



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

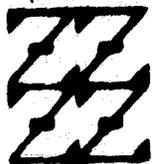
10
Zej

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
UNIDAD DE INVESTIGACION EN DIFERENCIACION
CELULAR Y CANCER

OBTENCION DE PEPTIDOS ANTIGENICOS A PARTIR
DE MOLECULAS DEL COMPLEJO MAYOR DE
HISTOCOMPATIBILIDAD CLASE I Y ANALISIS DE SU
EXPRESION ALELICA EN DOS LINEAS CELULARES DE
CARCINOMA DE CERVIX HUMANO.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGIA
P R E S E N T A
ROMMEL CHACON SALINAS

U N A M
F E B
Z A R A G O Z A



LO ORGANIZO
EL COMITÉ DIRECTIVO

DIRECTOR DE TESIS: M. en I.B.S.H. ALBERTO MONROY GARCIA.
ASESOR DE TESIS: DR. BENNY WEISS STEIDER

MEXICO, D. F.

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO EN LA UNIDAD
DE INVESTIGACION EN DIFERENCIACION CELULAR Y
CANCER DE LA FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO, BAJO LA DIRECCION DEL M. en I.B.S.H.
ALBERTO MONROY GARCIA Y BAJO LA ASESORIA DEL Dr.
BENNY WEISS STEIDER.**

**DURANTE EL DESARROLLO DE LA PRESENTE TESIS SE
CONTÓ CON EL APOYO DE D.G.A.P.A. A TRAVES DEL
PROYECTO IN206993.**

ESTA TESIS SE ENCUENTRA DEDICADA A:

TODAS LAS PERSONAS QUE PADECIERON O HAN PADECIDO CANCER.

A PAPA Y MAMA, quienes con su cariño y amor me han brindado la oportunidad de superarme continuamente

A MIS HERMANOS, ERIKA Y NEFTALI, quienes con su cariño me han apoyado de manera firme.

A ALMA, quien con su ayuda, cariño y comprensión me ha ayudado a realizar mis metas.

A MIS AMIGOS, FAMILIARES Y COMPAÑEROS, quienes con su amistad y apoyo logre salir adelante.

INDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	3
MARCO TEORICO.....	5
I. Inmunidad mediada por células.....	5
II. Estructura de las moléculas clase I y II del CMH.....	7
III. Polimorfismo de moléculas del CMH.....	9
IV. Vía principal de presentación de antígenos asociados a moléculas clase I del CMH.....	10
A) <i>Generación de péptidos</i>	13
B) <i>Translocación de péptidos del citoplasma al retículo endoplásmico</i>	14
C) <i>Chaperonas en el ensamblaje de moléculas CMH clase I</i>	15
V. Vía alterna de presentación de antígenos.....	16
VI. Expresión de péptidos asociados a moléculas del CMH clase I.....	17
VII. Identificación de epítomos.....	18
VIII. Técnicas para el análisis de péptidos procesados naturalmente asociados a moléculas CMH clase I.....	20
A) <i>Purificación</i>	20
B) <i>Secuenciación de la mezcla de péptidos</i>	21
IX. Cáncer cérvico-uterino.....	22
A) <i>Etiología</i>	22
B) <i>Respuesta inmune al cáncer cérvico-uterino</i>	24
B.1) <i>Inmunidad humoral</i>	24
B.2) <i>Inmunidad mediada por células</i>	25
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	27
OBJETIVOS.....	28

HIPOTESIS	29
MATERIAL Y METODO	30
RESULTADOS	37
DISCUSION DE RESULTADOS	58
CONCLUSIONES	63
LITERATURA CITADA	64
APENDICES	83

