

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

2ej

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA

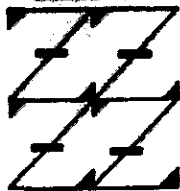
UNIDAD DE INVESTIGACION EN DIFERENCIACION CELULAR Y CANCER  
LABORATORIO DE BIOLOGIA CELULAR Y CANCER



EFEECTO DE LAS PROTEINAS E6 Y E7 DEL VIRUS DEL  
PAPILOMA HUMANO (HPV) TIPO 16 SOBRE LA EXPRESION  
DE LAS MOLECULAS DEL COMPLEJO PRINCIPAL DE  
HISTONAS EN UN SISTEMA MURINO.

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
**B I O L O G O**  
P R E S E N T A :  
**PATRICIA GUADALUPE FLORES GUZMAN**

UNAM  
FES  
ZARAGOZA



LO HOMBRO DE  
DE NUESTRA REFLEXION

DIR. DE TESIS

DR. ISAAC RODRIGO ZAMBRANO RAMIREZ

AGOSTO, 1999

TESIS CON  
PALLA DE ORIGEN

I

275666



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

**DEDICATORIA:**

**A mi gran familia:** - A papá y mamá.

- A mis hermanos: Mia, Gela, Coco, Vitor, Lino, Mami, Lala, Lalo,  
Minis y Neno.

A todos ellos por la enorme libertad de dejarme hacer lo que he querido y he podido.  
Gracias.

Por Esteban.

## AGRADECIMIENTOS:

- Quiero agradecer a todas las personas que de una u otra forma contribuyeron para el feliz término de esta tesis, de manera especial al M en C Carlos Bautista, al M. en C. Enrique Mendieta, al Biol. Jorge Hernández y al Dr. Alberto Monroy por sus comentarios y sugerencias. Lo mismo que al Dr. Rodrigo Zambrano por dirigirla.
- Agradezco de la misma forma a todos los integrantes de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer, de manera especial al grupo de Inmunobiología: al Dr. Alberto Monroy, a la Dra. Lourdes Mora, al Biol. Jorge Hernández, y a la pasante Carolina Flores, por el apoyo técnico, intelectual y moral brindado durante la mayor parte de este trabajo.
- También me permito agradecer a un grupo muy especial de personas que estuvieron a mi alrededor quizá no en el laboratorio, pero que soportaron mis berrinches y cambios de humor constantes: Mi familia, mis perros y mi banda de amigos (Raúl, Xóchitl, Alma, Rommel, Tieta, Toño, Ale, Mary, Beto, Fer y recientemente Mariana), con los cuales he podido darme el lujo de conjugar el verbo "viborear" en todos sus tiempos. Mil Gracias.
- Finalmente, agradezco también a los señores Ranulfo Pedraza y José Chavarría por su apoyo técnico.

# CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN .....	5
1. INTRODUCCION .....	7
I. Sistema Inmune .....	7
II. Respuesta inmune mediada por células .....	10
III. Complejo principal de histocompatibilidad .....	11
a) Complejo principal de histocompatibilidad clase I .....	13
IV. Fase Inmune Efectora .....	17
V. Virus del papiloma humano .....	19
a) Estructura génica de los VPH .....	20
b) Proteínas tempranas E6 y E7 .....	21
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	24
3. OBJETIVOS .....	25
4. HIPOTESIS .....	26
5. METODO .....	27
6. RESULTADOS .....	35
7. DISCUSION DE RESULTADOS .....	45
8. CONCLUSIONES .....	52
9. BIBLIOGRAFIA CITADA .....	53

## RESUMEN:

Las proteínas tempranas E6 y E7 de virus del papiloma humano tipo 16 (VPH-16), se encuentran en aproximadamente un 50% de los casos de cáncer cervical positivos para la presencia del virus del papiloma humano, principalmente en estadios avanzados, donde las regiones del virus que codifican para estas proteínas se encuentran integrados al genoma del hospedero. En este tipo de cáncer, aunque no en todos los casos, existe una presentación de antígenos alterada, encontrándose una disminución de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase I (CPH-I) en superficie celular. Si bien se ha encontrado que algunos virus pueden desregular la expresión de moléculas clase I en superficie como es el caso del citomegalovirus humano o murino, algunos tipos de herpes y el adenovirus tipo 12, para los virus del papiloma humano no se ha establecido con certeza una relación directa entre la presencia de este virus con el desarrollo de cáncer cervical y la disminución de moléculas clase I en superficie de las células tumorales.

En el presente trabajo, se pretendió generar un sistema *in vitro*, donde se cuente con una alta expresión de las proteínas oncogénicas E6 y E7 del VPH-16, para analizar el comportamiento de la molécula del CPH clase I en presencia de tales oncogénos y a la vez despertar una respuesta inmune dirigida específicamente contra las proteínas E6 y E7 del VPH-16. Para ello, se transfectaron los genes para las proteínas oncogénicas E6 y E7 del VPH-16 en células P815, con haplotipo H-2D del CPH-I. A las líneas generadas, que portaban ya sean los genes para las proteínas E6 ó E7 por separado, ambos genes juntos, o el plásmido vector solo, se les evaluó la expresión de los genes introducidos por RT-PCR. En las líneas que expresaban los genes, se analizó la expresión de moléculas del CPH-I por citometría de flujo. Sorprendentemente, los resultados mostraron que los genes introducidos son capaces de incrementar la expresión de moléculas clase I en superficie en comparación con las células no transfectadas o transfectadas sólo con el plásmido vector u otro plásmido irrelevante. Este incremento fue significativo para una  $F=0.95$  en las células transfectadas con los genes para E7 y para E7+E6, principalmente.

Por otra parte, las líneas generadas fueron cocultivadas en presencia de células de bazo de ratones Balb/c inmunizados con los plásmidos portadores de los genes E6 ó E7 del VPH tipo 16. En estos cocultivos se midió la proliferación de las células de bazo por incorporación de timidina tritiada encontrándose que las células que inducen una proliferación sostenida y mayor son aquellas que portan los genes para E7 o E6 y con menos notoriedad para las células que portan ambos plásmidos, en comparación con aquellos cultivos realizados con la línea parental.

Se sugiere que la disminución de moléculas del CPH clase I en superficie celular observada en cáncer cervical no es debida a un efecto directo de las proteínas oncogénicas E6 y E7 del virus del papiloma humano tipo 16, por lo menos en nuestro sistema de estudio. Más bien, este efecto puede ser debido a un proceso evolutivo del mismo tumor a un estadio maligno, a defectos en otras proteínas involucradas en el procesamiento y presentación de antígenos como por ejemplo, las proteínas transportadoras asociadas al procesamiento de antígenos, TAP-1 y TAP-2, algunas proteínas que componen el proteasoma u otras proteínas importantes como la tapasina y calreticulina; o bien, si el

efecto es debido a la presencia del VPH, es por proteínas diferentes a E6 y E7. Los resultados obtenidos en este trabajo permiten conocer más acerca de la biología de este virus y su relación con el proceso carcinogénico con el que se ha relacionado, conocimientos que pueden ser importantes para el desarrollo de una vacuna y estrategias terapéuticas.

## I. INTRODUCCION

Las células de diferentes tejidos mueren, se renuevan o son sustituidas durante la vida del organismo y los procesos que controlan esta proliferación-diferenciación y senescencia están finamente regulados a nivel bioquímico y genético. Un ejemplo de estos tejidos es la médula ósea, perteneciente al sistema hematopoyético y principal sitio de formación de células sanguíneas, proceso conocido como hematopoyesis (Meager, 1993; Lieberman, 1994). Las células originadas en la médula ósea cumplen con distintas funciones así como variados son los linajes en los que se diferencian. En el torrente sanguíneo se encuentran tipos celulares originados en la médula ósea que realizan funciones que incluyen el transporte de oxígeno a todos los tejidos del cuerpo (función llevada a cabo por los eritrocitos), la fagocitosis de células muertas, viejas o dañadas (realizada por macrófagos principalmente, y en menor grado por granulocitos), células encargadas de la coagulación sanguínea (megacariocitos, mediante su fragmentación a plaquetas) y células que intervienen en la respuesta en contra de agentes infecciosos que entran en el organismo causando enfermedades. Además, células accesorias del sistema inmune (células dendríticas, granulocitos, células cebadas y NK) vigilan los distintos tejidos y órganos del cuerpo para que en conjunto con las células encargadas de la defensa del organismo desencadenen una respuesta coordinada contra los agentes infecciosos que puedan invadirlo. Así mismo, el sistema inmune detecta la entrada de sustancias potencialmente tóxicas, diferenciando entre lo inocuo y lo peligroso (Abbas et al, 1994).

### I. Sistema Inmune:

En todos los mamíferos, al igual que en el ser humano, el sistema inmune es el encargado de mantener la integridad del organismo ante los ataques de agentes infecciosos causantes de enfermedades. Aunque tales agentes existen en una amplia variedad de tamaño y complejidad, presentan como característica general que son reconocidos como extraños por el cuerpo invadido. Normalmente, la piel y otros epitelios, como el recubrimiento del intestino, tracto genital y respiratorio, proveen una barrera contra agentes extraños protegiendo contra la invasión; sin embargo, cuando esta barrera es rebasada, el sistema inmune se activa y mediante una respuesta coordinada y colectiva, conocida como respuesta inmune, en la mayoría de los casos, logra la destrucción y eliminación del organismo extraño (Austyn, 1993).

A las sustancias o agentes extraños que ingresan al cuerpo, capaces de desencadenar una respuesta inmune se les da el nombre de antígenos. Aunque históricamente se conoce como antígeno a la molécula que estimula la producción de anticuerpos, la definición se ha tornado más general, incluyendo a cualquier cosa que pueda ser reconocida por el receptor de las células T (TCR, por sus siglas en inglés). Esta definición incluye entonces a moléculas normalmente producidas por el cuerpo, tales como factores de crecimiento o moléculas de adherencia, que por encontrarse en la superficie celular deben ser reconocidas como propias, diferenciándolas de agentes externos, sin demasiada especificidad para evitar las enfermedades autoinmunes (Austyn, 1993).



La protección contra diversos antígenos, sobre todo de microbios, incluye distintos mecanismos como barreras físicas (epitelios y piel), células fagocíticas (macrófagos y granulocitos) en sangre y tejido; células NK (del inglés "natural killer"), células T y moléculas llevadas por la sangre como son los anticuerpos y el sistema del complemento (Abbas et al, 1994) (Cuadro 1.1).

Cuadro 1: Barreras físicas contra antígenos extraños y tipos celulares encargados de la respuesta inmune en ellas.

Barrera física	Tipos celulares	Respuesta inmune
Sistema inmune cutáneo.	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Queratinocitos, producen IL-1, GM-CSF, IL-3, TNF e IL-6, IFN<math>\gamma</math></li> <li>-Células de Langerhans, células presentadoras de antígenos.</li> <li>-Linfocitos intraepiteliales, en su mayoría células T CD8+.</li> <li>-Linfocitos dermales, tanto células T CD4+ como CD8+.</li> <li>-Macrófagos.</li> </ul>	Reacciones inflamatorias e inmunes locales.
Sistema inmune mucoso.	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Linfocitos intraepiteliales, en su mayoría células T CD8+ en humanos.</li> <li>-Linfocitos propios de la lámina, constituidos por una mezcla de células.</li> <li>-Foliculos de la mucosa linfoide, como los parches de Peyer en el intestino o las amígdalas en la faringe</li> </ul>	Respuesta inmune y de tolerancia a antígenos que entran vía oral.
Respuesta inmune de linfocitos en circulación.	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Células dendríticas, células B y macrófagos como células presentadoras de antígenos.</li> <li>-Células NK.</li> <li>-Células T no comprometidas.</li> <li>-Células T y B de memoria.</li> <li>-Anticuerpos.</li> <li>-Moléculas del sistema de complemento.</li> </ul>	<p>Respuesta inmune específica o adquirida.</p> <p>Respuesta inmune innata.</p> <p>Inmunización contra antígenos por células de memoria.</p>

Tanto las moléculas como las células que componen el sistema inmune están involucradas en dos formas de inmunidad: la inmunidad natural o innata, la cual se considera el primer sistema de defensa, donde los microbios y cualquier molécula extraña son eliminados sin discriminación alguna, actuando antes de que los agentes infecciosos ataquen a todo el cuerpo. El segundo tipo de inmunidad es la inmunidad específica o adquirida, donde los mecanismos inmunológicos son inducidos o estimulados por exposición a sustancias extrañas que son exquisitamente específicas para distintas macromoléculas,

incrementando en magnitud las capacidades de defensa con cada una de las exposiciones sucesivas a una macromolécula particular. Esta respuesta inmune específica es activada sólo después de que un patógeno ha entrado al organismo, particularmente si el sistema innato no controla totalmente a dicho patógeno; entonces, en conjunto, ambos sistemas intervienen para contrarrestar la acción del antígeno. Asimismo, la respuesta inmune amplifica los mecanismos de protección de inmunidad natural, directa o enfocada a sitios de entrada de antígenos para incrementar la capacidad de eliminarlos (Lieberman, 1994; Meager, 1993).

Cualesquiera que sea el tipo de respuesta inmune se requiere de la participación de varios tipos celulares. En primer término, aquellas células encargadas de fagocitar (principalmente macrófagos) a los patógenos que ingresan al cuerpo, y que además sean capaces de presentar los péptidos derivados de la degradación de dichos patógenos (procesamiento de antígenos) a través de moléculas especializadas para tal fin (complejo principal de histocompatibilidad), y que con el reconocimiento de estos péptidos se inicie una respuesta citotóxica mediada por linfocitos T, el cual sería otro tipo celular, en contra de las células fagocitadas por los macrófagos (Figura 1).

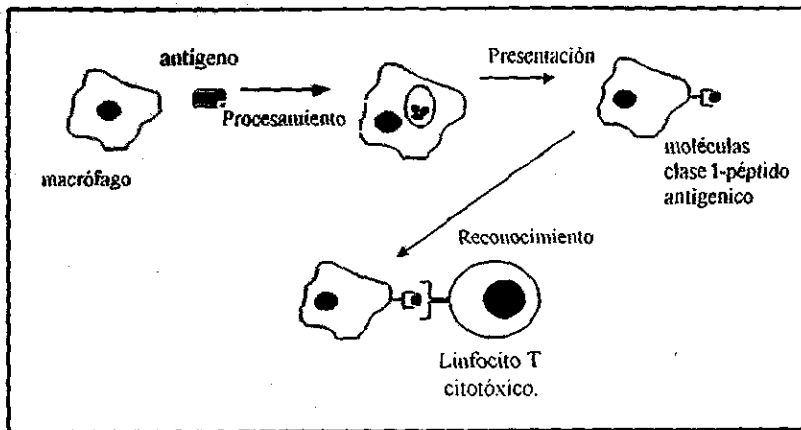


Figura 1. Representación esquemática de la fagocitosis de un antígeno, su procesamiento y presentación por macrófagos a células T.

Dentro de la inmunidad específica, la eliminación de los antígenos del cuerpo se efectúa por dos procesos, uno mediado por células (células T) y otro mediado por moléculas (inmunidad humoral, células B). De esta forma, la inmunidad específica está a cargo de las células linfoides especializadas: como son los linfocitos B, que secretan anticuerpos dirigidos específicamente contra los antígenos; y los linfocitos T, que eliminan a células del cuerpo que han sido infectadas por virus, mediándose la respuesta entonces por las células T citotóxicas (CTL's, por sus siglas en inglés "cytotoxic T lymphocyte") (von Boehmer, 1994). En adición a lo anterior, otros mecanismos de respuesta como es la secreción de sustancias bioquímicas denominadas citocinas por parte de las células T auxiliares y otros

tipos celulares, promueven la producción de anticuerpos, o bien, la expansión de células T citotóxicas (Janeway y Travers, 1994).

En mamíferos, los linfocitos se forman constantemente en los órganos linfoides tales como el timo, en donde maduran las células T, o en la médula ósea donde se generan células B. Tanto los precursores de las células B como de las células T en los genes de inmunoglobulinas o semejantes a inmunoglobulinas, sufren una serie de rearrreglos para producir moléculas o receptores de reconocimiento de antígenos que son expresados en la superficie celular. En los linfocitos B, los rearrreglos génicos resultan en la expresión de una forma de inmunoglobulina unida a la membrana plasmática, la cual sirve para reconocer antígenos particulares. Por otra parte, en los linfocitos T, el rearrreglo génico resulta en la expresión del llamado receptor de células T (TCR), un complejo glicoprotéico que contiene dos subunidades,  $\alpha$  y  $\beta$ , las cuales pueden reconocer ciertos epitopos antigénicos de moléculas proteicas cuando están presentes en asociación con el complejo principal de histocompatibilidad (CPH), capacitando a las células T para efectuar una respuesta citotóxica en contra de los antígenos presentados (Abbas et al, 1994).

## II. Respuesta inmune mediada por células:

Para que se lleve a cabo la activación de linfocitos T, existe la teoría que postula que estas células necesitan de al menos dos señales para su activación. La primera señal (específica de antígeno) es aportada por el complejo formado (intracelularmente) por un péptido unido a moléculas del CPH, mostrado sobre la superficie de las células presentadoras de antígenos (CPA), que se une a su vez al complejo formado por el receptor de las células T (TCR) y el ligando CD3 para enviar la señal dentro de las células T (Müller-Sieburg y Deryugina, 1995). Una segunda señal no específica del antígeno pero también aportada por las CPA, es mediada por el entrecruzamiento de la molécula CD28 en la superficie de la célula T con miembros de la familia B7 (B7.1, CD80; B7.2, CD86) en la superficie de las CPA (Liu y Linsky, 1992; Allison y Krammel, 1995).

### - Procesamiento y Presentación de antígenos.

El paso inicial en la presentación de antígenos es la unión del agente extraño nativo (es decir tal cual entra al organismo) a una CPA. Las CPA tienen como principal función capturar, internalizar y procesar antígenos y presentarlos a los linfocitos T no comprometidos, activándolos a madurar y proliferar contra el antígeno presentado en particular. Dentro de este tipo de células se incluyen los fagocitos mononucleares (macrófagos y granulocitos), células B y células dendríticas en sus diferentes tipos: células de Langerhans, dendríticas intersticiales (en corazón, riñón, estómago y pulmón), interdigerentes, foliculares, linfoides y células dendríticas veladas ("veiled") de sangre y nódulos linfáticos (Heijnen et al, 1996; Shurin, 1996; Stingl y Bergstresser, 1996). Quizá las células presentadoras por excelencia son las células dendríticas, siendo también las más estudiadas por su alta eficiencia para capturar, procesar y presentar antígenos. Las células dendríticas presentan altos niveles de expresión de moléculas del CPH clase I y II en su superficie celular, así como las moléculas coestimuladoras ya anteriormente mencionadas

como B7.1, B7.2 y otras como CD11a,b,c, CD40, ICAM1 (CD54) y LFA-3 (CD58) (Allison y Krammer, 1995; Shurin, 1996).

Continuando con el procesamiento de antígenos, las diferentes CPA pueden capturar a los antígenos por distintas vías, por ejemplo: los macrófagos suelen fagocitar, las células B utilizan su receptor de inmunoglobulina en su superficie celular, mientras que las células dendríticas pueden capturar antígenos mediante tres mecanismos distintos: por macropinocitosis, fagocitosis (en menor grado) y receptores de manosa (Heijnen et al, 1996; Shurin, 1996).

En cuanto los antígenos son capturados por las CPA e ingresan a las células, se localizan en vesículas unidas a la membrana intracelular en estructuras llamadas endosomas. El paso siguiente en la presentación de antígenos es el procesamiento del mismo para modificar su estructura. Para ello, el antígeno es degradado proteolíticamente mediante acción enzimática a pH ácido para generar fragmentos peptídicos que puedan unirse a las moléculas del CPH y puedan ser presentados a las células T. Este tipo de procesamiento de las proteínas antigénicas para la presentación asociada al CPH se debe a que los péptidos al unirse a las moléculas del CPH deben tener un tamaño predeterminado (10 a 20 aa de largo para moléculas clase II y de 8 a 9 aa para clase I) para poder ser acomodadas en el surco de unión de dicha molécula, como se discutirá más adelante. Hasta aquí y de manera general es como se realiza la captura de proteínas antigénicas; sin embargo, la endocitosis de proteínas es sólo una parte de la presentación de antígenos a células T, ya que también incluye el ensamblaje, tráfico intracelular y unión de péptidos (Brodsky y Guagliard, 1991).

Los mecanismos de procesamiento y presentación de antígenos han sido analizados ampliamente tanto para antígenos (Ag) extracelulares que son reconocidos por las células auxiliares CD4+ restringidas a CPH clase-II, como para la presentación de antígenos intracelulares a linfocitos T citotóxicos CD8+, restringidos a moléculas clase I. A continuación se revisarán los conceptos correspondientes a las moléculas del CPH, los cuales forman una parte importante de este trabajo de tesis.

