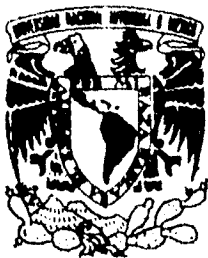


11261



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

VIAS DE PROCESAMIENTO DE ANTIGENOS
ENDOGENOS PARA SU PRESENTACION POR
MOLECULAS CLASE II DEL COMPLEJO PRINCIPAL
DE HISTOCOMPATIBILIDAD

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

MAESTRIA EN CIENCIAS BIOMEDICAS

INMUNOLOGIA

P R E S E N T A :

LAURA CECILIA BONIFAZ ALFONZO

ASESOR DE TESIS: DR. JOSE MORENO RODRIGUEZ

MEXICO, D. F.

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A DANIEL

A MIS PADRES Y HERMANOS,

A MIS MAESTROS, ALUMNOS Y AMIGOS

Este trabajo se realizo en la Unidad de Investigación Médica en Reumatología e Inmunobiología del Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, México, D. F.

Asesor: Dr. José Moreno Rodríguez.

Quiero agradecer de manera muy especial al Dr. Armando Isibasi Araujo y al Dr José Moreno Rodríguez.

contenido

CONTENIDO	I
LISTA DE ABREVIATURAS	III
RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
ANTECEDENTES	6
MOLECULAS CLASE I	6
ESTRUCTURA Y FUNCIONES	6
BIOSINTESIS, ENSAMBLAJE Y TRANSPORTE	7
MOLECULAS CLASE II	8
ESTRUCTURA Y FUNCIONES	8
BIOSINTESIS, ENSAMBLAJE Y TRANSPORTE	9
CADENA INVARIANTE (ii)	10
ESTRUCTURA	10
FUNCIONES	11
TRANSPORTE (MOLECULAS CLASE II-CADENA II)	12
DISOCIACION DE LA CADENA II, DM E INTERCAMBIO DE PEPTIDO	14
PROTEASAS QUE PARTICIPAN EN LA GENERACION DE PEPTIDOS	
PRESENTADOS POR MOLECULAS CLASE II	17
IMPORTANCIA DEL PEPTIDO EN LA ESTABILIZACION DE	
MOLECULAS CLASE II	18
TRANSPORTE DE MOLECULAS CLASE II A LA MEMBRNA CELULAR	
Y RECICLAJE.	19
PROCESAMIENTO Y PRESENTACION DE ANTIGENOS ENDOGENOS	
POR MOLECULAS CLASE II	21
ESTUDIOS DE PRESENTACION DE FORMAS ENDOGENAS DE	
LISOZIMA DE GALLINA (LG)	27
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	29
HIPOTESIS	30
OBJETIVOS	31
MODELO EXPERIMENTAL.	32

MATERIALES Y METODOS	33
REACTIVOS Y ANTICUERPOS	33
LINEAS CELULARES	33
INMUNOPRECIPITACION	34
ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA EN DODECIL SULFATO DE SODIO (SDS-PAGE)	35
ELUCION ACIDA DE PEPTIDOS UNIDOS A MOLECULAS CLASE II	35
CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION (HPLC)	36
OBTENCION DE UN PRECIPITADO DE LG	36
PRECIPITACION DE PROTEINAS CON TCA.	37
RESULTADOS.	38
EXPRESION DE DIFERENTES FORMAS ENDOGENAS DE LISOZIMA EN CELULAS LK35.2	38
LA VIDA MEDIA DE LAS FORMAS ENDOGENAS DE LG SUGIERE LA POSIBILIDAD DE PROCESAMIENTO EN COMPARTIMIENTOS TEMPRANOS	38
LOS PEPTIDOS DERIVADOS DE FORMAS ENDÓGENAS DE LG NO GENERAN DIMEROS CLASE II ESTABLES EN FORMA TEMPRANA	39
LA LOCALIZACION INTRACELULAR DE UNA PROTEINA ES CRITICA PARA DEFINIR EL PATRON DE PEPTIDOS RESULTANTES DE PROCESAMIENTO ANTIGENICO	41
LA UNION DE PEPTIDOS DERIVADOS DE UN ANTIGENO ENDOGENO SOLO OCURRE EN COMPARTIMIENTOS ENDOCITICOS	43
DISCUSIÓN	45
BIBLIOGRAFIA	51

LISTA DE ABREVIATURAS

RLT:	Receptor de linfocitos T
CPA:	Célula presentadora de antígeno
MHC:	Complejo principal de histocompatibilidad
RE:	Reticulo endoplasmico
LG:	Lisozima de gallina
B2M:	Beta dos microglobulina
Ii:	Cadena Invariante
LIP:	Péptido de cadena invariante generado por leupeptina
CLIP:	Péptido de cadena invariante asociado a clase II
MIIC:	Compartimiento clase II
BFA:	Brefeldina A
TAP1/2:	Transportadores asociados a procesamiento de antígeno
LMP2/7:	Proteínas de bajo peso molecular

RESUMEN

La función de las moléculas clase II es la presentación de antígenos derivados de proteínas exógenas a los linfocitos T CD4+. Sin embargo, un gran número de péptidos presentados por estas moléculas provienen de proteínas endógenas propias de la célula.

Este trabajo se realizó para determinar si había generación y unión de péptidos en compartimientos tempranos de la vía exocítica a moléculas clase II, como una vía de procesamiento de antígenos endógenos que permitiera explicar las diferencias observadas entre los mecanismos de procesamiento de formas exógenas y endógenas de una misma proteína. Además se determinó si la distribución intracelular de un antígeno endógeno resulta en diferentes péptidos presentados por moléculas clase II del MHC. El antígeno utilizado como modelo fue la lisozima de gallina (LG). Se examinaron tres líneas celulares que expresan tres formas endógenas de LG, una de ellas truncada y transmembranal, la otra retenida en el RE y una más secretada. El análisis consistió, por un lado, en hacer un seguimiento del antígeno y de las moléculas clase II intracelularmente, además de evaluar los péptidos asociados a las moléculas clase II en las distintas células presentadoras de antígeno (CPA).

Se encontraron diferencias en los perfiles de péptidos generados a partir de dos formas endógenas de una misma proteína. Sin embargo, no se pudo detectar unión de péptidos a moléculas clase II en compartimientos tempranos de la vía exocítica. Los resultados sugieren fuertemente que los antígenos endógenos pueden utilizar la misma vía de procesamiento que los antígenos exógenos para su presentación por moléculas clase II. Las diferencias en procesamiento observadas se deben, más que al origen de un antígeno, a su localización intracelular. El retículo endoplásmico no es un sitio adecuado para la unión de péptidos a moléculas clase II.

INTRODUCCION.

Tanto para la inducción de una respuesta inmune como para los mecanismos de tolerancia inmunológica, es necesario el reconocimiento del antígeno por los receptores específicos expresados en la superficie de los linfocitos B y T. En los primeros, el receptor es una forma transmembranal de inmunoglobulina; mientras que en los linfocitos T, el receptor es un heterodímero de 90 kDa, formado por una cadena α y una β , unidas mediante un puente disulfuro.¹

El receptor de antígeno en los linfocitos T (RLT), a diferencia de las inmunoglobulinas, es incapaz de reconocer antígenos en su forma nativa. El RLT sólo puede reconocer antígenos (casi siempre derivados de proteínas) después de que éstos han sido endocitados y procesados por una célula presentadora de antígenos (CPA).² El procesamiento de un antígeno, por lo tanto, consiste en la digestión intracelular de la proteína a péptidos capaces de asociarse a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) y la unión de los péptidos a éstas. En esta degradación participan diversas proteasas intracelulares.^{3,4}

Existen dos sitios en la célula que son importantes en la degradación de proteínas: el citosol, donde se encuentra un complejo multienzimático formado por más de 30 subunidades denominado proteosoma.⁴ Dos de las subunidades de este complejo, las denominadas LMP2 y LMP7 están codificadas dentro del MHC.^{5,6} Este sistema es utilizado como un mecanismo fisiológico de degradación de la célula y las proteínas que van a ser degradadas por este complejo multicatalítico necesitan ser marcadas mediante la adición de un

polipéptido de ubiquitina.⁷ El otro organelo importante de degradación intracelular es el lisosoma, en donde existen diversas hidrolasas incluyendo una gran variedad de proteasas que actúan a un pH ácido con diferentes tipos de actividades.⁸

Hay dos clases primordiales de moléculas del MHC que participan en la presentación de antígenos a los linfocitos T. Las moléculas clase I (HLA-A, B y C en humanos y H-2K y D en el ratón) presentan péptidos a los linfocitos T CD8⁺, que son los principales mediadores de la citotoxicidad mediada por células.⁹ Por otro lado, los péptidos unidos a las moléculas clase II del MHC (HLA-DR, DQ y DP en humanos y H-2A y H-2E en ratones) son reconocidos por linfocitos T CD4⁺, responsables de las funciones inductoras de la respuesta inmune.^{9,10} Las moléculas clase II del ratón tienen características y funciones muy similares a sus equivalentes humanas.

De acuerdo a su origen, existen dos fuentes de antígenos que pueden ser procesados y presentados a los linfocitos T. Aquellos antígenos que se sintetizan en el interior de las células y que son llamados endógenos, los cuales pueden ser proteínas propias de la célula sintetizadas, ya sea en los ribosomas libres o en aquellos asociados al retículo endoplásmico (RE) rugoso. Los antígenos endógenos pueden tener diversas localizaciones intracelulares desde que son sintetizados hasta que llegan a su destino específico dentro de la célula. Además de las proteínas propias de la célula, se consideran endógenos los antígenos tumorales y los virales. Además, debido a su comportamiento, también podrían clasificarse en este grupo los antígenos bacterianos y parasitarios que se multiplican en el interior de la célula. Estos antígenos se degradan predominantemente en

citosol¹¹ pero pudieran ser degradados en otro sitio dependiendo de su localización en la célula.

En este punto los sistemas de degradación intracelular son incapaces de distinguir entre proteínas propias y extrañas, así: cualquier péptido que se genere que pueda encontrarse con moléculas del MHC y que cumpla con las características para unirse a estas moléculas podría ser presentado a los linfocitos T.

El otro tipo de antígenos, son los denominados exógenos, que son originados fuera de la célula y penetran a ésta por endocitosis o fagocitosis. Por lo tanto, este tipo de antígenos se localiza principalmente por la vía endocítica. De esta manera se consideran antígenos exógenos a cualquier proteína que pueda ser endocitada o proteínas derivadas de agentes infecciosos que son fagocitados para promover su destrucción. Sin embargo, algunas proteínas propias de la célula residentes de la vía endocítica o que como mecanismo fisiológico se degradan en los lisosomas (aunque semánticamente son endógenos) pueden también considerarse como antígenos exógenos por su localización celular. La degradación de este tipo de antígenos es fundamentalmente en compartimientos de la vía endocítica, predominantemente en lisosomas.¹²

De acuerdo a lo anterior existen dos fuentes de antígenos que pueden estar localizados en diferentes sitios de la célula y que para poder presentarse necesitan ser procesados a péptidos capaces de encontrarse y unirse a dos clases distintas de moléculas de histocompatibilidad: las moléculas clase I y las moléculas clase II. Ambos tipos de moléculas del MHC comparten algunas características estructurales¹¹ pero difieren en los procesos de

ensamblaje y transporte intracelular desde su biosíntesis hasta su expresión en la membrana celular.

Si tomamos en cuenta estas diferencias y con base en un gran número de trabajos experimentales las moléculas clase I del MHC podrían presentar predominantemente péptidos derivados de proteínas endógenas y las moléculas clase II principalmente péptidos derivados de proteínas exógenas.^{14,15} Sin embargo, el análisis de péptidos eluidos de ambos tipos de moléculas, así como diversos reportes experimentales demuestran que las moléculas clase I pueden presentar péptidos derivados de antígenos exógenos¹⁶ y que un gran porcentaje de los péptidos presentados por las moléculas clase II corresponden a proteínas propias de la célula.^{16,17} Así más que el origen (exógeno o endógeno), lo que parece definir el destino de los péptidos es la localización intracelular de la proteína que les da origen.

Los mecanismos de procesamiento por los cuales los antígenos endógenos pueden ser presentados por moléculas clase II aún no están completamente definidos. Además, la presentación de péptidos de proteínas endógenas por moléculas clase II es de gran importancia en los mecanismos de tolerancia que participan en la prevención de enfermedades autoinmunes y pueden tener implicaciones importantes en la generación de las mismas. Por lo tanto, es importante el estudio de los mecanismos por los cuales una proteína endógena es presentada por moléculas clase II, así como la determinación del sitio en donde los péptidos derivados de proteínas endógenas son generados y el sitio donde se unen a moléculas clase II.

ANTECEDENTES

MOLECULAS CLASE I

Estructura y Funciones

Las moléculas clase I del MHC son glucoproteínas formadas por una cadena α de 44 kDa, constituida por tres dominios extracelulares, una región transmembranal y una cola intracitoplásmica corta. Esta molécula es codificada por el MHC en el cromosoma 6 humano y el 17 murino y se asocia de manera no covalente a una cadena β 2-microglobulina (β 2M), de 12 kDa, que se codifica en el cromosoma 15 humano.⁷

Las moléculas clase I son altamente polimórficas y se expresan en la superficie de la mayoría de las células nucleadas como un complejo trimolecular formado por la cadena α , la β 2M y un péptido antigénico de 7 a 10 aminoácidos.^{20, 21}

Los estudios cristalográficos de las moléculas clase I identificaron una estructura formada por los dominios más distantes a la membrana constituida por dos α hélices apoyadas en ocho bandas β plegadas antiparalelas (figura 1A).^{22, 23} Dentro de esta estructura se determinó una densidad electrónica que correspondía al péptido antigénico, que al ser eliminada daba lugar a una hendidura, la cual corresponde al sitio en donde los péptidos generados a partir del procesamiento se unen a las moléculas clase I para ser presentados a los linfocitos T CD8⁺.

En la base de esta estructura es donde existe el mayor polimorfismo, y se han determinado cavidades denominadas "*Pockets*" que son alelo específicas y que unen a determinados aminoácidos en los péptidos

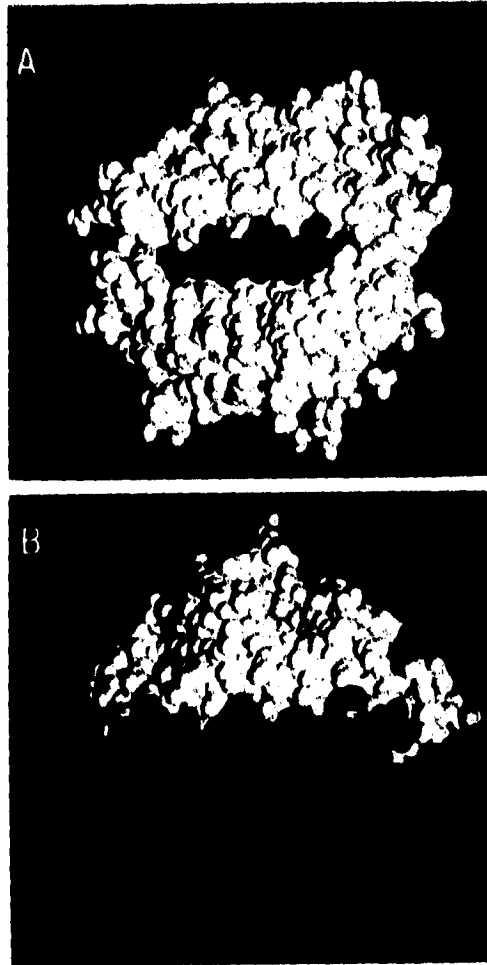


Figura 1. Estructura terciaria de las moléculas clase I (A) y clase II (B) del MHC (modificada de referencia 10).

llamados "Motifs".^{24, 25} Este tipo de interacciones explica las bases de la selectividad de la unión péptido-molécula de histocompatibilidad.

Biosíntesis, Ensamblaje y Transporte

Durante su biosíntesis, la cadena α de la molécula clase I y la β 2M, son translocadas cotraduccionalmente al interior del RE, donde ocurre una serie de eventos necesarios para el ensamblaje del trimero α - β 2M-péptido.²⁶ Al ingresar al RE a la cadena pesada se asocia una chaperona llamada calnexina^{27, 28} y posteriormente la β 2M. Diversos estudios experimentales demuestran que este dímero es inestable y que es indispensable la presencia de un péptido para completar el ensamblaje en RE.^{29, 30 y 31}

Si se considera que un gran número de antígenos sintetizados en citosol son presentados por moléculas clase I y que el citosol, mediante el sistema multicatalítico denominado proteosoma, formado por múltiples subunidades es capaz de efectuar proteólisis a pH neutro.³² Dado que las moléculas clase I están en el interior del RE, es indispensable la existencia de un sistema transportador del citosol al RE que permita el contacto de péptidos con la molécula clase I.

De esta manera el transportador es un heterodímero compuesto por las subunidades TAP1 y TAP2, que están codificadas en MHC, que se expresa en la membrana del RE.^{33, 34 y 35} La función de este dímero es transportar los péptidos generados en el citosol al interior del RE, de manera dependiente de ATP. Líneas celulares deficientes de estas moléculas transportadoras acumulan cadenas α y β 2M en el RE,³⁶ lo cual demuestra que la principal fuente de péptidos capaces de estabilizar a las moléculas clase I provienen de citosol.

