentos, las distintas CPA fueron preincubadas en presencia o ausencia de los siguientes inhibidores de proteasas o transporte intracelular: LLnL (250 μ M), lactacistina (1 μ m), E64 (100 μ M), cloroquina (50 μ m) y monensina (2.5 μ M) durante 24 horas. Posteriormente, las distintas CPA se fijaron durante 30 segundos con 0.025% glutaraldehído, después de lo cual se

les adicionó glicina 0.2M y se lavaron extensamente antes del cultivo con los hibridomas correspondientes.

Citometría de flujo. Para estos experimentos, las distintas CPA que expresan LG endógena y las células LK35.2 previamente cultivadas con cantidades crecientes de LG desde 0.3 hasta 3 mg/ml durante 24 horas, se marcaron con el anticuerpo monoclonal de rata C4H3, que reconoce IA^k con péptidos relacionados al determinante 52-61 unidos. Este marcaje se reveló con un segundo anticuerpo de cabra anti-rata biotinilado, seguido de estreptavidina marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC). También se utilizó el anticuerpo anti IA^k H116.32 biotinilado, seguido de estreptavidina-FITC. Las tinciones se realizaron a 4°C en PBS con azida de sodio al 0.1% para prevenir "capping" y suero humano al 1% para bloquear receptores Fc. Como control, se utilizaron células LK35.2 sin antígeno y células incubadas con un anticuerpo irrelevante del mismo isotipo del anticuerpo C4H3. La fluorescencia de las células se evaluó por citometría de flujo en un FACSort (Becton Dickinson, San José, CA) utilizando el software Cell quest. En todos los experimentos, se excluyeron las células muertas por la adición de yoduro de propidio.

RESULTADOS

1. - Expresión de las diferentes formas de LG por células LK35.2. Inicialmente se evaluó el nivel de LG expresada en las distintas CPA. Para esto, se cultivaron 10^7 células, se marcaron metabólicamente con metionina ^{35}S durante 20 min, y se inmunoprecipitaron con una mezcla de anticuerpos anti LG (2XF8, D1115 y F1066) o anti-IA^k (H116.32). Los precipitados, obtenidos de cantidades equivalentes de radiactividad de cada lisado, fueron resuspendidos en buffer de Laemli y se corrieron en geles de poliacrilamida al 15%. Como se puede observar en la figura 4a, la expresión de LGKDEL es mayor que la de LGs. La densitometría muestra que la expresión de LGKDEL es 6 a 7 veces mayor que LGs (Fig. 4b).

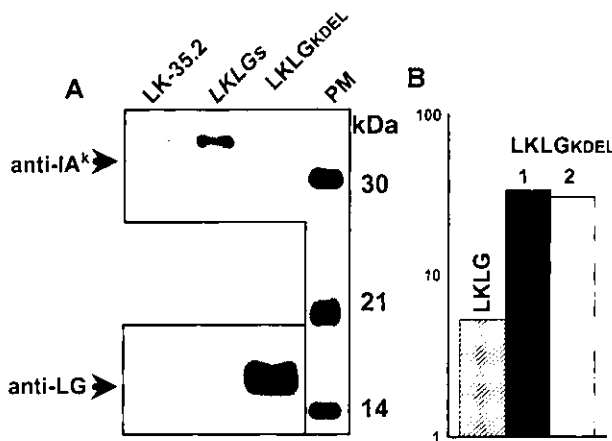


Figura 4a. Expresión de LG endógena por células LK35.2. Autorradiografía de un gel de PAGE-SDS al 15% con inmunoprecipitados de CPA que no expresan LG (LK35.2), que expresan LGs (LK-LGs) o LGKDEL (LK-LGKDEL) con una mezcla de anticuerpos anti-LG (2XF8, D1115 y F1066) o con el anticuerpo anti-IA^k (H116.32). La precipitación de LG e IA^k se llevó a cabo a partir de cantidades equivalentes de

radiactividad. 4b Densitometría obtenida en un experimento independiente que muestra la diferencia cuantitativa entre las dos formas de LG.

Por otra parte, en experimentos de marcaje y seguimiento, podemos observar en la Fig. 5 que la LGs sólo permanece dentro de la célula por 30 minutos, tiempo después del cual sólo se localiza en el sobrenadante de cultivo en ausencia de BFA, la cual impide su secreción. A tiempos tardíos de caza (24 y 48hr) se observan bandas de peso molecular mayor a 14kDa que podrían corresponder a la formación de agregados que se precipitan de con los anticuerpos utilizados. No se detectó LGKDEL en los sobrenadantes de cultivo de las células transfectadas con el gen que codifica esta proteína.

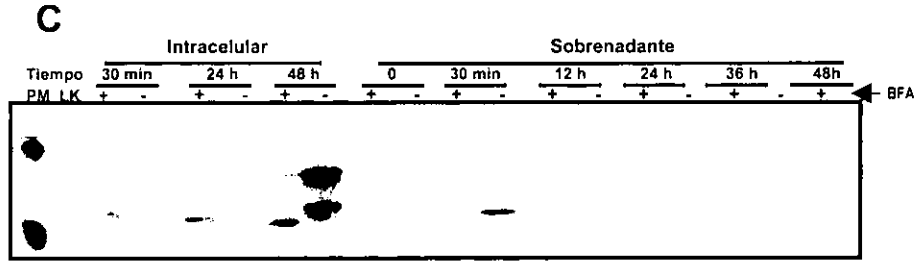


Figura 5. Permanencia de LGs en células LK-35.2. Autorradiografía de un gel de PAGE-SDS al 15% con inmunoprecipitados de LGs marcadas metabólicamente y cazadas a los tiempos indicados en ausencia (-) o en presencia (+) de BFA con una mezcla de anticuerpos anti-LG FA. Los inmunoprecipitados se obtuvieron a partir del contenido intracelular (izquierda) o de los sobrenadantes de cultivo (derecha). LK corresponde a células LK-35.2 sin transfectar, tratadas con los mismos anticuerpos.

2.- Capacidad de las distintas células presentadoras de antígeno de activar a hibridomas de células T.

Una vez determinada la expresión de las diferentes formas de LG endógena por células LK-35.2, se evaluó su capacidad de activar a hibridomas T que reconocen diferentes péptidos de LG, comparando con la célula no transfectada en presencia del antígeno exógeno. Para esto se cultivaron 5×10^5 células, de los diferentes hibridomas con cantidades progresivas de las distintas CPA. La respuesta de los hibridomas T se evaluó mediante su liberación de IL-2, que está en relación directa con la capacidad de la CPA de procesar el antígeno y generar el ligando del TCR.

Como puede verse en la figura 6, las CPA con las dos formas de LG endógena tienen la misma capacidad de activar al hibridoma C10; sin embargo, los otros hibridomas (A6B3, E907 y 2B6.3) responden mejor cuando se utiliza LK-LGs como CPA. Dado que la expresión de LKs es mucho menor, este resultado indica una mayor eficiencia de presentación de LGs comparada con LGKDEL, lo cual se apoya por el hecho de que LGs permanece en la célula por menos tiempo, posiblemente indicando una mayor eficiencia de degradación. Además, al comparar las formas endógenas de LG con LG

exógena, también hay diferencias en la generación de distintos determinantes. Así, LG endógena genera el determinante 48-62, reconocido por el hibridoma C10, con más eficiencia, mientras que 114-129, reconocido por el hibridoma 2D4.1, es generado eficientemente a partir de LG exógena, pero no se genera a partir de LK_{KDEL} y necesita un número elevado de células LK-LGs. Además de confirmar la presentación de antígenos endógenos por moléculas clase II y demostrar diferencias en la capacidad de generación de distintos determinantes a partir de LG endógena y LG exógena, estos resultados demuestran que dos formas endógenas distintas de LG difieren en la eficiencia de generación de ciertos determinantes de esta proteína

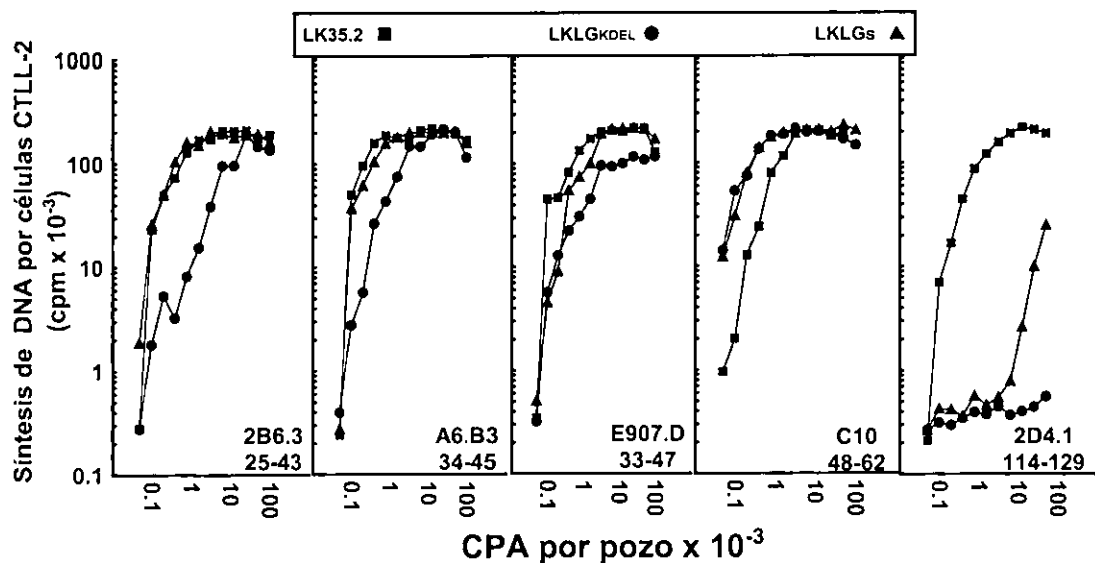


Figura 6. Respuesta de los distintos hibridomas de células T a las diferentes células presentadoras de antígeno. 5×10^4 células de hibridomas T (indicados en la parte inferior) se cultivaron con cantidades crecientes de las células LK-LGs (\blacktriangle), LK-LG_{KDEL} (\bullet) o LK35.2 cultivadas con 3 μ g de LG exógena (\blacksquare). Las células fueron cultivadas en placas de 96 pozos en un volumen de 200 μ l. Después de 24 horas de cultivo se tomaron 100 μ l del sobrenadante y este se transfirió a una nueva placa con 10^4 células CTLL-2. 20 horas después se agregó 1 μ Ci de ³H-timidina y las células se cultivaron durante 18 horas más y se cosecharon en un cosechador semiautomático. La síntesis de DNA (incorporación de ³H-timidina) se midió en un contador de centelleo. Los resultados se expresan como cpm x 10⁻³

3.- Densidad de MHC-II-péptido 52-61 en la superficie de las distintas CPA.

Para evaluar de otra forma la capacidad de generación de péptidos a partir de las formas endógenas y exógena de LG, se examinó la densidad de moléculas IA^k cargadas con péptidos relacionados con el péptido LG-52-61 (A^k52-61) en la superficie de células LK-35.2 portadoras de LG endógena o células LK-35.2 cultivadas 24 hr en presencia de concentraciones variables de LG exógena. La expresión de A^k52-61 se determinó por citometría de flujo con el anticuerpo monoclonal anti-A^k52-61 C4H3, que reconoce IA^k con el péptido 52-61 o péptidos relacionados con el mismo. Como se ve en la figura 7, el nivel de expresión de A^k52-61 en células LK-LGs es ligeramente mayor que en LK-LGKDEL. Esto indica, nuevamente, una mayor eficiencia de generación del determinante 52-61 a partir de LG endógena de secreción comparada con LG retenida en el RE. El nivel de expresión de A^k52-61 en células con las dos formas de LG endógena es inferior al de las células LK-35.2 cultivadas con 0.3µg/ml de LG exógena. Así, al comparar LG exógena con LG endógena, no hay correlación entre la densidad de A^k52-61 y la capacidad de las CPA de activar al hibridoma C10, específico contra este determinante. Es decir, a pesar de una densidad menor de A^k52-61 en superficie, las CPA presentan LG endógena con más eficiencia que las células LK-35.2 cultivadas con 3µg/ml LG exógena (Fig. 6).

Dado que el anticuerpo C4H3 reconoce en forma dosis dependiente un grupo de péptidos de diferente longitud relacionados con el determinante 52-61 ³⁴³, este resultado sugiere la posibilidad que la LG endógena genere un grupo más homogéneo de epitópos que la lisozima exógena que pueden ser reconocidos de manera óptima por el hibridoma C10. Estos resultados indican que ciertos determinantes pueden ser generados mas eficientemente a partir de la LG endógena.

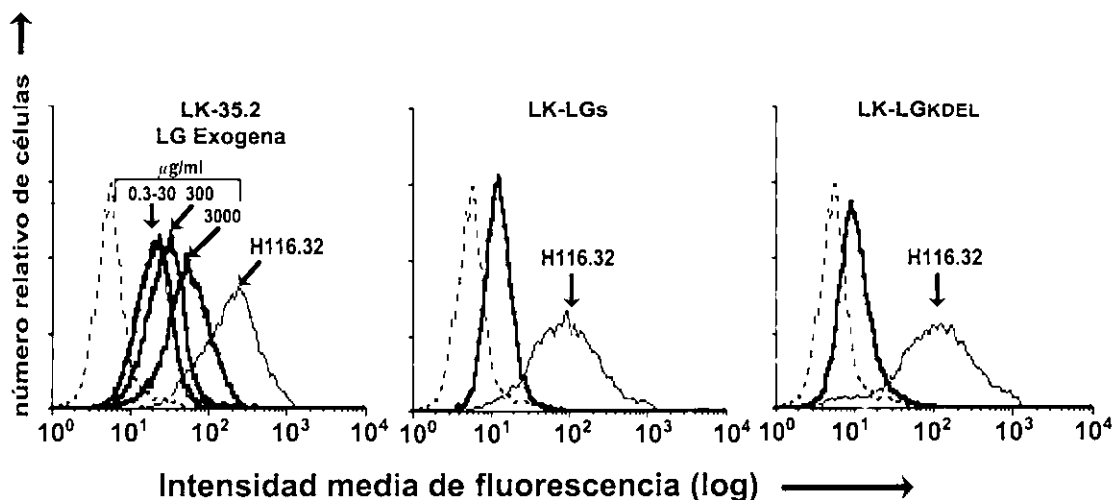


Figura 7. Expresión en superficie de IA^k con péptidos relacionados con el determinante 52-61. A la izquierda se muestra el histograma de las células LK-35.2 cultivadas sin antígeno o con las concentraciones indicadas de LG exógena durante 24 horas. A continuación, estas células se lavaron y se trataron con el anticuerpo C4H3 que reconoce los complejos IA^k -52-61. La tinción se reveló con un anticuerpo de cabra anti-rata biotinilado, seguido de estreptavidina marcada con FITC. En el centro y a la derecha se muestran los histogramas de las células LK-LGs y LK-LGKDEL, respectivamente, cultivadas sin antígeno y tratadas de igual manera que las células LK-35.2. Los controles negativos se muestran en todos los histogramas y corresponden a células LK-LGKDEL tratadas con un anticuerpo irrelevante del mismo isotipo del C4H3. La gráfica de este control se sobrepone con el obtenido a partir de células LK35.2 cultivadas sin antígeno (no mostrado). Se muestra también la expresión de moléculas clase II IA^k totales por las diferentes CPA mediante tinción con el anticuerpo H116.32.

4.- Papel del RE en la unión de péptidos derivados de proteínas endógenas a moléculas clase II del MHC.

La generación de péptidos reconocidos por linfocitos T en asociación a MHC-II por LGKDEL, y sus diferencias con LGs y LG exógena, sugiere la posibilidad de que los péptidos derivados de LGKDEL (retenida en el RE), pero no de las otras formas de LG, fueran generados y/o unidos a MHC II en el RE. Para examinar esta posibilidad, se incubaron células LK-LGKDEL o LK-35.2 con una mezcla de 15 aminoácidos marcados con 3H en presencia o ausencia de BFA. Después de 10 horas de incubación, las moléculas IA^k se purificaron por afinidad y los péptidos unidos a estas se eluyeron con 10% ácido acético y calor. Los péptidos <10 kDa se separaron por HPLC en fase reversa y se midió la incorporación de 3H en fracciones recolectadas cada dos

minutos. En la figura 8a puede observarse que la marca radiactiva sólo se recuperó a partir de las moléculas IA^k obtenidas de células LK35.2 y LK-LGKDEL no tratadas con BFA. Este resultado indica que, en nuestro sistema, no hay unión de péptidos a IA^k en el RE. Para asegurar que los dímeros clase II examinados en células tratadas con BFA habían sido retenidos en el RE en el momento del análisis, el material >10 kDa (moléculas clase II), se trató con endoH (Fig. 8b) que disminuyó su Mr, lo cual demuestra que son sensibles a la endo-H, confirmando que se encontraban en el RE.