### III. Complejo principal de histocompatibilidad

Las moléculas de histocompatibilidad son expresadas en la superficie de una amplia variedad de células y son las proteínas principales en el rechazo de injertos; al conjunto de genes, altamente poliomórficos, que las codifica se le conoce como complejo principal de histocompatibilidad (CPH). El papel central de los productos de los genes del CPH es la de unir, no covalentemente, porciones de proteínas antigénicas solubles o libres, para que sean reconocidas por linfocitos T específicos para tal antígeno. Existen dos tipos de moléculas del CPH, clase I y clase II, específicas para un subtipo de células T, al cual se unirán para activarla (Abbas, 1994) (Figura 2). Aunque presentan afinidades a péptidos semejantes en estructura y tamaño, las moléculas de clase I y II se unen a sus péptidos antigénicos por vías intracelulares distintas: mientras las moléculas clase I presentan péptidos originados de un procesamiento endógeno, derivados de proteínas producida por virus y proteínas propias de

la célula, las moléculas clase II pueden presentar péptidos de antígenos exógenos endocitados (células dañadas o senescentes, bacterias y otros patógenos), así como péptidos derivados también de proteínas normales de la célula (Brodsky y Guagliard, 1991).

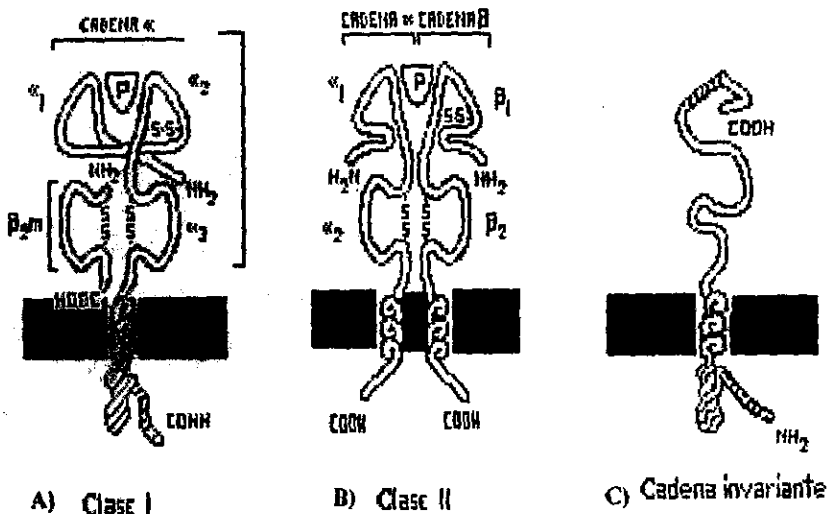


Figura 2: Esquema de la estructura del complejo principal de histocompatibilidad clase I, II y la cadena invariante. A) Las moléculas clase I están compuestas por una cadena de 45 kDa (cadena  $\alpha$ ) y la cadena  $\beta_2$ -microglobulina ( $\beta_2$ -m, 12 kDa), la cual es totalmente extracelular y es mantenida en la superficie celular por su asociación a la cadena  $\alpha$ . La cadena  $\alpha$  está orientada con el extremo amino terminal hacia el exterior celular, además de tres dominios extracelulares ( $\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3$ ). El sitio de unión del péptido se forma entre los dominios  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  (P). B) Las moléculas clase II son heterodímeros compuestos de una cadena  $\alpha$  de 33 a 35 kDa y una cadena  $\beta$  (25-29 kDa), orientadas con la región amino terminal hacia el exterior de la célula. Cada cadena presenta dos dominios ( $\alpha_1, \alpha_2, \beta_1, \beta_2$ ). El sitio de unión al péptido (P) está formado entre los dominios  $\alpha_1$  y  $\beta_1$ . C) La Cadena Invariante se asocia a las moléculas clase II durante su biosíntesis. Esta glicoproteína presenta un extremo carboxilo terminal extracelular, un dominio transmembranal simple y un tallo citoplásmico.

Las diferencias entre las moléculas de histocompatibilidad clase I y II, incluyen también a las células efectoras a las cuales se presentan los péptidos: como ya se había mencionado, los receptores de las células T citotóxicas  $CD8^+$ , se unen a los péptidos antigénicos unidos a moléculas clase I mientras que los complejos péptido-clase II son reconocidos por células auxiliares  $CD4^+$ .

El locus del CPH humano es muy grande (aproximadamente 3500 kpb) y está organizado de la siguiente forma: (a) genes clase II (HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR) el cual contiene 17 genes conocidos y pseudogenes, (b) genes complementarios o región de clase III (para proteínas del complemento C4A, C4B, C2, el Factor B y genes para la enzima 21-hidroxilasa), (c) genes de citocinas (TNF, LTA, LTB, LST-1, IC7, AIF-1) y proteínas de

choque térmico (Hsp70 1H y Hsp70 2), región denominada por algunos autores como clase IV por estar posiblemente involucrada en varios aspectos de estrés, inflamación o infección; y (d) genes de clase I (HLA-A, HLA-B, HLA-C), con 18 genes relacionados y pseudogenes. En ratón, el complejo principal de histocompatibilidad es más pequeño, y la secuencia de genes es: (a) clase I (H-2K), (b) clase II (I-A, I-E), (c) genes complementarios, (d) genes de citocinas y (e) clase I (H-2D, H-2L) (Abbas et al, 1994; Janeway y Travers, 1994; Gruen y Weissman, 1997).

En ratón, los alelos del CPH se designan mediante letras minúsculas (por ejemplo a, b, e). A los genes individuales dentro del CPH se les llama por el tipo de CPH de la cepa de ratón en que se identificaron por primera vez. Los dos *loci* del CPH independientes que se sabe son los más importantes para el rechazo de trasplantes en los ratones se llaman H-2K y H-2D. Por lo tanto, el alelo del gen K en una cepa con el CPH tipo k se le llama K<sup>k</sup> (pronunciado como K de k), mientras que el alelo del gen K en una cepa con el CPH d se le llama K<sup>d</sup> (pronunciado K de d). Después de K y D se descubrió un *locus* similar al que se llama L (Abbas, 1994).

En el presente trabajo se hará mención únicamente de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase I, así como los mecanismos de procesamiento y presentación de antígenos relacionados, dejando de lado al CPH-II, ya que no es de particular interés para los objetivos de la presente tesis.

#### a) Complejo Principal de Histocompatibilidad clase I.

Las moléculas del CPH clase I se unen a péptidos derivados de la degradación de proteínas que son procesadas endógenamente. Es decir, péptidos obtenidos a partir de proteínas sintetizadas dentro de la célula. Ejemplo de esto son las proteínas normales de la célula, proteínas virales y antígenos tumorales (oncogenes sobreexpresados o proteínas anormales). Los péptidos obtenidos de la degradación de estas proteínas dentro del complejo multicatalítico proteosomal en citosol, por un proceso descrito posteriormente, son presentados en la superficie celular acoplados a las moléculas clase I para su reconocimiento por los linfocitos T citotóxicos (CTL, por sus siglas en inglés), los cuales son el principal mecanismo de defensa contra virus, participando además en el mecanismo de destrucción de tumores.

Las moléculas clase I tienen una subunidad integral de membrana, la cadena pesada, codificada por el CPH de 45 kDa (cadena alfa o H), la cual se asocia no covalentemente con la  $\beta 2$  microglobulina ( $\beta 2m$ ), una proteína soluble no codificada por el CPH, de 12 kDa. La cadena  $\alpha$  está orientada con el extremo amino terminal en la parte extracelular, presentando tres dominios ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ) de 90 a 100 aminoácidos, un dominio transmembranal simple de aproximadamente 25 aa y un dominio citoplasmático (carboxilo terminal) de ~30 aa. El sitio o surco de unión del péptido está formado por los dominios  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ ; muchos de los residuos polimórficos de la cadena  $\alpha$  que difieren en la formas alélica están concentrados dentro del surco. Bajo este segmento de la molécula, se encuentra el dominio  $\alpha 3$  proximal

de la membrana y la subunidad  $\beta 2m$ , los cuales son homólogos a los dominios constantes de las inmunoglobulinas (Figura 2) (Williams et al, 1996)

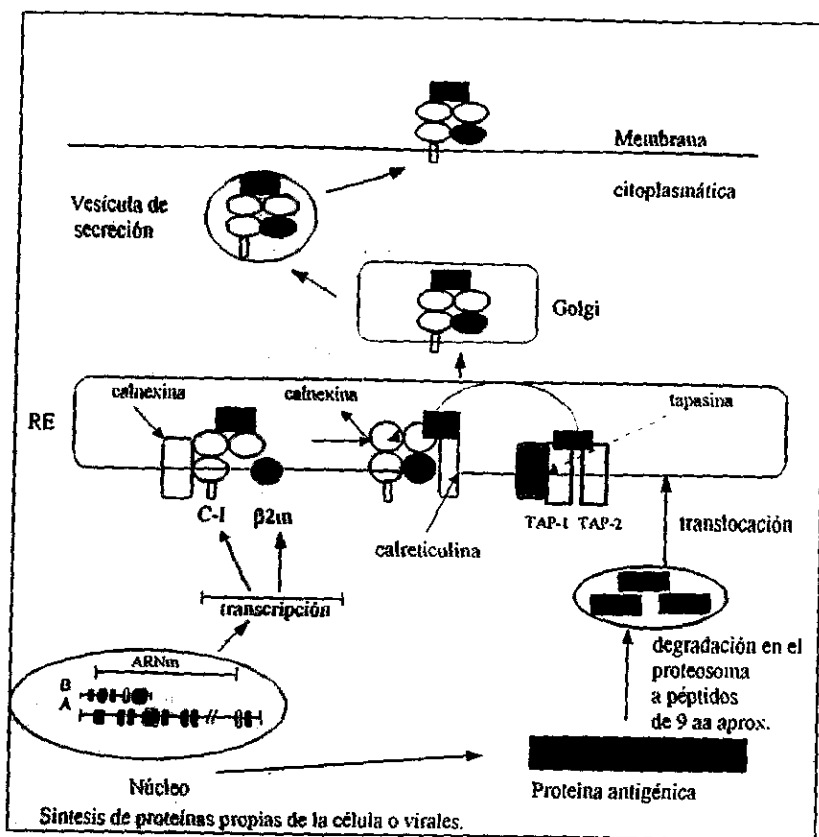


Figura 3. Representación esquemática de la vía de presentación y procesamiento de antígenos de las moléculas clase I. El conjunto de genes del complejo principal de histocompatibilidad (CPH) codifican para las moléculas clase I (cromosoma 6) (A); en otro locus, los genes para la cadena  $\beta 2m$  también son codificados (cromosoma 15) (B). Una vez sintetizada, la cadena  $\alpha$  del CPH clase I (C-I) se une a la calnexina en el RE, para ser acoplada con la cadena  $\beta 2m$ . Una vez formado el complejo cadena  $\alpha$ - $\beta 2m$ , la calnexina es liberada y entonces la molécula del CPH clase I parcialmente plegada se une a la subunidad TAP-1 por interacción de la tapasina y la calreticulina. De esta forma, se permite la unión del péptido antigénico translocado por las proteínas TAP-1 y TAP-2, cuyos genes se encuentran también en la región del CPH. Una vez que se unió el péptido antigénico a la molécula del CPH clase I, el complejo completa su plegamiento y es exportado al aparato de Golgi, donde sufrirá una glicosilación antes de ser enviado a la superficie en una vesícula de secreción. RE: retículo endoplasmático, Ag, antígeno.

Las moléculas clase I presentan péptidos de un tamaño promedio de nueve aminoácidos a células CD8+. Sin embargo, ciertas moléculas clase I pueden acomodar péptidos hasta con 13 aa a través de una protuberancia ascendente de la porción central del péptido. Algunas excepciones a esta estrecha unión del péptido han sido reportadas en donde uno o ambos extremos del péptido pueden extenderse fuera del surco (Williams et al, 1996).

Debido a que las moléculas clase I presentan péptidos pequeños, el antígeno intacto primero debe ser degradado en el citosol. El principal complejo proteolítico citosólico es el proteosoma, el cual existe en una forma 20S y 26S. El proteosoma está compuesto de más de 24 subunidades proteicas unidas para formar un complejo cilíndrico. Dos de estas subunidades, LMP-2 y LMP-7, son codificadas por genes que se encuentran en el locus del CPH (Martínez y Monáco, 1991; Arnaiz-Villena, 1993; Gruen y Weissman, 1997) y ello puede ser un indicio de su papel en la regulación de la función del proteosoma en el proceso de presentación de antígenos.

Una vez que han sido generados en el citosol, los péptidos son translocados al lumen del retículo endoplasmático (RE) para su asociación con moléculas clase I recién sintetizadas, a través de un complejo heterodimérico dependiente de nucleótidos trifosfato (NTP), compuestos de los transportadores asociados con el procesamiento de antígenos, TAP-1 y TAP-2 (del inglés "transporter in antigen processing") (figura 3). Los genes para los TAP-1 y TAP-2 están localizados en un locus del CPH los cuales codifican para un heterodímero que atraviesa varias veces la membrana del RE (Kelly et al, 1992; Gruen y Weissman, 1997). Los TAP tienen una alta afinidad por péptidos de 8 a 13 aa, además de presentar cierta selectividad hacia los péptidos basada principalmente en la estructura de los residuos del extremo carboxilo terminal, prefiriendo los péptidos con aminoácidos aromáticos o hidrofóbicos (Schumacher et al, 1994). Al igual que las subunidades del proteosoma, LMP-2 y LMP-7, la expresión de los TAP puede ser inducida por estimulación con interferón tipo gamma (IFN- $\gamma$ ), además que la sobrerregulación puede ser coordinada por promotores comunes. Sin embargo, existe un segundo mecanismo independiente de los TAP para el transporte de péptidos antigénicos, relacionado con la proteólisis de dominios de péptidos señales hidrofóbicos después de que las proteínas son translocadas al lumen del retículo endoplasmático.

La cadena  $\alpha$  del CPH clase I recién sintetizada, ya en retículo, rápidamente se asocia con una proteína residente del RE denominada p88 o calnexina que es una proteína integral de membrana asociada a calcio (Jackson et al, 1994). La calnexina va a ser liberada al darse la unión de la cadena  $\alpha$ -cadena  $\beta$ 2m y las moléculas clase I se unen entonces a un complejo de proteínas, una de las cuales es la calreticulina. La calreticulina es una molécula semejante a las lectinas, estructuralmente relacionada a la calnexina que se asocia de forma simultánea al heterodímero cadena  $\alpha$ -cadena  $\beta$ 2m y los TAP (Solheim et al, 1997). Otra proteína involucrada es la tapasina, proteína asociada a la subunidad TAP-1 del transportador, que va a permitir el parcial plegamiento del heterodímero cadena  $\alpha$ -cadena  $\beta$ 2m espere el péptido adecuado del citosol (Seliger et al, 1997; Janeway y Travers, 1997). La tapasina es una



proteína de 48 kDa, codificada también en el CPH. Finalmente, la unión de un péptido liberado del TAP al heterodímero parcialmente plegado, permite que las moléculas del CPH clase I se plieguen totalmente y abandonen el RE para migrar hacia el aparato de Golgi, donde sufrirán una glicosilación y luego será exportada hacia la superficie celular para su reconocimiento por el receptor de las células T unido a la molécula CD8 (Jackson et al, 1994; Hahn et al, 1996). El mecanismo de procesamiento de antígenos descrito aquí, se esquematiza en la figura 3, mientras que el reconocimiento por parte de las células CD8, se describe en la figura 4.

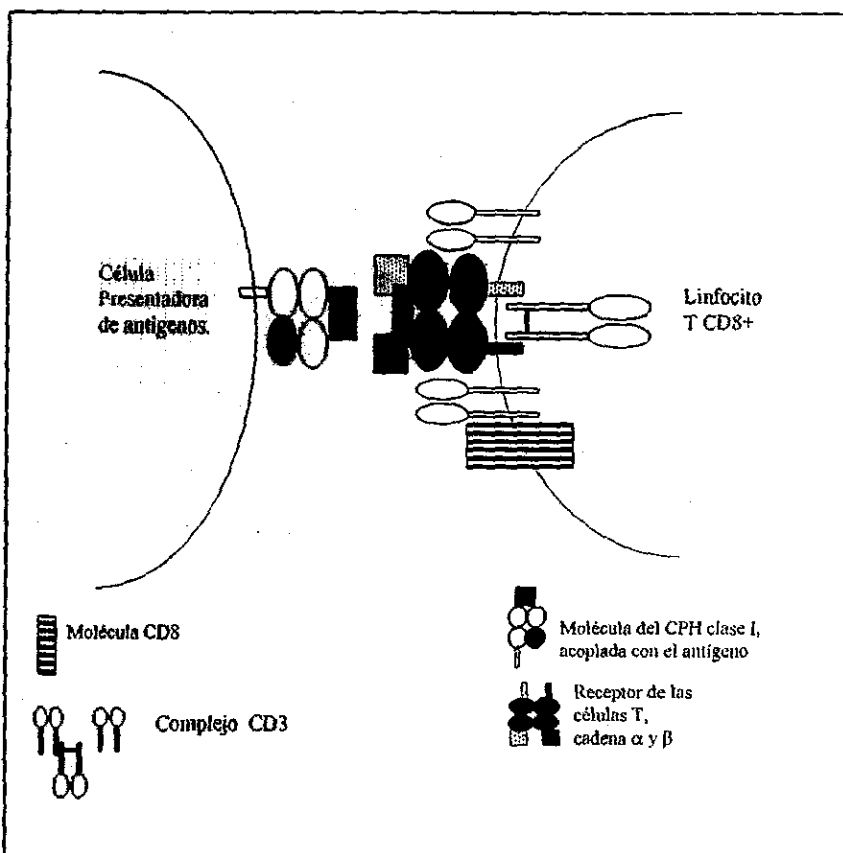


Figura 4: Esquema del reconocimiento por parte de las células T hacia células presentadoras de antígenos. Presentación via moléculas del CPH clase I de péptidos procesados endógenamente y expuestos en la superficie de las CPA para su reconocimiento por parte del receptor de las células T-complejo CD3, acoplado con la molécula de superficie CD8, en linfocitos citotóxicos.

Una vez que ha habido un reconocimiento del péptido antigénico por parte de las células T, sea en el contexto de moléculas clase I o II, se inicia el proceso de eliminación del agente extraño. Cabe señalar que la eliminación del antígeno mediante la inmunidad adquirida o específica está en estrecho contacto con la respuesta que pueda darse por los componentes de la inmunidad innata.

#### IV. Fase Inmune Efectora.

La inmunidad mediada por células de la respuesta inmune consta de tres fases: 1) **fase de reconocimiento**, donde el antígeno es reconocido por las células encargadas de fagocitar y presentar a agentes extraños en el organismo, procesándolos y presentándolos a las células que se encargaran de su eliminación; b) **fase de activación**, en la cual las células que fueron presentadas al antígeno secretan moléculas (interleucinas y quimiocinas) para su activación y proliferación hacia un antígeno en particular (teoría de la selección clonal) y finalmente, c) **fase efectora**, donde las células activadas o efectoras se encargan de eliminar al antígeno contra el cual fueron sensibilizadas (Abbas et al, 1994).

La fase efectora en la respuesta inmune innata es llevada a cabo por células no restringidas al complejo principal de histocompatibilidad como las células NK y/o las células asesinas activadas por linfocinas (células LAK, por sus siglas en inglés), mientras que en la inmunidad específica la fase efectora puede ser desarrollada en forma aislada, o en conjunto con las células arriba mencionadas, por los anticuerpos (citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos, ADCC, por sus siglas en inglés) o por los linfocitos T CD8+ citotóxicos (Paul, 1993).

La inmunidad específica mediada por células, es mediada por los linfocitos T citotóxicos; de manera general, se puede considerar que existen dos vías para la lisis de sus células blanco: a) una forma dependiente de la liberación de moléculas que originan la lisis de la célula blanco y b) mediante la expresión de la molécula Fas (Squier y Cohen, 1994). En ambos mecanismos al parecer la finalidad es inducir a la muerte celular programada o apoptosis (Alberts et al, 1994).

En la primera categoría, pueden ser incluidas todas las moléculas que secretadas en gránulos o inyectadas en la célula blanco por el linfocito T (CD4+, CD8+ e incluso células NK) pueden causar la lisis de la primera. Aunque de forma clásica se creía que la perforina o citolisina era la molécula contenida en los gránulos secretados por las células T, ahora se sabe que éstos además también pueden contener granzimas, un grupo de serina proteasas que, posiblemente, al ser inducidas por la misma perforina, actúen por hidrólisis y activación de proteínas intragranulares, inductoras de la fragmentación de ADN (Huding et al, 1993). El modelo de citotoxicidad por exocitosis granular propone que después de la interacción de la célula blanco con las células efectoras, éstas liberan el contenido de sus gránulos citoplásmaticos en el espacio intracelular entre el linfocito y la célula blanco. Entonces, la perforina sufre un cambio conformacional inducido por el calcio libre, integrándose a la membrana de la célula blanco, formando poros que son similares a los que se forman por ataque del sistema de complemento (Kägi et al, 1995).

La citotoxicidad por la vía dependiente de la expresión de la molécula Fas, también llamada CD95 o APO-1, está restringida a las células blanco que presentan dicha molécula en su superficie. En experimentos donde se observó la lisis de las células blanco en ausencia de calcio, lo cual eliminaba la lisis por perforina que depende de estos iones, llevó a suponer que la citotoxicidad en ausencia de  $Ca^{2+}$  es mediada por la molécula Fas (Rouvier et al, 1993). Sin embargo, trabajos posteriores han establecido que esta citotoxicidad depende en cierto grado de la presencia de los iones calcio (Hanabuchi et al, 1994; Stalder, 1994). Lo que es claro es que esta citotoxicidad requiere de la interacción de la molécula Fas en las células blanco y de su ligando en las células T (Kägi et al, 1995). Una vez que se lleva a cabo la interacción de la molécula Fas con su ligando se genera una señal que induce a su trimerización, que a su vez conducirá a la apoptosis o muerte celular programada en las células blanco por una vía de transducción de señales poco conocida. Entre las enzimas involucradas se encuentra la enzima convertidora de la interleucina  $1\beta$  (ICE, por "interleukin  $1\beta$ -converting enzyme") y/o proteasas relacionadas con ICE (Enari, 1995), además de una ruta de señales mediada por la esfingomielinasa ácida (Cifone et al, 1994; Gill et al, 1994). La homología de ICE con el gene que induce la muerte celular, *ced-3* en nemátodos indica que la apoptosis inducida por el ligando Fas se encuentra conservada en la evolución (Los et al, 1995).