Además, existen evidencias experimentales de que la cadena α unida a la β_2M se asocia transitoriamente a TAP1 y TAP2, para cargarse con los péptidos trasladados por estos transportadores.¹⁷⁻¹⁹ Si al dímero α - β_2M se une un péptido adecuado, el complejo resultante se disocia del heterodímero TAP1-TAP2 y la molécula totalmente ensamblada sigue su viaje por la vía exocítica a la superficie celular. Esto nos lleva a pensar que la asociación de las moléculas clase I con los transportadores tiene como objeto favorecer que los péptidos provenientes de citosol se unan a moléculas clase I.²⁰

Tomando en cuenta lo anterior, la función de las moléculas clase I de acuerdo a su estructura, ensamblaje y transporte, es entonces presentar péptidos derivados de proteínas endógenas, cuya degradación es fundamentalmente el complejo multicatalítico localizado en citosol a linfocitos T CD8+. Sin embargo, diferentes péptidos eluidos de moléculas clase I, demuestran que antígenos endógenos provenientes de otras fuentes, como proteínas de membrana, de secreción y proteínas relacionadas con moléculas del MHC e inclusive proteínas derivadas de antígenos exógenos pueden también presentarse por moléculas clase I, lo que sugiere la posible existencia de otros sitios de degradación en la célula u otras rutas o vías de unión de péptidos a moléculas clase I.^{16, 17, 39 y 40}

MOLECULAS CLASE II

Estructura y Funciones

Las moléculas clase II del MHC, como las moléculas clase I, son glucoproteínas altamente polimórficas, pero que están formadas por una cadena α de 32-34 kDa y una β de 26-28 kDa, ambas codificadas

por el MHC en el cromosoma 6 humano y 17 murino.⁷⁻⁹ Las dos cadenas tienen dos dominios extracelulares, uno transmembranal y uno intracitoplásmico. Las moléculas clase II son expresadas en la membrana de linfocitos B, macrófagos, células dendríticas, linfocitos T activados (en humanos) y bajo ciertas condiciones en células epiteliales, con un péptido de 13- 26 residuos de aminoácidos unido a ellas.⁴¹

Estudios cristalográficos realizados por Wiley y colaboradores demostraron, para la molécula IILA-DR1, que los dominios $\alpha 1$ y $\beta 1$ forman una estructura similar a la descrita anteriormente para las moléculas clase I (figura 1B).⁴² Las principales diferencias estructurales con respecto a MHC clase I, basadas en su cristalografía, radican en el dominio $\beta 2$ y en el sitio de unión a los péptidos (dominios $\alpha 1$ y $\beta 1$), en donde la molécula clase II tiene una estructura más abierta en los extremos, permitiendo que los péptidos se unan a ellas en conformación extendida, proyectándose en ambos extremos. De esta manera, los péptidos que se unen a moléculas clase II son muy variados en tamaño (aún para un mismo determinante antigénico) y están formados por un núcleo central con prolongaciones o extensiones tanto en el amino, como en el carboxilo terminal.⁴³ En la base del sitio de unión a péptidos de la molécula clase II también hay cavidades que interactúan con las cadenas laterales de determinados aminoácidos del núcleo del péptido (*motifs*), dando también lugar a una interacción selectiva péptido-alelo clase II.⁴⁴⁻⁴⁵

Biosíntesis, Ensamblaje y Transporte

Las cadenas α y β de las moléculas clase II, después de su biosíntesis, son translocadas en forma cotraducciona al interior del retículo endoplásmico (RE).⁴⁶ Después de su ingreso en el RE, las cadenas

clase II α y β , forman dímeros que se asocian con un homotrímero de una tercera proteína, conocida como la cadena invariante (Ii) para formar un nonámero.⁴⁷ Algunos trabajos demuestran la participación de chaperonas durante la formación de este nonámero, como la calnexina e IP90, las cuales se asocian a los dímeros $\alpha\beta$ libres en ausencia de cadena Ii y la presencia de la cadena Ii disocia a las chaperonas del complejo.⁴⁸ Otras chaperonas, como Bip, pueden también unirse a trímeros de cadena Ii, así como con uno o dos heterodímeros $\alpha\beta$ -Ii, y retenerlos en el RE,⁴⁹ hasta concluir el ensamble del nonámero. Algunas formas libres de cadena invariante también son retenidas en el retículo endoplásmico.

Estos trabajos sugieren fuertemente que no existen dímeros libres $\alpha\beta$ intermediarios en presencia de cadena Ii o, como una alternativa, que de existir, su vida media es muy corta.⁵⁰ Por otra parte, diversos trabajos demuestran de manera contundente la participación de Ii en el ensamblaje de las moléculas clase II.⁵¹ En ausencia de cadena Ii la expresión de moléculas clase II en la superficie es muy baja.⁵² No obstante, estudios realizados utilizando sistemas de síntesis de proteínas *in vitro* sugieren la posibilidad de que durante el ensamblaje de las moléculas clase II, se formen dímeros $\alpha\beta$ libres, capaces de unir péptidos, lo cual previene la unión de la cadena Ii con los heterotrímeros $\alpha\beta$ -péptido.⁵³ Los eventos de ensamblaje de las moléculas clase II se ilustran en la figura 2.

CADENA INVARIANTE

Estructura

La cadena invariante es una glucoproteína tipo II no polimórfica, codificada en el cromosoma 5 en el humano y en el cromosoma 18 en el

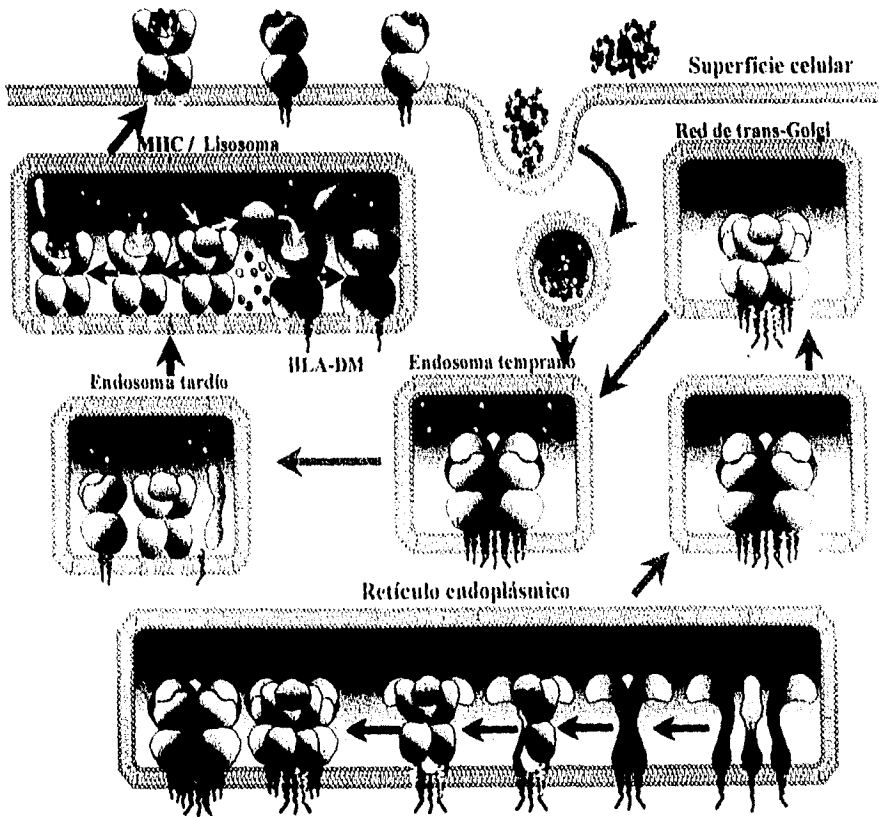


Figura 2. Vías de procesamiento de antígeno para presentación por moléculas clase II del MHC (Ver texto).

ratón. Esta molécula se expresa de manera constitutiva en CPA. En el ratón existen dos isoformas, mientras que en el humano hay cuatro isoformas de la proteína.⁵⁴

La principal forma expresada en humanos es de 216 aminoácidos, con un dominio amino terminal citoplásmico de 30 aminoácidos, seguidos por 26 residuos de aminoácidos hidrofóbicos que constituyen la región transmembranal. Esta forma es referida como p33 (p31 en el ratón). La segunda forma de la cadena II humana, que resulta de un codón alterno de iniciación de traducción, es conocida como p35.⁵⁵

La tercera isoforma de expresión de esta proteína, es resultante del procesamiento alternativo del mRNA y da como resultado la adición de 64 aminoácidos en la región extracelular, generando las proteínas denominadas p41 (en el ratón y en humanos) y p43 (sólo en humanos) por iniciación alternativa de traducción.⁵⁶ Cualquiera de las isoformas mencionadas puede formar el trimero durante el ensamblaje. Sin embargo existe predominancia de p33 o p35 en el humano y p31 en el ratón.⁵⁷

Funciones.

La cadena invariante tiene por lo menos tres funciones importantes en el procesamiento de antígenos por moléculas clase II.⁵⁸ La primera, como se mencionó anteriormente, es su participación en el ensamblaje para formación de nonámeros clase II estables, condición necesaria para salir del RE.⁴⁶⁻⁵⁰ En segundo lugar, la cadena II protege el sitio de unión de péptidos de las moléculas clase II, impidiendo la unión de péptidos antes de alcanzar la vía endocítica. Esto se apoya en trabajos experimentales que demuestran que los trimeros $\alpha\beta$ -II son incapaces de unir péptidos.⁵⁹ Sin embargo, este punto ha sido recientemente

objeto de controversia, ya que algunos trabajos con células que no expresan cadena II, demuestran que sus moléculas clase II tienen una capacidad limitada de unir péptidos endógenos. lo que sugiere que la prevención de la unión de péptidos a las moléculas clase II antes de que lleguen a la vía endocítica, no es una función primordial de la cadena II.⁶⁰

Finalmente, la porción intracitoplásmica de la cadena invariante es una señal de tráfico intracelular que lleva las moléculas clase II a la vía endocítica.⁶¹⁻⁶³ En ausencia de la cadena invariante, pocos dímeros clase II salen del RE. El tipo de tráfico intracelular inducido por la cadena invariante varía de acuerdo al tipo celular.⁶⁴

Si tomamos en cuenta los puntos mencionados, la cadena II tiene un papel muy importante en la presentación de antígenos exógenos por moléculas clase II. La ausencia de cadena II disminuye de manera importante la presentación de este tipo de antígenos por moléculas clase II.^{51, 52} Sin embargo, la presentación de algunos antígenos exógenos, así como la de algunos endógenos, puede aumentar en ausencia de II.⁶⁵⁻⁶⁶ Esto último sugiere la existencia de otras vías de procesamiento de antígeno para su presentación por moléculas clase II.

Transporte. (Moléculas clase II-cadena II)

Los nonámeros clase II-II que salen del RE viajan a través del aparato de Golgi hasta la red de Trans-Golgi, de donde el complejo multimérico es desviado a un compartimento endocítico temprano.⁶⁷ Una de las primeras evidencias importantes de la desviación de las moléculas clase II hacia la vía endocítica fue la demostración del

tiempo que tardan en llegar a la superficie celular (>4 horas), comparado con las moléculas clase I (60 minutos).^{66,69}

Estudios previos sugerían la presencia de moléculas clase II después de su biosíntesis, en compartimentos de la vía endocítica,⁷⁰ lo cual fue confirmado por los estudios de Guagliardi y Brodsky.⁷¹ Simultáneamente, los estudios de Bakke y Doberstein⁶¹ y subsecuentemente de Peterson y colaboradores⁷² demostraron que la cadena invariante tenía en su estructura una secuencia de aminoácidos que constituye una señal de tráfico que dirige, a las moléculas clase II, de la red de trans-Golgi hacia compartimentos de la vía endocítica.

En estos trabajos se generaron mutantes con deleciones en distintas regiones del gen, con las que se demostró que en la región amino terminal, residuos 12-15 de p33, se encuentra una región importante de tráfico intracelular. A partir de entonces, múltiples trabajos demuestran la participación de la cadena II en el tráfico de las moléculas clase II a la vía endocítica.^{61, 63, 65, 70} Los trabajos de Germain y colaboradores sugieren que la vía de llegada de las moléculas clase II a la vía endocítica es a través de la red del trans-golgi hacia los endosomas tempranos.^{66, 67}

Existen, en la vía endocítica, compartimentos multilaminares con características morfológicas que los distinguen de los endosomas tardíos y de los lisosomas, que se han denominado *MHC* o *CVII*. En estos compartimentos existe una acumulación de moléculas clase II⁷² y se cree que son los sitios de la vía endocítica en donde se efectúa la unión con los péptidos exógenos derivados del procesamiento.^{73,74}

A pesar de que los complejos clase II-cadena II parecen interceptar la vía endocítica mediante vesículas que se fusionan con los endosomas tempranos, dependiendo del tipo de célula, las moléculas clase II parecen acumularse en distintos compartimientos. Así, en linfocitos B se localizan abundantemente en los compartimientos *MHC*, mientras que en melanomas y células COS se localizan a lo largo de toda la vía endocítica. En algunas líneas de linfocitos B humanas también pueden encontrarse en endosomas tempranos y, en algunas ocasiones, en la superficie celular⁷⁶.

Además de las señales de tráfico localizadas en la secuencia de la cadena II, algunos trabajos han sugerido señales de tráfico en la secuencia de las cadenas α y β de la moléculas clase II. En el tallo citoplásmico de ambas cadenas se encuentran señales para internalización.⁷⁶ Bajo ciertas circunstancias, en ausencia de cadena II, las pocas moléculas clase II que salen del RE viajan a la superficie celular y posteriormente pueden ser internalizadas a compartimientos de la vía endocítica para su posterior reciclamiento.⁷⁷

Disociación de la Cadena II, DM e Intercambio de Péptido.

Para permitir la unión de péptidos a las moléculas clase II, la cadena II se disocia del dímero clase II en forma gradual, a partir de su llegada a la vía endocítica. En esto participan diferentes proteasas y el pH ácido.⁷⁸

De las proteasas que participan en la degradación de la cadena II, la mejor caracterizada es la catepsina B. Esta es una proteasa cisteínica con actividad de endopéptidasa, cuya localización principal son los lisosomas, los trabajos de Reyes y colaboradores⁷⁹ demuestran la degradación de II *in vitro* por la catepsina B, con la generación de

fragmentos de 27, y 24, 15 y 10 kDa (similares al tamaño de los productos de gradación de la cadena II *in vivo*) que permanecen unidos a la molécula clase II, a bajas concentraciones de enzima. Cuando se utilizan altas concentraciones de la enzima se logra la disociación total de la cadena II. Sin embargo *in vivo* las concentraciones de la catepsina B no son tan elevadas, por lo cual no se puede descartar la posibilidad de la participación conjunta de otras enzimas proteolíticas en la disociación de la cadena II. Además, en presencia del inhibidor de proteasas leupeptina (inhibidor de cisteín proteasas), se genera un fragmento que permanece unido a la cadena invariante, denominado LIP (péptido de cadena invariante generado por leupeptina).⁸⁰ lo que apoya la participación de proteasas de cisteína en la disociación de cadena II.

Estudios recientes han demostrado que después del procesamiento de la cadena invariante, el péptido denominado CLIP (péptido de cadena invariante asociado a clase II), que corresponde a los aminoácidos 81-104, permanece unido a la molécula clase II ocupando el sitio de unión de péptido⁸¹ y de la disociación de este péptido, que se une de la misma manera que péptidos convencionales,⁸² depende la unión del péptido antigénico que será presentado por las moléculas clase II. A este proceso se le denomina intercambio de péptido, el cual es indispensable para la unión de péptidos antigénicos. De no ocurrir así, una gran cantidad de moléculas presentarían el péptido CLIP en la superficie celular.

En la liberación del CLIP parecen no participar proteasas intracelulares. Se ha sugerido que la molécula clase II HLA-DM en humanos (H-2M en ratones) tiene un papel importante en el intercambio del CLIP y los péptidos antigénicos.^{83,84} Esta molécula

clase II no clásica, es codificada por los genes DMA y DMB de la región clase II del MHC humano;⁸⁵ no es polimórfica ni se expresa en la membrana celular, sino que se localiza de manera abundante en compartimientos de la vía endocítica con características similares a MIIC.⁸⁶ Aparentemente una señal de tráfico, independiente de la asociación con cadena Ii o moléculas clase II, las dirige a compartimientos de la vía endocítica.⁸⁷

La molécula DM, tiene poca homología estructural con las moléculas clase II convencionales. Estudios realizados *in vitro* con moléculas DM purificadas sugieren que a pH 5.0, éstas promueven la disociación de péptidos unidos a HLA-DR, incluyendo CLIP.³⁴ Este proceso por lo tanto, libera a las moléculas de los péptidos endógenos de Ii y aumenta la eficiencia de unión de péptidos exógenos.

Los estudios realizados con células deficientes en DM demuestran una acumulación de moléculas clase II con el péptido CLIP con una disminución en la eficiencia de presentación de antígenos exógenos.⁸⁸ La participación de esta molécula en el procesamiento de antígeno es menor en el ratón. Además, existen diferencias en el requerimiento de DM para la eficiencia de procesamiento para distintos alelos clase II. Esto ha llevado a postular la existencia de un mecanismo adicional para la disociación del péptido CLIP.