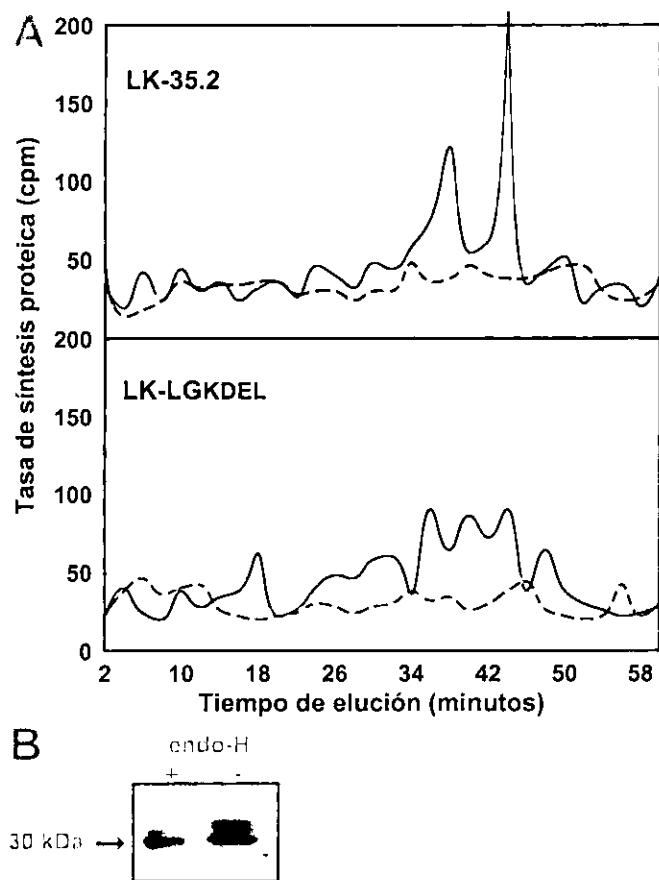


Figura 8. Determinación de la unión de péptidos a MHC-II en el RE. a) Cuentas por minuto de péptidos eluidos de moléculas IA^k obtenidas de células LK-35.2 sin transfectar (arriba) o de células LK-LGKDEL cultivadas durante 10 horas en presencia (- - -) o en ausencia (-) de 10 μg/ml BFA. Se cultivaron 5x10⁷ células con aminoácidos marcados con ³H, después de lo cual se purificaron las moléculas IA^k y se sometieron a elución con ácido acético al 10%. El material <10 kDa se analizó por HPLC en fase reversa y el contenido de radioactividad se determinó en un contador de centelleo. Los resultados se expresan como cpm de fracciones colectadas cada 2 minutos. b) Autorradiografía de las moléculas IA^k de las células cultivadas con BFA retenidas en las membranas Centricon™ después de la

elución ácida y tratadas (+) o no (-) con endoH.

5.- Papel del RE en la degradación de LG endógena.

A pesar de que no se encontró unión de péptidos a IA^k II en el RE, persistía la posibilidad de que algunos péptidos derivados de LG endógena pudieran generarse en este compartimiento. Así, se examinó la estabilidad de las dos

formas de LG endógena, por inmunoprecipitación en presencia o ausencia de BFA, en experimentos de pulso y seguimiento. Las células se pulsaron 15 minutos con ^{35}S -Met, se lavaron y se cultivaron con un exceso de metionina fría. En la parte superior de la figura 9a se observa que la banda de LGKDEL está presente a las 24 horas, aún en ausencia de BFA, aunque después de las 10 h hay una disminución gradual si se la compara con las células cultivadas con BFA. Esto sugiere que, de haber degradación, ésta es fuera del RE. Sin embargo, a las 48 horas de caza (Fig. 9b) en la LG inmunoprecipitada de las células cultivadas en presencia de BFA hay una banda de menor tamaño que podría corresponder a un producto de degradación. Por otro lado la LGs sólo es visible en presencia de BFA y a las 24 horas hay una banda adicional, menor de 14 kDa. Estos resultados sugieren que la degradación de ambas proteínas puede ser dependiente de su salida del RE pero tampoco excluyen la posibilidad de que sean degradadas, aún permaneciendo en el RE.

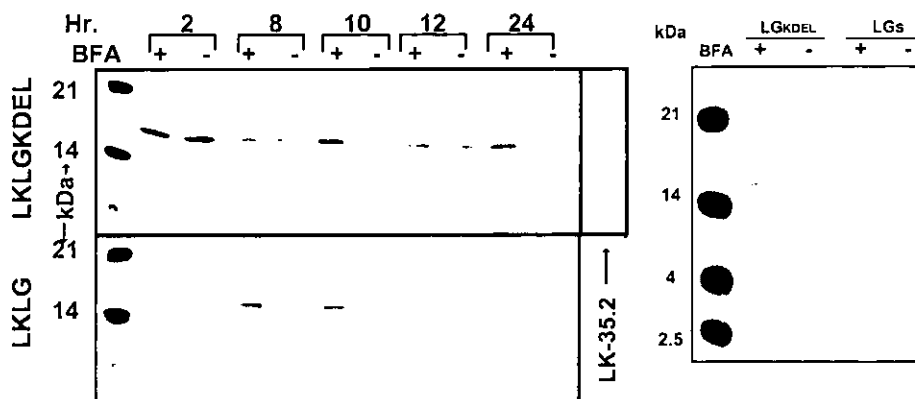
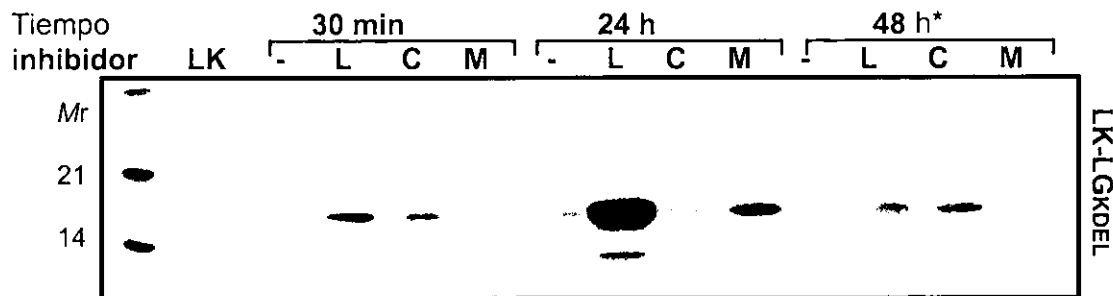


Figura 9. Permanencia de LG endógena en células LK35.2. a) Autorradiografía de geles de PAGE-SDS al 15% LGKDEL (arriba) o LGs (abajo) inmunoprecipitadas a partir de 10^7 células cultivadas en presencia (+) o ausencia (-) de BFA con $200\mu\text{Ci}$ de ^{35}S -Met por 15 minutos y cultivadas por los tiempos indicados con un exceso (10X) de metionina fría. Los lisados con cantidades iguales de radiactividad se inmunoprecipitaron con una mezcla de anticuerpos anti-LG 2XF8, D1115 y F1066. 5b LGKDEL y LGs, inmunoprecipitadas de células LK-LGKDEL y LK-LGs, respectivamente, seguidas hasta 48 horas en presencia (+) o ausencia (-) de BFA.

6.- Compartimientos intracelulares que participan en la degradación de la LG endógena.

Además de las diferencias en la eficiencia de generación de los péptidos entre ambas formas de LG endógena y entre éstas y LG exógena, los resultados

presentados hasta aquí, sugieren la posibilidad de que, para ser degradadas, las dos formas endógenas de LG tienen que salir del RE o, alternativamente, que a pesar de ser retenidas en el RE, pudieran ser degradadas. Estas dos posibilidades no son excluyentes. Sin embargo, estos resultados no permiten determinar el sitio de degradación de estas proteínas. Así, para determinar los compartimientos intracelulares involucrados en la degradación de la proteína LGKDEL se utilizaron distintos inhibidores del tráfico intracelular e inhibidores de los sistemas proteolíticos.



*A las 48 se inmunoprecipitó sólo la mitad de radiactividad.

Figura 10. Recuperación de LGKDEL endógena en células tratadas con distintos inhibidores. Autorradiografía de LGKDEL inmunoprecipitada con una mezcla de anticuerpos anti-LG a partir de células LK-LGKDEL cultivadas con ^{35}S -Met durante 15 minutos y posteriormente durante los tiempos indicados en ausencia (-) o en presencia de LLnL (L), Cloroquina (C) o monensina (M). LK corresponde a células LK35.2 sin transfectar inmunoprecipitadas con los mismos anticuerpos.

Para determinar el efecto de los inhibidores en la vida media de la proteína endógena retenida en el RE, las células LK-LGKDEL se marcaron metabólicamente con ^{35}S -Met en presencia o ausencia de monensina $2.5\mu\text{M}$ (MON), que previene el transporte del TGN a vesículas ácidas ^{155,156}, cloroquina $50\mu\text{M}$ (CLQ), que previene acidificación de compartimientos endocíticos ^{208,209} y LLnL $250\mu\text{M}$, inhibidor de calpaína, proteasomas y algunas cisteil proteasas ^{230,231,232}. Estas concentraciones se establecieron previamente como óptimas para inhibir sin afectar sustancialmente la viabilidad de las células. Las células así tratadas fueron cazadas a diferentes tiempos también en ausencia o presencia de los inhibidores, después de lo cual se lisaron y se inmunoprecipitaron con anticuerpos anti-LG. Como se observa en la figura 10, estas drogas incrementan la cantidad de LGKDEL endógena recuperada de los inmunoprecipitados. A los 30 minutos se observa un ligero efecto de

LLnL que es máximo a las 24 hr. Por otro lado, CLQ y MON tienen un efecto más tardío en la cantidad de LGKDEL recuperada de los inmunoprecipitados. Debido a que LLnL inhibe actividad de proteasomas y que el efecto observado por esta droga es a tiempos tempranos, este resultado sugiere la posibilidad de que los proteasomas pudieran participar en la generación de péptidos a partir de LGKDEL. Por otro lado, el efecto tardío de CLQ y MON indica que, después de un tiempo, parte de la proteína LGKDEL sale del RE, vía TGN para llegar a compartimentos ácidos en donde es degradada. Además del efecto en la cantidad de proteína recuperada, se observa una banda menor a 14 Kda que podría corresponder a un producto de degradación, que sólo se observa en presencia de los distintos inhibidores.

7.- Compartimientos intracelulares que participan en la generación de péptidos derivados de LG endógena, presentados por MHC-II

Para evaluar el efecto de los inhibidores en la generación de péptidos derivados de LG endógena presentados por MHC-II, las CPA con LGKDEL y las células LK-35.2 sin transfectar precultivadas con LG exógena, se cultivaron durante 24 horas con los distintos inhibidores, después de lo cual se fijaron y se cultivaron con los hibridomas T anti-LG. En la figura 11 puede verse que LLnL tuvo el mayor efecto inhibitorio en la presentación de péptidos derivados de LGKDEL, seguido de monensina y finalmente cloroquina. Esto ocurre tanto con el hibridoma A2.2B2 (LG-46-61), como con A6B3 (34-45). La activación del hibridoma C10 no es afectada por ninguno de los inhibidores. Sin embargo, como se había observado previamente, este hibridoma es muy eficiente en respuesta a los péptidos derivados de LGKDEL. Estos resultados correlacionan en forma paralela con el efecto de los inhibidores en la vida media de la proteína (Fig. 10).

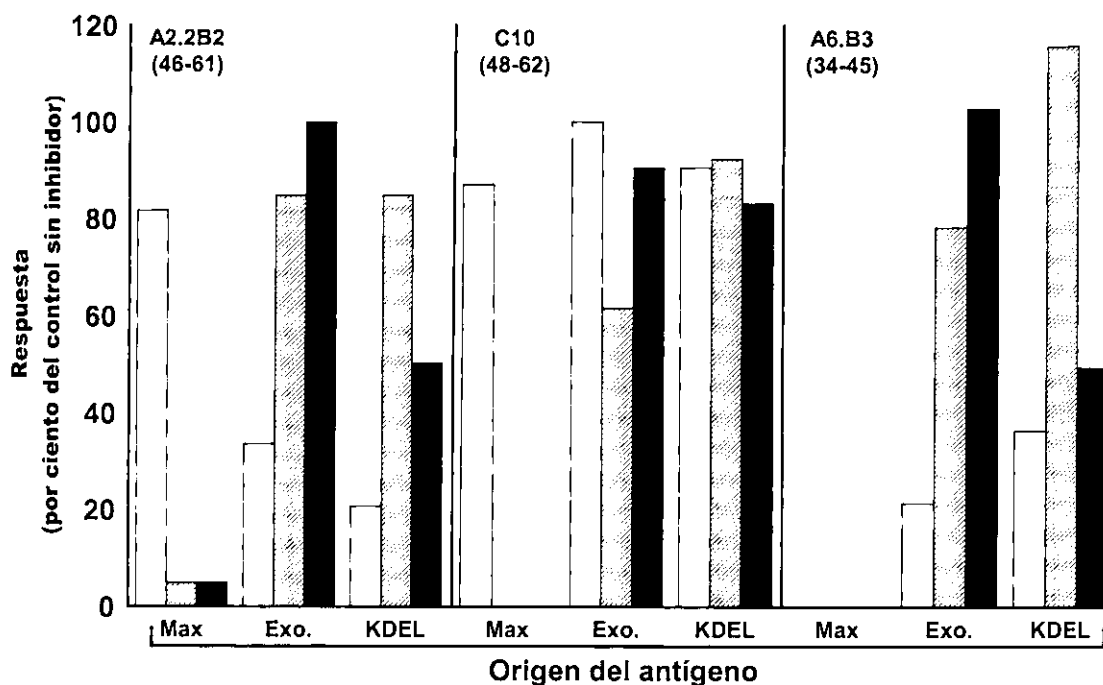


Figura 11. Efecto de distintos inhibidores en la respuesta distintos hibridomas de células T cultivados con las distintas CPA. Los distintos hibridomas T se cultivaron con células LK-LGKDEL en ausencia o presencia de LLnL 250 μ M (barras abiertas) cloroquina 50 μ M (barras cruzadas) o monensina 2.5 μ M (barras negras). Los controles incluyen células LK35.2 cultivadas con 3 μ g/ml de LG exógena adicionada después de la droga correspondiente (Max) y células LK35.2 cultivadas durante 24 horas con 3 μ g/ml de LG antes y después de la adición del inhibidor (Exo). Los resultados se expresan como el porcentaje de las cpm obtenidas del cultivo del hibridoma con la misma APC en ausencia de inhibidor.

Por otra parte, la presentación de péptidos derivados de LG exógena a 3 μ g/ml fue afectada también en mayor proporción por LLnL, sobre todo el determinate 34-35 reconocido por el hibridoma A6B3. A diferencia de su efecto en la presentación de péptidos derivados de LGKDEL, la cloroquina tuvo un mayor efecto inhibitorio en la generación de péptidos derivados del LG exógena, mientras que el efecto de la monensina fue mínimo. Estos resultados, además de corroborar las diferencias en los requerimientos para el procesamiento de antígenos endógenos y exógenos, sugieren que en la generación de péptidos derivados del antígeno retenido en el RE pueden estar participando los proteasomas. Sin embargo, la inhibición de la degradación de la proteína exógena por LLnL y por la monensina y la cloroquina en la degradación de la proteína endógena, los resultados

sugieren también la posibilidad de la LGKDEL sea transportada a la vía endocítica para ser procesada y presentada por MHC-II.

8.- Papel de los proteasomas y de los compartimientos endocíticos en la degradación de la LGKDEL endógena.

Lo hallazgos de que tanto el inhibidor de proteasomas LLnL, como la cloroquina y la monensina, que actúan en la vía endocítica, inhibieron la degradación de la proteína LGKDEL y la capacidad de las células LK-LGKDEL de activar a distintos hibridomas T sugieren que tanto proteasomas como compartimientos endocíticos pudieran estar coparticipando en el procesamiento de la LG. Sin embargo, como se mencionó, la LLnL no sólo inhibe la actividad de proteasomas sino también de algunas proteasas presentes en compartimientos endocíticos. Por lo tanto, se utilizó lactacistina, que es un inhibidor específico de la actividad de proteasomas^{228,229} y se comparó con E64 que es un inhibidor de cisteil proteasas³⁴⁹.