Este mecanismo de eliminación de células en el organismo es utilizado principalmente por las células CD4+, que aunque pueden también lisar vía perforinas, prefieren inducir a la apoptosis mediante la expresión del ligando Fas, en comparación con las células T citotóxicas, las cuales siguen una vía dependiente de perforinas y granzimas (Kägi et al, 1995)

La importancia de la función efectora de las distintas células que forman parte del sistema inmune en la protección del organismo en la inmunopatología, las enfermedades autoinmunes y el rechazo de transplantes, se basa en el correcto reconocimiento de los antígenos presentados por las células normales o infectadas con algún patógeno celular. Sin embargo, en distintas ocasiones, las partículas anormales o de células infectadas no son eliminadas completamente, o por alguna razón, evitan ser reconocidas por el sistema inmunológico, tal vez por inducir o asociarse a mecanismos de inmunosupresión. Por ejemplo, se ha encontrado que el ADN viral puede persistir indefinidamente en las células del hospedero, evadiendo el sistema inmune, al parecer como un efecto neto de una infección viral, en donde ésta es controlada pero no eliminada completamente, y de esta forma asegurar que se reduzca la inmunidad mediada por células (Rinaldo, 1990).

Se han identificado principalmente dos mecanismos por los cuales partículas virales se encuentran afectando la respuesta inmune antiviral; estos mecanismos son: a) las proteínas codificadas por el virus interfieren con la activación de linfocitos mediada por citocinas y su actividad antiviral; por ejemplo, el virus de Epstein-Barr codifica para una proteína con actividad similar a la IL-10, la cual es una molécula supresora de la actividad de los linfocitos auxiliares (Vieira, 1990), y b) disminución o baja regulación de las moléculas del CPH clase I; en este caso, se ha reportado que los adenovirus, los virus del herpes simple y

el citomegalovirus de ratón y humano evitan totalmente la expresión de moléculas clase I en la superficie de las células infectadas con estos virus (Rinaldo, 1990; Del Val et al, 1992; Campbell y Stater, 1994).

Aunque se desconoce mucho sobre la biología de la mayoría de los virus clínicamente importantes, la investigación sobre los mismos continúa; tal es el caso de los virus del papiloma humano, los cuales se encuentran estrechamente asociados con el desarrollo de cáncer de cérvix, y con los que se especula una posible relación con la evasión del este tipo de cáncer para ser reconocido por el sistema inmune.

#### V. Virus de papiloma humano.

Desde que zur Hausen (1976) propuso que ciertos tipos de virus del papiloma humano (VPH), que infectan el tracto genital y se transmiten sexualmente podían tener relación con la carcinogénesis del cérvix, se han realizado una gran cantidad de estudios para discernir la relación entre el VPH y el cáncer cervical. Actualmente se ha acumulado una gran cantidad de evidencia al respecto, encontrándose una relación de un 90% a un 95% en la presencia de los VPH en células provenientes de tumores de cérvix y en la mayoría de las líneas originadas a partir de carcinomas cervicales (Muñoz et al, 1992; Wheeler, et al, 1997; Yamada, 1997).

Actualmente los VPH han sido reconocidos como agentes implicados en la carcinogénesis de distintas células humanas, particularmente las de cérvix, la región anogenital, algunas de la piel, las vías respiratorias altas, y el tracto digestivo (Ponten et al, 1995; Toledo-Cuevas y García-Carrancá, 1996;).

Los papilomavirus son pequeños adenovirus que infectan epitelios e inducen principalmente lesiones benignas de la piel en humanos y otros mamíferos, incluyendo verrugas escamosas y papilomas. Más de 70 tipos de VPH han sido descritos, de los cuales, aproximadamente 30 tipos están relacionados con lesiones en el tracto anogenital (Münzer, 1995) y 20 de los mismos específicamente con tumores cervicales, donde el tipo 16 es el más predominante, encontrándose en un 50% en todas las infecciones (Yamada et al, 1997). Los VPH se clasifican en dos grupos, los que invaden las mucosas y los que infectan los epitelios secos como la piel. Los VPH que invaden las mucosas orales o genitales, se subdividen a su vez en dos grupos más: aquellos considerados de bajo riesgo (como el VPH tipo 6 y 11), y los de alto riesgo (tipos 16, 18, 31 y 33).

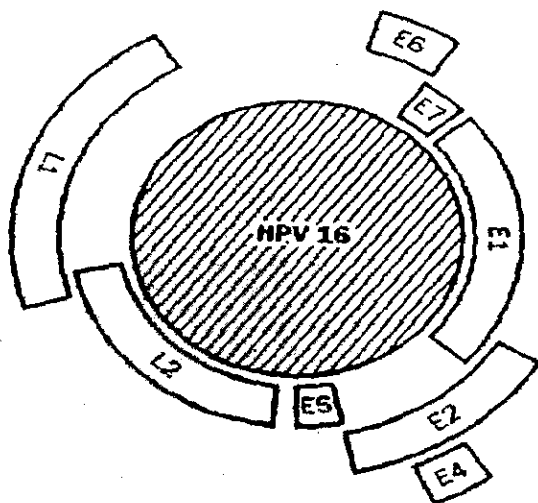


Figura 6: Esquema de la estructura genética del virus del papiloma humano tipo 16, donde se representan las regiones génicas que codifican para las proteínas virales tardías (L) y tempranas (E).

#### a) Estructura genética de los VPH.

A pesar de que existen más de setenta tipos de VPH, estos muestran una amplia conservación en la estructura y organización de su ADN (Figura 6). Presentan viriones icosaédricos, carecen de envoltura y contienen una molécula de ADN circular de doble cadena de aproximadamente 8 kpb (De Villiers, 1989). Los genes de los VPH están divididos en una región control donde se encuentra el origen de replicación y el promotor temprano, y otra región codificadora organizada en dos regiones: una temprana (E, de "early" en inglés) y una tardía (L de "late"). La región temprana contiene seis genes principales, 5 de proteínas tempranas y uno de tardías, cuyos productos están involucrados en procesos como la replicación viral, la regulación de la transcripción y la inmortalización celular (Toledo-Cuevas y García-Carrancá, 1996). La región tardía contiene dos genes que codifican para proteínas estructurales de la cápside nuclear. Las principales funciones conocidas de las proteínas codificadas por los genes del VPH, se resumen en el cuadro 1.2.

Cuadro 1.2: Características y funciones principales de las proteínas de virus del papiloma humano.

Proteínas tempranas	
E6	* Proteína básica unida a zinc. Se une a ADN de doble cadena con alta afinidad. Inmortaliza las células huésped y modula la transcripción del virus. Se une a p53 e induce a su degradación.
E7	* Fosfoproteína nuclear ácida, unida a zinc. Inmortaliza las células huésped y modula la transcripción del virus. Transforma al cooperar con <i>ras</i> en cultivos primarios de células de ratón. Se une a RB inactivándolo. Modula indirectamente la transcripción.
E2	* Regula la transcripción viral. Se une al ADN y coopera con E1 en la replicación viral.

E1	* Participa en la regulación viral. Inicia la replicación y modula la función de E2.
E4	* Participa en la maduración de las partículas virales.
E5	* Transforma. Se pierde durante la integración viral.

**Proteínas tardías**

L1 y L2 \* Proteínas de la cápside del virus.

Toledo-Cuevas y García-Carrancá, 1996 y Münger et al, 1992.

**b) Proteínas tempranas E6 y E7.**

En lesiones benignas, principalmente en cérvix humano asociadas con los VPH, se ha observado que el ADN de estos virus se encuentra en un estado episomal. Sin embargo, en carcinomas anogenitales, frecuentemente el ADN viral se encuentra integrado al genoma del hospedero. Esta integración, además de aportar estabilidad al ADN viral, también permite el incremento en la expresión de las proteínas oncogénicas E6 y E7 (Cuadro 2).

El proceso de integración conduce al rompimiento o interrupción del marco de lectura abierta del gene E2 y como consecuencia de ello, a una disminución en la expresión del represor transcripcional del promotor p97, específico de E6 y E7, con lo que aumentan su expresión estas últimas (McBride et al, 1991; Berumen et al, 1994; Jeon y Lambert, 1995). Esto último se relaciona con la frecuencia de tumores cervicales que presentan las proteínas virales E6 y E7, en comparación con estadios benignos en el mismo tipo celular. Es precisamente por estas observaciones que se han planteado distintas inmunoterapias y vacunas con referencia a la presencia de estas proteínas oncogénicas.

Los genes E6 y E7 son transcritos por un promotor temprano, el cual se conoce como p97 en los VPH tipos 16 y 31, y como p105 en el tipo 18. La actividad de este promotor es regulada por un elemento de control transcripcional en una región de control larga (LCR, por "long control region") la cual está localizada después de un punto de inicio ("start site") (Gloss et al, 1987). Diferentes factores nucleares se unen a la LCR en sitios específicos y regulan la actividad transcripcional del promotor, como AP1, NF1, TEF-1, TEF-2 y Oct1 que han sido identificados para el VPH tipo 16 (Chong et al, 1991; Ishiji, et al 1992). Sin embargo, al parecer el tipo de factor nuclear es dependiente del tipo de virus que se encuentre: por ejemplo, para el VPH tipo 18 se ha reportado una actividad de AP1 para activar la transcripción, en donde NF1 y Oct1 permanecen sin actividad significativa (Butz y Hoppe-Seyler, 1993)

En sistemas de cultivos celulares, la expresión de las proteínas E6 y E7 del VPH por sí solos parecen ser suficientes para immortalizar a distintos tipos celulares como epitelios, queratinocitos y fibroblastos (Münger y Phelps, 1993; Pirisi et al, 1987; Barbosa y Scheleger, 1989). La proteína E7 del VPH tipo 16 es una fosfoproteína ácida de 98 aminoácidos que se une a zinc, y tiene un peso de 21 kDa. Esta proteína ha sido detectada en el citoplasma y núcleo de células transformadas con este tipo de VPH. Los 38 aminoácidos terminales son muy similares a porciones análogas del antígeno T de SV40 y a las regiones conservadas 1 y 2 de las proteínas E1A de adenovirus, por lo que se especula

que esta región es importante para la transformación de la célula huésped y para la interacción del virus con proteínas celulares (Phelps et al, 1992). Por su parte, la proteína E6 del virus del papiloma humano tipo 16 consta de 151 aminoácidos, siendo una proteína básica que se une a zinc. A diferencia de la proteína E7, E6 presenta cuatro regiones con secuencia Cys-X-X-Cys (E7 sólo presenta dos) en la región carboxilo terminal que al parecer son las responsables de la afinidad de estas proteínas por el zinc. Además, la proteína E6 se une a la doble cadena de ADN con alta afinidad, lo cual la involucra en la regulación transcripcional del virus (Barbosa et al, 1989; Münger et al, 1992).

La principal importancia de las proteínas virales E6 y E7 radica en que se relacionan directamente con proteínas celulares que se encargan de controlar el ciclo celular, como las proteínas RB y p53 (Cuadro 1.2), que son clasificadas como oncogenes porque son responsables directos de la immortalización de las células del hospedero. La proteína RB (proteína del retinoblastoma) es una fosfoproteína nuclear que interviene en el ciclo celular. En células quiescentes (G0/G1) o fuera de ciclo, RB se encuentra en un estado no fosforilado, y es fosforilada al final de la fase G1 del ciclo celular por el complejo CDK-ciclina (CDK, cinasa dependiente de ciclina por sus siglas en inglés) y desfosforilada durante la mitosis (Lewin, 1994). La proteína E7 del VPH se une a la forma no fosforilada de RB, impidiendo que ésta se una a su blanco celular y con ello evitar que las células salgan de ciclo. En consecuencia y debido a que los blancos de RB incluyen a factores de transcripción como E2F y ciclinas del tipo D y E, las células continúan proliferando (Münger, 1992). Otros blancos celulares para la proteína E6, son las proteínas p107, ciclina A, la proteína de unión a la caja TATA (TBP, por sus siglas en inglés) y la familia de factores de transcripción AP-1, por lo menos para el VPH tipo 16 (Massimi y Banks, 1997).

Por su parte, el producto del gene p53 es una fosfoproteína nuclear que actúa como represor tumoral. Distintas observaciones experimentales han sugerido que de forma normal las células tienen la capacidad de crecer sin restricción alguna, y esta capacidad es inhibida por p53. Se ha detectado p53 ausente o mutada en distintos tipos de cáncer, lo cual lo establece como un posible factor para el desarrollo carcinogénico (Lewin, 1994). La proteína E6 del VPH se une a p53, induciendo a su degradación a través de la ruta de proteólisis mediada por ubiquitina. Como consecuencia, la vida media metabólica de p53 en células que expresan la proteína E6 de VPH, se encuentra sensiblemente disminuida (Scheffner et al, 1990; Münger et al, 1992). Se ha sugerido como resultado de distintos estudios bioquímicos que existe una interacción entre la proteína E6 y p53 mediada por otra proteína celular del hospedero, designada como E6-AP (Huibregtse et al, 1991). Al parecer, el complejo de E6 y E6-AP está involucrado directamente en la reacción de ubiquitinación de p53 y actúa como una ligasa de ubiquitina (actividad de E3) (Scheffner et al, 1993, 1995). Sin embargo, datos recientes revelan que la proteína viral E7, no sólo se une con alta afinidad a la proteína celular RB, sino también a p53, al parecer de una forma independiente de su capacidad para unirse a RB, implicando que la función de E7 es para la replicación viral más que para una transformación (Jones y Münger, 1997; Massimi y Banks, 1997; Ku et al, 1997).

Debido a la elevada asociación entre la presencia de VPH de alto riesgo con el desarrollo de cáncer cervical, se ha planteado el desarrollo de distintas estrategias para combatir este mal, aprovechando precisamente la presencia de este virus, para generar una respuesta inmune contra las células tumorales que se encuentran infectadas con él. Las distintas estrategias se basan principalmente en el reconocimiento por parte de células T CD8+ específicas contra péptidos antigenicos derivados del procesamiento endógeno y presentados en la superficie de las células tumorales, via las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase I. Sin embargo, aunque se ha logrado cierto reconocimiento, ya sea en células obtenidas de pacientes reestimuladas *in vitro* y con modelos murinos *in vivo*, utilizando proteínas acarreadoras o infecciones con virus vaccinia atenuado, la respuesta no ha sido del todo específica contra péptidos del VPH (Feltkamp et al, 1993; Chen et al, 1992; Nakagawa et al, 1997). Estos trabajos, aunque reflejan que durante las primeras etapas de la infección con el VPH hay una respuesta citotóxica y humoral, aún se desconoce parte del mecanismo por el cual las células infectadas con este virus, particularmente donde se desarrolla cáncer cérvico uterino, evaden un reconocimiento por parte del sistema inmunológico humano; o bien, si el virus del papiloma humano desarrolla una función imprescindible para que este proceso se lleve a cabo.



## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En distintos tipos de cáncer, la presencia de moléculas clase I en la superficie celular se ve disminuida sensiblemente, sobre todo en estadios avanzados de malignidad. El análisis de distintos tipos celulares donde existe alguna infección por virus, muestra una participación importante de proteínas virales en la presentación de las moléculas del CPH clase I. Por ejemplo, se ha demostrado que proteínas de algunos citomegalovirus provocan que las moléculas clase I no puedan salir del retículo endoplásmico, al impedir su correcto ensamblaje; algo similar ocurre con proteínas de otros virus como el producto del adenovirus 12, el cual inhibe la transcripción de las moléculas clase I o interfiere con la expresión de los TAP's.

Por otra parte, los virus del papiloma humano (VPH), se han encontrado asociados con más del 90% de los casos de cáncer cérvico uterino, principalmente los tipos 16, 18 y 33, considerados de alto riesgo. La presencia de estos tipos de virus podría estar relacionada con la baja expresión de moléculas del CPH clase I que se ha observado en este tipo de cáncer. En el presente trabajo se pretende evaluar el efecto de las proteínas tempranas E6 y E7 del VPH tipo 16 sobre las moléculas clase I en un sistema *in vitro*, proteínas consideradas como oncogénes virales por la capacidad que tienen de inducir la transformación celular. Asimismo, se pretende analizar la capacidad presentadora de las células que porten a los oncogenes de forma aislada o junta, de una forma indirecta, en el contexto del complejo principal de histocompatibilidad clase I. Con ello se pretende aportar datos sobre el proceso carcinogénico para conocer más sobre el mismo, pues aún se desconoce con certeza la relación (si es que existe tal) entre las proteínas oncogénicas del virus del papiloma humano y las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase I.

### 3. OBJETIVOS:

#### Objetivos Generales:

- Analizar si la expresión de moléculas del CPH clase I en superficie celular se ve modificada en las células que expresan las proteínas virales E6 y E7 del VPH tipo 16.
- Analizar la capacidad presentadora de antígenos de las células que expresen los genes E6 y E7 del VPH tipo 16.

#### Objetivos Particulares:

- Transfectar la línea celular de mastocitoma de ratón P815 (haplotipo H-2D) con los plásmidos que portan los genes que codifican para las proteínas virales E6 y E7 del VPH tipo 16.
- Analizar la expresión de los genes introducidos en la línea celular P815.
- Obtención de clones celulares que expresen las proteínas E6 y E7 del VPH tipo 16.
- Analizar la expresión de moléculas del CPH clase I en superficie celular, tanto en los clones celulares transfectados como en la línea parental.
- Analizar la capacidad presentadora de antígenos de los clones celulares que portan los genes para las proteínas oncogénicas virales del VPH tipo 16.

#### 4. HIPOTESIS:

Las proteínas E6 y E7 del VPH se encuentran en altos niveles en células de cáncer cervical, coincidiendo además en una alta proporción de los casos, con un procesamiento y presentación de antígenos alterado, y una disminución de moléculas del CPH clase I en la superficie celular. Aunque se desconoce el punto donde ocurre la alteración en el procesamiento de antígenos, es claro que puede existir una asociación directa con la presencia del VPH, ya otros virus son capaces de desregular la expresión de moléculas clase I. En base a lo anterior, suponemos que la presencia de las proteínas oncogénicas E6 y E7 del VPH tipo 16 pueden estar afectando directamente la expresión de moléculas clase I en superficie celular y con ello impedir el reconocimiento de las células tumorales por parte de células T. Si logramos generar un sistema *in vitro* donde las proteínas E6 y E7 del VPH tipo 16 se expresen de forma continua y analizar si existe algún cambio en la expresión de moléculas del CPH clase I en superficie celular, observaremos si existe la disminución de la expresión de las moléculas del CPH clase I, tal y como se da en un 38% de los casos de cáncer cervical donde está presente el VPH. Con ello se pretende conocer más sobre el mecanismo que sigue este virus para evadir la respuesta inmune mediada por células.

## 5. METODO:

### 5.1. Líneas celulares:

Se utilizaron células de la línea P815, la cual fue originada a partir de un mastocitoma de ratón (Ralph, 1976). Las células fueron crecidas en cajas de cultivo tipo Falcon de 25 cm<sup>2</sup> (Nunc) de poliestireno en medio de cultivo Iscove (Iscove's Modified Dulbecco's Medium, Gibco BRL), suplementado con 10% de suero fetal de bovino (GIBCO), 1mM de aminoácidos no esenciales (Sigma), 1mM de piruvato de sodio (Sigma) y 2mM de L-glutamina (Sigma). Las células en estas condiciones fueron cultivadas en una incubadora a 37°C, atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> y humedad a punto de rocío. El medio de cultivo fue reemplazado totalmente por medio fresco a los dos días de cultivo y las células fueron sembradas en una proporción de 1X10<sup>5</sup> células en 10 ml de medio de cultivo.

### 5.2. Transferencia de genes.

#### 5.2.1 Plásmidos

Los genes que codifican para las proteínas tempranas E6 y E7 del virus del papiloma humano tipo 16, fueron insertados al plásmido pcDNA3, cada cDNA por separado, obteniendo así dos plásmidos: 16E6.wtpcDNA3 (Figura 7) y 16E7.wtpcDNA3 (Figura 8). La región génica introducida se encuentra entre un sitio de restricción para la enzima EcoRI y uno para la enzima BamHI. En las figuras, se muestra la estructura de los plásmidos, con los sitios de restricción y los sitios donde se encuentran los genes de resistencia a antibióticos.

#### 5.2.2 Bacterias y expansión del plásmido.

Bacterias *E. coli* de la cepa DH5 $\alpha$  fueron transformadas con los plásmidos arriba descritos por la técnica reportada por Sambrook y colaboradores (1989). Brevemente, bacterias competentes fueron incubadas en hielo por 10 minutos en presencia del ADN a introducir, y sometidas a un choque térmico en un baño maría a 42°C durante 2 minutos. Las bacterias fueron cultivadas posteriormente en cajas preparadas con agar bacteriológico (Bioxon) al 1.5 % en medio de crecimiento para bacterias (CircleGrow, BIO101) y ampicilina (150  $\mu$ g/ml). A las colonias que crecieron en este medio de selección se les comprobó la presencia del plásmido introducido mediante una extracción a pequeña escala de ADN de los plásmidos (apartado 5.2.3). Se eligió una colonia que presentara los plásmidos introducidos y se cultivaron para obtener el ADN de los plásmidos a gran escala (apartado 5.2.4).