Estudios recientes realizados por Hämmerling y colaboradores demuestran que los residuos 81-90 del segmento amino terminal de CLIP, a pH ácido, pueden autocatalizar la liberación de este péptido y de otros péptidos de Ii, permitiendo la carga de péptidos generados por procesamiento lisosómico por un mecanismo de liberación alostérica.⁸⁹

Proteasas que Participan en la Generación de Péptidos Presentados por Moléculas Clase II.

En vesículas de la vía endocítica, fundamentalmente en lisosomas. Diversas proteasas participan en la generación de péptidos, derivados de proteínas exógenas, capaces de unirse a las moléculas clase II.⁴ Entre las mejor caracterizadas se encuentran las que tienen actividad de cisteín proteasas como las catepsinas A, B, y L; aquellas con actividad de serín proteasas similares a la tripsina y la quimotripsina, las que tienen actividad de aspartil proteasas como la catepsina E y la catepsina D y metaloproteasas como la termolisina.³⁰

Diversos estudios, utilizando inhibidores de diferentes proteasas, sugieren la participación de manera conjunta de las múltiples enzimas proteolíticas en la generación de péptidos antigénicos, lo que explicaría, al menos en parte, la gran heterogeneidad de los péptidos presentados por las moléculas clase II.³¹ Por otra parte, estudios utilizando un inhibidor específico de catepsina E, sugieren la participación de esta enzima en la generación de un determinante antigénico de ovaalbumina.³² Debemos considerar que la mayoría de estudios que demuestran la participación de ciertas enzimas en el procesamiento de antígeno son indirectos y, aunque existen estudios que lo sugieren, no se tienen evidencias experimentales que demuestren la participación selectiva de cada una de las enzimas en el procesamiento de antígenos específicos.³³

Estudios recientes han demostrado que, además de que los lisosomas participan en la degradación de proteínas que penetran a la célula por endocitosis, estos organelos también constituyen el sitio de degradación fisiológica de la célula y que las proteínas degradadas en

este sitio también requieren de la adición de un polipeptido de ubiquitina.⁹¹

Además de los lisosomas y el citosol como sitios importantes de degradación en la célula, algunos autores proponen que en el RE puede existir una degradación importante de proteínas y, por lo tanto, de generación de péptidos.^{95,96} Aquellas proteínas que no se ensamblan adecuadamente y que, en consecuencia, no son capaces de formar complejos oligoméricos, no pueden salir de RE. Por lo cual, para mantener un equilibrio, estas proteínas necesitan ser eliminadas. Todas las proteínas retenidas en RE eventualmente son degradadas, algunas de ellas rápidamente, mientras que otras tienen tiempos de vida muy largos.⁹⁷

La existencia de un sistema de degradación de proteínas en el RE está apoyada por trabajos en los que la utilización de agentes farmacológicos que inhiben la degradación lisosómica no afectan la degradación de proteínas de componentes multiméricos, como el RLT, en células deficientes de alguna de las cadenas.⁹⁸ Sin embargo, utilizando este complejo, se ha demostrado que algunos de sus componentes necesitan salir de RE para ser degradados, lo que sugiere la existencia de un mecanismo de transporte de proteínas a lisosomas, o algún otro sitio, para su degradación.⁹⁹ Además, tampoco puede descartarse la posibilidad de exista un mecanismo de transporte de proteínas parcialmente degradadas en RE a lisosomas.

Importancia del Péptido en la Estabilización del Dímero Clase II.

Al igual que para las moléculas clase I, diversos trabajos demuestran la participación del péptido en la estabilización del dímero clase II. La

aparición, en presencia de un péptido adecuado, de una forma denominada compacta de dímeros clase II, resistente al SDS, y que en geles de poliacrilamida permanece como un dímero de 55-60 Kda ($\alpha\beta$ -péptido), demuestra que el péptido provoca un cambio conformacional en el heterodímero clase II, promoviendo una estructura estable.¹⁰⁰

Los estudios realizados por Shaddegh-Nasseri y colaboradores demuestran que en la generación de complejos clase II- péptidos de vida media larga, hay dos estadios fundamentales. El primero a pH ácido, el cual promueve la adquisición de una conformación óptima del heterodímero clase II para la captura del péptido. En el segundo estadio, después de la neutralización, se estabiliza la unión del péptido, dando como resultado una interacción de alta afinidad con el péptido asociado.^{101, 102} La adición de péptidos exógenos a células con baja expresión de moléculas clase II aumenta la expresión de éstas en la superficie, lo que indica que el péptido promueve una conformación estable, necesaria para la expresión de las moléculas clase II.¹⁰³

Transporte de las Moléculas Clase II a la Membrana Celular y Reciclaje

Las moléculas clase II sin cadena H que se han cargado con péptido son transportadas a la superficie celular. La ruta por la cual este complejo trimolecular sale a la superficie no está definida aún. Algunos trabajos sugieren que esta vía de salida puede intersectar con la vía de exocitosis.⁵⁴ Sin embargo, no se puede descartar la existencia de una ruta alterna de salida.

Diversos trabajos han demostrado que después de que las moléculas clase II han llegado a la superficie celular, éstas pueden ser

internalizadas y recicladas de nuevo a ésta.¹⁰¹ Además, algunos trabajos sugieren la existencia de un intercambio de péptido durante este proceso.¹⁰⁵ El reciclaje de moléculas clase II podría implicar la existencia de otra vía de procesamiento para moléculas clase II, la cual explicaría por qué ciertos antígenos no requieren de la presencia de cadena I y/o de la molécula DM para su eficiente presentación por moléculas clase II.

Diversos trabajos experimentales apoyan este último punto. Los trabajos de Long y colaboradores demostraron que para la presentación de péptidos de la proteína de hemaglutinina del virus de influenza y para péptidos derivados de la proteína básica de la mielina por moléculas HLA-DR, el reciclaje de moléculas clase II es fundamental.^{106,107.}

Con base en los antecedentes planteados anteriormente, es claro que existen diversas variables que determinan cuales serán los péptidos presentados por las moléculas clase II.^{46,53} En primer lugar los eventos de ensamblaje de la moléculas clase II; en segundo, las rutas de transporte de las moléculas clase II a la superficie celular;⁶⁷⁻⁷⁴ en tercero y cuarto lugares, la presencia y disociación de la cadena I;^{59, 78 y 79} en quinto lugar, el intercambio de péptido⁸¹⁻⁸⁹ y, finalmente, el pH de los compartimientos donde se localizan las moléculas clase II.¹⁰⁹ Este último punto no sólo es importante para la actividad de las proteasas que degradan los antígenos a péptidos inmunogénicos, ya que a diferentes pH podrían generarse distintos péptidos, sino además, porque esto sería importante para la conformación de la molécula clase II y su disponibilidad para adquirir péptidos capaces de formar moléculas clase II estables.

Es generalmente aceptado que las moléculas clase II presentan péptidos derivados de proteínas degradadas en compartimientos de la vía endocítica.¹⁰⁷ Esto ha sido interpretado, erróneamente, en el sentido de que las moléculas clase II del MHC presentarían predominante o exclusivamente péptidos de proteínas exógenas. En estudios de elución de péptidos naturalmente procesados unidos a moléculas clase II humanas y murinas se ha encontrado que los péptidos predominantes en éstas son derivados de proteínas transmembranales, la mayoría de ellas relacionadas con moléculas del MHC (hasta un 50%), un 17% de los péptidos eluidos corresponden a proteínas exógenas, mientras que solo un 3% corresponden a proteínas citosólicas.¹⁰⁸

La frecuencia tan alta de péptidos provenientes de proteínas endógenas unidos a moléculas clase II, por un lado, no es sorprendente, pues muchas proteínas endógenas coinciden con las exógenas en los compartimientos de la vía endocítica por donde viajan las moléculas clase II. Sin embargo, algunos péptidos provienen de proteínas que no necesariamente deben estar en la vía endocítica. Esto podría explicarse si existiera unión de péptidos en otros sitios de la célula.

Procesamiento y Presentación de Antígenos Endógenos por Moléculas Clase II

Los antígenos endógenos derivados de proteínas propias de la célula pueden dividirse en tres grupos fundamentales: 1.- proteínas citosólicas, 2.- proteínas mitocondriales y nucleares, 3.- proteínas de la vía exocítica, las cuales pueden ser residentes de RE, golgi, proteínas de membrana y de secreción. De éstas, las proteínas de la vía exocítica son la que pueden ser presentadas de manera más eficiente por las

moléculas clase II.¹⁶ Sin embargo, hay ejemplos de proteínas citosólicas que también pueden presentarse,¹⁷ pero no existen ejemplos de proteínas mitocondriales o nucleares presentadas por clase II. Estos datos correlacionan con los estudios de elución de péptidos unidos a clase II.¹⁹

Diversos trabajos demuestran la presentación de antígenos provenientes de proteínas de la vía exocítica por moléculas clase II. La mayoría de estos trabajos trata de responder a la pregunta de cual es la vía de procesamiento que siguen estos antígenos para poder ser presentados por moléculas clase II. Es importante recalcar que, de las proteínas mencionadas, algunas no tendrían por que tener acceso a la vía endocítica y de ahí se deriva la posibilidad de que puedan degradarse y unirse a las moléculas clase II en otro sitio de la célula, distinto de los habituales. Para poder estudiar las rutas de procesamiento de este tipo de antígenos podemos dividirlos en tres grupos importantes :

Proteínas de membrana y de secreción: Operacionalmente, este grupo de proteínas se puede considerar como exógeno si tomamos en cuenta que las proteínas de membrana son, en algún momento, endocitadas como parte de los mecanismos de recambio natural de la célula. Para las proteínas transmembranales expresadas en la superficie celular, la utilización de sus ligandos favorece el entrecruzamiento y endocitosis mediada por receptores, haciendo más eficiente la presentación de antígeno.¹¹ Las proteínas de secreción, por otra parte, se liberan al medio para posteriormente seguir la vía de endocitosis clásica. Lo anterior sugiere que estas proteínas son endocitadas para ser presentadas por la vía clásica de presentación.

Sin embargo, existen ejemplos, tanto de proteínas de membrana como de secreción, que tienen diferentes requerimientos de procesamiento cuando se comparan con formas exógenas de la misma proteína.^{65,112} Una posible explicación de estas diferencias sería si los péptidos derivados de estas proteínas fueran presentados por moléculas clase II recicladas.

Los trabajos de Weiss y Bogen, utilizando como antígeno formas de cadena ligera de inmunoglobulina con diferentes mutaciones resultantes en formas transmembranales que no pueden expresarse en la superficie, así como formas de secreción no liberadas al medio, demostraron que algunos antígenos endógenos de este tipo pueden presentarse eficientemente por moléculas clase II aunque no lleguen a la superficie celular.¹¹³ Estos experimentos sugieren que puede existir una vía de procesamiento para proteínas que no adquieran una conformación adecuada o que sean incapaces de formar estructuras oligoméricas durante su ensamblaje en RE.

Los trabajos de Mathis y colaboradores en los que evaluaron la capacidad de respuesta de un panel de hibridomas de linfocitos T a CPA provenientes de ratones dobles transgénicos que expresan diferentes formas endógenas de proteínas TM y de secreción y que son deficientes de cadena Ii, demostraron diferencias notables cuando se compararon con formas exógenas de la misma proteína. Notablemente, algunos péptidos pudieron generarse a partir de formas exógenas pero no de formas endógenas de la proteína. En estos trabajos se demuestra además que la presentación de ciertos péptidos endógenos es inhibida en presencia de la cadena Ii, pero que otros determinantes dependen de la cadena Ii para su presentación.⁶⁵ Es importante señalar que estos antígenos no se pudieron detectar en

la superficie celular, ni en sobrenadante del medio de cultivo. Lo anterior es indicativo de la complejidad en los mecanismos de procesamiento de antígenos endógenos para su presentación por moléculas clase II y sugiere diversidad en las vías de procesamiento de este tipo de antígenos.

Además de lo planteado anteriormente, otros estudios utilizando como antígeno hemaglutinina de influenza tipo A (HA), demuestran que la presentación de este antígeno por moléculas clase II es sensible a cloroquina (un inhibidor de la acidificación endosómica).¹¹³ En estos trabajos, utilizando mutantes que generan formas de este antígeno deficientes en transporte, se sugiere que para que este antígeno pueda ser presentado por moléculas clase II necesita translocarse al RE, ya que una forma citosólica no puede ser presentada, pero que no se necesita transporte por el aparato de Golgi ni llegar a la superficie celular para poder ser presentado.¹¹⁴ Estos trabajos sugieren la existencia de un transporte directo de las mutantes de HA del RE a la vía endocítica para poder degradarse y unirse a las moléculas clase II.

Proteínas residentes del RE: Estas proteínas son el mejor ejemplo de antígenos que son presentados con alta eficiencia por moléculas clase II y que no tendrían porque llegar a la vía endocítica. Además, un porcentaje de péptidos naturalmente procesados unidos a moléculas clase II provienen de proteínas residentes de RE.¹¹⁵ Entre las proteínas residentes de retículo endoplásmico podemos encontrar las que tienen una secuencia señal que les permite permanecer en este compartimiento y que mediante la existencia de receptores pueden viajar del RE a la red de cis-Golgi. Un ejemplo de esto son las proteínas que tienen la secuencia KDEL en el extremo carboxilo terminal.¹¹⁶ Además, como se mencionó, muchas proteínas que no

adquieren una conformación adecuada o complejos multiméricos que no se ensamblan adecuadamente, se retienen en este sitio para su eventual degradación.⁹⁵

Weiss y colaboradores¹¹² utilizaron, además de lo descrito anteriormente, formas de cadena ligera de inmunoglobulina con la secuencia de retención KDEL y demostraron una eficiente presentación de antígeno. En estos trabajos surge la posibilidad de la generación y unión de estos péptidos se lleve a cabo en el RE. Sin embargo en los trabajos de McCluskey y colaboradores¹¹⁶ utilizando una forma de lisozima de gallina (LG) con la secuencia de retención KDEL, demostraron que la presentación de este antígeno es inhibida por cloroquina, lo que indica la participación de compartimientos ácidos para la presentación de este tipo de antígenos.

Proteínas citosólicas. Para que este tipo de proteínas se pueda presentar por moléculas clase II, es necesario que se degraden en el citosol y que utilicen el sistema de transportadores a RE (TAP1-TAP2), o depender de la existencia de un sistema de transporte de citosol a lisosomas, ya sea de proteínas degradadas o de proteínas completas. Los estudios de presentación de este tipo de antígenos por moléculas clase II han generado controversia. Los trabajos de Long y colaboradores demuestran la existencia de al menos dos mecanismos para la presentación de antígenos citosólicos por moléculas clase II, uno independiente y otro dependiente del sistema TAP1-TAP2.¹⁰⁹

Los trabajos de Klausner y colaboradores demuestran también dos vías por las que puede ocurrir la presentación de un antígeno citosólico (proteína de matriz de influenza A) por moléculas clase II, ya que puede ser presentada eficientemente por una vía insensible a BFA (inhibidor del transporte de RE a Golgi)¹¹⁷ y sensible a

cloroquina, lo que sugiere una vía de presentación directa de RE a lisosomas o a compartimientos ácidos. Por otro lado, estos autores identifican una segunda vía, sensible a BFA e insensible a cloroquina lo que sugiere la participación de un compartimiento pre-Golgi en la unión del péptido.¹¹⁸

Además, la cadena Ii previene la presentación de péptidos citosólicos por moléculas clase II.¹¹⁹ En estudios utilizando un péptido citosólico corto que requiere de transportadores para su presentación por moléculas clase II, la utilización de fibroblastos sin Ii como CPA, permite la presentación eficiente de este péptido. En contraste, células con un exceso de Ii son incapaces de presentar este mismo antígeno.¹²⁰ Estos últimos estudios sugieren la posibilidad de péptidos derivados de antígenos citosólicos en RE .

Finalmente, debemos mencionar los trabajos que demuestran que al realizar proteínas de fusión de ovalbumina y lisozima con la cadena invariante, aumenta la eficiencia de presentación por moléculas clase II. las proteínas que se presentan con mayor eficiencia son las que se fusionan con cadena Ii que contiene la señal de tráfico a la vía endocítica.¹²¹ Estos trabajos sugieren que el procesamiento de este tipo de antígenos se lleva a cabo en compartimientos de la vía endocítica, siendo entonces, el sitio más probable de procesamiento de la mayoría de los antígenos endógenos.

Con base en lo anterior se puede observar que para ninguno de los tipos antígenos descritos anteriormente existe una regla que determine cual es la vía de procesamiento que utilizan para ser presentados por moléculas clase II del MHC. Algunos trabajos sugieren la posibilidad de que el RE pueda ser un sitio de procesamiento y unión de péptidos a moléculas clase II, mientras que

otros demuestran que la generación y unión de péptidos sólo puede efectuarse en compartimientos de la vía endocítica independientemente de la fuente de antígeno.

Estudios de Presentación de Formas endógenas de lisozima de gallina (LG).