Para determinar el efecto de estas drogas en la vida media de la proteína, las células LK-LGKDEL se marcaron y se cazaron en ausencia o en presencia de los distintos inhibidores a los tiempos indicados. En la figura 12 se observa que la lactacistina aumenta la cantidad de proteína LGKDEL recuperada desde tiempos tempranos, inclusive desde los 20 minutos de marca, aunque este efecto es mayor a las 24 h. Por otro lado, E64 muestra un efecto tardío en la cantidad de la proteína recuperada. Estos resultados concuerdan con los arriba descritos y sugieren que el proteasoma participa en la degradación temprana de LGKDEL, mientras que las cisteil proteasas participan en la degradación de LGKDEL en forma tardía, sugiriendo nuevamente que parte de la proteína llega a compartimientos de la vía endocítica.

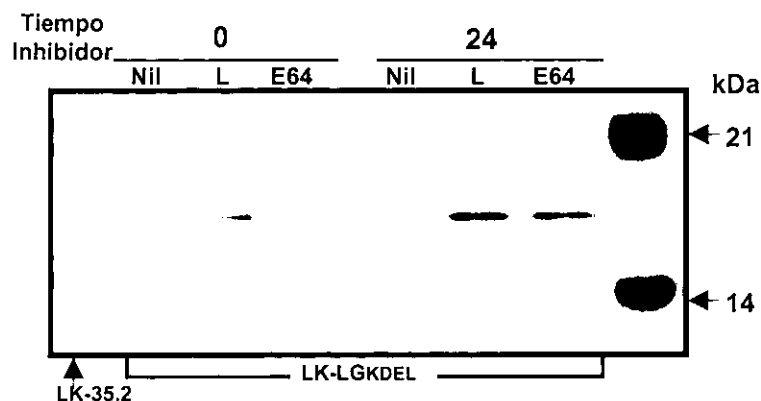


Figura 12. LGKDEL inmunoprecipitada con una mezcla de anticuerpos anti LG, a partir de células LK-LGKDEL cultivadas con ^{35}S -Met sin inhibidor (Nil) o en presencia de Lactacistina (L) o E64. A los 20 min se lavaron y se cultivaron sin ^{35}S -Met con los inhibidores durante los tiempos indicados. LK-35.2 células sin transfectar.

9.- Papel de los proteasomas y compartimientos endocíticos en la generación de péptidos de LG endógena presentados por IA^k.

Para determinar el papel relativo de proteasomas y de compartimientos endocíticos en la generación de los distintos determinantes antigénicos de LG. Las células LK-35.2 precultivadas con $3\mu\text{g}$ de LG, y las células LK-LGKDEL y LK-LGs, sin LG exógena, se cultivaron durante 24 h en presencia o ausencia de lactacistina, LLnL o E64, después de lo cual se fijaron y cultivaron con el hibridoma anti-LG34-45 A6.B3. Como se observa en las figuras 13 y 14, la lactacistina inhibe en forma acentuada la activación del hibridoma A6B3 en respuesta a LK-LGKDEL y en forma parcial a LK-LGs, sin afectar la presentación de LG exógena ni del péptido sintético.

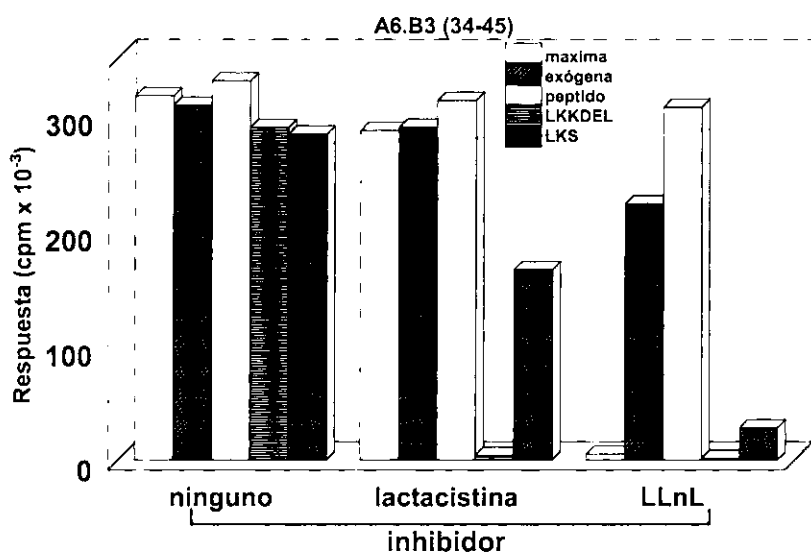


Figura 13. Papel del proteasoma en la generación de péptidos derivados de LG endógena. Se cultivó el hibridoma A6.B3 con células LK-LGKDEL (barras horizontales), LK-LGs (barras punteadas) en ausencia de LG exógena o LK-35.2 con 3 μ g de LG exógena (barras cruzadas) precultivadas en

ausencia o presencia de lactacistina 1 μ M y LLnL 250 μ M. Los controles incluyeron células LK-35.2 cultivadas con 3 μ g/ml de LG exógena adicionada después del inhibidor (Max) (barras blancas) y células LK-35.2, tratadas con los inhibidores, fijadas y cultivadas con el hibridoma A6.B3 en presencia del péptido 34-45 (péptido barras grises). Los resultados se expresan como síntesis de DNA de células CTLL-2 cultivadas con el sobrenadante de los distintos cultivos.

Por otro lado, el inhibidor de cisteil proteasas E64 (figura 14) afecta en una forma casi total la generación del determinante LG34-45, reconocido por A6.B3, a partir de las dos formas de LG endógena y de LG exógena (máxima). Estos resultados confirman la participación, probablemente conjunta, de proteasomas y de compartimientos de la vía endocítica en el procesamiento de LGKDEL para generar péptidos presentados por IA^k.

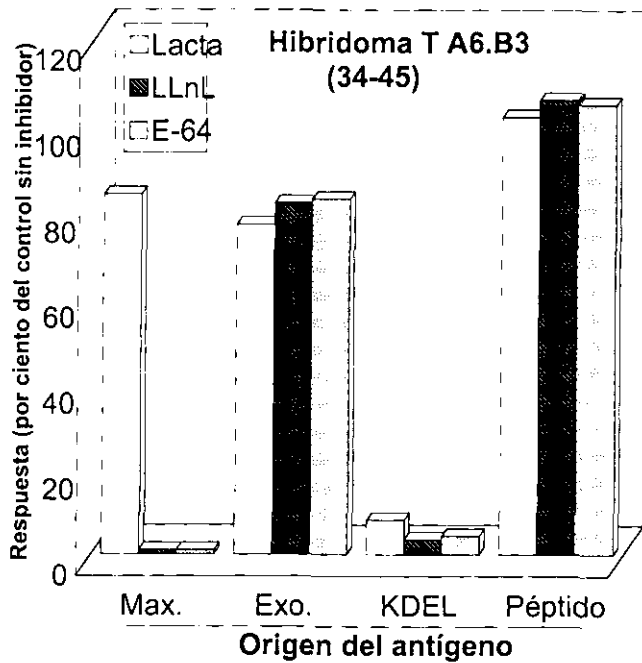


Figura 14. Participación de cisteil proteasas en la generación de péptidos derivados de LGKDEL. Se cultivó el hibridoma A6.B3 con células LK-LGKDEL en ausencia de LG exógena, o células LK-35.2 con 3 μg de LG exógena (Exo) precultivadas en ausencia o presencia del lactacistina 1mM (barras cruzadas), E-64 100mM (barras punteadas) y LLnL 250 μM (barras cruzadas). Los controles son los mismos que en la figura 9. Los resultados se expresan como el porcentaje de las cpm cultivo del hibridoma con la misma CPA sin inhibidor.

DISCUSION

Estudios realizados con antígenos endógenos presentados por MHC-II han encontrado que su procesamiento difiere del de antígenos exógenos, sugiriendo que los primeros son procesados por una vía diferente. En ambos casos se ha demostrado la participación de compartimientos endocíticos en el procesamiento y presentación de antígenos por MHC-II. Tomando en cuenta que el procesamiento de un antígeno en la vía endocítica, puede ser diferente, dependiendo de su ruta de acceso ³⁵⁰, una pregunta fundamental para explicar las diferencias en el procesamiento de antígenos endógenos y exógenos es determinar si existe una vía de procesamiento independiente de compartimientos endocíticos, o si las diferencias mencionadas son consecuencia del transporte del antígeno endógeno a vesículas endocíticas distintas que los antígenos exógenos. En este trabajo se estudiaron estas posibles diferencias, teniendo como hallazgo principal la demostración de la participación del mecanismo de degradación asociado a RE, mediado por proteasomas, en la generación de péptidos derivados de un antígeno endógeno retenido en el RE, capaces de ser presentados por MHC-II, a pesar de que también se encontró que una parte de este antígeno es transportado a compartimientos endocíticos para su procesamiento y presentación por MHC-II.

Los experimentos iniciales de presentación de antígeno realizados en este estudio, con células que expresan LGs y LGKDEL, demostraron que estos antígenos se presentan eficientemente por MHC-II a partir de una poza endógena, ya que no se detectó LGKDEL en los sobrenadantes de cultivo de células que expresan esta proteína. Además, de acuerdo con hallazgos previos, la cantidad de LGs liberada al medio y endocitada por otra CPA no fue suficiente para generar péptidos presentados por MHC-II ³⁴⁰. Por otra parte, en este y en otros trabajos ³³⁷ se encontraron diferencias en la capacidad de generación de distintos determinantes a partir de las formas

endógenas de LG y la LG exógena, sugiriendo una vía de procesamiento distinta para los antígenos sintetizados en el interior de la célula.

Estudios previos han demostrado que tanto la localización como el nivel de expresión de una proteína endógena son importantes para que esta sea eficientemente presentada por MHC-II. Los resultados obtenidos en este estudio concuerdan con el concepto de que la eficiencia de presentación de un antígeno endógeno correlaciona con su localización ya que, a pesar de que se expresa abundantemente, la proteína LG retenida en el RE se presenta con menor eficiencia que la LGs. Este hallazgo apoya resultados previos que indican que los antígenos capaces de salir del RE son presentados con mayor eficiencia por MHC-II ³¹⁷. Sin embargo, al igual que en otros estudios nuestros resultados iniciales sugirieron que algunos antígenos retenidos en el RE son procesados, aún cuando permanecen en este compartimiento ³¹⁹.

En varios estudios se ha sugerido la participación de compartimientos exocíticos tempranos en el procesamiento y presentación de antígenos endógenos de la vía exocítica ^{308,309,317-320}. En los experimentos realizados en este trabajo, el efecto de los inhibidores de proteasomas LLnL y sobre todo de la lactacistina en la cantidad de proteína LGKDEL recuperada a partir de células que expresan esta proteína, sugieren que LGKDEL puede ser susceptible a degradación por proteasomas. Dado que se ha sugerido que el principal mecanismo de degradación de proteínas retenidas en el RE, es mediado por proteasomas, los resultados indican la participación de este mecanismo en la degradación de LGKDEL. Estos resultados difieren de otros estudios de presentación de antígenos endógenos, que proponen que proteasas, aún no caracterizadas, presentes en compartimientos exocíticos tempranos (RE y cisternas del Golgi) podrían participar en el procesamiento de tipo de antígenos ³⁷⁴⁻³⁷⁸. Nuestros resultados concuerdan con los de trabajos que han propuesto que el principal mecanismo de degradación de proteínas retenidas en el RE es dependiente de proteasomas ²⁵⁵⁻²⁶¹ pero, además, estos resultados indican que péptidos derivados de una proteína residente del RE, generados por proteasomas pueden ser presentados por

MHC-II. Esto se apoya en el hallazgo de que la incubación de LK-LGKDEL como CPA con inhibidores de proteasomas afectó sustancialmente su capacidad de activar a linfocitos T en respuesta a péptidos de LG. Este resultado indica que este mecanismo de degradación puede contribuir de manera importante a la generación de péptidos derivados de LGKDEL presentados por MHC-II.

Para entender como los péptidos derivados de un antígeno degradado por proteasomas son presentados por MHC-II, es importante tener en cuenta que en la degradación por proteasomas de proteínas retenidas en RE, pueden participar tanto los proteasomas libres del citosol como los asociados al RE. Nuestros hallazgos no permiten discernir entre el tipo de proteasomas que participan en la degradación de LGKDEL; sin embargo, otros estudios ³³⁵ y hallazgos de nuestro laboratorio han demostrado que la presentación de una forma citosólica de LG es menos eficiente que la de LGKDEL. Esto sugiere, por lo tanto, que la degradación de LGKDEL por proteasomas no requiere el transporte de esta proteína al citosol y que, como se ha reportado para otras proteínas, es susceptible de degradación por proteasomas sin dejar el RE. Si lo anterior es cierto, un sitio posible para el encuentro de los péptidos generados por proteasomas con MHC-II es el RE, que es donde se lleva a cabo el ensamble de MHC-II ⁵⁴. De acuerdo con esto, algunos trabajos han propuesto que es posible la unión de péptidos a MHC-II en el RE compitiendo con la cadena Ii ⁶⁴. Por el contrario, en otros estudios se ha propuesto que aún en células sin cadena Ii, la unión de péptidos a MHC-II en el RE es ineficiente ³²¹. En nuestros experimentos de elución de péptidos de IA^k, no se obtuvieron péptidos unidos a estas moléculas derivadas del RE, a pesar de que tanto IA^k, como el antígeno endógeno LGKDEL permanecieron en dicho compartimiento durante 10 horas debido a la adición de BFA. Tomado como un hecho que es posible que los péptidos de LGKDEL degradados por proteasomas estén presentes en el RE, junto con péptidos señal de distintas proteínas de la vía exocítica y otros péptidos transportados por los TAPS, que no se unieron a MHC-I, una posible explicación de nuestros resultados sería que el RE no fuera un sitio adecuado

para la unión de péptidos a MHC-II o que ningún péptido se encuentre en el RE en cantidad suficiente para competir con la cadena Ii y unirse a MHC-II. Sin embargo, a pesar de que la técnica utilizada en este estudio es muy sensible, es posible que sea insuficiente para la detección de algunos péptidos unidos a las moléculas clase II en el RE.

Una alternativa para explicar la presentación de péptidos del RE por MHC-II sin que su unión a MHC-II se lleve a cabo en este sitio, sería la existencia de un mecanismo para el transporte del contenido de RE a vesículas endocíticas, ya que es improbable que péptidos del RE puedan viajar intactos a lo largo la vía exocítica hasta llegar a la vía endocítica y ahí unirse a MHC-II. En este mecanismo podría estar implicada la GTPasa Rab 24 que se ha encontrado en el RE y en compartimientos endocíticos y que se ha sugerido que participa en mecanismos de autofagia ¹⁶⁹.

Por otra parte, también es posible que la proteína LGKDEL se transporte al citosol, de donde la proteína parcialmente degradada o péptidos degradados por el proteasoma serían transportados a vesículas endocíticas para su unión a MHC-II. Lo anterior se apoya en trabajos en los que se demuestra la existencia de un mecanismo de transporte, de proteínas parcialmente degradadas, de vacuolas endocíticas al citosol, donde son finalmente degradadas por proteasomas ¹⁹. Debido a que muchos de los mecanismos de transporte son bidireccionales, este mecanismo podría también ser utilizado para el transporte de péptidos o proteínas parcialmente degradadas del citosol a vesículas endocíticas. Además, se han descrito distintos mecanismos para el transporte de material citosólico a vesículas endocíticas

288-290

Tomando en cuenta la baja eficiencia de presentación de antígenos citosólicos por MHC-II y que los antígenos citosólicos degradados por proteasomas son presentados eficientemente por MHC-I y no por MHC-II, es posible que sólo ciertas proteínas tengan acceso a los mecanismos de transporte mencionados. Dado que los antígenos que entran al RE son

presentados con mayor eficiencia por MHC-II que los antígenos citosólicos, proponemos que el sitio de unión a MHC-II de los péptidos derivados de LGKDEL, generados por proteasomas, es el RE. Alternativamente, tomando en cuenta que en este estudio no se encontró unión de péptidos en el RE, dichos péptidos podrían ser transportados del RE a vesículas endocíticas, donde se unirían a MHC-II. Finalmente, es posible que los péptidos degradados por proteasomas citosólicos, derivados de LGKDEL, sean transportados al interior del RE por los TAPs. Lo anterior deja nuevamente la posibilidad de que la unión de dichos péptidos a MHC-II sea en el RE o que de ahí sean transportados a vacuolas endocíticas, en donde se unirían a MHC-II.

A pesar de que tanto LGs como LGKDEL entran al RE, el efecto de los inhibidores de proteasomas en la presentación de la proteína LGs fue muy inferior al efecto sobre LGKDEL. Esto sugiere que, a diferencia de LGKDEL, la degradación por proteasomas no es la principal vía para la generación de péptidos derivados de LGs. Esto puede explicarse porque además de tener una secuencia de retención en el RE, en las células aquí utilizadas, la proteína LGKDEL es sobreexpresada, lo que puede hacerla altamente susceptible del sistema de degradación dependiente de proteasomas. Por otra parte, debido a que la presentación de LGs es más eficiente que la de LGKDEL, es posible que después de salir del RE, LGs se transporte a compartimientos endocíticos donde es procesada y sus péptidos presentados por MHC-II.