#### 5.2.3 Obtención de ADN de plásmidos a pequeña escala o miniprep.

Utilizando la técnica reportada por Sambrook y colaboradores (1989), se extrajo el ADN de colonias de bacterias DH5 $\alpha$  transformadas con alguno de los plásmidos arriba mencionados. Las colonias fueron elegidas aleatoriamente para comprobar la presencia de dicho plásmido y se crecieron en 5 ml de medio de cultivo para bacterias (CircleGrow, BIO101) durante 12 horas o toda la noche a 37°C con agitación (Gyromax 703, Amerex Instruments Inc.). Posteriormente, 3 ml del cultivo fueron centrifugados a 14,000 r.p.m. a 4°C durante 2 minutos (Centrifuge 5402, Eppendorf), resuspendidas las células en 75  $\mu$ l de

solución A (glucosa 50 mM, EDTA 10 mM, Tris 25 mM, pH 8.0) con ayuda de un vórtex, para luego añadir 150 µl de solución B (SDS 15, NaOH 0.2 M). Para la lisis se mezcló por inversión para finalmente agregar 90 µl de solución C (KC<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>, 25.5 mM pH 4.8-5.0 ajustado con ácido acético glacial concentrado). Se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 minutos y el ADN plasmídico del sobrenadante fue precipitado con 1 ml de etanol frío absoluto durante 10 minutos en hielo. El ADN precipitado se obtuvo por centrifugación y la pastilla obtenida se lavó con etanol frío al 70% en agua (v/v) y finalmente se secó en una centrifuga con vacío (Automatic Environmental SpeedVac, Savant) durante 15 minutos. La pastilla fue resuspendida en 20 µl de solución amortiguadora de Tris-EDTA (solución TE, Tris 10 mM pH 8, EDTA 1mM pH 8). La presencia del ADN plasmídico y el inserto en el mismo se comprobó mediante la digestión con enzimas de restricción y corrimiento en geles de agarosa (apartado 5.2.5).

#### 5.2.4 Obtención de ADN de plásmidos a gran escala o maxiprep.

Bacterias transformadas a las cuales se les había comprobado la presencia del plásmido, fueron crecidas en 250 ml de medio de cultivo para bacterias a partir de 2 ml de inóculo durante toda la noche o 12 horas a 37°C en agitación. Las bacterias fueron centrifugadas a 8,000 rpm (Beckman) a 4°C durante 10 minutos y posteriormente resuspendidas en 12 ml de una solución A y 25 ml de solución B, manteniendo las células en hielo por 5 minutos y añadiendo 12 ml de la solución C para dejarlas en hielo por 1 hora. Después de transcurrido este tiempo se centrifugó a 8,000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se filtró el sobrenadante haciéndolo pasar por una gasa doble y se añadió 57.5 ml de etanol absoluto para precipitar por espacio de una hora a -20°C. El ADN precipitado se centrifugó durante 15 minutos y se resuspendió en 4 ml de solución TE. Se agregó 0.4 ml de Tris pH 9.4 y 0.4 ml de LiCl 8M para posteriormente realizar dos lavados con 4 ml de fenol:cloroformo (1:1) y dos lavados con 2 ml de cloroformo. En el último lavado se tomó la fase acuosa y se precipitó con 2 volúmenes y medio de etanol absoluto. El precipitado formado se centrifugó y se lavó dos veces con etanol al 70% para posteriormente ser secado en una centrifuga con vacío y resuspendido en 200 µl de agua estéril. Posteriormente, se calculó la cantidad de ADN presente al leer la densidad óptica de un 1µl de la solución final diluida en agua (hasta 100 veces) en un espectrofotómetro a 260 nm, para después calcular la concentración en base a la equivalencia de que 50 µg de ADN corresponden a una lectura de densidad óptica de 1. La presencia del ADN plasmídico y el inserto en el mismo se comprobó mediante la digestión con enzimas de restricción y corrimiento en geles de agarosa (apartado 5.2.5).

#### 5.2.5 Digestión con enzimas de restricción.

El ADN de los plásmidos obtenidos a pequeña o gran escala fue digerido con las enzimas de restricción que flanquean el inserto, EcoRI y BamHI, para comprobar la presencia de los plásmidos y el inserto. 5 µl de ADN plasmídico obtenido a pequeña escala se puso en contacto con 2 µl de solución amortiguadora B 10X (Buffer B, Boehringer Mannheim), 1 µl de enzima EcoRI (Boehringer Mannheim), 1 µl de enzima BamHI (Boehringer Mannheim) y 11 µl de agua estéril, para obtener un volumen final de 20 µl. La reacción se llevó a cabo a 37°C durante dos horas en presencia de 1 µl de ARNasa (10 mg/ml). Una vez terminada la reacción, se añadieron a las muestras 4 µl de solución de

corrida en gel (Sigma) y el ADN se separó en un gel de agarosa 1.5% en solución amortiguadora de Tris-borato, a una corriente constante de 70 volts y 35 mA, durante una hora y media.

### 5.3. Transfección de las células.

Células P815 obtenidas en fase exponencial, fueron transfectadas con ADN plasmídico sin linearizar, codificante de las proteínas E6 ó E7 del virus del papiloma humano tipo 16 o ambos plásmidos juntos. La transfección de las células se realizó con un paquete comercial de transfección liposomal (DOTAP Liposomal transfection reagent, Boehringer Mannheim), con las especificaciones marcadas por el distribuidor. Brevemente, células P815 ( $10^4$  células para cada transfección) fueron transfectadas por lipofección con 5 µg de cada ADN plasmídico disuelto en solución amortiguadora Hepes (20 mM, pH 7.4) a un volumen de 70 µl más la solución comercial de DOTAP (30 µl). Cuatro horas después de la transfección, se cambió el medio donde se había realizado la transfección, sustituyéndolo por medio de cultivo fresco (medio Iscove con SFB 8%, suplementado con aminoácidos no esenciales 1mM, piruvato de sodio 1mM y L-glutamina 2mM) con el antibiótico análogo a la neomicina, geneticina G418 (Boehringer Mannheim) para seleccionar las células transfectadas de las que no lo estaban, en una concentración de 1 mg/ml. Las células fueron sembradas en una placa de 24 pozos, colocando 2 ml de suspensión celular por pozo (entre 200 y 210 células por pozo, aproximadamente). Las células fueron mantenidas durante el tiempo necesario, observándolas diariamente y sustituyendo el medio de cultivo ácido por fresco con antibiótico las veces que fuera necesario. Las líneas celulares originadas fueron denominadas P815-E6, P815-E7 y P815-E67, dependiendo de los genes que portaban y la expresión del plásmido fue comprobada mediante RT-PCR (apartado 5.4.2).

### 5.4. Expresión de los genes E6 y E7.

#### 5.4.1 Extracción de ARN total.

El ARN total, de la células transfectadas o sin transfectar fue extraído según la técnica establecida por Chomczynski y Sacchi en 1987, con algunas variantes. Células P815 ( $10^7$ ), transfectadas o sin transfectar, fueron cosechadas, lavadas tres veces con solución amortiguadora de fosfatos (PBS), y lisadas con 500 µl de solución desnaturalizante (4M de isotiocianato de guanidina, 25 mM de citrato de sodio pH7, 0.15 de β-mercaptoetanol y N-lauril sarcosilo al 0.5%), 25 µl acetato de sodio 2M pH 4 y dos volúmenes de fenol ácido a 68°C y 100 µl de cloroformo: alcohol isoamílico (49:1). Después de incubar esta mezcla por 10 minutos en hielo, se centrifugó a 14 000 r.p.m. durante 5 minutos a 4°C. La fase acuosa obtenida de la centrifugación se transfirió a un nuevo tubo limpio preenfriado en hielo, donde además se adicionaron 2.5 volúmenes de etanol frío al 95%, dejando precipitar el ARN toda la noche a -20°C o bien, durante 1 hora a -70°C. Para obtener el botón de ARN se centrifugó durante media hora a 14 000 r.p.m y 4°C, el sobrenadante se eliminó y se dejó secar el botón para resuspenderlo en 20 µl de agua tratada con dietilpirocarbonato (0.2%).

#### 5.4.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa Transcriptasa Reversa (RT-PCR)

El ARN total extraído de las células transfectadas o sin transfectar fue cuantificado en un espectrofotómetro (CamSpec) a una longitud de onda de 260 nm y en una

equivalencia de 1 D.O. = 40 µg de ácidos nucleicos. Para realizar la reacción de transcriptasa reversa (RT, del inglés "reverse transcriptase") se utilizó el ARN total en una concentración de 0.5 µg/µl. A cada 2 µl de ARN total se le adicionaron 8.7 µl de la mezcla para RT, la cual esta compuesta por 2 µl de MgCl<sub>2</sub> 25mM, 1 µl de amortiguador de la RT 10X (50mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 1mM MgCl<sub>2</sub>), 4 µl de trifosfatos de desoxirribonucleósido (dNTPs) 10mM (Perkin Elmer), 0.2 µl de inhibidores de ARNasa 10 U/µl (Perkin Elmer), 0.5 µl oligo (dT) 50 µM (Perkin Elmer), 0.5 µl de enzima retrotranscriptasa 25 U/µl (Perkin Elmer) y 0.5 µl de ditiotreitól (DTT) 0.1M. La reacción se llevó a cabo en un termociclador (Cyclogene, Techne) en un programa de un solo ciclo que incluía la alineación y extensión del ARN (42°C, 1 hora), desnaturalización del ADN (95°C, 5 minutos), y un segmento para finalizar la reacción (5°C, 24 horas).

El total del producto de la reacción en transcriptasa reversa fue utilizada para realizar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés "polymerase chain reaction"). A cada producto de la RT se le adicionó el volumen suficiente de los reactivos que se enlistan a continuación para llevar a la concentración final que se da en seguida de cada reactivo: MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM, amortiguador de la PCR 1X (50mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 1mM MgCl<sub>2</sub>), dimetilsulfóxido 10%, ADN polimerasa *Thermus aquaticus* (*Taq* ADN polymerase o *Taq* polimerasa) 1 U/µl (Perkin Elmer), oligonucleótidos (Gibco BRL) 10 pmol y agua tratada con Dietilpirocarbonato (agua DEPC 0.2%) para completar el volumen de dilución. Como controles negativos, se utilizó ARN total de células no transfectadas, mientras que como control positivo el plásmido con los genes para E6 ó E7 de HPV tipo 16, respectivamente. En este último caso, durante el PCR se adicionaron a estas muestras, además de los reactivos antes mencionados, dNTPs a una concentración final de 200 µM. La reacción se llevó a cabo en un termociclador (Cyclogene, Techne) en un primer programa de un sólo ciclo a 94°C durante tres minutos, unido a un segundo programa de 15 ciclos, cada uno con 94°C durante 1 minuto, para la desnaturalización, 54°C por 1 minuto para la alineación, y 72°C por 1 minuto para la extensión. Este segundo programa fue unido a un tercer programa de 30 ciclos, donde cada uno consistió de 94°C durante 1 minuto, para la desnaturalización, 60°C por 1 minuto para la alineación, y 72°C por 1 minuto para la extensión.

Los oligonucleótidos utilizados fueron: para E6 (E6EcoRI), el sentido dirección 5'a 3' fue AGC GAA TTC TTA CAG CTG GGT TTC TCT ACG TGT TCT TG y un antisentido, en dirección 5'a 3' (E6BamHI) AGC GGA TCC ATG TTT CAG GAC CCA CAG GAG CGA CCC A, con un producto esperado de aproximadamente 477 pares de bases. Para E7, los oligonucleótidos fueron: el sentido en dirección 5'a 3' (E7EcoRI):AGC GGA TCC ATG CAT GGA GAT ACA CCT ACA TTG CAT GA y un antisentido en dirección 5'a 3' (E7BamHI) AGC GAA TTC TTA TGG TTT CTG AGA ACA GAT GGG GCA C, con un producto esperado de aproximadamente 318 pares de bases.

Los productos de la amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa fueron separados en un gel de agarosa 1.5% en solución amortiguadora de Tris-borato, a una corriente constante de 70 volts y 35 mA, durante una hora y media.

### 5.5.5. Análisis de la expresión de moléculas clase I del CPH.

A las células transfectadas con los plásmidos para las proteínas E6, E7 o ambos del virus del papiloma humano, así como células P815 transfectadas únicamente con el plásmido, se les analizó la expresión de moléculas clase I del complejo principal de histocompatibilidad en superficie celular, para saber si disminuía su expresión, aumentaba o permanecía sin cambio con respecto a células sin transfectar.

Aproximadamente  $10^6$  células P815 transfectadas o sin transfectar (P815-E6, P815-E7, P815-X2, P815-B7.1, P815-pcDNA y P815), fueron sembradas la noche anterior al ensayo en 2 ml de medio de cultivo Iscove, L-glutamina 200 mM y suero fetal de bovino al 10%. Al día siguiente, las células fueron obtenidas de los cajas de cultivo, lavadas dos veces con PBS al 2% de SFB, y resuspendidas en 200  $\mu$ l de esta última solución, repartiendo 100  $\mu$ l por cada pozo. A un grupo de pozos se les agregó 100  $\mu$ l de medio condicionado del hibridoma SF1.11, productor del anticuerpo contra las moléculas clase I alelo  $K^d$ , a otro grupo 100  $\mu$ l de medio condicionado del hibridoma 344.205, productor del anticuerpo contra las moléculas clase I alelo  $D^d$  y 100  $\mu$ l del medio condicionado del hibridoma HB27 productor del anticuerpo contra las moléculas clase I  $L^d$  a un tercer grupo de pozos. Las células se incubaron en hielo durante media hora, después de la cual, se lavaron dos veces con una solución fría de PBS-SFB al 2%, e incubaron durante treinta minutos en hielo con un anticuerpo secundario marcado con fluoresceína que reconoce la porción Fc de cualquier anticuerpo de ratón (Gibco, BRL). Pasado este tiempo, las células se lavaron dos veces con PBS-SFB 2% frío para eliminar el exceso de anticuerpo, se resuspendieron en 200  $\mu$ l de PBS-SFB 2% frío y se transfirieron a tubos para citómetro de flujo. Antes de leer las muestras en un citómetro de flujo (FACScan, Beckman Dickinson) se les añadió 200  $\mu$ l de una solución de PBS-SFB 2% con yoduro de propidio (1  $\mu$ g/ml).

Como control de técnica se utilizó la línea P815 sin transfectar, incubada únicamente con el anticuerpo secundario o bien sin anticuerpo; como control experimental se utilizaron las células P815-pcDNA, P815-B7.1 y P815 sin transfectar, a las que se les dio el mismo tratamiento que al resto de las líneas.

### 5.6. Inmunización y ensayos de proliferación de células de bazo de ratón.

#### 5.6.1 Inmunización de ratones y obtención de células de bazo.

Ratones Balb/c de 6 a 8 semanas de edad fueron inyectados con 100  $\mu$ g de ADN de plásmido en 0.5 ml de PBS estéril, vía subdérmica. Quince días después de la inmunización se aplicó un refuerzo con la misma cantidad de ADN por la misma vía. Los ratones fueron sacrificados 15 días después y el bazo les fue extraído para ser disgregado en una malla de organza y obtener así las células de este órgano. Las células rojas fueron eliminadas del cultivo mediante uso de una solución de lisis compuesta por  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.15M,  $\text{KHCO}_3$  1 mM,  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  0.1mM; el resto de la suspensión celular se cultivó en medio completo (medio de cultivo Iscove (GIBCO), 10% suero fetal de bovino (GIBCO), 1mM de aminoácidos no esenciales (Sigma), 1mM de piruvato de sodio (Sigma), 2mM de L-glutamina (Sigma), 0.2 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol), en presencia o ausencia de las líneas celulares transfectadas y sin



transfectar.

#### 5.6.2 Ensayos de proliferación de células de bazo.

Células de bazo de ratones inmunizados con ADN de plásmido (apartado 5.6.1) obtenidas recientemente fueron sembradas en placas de 96 pozos en relación 1:10 con las células transfectadas con los genes E6, E7 o ambos, tratadas con glutaraldehído a 0.25 % en PBS, en medio completo e IL-2 recombinante de ratón (rrIL-2) (10 U/ml). Las células fueron sembradas por triplicados en 3 series. Al día dos de iniciado el cultivo, se agregó 0.5 $\mu$ Ci de timidina tritiada por mililitro de medio a los cultivos. 24 horas después, una serie o grupo fueron obtenidas de las placas, lavadas dos veces con PBS y lisadas con 100  $\mu$ l de NaOH 2M. El lisado celular fue transferido a un vial, en donde se agregaron 1.5 ml de líquido de centelleo y la cantidad de radioactividad liberada fue leída en un contador de centello. La operación se repitió para el día 4 y 5 de iniciado el cultivo. Los resultados se muestran en cantidad de cuentas por minuto (c.p.m.).

#### 5.7 Análisis Estadístico.

Los datos obtenidos de tres ensayos realizados por separado, por triplicado cada uno del análisis de la expresión de moléculas clase I del CPH (apartado 5.5), así como los datos obtenidos de tres ensayos de proliferación (apartado 5.6.2), fueron sometidos a un análisis de varianza (ANDEVA) con una prueba de diferencia significativa de Fisher.

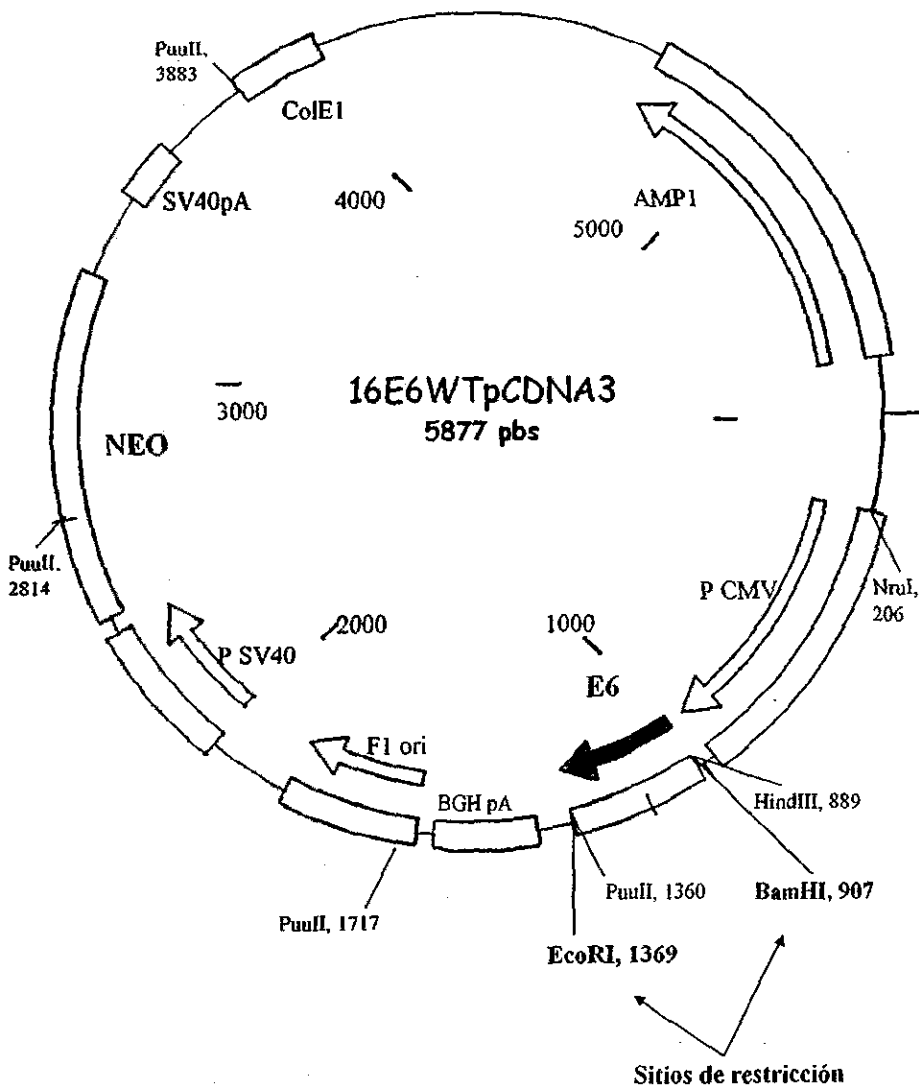


Figura 7. Esquema del mapa genético del plásmido 16E6WTpCDNA3, donde se muestran los sitios sensibles a enzimas de restricción, el sitio del inserto para la proteína E6 y el tamaño en pares de bases (pbs).