El modelo de presentación de antígeno, utilizando formas endógenas de lisozima de gallina, ha sido utilizado para responder una serie de preguntas relacionadas con las vías de procesamiento de antígenos endógenos.^{116,122-126} En estudios realizados por otros grupos utilizando células B como presentadoras de antígeno se demostró que una forma soluble de LG, liberada al medio, sintetizada de manera endógena se comporta igual que una exógena. Sin embargo una CPA que codifica una forma de LG con secuencia de retención en RE fue incapaz de presentar el epitopo 112-124. Además el uso de inhibidores de proteasas impide la generación de algunos epitopos pero no de otros.¹²³ Esto sugiere distintos sitios de procesamiento para formas endógenas de un antígeno.

En otros trabajos utilizando LG con secuencia de retención KDEL (LK-KDEL) se demuestra inhibición de presentación de los epitopos evaluados por cloroquina,¹¹⁶ sugiriendo participación de compartimientos ácidos en el procesamiento. Los trabajos de Salamero y colaboradores también demuestran la necesidad de agentes lisosomotrópicos para la presentación de una forma de LG retenida en RE y la necesidad de la cadena II.¹²⁴

En estudios realizados por nuestro grupo, utilizando CPA que expresan una forma transmembranal de lisozima de gallina que codifica para los aminoácidos 1-80 (LK-LG-TM), se demuestra que el

epitopo 25-43 no puede ser generado a partir de formas exógenas pero sí de formas endógenas de la proteína, cuando se utilizan fibroblastos como CPA, sugiriendo distintos sitios de generación para péptidos endógenos.¹²⁵

Por último, utilizando diferentes CPA que expresan formas de LG sintetizadas de manera endógena, LK-LG-TM, LK-LG-KDEL, y una forma de secreción LK-LG, se demostró que, dependiendo de la localización del antígeno, la eficiencia de activación de hibridomas que reconocen el mismo epítipo puede variar. Además se demostró para ciertos epítopos inhibición por cloroquina y otros pudieron presentarse en presencia de este inhibidor. La presentación en todos los casos fue sensible a BFA y la utilización de monensina no demostró inhibición para ciertos determinantes.¹²⁶

Estos datos sugieren tres alternativas para explicar las diferencias observadas en la presentación de diferentes formas de antígenos endógenos y las diferencias observadas cuando se comparan con formas exógenas de la misma proteína. 1.- Que péptidos endógenos de la vía exocítica se generen en compartimientos tempranos de esta y se unan a las moléculas clase II ahí. 2.- Que los péptidos se generen en la vía exocítica y se transporten a la vía endocítica para unirse a las moléculas clase II. 3.- Que tanto la generación como la unión de péptidos se lleve a cabo en compartimientos de la vía endocítica. Este trabajo de tesis pretende plantear un modelo experimental que permita discriminar entre estas posibilidades

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

¿En donde son procesadas diferentes formas endógenas de una misma proteína para la generación de péptidos presentados por moléculas clase II?

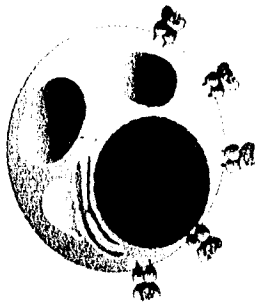
HIPOTESIS

- 1.- Los antígenos endógenos pueden procesarse a péptidos en compartimientos de la vía exocítica.
- 2.- Antígenos procesados en compartimientos tempranos pueden unirse a moléculas clase II antes de que estas lleguen a la vía endocítica.
- 3.- La localización de un antígeno determina que péptidos se presentan por moléculas clase II.

OBJETIVOS.

Este trabajo forma parte de un proyecto de investigación que pretende determinar las vías de procesamiento de antígenos endógenos por moléculas clase II mediante:

- 1.- Determinar si existe generación de péptidos derivados de formas endógenas de una proteína en compartimientos tempranos de la vía endocítica.
- 2.- Determinar si existe unión de péptidos en compartimientos tempranos en CPA con diferentes formas endógenas de una proteína.
- 3.- Determinar si el patrón de distribución de un antígeno determina que los péptidos presentados por moléculas clase II sean diferentes.



LK-35.2



LK-LG-KDEL



LK-LG-TM



LK-LG

Figura 3. Representación esquemática de la localización intracelular de las distintas formas de lisozima en las CPA utilizadas en estos estudios.

MODELO EXPERIMENTAL.

El antígeno utilizado como modelo fue la lisozima de gallina, que es una proteína con gran capacidad inmunogénica en ratones H-2^k. Como CPA se utilizó el hibridoma B LK35.2 (H-2^{k/d}).¹²⁷ A partir de esta célula se utilizaron diferentes transfectantes con el objeto de contar con diferentes formas, sintetizadas de manera endógena, de una misma proteína (figura 4). LK-LG-TM que expresa una forma transmembranal y truncada de LG, LK-LG.KDEL que expresa una forma de LG con una señal de retención en RE y LK-LG que expresa una forma de secreción de LG.

Con este modelo experimental se realizaron experimentos que permitieron seguir a la proteína dentro de la célula. Para esto se efectuaron experimentos de pulso y seguimiento para determinar la vida media de las diferentes formas de LG, también se realizaron experimentos para seguir a las moléculas clase II en las diferentes transfectantes y determinar el tiempo de aparición de formas compactas de moléculas clase II. Por último se realizaron experimentos de elución de péptidos para determinar la posible unión de péptidos en compartimientos tempranos de la vía exocítica y para evaluar el patrón de péptidos asociados a moléculas clase II derivados de las diferentes formas de LG.

MATERIALES Y METODOS

Reactivos y anticuerpos. La LG utilizada fue de Sigma Chemical Company, el medio de cultivo fue RPMI-1640 (GIBCO) suplementado con HEPES 25 mM, Glutamina 2 mM, piruvato de sodio, penicilina, estreptomycin y suero fetal bovino (Hy-Clone) al 5% (medio completo). Los inhibidores de proteasas utilizados fueron leupeptina, E-64, aprotinina, PMSF, pepstatina A y 1,10-fenantrolina, todos obtenidos de Sigma. Se utilizó además brefeldina A (obsequio de Luciano Adorini, Roche Milano, Italia). La enzima endoglucosidasa H se obtuvo de USB, la tripsina de Sigma, sepharosa 4B-Proteína G, y Sepharosa 4B-Proteína A de Sigma. Los anticuerpos monoclonales (mAb) H116-32 (IgG2b anti-H-2A α^k ,¹²⁸) y K22-203 (IgG2a anti-H-2A β^k ,¹²⁹), fueron obtenidos de los hibridomas del mismo nombre (obsequio del Dr. Günter Hämmerling, DKFZ). El anticuerpo monoclonal 2XF8 (IgG1 anti lisozima de gallina) se obtuvo en nuestro laboratorio. Estos mAb se utilizaron ya fuera como líquido de ascitis, sobrenadante de cultivo celular o purificados en una columna de proteína A de *Staphylococcus aureus* unida a Sepharosa 4B. (para el caso de los dos primeros).

Líneas celulares. Como CPA se utilizó el hibridoma murino LK-35.2 (H-2 k^d),¹²⁷ Se utilizaron además células LK35.2 transfectadas con diferentes formas de LG. La línea LK-LG-TM que fue transfectada con el plásmido pJAM2 β -neo que contiene los dos primeros exones de LG (1-80) unidos a los exones que codifican el segmento transmembranal (TM) y al intracitoplásmico del gen clase I H-2K b .¹²⁵ La línea LK-LG que esta transfectada con un plásmido que contiene el DNA complementario (cDNA) de LG soluble (secretoria) y la línea LK-LG-KDEL que esta transfectada con un plasmido que contiene el

cDNA de LG que en su extremo 5' (carboxilo terminal) tiene los nucleótidos que codifican para el tetrapéptido KDEL (lys-asp-glu-leu) que aporta una señal de retención en RE las célula.¹¹⁵ Estas células fueron donadas por Frank Momburg (DKFZ, Heidelberg). Todas las líneas se mantuvieron en cultivo a 37 C en atmósfera de 5% CO₂ y 90% de humedad en medio completo, en botellas de cultivo de 200 cm² (Nunc).

Inmunoprecipitación. Se utilizó el método descrito por Laemli¹³¹ con algunas modificaciones. Las células LK-35.2 fueron cultivadas en diversas condiciones (ver sección de resultados), después de lo cual se lavaron y se incubaron en RPMI-1640 sin metionina ni cisteína durante 10 a 20 min, en presencia de 200 μ Ci de metionina y cisteína marcadas con ³⁵S. Al final de dicha incubación las células se lavaron extensamente y se lisaron en una solución lítica a base de Nonidet P40 (NP40) 1%, con tris 0.05 M pH 7.5, EDTA, NaCl 0.15 M y un cocktail de inhibidores de proteasas (leupeptina 25 μ g/ml, E-64 10 μ M , aprotinina 2 μ g/ml, PMSF 10mM, pepstatina A 0.1ng/ml y 1,10-fenantrolina 10mM). Para los experimentos de pulso y seguimiento, antes de lisar, se lavaron las CPA y se añadieron metionina y cisteína frías (un exceso de 10 veces lo normal) y se cultivaron así durante períodos variables hasta que se lavaron y se lisaron como se describió arriba. Los lisados se centrifugaron en una microcentrífuga a 13,000 rpm, se desechó el botón de núcleos y se colectó el sobrenadante. Estos sobrenadantes fueron preadsorbidos en forma extensa con *Staphylococcus aureus*, cepa I de Cowan formalinizado (SAC), inicialmente en ausencia y después en presencia de un anticuerpo monoclonal irrelevante pero con el mismo isotipo de los anticuerpos anti LG o anti-clase II. A continuación, se añadieron los anticuerpos anti LG (2XF8) o anti-H-2A relevantes (H116.32 y K22-203), dependiendo del experimento, en

forma de sobrenadante de cultivo o purificados. Después de 12 horas de incubación a 4°C, a los sobrenadantes se agregó una cantidad óptima de suspensión de SAC, Sepharosa 4B-proteína A o Sepharosa 4B-proteína G dependiendo del experimento y se incubaron a 4°C en agitación constante durante otras 12 horas, después de lo cual se lavaron 5 veces con buffer de lavado (buffer de lisis sin inhibidores de proteasas y NP40 al 0.1%) y una vez más con buffer de tris 0.01 M, pH 7.4). A estas muestras se les agregó buffer de Laemli y, dependiendo del experimento, se calentaron 1 min a 95°C ó no. En algunos casos las muestras fueron tratadas con la enzima endoglucosidasa H, durante 12 horas, después de lo cual se corrieron en geles de poliacrilamida descritos abajo.

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

Elución ácida de péptidos unidos a moléculas clase II. Para estos experimentos, se cultivaron 5×10^7 CPA a una densidad máxima de 5×10^6 /ml en botellas de cultivo en medio RPMI carentes de 15 aminoácidos (ala, arg, asp, glu, gly, his, ile, leu, lys, phe, pro, ser, thr, tyr, val), los cuales fueron sustituidos por 5 mCi de los mismos 15

aminoácidos marcados con ^3H . Estos experimentos se llevaron a cabo en ausencia o en presencia de 10 $\mu\text{g/ml}$ de brefeldina A. Después de 10 horas en cultivo, las células se lisaron con buffer de lisis con NP-40 y se trataron de manera similar a las células de los estudios de inmunoprecipitación hasta la adsorción a proteína A-Sepharosa 4B. El gel con las moléculas clase II unidas fue lavado exhaustivamente con buffer de lavado y después con 0.01 M tris pH 7.4. A continuación, se añadió una solución de ácido acético al 10% y las muestras se calentaron a 95°C y se centrifugaron a 3000 g durante 20 min en tubos centrífuga con una membrana con "cut-off" de 10 kDa. Las muestras fueron eluidas dos veces más con ácido acético al 10% y el material menor a 10 kDa se recuperó debajo de la membrana y se analizó por HPLC. Se cuantificaron tanto los materiales mayor y menor de 10 kDa y el primero se trató con la enzima endoglucosidasa H y se analizó mediante geles de SDS-PAGE al 12%.

Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Esta se realizó en un cromatógrafo Waters con una bomba Waters 626 con líneas no metálicas (de peek) y un controlador Waters 600S. Se utilizó una columna de fase reversa Waters Delta-Pak HPLC C_{18} , con poro de 300 Å, de 2.0 x 150 mm. El gradiente utilizado fue continuo de 0% a 60% de solución B en 60 min en donde la solución A fue agua con 0.1% ácido trifluoroacético y la solución B acetonitrilo al 100 %. El líquido se pasó por un detector de arreglo de fotodiodos Waters 996 y se detectó la absorbancia a 220 nm cada 2 seg. Se colectaron fracciones manualmente, cambiando los tubos cada dos minutos. El material colectado fue analizado en un contador de centelleo.

Obtención de un tripsinizado de I.G. Como control, antes de correr las muestras relevantes se corrió un tripsinizado de lisozima, el cual se

generó de la siguiente manera: inicialmente se redujeron 100 mg de LG, en 2 ml de urea 8M (Bio-Rad), con 2-ME 0.2 M durante 12 horas, después de lo cual se añadió iodacetamida 0.25 M durante 2 horas. Esta muestra fue dializada exhaustivamente contra agua y después contra carbonato de amonio pH 8, al final de lo cual se digirió con tripsina pancreática bovina (Sigma) 1% (concentración final) durante 12 horas a temperatura ambiente. Después de la digestión, la muestra se centrifugó en tubos centrífugos (cutoff 10 kDa) y se colectó el material menor a 10 kDa.

Precipitación de proteínas con TCA. Para medir la cantidad de material radiactivo incorporado en los lisados obtenidos, se tomaron alícuotas de 5 μ l del lisado, al cual se añadieron 5 μ l de una solución de albúmina sérica bovina al 10%. Esta mezcla se depositó en un filtro al que se añadió ácido tricloroacético (TCA) frío al 10%, se incubó durante 30 min a 4°C, después de lo cual se lavó extensamente con TCA a temperatura ambiente y finalmente con etanol al 95%. Los filtros se pusieron en viales con líquido de centelleo y se leyeron en un contador de radioactividad β .

RESULTADOS:

Expresión de las diferentes formas endógenas de lisozima en las células LK35.2. En este experimento se determinó la expresión de la proteína transfectada en las distintas CPA. Para esto, se cultivaron 10^7 células que se marcaron metabólicamente con metionina y cisteína con ^{35}S . Se inmunoprecipitaron cantidades iguales de radioactividad de lisados obtenidos después de marcaje metabólico con el anticuerpo 2XF8 (anti-LG). Los diferentes precipitados se resuspendieron en buffer de Laemli y se corrieron en geles de poliacrilamida al 15%. En la figura 4 se puede observar que la expresión de LG es similar en magnitud en las células LK-LG (carril 2) y LK-LG-KDEL (carril 4), en donde hay una banda bien definida de aproximadamente 14 kDa. Este resultado indica que las diferencias observadas en los experimentos de presentación de antígeno utilizando estas CPA,¹²⁰ no son debidas a diferencias en la concentración del antígeno. Sin embargo, la banda en las células LK-LG-TM, aunque se encuentra alrededor de 14 kDa, tiene una menor definición (carril 3). Como control negativo se utilizó la célula LK35.2 sin transfectar (carril 5). Este resultado sugiere que la proteína TM-LG-1-80 es degradada en forma temprana. Esto, además, sugiere que la vida media de esta proteína es muy corta, posiblemente por no adquirir una conformación adecuada como consecuencia de la falta de los aminoácidos 81-129 y podría llevar a pensar que, como ocurre con otras proteínas, esta proteína se degrada en compartimientos tempranos después de su biosíntesis.

La vida media de las formas endógenas de LG sugiere la posibilidad de procesamiento en compartimientos tempranos. Para determinar la vida media de la proteína TM-LG-1-80 se realizaron experimentos de pulso y seguimiento. Se marcaron 10^7 células de las distintas CPA

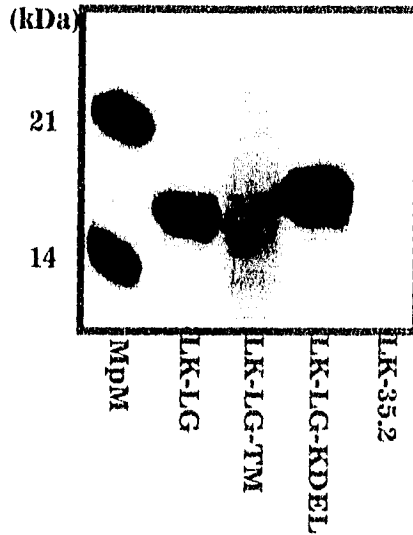


Figura 4. Expresión de diferentes formas de lisozima endógena. Se cultivaron 10^7 células transfectadas con las distintas formas de lisozima endógena en presencia de $250 \mu\text{Ci}$ de ^{35}S -metionina y $250 \mu\text{Ci}$ de ^{35}S -cisteína durante 15 minutos, después de lo cual se lisaron y el sobrenadante se inmunoprecipitó con el anticuerpo anti-LG 2XF8, seguido de adsorción a proteína G-sepharosa 4B. Se cargaron geles de poliacrilamida al 15% con la misma cantidad de marca radiactiva en cada carril y se expusieron a película de rayos X para la autorradiografía (ver texto).