Aunque la presentación de péptidos derivados de LGKDEL fue inhibida totalmente por LLnL y lactacistina, los resultados derivados de este trabajo demuestran que esta proteína puede ser procesada por un mecanismo alternativo. Los experimentos con monensina, cloroquina y E-64, demuestran que, después de un lapso de tiempo en el RE, una parte de la proteína LGKDEL es capaz de salir y llegar a la vía endocítica. Lo anterior puede ser debido a la saturación los receptores carga para KDEL por la elevada expresión de la proteína, evitando su recuperación de las cisternas del Golgi

¹⁹³. Por otra parte, ya que LGKDEL no es una proteína residente natural del RE, es muy probable que carezca de señales adicionales necesarias para su retención total en este compartimiento ¹⁹⁷. En ambos casos, una porción de la proteína podría ingresar al mecanismo de transporte vesicular masivo e interceptar en algún momento con los compartimientos endocíticos.

Los experimentos con monensina y cloroquina indican que LGKDEL se transporta a la vía endocítica a partir del TGN, ya que la cantidad de proteína recuperada aumenta con el uso de ambas drogas. El efecto de estos inhibidores en la degradación de la proteína es tardío (24 o más horas), indicando que antes de este tiempo la mayor parte de la proteína permanece en el RE y es susceptible a la acción de los proteasomas. Por otra parte, además de aumentar la cantidad de proteína recuperada, el uso de los inhibidores mencionados durante 24 horas o más, permite la detección de una banda menor de 14kDa que podría corresponder a un producto de degradación de LG. Esto ocurre tanto con inhibidores de proteasomas como con inhibidores de proteasas ácidas, lo que sugiere que el uso individual de estos inhibidores, no impide completamente la degradación de la proteína, indicando que esta es degradada por ambos mecanismos.

El efecto de monensina, cloroquina y E-64 en la degradación de LGKDEL correlaciona con la inhibición por las mismas drogas en la presentación de péptidos derivados de esta proteína capaces de activar distintos hibridomas de células T. Los resultados derivados de estos experimentos concuerdan con los de estudios que demuestran la importancia del transporte de antígenos endógenos a la vía endocítica para su presentación por MHC-II, así como con la demostración de que los inhibidores de proteasas ácidas afectan la presentación por MHC-II de antígenos endógenos retenidos en el RE ^{296,310,311,336,338}. Sin embargo, debido a que todos los inhibidores utilizados en este estudio también afectan la degradación de la cadena Ii, es posible que el efecto de E-64 y cloroquina en la presentación de péptidos derivados de LGKDEL sea debido a inhibición de la degradación de la cadena Ii, lo cual impediría la unión de péptidos derivados de LGKDEL a MHC-II en

compartimientos endocíticos. Por otro lado, el inhibidor de proteasomas LLnL afectó tanto la presentación de LG endógena como exógena. Esto se debe a que, además de inhibir proteasomas esta droga tiene efecto sobre algunas cisteil-proteasas de la vía endocítica ²³².

La participación de los proteasomas en la degradación de LG endógena explica en parte las diferencias en los péptidos generados a partir de formas endógenas de LG y LG exógena. Sin embargo, a pesar de que aparentemente la LGs es procesada principalmente por su transporte a vesículas endocíticas, las diferencias entre las dos formas endógenas de LG son solamente en eficiencia. Además, de acuerdo a los resultados obtenidos, parte de LGKDEL es degradada en vesículas ácidas. Es posible que los péptidos derivados del mecanismo dependiente de proteasomas y los que son generados en las vesículas endocíticas a las que tienen acceso los antígenos endógenos, tengan características muy similares. Apoyando lo anterior, se ha reportado que los proteasomas pueden generar péptidos muy variados en tamaño ^{239,240}. Alternativamente es posible que la participación de los proteasomas sea en la degradación parcial de la proteína endógena y que la generación final de los péptidos se lleve a cabo en compartimientos endocíticos similares a los que son transportados los antígenos endógenos que salen del RE. Por otra parte, los resultados obtenidos al analizar los complejos IA^k cargados con el péptido 52-61 o péptidos relacionados con este, en la superficie de las distintas CPA, indican que estos complejos pudieran ser más homogéneos a partir de las formas endógenas de LG que de LG exógena. Los péptidos unidos a moléculas clase II en compartimientos endocíticos son muy heterogéneos en tamaño aún para un mismo determinante ⁴⁸. Por lo tanto, es posible que estas diferencias puedan ser resultado de la participación de los proteasomas en la generación de péptidos derivados de antígenos endógenos o que los péptidos derivados de antígenos endógenos sean generados en vesículas endocíticas distintas a las que participan en la generación de péptidos derivados de antígenos exógenos internalizados por pinocitosis. Finalmente, los resultados de este trabajo indican también que algunos determinantes generados a partir de

LG endógena pueden activar de manera más eficiente a un hibridoma de linfocitos T que los generados a partir de LG exógena, apoyando nuevamente las diferencias en la generación de los determinantes dependiendo del origen del antígeno.

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que antígenos de la vía exocítica que entran al RE y sobre todo un antígeno retenido en el RE pueden ser procesados por vías que no son excluyentes. Así, una parte de la proteína LGKDEL que permanece en el RE es susceptible al mecanismo de degradación asociado a RE, mediado por proteasomas y los péptidos generados son presentados por MHC-II. La generación de péptidos capaces de unirse a MHC-II por este mecanismo propone la existencia de una vía de procesamiento independiente de compartimientos endocíticos para la presentación de antígenos endógenos. Por otra parte, después de un tiempo de permanecer en el RE otra parte de la proteína LGKDEL escapa del RE para interceptar con los compartimientos endocíticos en donde es procesada y los péptidos generados se unen a MHC-II.

CONCLUSIONES

- El mecanismo de degradación de proteínas asociado a RE, mediado por proteasomas participa en la generación de péptidos derivados de antígenos endógenos capaces de unirse a MHC-II
- El transporte de antígenos endógenos a compartimientos endocíticos es importante para su procesamiento y presentación por MHC-II.

BIBLIOGRAFIA

1. Davis, MM., Bjorkman, PJ.. (1988). T Cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature*. 334, 395-402.
2. Germain, R.N. (1994) MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: Providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* 76, 287-299.
3. Dimet, S., Sthal, P.,(1985) Macrophage endosomes contain proteases which degrade endocytosed protein ligands. *J. Biol. Chem.* 260, 15311-15317.
4. Hershko, A., Ciechanover, A.. (1992) The ubiquitin system for protein degradation *Rev Biochem.* 61, 761-807.
5. Flavell, R. A., Allen, H., Burkly, L. C., Sherman, D. H., Waneck G. L., y Widera, G.. (1986) Molecular Biology of the H-2 histocompatibility complex. *Science* 233, 437-443.
6. Monaco, JJ.. (1993) Structure and function of genes in the MHC class II region. *Current Opinion in Immunology*. 5, 17-20.
7. Salter, R. D., Benjamin, R.j., Wesley, P.K., Buxton, S.E., Garrrrett T., Clayberger, C., Krensky, A.M., Norment, A.M., Litman, D.R., and Parham, P., (1990). A binding site for the T cell co-receptor CD8 on the α domain of HLA-A2. *Nature*. 345, 1-46.
8. Vignali, D. A. A., Moreno, J., Schiller, D., y Hammerling, G. J.. (1992). Species-specific binding of CD4 to the β 2 domain of Major Histocompatibility complex class II molecules *J. Exp. Med* 175, 925-932.
9. Lie, WR., Nyers, NB., Gorka, J., Rubocki, RJ., Connolly, JM., Hansens, TH.. (1990) Peptide ligand-induce conformational and surface expression of the Ld class I MHC molecule. *Nature*. 344,439-441.
10. Sadegh-Nassery, S., y Germani, R. N.. (1991). A role for peptide in determining MHC class II structure. *Nature* 353, 167-170
11. Ciechanover, A.. (1994) The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell* 79, 13-21.
12. Beynon, R.J., Bond, J.S.. (1986) Catabolism of intracellular protein: molecular aspects. The American physiological society.
13. Goldberg. AL., Rock, KT.. (1992) Proteolysis, proteasomes and antigen presentation. *Nature* 257, 375-379.
14. Unanue, E. R.. (1984). Antigen-presenting function of the macrophage. *Ann.Rev. Immunol.* 2, 395-428.
15. Michalek, MT., Granr, EP., Gramm, C., Golberg, AL., Rock, KL., (1993). A role for ubiquitin-dependently proteolytic pathway in MHC class-I-restricted antigen presentation. *Nature* 363, 552-554.

16. Rock, KL., Gramm, C., Rothstein, L., Clark, K., Stein, R., Dick, L., Hwang, D., Goldberg, AL.. (1994) Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* 78, 761-771.
17. Harding, C. V., Collins, D. S., Slot, J. W., Geuze, H. J., y Unanue, E. E. (1991). Liposome-encapsulated antigens are processed in lysosomes, recycled , and presented, to T cells. *Cell* 64, 393-401.
18. Zaghouani, H., Kuzu, Y., Kuzu, H., Brumeanu, T.D., Swiggard, W.J., Steiman , R.M., Bona, C.A.. (1993) Contrasting efficacy of presentation by major histocompatibility complex class I and class II products when peptides are administered within a common protein carrier, self immunoglobulin. *Eur J Immunol* 23, 2746-2750.
19. Rodriguez, A., Regnault, A., Kleijmeer, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Amigorena, S.. (1999) Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC class I presentation in dendritic cells *Nature Cell Biol* 1, 362-368.
20. Hughes, E. A., Hammond, C., Cresswell, P.. (1996) Misfolded major histocompatibility complex class I heavy chains are translocated into the cytoplasm and degraded by proteasome. *Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 1896-1901.
21. Harding, CV., Song, R. (1994) Phagocytic processing of exogenous particulate antigens by macrophages for presentation by class I MHC molecules. *J. Immunol.* 153, 4925-4933.
22. Carbone, FR., Bevan, MJ.. (1990) Class I restricted processing and presentation of exogenous cell-associated antigen in vivo. *J. Exp Med* 171, 377-387.
23. Buus, S., Sette, A., Colon, S. M., Grey, H. M.. (1988). Autologous peptides constitutively occupy the antigen binding site of Ia. *Science* 242, 1045-1047
24. Urban, R. G., Chicz, R M., Vignali, D. A. A., y Strominger, J. L.. (1993) The dichotomy of peptide presentation by class I and class II MHC proteins. En *Chemical Immunology*, Editado por Adorini, L., Arai, K., y Fitch, F. W.. Ishizaka, K., Lachmann, P. J., y Waksman, B. H.. S. Kager, Basilea. 197-234
25. Madden, DR., Goga, JC., Strominger, JL., Wiley, DC.. (1991) The structure of HLA-B27 reveals nonamer self-peptides bound in a extended conformation. *Nature.* 353, 321-325.
26. Madden, DR., Gorga, JC., Strominger, JL., Wiley, DC.. (1992) The threedimensional structure of HLA-B27 at 2.1 resolution suggest a general mechanism for tight peptide binding to MHC. *Cell.* 70, 1035-1048.
27. Bjorkman, P. J., Saper, M. A., Samraoui, B., Bennet, W. S., Strominger, J L., y Wiley, D. C.. (1987a) Structure of the human class I histocompatibility antigen HLA-A2. *Nature* 329, 506-512
28. Bjorkman, P. J., Saper, M. A., Samraoui, B., Bennet, W. S., Strominger, J L, y Wiley, D. C.. (1987b) The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature* 329, 512-518

29. Falk, Röttschke, O., Stevanović, S., Jung, G., Rammensee, HG. (1991) specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature*. 351, 290-296.
30. Garrett, TPJ., Saper, MA., Bjorkman, PJ., Strominger, JL., Wiley, DC., (1989). Specificity Pockets for the side chains of peptide antigens in-HLA-Aw68. *Nature*. 324, 692-696.
31. Williams, DB., Boriello, F., Zeff, RA., Nathenson, SG., (1988) Intracellular transport of class I histocompatibility molecules. *J BiolChem*. 263, 4549-4560.
32. Degen, E., Williams, DB., (1991) Participation of a novel 88-kD protein in the biogenesis of murine class I histocompatibility molecules. *J Cell Biol*. 112, 1099-115.
33. Hochstenbach, F., David, V., Watkins, S., Brenner, MB.. (1992) Endoplasmic reticulum resident protein of 90 kilodaltons associates with the T-cell and B-Cell antigen receptors and major histocompatibility complex antigens during their assembly. *Proc Natl Acad Sci USA*. 89, 4734-4738.
34. Engelhard, VH.. (1994) Structure if peptides associated with class I and class II MHC molecules. *Ann Rev.Immunol*. 12, 181-207.
35. Degen, E., Cohen-Coyle, MF., Williams, DB.. (1992) Efficient dissociation of the p88 chaperone from major histocompatibility complex class I molecules requires both beta2-microglobulin and peptide. *J Exp Med*. 175, 1653-1661.
36. Deverson, EV., Gow, IR., Coadwell, WJ., Monaco, JJ., Butcher, GW., Howard, JC., (1990) MHC class II region encoding proteins related to the multidrug resistance family of transmembrane transporters. *Nature*. 348, 738-741.
37. Kleijmerr, MJ., Kelly, A., Geuze, HJ., Slot, JE., Townsed, A., Trowsdale, J.. (1992) Location of MHC-encoded transporters in the endoplasmic reticulum and cis-golgi. *Nature*. 357, 342-344.
38. Trowsdale, J., Hanson, I., Mockridge, I., Beck, S., Townsend, A., Kelly, A., (1990) Sequences encoded in the class II region of the MHC related to the "ABC" superfamily of transporters. *Nature*. 348,741-744.
39. Powis, SJ., Townsend, AR., Deverson, EV., Bastin, J., Butcher, GW., Howard, JC.. (1991) Restoration of antigen presentation to the mutant cell line RMA-S by an MHC-linked transporter. *Nature*. 354, 528-531.
40. Sadasivan, B., Lehner, JC., Ortman, B., Spies, T., Cresswell, P.. (1996) Roles for calreticulin and a novel glycoprotein, tapasina, in the interaction of MHC class I molecules with TAP. *Immunity* 5, 103-114.
41. Ortman, B., Androlewicz, MJ., Cresswell, P.. (1994). MHC class I β 2 microglobulin complex associate with TAP transporters before peptide binding. *Nature*. 368, 864-867.
42. Suh, W-K., Cohen-Doyle, MF., Fruh, KW., Peterson, PA., Williams ,DB.. (1994) Interaction of MHC class I molecules with the transporter associated with antigen processing. *Science*. 264, 1322-1326.

43. Moore, MW., Carbone, FR., Bevan, MJ.. (1988) Introduction of soluble protein into class I pathway of antigen processing and presentation. *Cell*. 54, 777-785.
44. Rock, KL., Rothstein, L., Gamble, S., Fleischacker, C.. (1993) Characterization of antigen-presenting cells that present exogenous antigen in association with class I MHC molecules. *J. Immunol.* 150, 438-446.
45. Norbury, C.C., Hewlett, L.J., Prescott, A.R., Shastri, N., Watts, C.. (1995) Class I MHC presentation of exogenous soluble antigen via macropinocytosis in bone marrow macrophages. *Immunity*. 3,783-791.
46. Vignali, D. A. A., y Strominger, J. L., (1994). Coreceptor function and the characteristics of MHC-bound peptides. *A common link? The Immunologist* 2, 112-118
47. Brown, J., Jardetzky, T., Gorga, J. C., Stern, L. J., Urban, R. G., Strominger, J L, y Wiley, D. C.. (1993). Three dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* 332, 845-850
48. Chicz, R.M., Urban, R. G., Gorga, J. C., Vignali, D. A. A., Lane, W. S., y Strominger, J. L. (1993). Specificity and promiscuity among naturally processed peptides bound to HLA-DR alleles. *J. Exp. Med.* 178, 27-47
49. Rudensky, A. Y., Preston- Hurlburt, P, Al-Ramadi, B. K., Rothbard, J., y Janeway C. A.. (1992). Truncation variants of peptides isolated from MHC class II suggest sequence motifs. *Nature* 359, 429-431
50. Rudensky, A. Y., Preston- Hurlburt, P, Hong, S- C. H., Barlow, A, y Janeway C. A. (1991). Sequence analysys of peptides bound to MHC class II molecules. *Nature* 353, 622-624
51. Weiss, S., Bogen., B.. (1991) MHC class II-restricted presentation of intracellular antigen. *Cell* 64, 767-776
52. Nuchtern, J. G., Biddison, W.E., and Klausner, R. D.. (1990). Class II MHC molecules can use the endogenous pathway of antigen presentation. *Nature* 354, 392-394.
53. Kvist, S., Wiman, K., Claesson, L., Peterson, PA., Dobberstein, B.. (1982) Membrane insertion and oligomeric assembly of HLA-DR histocompatibility antigens. *Cell* 29, 61-69
54. Roche, P. A., Marks, M. S., y Cresswell, P.. (1991). Formation of nine-subunit complex by HLA class II glycoproteins and the invariant chain. *Nature* 354, 392-394
55. Anderson, SK., Cresswell, P..(1994) A role for calnexine (IP90) in the assembly of class II MHC molecules. *EMBO Journal*. 13, 675-682.
56. Bonnerot, CH., Marks, MS., Cosson, P., Robertson, EJ., Bikoff, EX., Germain, RN., Bonifacino, JS.. (1994) Association with Bip and aggregation of class II MHC molecules synthesized in the absence of invariant chain. *EMBO Journal*. 13, 934-944.