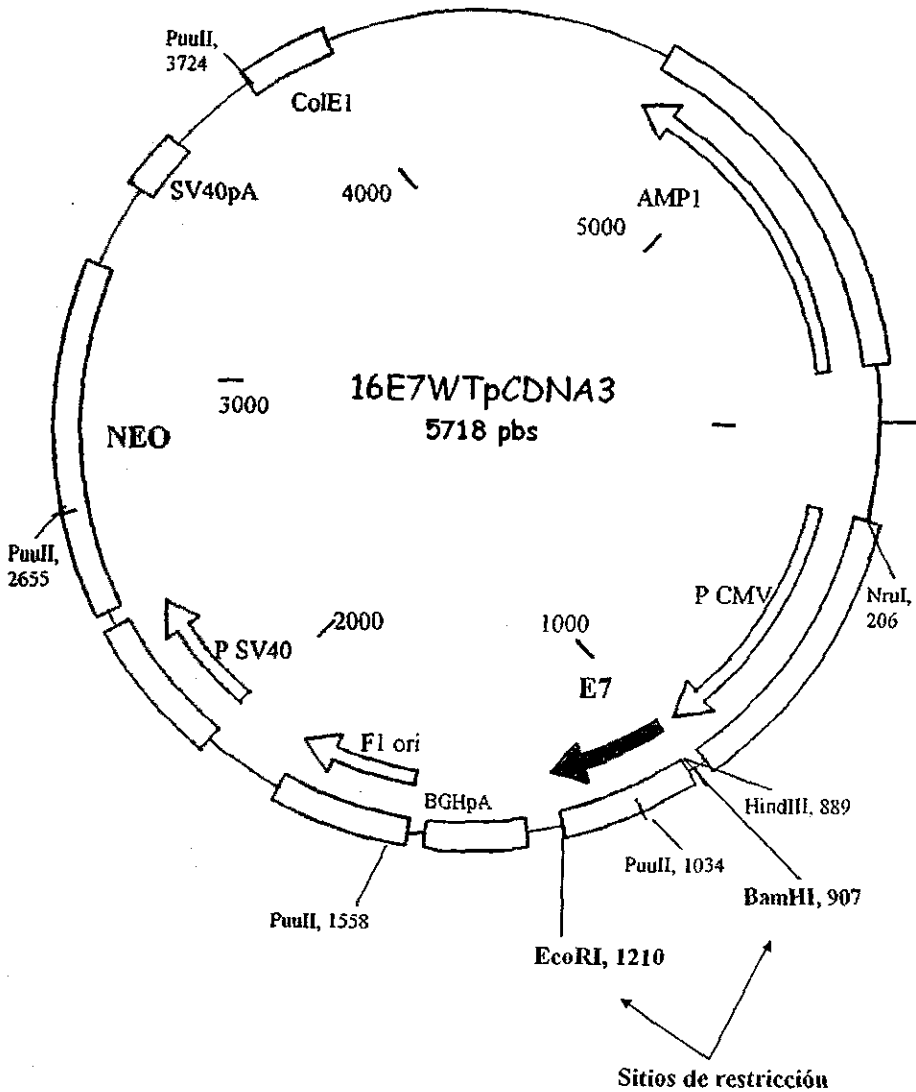
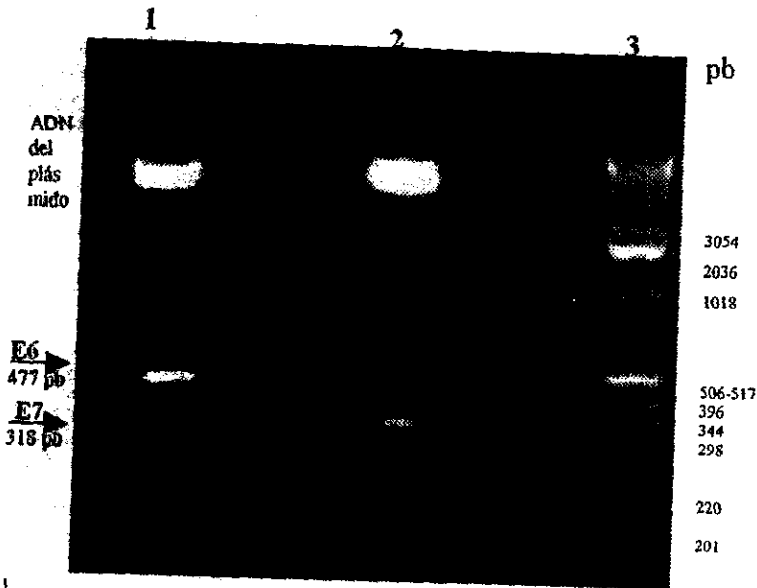


Figura 8. Esquema del mapa genético del plásmido 16E6WTpCDNA3, donde se muestran los sitios sensibles a enzimas de restricción, el sitio del inserto para la proteína E6 y el tamaño en pares de bases (pbs).

## 6. RESULTADOS:

### 6.1. Plásmidos:

Los plásmidos que portan los genes para la proteína E6 o E7 del virus del papiloma humano tipo 16, fueron expandidos en bacterias *E. coli* de la cepa DH $\alpha$ 5, obteniendo y purificando el ADN plasmídico como se explica en el método (apartado 2.4). En la fotografía 1 se muestra el ADN plasmídico, tanto para el plásmido 16E6.wtpcDNA3 (carril 1) como para 16E7.wtpcDNA3 (carril 2), digeridos con las enzimas EcoRI y BamHI y separados en un gel de agarosa al 1.5% en solución amortiguadora de Tris-borato. Así mismo, se pueden apreciar las bandas que corresponden al tamaño esperado para los insertos: 477 pares de bases para E6 y 318 pares de bases para E7.



Fotografía 1. Plásmido pcDNA3 y los insertos para los genes de E6 y E7 del virus del papiloma humano tipo 16. Carril 1: 16E6.wtpcDNA3 digerido con las enzimas EcoRI y BamHI; carril 2: 16E7.wtpcDNA3 digerido también con las dos enzimas anteriores. Carril 3: marcadores de tamaño en pares de bases.

El ADN plasmídico fue cuantificado en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 260nm. La cantidad de ADN obtenida se muestra en el cuadro siguiente.

Cuadro 6.1: Cuantificación del ADN plasmídico a 260 nm y 280 nm.

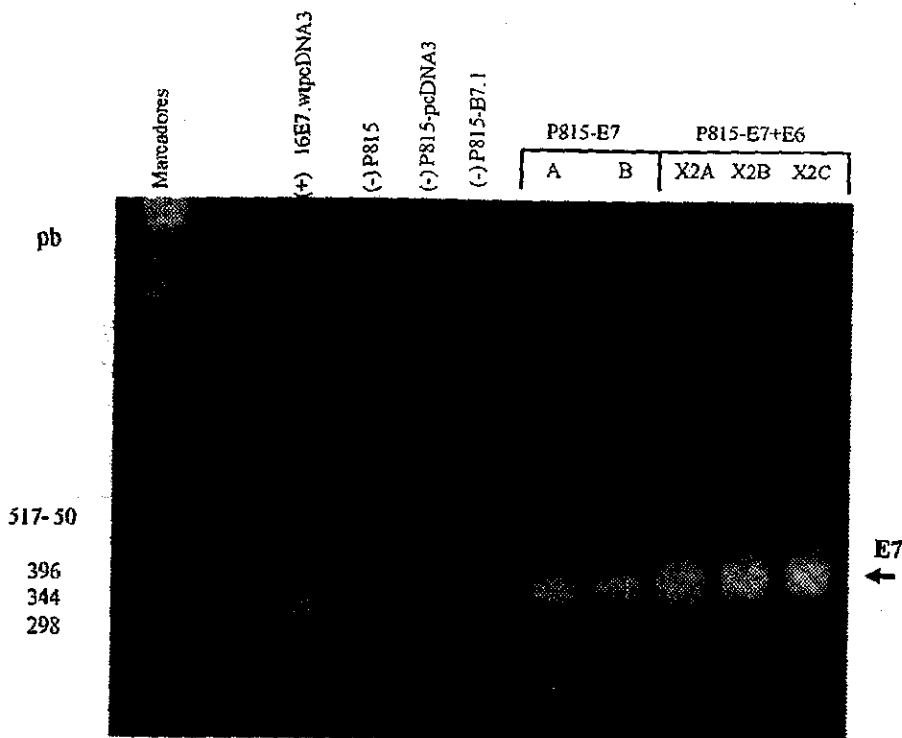
Plásmido	Concentración en µg/ul	Relación ác. nucléico/proteína
16E6.wtpcDNA3	7.395	1.620
16E7.wtpcDNA3	2.130	1.492

## 6.2. Transfección de células P815 y expresión de los genes introducidos.

Las células P815 ( $10^4$  células para cada transfección) fueron transfectadas por lipofección con la solución comercial de DOTAP. Esta solución forma poros transitorios en la superficie celular, lo que permite la entrada a la célula del plásmido. Las células que crecieron en presencia del antibiótico G418 (aproximadamente 10 a 11 días después de realizada la transfección), se consideraron como una transfección positiva. Las células transfectadas, se denominaron P815-E6, P815-E7, P815-X2, para las líneas que portaban los genes E6, E7 y E6-E7 juntos, respectivamente, añadiéndose una letra para cada pozo donde crecieron las células, considerándose como una población separada de las que crecieron en los otros pozos. Se obtuvieron dos poblaciones para las células que crecieron en presencia del antibiótico transfectadas con los genes E7, tres para las células que portaban los genes para E6 y tres para aquellas células transfectadas con ambos plásmidos.

A las células que crecieron en presencia del antibiótico G418 se les realizó la reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa reversa (RT-PCR) a partir de ARN total de las células, con la finalidad de comprobar la expresión de los genes introducidos, utilizando oligonucleótidos o primers de inicio específicos para E6 y E7 del virus del papiloma humano tipo 16.

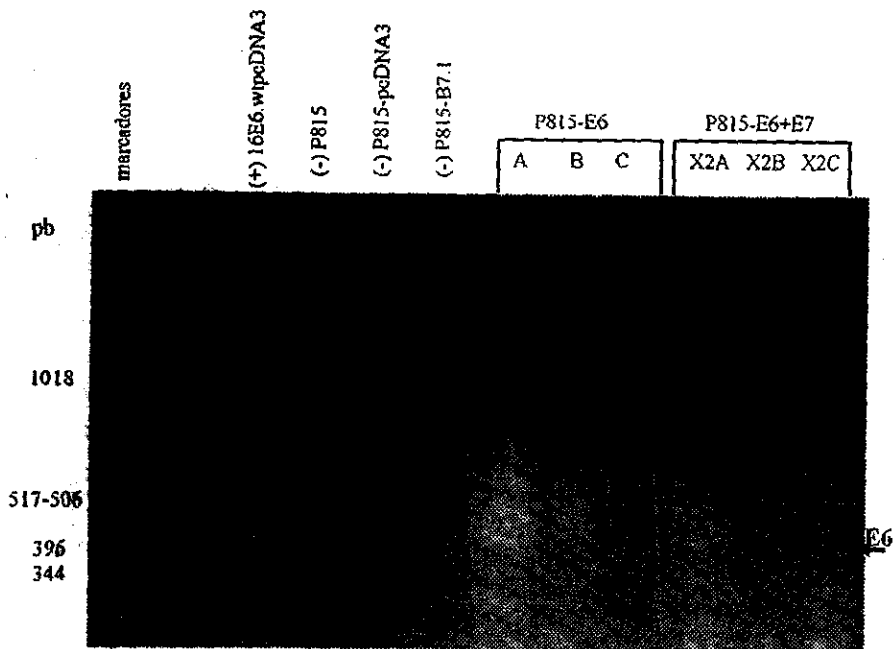
En la fotografía 2 se muestra la expresión del gen E7 en las células transfectadas con el plásmido 16E7.wtpcDNA3. El producto de esta amplificación se observa en todas las células transfectadas, ya sea con el plásmido con el gen para E7 (carriles 6 y 7) o con los plásmidos con los genes de E7 y E6 (carriles 8, 9 y 10), coincidiendo en tamaño con el obtenido para el ADN del plásmido E7.16wtpcDNA3, utilizado como control positivo (carril 2). Esta banda corresponde al tamaño esperado, de 318 pares de bases, y no aparece en las células no transfectadas (carril 3) o transfectadas con el plásmido vector sólo (pcDNA3, carril 4), o para una línea ya establecida con anterioridad de la misma línea parental P815 que porta un plásmido con los genes para la molécula de superficie celular B7.1 (carril 5). Cabe mencionar que en esta última línea el plásmido que porta no es pcDNA, y los genes que se introdujeron no están relacionados tampoco con el virus del papiloma humano



**Fotografía 2:** Determinación de la expresión del gen E7 introducido en las células P815 por RT-PCR. Abreviaciones: (+): Control positivo, plásmido 16E7.wtpcDNA3. (-): Controles negativos, células P815 sin transfectar, transfectadas con el plásmido vector solo pcDNA3 (P815-pcDNA3) y transfectadas con un plásmido para B7.1 (P815-B7.1). Las células P815 transfectadas con el plásmido 16E7.wtpcDNA3, poblaciones A y B se abrevian como P815-E7. Las células P815 transfectadas con el plásmido 16E7.wtpcDNA3 y el plásmido 16E6.wtpcDNA3, poblaciones A, B y C, (X2A, X2B, X2C) se marcan como P815-E7+E6. La flecha señala el producto de la amplificación y los marcadores de tamaño están en pares de bases (pb)

En la fotografía 3 se muestra la expresión del gen E6 en las células transfectadas con el plásmido 16E6.wtpcDNA3 solo o junto con el plásmido 16E7.wtpcDNA3. Sin embargo, a pesar de que las células a las que se les extrajo el ARN total fueron crecidas en medio de selección con G418 y sólo se utilizaron aquellas poblaciones que fueron capaces de crecer en este medio, no todas las poblaciones presentaban la expresión de los genes introducidos. Para las células transfectadas con el plásmido 16E6.wtpcDNA3, sólo en la población denominada a (P815-E6A, carril 6) se encontró la expresión del gene introducido; para la población b (E6B, carril 7) se aprecia una banda difusa a la altura esperada, que coincide en tamaño con el producto obtenido de la amplificación del plásmido E6.16wtpcDNA3,

utilizado como positivo (carril 2). Para la otra población obtenida de las transfecciones (E6C), no encontramos ninguna banda, lo cual es indicio de que el gen no se está expresando en esta población. En aquellas células donde se introdujeron ambos plásmidos (16E6.wtpcDNA3 y 16E7.wtpcDNA3), se observó una banda difusa como producto de la RT-PCR, encontrándose dicha banda con mayor intensidad en la población P815-X2A (carril 9) y siendo poco perceptible en las otras dos poblaciones (P815-X2B y P815-X2C, carriles 10 y 11 respectivamente). De esta forma, tenemos una población de cada una de las condiciones de transfección antes mencionadas donde se expresan los genes introducidos con el plásmido 16E6.wtpcDNA3 dentro de las células P815.



Fotografía 3: Expresión del gen E6 introducido en las células P815 por RT-PCR. Abreviaciones: (+): Control positivo, plásmido 16E6.wtpcDNA3. (-): Controles negativos, células P815 sin transfectar, transfectadas con el plásmido vector solo pcDNA3 (P815-pcDNA3) y transfectadas con un plásmido para B7.1 (P815-B7.1). Las células P815 transfectadas con el plásmido 16E6.wtpcDNA3, poblaciones A, B y C se abrevian como P815-E6. Las células P815 transfectadas con el plásmido 16E6.wtpcDNA3 y el plásmido 16E7.wtpcDNA3, poblaciones A, B y C, (X2A, X2B, X2C) se marcan como P815-E6+E7. La flecha señala el producto de la amplificación y los marcadores de tamaño están en pares de bases (pb)

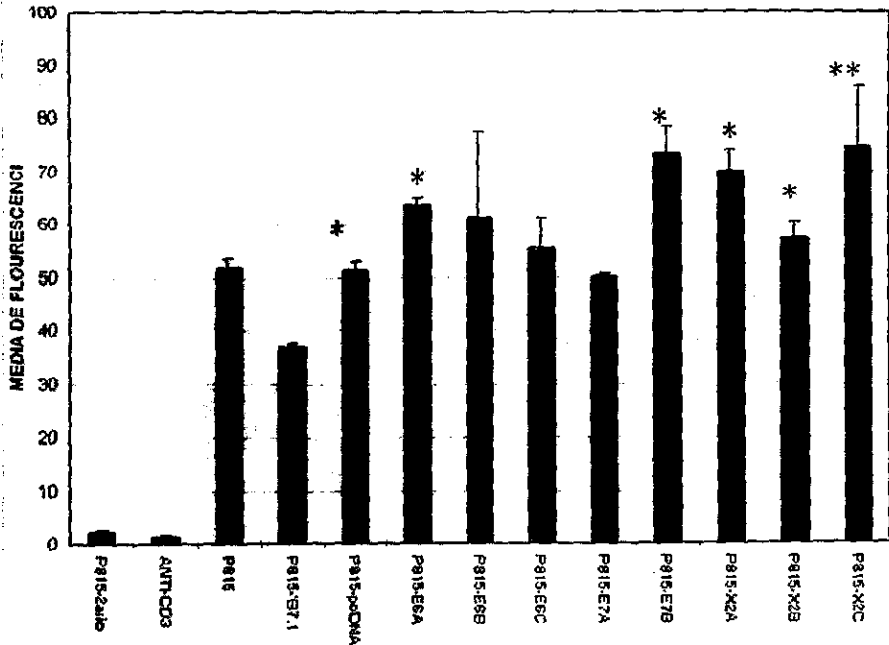
### 6.3. Análisis de la expresión de moléculas clase I en la superficie celular de las líneas transfectadas.

Uno de los objetivos de este trabajo era observar si las proteínas E6 y E7 afectan la expresión de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase I en células transfectadas y evaluar este modelo para la presentación de antígenos. Para ello, en las células transfectadas, tanto con los genes para E6, E7, ambos o únicamente con el plásmido vacío, se evaluó la expresión de moléculas clase I en la superficie celular, en comparación con las células P815 sin transfectar. En nuestro sistema, la línea P815 corresponde a un haplotipo d de las moléculas del CPH clase I y se dirigieron tres anticuerpos contra diferentes alelos de moléculas clase I, aunque de manera general reconocen a las moléculas del haplotipo d.

En la gráfica 1 se muestran las medias de fluorescencia obtenidas para células donde se dirigieron anticuerpos contra las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase I, alelo K<sup>d</sup>. Como se puede observar en esta gráfica, las líneas transfectadas E6A, E7B, X2A, B y C muestran un aumento en la cantidad de moléculas clase I expresadas en superficie celular, en comparación con los controles (P815 sin transfectar, o transfectada con el plásmido vacío, pcDNA). Asimismo, también se presenta una disminución de moléculas clase I en superficie para células P815 transfectadas con otro plásmido que porta los genes para la molécula de superficie B7.1, la cual interviene en la coestimulación de linfocitos T. Sin embargo, el aumento en las moléculas clase I en superficie no es estadísticamente significativo para todas las líneas, encontrándose una diferencia con respecto a la línea P815 transfectada con el plásmido sólo, en contadas líneas. Encontramos un aumento significativo de una  $F=0.95$  en las poblaciones P815-E6A, P815-E7B, P815-X2A y P815-X2B, mientras que para la población P815-X2C, sólo es significativa desde una  $F=0.75$ .

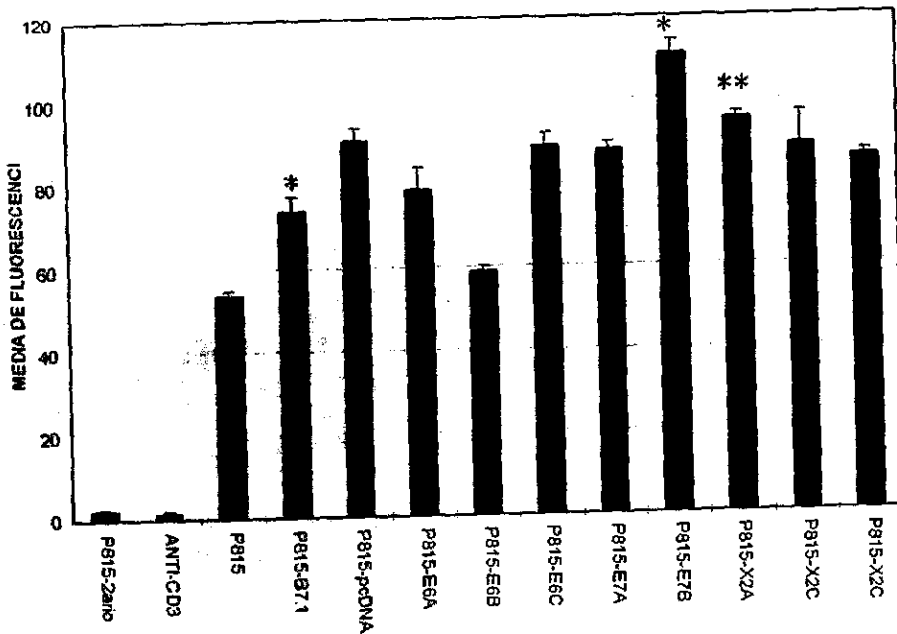
En la gráfica 2, se observan los resultados obtenidos donde se analizaron las moléculas del CPH clase I sobre la superficie de células P815 transfectadas y sin transfectar, pero ahora con anticuerpos dirigidos contra el haplotipo del CPH clase I D<sup>d</sup>. Los resultados obtenidos muestran un incremento en superficie de las moléculas D<sup>d</sup> en todas las líneas transfectadas, en forma independiente del plásmido o los genes que porten, con respecto a la línea parental. En este ensayo, realizamos el análisis de varianza con respecto a la línea transfectada con el plásmido vacío (pcDNA), encontrando un incremento de las moléculas del CPH clase I en superficie únicamente con las poblaciones: P815-E7B y P815-X2B, en un rango de significancia de una  $F=0.95$  y  $0.75$ , respectivamente.