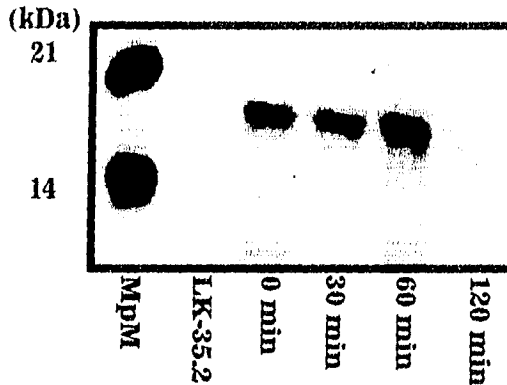


Figura 5. Vida media de LG-KDEL en células LK-35.2. Se cultivaron 10^7 células transfectadas con LG-KDEL en presencia de $250 \mu\text{Ci}$ de ^{35}S -metionina y $250 \mu\text{Ci}$ de ^{35}S -cisteína durante 15 minutos, después de lo cual se añadió un exceso (10x) de cisteína y metionina frías y se siguieron por los tiempos mencionados, se lisaron y el sobrenadante se inmunoprecipitó con el anticuerpo anti-LG 2XF8, seguido de adsorción a proteína G-sepharosa 4B. Se cargaron geles de poliacrilamida al 15% con la misma cantidad de marca radiactiva en cada carril y se expusieron a película de rayos X para la autorradiografía (ver texto).

durante 15 minutos, después de lo cual se lavaron y se cultivaron sin marca y con un exceso (10 veces) de a.a. fríos por los tiempos indicados.

Utilizando cantidades iguales de marca radioactiva de lisados obtenidos de la célula LK-LG-TM, marcada metabólicamente durante 15 minutos, la proteína sólo pudo detectarse al tiempo 0 de caza y no fue posible observarla a tiempos mayores de seguimiento. lo que demuestra que la vida media de esta proteína es muy corta (resultados no mostrados). En contraste, los resultados con la LG, precipitada de iguales cantidades de radioactividad de lisados provenientes de la línea LK-LG-KDEL, demuestran que esta proteína tiene una vida media de 120 minutos después de los cuales comienza a degradarse (figura 5). Como esta proteína tiene una secuencia señal de retención en RE es posible que la degradación ocurra en este compartimiento. Estos resultados sugieren la posibilidad que la degradación de estas proteínas sintetizadas de manera endógena ocurra en compartimientos exocíticos tempranos.

Los péptidos derivados de formas endógenas de LG no generan dímeros clase II estables en forma temprana. Basándose en la posibilidad que los péptidos derivados de estas proteínas se generan en compartimientos tempranos de la vía exocítica y en evidencias experimentales que demuestran que péptidos derivados de LG pueden inducir la formación de dímeros clase II compactos,¹³² los siguientes experimentos se realizaron para determinar si los péptidos derivados de las formas endógenas de LG se generan y se unen a moléculas clase II en compartimientos tempranos de la vía exocítica.

En diversos estudios se ha demostrado que en ausencia de un péptido unido a ellos, los dímeros clase II son fácilmente dissociables en

presencia del detergente iónico SDS al 4%.^{101,102} En cambio, cuando tienen un péptido unido, los dímeros clase II son resistentes a los efectos del detergente y sólo se disocian al añadir calor (a 95°C). Los dímeros clase II llegan a la vía endocítica aproximadamente a los 30 min de su biosíntesis.¹⁴³ Los péptidos presentes en la vía endocítica estabilizan el dímero, haciéndolo resistente al detergente, mientras que antes de 30 min, los dímeros son inestables. Por lo tanto, era posible que los sí péptidos de LG endógena eran generados antes de llegar a la vía endocítica, pudieran estabilizar dímeros clase II antes de los 30 min.

Los resultados de la figura 6 representan un experimento en que las células LK-35.2 (arriba), LK-LG-KDEL (parte media) y LK-LG-TM (parte baja) fueron pulsadas durante 15 min con metionina y cisteína marcadas con ³²S y después seguidas durante dos horas más, ya sin la marca radiactiva y con un exceso (10 veces) de a.a. no marcados. Como puede verse, antes de 30 min (durante el paso de las moléculas clase II por el RE y el Golgi) no se observan dímeros clase II estables (resistentes al SDS). Las dos bandas observadas corresponden a las cadenas α y β que se disocian al contacto con el detergente, con o sin calor. Después de los 30 min, empieza a observarse una banda de aproximadamente 60 kDa, correspondiente al dímero compacto, que no se disocia con el SDS, pero que desaparece con el calor. Como puede verse, no hay diferencias en el tiempo de aparición de las formas compactas entre las células LK-35.2 sin LG endógena y aquellas transfectadas con las distintas formas de LG. Estos resultados sugieren que no hay péptidos capaces de estabilizar a las moléculas clase II antes de llegar a un compartimiento endocítico. Sin embargo, no se puede descartar que la técnica utilizada no tenga la sensibilidad suficiente para detectar la presencia de un número

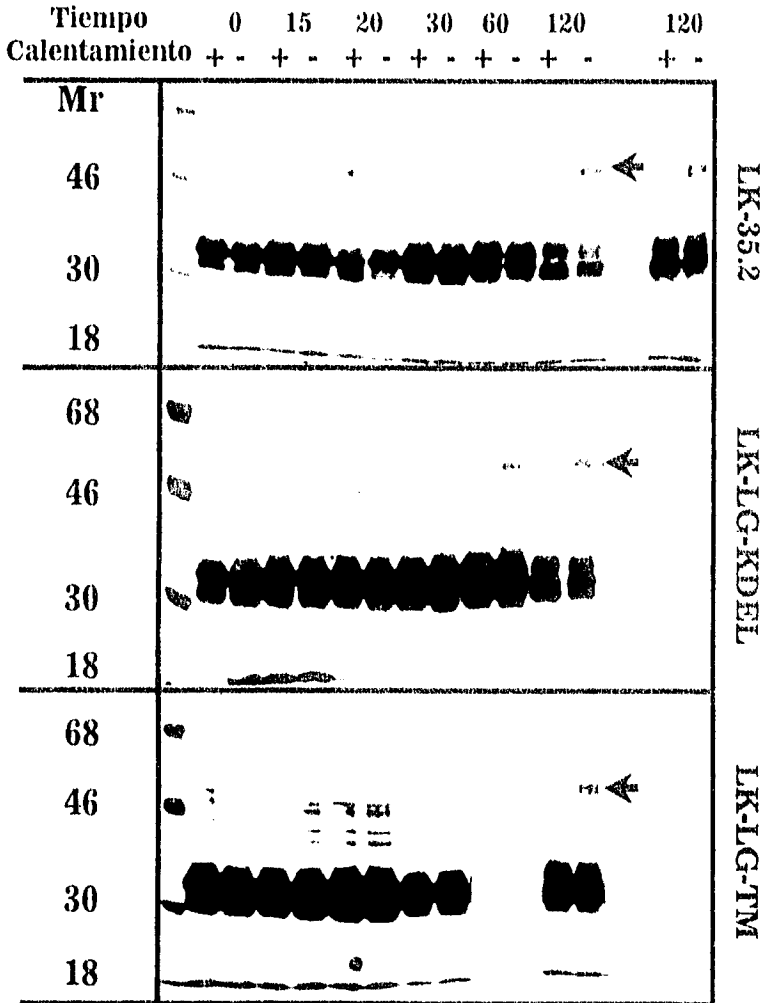


Figura 6. Los péptidos de LG endógena no generan dímeros clase II estables antes de llegar a la vía endocítica. Autorradiografía de un experimento de pulso y seguimiento de las moléculas clase II H-2A^k por inmunoprecipitación con anticuerpos monoclonales H116-32 (anti-H-2A^k) y K22-203 (H-2A^k) en células LK-35.2 (arriba) o en las transfectantes con forma retenida en el RE (en medio) o transmembranal (abajo). En la parte superior se indica el tiempo de seguimiento en minutos y se se sometió a calentamiento a 95°C (+) ó no (-). Carril 1, marcadores de peso molecular marcados con ¹⁴C, que son: albúmina bovina (Mr 68 kDa), ovoalbúmina (Mr 46 kDa), anhidrasa carbónica (Mr 30 kDa) y lactoglobulina A (Mr 18 kDa). Los demás carriles son inmunoprecipitados de moléculas clase II obtenidos de células incubadas por diferentes tiempos en ausencia de LG exógena. En la extrema derecha, parte superior se muestran células LK-35.2 cultivadas en presencia de 2 mg/ml de LG exógena. Las flechas muestran las bandas correspondientes a las moléculas clase II estables (resistentes al SDS).

reducido de dímeros estables formados en presencia de péptidos de LG en el RE o en el aparato de Golgi.

En la parte superior de la figura 6 puede observarse, además, que no hay un aumento significativo de la banda que corresponde a moléculas clase II compactas al añadir un exceso (2 mg) de LG exógena a las células LK35.2 sin transfectar, lo que puede indicar que, al menos en nuestras manos, altas concentraciones de un antígeno exógeno no aumentan significativamente la presencia de moléculas clase II compactas aun en la vía exocítica. Estos resultados indican que una gran cantidad de péptidos endógenos propios de la célula están unidos a moléculas clase II, que son suficientes para estabilizarlas y que el sitio de unión de estos péptidos es la vía endocítica.

La localización intracelular de una proteína endógena es crítica para definir el patrón de péptidos resultantes del procesamiento antigénico. Los resultados hasta ahora mostrados sugieren que, aunque los péptidos derivados de LG endógena pudieran generarse en compartimientos tempranos de la vía exocítica, estos no pueden promover la aparición de moléculas clase II compactas antes de llegar a la vía endocítica, sugiriendo que el RE o el cis golgi no son sitios apropiados para la unión de péptidos a moléculas clase II o que si se llegan a unir, no estabilizan el dímero clase II. Sin embargo, para poder demostrar lo anterior de manera concluyente, era necesario realizar un análisis de los péptidos asociados a moléculas clase II en las diferentes CPA. Además, la evaluación de los péptidos asociados a las moléculas clase II en CPA que solamente difieren en la forma de expresión de la misma proteína nos permitiría determinar la existencia de diferencias en los sitios de procesamiento.

Los siguientes experimentos se diseñaron para determinar si la localización de una proteína puede dirigir el patrón de péptidos presentados por las moléculas clase II. Las distintas CPA se incubaron con una mezcla de 15 aminoácidos marcados con tritio durante 10 horas, después de lo cual se lisaron y se purificaron las moléculas clase II en una columna de afinidad de un anticuerpo monoclonal anti-H-2A α ^k unido a proteína A-sepharosa. Una vez purificadas, las moléculas clase II se lavaron extensamente y se trataron con ácido acético al 10% para eluir los péptidos unidos a ellas. El material menor de 10 kDa se separó en tubos centrífugo y se sometió a análisis por HPLC de fase reversa. Para determinar las características de los péptidos obtenidos, se compararon con el perfil obtenido con los péptidos derivados de un tripsinizado de LG (figura 7), los cuales son, en su gran mayoría hidrofílicos. La figura 7 muestra, además, los perfiles sobrepuestos obtenidos de los péptidos derivados de LK-LG-TM con los péptidos obtenidos de LG tripsinizada. Los péptidos endógenos obtenidos de la célula LK.35.2 son más hidrofóbicos que los péptidos del tripsinizado de LG (figura 8, parte superior).

En la figura 8 podemos observar los perfiles derivados de células LK-35.2 sin LG endógena (arriba) y las CPA portadoras de las distintas formas de LG endógena: LK-LG-KDEL (parte media) y LK-LG-TM (abajo). Como puede verse, aunque algunos de los picos observados son similares en las tres líneas celulares, otros picos son exclusivos de las células portadoras de LG endógena y coinciden con el punto de elución de algunos de los péptidos obtenidos en el tripsinizado de LG (figura 7). A diferencia de los demás picos que tienden a ser más hidrofóbicos y que tienen los mismos tiempos de retención que los péptidos obtenidos de células LK-35.2 sin LG endógena. Además, las distintas formas de LG endógena dan lugar a péptidos únicos, lo que

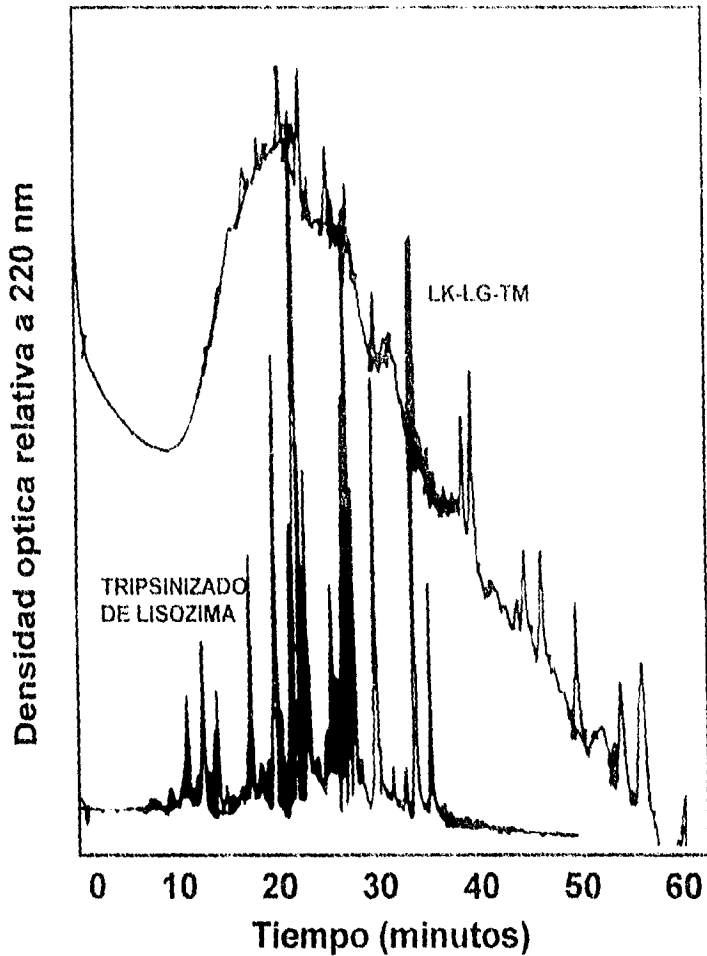


Figura 7. Péptidos de LG endógena eluidos de moléculas clase II H-2A^K, sobrepuestos con tripsinizado de lisozima. Se cultivaron 5×10^7 células LK-LG-TM con 5 mCi de una mezcla de 15 aminoácidos marcados con ³H durante 10 horas, después de lo cual se lisaron las células y las moléculas clase II fueron inmunoprecipitadas con anticuerpos monoclonales H116-32 (anti-H-2Aa^k) y K22-203 (anti-H-2Ab^k), seguidos de proteína-A sepharosa 4B. Después de lavados extensos, las moléculas clase II fueron sometidas a elución ácida (10% ácido acético) y se separó el material menor que 10kDa en membranas centricón. Este material fue pasado por HPLC en fase reversa en una columna C18 con un gradiente de 0 a 60 acetonitrilo/agua TFA 0.1%. El tripsinizado de LG se obtuvo con una preparación comercial de tripsina, digiriendo durante 12 horas. Las condiciones de elución fueron las mismas que para el lisado de células.

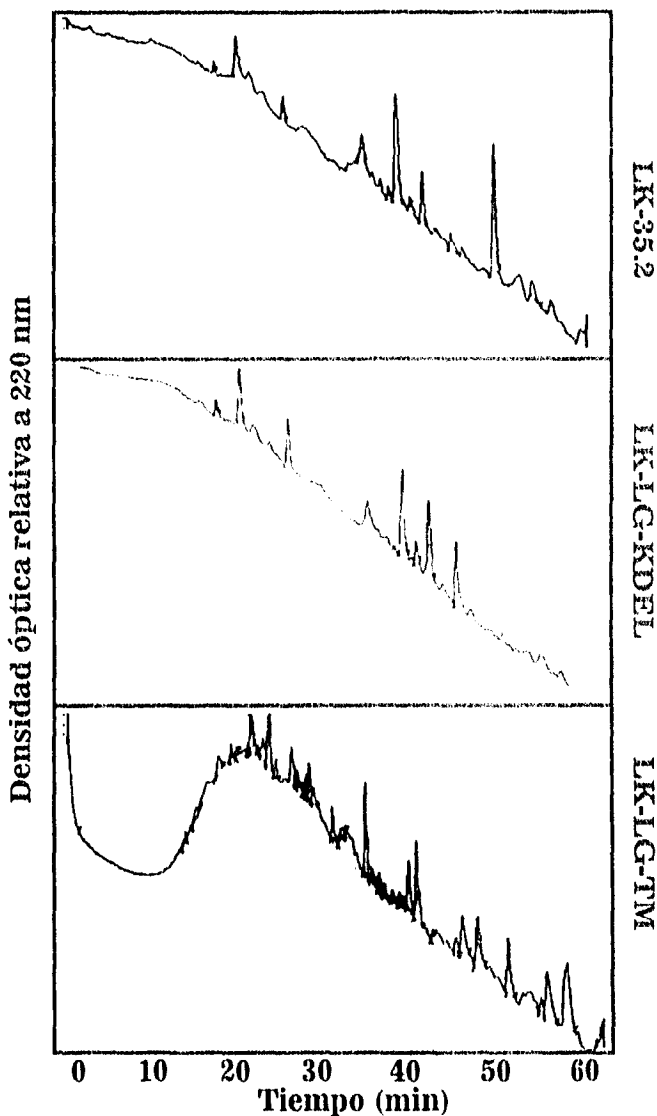


Figura 9. Péptidos de LG endógena eluidos de moléculas clase II H-2A^k en CPA portadoras o no de distintas formas de LG endógena. Se cultivaron 5×10^7 células LK-LG-KDEL con 5 mCi de una mezcla de 15 aminoácidos marcados con ³H, después de lo cual se llaron las células y las moléculas clase II fueron inmunoprecipitadas con los anticuerpos monoclonales H116-32 (anti-H-2A^k) y K22-203 (H-2A^k), seguidos de proteína-A sepharosa 4B. Después de lavados extensos, las moléculas clase II fueron sometidas a elución ácida (10% ácido acético) y se separó el material < 10 kDa en membranas centrífuga. Este material fue pasado por HPLC en fase reversa en una columna C18 con un gradiente de 0 a 60 acetonitrilo/agua, TFA 0.1%.

sugiere que las distintas localizaciones de LG endógena resultan en diferencias en procesamiento. Estos resultados confirman que las distintas formas de LG endógena dan lugar a péptidos diferentes lo que puede sugerir que se pueden generar en distintos sitios de la célula.