57. Nijenhuis, M., and Neeffjes, J. J.. (1994). Early events in the assembly of major histocompatibility complex class II heterotrimeric complexes from their free subunits. *Eur. J. Immunol.* 24, 247-256.
58. Bikoff, E. K., Huang, L.- Y., Episkopou, V., van Meerwijk, J., Germain, R. N., y Robertson, E. J.. (1993). Defective major histocompatibility complex class II assembly, transport peptide acquisition and CD4+ T cell selection in mice lacking invariant chain expression. *J. Exp. Med.* 177, 1699-1712
59. Jasanoff, A., Park, S.J., Wiley, DC. (1995) Direct observation of disordered regions in the major complex class II-associated invariant chain. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92, 5620-5629.
60. Bertolino, P., Staschewski, M., Trescol-Biemont, MC., Freisewinkel, IM, Schenck, K., Chretien, I., Forquet, F., Gerlier, D., Rabourdin-Combe, C., Koch, N. (1995) Deletion of a C-terminal sequence of class II-associated invariant chain abrogates invariant chains oligomer formation and class II antigen presentation. *J Immunol.* 154, 5620-5629.
61. Ghosh, P., Amaya, M., Mellins, E., Wiley, DC. (1995) The structure of an intermediate in class II MHC maturation: CLIP bound to HLA-DR3. *Nature.* 378, 457-462.
62. Zhong, G., Castellino, F., Romagnoli, P., Germain, R.N. (1996) Evidence that binding site occupancy is necessary and sufficient for effective major histocompatibility complex (MHC) class II transport through the secretory pathway redefines the primary function of class II-associated invariant chain peptides (CLIP). *J Exp Med* 184, 2061-2066.
63. Viville, S., Neeffjes, J., Lotteau, V., Dierich, A., Leleur, M., Ploegh, H., Benoist, C., y Mathis, D.. (1993). Mice lacking the MHC class II-associated invariant chain. *Cell* 72, 635-648
64. Bijlmakers, M-J., Benaroch, P., Ploegh, H L.. (1994) Assembly of HLA DR1 molecules translated in vitro: binding of peptide in the endoplasmic reticulum precludes association with invariant chain. *EMBO Journal.* 13, 2699-2707
65. Cresswell, P. (1996). Invariant Chain Structure and MHC Class II Function molecules. *Cell.* 84, 505-507.
66. Strubin, M., Berte, C., Mach, B.. (1986) Alternative splicing and alternative initiation of translation explain the four forms of the Ia antigen-associated invariant chain. *EMBO J.* 5,3483-3488.
67. O'Sullivan, DM., Noonan, D., Quaranta, V., (1987) Four Ia invariant chain forms derive from a single gene by alternate splicing and alternate initiation of transcription / translation. *J. Exp. Med.* 166, 440-460.
68. Hammerling, G. J. y Moreno, J.. (1990). The function of the invariant chain in antigen presentation by MHC class II molecules. *Immunology Today* 11, 337-340
69. Roche, P. A., Cresswell, P.. (1990). Invariant chain association with HLA-DR molecules inhibits immunogenic peptide binding. *Nature* 345, 615-618

70. Bakke, O., Dobberrstein, B.. (1990). MHC class II-associated invariant chain contains a sorting signal for endosomal compartments. *Cell* 63, 707-716
71. Lotteau, V., Teyton, L., Peleraux, A., Nilsson, T., Karlsson, L., Schmid, S. L., Quaranta, V., y Peterson, P. A.. (1990), Intracellular transport of class II MHC molecules directed by invariant chain. *Nature* 348, 600-605.
72. Pieter, J., Bakke, O., Dobberstein, B., (1993) The MHC class II-associated invariant chain contains two endosomal targeting signals within its cytoplasmic tail. *Journal of Cell Science*. 106, 831-846.
73. Simosen, A., Momburg, F., Drexler, J., Hämmerling, G.J., Bakke, O.. (1993) Intracellular distribution of the MHC class II molecules and the associated invariant chain in different cell lines. *Int immunol.* 5, 903-917.
74. Romagnoli, P., Layet, C., Yewdell, J., Bakke, O., Germain, RN. (1993) Relationship between invariant chain expression and major histocompatibility complex class II transport into early and late endocytic compartments. *The Journal of Experimental Medicine*. 177, 583-596.
75. Neefjes J. J., Stollorz, V., Peters, P. J., Geuze, H. J., y Ploegh, H. L. (1990). The biosynthetic pathway of MHC class II but not class I molecules intersects the endocytic route. *Cell* 61, 171-183
76. Peters, P. J., Neefjes, J.J., Oorschot, V., Ploegh, H. L., and Geuze, H.J.. (1991). Segregation of MHC molecules from MHC class I molecules in the Golgi complex for transport to lysosomal compartments *Nature*. 349,669-676
77. Cresswell, P. (1985) Intracellular class II HLA antigens are accessible to transferrin-neuraminidase conjugates internalized by receptor-mediated endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci* 82, 8188-8192.
78. Guagliardi, L. E., Koppelman, B., Blum, J. S., Marks, M.S.; Cresswell, P., y Brodsky, F. M.. (1990). Co-localization of molecules involved in antigen processing and processing and presentation in an early endocytic compartment. *Nature* 343, 133-139
79. Amigorena, S., Drake, J.R., Webster, P., Mellman, I.. (1994) Transient accumulation of new class II MHC molecules in a novel endocytic compartment in B lymphocytes. *Nature* 369,113-119
80. Castellino, F., Germain, R.N. (1995) Extensive trafficking of MHC class II-invariant chain complexes in the endocytic compartments. *Immunity* 2, 73-88
81. Glickman, J. N., Morton, P. A., Slot, J.W., Kornfel, S., Geuze, H.J.. (1996) The biogenesis of the MHC class II compartment in human I-cell disease B lymphoblasts. *J Cell Biology* 132, 769-785.
82. Benaroch, P., Yilla, M., Raposo, G., Ito, K., Miwa, K., Geuze, HJ., Ploegh, HL.. (1995) How MHC class II molecules reach the endocytic pathway. *EMBO J.* 14, 37-49.
83. Harding, C.V., Geuze, H.J.. (1993) Immunogenic peptides bind to class II molecules in an early lysosomal compartment. *Curr. Opin. Cell Biol* 5, 596-605.

84. Kleijmeer, M.J., Morkowski, S., Griffith, J.M., Rudensky, A. Y., Geuze, H.J.. (1997) Major histocompatibility complex class II compartments in human and mouse B Lymphoblasts represent conventional endocytic compartments. *J Cell Biology* 139, 639-649.
85. Pierre, P., Mellman, I. (1998) Exploring the mechanisms of antigen processing by cell fractionation. *Curr Opin Immunol.* 10, 145-153.
86. Simonsen, A., Momburg, F., Drexler, J., Hammerling, G.J., Bakke, O.. (1993) Intracellular distribution of the MHC class II molecules and the associated invariant chain (Ii) in different cell lines. *Int. Immunol.* 5, 903-907.
87. Brachet, V., Raposo, G., Amigorena S., Mellman I. Ii Chain controls the transport of major histocompatibility complex class II molecules to and from lysosomes. (1997) *J Cell Biol* 173,51-65.
88. Pierre, P., Mellman, I. (1998) Developmental regulation of invariant Chain proteolysis controls MHC class II trafficking in mouse dendritic cells. *Cell* 93, 1135-1145.
89. Roche, PA., Teletski, CL., Stang, R., Bakke, O., Long, E.. (1993) Cell surface HLA-DR-invariant chain complexes are targeted to endosomes by rapid internalization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 8581-8585.
90. Chervonsky, AV., Gordon, L., Sant, AJ., (1994) A segment of the MHC class II β chain plays a critical role in targeting class II molecules to the endocytic pathway. *International Immunology.* 6, 973-982.
91. Roche, PA., Teletski, CL., Stang, E., Oddmund, B., Long, EO.. (1993) Cell surface HLA-DR-invariant complex are targeted to endosomes by rapid internalization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90,8581-8585.
92. Wang, K., Peterson, P.A., Karlsson, L. (1997) Decreased endosomal delivery of major histocompatibility complex class II-invariant chain complexes in dynamin-deficient cells. *J. Biol. Chem.* 272, 17055-17060.
93. Roche, P. A., y Creswell, P.. (1991). Proteolysis of class II- associated invariant chain generates a peptide binding site in intracellular HLA-DR molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 3150-3154
94. Morton, P.A., M.L. Zacheis., K.S. Giacometto., J.A Manning., B.D. Schwartz.. (1995) Delivery of nascent MHC class II-Invariant chain by cysteine proteases precedes peptide binding in B-lymphoblastoid cells. *J. Immunol* 154, 137-150.
95. Amigorena, S., P. Webster., J. Drake., J. Newcomb., P. Cresswell., I. Mellman.. (1995) Invariant chain cleavage and peptide loading in major histocompatibility complex class II vesicles. *J. Exp. Med.* 181, 1729-1741.
96. Nguyen, QV., Knapp, W., Humphreys, RE (1989) Inhibicion por leupeptin and antipain of the proteolysis of Ii. *Human Immunol.* 24, 153-163
97. Riberdy, J. M., Newcomb, J. R., Surman, M. J., Barbosa, J. A., y Cresswell, P.. (1992). HLA-DR molecules from an antigen-processing mutant cell line are associated with invariant chain peptides. *Nature* 360, 474-477

98. Stumptner, P., Benaroch, P.. (1997) Interaction of MHC class II molecules with the invariant chain: role of the invariant chain (81-90) region. *EMBO J* 16, 5807-5818.
99. Blum, J., Cresswell, P.. (1988) Role for intracellular proteases in the processing and transport of class II HLA antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 3975-3979
100. Reyes, V. E., y Humphreys, R. E.. (1991). Cathepsin B cleavage of Ii from class II MHC a- and b-chains. *J. Immunol* 146, 3877-3880
101. Maric, M.A., Taylor, M.D., Blum, J. S.. (1994) Endosomal aspartic proteinases are required for invariant-chain processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 2171-2175.
102. Avva, P.R., Cresswell, P., (1994) In vivo and in vitro formation and dissociation of HLA-DR complexes with invariant chain-derived peptides. *Immunity* 9, 763-774.
103. Deussing, J., Roth, W., Saftig, P., Peters, C., Ploegh, H.L., Villadangos, J.A.. (1998) Cathepsins B and D are dispensable for major histocompatibility complex class II-mediated antigen presentation. *Proc Natl Acad Sci* 95, 4516-4521.
104. Villadangos, J.A., Riese, R.J., Peters, C., Chapman, H.A., Ploegh, H.L.. (1997) Degradation of mouse Invariant Chain: Roles of Cathepsins S and D and the influence of major histocompatibility complex polymorphism. *J. Exp. Med* 186, 549-560.
105. Riese, R.J., P.R. Wolf., D. Bromme., L. R. Natkin., J.A. Villadangos., H. L. Ploegh., H.A. Chapman.. (1996). Essential role for cathepsin S in MHC class II-associated invariant chain processing and peptide loading. *Immunity* 4, 357-366.
106. Nakagawa, T., Roth, W., Wong, P., Nelson, A., Farr, A., Deussing, J., Villadangos, J.A., Ploegh, H., Peters, C., Rudensky, A.Y.. (1998) Cathepsin L: a critical role in Ii degradation and CD4 T cell selection in the thymus. *Science* 280, 450-453.
107. Shi, G.P., Villadangos, J.A., Dranoff, G., Small, C., Kathleen, J.H., Riese, R., Ploegh, H.L., Chapman, H.A.. (1997) Cathepsin S required for normal MHC class II peptide loading and germinal center development. *Immunity*. 10, 197-206.
108. Shi, G.P., A.C. Web., K.E. Foster., J.H.M. Knoll., C.A. Lemere., J.S. Munger., H.A. Chapman.. (1994) Human cathepsin S: chromosomal localization, gene structure and tissue distribution. *J. Biol. Chem* 269, 11530-11536.
109. Denzin, L K., Cresswell, P.. (1995). HLA-DM induce CLIP dissociation from MHC class II alpha beta dimers and facilitates peptide loading. *Cell* 62, 155-165
110. Sloan, V.S., Cameron, P., Porter, G., Gammon, M., Amaya, M., Mellins, E., Zaller, D.M.. (1995) Mediation by HLA-DM of dissociation of peptides from HLA-DR. *Nature*. 375, 802-804.
111. Kelly, P., Monaco, J.J., Cho, S., Trowsdale, J.. (1991) New human HLA class II-related molecules, DM. *Nature* 355, 571-573.
112. Radley, E., Alderton, R P., Kelly, A., Trowsdale, J., Beck, S.. (1994) Genomic Organization of HLA-DMA and HLA-DMB. *The Journal of Biological Chemistry* 269, 18834-18838.

113. Sanderson, F., Kleijmer, M J., Kelly, A., Verwoerd, D., Tulp, A., Neeffjes, J J., Geuze, HJ., Trowsdale, J.. (1994) Accumulation of HLA-DM, a regulator of antigen presentation in MHC class II Compartments. *Science* 226, 1566-1569.
114. Lindstedt, R., Lijedahl, M., Péléraux, A., Peterson, P A., Karlsson, Lars.. (1995) The MHC Class II Molecule H2-M Is targeted to an Endosomal Compartment by a Tyrosine-Based Targeting Motif. *Cell* 3, 561-572.
115. Fremont, D.H., Craawford, F., Marrack, P., Hendrickson, W.A., Kappler, J.. (1998) Crystal Structure of Moouse H2-M. *Immunity* 9, 385-393.
116. Mosyak, L., Zaller, D.M., Wiley, D.C.. (1998) The structure of HLA-DM, the peptide exchange catalyst that loads antigen onto class II MHC molecules during antigen presentation. *Immunity* 9, 377-383.
117. Kropshofer, H., Arndt, S. O., Moldenhauer, G., Hammerling, G.J., Vogt, A. B.. (1997) HLA-DM acts as a molecular chaperone and rescues empty HLA-DR molecules at lysosomal pH. *Immunity* 6, 293-302.
118. Morris, P., Shaman, J., Attaya, M., Amaya, M., Goodman, S., Bergman, C., Monaco, J.J., Mellins, E.. (1994) An essential role for HLA-DM in antigen presentation by class II major histocompatibility molecules. *Nature* 368, 551-554.
119. Liljedahi, M., Winqvist, O., Surh, C.D., Wong, P., Ngo, K., Teyton, L., Peterson, P.A., Brunmark, A., Rudenskky, A.L., Fung-leung, W-P., Karlsson, L.. (1998) Altered antigen presentation in mice lacking H2-O. *Immunity* 8, 233-243.
120. Fung-Leung, W-P., Surh, CD., Lijedahl, M., Pang, J., Leturcq, D., Peterson, PA., Webb, SR., Karlsson, L.. (1996) Antigen presentation and T Cell Development in H2-M-Deficient Mice. *Science* 271, 1278-1281.
121. Martin, D. W., Hicks, G.G., Mendiratta, S.K., Leva, H.I., Ruley, H. E., Kaer, L.V.. (1996) H-2M Mutant Mice are defective in the peptide loading of class II molecules, antigen presentation, and T cell repertorie selection. *Cell* 84, 543-550.
122. Stebbins, C. C., Loss, G. E., Jr., Elias, C. G., Chervonsky, A., Sant, A. J.. (1995) The requirement for DM in class II-restricted antigen presentation and SDS-stable dimer formation is allele and species dependent. *J Exp Med* 181, 223-234.
123. Kropshofer, H., Vogt, A.B., Stern, L.J., Hämmerling, GJ., (1995) Self-Release of CLIP in Peptide Loading of HLA-DR Molecules. *Science* 270, 1357-1359.
124. Tulp, A., Verwoerd, D., Dobberstein, B., Ploegh, H. L., y Pieters, J.. (1994). Isolation and characterization of the intracellular MHC class II compartment. *Nature* 369, 120-126
125. Calafat, J., Nijenhuis, M., Janssen, H., Tulp, a., Dusseljee, S., Wubbolts, R., Neeffjes, J.. (1994) Major Histocompatibility Complex Class II Molecules Induce the Formation of Endocytic MIIC-like Structures. *The Journal of Cell Biology* 126, 967—977.
126. Kleijmeer, M.J., Raposo, G., Geuze, H.J.. (1996) Characterization of MHC compartments by immunoelectron microscopy *Methods* 10, 191-207.