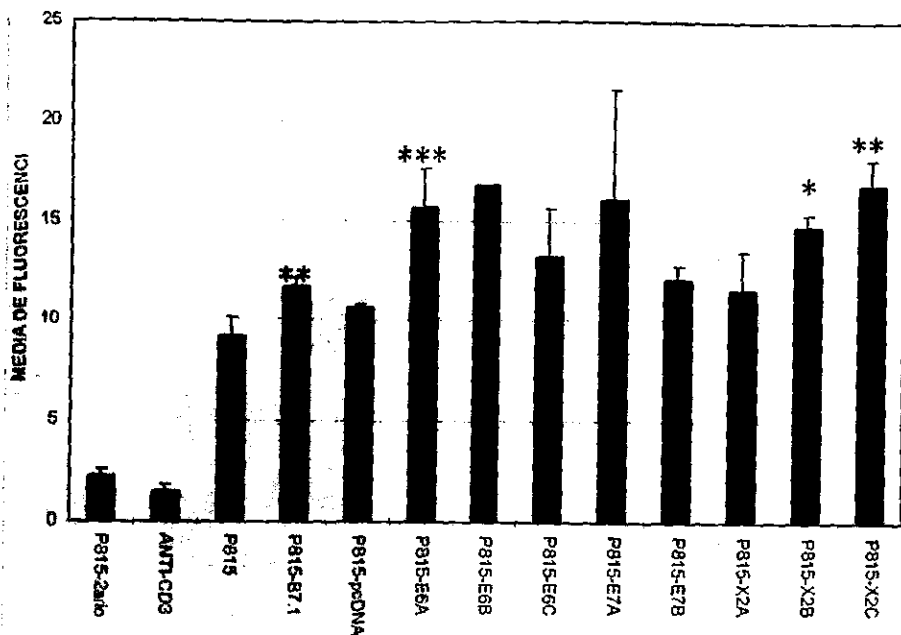


Gráfica 1. Análisis de la expresión de las moléculas del CPH clase I alelo K<sup>d</sup>, sobre la línea P815 sin transfectar o transfectada con los plásmidos que portan los genes para E6 y E7, transfectada con el plásmido vector sólo (P815-pcDNA), o con un plásmido diferente (P815-B7.1), que en este caso porta los genes para la molécula coestimuladora B7.1. ANTI-CD3, anticuerpo irrelevante; P815-2ario, células P815 sólo con el anticuerpo secundario, para fluorescencia de fondo. (\*) Indica donde la diferencia fue estadísticamente significativa para  $F=0.95$  y (\*\*) indica donde lo fue para  $F=0.75$  con respecto a las células P815-pcDNA.

La gráfica 3 muestra los resultados para el análisis de la expresión de moléculas clase I alelo L<sup>d</sup>. En esta gráfica, a diferencia de las otras dos, la media de fluorescencia es muy baja, lo cual nos indica niveles basales muy bajos de este alelo en la línea P815. En relación con la expresión de las moléculas del CPH clase I de este haplotipo en la superficie de las líneas transfectadas, en general se repite el comportamiento observado para el caso del haplotipo D<sup>d</sup>, es decir, un incremento en todas las líneas transfectadas, sin restricción del tipo de genes o plásmido que portan. Sin embargo, aquí el supuesto incremento no es significativo después de someter los datos a un análisis de varianza, con respecto a la línea que porta el plásmido únicamente. Tal incremento se observa sólo para contadas poblaciones: E6A con una  $F=0.90$ ; X2B y X2C con una  $F=0.75$  y  $0.95$  de significancia, respectivamente.



Gráfica 2. Análisis de la expresión de las moléculas del CPH clase I alelo D<sup>d</sup>, sobre la línea P815 sin transfectar o transfectada con los plásmidos que portan los genes para E6 y E7, transfectada con el plásmido sólo (P815-pcDNA), o con un plásmido diferente (P815-B7.1), que en este caso porta los genes para la molécula coestimuladora B7.1. ANTI-CD3, anticuerpo irrelevante; P815-2ario, células P815 sólo con el anticuerpo secundario, para fluorescencia de fondo. (\*) Indica donde la diferencia fue estadísticamente significativa para  $F=0.95$  y (\*\*) indica donde lo fue para  $F=0.75$  con respecto a las células P815-pcDNA.



Gráfica 3. Análisis de la expresión de las moléculas del CPH clase I alelo L<sup>d</sup>, sobre la línea P815 transfectada con los plásmidos que portan los genes para E6 (E6A, E6C), E7 (E7B) o ambos (X2A, X2B, X2C), transfectada con el plásmido solo (PCDNA), sin transfectar (P815) o con un plásmido diferente (B7.1), que en este caso porta los genes para la molécula coestimuladora B7.1. ANTI-CD3, anticuerpo irrelevante; P815-2ario, células P815 solo con el anticuerpo secundario, para fluorescencia de fondo. (\*) Indica donde la diferencia fue estadísticamente significativa para F= 0.975, (\*\*) F=0.95, (\*\*\*) F=0.90 con respecto a la línea P815-pcDNA.

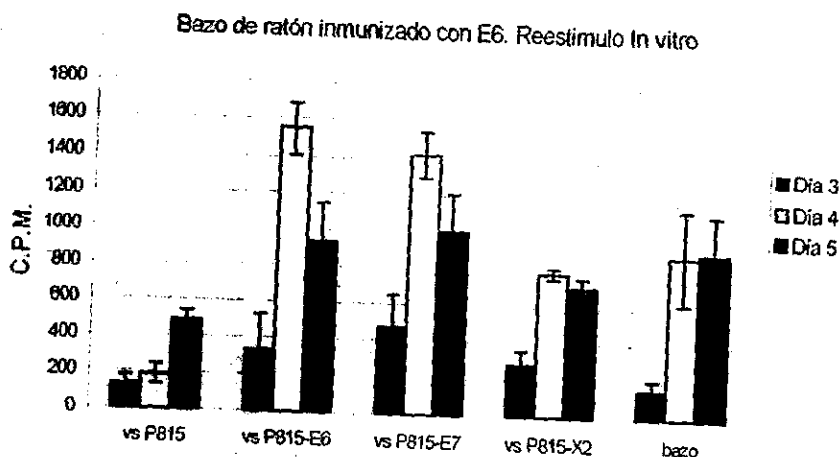
En resumen, las moléculas del CPH clase I se incrementan de forma significativa en superficie de células que han sido transfectadas con genes para las proteínas virales E6 y E7. Las poblaciones donde se observa este incremento se muestran en el cuadro siguiente:

Alelo analizado de moléculas clase I	Poblaciones donde se observo cambio
K <sup>d</sup>	P815-E6a, P815-E7b, P815-X2a, X2b y X2c
D <sup>d</sup>	P815-E7b y P815-X2a
L <sup>d</sup>	P815-E6a, P815-X2b y P815-X2c

6.4. Las células P815 transfectadas con los genes E6 y E7 inducen la proliferación de células de bazo de ratones inmunizados con ADN de plásmido.

Después de observar el efecto que producían las proteínas virales E6 y E7 sobre las moléculas del CPH clase I en superficie celular, se analizó la capacidad de estas células para presentar antígenos; para ello, examinamos si estas células que incrementaban antígenos en superficie eran capaces de inducir a la proliferación a células de bazo, obtenidas de ratones inmunizados con ADN de los mismos plásmidos utilizados para realizar las transfecciones.

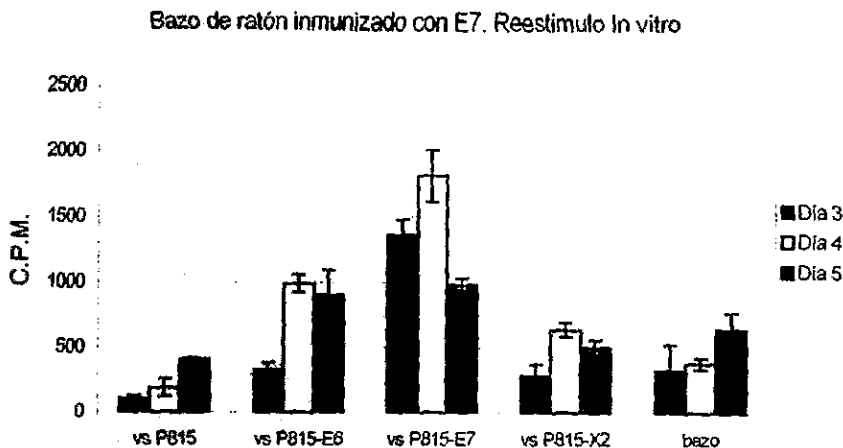
Los resultados de la proliferación de células de bazo de ratones inmunizados con el plásmido con los genes para E6 que se muestran en la gráfica 4, indican que estas células son capaces de diferenciar entre las células que están transfectadas de las que no lo están.



Gráfica 4. Incorporación de timidina tritiada por parte de células de bazo de ratones Balb/c inmunizados con ADN del plásmido 16E6.wtpcDNA3 en presencia y/o ausencia de células presentadoras. Los días marcados en el recuadro indican los tiempos de iniciado el cocultivo. Las células utilizadas como presentadoras de antígenos fueron: la línea parental P815 (P815), transfectada con los plásmidos con los genes E6, E7, o ambos (P815-E6, P815-E7 y P815-X2 respectivamente) y los bazocitos sin células presentadoras (bazo). Las c.p.m. de las células que sirvieron como presentadoras sin células a restimular (bazocitos en este caso), ya sea la línea parental o transfectada, no se muestran, pero tuvieron cuentas inferiores o semejantes a los esplenocitos en presencia de la línea parental (datos no mostrados).

Las células de bazo son capaces de incorporar timidina 3.5 veces más en presencia de las células que presentan el plásmido con los genes para E6 y E7 que aquellas que no presentan ningún plásmido (línea P815 parental). Sin embargo, los esplenocitos cultivados en ausencia de células presentadoras tienen una tasa de proliferación superior a aquellos puestos en presencia de la línea parental e incluso con aquellas células que presentan ambos plásmidos

Por otra parte, para las células de bazo obtenidas de ratones inmunizados con el plásmido con los genes para la proteína E7 se obtienen resultados muy similares, los cuales se muestran en la gráfica 5. Aquí, se puede observar que los esplenocitos reconocen de forma amplia a las células P815 transfectadas con el plásmido E7.16wtpcDNA3, incrementando su incorporación de timidina incluso desde el día 3 de iniciado el cultivo, a diferencia de las células de bazo puestas en cultivo con las células transfectadas con el plásmidos con los genes para E6 o sin transfectar. Tampoco aquí se obtuvo una respuesta contra la línea P815 transfectada con ambos plásmidos.



gráfica 5. Incorporación de timidina tritiada por parte de células de bazo de ratones Balb/c inmunizados con ADN del plásmido 16E7.wtpcDNA3 en presencia y/o ausencia de células presentadoras. Los días marcados en el recuadro indican los tiempos de iniciado el cocultivo. Las células utilizadas como presentadoras de antígenos fueron: la línea parental P815 (P815), transfectada con los plásmidos con los genes E6, E7, o ambos (P815-E6, P815-E7 y P815-X2 respectivamente) y los bazocitos sin células presentadoras (bazo).

## 7. DISCUSION DE RESULTADOS

El cáncer es un proceso multifactorial donde están involucrados distintos eventos genéticos y la interacción que pueda darse con el microambiente que rodea a los tejidos. La activación de protooncogenes o la pérdida total o parcial del control de distintas moléculas indispensables para mantener el balance del organismo puede deberse a la presencia de agentes patógenos como los virus. El sistema inmune es el encargado de eliminar a aquellas células que han visto roto su balance de crecimiento y una importante herramienta para que se lleve a cabo su acción, son las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase I. Las moléculas del CPH clase I presentan péptidos de proteínas mutadas o de virus que se encuentren infectando a una célula, a los linfocitos T CD8+ para así despertar una respuesta inmune y eliminar a tales células infectadas o anormales. Sin embargo, en distintos tipos de cáncer se ha visto una disminución en la expresión de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase I (Seliger et al, 1996; Seliger, Höhne, 1996; Frisan, 1996; Cromme et al, 1994; Kaklamanis et al, 1995; Garrido et al, 1997). Se ha observado también que en algunas enfermedades no malignas vinculadas con infecciones virales, como el citomegalovirus humano o murino (Campbell, Slater, 1994; Beersma et al, 1993), la infección con algunos tipos de herpes (Jennings et al, 1985) y el adenovirus tipo 12 (Friedman, 1988), existe una relación directa de la infección viral con el proceso de la enfermedad. En el caso del cáncer, la disminución de las moléculas del CPH clase I en superficie no ha sido claramente explicado, por lo menos en los casos donde la enfermedad se encuentra relacionada con la presencia de algún virus.

En el presente trabajo se analizó la expresión de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase I en la superficie celular con relación a la presencia de las proteínas virales E6 y E7 del virus del papiloma humano tipo 16. Para ello se utilizó el plásmido pcDNA3 al cual se ligaron la secuencia génica del VPH tipo 16 que codifica para la proteína E6 o para la proteína E7, nombrándolos entonces como plásmidos E6.16wtpcDNA3 y E7.16wtpcDNA3, respectivamente.

La línea celular P815 fue transfectada con los plásmidos ya mencionados y la expresión de los genes introducidos se muestra en las fotografías 2 y 3, confirmándose la del gen para E7 del VPH tipo 16, tanto para las células transfectadas únicamente con el plásmido E7.16wtpcDNA3, como donde se introdujeron ambos plásmidos (E6.16wtpcDNA3 y E7.16wtpcDNA3). Sin embargo, para las células transfectadas con el plásmido para E6, ya sea en una transfección simple o doble a pesar de que las células a las que se les extrajo el ARN total fueron crecidas en medio de selección con G418 y sólo se utilizaron aquellas poblaciones que fueron capaces de crecer en este medio, no todas presentaban la expresión de los genes introducidos. En las poblaciones P815-E6a y P815-E6b con una transfección simple se encontró una banda correspondiente al ADN de los genes para E6, en relación con el positivo (ADN del plásmido E6.16wtpcDNA3). Por otra parte, en las células a las que se les realizó una doble transfección, todas mostraron la banda para E6 aunque de manera difusa. Posiblemente, en las poblaciones donde no encontramos una respuesta positiva o apenas perceptible, el vector que porta los genes de resistencia para el antibiótico se está expresando, no así la región con los genes para la proteína E6, por algún mecanismo postranscripcional, como la metilación (Lewin, 1994). De ser esto cierto,

la expresión de los genes E6 que observamos en la RT-PCR, puede ser contaminación por ADN plasmídico, ya que las muestras de ARN obtenido de las células no fue tratado con ADNasas antes de ser utilizado en la RT-PCR, aún cuando en el gel para comprobar la integridad del ARN no se observaban bandas de ADN (datos no mostrados). A pesar de la baja respuesta en la expresión de los genes para E6, en las células transfectadas se analizó la expresión de las moléculas clase I en superficie celular, aún cuando el producto de la amplificación del ADN complementario obtenido del transcrito de E6 no se observara con claridad.

Existen distintos trabajos en cáncer cervical donde se ha asociado la presencia de virus del papiloma humano de alto riesgo, principalmente los tipos 16 y 18, con la expresión de moléculas clase I reducida conforme aumenta el grado de malignidad del tumor (Connor, Stern, 1990; Coutorier et al, 1991; Cromme et al, 1993; Cromme et al, 1994.). Al parecer, este es un comportamiento que correlaciona con la capacidad que desarrollan las células tumorales para migrar a través de los tejidos durante una metástasis agresiva, y de esta forma evitar la respuesta del sistema inmune, al igual que lo es la expresión de ciertos haplotipos de moléculas del CPH clase I que son reconocidos por las células NK y con ello evitar la respuesta inmune innata (Carina et al, 1995). Aunque no se ha establecido una relación con certeza entre los fenotipos alterados del CPH clase I, la neoplasia cervical y la presencia del VPH tipos 16 ó 18, encontrada en un 63% de tumores analizados (Garrido et al, 1997), no se ha descartado que las proteínas codificadas por el VPH puedan estar involucradas en la disminución de la expresión del CPH clase I, ya que se expresan a varios niveles en este tipo de lesiones.

Nosotros evaluamos si la expresión en superficie de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase I se ve afectada por la presencia de dos oncogenes del virus del papiloma humano tipo 16 juntos o en forma individual.

La gráfica 1 muestra el comportamiento de las moléculas clase I que fueron reconocidas con el anticuerpo contra el alelo K<sup>d</sup>. Al comparar las medias de fluorescencia de la línea parental con la línea transfectada únicamente con el plásmido sólo (pcDNA), no encontramos diferencia estadísticamente significativa entre ellas, por ello el resto del análisis estadístico se realizó con respecto a cualquiera de estas líneas. Encontramos un incremento en la expresión de moléculas clase I en superficie en aquellas células que presentan los genes ya sea en forma individual o juntos para determinadas poblaciones: E6A, E7B, X2A, y X2B, con una F desde 0.95. Para algunos casos, como E6A y X2B presentan diferencias con respecto a los controles desde una F= 0.975. Con lo anterior descartamos que el incremento observado sea producto de la técnica, por lo que los resultados indican mas bien un efecto de los genes introducidos en las células, por lo menos para lo que se refiere al análisis de este alelo del CPH clase I en superficie celular.

La expresión de moléculas clase I se ve disminuida en una línea que presenta la molécula coestimuladora B7.1, presente de forma normal en células presentadoras de antígenos profesionales y que funciona como una molécula coestimuladora, involucrada en el mecanismo de activación de linfocitos T (Van Parijs, Abbas, 1998). Estadísticamente, esta

disminución es significativa para una  $F=0.95$  en este ensayo; sin embargo desconocemos la razón para tal comportamiento. Este resultado bien puede ser una apreciación de la técnica para este ensayo, ya que en las otras dos gráficas se puede observar que las células transfectadas con B7.1 incrementan levemente su presencia en membrana de moléculas del CPH clase I con respecto a la línea sin transfectar.

Así, la respuesta que observamos en la primera gráfica sobre la expresión de moléculas clase I, la atribuimos a la presencia de los oncogenes, pues en las células transfectadas con el plásmido solo, no existe diferencia en relación con las células no transfectadas. Para el caso de las células donde se analizó el alelo de moléculas clase I  $D^d$ , encontramos resultados contradictorios en relación con la gráfica anterior. Al parecer, los niveles de expresión basales en la superficie celular de este alelo de moléculas clase I es similar a los del alelo  $K^d$  (Lie et al, 1990; Ciavarra et al, 1982) sin embargo a diferencia de la gráfica anterior, encontramos que los niveles de las células transfectadas bien con el plásmido sólo, con los oncogenes o la molécula B7.1, se incrementan aún más que en el caso del alelo  $K^d$ . Una posible explicación es que las células expresan en mayor cantidad el alelo  $D^d$  que el alelo  $K^d$  de moléculas del CPH clase I de una forma inherente a la población utilizada. Cabe recordar que para obtener las poblaciones resistentes al antibiótico, después de la transfección, las células fueron clonadas y la cantidad de moléculas clase I en superficie variara levemente en relación con la población analizada. Aunque bien podría suponerse entonces que el incremento de las moléculas clase I en superficie de las células transfectadas se debería entonces a la clonación y no a la transfección, sin embargo, el incremento se marcaría más por efecto de los oncogenes, que es lo que observamos en las gráficas 1 y 2, ya que en ninguna de las dos, la línea parental presenta un aumento de las moléculas clase I superiores a 60 en su media de fluorescencia. De tratarse de un artificio propio de la línea, consideraríamos encontrar mayor desviación en los valores obtenidos en la línea parental. Incluso con las células transfectadas con pcDNA o B7.1, los valores de las células transfectadas los exceden de manera significativa desde un 0.95 para una población: E7B. La población X2A es significativa en un 25%, por lo cual no se puede considerar muy diferente.

Existe un comportamiento semejante al anterior en las células donde se analizó la expresión de moléculas clase I con el anticuerpo dirigido contra las moléculas  $L^d$  (gráfica 3). En el análisis de este alelo, encontramos que las poblaciones que incrementaron su expresión en superficie, estadísticamente fueron únicamente E6A, X2B y X2C. Aquí, E7B no incrementa la expresión de moléculas clase I en membrana, a pesar de ser una de las poblaciones donde se había mantenido este incremento para los otros dos alelos. Para este alelo, las medias de fluorescencia son muy bajas. Esta intensidad en la fluorescencia se mantuvo constante en las repeticiones, mostrando que se debe a la baja presencia de este alelo en la línea celular P815. Distintos autores (Lie et al, 1990; Örn, 1992; Ciavarra, 1982; Beck et al, 1986) ya habían observado la baja presencia en superficie de las moléculas del CPH clase I haplotipo  $L^d$ , lo que se atribuye a una baja asociación de esta molécula en la  $\beta 2m$  y su bajo transporte intracelular, junto con una ausencia de péptidos afines, ya sean propios o antígenicos, para saturar la molécula del CPH clase I alelo  $L^d$ . Es decir, al no existir suficientes péptidos afines para la molécula  $L^d$ , ésta es incapaz de abandonar RE y migrar a membrana; de esta forma la cantidad de moléculas clase I de este alelo, es menor en



relación con los las moléculas K<sup>d</sup> y D<sup>a</sup> (Beck et al, 1986). Esto explicaría el comportamiento de este alelo en nuestro sistema; quizá péptidos derivados de las proteínas oncogénicas E6 y E7 no sean afines a este alelo. Sin embargo, al analizar el cuadro 6.2, bien puede considerarse que no existe cambio en la expresión de este alelo en la superficie de las células transfectadas, por efecto de los genes E6 y E7.