RESUMEN

Hoy en día una de las principales causas de mortalidad en nuestro país es la originada por el cáncer, a pesar de que existen muchas estrategias para combatirlo aun no se ha logrado el éxito en la mayoría de los casos en los que la detección no ha sido oportuna. Actualmente se han realizado una gran cantidad de estudios a nivel molecular, con la finalidad de crear vacunas que sean específicas a antígenos presentes en las células cancerosas. Los linfocitos T citotóxicos (CTL's) juegan un papel importante en la inmunidad del huésped hacia patógenos intracelulares y cáncer. Los CTL's reconocen antígenos sólo en asociación con moléculas clase I del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH-I). En la actualidad existe un gran interés en obtener y caracterizar péptidos antigénicos presentados por moléculas CMH-I que se derivan del procesamiento de proteínas sintetizadas endógenamente propias de células que han sufrido infecciones virales o bien, se han vuelto cancerosas con la finalidad de crear vacunas que sean específicas a antígenos presentes en las células cancerosas. Este trabajo se realizó con la finalidad de obtener y analizar hidrofílicamente a péptidos asociados a distintos alelos del CMH-I que son presentadas por dos líneas celulares provenientes de carcinoma de cérvix humano (denominadas Calo e Inbl) y que se encuentran asociadas etiológicamente a una infección de tipo viral (*Papilloma virus* tipo 18). Los alelos del CMH-I: HLA-A28 y HLA-B27 presentes en la membrana de las líneas Calo; el alelo HLA-A11 de la línea Inbl; y el alelo HLA-Bw6 presente en ambas líneas celulares fueron detectados por citofluorimetría de flujo con ayuda de anticuerpos monoclonales producidos por los hibridomas PA2.1, B27.M1, A11.1M, y SFR8-B6 respectivamente. Los péptidos asociados a cada uno de los alelos del CMH-I se obtuvieron por medio de cromatografía de inmutafinidad y separados de acuerdo a su hidrofobicidad por medio de un cromatografía de alta resolución (HPLC), en una columna de fase reversa. Los resultados obtenidos nos revelan la carencia de péptidos de carácter hidrofílico en los alelos de la línea Inbl en relación con los péptidos asociados a alelos

de la línea Calo, lo que puede estar relacionado con el grado de malignidad de las líneas celulares y por tanto influir en la evasión de la respuesta inmune celular. El conocer las características bioquímicas y funcionales de estos péptidos en un futuro será de gran trascendencia para poder indagar el origen de los antígenos que están siendo presentados en el contexto del CMH-I y por lo tanto establecer estrategias para eliminar específicamente a estas células tumorales.

INTRODUCCION

Actualmente una de las principales causas de mortalidad en nuestro país y en el mundo, es la originada por enfermedades degenerativas, como lo es el cáncer. Muchas han sido las estrategias para combatirlo, desde la planeación de campañas de prevención y tratamiento oportuno, hasta el tratamiento en etapas avanzadas; en las cuales la cirugía, quimioterapia y radioterapia han sido las más utilizadas y con resultados poco alentadores en la mayoría de los casos. En consecuencia, la búsqueda de nuevas estrategias en el tratamiento del cáncer debe ser una de las prioridades en la investigación médica. De hecho, en los últimos años, un gran bloque de información se ha vertido al respecto, enfocando la investigación no sólo a nivel celular, sino también a nivel molecular, donde estudios inmunológicos y de biología y genética molecular han tenido gran relevancia.

Los estudios inmunológicos han tenido como uno de sus principales objetivos el tratar de generar nuevos conocimientos que puedan ser aplicados en favor de la creación de vacunas específicas hacia antígenos presentes en las células cancerosas, y de esta manera prolongar y mejorar la calidad de vida de los pacientes que padecen estas enfermedades.

Hoy en día se sabe que una gran parte de los antígenos que son presentados en células cancerosas o infectadas por un virus tienen como origen a proteínas antigénicas que son procesadas en la célula y presentadas en el contexto de moléculas clase I del CMH. Esto se demostró cuando se observó que los linfocitos T específico-virales reconocían a antígenos virales en el contexto de moléculas clase I del CMH. Posteriormente otro grupo demostró que los linfocitos T también pueden ser estimulados con péptidos sintéticos, los cuales se localizaban en fragmentos de proteínas virales intracelulares, por lo cual los péptidos sintéticos unidos a las células no infectadas podían ser substituidos de manera natural tras una infección con el virus. En 1990 se caracterizó a los antígenos que se asocian a las moléculas clase I del CMH al aislarse

péptidos naturales que hablan sido procesados, y que eran reconocidos por los linfocitos CD8⁺ en el contexto de moléculas clase I del CMH.