127. Nijman, H.W., M.J. Kleijmeer., M.A. Ossevoort., V.M.J. Oorschot., M.P.M. Vierboom., M. van de Keur., P. Kenemans., W.M. Kast., H.J. Geuze., C.M.J. Melief.. (1995) Antigen capture and MHC class II compartments of freshly isolated and cultured human blood dendritic cells. *J. Exp. Med.* 182, 163-174
128. West, M.A., Lucocq, J M., Watts, C.. (1994). Antigen processing and class II MHC peptide loading compartments in human B-lymphoblastoid cells. *Nature* 369, 147-150
129. Qiu, Y., Wandinger-Ness, A., Dalke, D.P., Pierce, S.K.. (1994) Separation of subcellular compartments containing distinct functional forms of MHC class II. *J. Cell Biol.* 125, 595-605.
130. Pierre, P., Turley, S.J., Gatti, E., Hull M., Meltzer, J., Mirza, A., Inaba, K., Steinman, R.M., Mellman, I. (1997) Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells. *Nature* 388, 787-792.
131. Sanderson, F., Kleijmeer, M.J., Kelly, A., (1994) DM, and HLA-class II molecule with and accessory function in antigen presentation, accumulates in an intracellular class II compartment. *Science* 266,1566-1569.
132. Geuze, H.J.. (1998) The role of endosomas and lysosomes in MHC class II functioning. *Immunology today* 19, 282-287.
133. Escola, J.M., Grivel, J.C., Chavrier, P., Gorvel, J.P.. (1995) Different endocytic compartments are involved in the tight association of class II molecules with processed hen egg lysozyme and ribonuclease A in B cells *J. Cell Sci* 108, 2337-2345.
134. Fernandez-Borja M.. (1996) HLA-DM and MHC class II molecules co-distribute with peptidase-containing lysosomal subcompartments. *Int immunol* 8, 625-640
135. Ferrari, G., Knigh, M.A., Watts, C., Pieters, J., (1997) Distinct intracellular compartments involved in invariant chain degradation and antigenic peptide loading o major histocompatibility complex (MHC) class II molecules. *J. Cell Biol* 139, 1433-1446.
136. Germain, R.N., Rinker Jr, A.G.. (1993) Peptide binding inhibits protein aggregation of invariant-chain free class II dimers and promotes surface expression of occupied molecules. *Nature* 363, 735-728
137. Sadegh-Nassery, S., McConell, H. M.. (1989). A kinetic intermediate in the reaction of an antigenic peptide and I-E^k. *Nature* 337, 274-276
138. Agrawal, B, Fraga, E., Kane, K., Singh, B.. (1994) Up-regulation of the MHC clas II molecules on B Cells by peptide ligands. *J Immunology* 3, 965-975
139. Raposo, G., Nijaian, H.W., Leijendekker, S.R., Harding, C.V., Mellet, C.JM., Geuze, U.J. (1996). B Lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J. Exp. Med* 183, 1161- 1172.
140. Wubbolts, R., Fernandez-Borja, M. Oomen, L., Verwoerd, D., Janssen, H., Calafat, J., Tulp, A., Dusseljee, S., Neeffes, J. (1996). Direct vesicular transport os MHC class II molecules from lysosomal structures to the cell surface. *J Cell Biology* 135, 611-622.

141. Pond, L., Watts, C. (1997). Characterization of transport of newly assembled, T cell-stimulatory MHC class II-peptide complex from MHC class II compartments to the cell surface. *J Immunol* 159,543-533.
142. Rothman, J.E., Wieland, F.T.. (1996) Protein sorting by transport vesicles. *Science* 272, 227-233.
143. Springer, S., Spang, A., Schelman, R.. (1999) A primer on vesicle budding. *Cell* 97, 145-148.
144. Goud, B., McCaffrey, M.. (1991) Small GTP-binding proteins and their role in transport. *Current Opin Cell Biol* 3, 626-633.
145. Nichols, B.J., Ungerman, C., Pelham, H.R.B., Wickner, W.T., Hass, A.. (1997) Homotypic vacuolar fusion mediated by t- and v-SNAREs. *Nature* 387, 199-202.
146. Weber, T., Zemelman, B.V., McNew J.A., Westermann, B., Gmachl, M., Parlati, F., Söllner, Rothman, J.E.. (1998) SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell* 92, 759-772.
147. Söllner, T., Whiteheart, S.W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P., Rothman, J.E.. (1993) SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* 362, 318-324.
148. Novick, P., Brennwald, P.. (1993) Friends and family: The role of Rab GTPases in vesicular traffic. *Cell* 75, 597-601.
149. Brednarek, S.Y., Ravazzola, M., Hosobuchi, M., Amherdt, M., Perrelet, A., Schekman, R., Orci, L.. (1995). COPI and COPII-coated vesicles bud directly from the endoplasmic reticulum in yeast. *Cell* 83, 1183-1196
150. Chardin, P., McCormick, F.. Brefeldin A: (1999) the advantage of being uncompetitive. *Cell* 97, 135-155.
151. Donaldson, J.G., Cassel, D., Kahn, R.A., Klausner, R.D.. (1992b) Brefeldin A inhibits Golgi membrane-catalyzed exchange of guanine nucleotide onto ARF protein. *Nature* 360, 350-352.
152. Wendland, B., Emr, S. D./ Riezman, H.. (1998) Protein traffic in the yeast endocytic and vacuolar protein sorting pathways. *Current Opin Cell Biol* 10, 513-522.
153. Roberts, D.L., Weix, D.J. Dahms, N.M., Kim, J-J.P.. (1998) Molecular basis of lysosomal enzyme recognition: three dimensional structure of the cation-dependent mannose 6-Phosphate receptor. *Cell* 93, 639-648.
154. Le Borgne R, Griffiths, G., Hoflack, B.. (1996) Mannose-6-phosphate receptors and ADP-ribosylation factors cooperate for high affinity interaction of the AP-1 golgi assembly proteins with membranes. *J. Biol Chem* 271, 2162-2170.
155. Mollenhauer, H.H., Morre, D. J., Rowe, L.D.. (1990) Alteration of intracellular traffic by monensin; mechanism, specificity and relationship to toxicity. *Biochim. Biophys. Acta* 1031, 225-246.

156. Wileman, T., Boshans, R.L., Schlesinger, P., Stahl, P.. (1984) Monensin inhibits recycling of macrophage mannose-glycoprotein receptors and ligand delivery to lysosomes. *J. Biochem* 220,665-675.
157. Mahaffey, D.T., Peeler, J.S., Brodsky, F.M., Anderson, R.G.. (1990) Clathrin-coated pits contain an integral membrane protein that binds the AP-2 subunit with high affinity. *J. Biol Chem* 265, 16514-1620.
158. Anderson, R.G.. (1993a) Plasmalemmal caveolae and GPI-anchored membrane proteins, *Curr. Opin. Biol* 5, 947-652.
159. Benmerah, A., Gagnon, J., Begue, B., Megarbane, B., Dautry, V.A., Cerf, B.N.. (1995) The tyrosine kinase substrate eps15 is constitutively associated with the plasma membrane adaptor AP-2. *J. Cell Biol* 131, 1831-1838.
160. Pishvae, B., Payne, G.S.. (1998) Clathrin coats threads laid bare. *Cell* 95, 443-446.
161. Robinson, S.M.. (1994) The role of clathrin, adaptors and dynamin in endocytosis. *Curr. Opin. Cell Biol* 6, 538-544.
162. Sever, S., Muhlberg, A.B., Schmid, S. L.. (1999) Impairment off dynamin's GAP domain stimulates receptor-mediated endocytosis. *Nature* 402, 481-486.
163. Simpson, F., Peden, A.A., Christopoulou, L., Robbinson, M.S.. (1997) Chatacterization of the adaptor-related protein complex, AP-3. *J. Cell Biol* 137, 835-845.
164. Novick, P., Zerial, M.. (1997) The diversity of Rab proteins in vesicle transport. *Curr. Opin. Cell Biol* 9, 496-504.
165. Stenmark, H., Valencia, A., Martínez, O., Urlich, O., Goud, B., Zerial, M.. (1994) Distinct structurak elements of Rab 5 defines its funcional specificity. *EMBO J* 94, 13163-13168.
166. Bottger, G., Nagelkerken, B., van der Sluijs, P.. (1996) Rab 4 and Rab 7 define distinct noverlapping endosomal compartments. *J. Biol Chem* 271, 29191-29197.
167. Press, Barry., Feng, Y., Hoflack, B., Wandinger-Ness, A.. (1998) Mutant Rab 7 causes the accumulation of cathepsin D and cation-independent mannose 6-phosphate receptor in an early endocytic compartment. *J. Cell Biol* 140, 1075-1089.
168. Feng, Y., Press, B., Wadinger-Ness, A., (1995) Rab 7: An I mportant regulator of late endocytic mcmbane traffic. *J. Cell Biol* 139, 1433-1446.
169. Pfeffer, S.. (1994) Rab GTPases: Master regulators of membrane trafficking. *Curr. Opin. Cell Biol* 6, 522-526.
170. Watts, C..(1997) Capture and processing of exoogenous antigens for presentation by MHC molecules. *Annu Rev. Immunol* 15, 821-850.
171. Mellman, I.. Endocytosis and molecular sorting. (1996) *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol* 575-625.

172. Besterman, J.M., Airhart, J.A., Woodworth, R.C., Low, R.B.. (1981) Exocytosis of pinocytosed fluid in cultured cells: Kinetic evidence for rapid turnover and compartmentation. *J. Cell. Biol* 91, 716-727.
173. Steinman, R.M., Swanson, J.. (1995) The endocytic activity of dendritic cells. *J Exp Med* 182, 283-288.
174. Mellman, I., Plutner, H.. (1984) Internalization and degradation of macrophage Fc receptors bound to polyvalent immune complexes. *J Cell Biol* 98, 1170-1176.
175. Smythe, E., Redelmeier, T.E., Schmid, S.L.. (1992) Receptor-mediated endocytosis in semintact cells. *Meth. Enzymol* 219,223-234.
176. Hunziker, W., Fumey, C.. (1994) A di leucine motif mediated endocytosis and basolateral sorting of macrophage IgG Fc receptors in MDCK cells. *EMBO J* 13,2963-2967.
177. Ohno, H., Stewart, J., Fournier, M.C., Bosshart, H., Rhee, I.. (1995) Interaction of tyrosine-based sorting signals with clathrin-associated proteins. *Science* 269, 1872-1875.
178. Riezman, H., Woodman, G.P., Van Meer, G., Marsh, M.. (1997) Molecular mechanisms of endocytosis. *Cell* 91, 731-738.
179. Drake, J.R., Webster, P., Cambier, J.C., Mellman, I.. (1997) Delivery of B cell receptor-internalized antigen to endosomes and class II vesicles. *J. Exp Med* 186, 1299-1306.
180. Palade, G.. (1975) Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* 189, 347-358.
181. Walter, P., Lingappa, V.R.. (1986) Mechanism of protein translocation across the endoplasmic reticulum membrane. *Annu. Rev. Cell Biol* 2,499-516.
182. Andrews, D.W., Johnson, A.E.. (1996) The translocon: more than a hole in the ER membrane? *Trends Biochem. Sci* 21, 365-369.
183. Crowley, K.S., Reinhart, G.D., Johnson, A.E.. (1993) The signal sequence moves through a ribosomal tunnel into a noncytoplasmic aqueous environment at the ER membrane early in translocation. *Cell* 73, 1101-1115.
184. Rapoport, T.A., Jungnickel, B., Kutay, U.. (1996) Protein transport across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial inner membranes. *Annu. Rev. Biochem* 65, 271-303.
185. Oliver, J., Jungnickel, B., Görlich, D., Rapoport, T., High, S.. (1995) The Sec61 complex is essential for the insertion of proteins into the membrane of the endoplasmic reticulum. *FEBS Lett* 362,126-130.
186. Isidoro, C., Maggioni, C., Demos, M., Pizzagalli, A., Fra, A.M., Sitia, R.. (1996) Exposed thiols confer localization in the endoplasmic reticulum by retention rather than retrieval. *J. Biol Chem* 271, 26138-26142.

187. Rothman, J.E.. (1994) Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature* 372, 55-63.
188. Bremser, M., Nickel, W., Schweikert, M., Ravazzola, M., Amherdt, M., Hughes, C.A., Söllner, T.H., Rothman, J.E., Wieland, F.T.. (1999) Coupling of coat assembly and vesicle budding to packaging of putative cargo receptors. *Cell* 96, 495-506.
189. Munro, S., Pelham, H.R.B.. (1986) An Hsp70-like protein in the ER: identity with the 78 Kd glucose regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein. *Cell* 46, 291-300.
190. Andres, D.A., Dickerson, I.M., Dixon, J.E.. (1990) Variants of the carboxyl-terminal KDEL sequence direct intracellular retention. *J. Biol Chem* 265,5952-5955
191. Pelham, H. R.B.. (1989) Control of protein exit from the endoplasmic reticulum. *Annu Rev. Cell Biol* 5, 1-23.
192. Munro, A., Pelham, H R.B., (1987)A C- terminal signal prevents secretion of luminal ER Proteins. *Cell* 48, 899-907.
193. Yun, H.Y., Eipper, B.A.. (1995) Addition of an endoplasmic reticulum retention/retrieval signal does not block maturation of enzymatically active peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase. *J Biol Chem* 270, 15412-15416
194. Scheel, A.A., Pelma, H.R.. (1996) Purification and characterization of the human KDEL receptor. *Biochemistry* 35, 10203-10209.
195. Lewis, M.J., Pelham, H.R.. (1992) Ligand-induced redistribution of a human KDEL receptor from the golgi complex to the endoplasmic reticulum. *Cell* 68, 353-364.
196. Cosson P., Letourneur, F.. (1994) Coatomer interaction with di-lysine endoplasmic reticulum retention motifs. 263, 2629-2631.
197. Nilsson, T., Warren, G.. (1994) Retention and retrieval in the endoplasmic reticulum and the golgi apparatus. *Curr Opin Cell Biol* 4, 517-521.
198. Sönnichsen, B., Füllekrug, J., Nguyen Van, P., Diekmann, W., Robinson, D.G., Mieskes, G.. (1994) Retention and retrieval: both mechanisms cooperate to maintain calreticulin in the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci* 107, 2705-2717.
199. Vincent, M.J., Martin, A.S., Compans, R.W.. (1998) Function of the KKXX in endoplasmic reticulum retrieval of a transmembrane protein depends on the length and structure of the cytoplasmic domain. *J. Biol Chem* 273, 950-956.
200. Kaiser, C., Ferro-Novick, S.. (1998) Transport from the endoplasmic reticulum to the golgi. *Curr Opin Cell Biol* 10, 477-482.
201. Schafer, W., Stroh, A., Berghofer, S., Seiler, J., Vey, M., Kruse, M.L., Kern, H.F., Klenk, H.D., Garten, W.. (1995) Two independent targeting signals in the cytoplasmic domain determine trans-golgi network localization and endosomal trafficking of the protein convertase furin. *EMBO J* 14, 2424-2435.