Resumiendo, las poblaciones de P815 transfectadas con el gene para E6 donde se ve un incremento constante en la expresión de moléculas clase I, fueron aquellas que expresan más eficientemente este gen, de acuerdo con los ensayos de RT-PCR. En las poblaciones P815-E6B y E6C la expresión de gene no se observó con certeza, pues la fotografía obtenida no fue del todo fiel al gel, donde se apreciaban unas bandas muy difusas a la altura del producto esperado. En estas poblaciones la expresión de moléculas clase I en superficie celular nos da una desviación estándar muy grande, con lo cual no permite que exista una diferencia significativa entre estas poblaciones y el control P815-pcDNA.

Por otra parte, una vez que se observó el efecto de los genes introducidos dentro de la línea P815 sobre la expresión de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase I, analizamos la capacidad de estas células para presentar antígenos e inducir la proliferación de células de bazo de ratones inmunizados con plásmidos portando a E6 o E7. La inmunización con ADN es una de las técnicas actualmente empleadas para estimular una respuesta colectiva contra las proteínas producidas por el ADN introducido. Aunque aún se desconoce gran parte de los mecanismos por los cuales las células del hospedero son capaces de sintetizar proteínas a partir de un ADN extraño introducido en un plásmido, esta es una técnica utilizada con bastante éxito en los últimos años. Se tienen datos de la respuesta por parte del organismo huésped, el cual genera una respuesta inmune mediada por células T o por anticuerpos contra las proteínas codificadas por el ADN introducido (Donnelly et al, 1995; Davis, 1997). La intensidad de cada tipo de respuesta está determinada por el sitio donde se llevó a cabo la inmunización; es decir, al parecer una inmunización vía intramuscular induce una acción de tipo humoral, aunque la presencia de células citotóxicas también existe. Por otra parte, cuando la inmunización se lleva a cabo vía subdérmica, la respuesta inmune es mediada por células, en relación con la respuesta humoral observada (Boyle, 1997; Yokoyama, 1997; González et al, 1996). Ya que en el presente trabajo nos interesaba obtener células T citotóxicas, se utilizó la inyección subdérmica para inmunizar a ratones Balb/c.

Las células de bazo de ratones inmunizados con ADN de los mismos plásmidos transfectados en la línea P815 proliferan cuando son cultivadas en presencia de las líneas generadas, aunque también lo hacen en presencia de la línea parental. Este comportamiento era esperado, ya que el mastocitoma P815 fue generado a partir de tumores en ratones DBA/2, y al ser introducida la línea en ratones sanos, donde se comparte el haplotipo d del CPH clase I, la respuesta contra antígenos tumorales se daría. Sin embargo, como se puede observar en las gráficas, la proliferación obtenida con la línea parental esta por debajo de la inducida por las células que portan los genes de E6, E7 o ambos del VPH tipo 16. Además, por las desviaciones de las muestras que se obtienen para la línea parental, se considera que no hay diferencia con las células utilizadas como controles, es decir, las células transfectadas

en ausencia de células efectoras y las células de bazo solas (gráficas 4 y 5). Sin embargo, las gráficas también muestran que las células P815 transfectadas con ambos plásmidos son incapaces de hacer proliferar a las células de bazo de ratones inmunizados como era de esperarse. Quizá en esta población, la probabilidad de perder los genes transfectados se vio acentuada, siendo menos estable con la presencia de ambos plásmidos. Aunque el proceso llamado de incompatibilidad de plásmidos encontrado en bacterias, no ha sido reportado para células eucariontas, no se debe abolir esta posibilidad (Sambrook et al, 1989; Lewin, 1994). Este proceso ya ha sido perfectamente descrito y en él, dos plásmidos introducidos en la misma células, que presenten el mismo origen de replicación o replicón (ColE1 en este caso) se excluyen uno al otro, permitiéndose muchas veces la expresión del plásmido más estable. Bien podría darse el caso de este proceso en nuestro sistema, lo que explicaría la expresión positiva en todas las células transfectadas con E7, no así con E6. Sin embargo, esto no explica la baja respuesta en la expresión del plásmido E6 en las células transfectadas únicamente con éste.

Por otra parte, las células de bazo por si mismas son capaces de mantenerse si no en proliferación constante, si con cierta tasa de crecimiento por algunos días (gráficas 4 y 5). Lo cual indicaría la capacidad de estas células para ser mantenidas in vitro, aún sin presentar un reestímulo. Las células de bazo al parecer son capaces de proliferar tanto en presencia de células transfectadas ya sea con E6 como con E7, independientemente con el plásmido que hayan sido inmunizados los ratones de los que provenía el bazo; esos resultados podrían llevarnos a suponer que las proteínas E6 y E7 podrían estar compartiendo algunos epitopos semejantes, al encontrarse cierta semejanza en la proliferación inducida. Sin embargo, al analizar las secuencias de aminoácidos (Seedorf et al, 1985) no se observan epitopos semejantes, lo que descartaría esa suposición y nos conduciría más bien a una respuesta inespecífica para reconocer a las proteínas virales. Es decir, nuestro sistema demuestra la utilidad de la transfección de las proteínas E6 y E7 y que éstas son incapaces de disminuir la cantidad de moléculas clase I en superficie, como se ha encontrado en carcinoma cervical positivo al VPH tipo 16, y que estas células son capaces de presentar antígenos. Sin embargo, al parecer se requiere de mayor fineza en el procedimiento experimental para lograr una respuesta específica, al menos en nuestro sistema.

Cabe también mencionar que se necesita repetir ensayos de este tipo utilizando ratones inmunizados con el plásmido solo, pues al obtener una respuesta similar tanto para las células con los plásmidos E6 como E7, es necesario descartar que esta respuesta no sea dada contra el plásmido en sí.

Aunque no existe evidencia clara de los efectos directos de la expresión génica del VPH sobre la modulación de CPH clase I, estos pueden ser importantes en la supervivencia de los tumores cervicales con este virus. Es posible que la baja regulación de HLA clase I pueda ser el resultado de eventos inmunoselectivos donde confiera ventaja a un cáncer más agresivo (Connor, Stern, 1990; Cromme et al, 1993). Así mismo, puede ser que los productos alélicos del CPH clase I capaces de presentar péptidos del VPH (verbigracia, de las proteínas E6/E7 HPV 16) se encuentren potencialmente bajos. Sin embargo, en el presente trabajo, nosotros no encontramos una disminución de las moléculas del CPH clase I

en superficie por efecto de la presencia de las proteínas oncogénicas E6 y E7 del virus del papiloma humano tipo 16

Distintos trabajos donde se ha introducido plásmidos que portan genes y/o el genoma completo del VPH tipo 16 ó 18, a líneas celulares en cultivo, principalmente queratinocitos, y analizando luego los cambios en la expresión de moléculas del CPH clase I dan resultados heterogéneos. Lo mismo ocurre cuando se analizan estas moléculas en la superficie de células de cultivos primarios originados a partir de biopsias de pacientes con cáncer cervical, positivas para VPH 16. Hoos et al (1996) introducen a la línea celular de queratinocitos humana HaCat el gene E7 de VPH 16 utilizando una construcción de vaccinia recombinante y analiza posteriormente los efectos sobre las moléculas del CPH clase I y II, concluyéndose que no hay cambio significativo sobre la expresión de estas moléculas. Lo anterior es relevante por los resultados obtenidos en este trabajo, donde se observa un incremento significativo en la cantidad de moléculas del CPH clase I detectadas en la superficie de nuestras células transfectadas.

Analizando a las proteínas virales utilizadas en el presente trabajo, se ha reportado que las proteínas E7 son capaces de incrementar la actividad de ATPasa de la subunidad S4 del proteasoma 26S, aumentando con ello la degradación de proteínas intracelulares (Berezutskaya, Bagchi, 1997). Además, E7 es capaz de inducir la degradación de Rb via la ubiquitina, mecanismo por el cual el proteasoma reconoce a las proteínas que debe degradar (Boyer et al, 1996). Así, si E7 es capaz de ligar la ubiquitina a proteínas clave en el control celular, y además de incrementar la actividad proteasa en el citosol, esto explicaría el incremento de moléculas clase I en superficie que encontramos en el presente trabajo, por lo menos donde se encuentra presente E7. Es decir, al producirse mayor cantidad de péptidos degradados por el proteasoma, se bombardearían mayor cantidad de péptidos al RE, y se induciría al ensamblaje de mayor cantidad de moléculas clase I, para transportar los péptidos, aún sin considerar la naturaleza propia de los péptidos transportados. Para E6 no se ha reportado un mecanismo semejante en relación con el proteasoma, aunque no se debe descartar, ya que obtenemos un comportamiento similar pero menos acentuado con respecto a las moléculas del CPH clase I; cabe recordar aquí, que de la misma forma que E7 induce a la degradación via ubiquitina a la proteína Rb, la proteína E6 viral hace lo mismo con la proteína p53 (Werness et al, 1990). Sin embargo, se necesitan realizar más trabajos para confirmar esta hipótesis.

Aunque, desconocemos la naturaleza de los péptidos presentados en las moléculas del CPH clase I que se incrementan en superficie, no se descarta que sean producto de proteínas celulares degradadas via proteosoma. Aún cuando los péptidos presentados por las moléculas del CPH clase I en superficie celular sean producto de la degradación de las proteínas E6 y E7, nos llevaría a suponer que alguna otra proteína del VPH tipo 16 está involucrada en la disminución de estas moléculas en superficie, observada en cáncer cervical, si es que existe relación con el VPH. Una posible proteína candidato es la proteína viral E5. Sin embargo, la literatura es incierta con respecto a la relación de E5 y la disminución en la expresión del CPH, ya que no existen trabajos publicados con este punto en particular, aunque existe una vaga mención de esta hipótesis en otras referencias (McCance, 1995;

Tindle, 1996; Tindle, 1997).

Brevemente, se sabe que la proteína E5 del VPH tipo 16 al ser transfectada en líneas celulares de queratinocitos y fibroblastos o cultivos primarios de estos mismos tipos celulares, incrementa la proliferación de estas células por efecto del factor de crecimiento epidermal (EGF) (Straight et al, 1993; Pim et al, 1992). Además, permite el reciclamiento rápido del receptor de este factor (EGFR) y evita la degradación del mismo, al impedir la acidificación en las vesículas endosomales que portan el EGFR. Esto último, se supone que es regulado por la unión de E5 con una proteína celular de 16kDa con actividad de ATPasa, proteína formadora de poros (Straight et al, 1995; Conrad, 1993). Dentro de la célula, la proteína E5 se encuentra regulando señales al núcleo, ya que en células que presentan esta oncoproteína, existen altos niveles de c-fos y c-jun y suprime la actividad de p21<sup>rasf-1/cip-1</sup>, inhibidor del ciclo celular (Bouvard, 1994; Tsao, 1996). Lo anterior refuerza la relación entre la actividad de E5 con la oncoproteína viral E7, ya que cuando ambas se encuentran incrementan la proliferación celular (Bouvard, 1994).

Tal vez, si hay una disminución de moléculas clase I en superficie celular regulada por E5, es por la relación que esta proteína establece con la proteína p16, ATPasa formadora de poros. Se ha hipotetizado que mediante esta ATPasa, la proteína E5 evita la degradación del EGFR en las vesículas que los portan cuando son introducidos a la célula para su reciclamiento o degradación. Entonces, podemos suponer que hacen lo mismo pero para las vesículas que portan el complejo de moléculas clase I, cambiando el pH de estas vesículas. Stryhn et al (1996), al cambiar el pH dentro de las vesículas que portan los complejos clase I unidos a sus péptidos, encuentra que la presentación de estos péptidos disminuye, al disociarse la unión complejo-péptido. Sin embargo, esta disociación determinada por pH afecta a determinados alelos. Aunque ellos trabajan en un modelo murino de haplotipo H-2b, es de suponer que todos los alelos tengan un comportamiento similar. Encuentran que a pH neutro la unión es óptima para dos de tres moléculas clase I (K<sup>b</sup> y D<sup>b</sup>), mientras que el pH ácido es óptimo para las moléculas del CPH clase I K<sup>k</sup>. Así, tal vez, la proteína E5 del VPH, al cambiar el pH de los endosomas que portan los complejos de moléculas clase I- péptido, evita la presentación de dichos péptidos, cuando más si se trata de péptidos derivados de proteínas virales.

Lo anterior es una suposición de lo que podría estar ocurriendo *in vivo*. Aún faltarían realizar experimentos que comprueben esta suposición. Realizando experimentos donde se pudiera introducir en un modelo similar al que trabajamos o incluso el mismo, la proteína E5 a la par que las oncoproteínas virales E6 y E7, y entonces analizar si la expresión de moléculas clase I en superficie disminuye y si esto ocurre, ver si este mecanismo es mediado o no por la acidificación de los endosomas que portan el complejo de moléculas clase I- péptido. Si nuestras suposiciones son ciertas y la proteína responsable de la disminución de moléculas clase I es E5, estaríamos encontrando la explicación para la disminución que se observa de estas moléculas en carcinoma cervical asociado al VPH de alto riesgo. Esta información es indispensable no sólo para incrementar nuestro conocimiento del comportamiento viral, sino también para el desarrollo de estrategias encaminadas a la prevención y tratamiento del cáncer cervical.

## 8. CONCLUSIONES:

Del trabajo experimental desarrollado en la presente tesis se desprenden las siguientes conclusiones:

- Las proteínas E6 y E7 del virus del papiloma humano tipo 16, son capaces de incrementar la cantidad de moléculas clase I en la superficie de la línea celular de ratón P815, transfectadas de forma independiente o juntas.

- El mayor incremento de moléculas del CPH clase I se observa en las células transfectadas con el plásmido 16E7.wtpcDNA3.

- Las células transfectadas que incrementan la cantidad de moléculas del CPH clase I en superficie celular son capaces a su vez de inducir a la proliferación de células de bazo de ratones inmunizados con los plásmidos para las proteínas oncogénicas E6 y E7 del VPH tipo 16.

Finalmente, nosotros sugerimos la realización de más trabajos para observar el comportamiento de la misma línea celular ahora, tal vez, con otra proteína del VPH tipo 16, como es la proteína E5, para descartar o analizar el comportamiento de esta proteína en nuestro sistema. Aún falta conocer más acerca de la biología de ciertos virus asociados a enfermedades malignas, y es el caso del virus del papiloma humano. Así pues, el establecer una relación directa entre la disminución o incremento de moléculas del CPH clase I en superficie (como observamos en el presente trabajo) de células infectadas con el virus del papiloma humano, y el desarrollo de cáncer cervical, permitirá el desarrollo de terapias encaminadas a vencer esta enfermedad.

## 9. BIBLIOGRAFIA CITADA:

- Abbas, A.K., Litchman, A.H., Pober, J.S. 1994. "Cellular and molecular immunology". 2a. Editor W.B. Saunders Company.
- Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Watson, J.D. 1994. "Molecular biology of the cell". 3a. Garland Publishing, Inc. USA. 1294 pp.
- Allison, J.P., Krammel M.F. 1995. "The yin and yang of T cell costimulation". *Science* 270: 932-933
- Arnaiz-Villena, A. 1993. "MHC research: fast forward". *Immunology Today*, 14: 3-5
- Austin J.M., Wood, K.J. 1993. "Principles of cellular and molecular immunology". Oxford University Press, Hong Kong. 734 pp.
- Barbosa, M.S., Schelegel, R. 1989. "The E7 and E6 genes of HPV-18 are sufficient for inducing two-stage *in vitro* transformation of human keratinocytes". *Oncogene* 61: 1061-1066.
- Barbosa, M.S.; Lowy, D.R.; Schiller, J.T. 1989. "Papillomavirus polypeptides E6 and E7 are zinc-binding proteins". *Journal of Virology* 63(3): 1404-1407.
- Bass, E.J.; van Santen, H.M.; Kleijmeer, M.J.; Geuze, H.J.; Peters, P.J.; Ploegh, H.L. 1990. "Peptide-induced stabilization and intracellular localization of empty HLA class I complexes". *Journal of Experimental Medicine* 176:147-156.
- Beck, J.C.; Hansen, T.H.; Cullen, S.E.; Lee, D.R. 1986. "Slower processing weaker  $\beta$ 2-M association, and lower surface expression of H-2L<sup>d</sup> are influenced by its amino terminus". *Journal of Immunology* 137 (3): 916- 923.
- Beersma, M.F.V.; Bijlmakers, M.J.E.; Ploegh, H.L. 1993. "Human cytomegalovirus down-regulates HLA class I expression by reducing the stability of class I H chains". *Journal of Immunology* 151: 4455-4464.
- Benham, A., Tulp A., J. Neefjes. 1995. "Synthesis and assembly of MHC-peptides complexes". *Immunology Today* 16(7): 359-362.
- Berezutskaya, E.; Bagchi, S. 1997. "The human papillomavirus E7 oncoprotein functionally interacts with the S4 subunit of the 26S proteasome". *Journal of Biological Chemistry* 272(48): 30133-30146.
- Berumen, J., Casas, L., Segura E., Amezana, J.L., Garcia-Carranca, A. 1994. "Genome amplification of human papillomavirus types 16 and 18 in cervical carcinomas is related to the retention of E1/E2 genes". *International Journal of Cancer* 50: 640-645.
- Bouvard, V.; Matlashewski, G.; Gu, Z.M.; Storey, A.; Banks, L. 1994. "The human papillomavirus type 16 E5 gene cooperates with the E7 gene to stimulate proliferation of primary cells and increases viral gene expression". *Virology* 203(1): 73-80.
- Boyer, S.N.; Wager, D.E.; Bond, V. 1996. "E7 protein of human papilloma virus-16 induce degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin- proteasome pathway". *Cancer Research* 56:4620-4624.
- Boyle, J.S.; Silva, A.; Brody, J.L.; Lew, A.M. 1997. "DNA immunization: induction of higher avidity antibody and effect of route on T cell cytotoxicity". *Proceedings of National Academy of Sciences U.S.A.* 94:14626-14631.
- Brodsky, F. M., Guagliard, L.E. 1991. "The cell biology of antigen processing and presentation". *Annual Reviews of Immunology* 9: 707-44.

- Butz, K., Hoppe-Seyler, F. 1993. "Transcriptional control of human papillomavirus (HPV) oncogene expression: composition of the HPV type 18 upstream regulatory region". *Journal of Virology* 67: 6476-6486.
- Campbell, A.E., Slater, J.S. 1994. "Down-regulation of major histocompatibility complex class I synthesis by murine cytomegalovirus early gene expression". *Journal of Virology* 68(3): 1805-1811.
- Carina, G.J.M. Hilders, M., morgado, M.I.; Nooyen, Y. Jan, F.G. 1995. "Altered HLA expression by metastatic cervical carcinoma cells as a factor in impaired immune surveillance". *Gynecologic Oncology* 57:366-375.
- Chávez B., A.D. 1997. "Análisis de la expresión de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase I (MHC-I) en dos líneas celulares de cáncer cérvico-uterino (CaCu) CaLo e InBl y el efecto de la transfección con las moléculas transportadoras asociadas con el procesamiento de antígenos (TAP1 y TAP2)". Tesis profesional para obtener el grado de biólogo. Facultad de Estudios Superiores, Zaragoza, UNAM, México. 81 pp.
- Chen, L.; Mizano, M.T.; Singhal, M.C.; Hu, S.L.; Galloway, D.A.; Hellstrom, I.; Hellstrom, K.E. 1992. "Induction of cytotoxic T-lymphocytes specific for a syngeneic tumour expressing the E6 oncoprotein of human papillomavirus type 16". *Journal of Immunology* 148: 2617-2621.
- Chomczynski, P; Sacchi, N. 1987. "Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction". *Analytical Biochemistry* 162: 156-159.
- Chong, T., Apt, D., Gloss, B., Isa, M., Bernard, H.U. 1991. "The enhancer of human papillomavirus type 16: binding sites for the ubiquitous transcriptional factors Oct-1, NFA, TEF-2, NF1 and AP1 participate in epithelial cell-specific transcription". *Journal of Virology* 65: 5933-5943.
- Ciavarrá, R; Forman, J. 1982. "H-2L- restricted recognition of viral antigens". *Journal of Experimental Medicine* 156: 778- 790.
- Cifone, M; De María, G.R; Roncalioli, P; Rippo, M.R.; Azuma, M; Lanier, L.L; Santoni, A; Testi, R. 1994. "Apoptotic signaling through CD95 (FAS/APO) activates an acidic sphingomyelinase". *Journal of Experimental Medicine* 180:1547-1555.
- Connor, M.E.; Stern, P.L. 1990. "Loss of MHC class I expression in cervical carcinoma". *International Journal of Cancer* 46:1029-1034.
- Conrad, M.; Bubb, V.J.; Schlegel, R. 1993. "The human papillomavirus type 6 and 16 E5 proteins are membrane-associated proteins which associate with 16-kilodalton pore-forming protein". *Journal of Virology* 67(10):6170-6178.
- Couturier, J.; Sastre-Garau, X.; Schneider-Manoury, S.; Labib, A.; Orth, G. 1991. "Integration of papillomavirus DNA near myc genes in genital carcinomas and its consequences for proto-oncogenes expression". *Journal of Virology* 65. 4534-4538.
- Cox, J.H.; Bennink, J.R.; Yewdel, J.W. 1991. "Retention of adenovirus E19 glycoprotein in the endoplasmic reticulum is essential to its ability to block antigen presentation". *Journal of Experimental Medicine* 174: 1629-1637.
- Cromms, F.V.; Airey, J.; Heemels, M.T.; Ploegh, H.L.; Keating, P.J.; Stern, P.L.; Meijer, C.J.L.M.; Walboomers, J.M.M. 1994. "Loss of transporter protein, encoded by the TAP-1 gene, is highly correlated with loss of HLA expression in cervical carcinomas". *Journal of Experimental Medicine* 179:335-340.