En vista de ello, el presente trabajo tiene como finalidad proporcionar una metodología que sea eficiente para obtener antígenos asociados a moléculas clase I del CMH de células tumorales, y de esta manera proporcionar herramientas para la obtención y caracterización de antígenos tumorales, con vías a la fabricación de vacunas específicas contra tumores que porten a estos antígenos.

MARCO TEORICO

En la actualidad se conocen dos mecanismos inmunológicos para destruir a tumores, uno de los cuales es innato y el otro es adaptativo. El sistema innato se encuentra conformado en su mayoría por células fagocitarias, como son los monocitos-macrófagos, así como neutrófilos polimorfonucleares, que junto con las células asesinas naturales destruyen antígenos y células tumorales de manera inespecífica. Todas las células que conforman este sistema tienen su origen en la médula ósea y atacan a los agentes extraños mediante citólisis, o bien por citotaxis (1-3).

Cuando el sistema innato fracasa en su intento por detener la invasión de los agentes infecciosos o la proliferación de las células tumorales, se pone en marcha el sistema inmune adaptativo, el cual se caracteriza por la alta especificidad celular y la generación de "memoria" para contrarrestar el efecto de un segundo ataque. Dentro de este sistema se encuentran tanto inmunidad humoral, como inmunidad mediada por células (1-3).

La inmunidad humoral es producida por la acción de linfocitos B que se forman en la médula ósea, y que reconocen a antígenos que se encuentran libres en solución, por medio de anticuerpos localizados en su superficie. Una vez que han sido activados se dividen y determinan en células plasmáticas que segregan una gran cantidad de anticuerpos, que actuarán sólo frente a un antígeno específico. Una vez que se han unido, los anticuerpos pueden neutralizar o favorecer la degradación del antígeno con ayuda de las proteínas del complemento, o bien por medio de células cuya citotoxicidad es dependiente de anticuerpos, tales como macrófagos y células NK (1-3).

I. INMUNIDAD MEDIADA POR CELULAS

En la inmunidad mediada por células participan los linfocitos que tienen su origen en el timo, y por lo que se conocen como linfocitos T. Desde mediados de la década de los 70's se ha logrado entender que los

linfocitos T no reconocen a antígenos de manera directa, sino que los reconocen en forma de complejos, los cuales se encuentran conformados por el antígeno y por moléculas de clase I o clase II codificadas por genes del CMH. Estudios efectuados en la década de los 80's dieron soporte al concepto que antígenos externos reconocidos por linfocitos T restringidos a moléculas del CMH clase II podían ser imitados a través de la adición de péptidos derivados de la proteína antigénica intacta a células positivas para clase II (4), y que estos péptidos se asociaban con moléculas del CMH clase II (5-6). Posteriormente, este paradigma fue extendido a moléculas de clase I (7). Si bien estas observaciones provelan un modelo unificado del reconocimiento de linfocitos T basado en la forma del antígeno, las principales vías intracelulares para la producción de estos péptidos difieren de una clase a otra (8-10). Los péptidos antigénicos que se asocian con moléculas clase I son generados comúnmente a partir de proteínas sintetizadas o introducidas directamente en el citoplasma de la célula, mientras que los péptidos que se asocian a moléculas de clase II son producidos normalmente en un compartimento endosomal o lisosomal.

Esencialmente, todas las células nucleadas expresan moléculas de clase I, las cuales se expresan abundantemente en células linfoideas; en menor cantidad en hígado, pulmón y riñón; y en muy poca cantidad en el cerebro y músculo esquelético. Las moléculas de clase II se encuentran más restringidas, encontrándose asociadas especialmente a los linfocitos B, células presentadoras de antígeno y macrófagos (2).