202. Geuze, H.J., Slot, J.W., Strous, G.J., Peppard, K., Von Figura, K.. (1985) Possible pathways for lysosomal enzyme delivery. *J. Cell Biol* 101, 2253-2262.
203. Weiss, S., and Bogen, B.. (1991). MHC class II- restricted presentation of intracellular antigen. *Cell* 64,767-776.
204. Authier, F., Posner, B.I., Bergeron, J.J.. (1996) Endosomal proteolysis of internalized proteins. *FEBS Lett.* 389, 55-60.
205. Lupas, A., Flanagan, J.M., Tamura, T., Baumeister, W.. (1997) Self-compartmentalizing proteases. *Trends Biochem. Sci* 22, 399-404.
206. Niedermann, G., Grimm, R., Geir, E., Maurer. M., Realini, C., Gartmann, C., Soll, J., Omura, S., Rechsteiner, M.C., Baumeister, W., Eichmann, K.. (1997) Potencial immunocompetence of proteolytic fragments produced by proteasomes before evolution of the vertebrate immune system. *J. Exp Med* 185, 209-220.
207. Chapman, H. A.. (1998) Endosomal proteolysis and MHC class II function. *Current Opinion Immunol* 10, 93-102.
208. Ziegler, H.K., Unanue, E.R.. (1982) Decrease in macrophage antigen catabolism caused by ammonia and chloroquine is associated with inhibition of antigen presentation to T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 79, 175-178.
209. Nowell J., Quaranta, V.. (1985) Chloroquine affects biosynthesis of Ia molecules by inhibiting dissociation of invariant chains (g) from α - β dimers in B cells. *J Exp Med* 162, 1371-1376.
210. Fineschi, B., Miller, J.. (1997) Endosomal proteases and antigen processing. *Trends. Biochem Sci* 22, 377-382.
211. Van Noort, J.M., Jacobs, M.J.. (1994) Cathepsin D, but not cathepsin B, releases T cell stimulatory fragments from lysozyme that are functional in the context of multiple murine class MHC molecules. *Eur. J. Immunol* 24, 2175-2180.
212. Bennett, K., Levine, T., Ellis, J.S., Peanasky, R.J., Samloff, I.M., Kay, J., Chain, B.M.. (1992) Antigen processing for presentation by class II major histocompatibility complex requires cleavage by cathepsin E. *Eur J. Immunol* 22, 1519-1524.
213. Gradehandt. G., Ruede, E.. (1991) The endo/lysosomal portease cathepsin B is able to process conalbumin fragments for presentation to T cells 74, 393-398.
214. Katunuma, N., Matsunaga, Y., Saibara, T.. (1994) Mechanism and regulation of antigen processing by cathepsin B. *Advan. Enzyme Regul* 34, 145-158.
215. Takahashi, H., Cease, K. B., y Berzofsky, J. A.. (1989). Identification of proteases that process distinct epitopes on the same protein. *J. Immunol* 142, 2221-2229.
216. Vidard, L., Rock, K.L., Benacerrat, B.. (1991) The generation of immunogenic peptides can be selectively increased or decreased by proteolytic enzyme inhibitors. *J. Immunol* 147, 1786-1791.
217. Puri, J., y Factorovich, Y.. (1988). Selective inhibition of antigen presentation to cloned T cells by protease inhibitors. *J. Immunol* 141, 3313-3317

218. Manoury, B., Hewitt, E.W., Morrice, N., Dando, P.M., Barrett, A.J., Watts, C.. (1998) An asparaginyl endopeptidase processes a microbial antigen for class II MHC presentation. *Nature* 396, 695-627.
219. Takeshima, H., Sakaguchi, M., Mihara, K., Murakami, K., Omura, T.. (1995) Intracellular targeting of lysosomal cathepsin D in COS cells. *J Biochem* 118, 981-988.
220. Forquet, F., Barois, N., Machy, P., Trucy, J., Zimmermann, V.S., Leserman, L., Davoust, J.. (1999) Presentation of antigens internalized through the B cell receptor requires newly synthesized MHC class II molecules. *J Immunol* 162, 3408-3416.
221. Lah, T.T., Hawley, M., Rock, K.L., Goldberg, A.L.. (1995) Gamma-interferon causes a selective induction of the lysosomal proteases, cathepsin B and L, in macrophages. *FEBS Lett* 363, 85-89.
222. Baumeister, W., Walz, J., Zühl, F., Seemüller, E.. (1998) The proteasome: Paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell* 92, 367-380.
223. Yang, Y., Früh, K., Ahn, Kwangseog, A., Peterson, P. A.. (1995) In vivo assembly of the proteasomal complexes, implications for antigen processing. *J Biol Chem* 270, 27687-27694.
224. Fu, Hongyong., Sadis, S., Rubin, D.M., Glickman, M., van Nocker, S., Finley, D., Viestra, R.D.. (1998) Multiubiquitin chain binding and protein degradation are mediated by distinct domains within the 26 S proteasome subunit Mcl1. *J Biol Chem* 273, 1970-1981.
225. Larsen, C.N., Finley, D.. (1997) Protein translocation channels in the proteasome and other proteases *Cell* 91, 431-434.
226. Löwe, J., Stock D., Jap B., Zwickl, P., Baumeister, W., Huber, R.. (1995) Crystal structure of the proteasome from the archeon *T. acidophilum* at 3.5 Å resolution. *Science* 268, 533-539.
227. Cardozo, C.. (1993) Catalytic components of the bovine pituitary multicatalytic proteinase complex (proteasome). *Enz. Prot* 47,296-305.
228. Dick, L.R., Cruikshank, A.A., Grenier, L., Melandri, F.D., Nunes, S.L., Stein, R.L.. (1996a). Mechanistic studies on the inactivation of the proteasome by lactacystin. *J. Biol. Chem* 271,7273-7276.
229. Fenteany, G., Standaert, R.F., Lanc, W.S., Choi, S., Corey, E.J., Schreiber, S.L.. (1995) Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino terminal threonine modification by lactacystin. *Science* 268, 726-731.
230. Hughes, E.A., Ortman, B., Surman, M., Cresswell, P.. (1996) The protease inhibitor N-acetyl-l-leucyl-l-leucyl-norleucinal, decreases the pool of major histocompatibility complex class I-binding peptides and inhibits peptide trimming in the endoplasmic reticulum. *J Exp Med* 183, 1569-1578.

231. Harding, C. V., France, J., Song, R., Farah, J.M., Chatterjee, S., Iqbal, M., Siman, R.. (1995) Novel dipeptide aldehydes are proteasome inhibitor and block the MHC-I antigen processing pathway. *J Immunol* 155, 1767-1775.
232. Sasaki, T., Kishi, M., Saito, M., Higuchi, N., Kominami, E., Katunuma, N., Murachi, T.. (1990) Inhibitory effect of di- and tripeptidil aldehydes on calpains and catheosins. *J. Enzyme inhib* 3, 195-201.
233. Arrigo, A.P., Tanaka, K., Goldberg, A.L., Welch, W.J.. (1988) Identity of the 19S prosome particle with the large multifunctional protease complex of mammalian cells (the proteasome). *Nature* 331, 192-194
234. Glickman, M.H., Rubin, D. M., Coux, O., Wefes, I., Pfeifer, G., Cjeka, Z., Baumeister, W., Fried, V.A., Finley, D.. (1998) A Subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-Signalosome and eIF3. *Cell* 94, 615-623.
235. Ortiz- Navarrete, V., Seeling, A., Gernold, M., Frentzel, S., Kloetzel, P.M., Hämmerling, G.J.. (1991) Subunit of "20S" proteasome (multicatalytic proteinase) encoded by the major histocompatibility complex. *Nature* 353, 662-664.
236. Eggers, M., Boes-fabian, B., Ruppert, T., Kloetzel, P.M., Koszinowski, U.H.. (1995) The cleavage preference of the proteasome governs the yield of antigen peptides. *J Exp Med* 182, 1865-1870.
237. Groettrup, M., Ruppert, T., Kuehn, L., Seeger, M., Standera, S., Koszinowski, U., Kloetzel, P.M.. (1995) The interferon- γ -inducible 11S regulator (PA28) and the LMP2/LMP7 subunits govern the peptide production by the 20 S proteasome *in vitro*. *J Biol Chem.* 270, 23808-23825.
238. Coux, O., Tanaka, K., Goldberg, A.L.. (1996) Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu. Rev Biochem* 65, 801-847.
239. Kisselev, A.F., Akopian, T.N., Woo, K.M., Goldberg, A.L.. (1999) The sizes of peptides generated from protein by mammalian 26 and 20 S proteasomas. *J Biol Chem.* 274, 3363-3371.
240. Kisselev, A.F., Akopian, T.N., Goldberg, A.L.. (1998) Range of sizes of peptide products generated during degradation of different proteins by archaeal proteasomas. 273, 1982-1989.
241. Bakau, B., Horwich, A.L.. (1998) The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* 92, 351-366.
242. Heemels, M.T., Ploegh, H.. (1995) Generation, translocation and presentation of MHC class I-restricted peptides. *Ann Rev. Biochem* 64, 463-491.
243. Lippincott Schwartz, J., Bonifacino, J. S., Yuan, L.C., Klausner, R.D. (1988) Degradation from the endoplasmic reticulum disposing of newly synthesized proteins. *Cell* 54, 209-220.
244. Bonifacino, J.S., Suzuki, C.K., Lippincott Schwrtz, J., Weissman, A.M., Klausner, R.D. (1990) A peptide sequence confers retention and rapid degradation in the endoplasmic reticulum. *Science* 247, 78-82.

245. Wileman, T., Kane, L. P., Young, J., Carson, G.R., Terhom C. (1993) Association between subunit ectodomains promote T cell antigen receptor assembly and protect against degradation in the ER. *J Cell Biol* 122, 67-78.
246. Hsu, V. W., Yuan, L. C., Nuchtern J. G., Lippincott-Schwartz, I., Hämmerling, G. I., Klausner, R. D. (1991). A recycling pathway between the endoplasmic reticulum and the golgi apparatus for retencion of unassembled MHC class I molecules. *Nature* 352, 441-444.
247. Raposo, G., VanSanten, H. M., Leijendekker, R-, Geuze, H. J., Ploegh, H. L. (1995). Misfolded major histocompatibility complex class I molecules accumulate in an expanded ER-golgi intermediate compartment. *J. Cell Biol* 131, 1403-1419.
248. Koppelman, B., Cresswell, P. (1990) Rapid nonlysosomal degradation of assembled HLA class II glycoproteins incorporating a mutant DR alpha-chain. *J. Immunol* 145, 2730-2736.
249. Cotner, T., Pious, D. (1995). HLA-DR beta chains enter into an aggregated complex containing GRP- 78/Bip prior to their degradation by the pre-Golgi degradative pathway. *J. Biol. Chem* 270, 2379-2386.
250. Gardner, A.M., S. Aviel., Argon, Y.. (1993) Rapid degradation of an unassembled immunoglobulin light chain is mediated by a serine protease and occurs in a pre-Golgi compartment. *J. Biol. Chem* 268, 25940-25949.
251. Knittler, M.R., S. Dirks., I.G. Haas.. (1995) Molecular chaperones involved in a protein degradation in the endoplasmic reticulum: quantitative interaction of the heat shock cognate protein Bip with partially folded immunoglobulin light chains that are degraded in the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 1764-1768.
252. Wikströrn, L., Lodish, F. (1991). Unfolded H2b asialoglycoprotein receptor subunit polypeptides are selectively degraded within the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol* 113, 997-1007.
253. Stafford, F. I., Bonifacino, I. S. (1991). A permeabilized cell system identifies the endoplasmic reticulum as a site of protein degradation. *J. Cell Biol* 115, 1225-1236.
254. Klausner, R. D., Sitia, R.. (1990) Protein degradation in the endoplasmic reticulum *Cell*, 62, 611-614.
255. Jensen, T. J., Loo, M.A., Pind, S., Williams, D. B., Goldberg, A. L., Riordan, J.R.. (1995). Multiple proteolytic systems, including the proteasome, contribute to CFTR processing. *Cell* 83, 129-133.
256. Ward, C. L., Omura, S., Kopito, R.R.. (1995). Degradation of CFTR by the ubiquitin-proteosome pathway. *Cell* 83, 121-127.
257. McCracken, A. A., Brodsky, J. L. (1996). Assembly of ER-associated protein degradation in vitro: dependence on cytosol, calnexin and ATP. *J. Cell Biol* 32, 291-298.

258. Huppa, J. B., Ploegh, H. L. (1997). The alpha chain of the T cell antigen receptor is degraded in the cytosol. *Immunity* 7, 113-122.
259. Hughes, E. A., Hammond, C., Cresswell P. (1997). Misfolded major histocompatibility complex class I heavy chains are translocated into the cytoplasm and degraded by the proteasome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 1896-1901.
260. Wiertz, E. L., Jones, T. R., Sun, L., Bogoy, M., Geuze, H. J., Ploegh, H. L.. (1996 a). The human cytomegalovirus US11 gene product dislocates MHC class I heavy chains from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Cell* 84, 769-779.
261. O'Hare, T., Wiens, G.D., Whitcomb E. A., Enns, C.A., Rittenberg, M.B.. (1999) Cutting Edge: Proteasome involvement in the degradation of unassembled Ig Light Chains. *J Immunol* 163, 11-14.
262. Biederer, T., Volkwein, C., Sommer, T. (1997). Role of Cuep1 in ubiquitination and degradation at the ER surface. *Science* 278, 1806-1809.
263. Wiertz, E. J. H. J., Tortorella, D., Bogoy, M., Yu, J., Mothes, W., Jones, T. R., Rapoport, T. A., Ploegh, H.L.. (1996b). Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction. *Nature* 384,432-438.
264. Pilon, M., Schekrnan, R., R6misch, K. (1997). Sec61 mediates export of a misfolded smretory protein from the endoplasmic reticulum to the cytosol for degradation. *EMBO J* 16,4540-4548.
265. Plemper, R. K., Bohmler, S., Bordallo, J., Sommer, T., Wolf, D.H. (1997). Mutant analysis links the translocon and Bip to retrograde protein transport for ER degradation. *Nature* 388, 891-895.
266. Knop, M., Finger, A., Braun, T., Hellmuth, K., Wolf D. H.. (1996). Der1, a novel protein specifically required for endoplasmic reticulum degradation in yeast. *EMBO J* 15, 753-763.
267. Bieder, T., Volkwein, C., Sommer, T.. (1996) Degradation of subunits of the Sec61p complex, an integral component of the ER membrane, by the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J* 15, 2069-2076.
268. Dussljee, S., Wubbolts, R., Verwoerd, D., Tulp, A., Janssen, H., Calafat, J., Neefjes, J. (1998) Removal and degradation of the free MHC class II β chain in the endoplasmic reticulum requires proteasomes and is accelerated by BFA. *J Cell Sci* 111, 2217-2226.
269. Yang, M., Omura, S., Bonifacino, J. S., Weissman, A. M.. (1998). Novel aspects of degradation of T cell receptor subunits from the endoplasmic reticulum (ER) in T cells: importance of oligosaccharide processing, ubiquitination, and proteasome-dependent removal from ER membranes. *J. Exp. Med* 187, 835-846.
270. Hiller, M. M., Finger, A., Schweiger, M., Wolf, D. H. (1996). ER degradation of a misfolded luminal protein by the cytosolic ubiquitin-proteasome pathway. *Science* 273, 1725-1728.

271. Qu, D., Teckman, J.H., Omura, S., Perlmutter, D. H. (1996) Degradation of a mutant secretory protein, α 1-antitrypsin Z, in the endoplasmic reticulum requires proteasome activity. *J. Biol Chem.* 271, 22791-22795.
272. Hampton, R., Gardner, R.G., Rine, J. (1996) Role of 26S proteasome and HRD genes in the degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, an integral endoplasmic reticulum membrane protein. *Mol. Biol. Cell* 7, 2029,2044.
273. Mullin, C., Lu, Y., Campbell, A., Fang, H., Green, N. (1995). A mutation affecting signal peptidase inhibits degradation of an abnormal membrane protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem* 270, 1-9.
274. Amara, J. F., Lederkremer, G., Lodish, H.F.. (1989). Intracellular degradation of unassembled asialoglycoprotein receptor subunits: A pre-golgi, nonlysosomal endoproteolytic cleavage. *J. Cell Biol* 109, 3315-3324.
275. Young, J., Kane, L. P., Exley, M., Wilernan, T. (1993) Regulation of selective protein degradation in the endoplasmic reticulum by redox potential. *J Biol Chem* 268, 19810-19818.
276. Otsu, M., Urade, R., Kito, M., Omura, F., Kikuchi, M., (1995) A possible role of ER-60 Protease in the degradation of misfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *J. Biol Chem* 270, 14958-14961.
277. Sommer, T., Jentsch, S. (1993). A protein translocation defect linked to ubiquitin conjugation at the endoplasmic reticulum. *Nature* 365, 176-179.
278. Bonifacino, J. S., Suzuki, C. K., Klausner, R. D. (1990) A peptide sequence confers retention and rapid degradation in the endoplasmic reticulum. *Science* 247, 79-82.
279. Kearse, K. P., Williams, D. B., Singer, A. (1994) Persistence of glucose residues on core oligosaccharides prevents association of TCR α and TCR β proteins with calnexin and results specifically in accelerated degradation of nascent TCR α proteins within the endoplasmic reticulum. *EMBO J* 13, 3678-3686.
280. Mosse, C. A., Meadows, L., Luckey, C. J., Kittlesen, D. J., Huczko, E. L., Slingluff, C. L., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Engelhard, V. H. (1998). The class I antigen-processing pathway for the membrane protein tyrosinase involves translation in the endoplasmic reticulum and processing in the cytosol. *J. Exp. Med* 184, 37-48.
281. Dunn, W. A Jr.. (1994) Autophagy and related mechanisms of lysosome-mediated protein degradation. *Trends in Cell Biol* 4, 139-143.
282. Dunn, W.A Jr.. (1990) Studies on the mechanisms of autophagy: formation of the autophagic vacuole. *J Cell Biol* 110, 1923-1933.
283. Ueno, T., Muno, D., Kominami, E.. (1991) Membrane markers of endoplasmic reticulum preserved in autophagic vacuolar membranes isolated from leupeptin administered rat liver. *J Cell Biol* 266, 18995-18999.
284. Dunn, W.A Jr.. (1990) Studies of the mechanisms of autophagy: maturation of the autophagic vacuole. *J Cell Biol* 110, 1935-1945.