Al medir la radiactividad, ésta coincidió con los picos observados (figura 11) y en uno de los casos se realizaron experimentos de presentación con las fracciones del cromatograma, obteniéndose activación del hibridoma A6B3, específico contra el péptido 23-43 de LG (No mostrado).

La unión de péptidos derivados de un antígeno endógeno sólo ocurre en compartimientos endocíticos. Para descartar la posibilidad de que algunos péptidos generados en RE pudieran unirse a moléculas clase II en ese mismo sitio, en la segunda parte del experimento, durante el pulso con aminoácidos radiactivos, las CPA fueron cultivadas en presencia o en ausencia de brefeldina A. Debido a que esta droga impide la salida del contenido del RE al cis-Golgi¹³⁴, el objetivo era maximizar la exposición de las moléculas clase II a los posibles péptidos presentes en el RE y así aumentar la posibilidad de que algún péptido allí presente pudieran unirse a las moléculas clase II en competencia con la cadena Ii. Durante el pulso con los aminoácidos marcados, se observaron picos similares, como puede observarse en la figura 9. Sin embargo, al medir la radiactividad, se encontró que, a diferencia de los péptidos eluidos de las células cultivadas sin brefeldina A, éstos no contenían marca

Para corroborar que las moléculas clase II de las células tratadas con brefeldina A provenían realmente del RE, el material mayor a 10 kDa fué tratado con la enzima endoglucosidasa H y posteriormente

analizado en geles de poliacrilamida-SDS. En la figura 10 se pueden observar dos bandas correspondientes a las moléculas clase II. En las células tratadas con BFA se observa una disminución del peso molecular, lo que indica la sensibilidad a la enzima y, por lo tanto, demuestra que dichas moléculas clase II no habían dejado el RE.

A pesar de que los perfiles de péptidos obtenidos de las células tratadas con o sin brefeldina A fueron parecidos, en la figura 9 se ve claramente una diferencia en la radiactividad de ambos grupos de péptidos. Para examinar ésto en más detalle, se graficó la radiactividad de los picos obtenidos de las células tratadas con brefeldina A y se comparó con el de las células cultivadas sin esta droga. La figura 11 demuestra que los perfiles de péptidos obtenidos de las CPA tratadas con brefeldina A son planos durante toda la elución, distinto del perfil de radiactividad de los picos obtenidos de las células cultivadas sin brefeldina. Esto indica que los picos observados, se encontraban unidos a las moléculas clase II antes de agregar la brefeldina A y que no hubo unión de péptidos a las moléculas clase II mientras eran retenidas en el RE por esta droga.

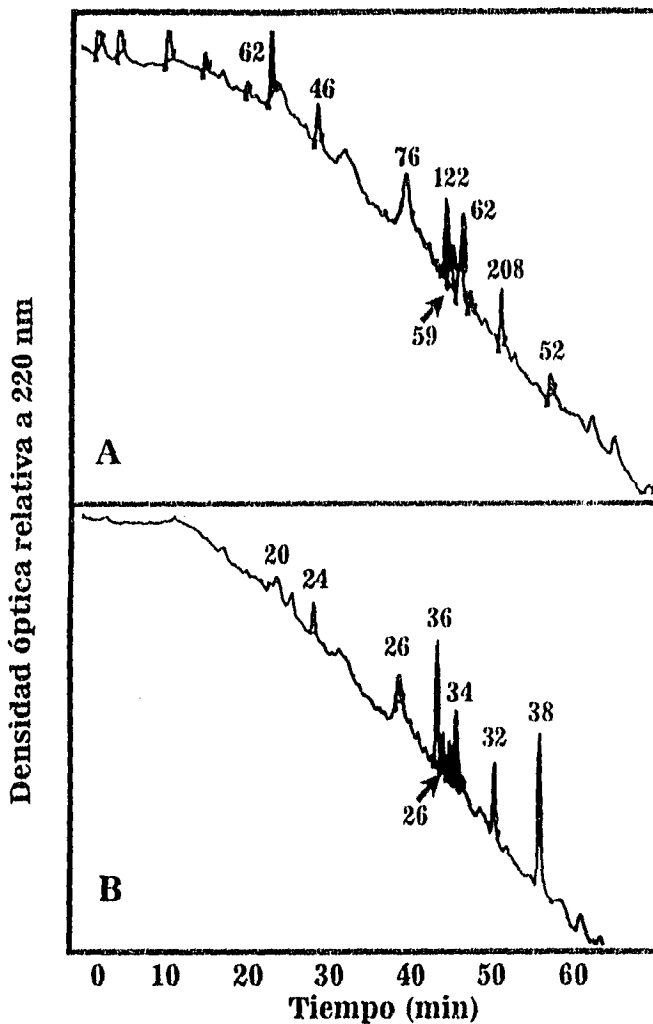


Figura 9. Péptidos de Ig endógena eluidos de moléculas clase II H-2A^k obtenidas de células cultivadas en presencia o ausencia de brefeldina-A. Se cultivaron 5×10^7 células LK-LG-KDEL con 5 mCi de una mezcla de 15 aminoácidos marcados con ^3H , en ausencia (A) o en presencia (B) de brefeldina A ($10 \mu\text{g/ml}$) durante 10 horas, después de lo cual se lisan las células y las moléculas clase II fueron inmunoprecipitadas con los anticuerpos monoclonales H116-32 (anti-H-2A^k) y K22-203 (H-2A^k), seguidos de proteína-A sepharosa 4B. Después de lavados extensos, las moléculas clase II fueron sometidas a elución ácida (10% ácido acético) y se separó el material $< 10 \text{ kDa}$ en membranas centrífugas. Este material fue pasado por HPLC en fase reversa en una columna C18 con un gradiente de 0 a 60 acetonitrilo/agua, TFA 0.1%. Las fracciones se colectaron cada 2 min y se analizaron en un contador de centelleo

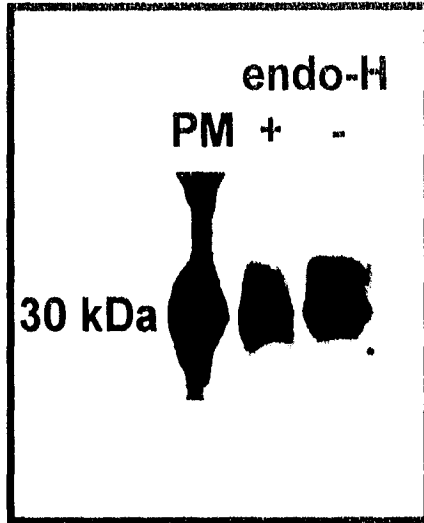


Figura 10. Moléculas clase II H-2A^α de células cultivadas en presencia o ausencia de brefeldina-A de las cuales se eluyeron los péptidos de LG endógena. Se cultivaron 5×10^7 células LK-LG-KDEL con 5 mCi de una mezcla de 15 aminoácidos marcados con ³H, en presencia de brefeldina A (10 μg/ml) durante 10 horas, después de lo cual se lisaron las células y las moléculas clase II fueron inmunoprecipitadas con anticuerpos monoclonales H116-32 (anti-H-2A^α) y K22-203 (H-2A^β), seguidos de proteína-A sepharosa 4B. Después de lavados extensos, las moléculas clase II fueron sometidas a elución ácida (10% ácido acético) y se separó el material <10 kDa en membranas centrífuga. El material retenido arriba de la membrana (>10 kDa) se trató con endoglucosidasa H (carril 2) o no, se corrió en un gel de poliacrilamida al 12% y se reveló por autorradiografía.

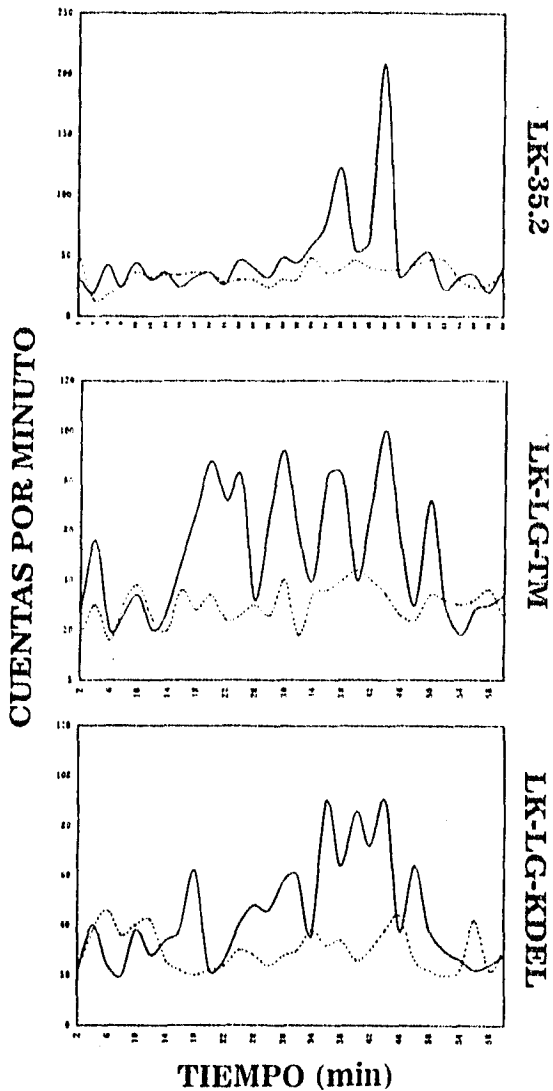


Figura 11. Gráfica comparativa de la radiactividad de los péptidos eluidos de las moléculas clase II H-2A^b de las CPA portadoras o no de distintas formas de IIsosizina endógena. Se cultivaron 5×10^7 células con 5 μ Cl de una mezcla de 15 aminoácidos marcados con ³H como se describió en la figura 9. El material menor de 10 kDa fue pasado por una columna de HPLC fase reversa (C18) con un gradiente de 0 a 60 acetonitrilo en agua con TFA 0.1%. Se colectaron las fracciones cada 2 minutos y se analizaron en un contador de centelleo. Los resultados se expresan en cuentas por minuto. Arriba, células LK-35.2; parte media, células LK-LG-TM y parte inferior, células LK-LG-KDEL.

DISCUSION.

Estos estudios se llevaron a cabo con el fin de determinar si se pueden generar péptidos derivados de una proteína endógena en el RE y, en caso de ser así, si estos péptidos podían unirse a las moléculas clase II en este mismo compartimiento. Se utilizaron CPA que expresan tres formas diferentes de LG sintetizadas de manera endógena. LK-LG-TM que expresa una forma transmembranal y truncada, LK-LG-KDEL que expresa una forma de retenida en RE y LK-LG que expresa una forma secretada al medio. El estudio consistió, primero, en evaluar la vida media de las distintas formas de LG; posteriormente se realizó un seguimiento de las moléculas de histocompatibilidad y, por último, se evaluaron los péptidos unidos a las moléculas clase II en las distintas CPA.

Los principales hallazgos derivados de este trabajo son: 1) La unión de péptidos a las moléculas clase II solamente puede ocurrir en la vía endocítica, independientemente de donde hayan sido generados. 2) Existen diferencias entre los péptidos derivados de dos formas endógenas de una misma proteína, lo que sugiere diferentes sitios de procesamiento 3) Las diferencias entre los requerimientos de procesamiento para antígenos endógenos pueden deberse más que al origen del antígeno, a su localización intracelular.

Diversos estudios han demostrado que el procesamiento de antígenos exógenos, para su presentación por moléculas clase II, es un proceso complejo y con gran variabilidad que depende, tanto de las características de la molécula clase II, como de la proteína antigénica estudiada. Así, no todos los alelos clase II tienen los mismos requerimientos para unir péptidos o para adquirir una estructura estable. Además, parece haber diferencias en los sitios de

procesamiento de distintos antígenos. Un ejemplo de ello es el requerimiento de la expresión de cadena II para el procesamiento eficiente de LG, mientras que para otro antígeno proteico, la ribonucleasa pancreática bovina, la cadena invariante no tiene ninguna influencia.¹³⁵

Para los antígenos endógenos parece tampoco haber una regla general en cuanto a los requerimientos de procesamiento. Así, no todos los antígenos endógenos son presentados con la misma eficiencia,^{120,122} además de que la presentación de algunos no es bloqueada por el uso de inhibidores de la acidificación de la vía endocítica^{123,116}. Un punto importante en este sentido es el requerimiento de la cadena invariante, ya que mientras algunos antígenos necesitan de la presencia de ésta, otros solamente pueden ser presentados cuando la cadena invariante no está presente.^{60,65,124}

Una posible explicación para las diferencias entre el procesamiento de formas endógenas y exógenas de la misma proteína, es la generación y unión de péptidos a moléculas clase II en el RE. Esto implicaría, en primer lugar, la existencia de un sistema de degradación de proteínas en este compartimento, lo que ha sido sugerido por diversos trabajos.⁹⁵⁻⁹⁸ Sin embargo, debemos mencionar que a la fecha, se desconocen los mecanismos de degradación de proteínas en el RE, tanto en el caso de proteínas residentes de este compartimento, como de aquellas que por una mala conformación, no son transportadas a través de la vía exocítica.

Nuestros resultados iniciales sugerían la posibilidad de generación y unión de péptidos a las moléculas clase II en el RE, ya que en el caso de la lisozima transmembranal truncaada, por su conformación anormal debido a la ausencia de los últimos 39 aminoácidos se

degrada inmediatamente después de su biosíntesis, como se muestra en la figura 5. En el caso de la LG-KDEL, aunque su vida media es más larga, también se observó una degradación. El sitio posible para esto es el RE, debido a que la secuencia de retención no le permite salir de ahí y toda proteína necesita un recambio. Debemos considerar, sin embargo, que estos experimentos no excluyen la posibilidad de que ambas formas de LG se transporten del RE a compartimientos de la vía endocítica (u otro sitio) para ahí degradarse, ni tampoco la de una degradación parcial de ellas en el RE para luego ser transportadas a la vía endocítica para su degradación total.

Por otro lado, para poderse unir a las moléculas clase II en el RE, los péptidos ahí generados, deben ser capaces de competir con la cadena invariante durante el ensamblaje de las moléculas clase II. Esta idea se apoya en los trabajos de Ploegh y colaboradores que demuestran que utilizando sistemas de traducción *in vitro* puede haber unión de péptidos en RE compitiendo con la cadena Ii.⁵⁴ Sin embargo, otros trabajos demuestran lo contrario.⁵⁵ En nuestros experimentos no se observó formación de dímeros clase II compactos en tiempos tempranos. Esto indica que el ambiente del RE no permite la formación de moléculas clase II compactas, aún suponiendo que existían péptidos de LG capaces de unirse a moléculas clase II. Estos resultados son la primera evidencia directa de que el RE no es un sitio adecuado para la adquisición de péptidos por moléculas clase II. Aunque parecería importante realizar estos experimentos en ausencia de cadena Ii, los trabajos de Hämmerling y colaboradores⁶⁰ demostraron que aún en células sin cadena Ii la unión de péptidos en compartimientos tempranos es ineficiente. Por lo tanto, dichos estudios no parecen ser indispensables. Lo anterior sugiere que en el RE no existen las condiciones adecuadas para la unión de péptidos a

moléculas clase II del MHC. Así, era necesario realizar experimentos adicionales para descartar en forma concluyente la posibilidad de unión de péptidos a las moléculas clase II en el RE.

Los experimentos de elución de péptidos asociados a moléculas clase II y el uso de BFA para bloquear el transporte y favorecer la acumulación de moléculas clase II en RE, demuestran de manera contundente que no hay unión de péptidos en estos compartimientos, ya que los péptidos eluidos de las moléculas clase II en CPA cultivadas con BFA no tenían marca radioactiva incorporada, lo que indica que estos péptidos provienen de moléculas clase II que habían salido del RE antes de la adición de la brefeldina A. Así, las moléculas clase II marcadas que fueron las que estuvieron retenidas en RE no tenían péptidos unidos. Esto nuevamente nos lleva a concluir que el pH ácido de las vesículas endocíticas es necesario para la unión de péptido a la molécula clase II una vez que el último fragmento de la cadena II - CLIP- ha sido removido.^{83,84,89} El hecho de que en células sin II no se detecte unión de péptidos en RE⁹⁰ indica que incluso los dímeros $\alpha\beta$ sin II en el RE no tienen la conformación adecuada para unir péptidos.