- Cromme, F.; Snijders, P.J.F.; van den Brule, A.J.C.; Kenemans, P.; Meijer, C.J.L.M.; Walboomers, J.M. 1993. "MHC class I expression in HPV 16 positive cervical carcinomas in post-transcriptionally controlled and independent from c-myc overexpression". *Oncogene* 8:2969-2975.
- Cromme, F.V.; Meijer, C.J.; Snijders, P.J.; Uyterlinde, A. Kenemans, P. Helmerhorst, T.; Stern, P.L.; van den Brule A.J.; Walboomers, J.M. 1993 "Analysis of MHC class I and II expression in relation to presence of HPV genotypes in premalignant and malignant cervical lesions". *British Journal Cancer* 67(3):1372-1380.
- Davis, H.L.; Whalen, R.G. 1997. "Comparison of plasmid DNA preparation methods for direct gene transfer and genetic immunization". *BioTechniques* 21:92-99.
- De Val, M.; Hengel, H.; Hacker, H.; Hartlaub, U.; Ruppert, T.; Lucin, P.; Koszinowski, U.H. 1992. "Cytomegalovirus prevents antigen presentation by blocking the transport of peptide-loaded MHC class I molecules into the medial-Golgi compartment. *Journal of Experimental Medicine* 176:729-738.
- De Villiers, E.M. 1989. "Heterogeneity of the human papillomavirus group". *Journal of Virology* 63: 4398-4903.
- Dexter, T.M., Garland, J.M., Testa, N.G. 1990. "Colony-Stimulating Factors. Molecular and cellular biology". Marcel Dekker Inc. New York, USA.
- Dexter, T.M., Heyworth, C.M., Spooer, E. Ponting, I.L.O. 1990. "The role of growth factors in self-renewal and differentiation of haemopoietic stem cells". *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 327: 85-98.
- Donnelly, J.J.; Friedman, A.; Martinez, D.; Montgomery, D.L.; Shiver, J.W.; Motzel, S.L.; Ulmer, J.B.; Liu, M.A. 1995. "Preclinical efficacy of prototype DNA vaccine. enhanced protection against antigenic drift in influenza virus". *Nature Medicine* 1(6): 583-587.
- Feltkamp, M.C.W.; Smits, H.L.; Vierboom, M.P.M.; Minnaar, R.M.; de Jongh, B.M.; Drijfhout, J.W.; ter Schegget, J.; Melief, C.M.; Kost, W.M. 1993. "Vaccination with cytotoxic T lymphocyte epitope containing peptide protects against a tumor induced by human papillomavirus type 16-transformed cells". *European Journal of Immunology* 23: 2242-2249.
- Ferrone, S.; Marincola, F.M. 1995. "Loss of HLA class I antigen by melanoma cells: molecular mechanisms, functional significance and clinical relevance". *Immunology Today* 16(10):487-494.
- Friedman, D.J., Ricciardi, R.P. 1988. "Adenovirus type 12 E1A gene represses accumulation of MHC class I mRNA at the level of transcription". *Virology* 165: 303-305.
- Frisan, T.; Zhang, Q.; Levitskaya, J.; Corani, M.; Kurilla, M.G.; Masucci, M.G. 1996. "Defective presentation of MHC class I- restricted cytotoxic T-cell epitopes in Burkitt's lymphoma cells". *International Journal of Cancer* 68: 252-258.
- Garrido, F.; Ruiz-Cabello, F.; Cabrera, T.; Pérez-Villar, J.J.; López-Botet, M.; Dugan-Keen, M.; Stern, P.L. 1997. "Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours". *Immunology Today* 18(2): 89-95.
- Germain, R.N. 1994. "MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation". *Cell* 75: 287-299.
- Germain, R.N., Hendrix, L.R. 1991. "MHC class II structure occupancy and surface expression determined by post-endoplasmic reticulum antigen binding". *Nature* 353:134-139.



- Gill, B.M; Nishikata, H; Chan, G; Delovitch, T.L; Ochi, A. 1994. "Fas antigen and sphingomyelin-ceramide turnover-mediated signaling: role in life and death of T lymphocytes". *Immunology Reviews* 142: 113.
- Glew, S.S.; Connor, M.E.; Snijders, P.J.F.; Stranbridge, C.M.; Buckley, C.H.; Walboomers, J.M. 1993. "HLA expression in preinvasive cervical neoplasia in relationship to human papillomavirus infection". *European Journal of Cancer* 29A:1963-1970.
- Gloss, B., Bernard, H.U., Seedorf, H., Klok, G. 1987. "The upstream regulatory region of the human papillomavirus type 16 contains an E2 protein-independent enhancer which is specific for cervical carcinoma cells and regulated by glucocorticoid hormones". *EMBO Journal* 6: 3733-3743.
- Gonzalez, J.C.; Morillo, C.S.; Cranmer, L.D.; Spector, H.; 1996. "DNA immunization confers protection against murine cytomegalovirus infection". *Journal of Virology* 70(11): 7921-7928.
- Gruen J.R.; Weissmann, S.M. 1997. "Evolving views of the major histocompatibility complex". *Blood* 90(11):4252-4265.
- Hahn, Y.S., Yang, B., Braciale, T.I. 1996. "Regulation of antigen processing and presentation to class I MHC restricted CD8+ T lymphocytes". *Immunological Reviews*, No. 151: 31-49.
- Harris, P.E.; Maffei A.; Colovai, A.I., Kinne, J.; Tuguela, S., N. Suciu-Foca. 1996. "Predominant HLA-Class II bound self-peptides of a hematopoietic progenitor cell line are derived from intracellular proteins". *Blood* 87 (12): 5104-5112.
- Heijnen, I.A.F.M., van Vught, M.J., Fanger, N.A., Graziano, R.F., Wit, T.P.M., Hofhius, F.M.A., Guyre, P.M., Capel, P.J.A., verbeek, J.S., van de Winkel, J.G.J. 1996. "Antigen targeting to myeloid-specific human Fcγ RI/CD64 triggers enhanced antibody responses in transgenic mice". *Journal of Clinical Investigation* 97(2):331-338.
- Henderson, R.A.; Michel, H., Sakaguchi, K. 1992. *Science* 255: 1264-1266.
- Hoss, A.; D'Incan, C.; Gissmann, L.; Altmann, A.; Momburg, F.; Nindl, Y.; Osen, W.; Schönning, B.H.; Jochmus, I. 1996. "Human papillomavirus type 16 (HPV16) E7 and major histocompatibility complex (MHC) class I and II expression in human keratinocytes in culture". *Archives of Virology* 141:449-458.
- Huding, D.; Ewaldt, G.R.; Woodard, S.L. 1993. "Proteases and lymphocyte cytotoxic killing mechanisms". *Current Opinion in Immunology* 5:90-96.
- Huitbregtse, J.M., Scheffner, M., Howley, P.M. 1991. "A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18". *EMBO Journal* 10: 4129-4135.
- Ishiji, T., Lace, M.J., Parkkinen, s., Anderson, R.D., Haugen., T.H., Cripe, T.P., Xiao, J.H., Cambon, P., Turek, L.P. 1992. "Transcriptional enhancer factor (TEF-1) and its cell-specific co-activator activate human papillomavirus-16 E6 and E7 oncogene transcription in keratinocytes and cervical carcinoma cells". *EMBO Journal* 11.2271-2281.
- Jackson, M., Cohen-Doyle, M., Petersen, P.; Williams, D. 1994. "Regulation of MHC class I transport by the molecular chaperone, calnexin (p88, IP90). *Science* 263:384-387.
- Janeway, C.A., Travers, P. 1997. "Immunobiology. The immune system in health and disease". Garland Publishing Inc. New York, USA. 13-60 pp.
- Jeon, S.; Lambert, P.F. 1995. "Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: Implications for cervical carcinogenesis". *Proceedings of National Academy of Sciences U.S.A.* 92:1654-1658.

- Jennings, S.R.; Rice, P.L.; Kloszewski, E.D.; Anderson, R.W.; Thompson, D.L.; Tevethia, S.S. 1985. "Effects of herpes simplex virus types 1 and 2 on surface expression of class I major histocompatibility complex antigens on infected cells". *Journal of Virology* 56: 757-766.
- Jones, D.L.; Münger, K. 1997. "Analysis of the p53-mediated G1 growth arrest pathway in cells expressing the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein". *Journal of Virology* 71(4):2905-2912.
- Kägi, D.; Ledermann, B.; Bürki, K.; Zinkernager, R.M. 1995. "Lymphocyte-mediated cytotoxicity in vitro and in vivo: Mechanisms and significance". *Immunological Reviews* No. 146: 95-115.
- Kaklamani, L.; Leek, R.; Koukourakis, M.; Gatter, K.C. Harris, A.L. 1995. "Loss of transporter in antigen processing 1 transport protein and major histocompatibility complex class Y molecules in metastatic versus primary breast cancer". *Cancer Research* 55: 5191-5194.
- Kelly, A., Powis, S.H., Kerr, L.A., Mockridge, J., Elliott, T., Bastin, J. Vehanska, Z.B., Ziegler, A., Trowsdale, J., Townsend, A. 1992. "Assembly and function of the two ABC transporter proteins encoded in the human major histocompatibility complex". *Nature* 355:641.
- Ku, J; Kim, W; Park, H; Rang, S; Park, J. 1997. "Establishment and characterization of 12 uterine cervical-carcinoma cell lines: common sequence variation in the E7 gene HPV-16-positive cell lines". *International Journal of Cancer* 72: 313-320.
- Kyo, S., Klumpp, D.J., Inoue, M., Kanaya, T., Laimins, L.A. 1997. "Expression of AP1 during cellular differentiation determines human papillomavirus E6/E7 expression in stratified epithelial cells". *Journal of General Virology* 78: 401-411.
- Lewin, B. 1994. "Genes V". Oxford University Press. U.S.A. 1272pp.
- Lie, W.; Myers, N.B.; Gorka, J.; Rubocki, R.J.; Connolly, J.M.; Hansen, T.H. 1990. "Peptide ligand-induced conformation and surface expression of the L<sup>d</sup> class I MHC molecule". *Nature* 344: 439-441.
- Lieberman, D.A., Hoffman, B. 1994. "Differentiation primary response genes and proto-oncogenes as positive and negative regulators of terminal hematopoietic cell differentiation". *Stem Cells* 12(4):352-369.
- Liu Y., Linsky P.S., 1992 "Costimulation of T-cell growth". *Current Opinion in Immunology* 4:265-270.
- Martinez, C.K., Monaco, J.J. 1991. "Homology of proteasome subunits to a major histocompatibility complex-linked LMP gene". *Nature* 353:664.
- Massimi, P., banks, L. 1997. "Repression of p53 transcriptional activity by the HPV E7 proteins". *Virology* 227: 255-259.
- McBride, A.A., Romanezuk, H., Howley, P.M. 1991. "The papillomavirus E2 regulatory proteins". *Journal of Biological Chemistry* 266: 18411-18414.
- McCance, D.J.; Cromme, F.V.; Straight, S.W.; Tsao, G.; Pleogh, H.L.; Meijer, C.J.L.M.; Walboomer, J.M.M. 1995. "Expression of HPV-16 E5 protein in keratinocytes leads to post-transcriptional loss of MHC-1 and TAP-1". *Journal of Cellular Biochemistry Supplement* 0:292.
- Meager, A. 1993. "Cytokines". Prentice Hall Advanced Reference Series. *Physical and Life Sciences*, New Jersey, U.S.A.

- Müller-Sieburg, C.E., Deryugina, E. 1995. "The stromal cells' guide to the stem cells universe". *Stem cells* 13:477-486.
- Münger, K. 1995. "The molecular biology of cervical cancer". *Journal of Cellular Biochemistry*, Supplement. 23:55-60.
- Münger, K.; Phelps, W.C. 1993. "The human papillomavirus E7 protein as a transforming and transactivating factor". *Biochemical and Biophysical Acta* 1155: 11-123.
- Münger, K.; Scheffner, M.; Huibregtse, J.; Howley, P. 1992. "Interactions of HPV E6 and E7 oncoproteins with tumor suppressor gene products". *Cancer Surveys* 12:197-217.
- Muñoz, N., Bosch, F.X., De Sanjose, S. 1992. "The causal link between human papillomavirus and invasive cervical cancer: a population study based in Columbia and Spain". *International Journal of Cancer* 52: 743-749.
- Nakagawa, M.; Stites, D.P.; Farhat, S.; Sisler, J.R.; Moss, B.; Kong, F.; Moscicki, A.; Palefsky, J.M. 1997. "Cytotoxic T lymphocyte responses to E6 and E7 proteins of human papillomavirus type 16: Relationship to cervical intraepithelial neoplasia". *Journal of Infectious Diseases* 175:927-931.
- Örn, A.; Goodenow, R.S.; Hood, L. 1982. "Product of a transferred H-2 L<sup>d</sup> gene acts as restriction element for LCMV-specific killer T cell". *Nature* 297:415-417.
- Paul, W.E. 1993. "Fundamental immunology". 3a. Raven Press, USA. 1490 pp.
- Phelps, W.C., Münger, K., Yee, C.L., Barnes, J.A., Howley, P.M. 1992. "Structure-function analysis of the human papillomavirus type 16 E7 oncoproteins". *Journal of Virology* 66(4): 2418-2427.
- Pim, D.; Collins, M.; Banks, L. 1992. "Human papillomavirus type 16 E5 gene stimulates the transforming activity of the epidermal growth factor receptor". *Oncogene* 7(1):27-32.
- Pirisi, L., Yasumoto, M., Feller, M., Doniger, J., Paolo, J.A.D. 1987. "Transformation of human fibroblasts and keratinocytes with human papillomavirus type 16 DNA". *Journal of Virology* 4: 1529-1532.
- Ponten, J., Adami, H., Bergström, R., Diller, J., Friberg, L., Gustafsson, L., Müller, A.B., Parkin, d.M., Sørensen, P., Trichopoulos, D. 1995. "Strategies for global control of cervical cancer". *International Journal Cancer* 60:1-26.
- Ploegh, H.L. 1998. "Viral strategies of immune evasion". *Science* 280:248-253.
- Ralph, P. 1976. "Lysozyme synthesis by established human and murine histiocytic lymphoma cell lines". *Journal of Experimental Medicine* 143: 1528-1533.
- Rinaldo, C.R. 1990. "Immune suppression by herpesviruses". *Annual Reviews of Medicine* 41: 331-338.
- Rouvier, E.; Luciani, M.F.; Golstein, P. 1993. "Fas involvement in Ca<sup>2+</sup> independent T-cell-mediated cytotoxicity". *Journal of Experimental Medicine* 177:195-200.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989. "Molecular cloning. A laboratory manual". 2a. Cold Spring Harbor Laboratory Press, U.S.A.
- Scheffner, M., Huibregtse, J.M., Vierstra, R.D., Howley, P.M. 1993. "The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53". *Cell* 74: 495-505.
- Scheffner, M., Nuber, U., Huibregtse, J.M. 1995. "Protein ubiquitination involving an E1-E2-E3 enzyme ubiquitin thioester cascade". *Nature* 373: 81-83.
- Scheffner, M., Werness, B.A., Huibregtse, J.M., Levine A.J., Howley, P.M. 1990. "The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus type 16 and 18 promotes the degradation of p53". *Cell* 63: 1129-1236.

- Schumacher, T.N, Kantesaria, D.V., Heemels, R.T., Ashton, R.P., Sheperd, J.C., Fru, K., Yang, Y., Peterson, P.A., Tonegawa, S., Plegh, H.L. 1994. "Peptide length and sequence specificity of the mouse TAP1/TAP2 translocator". *Journal of Experimental Medicine* 179:533.
- Seedorf, K.; Kraemmer, G.; Duerst, M.; Suhai, M.S.; Roewekamp, W.G. 1985. "Human papillomavirus type 16 DNA sequence". *Virology* 145: 181-185.
- Seliger, B.; Harders, C.; wolscheid, U.; Staeger, M.S.; Reske-Hunz, A.B.; Huber, C. 1996. "Suppression of MHC class I antigens in oncogenic transformants: Association with decreased recognition by cytotoxic T lymphocytes". *Experimental Hematology* 24: 1275-1279.
- Seliger, B.; Hühne, A.; Knuth, A.; Bernhard, H.; Meyer, T.; Tampe, R.; Momburg, F.; Huber, C. 1996. "Analysis of the major histocompatibility complex antigen presentation machinery in normal and malignant renal cells: Evidence for deficiencies associated with transformation and progression". *Cancer Research* 56: 1756-1760.
- Seliger, B.; Maeruer, M.J.; Ferrone, S. 1997. "Tap off- tumor on". *Immunology Today* 18(6): 292-299.
- Shurin, M.R. 1996. "Dendritic cells present tumor antigen". *Cancer Immunology Immunotherapy* 43:158-164.
- Solheim, J.C.; Correno, B.M.; Hansen, T.H. 1997. "Are transporters associated with antigen processing (TAP) and tapasin class I MHC chaperones?". *Journal of Immunology* 158: 541-543.
- Squier, M.K.T.; Cohen, J.J. 1994. "Cell-mediated cytotoxic mechanisms". *Current Opinion in Immunology* 5:90-96.
- Stingl, G., Bergstresser, P.R. 1996. "Dendritic cells: a major story unfolds". *Immunology Today* 16(7): 330-333.
- Straight, S.W.; Hinkie, P.M.; Jewers, R.J.; McCance, D.J. 1993. "The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 transforms fibroblasts and effects the downregulation of the epidermal growth factor receptor in keratinocytes". *Journal of Virology* 67(8): 4521-32.
- Straight, S.W.; Herman, B.; McCance, D.J. 1995. "The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 inhibits the acidification of endosomes in human keratinocytes". *Journal of Virology* 69(5): 3185-3192.
- Stryhn, A.; Pedersen, L.; Romme, T.; Olsen, A.C.; Nissen, M.H.; Thorpe, C.I.; Baus, S. 1996. "pH dependence of MHC class I-restricted peptide presentation". *Journal of Immunology* 156: 4191-4197.
- Tindle, R.W. 1996. "Human papillomavirus vaccines for cervical cancer". *Current Opinion in Immunology* 8:643-650.
- Tindle, R.W. 1997. "Immunomanipulative strategies for the control of human papillomavirus associated cervical disease". *Immunologic Research* 16/4: 387-400.
- Toledo-Cuevas, E.M.; García-Carrancá, A. 1996. "La proteína p53 y los oncogenes de papillomavirus humanos en la carcinogénesis del cuello uterino". *Revista de Investigación Clínica* 48(1): 59-68.
- Tsao, Y.P.; Li, L.Y.; Tsai, T.C.; Chen S.L. 1996 "Human papillomavirus type 11 and 16 E5 represses p21 (Waf1/Cip1) gene expression in fibroblast and keratinocytes". *Journal of Virology* 70(11): 7535-9.
- Van Parijs, L.; Abbas, A.K. 1998. "Homeostasis and self-tolerance in the immune system: Turning lymphocytes off". *Science* 280:243-248.

- Versteeg, R.; Kruse-Wolters, M.; Plomp, A.C.; van Leeuwen, A.A.D.; Stam, N.J.; Ploegh, H.L. 1989. "Suppression of class I human histocompatibility leukocyte antigen by c-myc in locus-specific". *Journal Experimental Medicine* 170:621-635.
- von Boehmer, H. 1994. "Positive selection of lymphocytes". *Cell* 76:219-228.
- Wei, M.L., Cresswell, P. 1992. *Nature* 356:443-446.
- Werness, B.A.; Levine, A.J.; Howly, P.M. 1990. "Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53". *Science* 248:76-79.
- Wheeler, C.M., Yamada, T., Hildesheim, A., Jeninson, S.A. 1997. "Human papillomavirus type 16 sequence variants: identification by E6 and L1 lineage-specific hybridization". *Journal of Clinical Microbiology* 35(1):11-19.
- Williams, D.B., Vassilakos, A., Suh, W. 1996. "Peptide presentation by MHC class II molecules". *Trends in Cell Biology* 6:267-273.
- Yamada, T.; Manos, M.M.; Peto, J.; Greer, C.C.; Munoz, N.; Bosch, F.X.; Wheeler, C.M. 1997. "Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancer: a worldwide perspective". *Journal of Virology* 71. 2463-2472.
- Yokoyama, M.; Hassett, D.E.; Zhang, J.; Whitton, J.L. 1997. "ADN immunization can stimulate florid focal inflammation, and the antiviral immunity induced varies depending on injection site". *Vaccine* 15(5): 553-560.
- zur Hausen, H. 1976. "Condylomata acuminata and human genital cancer". *Cancer Research* 36:794-802.