285. Terlecky, S.R., Dice, J.F.. (1993) Polypeptide import and degradation by isolated lysosomes. *J Biol Chem* 268, 23490-23495.
286. Chiang, H.L., Schekman, R., Hamamoto, S., (1996) Selective Uptake of cytosolic, peroxisomal, and plasma membrane proteins into yeast lysosome for degradation. *J Biol Chem* 271, 9934-9941.
287. Chervonsky, A., Sant, A.J.. (1995) In the absence of major histocompatibility complex class II molecules, invariant chain is translocated to late endocytic compartments by autophagy. *Eur. J. Immunol* 25, 911-918.
288. Baba, M., Osumi, M., Scott, S.V., Klionsky, D.J., Ohsumi, Y.. (1997) Two distinct pathways for targeting proteins from the cytoplasm to the vacuole/lysosome. *J Cell Biol* 139, 1687-1695.
289. Agarraberes, F.A., Terlecky, S.R., Dice, F.. (1997) An intralysosomal hsp70 is required for a selective pathway of lysosomal protein degradation. *J Cell Biol.* 137, 825-834.
290. Cuervo, A.M., Dice, F.. (1996). A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science* 173, 501-503.
291. Cuervo, A.M., Hu, W., Lim, B., Dice, JF.. (1998) IkappaB is a substrate for a selective pathway of lysosomal proteolysis. *Mol Biol Cell* 9, 1995-2010.
292. Schlumpberger, M., Schaeffeler, E., Straub, M., Bredschneider, M., Wolf, D.H., Thumm, M.. (1997) AUT1, a gene essential for autophagocytosis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriology* 179, 1068-1076.
293. Huang, P.H., Chiang, H.L.. (1997) Identification of novel vesicles in the cytosol to vacuole protein degradation pathway. *J Cell Biol* 136, 803-810.
294. Loayza, D., Michaelis, S.. (1998) Role for the ubiquitin-proteasome system in the vacuolar degradation of Ste6p, the a-factor transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 18,779-789.
295. Liou, W., Geuze, H.J., Geelen, Math J.H., Slot, J.W.. (1997) The autophagic and endocytic pathways converge at the nascent autophagic vacuoles 136, 61-70.
296. Nadimi, F., Moreno, J., Momburg, F., Heuser, A., Fuchs, S., Adorini, L., Hämmerling, G.J.. (1991) Antigen presentation of hen egg-white lysozyme but not of ribonuclease A is augmented by the major histocompatibility complex class II associated invariant chain. *Eur. J. Immunol* 21, 1255-1257.
297. Forquet, F., Barois, N., Machy, P., Trucy, J., Zimmermann, V.S., Leserman, L., Davoust, J.. (1999) Presentation of antigens internalized through the B cell receptor requires newly synthesized MHC class II molecules. *J Immunol* 162, 3408-3416.
298. Drake, J.R., Lewis, T.A., Condon, K.B., Mitchell, R.N., Webster, P.. (1999) Involvement of MIIC-like late endosomes in B Cell receptor-mediated antigen processing in murine B cells. *J Immunol* 162, 1150-1155.
299. Weiser, P., Müller, R., Braun, U., Reth, M.. (1997) Endosomal targeting by the cytoplasmic tail of membrane immunoglobulin. *Science* 276, 407-409.

300. Liu, K-J., Parikh, V.S., Trucker, P.W., Kim, B.S.. (1991) Role of the B cell antigen receptor in antigen processing and presentation. *J Immunol* 151, 6143-6154.
301. Zimmermann, V.S., Rovere, P., Trucy, J., Serre, K., Machy, P., Forquet, F., Leserman, L., Davoust, J.. (1999) Engagement of B Cell receptor regulates the invariant chain-dependent MHC class II presentation pathway. *J Immunol.* 162, 2495-2502.
302. Siemasko, K., B.J. Eisfelder, E., Williamson, S. Kabat., Clark, M.R.. (1998) Signals from the B lymphocyte antigen receptor regulate MHC class II containing late endosomes. *J Immunol* 160, 5203-5206.
303. Minskoff, S.A., Matter, K., Mellman, I.. (1998) Fc gamma RII-B1 regulates the presentation of B cell receptor-bound antigens. *J Immunol* 161, 2079-2083.
304. Amigorena, S., Lankar, D., Briken, V., Gapin, L., Viguiier, M., Bonnerot, C.. (1998) Type II and III receptors for Immunoglobulin G (IgG) control the presentation of different T cell epitopes from single IgG-complexed antigens. *J Exp. Med* 4, 505-515.
305. Calin-Laurens, V., Forquet, F., Lombard-platelet, S., Bertolino, P., Chrétien, I., Trescol-Biémont, M-C., Gerlier, D., Rabourdin-Combe, C.. (1992) High efficiency of endogenous antigen presentation by MHC class II molecules. *Inter Immunol* 4, 113-1121.
306. Bodmer, H., Viville, S., Benoist, C., y Mathis, D., (1994). Diversity of endogenous epitopes bound to MHC class II molecules limited by the invariant chain. *Science* 263, 1284-1286
307. Kittlesen, D.J., Brown, L.R., Braciale, V.L., Sambrook, J.P., Gething, M-J., Braciale, T.J.. (1993) Presentation of newly synthesized glycoproteins to CD4+ T lymphocytes. An analysis using influenza hemagglutinin transport mutants *J. Exp. Med* 177, 1021-1030.
308. Chen, B.P., Madrigal, A., Parham, P.. (1990) Cytotoxic T cell recognition of an endogenous class I HLA peptide presented by a class II HLA molecule. *J Exp Med* 172, 779-788.
309. Weiss, S., Bogen, B.. (1989) B-lymphoma cells process and present their endogenous immunoglobulin to major histocompatibility complex-restricted T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 282-286.
310. Callahan, K. M., Rowell, J.F., Soloski, M.J., Machamer, C.E., Siliciano, R.F.. (1993) HIV-1 envelope protein is expressed in the surface of infected cells before its processing and presentation to class II-restricted T lymphocytes.. *J immunol* 151, 2928-2942.
311. Rowell, J.F., Ruff, A.L., Guarnieri, F.G., Staveley-Oçaroll, K., Lin, X., Tang, J., August, T., Siliciano, R.F.. (1995) Lysosome-associated membrane protein-1-mediated targeting of the HIV-1 envelope protein to an endosomal/lysosomal compartment enhances its presentation to MHC class II-restricted T cells. *J Immunol* 155, 1818-1828.
312. Snider, DP., Segal, DM., (1987). Targeted antigen presentation using cross-linked antibody heteroaggregates. *Immunol* 139,1609-1616.

313. Reiss, C.S., Gapud, C.P., Keil, W.. (1992) Newly synthesised class II MHC chains are required for VSV G presentation to CTL clones. *Cell Immuno* 139, 229-238.
314. Sanderson, S., Frauwirth, K., Shastri, Nilabh.. (1995) Expression of endogenous peptide-major histocompatibility complex class II complexes derived from invariant chain-antigen fusion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci* 92, 7217-7221.
315. Thomson, S.A., Burrows, S.R., Misko, I.S., Moss, D.J., Coupar, B.E., Khanna, R.. (1998) Targeting a polyepitope protein incorporating multiple class II-restricted viral epitopes to the secretory/endocytic pathway facilitates immune recognition by CD4+ cytotoxic T lymphocytes: a novel approach to vaccine design. *J Virol* 72, 2246-2252.
316. Polydefkis, M., Koenig, S., Flexner, C., Obah, E., Gebo, K., Chakrabarti, S., Earl, P.L., Moss, B., Siliciano, R.. (1990) Anchor sequence-dependent endogenous processing of human immunodeficiency virus 1 envelope glycoprotein gp160 for CD4+ T cell recognition. *J Exp Med* 171, 875-887.
317. Thomas, B.D., Hodgson, J., Riska, P.L., Graham, C.M.. (1990) The role of the endoplasmic reticulum in antigen processing. *J Immunol* 144, 2789-2794.
318. Cerundolo, V.. (1993) Antigen processing and presentation. The role of the endoplasmic reticulum. *Subcell Biochem* 21, 209-228.
319. Bartido, S.M., Diment, S., Reiss, C.S.. (1995) Processing of a viral glycoprotein in the endoplasmic reticulum for class II presentation. *Eur J Immunol* 25, 2211-2219.
320. Dodi, A I., Brett, S., Nordeng, T., Sidhu, S., Batchelor, R J., Lombardi, G., Bakke, O., Lechler, R.. (1994) The invariant chain inhibits presentation of endogenous antigens by a human fibroblast cell line. *Eur. J. Immunol.* 24, 1632-1639.
321. Busch, R., Vturina, I., Drexler, J., Momburg, F., y Hämmerling, G.. (1995). Poor loading of major histocompatibility complex class II molecules with endogenously synthesized short peptides in the absence of invariant chain. *Eur. J. Immunol* 25, 48-53.
322. Sweetser, M.T., Morrison, L.A., Braciale, V.L., Braciale, T.J.. (1989) Recognition of pre-processed endogenous antigen by class I but not class II MHC-restricted T cells. *Nature* 342, 180-182.
323. Aichinger, G., Karlsson, L., Jacckson, M.R., Vestberg, M., Vaughan, J.H., Teyton, L., Lechler, R.I., Peterson, P.A.. (1997) Major histocompatibility complex class II-dependent unfolding, transport, and degradation of endogenous proteins. *J Biol Chem* 272, 29127-2936.
324. Bikoff, E.K.. (1991) Class II- restricted IgG2ab-specific T cells recognize a signal-minus form of the V-CH3b antigen. *Eur J Immunol* 21, 1411-1417.
325. Wysocka, M., Eisenlohr, L.C., Otvos, L Jr., Horowitz, D., Yewdell, J.W., Bennink, J.R., Hackett, C.J.. (1994) Identification of overlapping class I and class II H-2d-restricted T cell determinants of influenza virus N1 neuraminidase that require infectious virus for presentation. *Virology* 201, 86-94.

326. Jacobson, S., Sekaly, R.P., Jacobson, C.L., McFarland, H.F., Long, E. O.. (1989) HLA class II-restricted presentation of cytoplasmic measles virus antigens to cytotoxic T cells. *J Virol* 63, 1756-1762.
327. Jaraquemada, D., Marti, M., Long, E.O.. (1990) An endogenous processing pathway in vaccinia virus-infected cells for presentation of cytoplasmic antigens to class II-restricted T cells. *J Exp Med* 172, 947-954.
328. Malnati, M. S., Marti, M., LaVaute, T., Jarquemada, D., Biddison, W., DeMars, R., Long, E.O.. (1992) Processing pathways for presentation of cytosolic antigen to MHC class II-restricted T cells. *Nature* 357, 702-704.
329. Long, E O., LaVaute, T., Pinet, V., Jaraquemada, D.. (1994) Invariant chain prevents the HLA-DR-restricted presentation of a cytosolic peptide. *The J. Immunology* 153, 1487-1494.
330. Malnati, M.S., Ceman, S., Weston, M., DeMars, R., Long, E.O.. (1993) Presentation of cytosolic antigen by HLA-DR requires a function encoded in the class II region of the MHC. *J Immunol* 151, 6751-6756.
331. Guegen, M., Long, E.O.. (1996) Presentation of cytosolic antigen by major histocompatibility complex class II molecules requires a long-lived form of the antigen. *Proc Natl Aca Sci USA* 93, 14692-14697
332. Oxenius, A., Bachmann, M.F., Ashton-Rickardt, P.G., Tonegawa, S., Zinkernagel, R.M., Hengartner H.. (1995) Presentation of endogenous viral proteins in association with major histocompatibility complex class II: on the role of intracellular compartmentalization, invariant chain and the TAP transporter system. *Eur J Immunol* 25, 3402-3411.
333. Brooks, A., Hartley, S., Kjer-Nielsen, L., Perea, J., Goodnow, CC., Basten, A., McCluskey, J.. (1991) Class II-restricted presentation of an endogenously derived immunodominant T-cell determinant of egg lysozyme. *Proc. Natl. Acad. Sci* 88, 3290-3294.
334. Calin-Laurens, V., Forquet, F., Mottez, E., Kanellopoulos, J., Godeau, F., Kourlsky, P., Gerlier, D., Roubourdin-Combe, C.. (1991) Cytosolic targeting of hen egg lysozyme gives rise to a short-lived protein by class I but not class II major histocompatibility complex molecules. *Eur J Immunol* 21, 761-769.
335. Brooks, A. G., y McCluskey, J.. (1993). Class II-restricted presentation of a hen egg lysozyme determinant derived from endogenous antigen sequestered in the cytoplasm or endoplasmic reticulum of the antigen presenting cells. *J. Immunol* 150, 3690-3697
336. Martine, H., Bertolino, P., Forquet, F., Roubourdin-Combe, CH., Gerlier,, Davoust, J., Salamero, J.. (1993) Major histocompatibility complex class II restricted presentation of secreted and endoplasmic reticulum resident antigens requires the invariant chain and is sensitive to lysosomotropic agents. *Eur J Immunol* 23, 3167-3172.
337. Adorini, L., Guéry, J., Fuchs, S., Ortiz, V., Hammerling, G. J., and Momburg, F.. (1993). Processing of endogenously synthesized hen egg-white lysosyme retained in the endoplasmic reticulum or in secretory form gives rise to a similar but not

identical set of epitopes recognized by class II restricted T cells. *J Immunol* 151, 3576-3586.

338. Parra-López, C.A., Lindner, R., Vidavsky, I., Gross, M., Unanue, E.R.. (1997) Presentation on class II MHC molecules of endogenous lysozyme targeted to the endocytic pathway. *J Immunol* 158, 2670-2679.

339. Moreno, J., Vignali, D. A. A., Nadimi, F., Fuchs, S., Adorini, L., y Hammerling, G. J., (1991) Processing of an endogenous antigen can generate MHC class II-restricted determinants distinct from those generated after the processing of exogenous protein. *J. Immunol* 147, 3306-3313

340. Gutierrez, M.. (1996) Vias de procesamiento intracelular de diferentes formas de lisozima de gallina. Tesis para obtener el grado de Maestría en ciencias biomedicas con especialidad en inmunología. IPN. ENCB.

341. Hämmerling, G. J., Koch, N., Grützmann, R., Ade, N., (1982). Monoclonal antibodies against murine Ia antigens: studies on structure, function, epitopes, and idiotypes. En *Ia antigens*, Vol. I Mice S Ferrone y C. C. Davd eds. CRC press, Boca Raton, FL, 55-79

342. Harper, M., Lema, F., Boulot, G., Pijak, R.. (1987) Antigen specificity and cross reactivity of monoclonal anti lysozyme antibodies. *Mol Immunol* 24, 97-108.

343. Zhong, G., Reis e Sousa, C., Germain, R. N.. (1997) Production, specificity and functionality of monoclonal antibodies to specific peptide-major histocompatibility complex class II complexes formed by the processing of exogenous proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 13856-13861.

344. Kappler, J., White, J., Wegmann, D., Mustain, E., Marrack, P.. (1982) Antigen presentation by Ia+ Bcell hybridomas to H-2-restricted T cell hybridomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79,3604-3607.

345. Allen, P. M., McKean, D. J., Beck, B. N., Sheffield, J., Glimcher, L. H.. (1985). Direct evidence that a class II molecule and a simple globular protein generate multiple determinants. *J. Exp. Med* 162, 1264-1274.

346. Moreno, J., Adorini, L., Hämmerling, G.J.. (1990) Co-dominant restriction by a mixed haplotype I-A determinant (ak-bb) for the lysozyme peptide 52-61 in H-2k x H-2b F1 mice. *J Immunol.* 144 3896-3904.

347. Adorini, L., Moreno, J., Momburg, F., Hämmerling, G.J., Guéry, J., Vali, A., Fuchs, S.. (1991) Exogenous peptides compete for the presentation of endogenous antigen to major histocompatibility complex class II restricted T-cells. *J Exp Med* 144, 3896-3904.

348. Laemmli, U. K., (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the heads of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

349. Hanada, K.. (1878) *Protease Inhibitors: Medical and Biological Aspects.* Agric. Biol. Chem 42, 523-536.

350. Griffin, J. P., R. Chu., Harding, C.V.. (1997) Early endosomes and late endocytic compartment generate different peptide-class II MHC complex via distinct processing mechanisms. *J Immunol* 158, 1523-1530.