Otra alternativa para explicar lo anterior es que la concentración de péptidos en el RE es insuficiente para su unión a moléculas clase II. Los únicos péptidos que se han demostrado en forma contundente en el RE, son los péptidos señal. En el caso de las moléculas clase I, la unión de péptidos provenientes del citosol es favorecida por la asociación de aquellas a TAP1-TAP2. Lo anterior sugiere que la degradación de las distintas formas de LG no ocurrió en este sitio y, por lo tanto, que, además de una baja capacidad de unión, otro factor para la ausencia de péptidos asociados a las moléculas clase II en compartimientos tempranos es que, además de los mencionados, no

existan otros péptidos en RE. Esto es compatible con los resultados obtenidos en trabajos realizados con células deficientes en transportadores, en las que hay una baja expresión de moléculas clase I en superficie,³⁶ apoyando la conclusión de que el RE es un compartimiento con bajo aporte de péptidos.

Otro hallazgo importante de la elución de los péptidos asociados a las moléculas clase II fue la demostración de que dos formas endógenas de una misma proteína pueden dar distintos patrones peptídicos. Es posible que estas diferencias se deban a su localización intracelular ya que ambas formas de lisozima pudieron degradarse en distintos sitios de la célula y así generar diferentes perfiles de péptidos. Como se mencionó, muchos de los aspectos del transporte y sitios de degradación de proteínas en el RE son desconocidos. Por lo tanto, lo que nuestros resultados indican es, que a pesar de que ambas proteínas entran al RE, su comportamiento subsecuente es diferente. Así los péptidos derivados de la LG-TM podrían generarse en un sitio distinto de donde se generan los péptidos derivados de LG-KDEL, aunque aparentemente, la unión a las moléculas clase II fue, en ambos casos, en algún compartimiento endocítico. En este punto es importante comentar que el hecho de que la LG-TM sea una forma truncada pudo influir en los perfiles de péptidos observados.

De acuerdo a los resultados aquí presentados y tomando en consideración otros estudios realizados por nuestro grupo en los que la presentación de ciertos determinantes derivados de estas mismas proteínas a linfocitos T fue inhibida por BFA y por cloroquina, pero no por monensina, (inhibidor del transporte a nivel de la red de transgolgi)¹²⁶ podemos concluir que la vía de procesamiento que siguen estos antígenos es muy similar a aquella utilizada por los antígenos

exógenos y que lo más importante para marcar diferencias, en proteínas que entran a la vía exocítica, son las señales de transporte en la proteína, para su posterior degradación independientemente de su origen.

El hecho de que una misma proteína con distintas localizaciones intracelulares sea capaz de generar péptidos diferentes, puede tener implicaciones importantes en cuanto a la inducción de tolerancia inmunológica, así como en relación con la génesis de autoinmunidad y enfermedades autoinmunes, ya que péptidos que bajo ciertas circunstancias no se generen pueden evitar la selección de clones autoreactivos y en el momento de estar presentes pueden ser el punto inicial para el desarrollo de un fenómeno autoinmune.

REFERENCIAS

- Davis, M.M., Bjorkman, P.J. (1988). T-Cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature*. 334, 395-402.
- ² Unanue, E. R. (1984). Antigen-presenting function of the macrophage. *Ann.Rev. Immunol.* 2, 395-428.
- ³ Dimet, S., Sthal, P. (1985) Macrophage endosomes contain proteases which degrade endocytosed protein ligands. *J. Biol. Chem.* 260, 15311-15317.
- ⁴ Hershko, A., Ciechanover, A. (1992) The ubiquitin system for protein degradation. *Rev Biochem.* 61, 761-807.
- ⁵ Martinez, C.K., Monaco, J.J. Homology of proteasoma subunits to a major histocompatibility complex-linked LMP gene. (1991) *Nature* 353, 664-667.
- ⁶ Ortliz-Navarrete, V., Seeling, A., Gernold, M., Frentzel, S., Kloetzel, P.M., Hammerling, G.J. (1991) Subunit of "20S" proteasome (multicatalytic proteinase) encoded by the major histocompatibility complex. *Nature* 353, 662-664.
- ⁷ Flavell, R. A., Allen, H., Burkly, L. C., Sherman, D. H., Waneck G. L., y Widera, G. (1986) Molecular Biology of the H-2 histocompatibility complex. *Science* 233, 437-443.
- ⁸ Salter, R. D., Benjamin, R.J., Wesley, P.K., Buxton, S.E., Garrett T., Clayberger, C., Krensky, A.M., Norment, A.M., Litman, D.R., and Parham, P., (1990). A binding site for the T cell co-receptor CD8 on the α domain of HLA-A2. *Nature*. 345, 1-46.
- ⁹ Vignali, D. A. A., Moreno, J., Schiller, D., y Hammerling, G. J.. (1992). Species-specific binding of CD4 to the b2 domain of Major Histocompatibility complex class II molecules.
- ¹⁰ Monaco, J.J.. (1993) Structure and function of genes in the MHC class II region. *Current Opinon in Immunology.* 5, 17-20.
- ¹¹ Michalek, M.T., Gramr, E.P., Gramm, C., Golberg, A.L., Rock, K.L., (1993). A role for ubiquitin-dependently proteolytic pathway in MHC class-I-restricted antigen presentation. *Nature* 363, 552-554.
- ¹² Harding, C. V., Collins, D. S., Slot, J. W., Geuze, H. J., y Unanue, E. E.. (1991). Liposome-encapsulated antigens are processed in lysosomes, recycled, and presented, to T cells. *Cell* 64 393-401.

-
- ¹⁸ Bjorkman, P.J., Burneister, W.P. (1994) Structures of two class I MHC molecules elucidated: crucial differences and similarities. *Current Opinion in Structural Biology*. 4,852-856.
- ¹⁹ Harding, C. V., Unanue, E. R. (1990) Cellular mechanisms of antigen processing and the function of class I and II major histocompatibility complex molecules. *Cell Regulation* 1, 499-509.
- ²⁰ Yewdell, J. W., y Bennink, J. R.. (1990). The binary logic of antigen processing and presentation to T cells. *Cell* 62, 203-206.
- ²¹ Harding, CV., Song, R. (1994) Phagocytic processing of exogenous particulate antigens by macrophages for presentation by class I MHC molecules. *J. Immunol.* 153,4925-4933.
- ²² Carbone, FR., Bevan, MJ.. (1990) Class I restricted processing and presentation of exogenous cell-associated antigen in vivo. *J. Exp Med* 171, 377-387.
- ²³ Buus, S., Sette, A., Colon, S. M., Grey, H. M.. (1988). Autologous peptides constitutively occupy the antigen binding site of Ia. *Science* 242, 1045-1047
- ²⁴ Urban, R. G., Chiez, R M., Vignali, D. A. A., y Strominger, J. L. (1993) The dichotomy of peptide presentation by class I and class II MHC proteins. En *Chemical Immunology*, Editado por Adorini, L., Arai, K., y Fitch, F. W., Ishizaka, K., Laelmann, P. J., y Waksman, B. H.. S. Kager, Fasilea, 1993 pp 197-234
- ²⁵ Madden, DR., Goga, JC., Strominger, JL., Wiley, DC.. (1991) The structure of HLA-B27 reveals nonamer self-peptides bound in a extended conformation. *Nature*. 353, 321-325.
- ²⁶ Madden, DR., Gorga, JC., Strominger, JL., Wiley, DC.. (1992) The threedimensional structure of HLA-B27 at 2.1 resolution suggest a general mechanism for tight peptide binding to MHC. *Cell*. 70, 1035-1048.
- ²⁷ Bjorkman, P. J., Saper, M. A., Samraoui, B., Bennet, W. S., Strominger, J L., y Wiley, D. C.. (1987a) Structure of the human class I histocompatibility antigen HLA-A2. *Nature* 329, 506-512
- ²⁸ Bjorkman, P. J., Saper, M. A., Samraoui, B., Bennet, W. S., Strominger, J L., y Wiley, D. C.. (1987b) The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature* 329, 512-518
- ²⁹ Falk, Röttschke, O., Stevanovic, S., Jung, G., Rammensee, HG. (1991) specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature*. 351, 290-296.

-
- ²⁵ Garrett, TPJ., Saper, MA., Bjorkman, PJ., Strominger, JL., Wiley, DC., (1989). Specificity Pockets for the side chains of peptide antigens in-HLA-Aw68. *Nature*. 324,692-696.
- ²⁶ Williams, DB., Boriello, F., Zeff, RA., Nathenson, SG., (1988) Intracellular transport of class I histocompatibility molecules. *J BiolChem*. 263, 4549-4560.
- ²⁷ Degen, E., Williams, DB., (1991) Participation of a novel 88-kD protein in the biogenesis of murine class I histocompatibility molecules. *J Cell Biol*. 112, 1099-1115.
- ²⁸ Hochstenbach, F., David, V., Watkins, S., Brenner, MB., (1992) Endoplasmic reticulum resident protein of 90 kilodaltons associates with the T-cell and B-Cell antigen receptors and major histocompatibility complex antigens during their assembly. *Proc Natl Acad Sci USA*. 89, 4734-4738.
- ²⁹ Engelhard, VH., (1994) Structure of peptides associated with class I and class II MHC molecules. *Ann Rev Immunol* 12, 181-207.
- ³⁰ Lie, WR., Nyers, NB., Gorka, J., Rubocki, RJ., Connolly, JM., Hansens, TH., (1990) Peptide ligand-induced conformational and surface expression of the Ld class I MHC molecule. *Nature*. 344,439-441.
- ³¹ Degen, E., Cohen-Coyle, MF., Williams, DB., (1992) Efficient dissociation of the p88 chaperone from major histocompatibility complex class I molecules requires both beta2-microglobulin and peptide. *J Exp Med*. 175, 1653-1661.
- ³² Michalek, MT., Gramr, EP., Gramm, C., Golberg, AL., Rock, KL., (1993). A role for ubiquitin-dependently proteolytic pathway in MHC class-I-restricted antigen presentation. *Nature* 363, 552-554.
- ³³ Deverson, EV., Gow, IR., Coadwell, WJ., Monaco, JJ., Butcher, GW., Howard, JC., (1990) MHC class II region encoding proteins related to the multidrug resistance family of transmembrane transporters. *Nature*. 348, 738-741.
- ³⁴ Kleijmerr, MJ., Kelly, A., Geuze, HJ., Slot, JE., Townsend, A., Trowsdale, J., (1992) Location of MHC-encoded transporters in the endoplasmic reticulum and cis-golgi. *Nature*. 357,342-344.
- ³⁵ Trowsdale, J., Hanson, I., Mockridge, I., Beck, S., Townsend, A., Kelly, A., (1990) Sequences encoded in the class II region of the MHC related to the "ABC" superfamily of transporters. *Nature*. 348,741-744.
- ³⁶ Powis, SJ., Townsend, AR., Deverson, EV., Bastin, J., Butcher, GW., Howard, JC., (1991) Restoration of antigen presentation to the mutant cell line RMA-S by an MHC-linked transporter. *Nature*. 354, 528-531.

-
- ³⁷ Ortman, B., Androlewicz, M.J., Cresswell, P. (1994). MHC class I B2 microglobulin complex associate with TAP transporters before peptide binding. *Nature*. 368, 864-867.
- ³⁸ Suh, W-K., Cohen-Doyle, M.F., Fruh, K.W., Peterson, P.A., Williams, D.B. (1994) Interaction of MHC class I molecules with the transporter associated with antigen processing. *Science*. 264, 1322-1326.
- ³⁹ Moore, M.W., Carbone, F.R., Bevan, M.J. (1988) Introduction of soluble protein into class I pathway of antigen processing and presentation. *Cell*. 54, 777-785.
- ⁴⁰ Rock, K.L., Rothstein, L., Gamble, S., Fleischacker, C. (1993) Characterization of antigen-presenting cells that present exogenous antigen in association with class I MHC molecules. *J. Immunol*. 150, 438-446.
- ⁴¹ Vignali, D. A. A., y Strominger, J. L. (1994) Coreceptor function and the characteristics of MHC-bound peptides. A common link? *The Immunologist* 2, 112-118
- ⁴² Brown, J., Jardetzky, T., Gorga, J. C., Stern, L. J., Urban, R. G., Strominger, J L, y Wiley, D. C. (1993). Three dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* 332, 845-850
- ⁴³ Chicz, R.M., Urban, R. G., Gorga, J, C., Vignali, D. A. A., Lane, W. S., y Strominger, J. L. (1993). Specificity and promiscuity among naturally processed peptides bound to HLA-DR alleles. *J. Exp. Med.* 178, 27-47
- ⁴⁴ Rudensky, A. Y., Preston- Hurlburt, P, Al-Ramadi, B. K., Rothbard, J., y Janeway C. A. (1992). Truncation variants of peptides isolated from MHC class II suggest sequence motifs. *Nature* 359, 429-431
- ⁴⁵ Rudensky, A. Y., Preston- Hurlburt, P, Hong, S-. C. H., Barlow, A, y Janeway C. A. (1991). Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules. *Nature* 353, 622-624
- ⁴⁶ Germain, R. N. (1993). The biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation. *Ann Rev Immunol.* 11, 403-450.
- ⁴⁷ Roche, P. A., Marks, M. S., y Cresswell, P. (1991). Formation of nine-subunit complex by HLA class II glycoproteins and the invariant chain. *Nature* 354, 392-394
- ⁴⁸ Anderson, S.K., Cresswell, P. (1994) A role for calnexin (IP90) in the assembly of class II MHC molecules. *EMBO Journal*. 13, 675-682.

- ⁴⁸ Bonnerot, CH, Marks, MS, Cosson, P., Robertson, EJ, Blkoff, EX., Germain, RN., Bonifacino, JS. (1994) Association with Bip and aggregation of class II MHC molecules synthesized in the absence of invariant chain. *EMBO Journal* 13,934-944.
- ⁴⁹ Nijenhuis, M., and Neeffes, J. J. (1994). Early events in the assembly of major histocompatibility complex class II heterotrimers from their free subunits. *Eur. J. Immunol.* 24: 247-256.
- ⁵¹ Blkoff, E. K., Huang, L.-Y., Episkopou, V., van Meerwijk, J., Germain, R. N., y Robertson, E. J. (1993). Defective major histocompatibility complex class II assembly, transport peptide acquisition and CD4⁺ T cell selection in mice lacking invariant chain expression. *J. Exp. Med.* 177, 1699-1712
- ⁵² Viville, S., Neeffes, J., Lotteau, V., Dierich, A., Lelour, M., Ploegh, H., Benoist, C., y Mathis, D. (1993). Mice lacking the MHC class II-associated invariant chain. *Cell* 72, 635-648
- ⁵³ Bijlmakers, M.-J., Benaroch, P., Ploegh, H L. (1994) Assembly of HLA DR1 molecules translated in vitro: binding of peptide in the endoplasmic reticulum precludes association with invariant chain. *EMBO Journal*. 13 (11) 2699-2707
- ⁵⁴ Cresswell, P. (1994). Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 12, 259-293.
- ⁵⁵ Strubin, M., Berte, C., Mach, B. (1986) Alternative splicing and alternative initiation of translation explain the four forms of the Ia antigen-associated invariant chain. *EMBO J.* 5,3483-3488.
- ⁵⁶ O'Sullivan, DM., Noonan, D., Quaranta, V., (1987) Four Ia invariant chain forms derive from a single gene by alternate splicing and alternate initiation of transcription / translation. *J. Exp. Med.* 166, 440-460.
- ⁵⁷ Arunachalam, B., Lamb, CA., Cresswell, P. (1993) Transport properties of free and MHC class II-associated oligomers containing different isoforms of human invariant chain. *International Immunology* 6, 493-451.
- ⁵⁸ Hammerling, G. J. y Moreno, J.. (1990). The function of the invariant chain in antigen presentation by MHC class II molecules. *Immunology Today* 11, 337-340
- ⁵⁹ Roche, P. A., y Cresswell, P.. (1990). Invariant chain association with HLA-DR molecules inhibits immunogenic peptide binding. *Nature* 345, 615-618
- ⁶⁰ Busch, R., Vturina, I., Drexler, J., Momburg, F., y Hämmerling, G.. (1995). Poor loading of major histocompatibility complex class II molecules with

endogenously synthesized short peptides in the absence of invariant chain. *Eur. J. Immunol* 25, 48-53.

⁶¹ Bakke, O., y Dobberstein, B. (1990). MHC class II-associated invariant chain contains a sorting signal for endosomal compartments. *Cell* 63, 707-716

⁶² Lotteau, V., Teyton, L., Peleraux, A., Nilsson, T., Karlsson, L., Schmid, S. L., Quaranta, V., y Peterson, P. A. (1990), Intracellular transport of class II MHC molecules directed by invariant chain. *Nature* 348: 600-605.

⁶³ Pieteer, J., Bakke, O., Dobberstein, B., (1993) The MHC class II-associated invariant chain contains two endosomal targeting signals within its cytoplasmic tail. *Journal of Cell Science*. 106,831-846.

⁶⁴ Castelino, F., y Germain, R. N., (1995) Extensive trafficking of MHC class II-invariant chain complexes in the endocytic pathway and appearance of peptide-loaded class II in multiple compartments. *Immunity* 2, 73-88

⁶⁵ Bodmer, H., Viville, S., Benoist, C., y Mathis, D. (1994). Diversity of endogenous epitopes bound to MHC class II molecules limited by the invariant chain. *Science* 263, 1284-1286

⁶⁶ Anderson, SK., Swier, K., Arneson, L., Miller, J. (1993). Enhanced antigen presentation in the absence of the invariant chain endosomal localization signal. *J. Exp Med.* 178, 1959-1969.

⁶⁷ Romagnoli, P., Layet, C., Yewdell, J., Bakke, O., Germain, RN. (1993) Relationship between invariant chain expression and major histocompatibility complex class II transport into early and late endocytic compartments. *The Journal of Experimental Medicine*. 177, 583-596.

⁶⁸ Neeftjes J. J., Stollorz, V., Peters, P. J., Geuze, H. J., y Ploegh, H. L. (1990). The biosynthetic pathway of MHC class II but not class I molecules intersects the endocytic route. *Cell* 61, 171-183

⁶⁹ Peters, P. J., Neeftjes, J.J., Oorschot, V., Ploegh, H. L., and Geuze, H.J. (1991). Segregation of MHC molecules from MHC class I molecules in the Golgi complex for transport to lysosomal compartments. *Nature*. 349:669-676

⁷⁰ Cresswell, P. (1985) Intracellular class II HLA antigens are accessible to transferrin-neuraminidase conjugates internalized by receptor-mediated endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82,8188-8192.

⁷¹ Guagliardi, L. E., Koppelman, B., Blum, J. S., Marks, M.S., Cresswell, P., y Brodsky, F. M.. (1990). Co-localization of molecules involved in antigen

processing and presentation in an early endocytic compartment. *Nature* 343, 133-139

⁷² Amigorena, S., Drake J. R., Webster, P., y Mellman, I. (1994) Transient accumulation of new class II MHC molecules in a novel endocytic compartment in B lymphocytes. *Nature* 369, 113-120

⁷³ Tulp, A., Verwoerd, D., Dobberstein, B., Ploegh, H. L., y Pieters, J. (1994). Isolation and characterization of the intracellular MHC class II compartment. *Nature*, 369, 120-126

⁷⁴ Calafat, J., Nijenhuis, M., Janssen, H., Tulp, a., Dusseljee, S., Wubbolts, R., Neefjes, J. (1994) Apor Histocompatibility Complex Class II Molecules Induce the Formation of Endocytic MHC-like Structures. *The Journal of Cell Biology*. 126, 967--977.

⁷⁵ West, M.A., Lucocq, J M., Watts, C. (1994). Antigen processing and class II MHC peptide loading compartments in human B-lymphoblastoid cells. *Nature* 369, 147-150

⁷⁶ Chervonsky, AV., Gordon, L., Sant, AJ., (1994) A segment of the MHC class II b chain plays a critical role in targeting class II molecules to the endocytic pathway. *International Immunology*. 6, 973-982.

⁷⁷Roche, PA., Teletski, CL., Stang, E., Oddmund, B., Long, EO. (1993) Cell surface HLA-DR-invariant complex are targeted to endosomes by rapid internalization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 8581-8585.

⁷⁸ Roche, P. A., y Creswell, P. (1991). Proteolysis of class II-associated invariant chain generates a peptide binding site in intracellular HLA-DR molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 3150-3154

⁷⁹ Reyes, V. E., y Humphreys, R. E. (1991). Cathepsin B cleavage of I_i from class II MHC a- and b-chains. *J. Immunol.* 146, 3877-3880

⁸⁰ Nguyen, QV., Knapp, W., Humphreys, RE (1989) Inhibicion por leupeptin and antipapain of the proteolysis of I_i. *Human Immunol.* 24, 153-163

⁸¹Riberdy, J. M., Nwecomb, J. R., Surman, M. J., Barbosa, J. A., y Creswell, P. (1992). HLA-DR molecules from an antigen-processing mutant cell line are associated with invariant chain peptides. *Nature* 360, 474-477

⁸² Ghosh, P., Amaya, M., Mellins, E., Wiley DC. (1995) The structure of HLADR3 complexed with CLIP an intermediate on peptide loading. *Nature* 378m 457,462.

-
- ⁸³ Denzin, L.K., Cresswell, P. (1995). HLA-DM induce CLIP dissociation from MHC class II alpha beta dimers and facilitates peptide loading. *Cell* 62, 155-165
- ⁸⁴ Sloan, V.S., Cameron, P., Porter, G., Gammon, M., Amaya, M., Mellins, E., Zaller, D.M. (1995) Mediation by HLA-DM of dissociation of peptides from HLA-DR. *Nature*. 375, 802-804.
- ⁸⁵ Radley, E., Alderton, R.P., Kelly, A., Trowsdale, J., Beck, S. (1994) Genomic Organization of HLA-DMA and HLA-DMB. *The Journal of Biological Chemistry* 269, 18834-18838.
- ⁸⁶ Sanderson, F., Kleijmer, M.J., Kelly, A., Verwoerd, D., Tulp, A., Neefjes, J.J., Geuze, H.J., Trowsdale, J. (1994) Accumulation of HLA-DM, a regulator of antigen presentation in MHC class II Compartments. *Science* 226, 1566-1569.
- ⁸⁷ Lindstedt, R., Lijedahl, M., Péléraux, A., Peterson, P.A., Karlsson, Lars. (1995) The MHC Class II Molecule H2-M Is Targeted to an Endosomal Compartment by a Tyrosine-Based Targeting Motif. *Cell* 3, 561,572.
- ⁸⁸ Fung-Leung, W-P., Surh, C.D., Lijedahl, M., Pang, J., Leturcq, D., Peterson, P.A., Webb, S.R., Karlsson, L. (1996) Antigen presentation and T Cell Development in H2-M-Deficient Mice. *Science* 271, 1278-1281.
- ⁸⁹ Kropshofer, H., Vogt, A.B., Stern, L.J., Hämmerling, G.J., (1995) Self-Release of CLIP in Peptide Loading of HLA-DR Molecules. *Science* 270, 1357-1359.
- ⁹⁰ Takahashi, H., Cease, K. B., y Berzofsky, J. A. (1989). Identification of proteases that process distinct epitopes on the same protein. *J. Immunol.* 142, 2221-2229.
- ⁹¹ Blum, J., Cresswell, P. (1988) Role for intracellular proteases in the processing and transport of class II HLA antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 3975-3979
- ⁹² Bennet, K., Levine, T., Ellis, J. S., Peanasky, R. J., Samloff, I. M., Kay, J., y Chalm, B. M. (1992). Antigen processing for presentation by class II major histocompatibility complex requires cleavage by cathepsin E. *Eur. J. Immunol.* 22, 1519-1524
- ⁹³ Puri, J., y Factorovich, Y. (1988). Selective inhibition of antigen presentation to cloned T cells by protease inhibitors. *J. Immunol.* 141, 3313-3317
- ⁹⁴ Hicke, L., Riezman, H., (1996) Ubiquitination of a yeast plasma membrane receptor signals its ligand stimulated endocytosis-287 *Cell.* 84, 277.

-
- ⁹⁵ Klausner, R. D., Sitia, R. (1990) Protein degradation in the endoplasmic reticulum. *Cell*, 62, 611-614.
- ⁹⁶ Lippincott Schwartz, J., Bonifacino, J. S., Yuan, L.C., Klausner, R.D. (1988) Degradation from the endoplasmic reticulum disposing of newly synthesized proteins. *Cell* 54, 209-220.
- ⁹⁷ Rose, J.K., Doms R.W.. (1988) Regulation of protein Export from the endoplasmic reticulum. *Ann. Rev. Cell Biol.* 4, 257-258
- ⁹⁸ Minami, Y., Weissman, A.M., Samelson, L.E., Klausner, R.D. (1987) Bulding of multichain receptor: synthesis degradation and assembly of the T cell antigen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84, 2688-2692
- ⁹⁹ Bonifacino, J.S., Suzuki, C.K., Lippincott Schwartz, J., Weissman, A.M., Klausner, R.D. (1990) A peptide sequence confers retention and rapid degradation in the endoplasmic reticulum. *Science* 247, 78-82.
- ¹⁰⁰ Germain, R.N., Rinker Jr, A.G.. (1993) Peptide binding inhibits protein aggregation of invariant-chain free class II dimers and promotes surface expression of occupied molecules. *Nature* 363, 735-728
- ¹⁰¹ Sadegh-Nassery, S., y Germani, R. N.. (1991). A role for peptide in determining MHC class II structure. *Nature* 353, 167-170
- ¹⁰² Sadegh-Nassery, S., McConell, H. M.. (1989). A kinetic intermediate in the reaction of an antigenic peptide and I-E^k. *Nature* 337, 274-276
- ¹⁰³ Agrawal, B., Fraga, E., Kane, K., Singh, B.. (1994) Up-regulation of the MHC clas II molecules on B Cells by peptide ligands. *Journsl of Immunology* 965-975
- ¹⁰⁴ Reid, P A., Watts, C.. (1990). Cycling of cell-surface MHC glycoproteins throug primaquine-sensitive intracellular compartments. *Nature.* 346, 655-657
- ¹⁰⁵ Nijenhuis, M., Calafat, J., Kuijpers, K. C., Janssen, H., de Haas, M., Nordeng, T. W., Bakke, O., y Neefjes, J. J.. (1994). Targeting major histocompatibility complex class II molecules to the cell surface by invariant chain allows antigen presentation upon recycling. *Eur. J. Immunol.* 24, 873-883
- ¹⁰⁶ Pinet, V., Malnati, M., y Long, E. O.. (1994). Two processing pathways for the MHC class-restricted presentation of exogenous influenza virus antigen. *J. Immunol.* 152, 4852-4860

-
- ¹⁰⁷ Pinet, V., Vergelli, M., Martin, R., Bakke, O., Long, E.O. (1995), Antigen presentation mediated by recycling of surface HLA-DR molecules. *Nature* 375,603-606.
- ¹⁰⁸ Jensen, P.E., (1991). Enhanced Binding of Peptide Antigen to Purified Class II Major Histocompatibility Glycoproteins at Acidic pH. *J. Exp. Med.* 144, 1111-1120.
- ¹⁰⁹ Poirier, G., Chain, B., (1993) Analysis of the cellular requirements for the binding of exogenous peptide to MHC Class II Molecules. *Cellular Immunology* 152, 456-467.
- ¹¹⁰ Malnati, M. S., Marti, M., LaVaute, T., Jarquemada, D., Biddison, W., DeMars, R., y Long, E. O. (1992). Processing pathways for presentation of cytosolic antigen to MHC class II-restricted T cells. *Nature* 357, 702-704.
- ¹¹¹ Snider, D.P., Segal, D.M., (1987). Targeted antigen presentation using cross-linked antibody heteroaggregates. *Immunol.* 139,1609-1616.
- ¹¹² Weiss, S., and Bogen, B., (1991). MHC class II- restricted presentation of intracellular antigen. *Cell* 64:767-776.
- ¹¹³ Ziegler, H.K., Unanue, E. R. (1982). Decrease in macrophage antigen catabolism caused by ammonia and chloroquine is associated with inhibition of antigen. *Proc. nat. Acad. Sci.* 79, 175-178.
- ¹¹⁴ Kittlesen, D.J., Brown, L.R., Braciale, V.L., Sambrook, J.P., Gething, M-J., Braciale, T.J., (1993) Presentation of newly synthesized glycoproteins to CD4⁺ T lymphocytes. An analysis using influenza hemagglutinin transport mutants *J. Exp. Med.* 177, 1021-1030.
- ¹¹⁵ Munro, A., Pelham, H R.B., (1987) A C- terminal signal prevents secretion of luminal ER Proteins. *Cell*, 48, 899-907.
- ¹¹⁶ Brooks, A. G., y McCluskey, J., (1993). Class II-restricted presentation of a hen egg lysozyme determinant derived from endogenous antigen sequestered in the cytoplasm or endoplasmic reticulum of the antigen presenting cells. *J. Immunol.* 150, 3690-3697
- ¹¹⁷ Lippincott-Schwartz, J., Donaldson, J. G., Scwelzer, A., Berger, E. G., Hauri, H- P., Yuan, L. C., y Klausner, R. D., (1990). Microtubule-dependent retrograde transport of proteins into the ER in the presence of brefeldin A suggests an ER recycling pathway. *Cell* 60, 821-836.
- ¹¹⁸ Nuchtern, J. G., Biddison, W.E., and Klausner, R. D., (1990). Class II MHC molecules can use the endogenous pathway of antigen presentation. *Nature* 354, 392-394.

- ¹¹⁹ Long, E. O., LaVaute, T., Pinet, V., Jaraquemada, D. (1994) Invariant chain prevents the HLA-DR-restricted presentation of a cytosolic peptide. *The Journal of Immunology* 153-157
- ¹²⁰ Dodi, A. I., Brett, S., Nordeng, T., Sidhu, S., Batchelor, R. J., Lombardi, G., Bakke, Oddmund, B., Lechler, R. (1994) The invariant chain inhibits presentation of endogenous antigens by a human fibroblast cell line. *Eur. J. Immunol.* 24, 1632-1639.
- ¹²¹ Sanderson, S., Frauwirth, K., Shastri, Nilabh. (1995) Expression of endogenous peptide-major histocompatibility complex class II complexes derived from invariant chain-antigen fusion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 7217-7221.
- ¹²² Brooks, A., Hartley, S., Kjer-Nielsen, L., Perea, J., Goodnow, CC., Basten, A., McCluskey, J. (1991) Class II-restricted presentation of an endogenously derived immunodominant T-cell determinant of egg lysozyme. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 3290-3294.
- ¹²³ Adorini, L., Guéry, J., Fuchs, S., Ortiz, V., Hammerling, G. J., and Momburg, F. (1993). Processing of endogenously synthesized hen egg-white lysozyme retained in the endoplasmic reticulum or in secretory form gives rise to a similar but not identical set of epitopes recognized by class II restricted T cells. *J Immunol* 151, 3576-3586.
- ¹²⁴ D. EurMartine, H., Bertolino, P., Forquet, F., Rabourdin-Combe, CH., Gerlier, J., Davoust, J., Salamero, J. (1991) Major histocompatibility complex class II restricted presentation of secreted and endoplasmic reticulum resident antigens requires the invariant chain and is sensitive to lysosomotropic agents. *J. Immunol.* 23, 3167-3172.
- ¹²⁵ Moreno, J., Vignali, D. A. A., Nadimi, F., Fuchs, S., Adorini, L., y Hammerling, G. J., (1991) Processing of an endogenous antigen can generate MHC class II- restricted determinants distinct from those generated after the processing of exogenous protein. *J. Immunol.* 147, 3306-3313
- ¹²⁶ Gutierrez, M. (1996) Vías de procesamiento intracelular de diferentes formas de lisozima de gallina. Tesis para obtener el grado de Maestría en ciencias biomédicas con especialidad en inmunología. IPN. ENCB.
- ¹²⁷ Allen, P. M., McKean, D. J., Beck, B. N., Sheffield, J., Glincher, L. H. (1985). Direct evidence that a class II molecule and a simple globular protein generate multiple determinants. *J. Exp. Med.* 162, 1264-1274.
- ¹²⁸ Hämmerling, G. J., Koch, N., Grützmann, R., Ade, N., (1982). Monoclonal antibodies against murine Ia antigens: studies on structure, function, epitopes, and idiotypes. En *Ia antigens*, Vol. I Mice S Ferrone y C. C. Davd eds. CRC press, Boca Raton, FL, pp55-79

- ¹²⁹ Ozato, K., Sachs, D. H. (1981). Monoclonal antibodies to mouse MHC antigens. III hybridoma antibodies reacting to antigens of the H-2b haplotype reveal genetic control of idiotype expression. *J. Immunol.* 126, 317.
- ¹³⁰ Kappler, J., White, J., Wegmann, D., Mustain, E., Marrack, P. (1982) Antigen presentation by Ia+ Bcell hybridomas to H-2-restricted T cell hybridomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79,3604-3607.
- ¹³¹ Cullen, S.E., (1984) *Meth. Enzymol.* 108, 523-548
- ¹³² Stern, L., Wiley, DC. (1992) The human class II MHC protein HLA-DR1 assembles as empty ab heterodimers in the absence of antigenic peptide. *Cell.* 68, 465-477.
- ¹³³ Germain, R. N, Hendrix, L. R. (1991). MHC class II structure, occupancy and surface expression determined by post-endoplasmic reticulum antigen binding. *Nature*353,143-139.
- ¹³⁴ Klausner, R. D., (1990), J. E. (1991). Brefeldin A, a drug that blocks secretion, prevents the assembly of non-clathrin-coated buds on golgi cisternae. *Cell* 64, 1183-1195.
- ¹³⁵ Nadimi, F., Moreno, J., Momburg, F., Heuser, A., Fuchs, S., Adorini, L., Hämmerling, G.J. (1991) Antigen presentation of hen egg-white lysozyme but not ribonuclease A is augmented by the major histocompatibility complex class II-associated invariant chain. *Eur. J. Immunol* 21, 1255-1263.