La observación de que la expresión en la superficie de las células o la conformación de las moléculas CMH se encuentra alterada en mutantes que tienen afectados genes que son importantes en las vías de presentación, indica que en células sin infectar, la gran mayoría de moléculas CMH en la superficie celular tienen péptidos unidos a ellas, presumiblemente derivados de la degradación de proteínas celulares normales o material que ha sido endocitado (11-15). Así mismo, se conoce que existen dos poblaciones de linfocitos T, una de las cuales son conocidas como linfocitos CD4⁺, los cuales son en su mayoría células

auxiliares, reconocen a péptidos antigénicos que se encuentran unidos a las moléculas clase II del CMH expresadas en la superficie de linfocitos B, macrófagos, o células dendríticas. La población de linfocito T CD8⁺, la mayoría de las cuales son citotóxicas, reconocen péptidos antigénicos unidos a moléculas clase I del CMH (1-3).

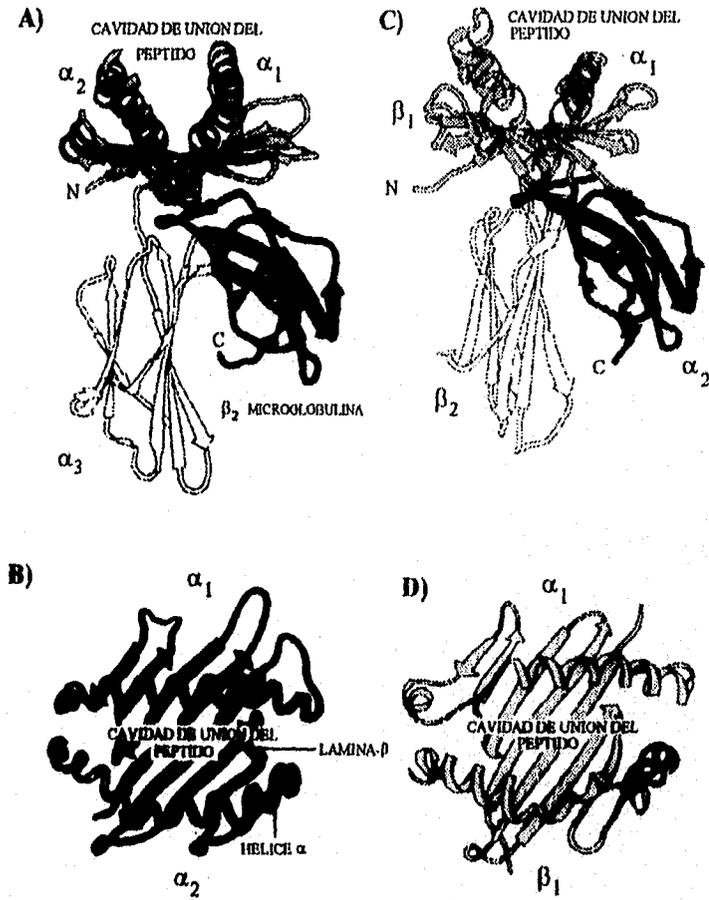
II. ESTRUCTURA DE LAS MOLECULAS CLASE I Y II DEL CMH

Las moléculas del CMH son glicoproteínas que se expresan en la membrana celular y que son el producto de un conjunto de genes altamente polimórficos, los cuales se localizan en el brazo corto del cromosoma 6 en el humano. La estructura que presentan estas proteínas ha sido dilucidada a partir del análisis cristalográfico por rayos X de la estructura tridimensional de las moléculas del CMH, y ha permitido clasificarlas en dos grandes clases:

- Clase I: Estas moléculas consisten de una cadena polipeptídica pesada de un peso molecular de 45,000 daltones (Da); unida no covalentemente a un cadena más pequeña de peso molecular de 12,000 Da; y que es conocida como β_2 -microglobulina (β_2 -m). La parte más larga de la cadena pesada se encuentra organizada en tres dominios globulares, a los cuales se les denomina α_1 , α_2 y α_3 , los cuales sobresalen de la superficie de la célula. Anclando a la molécula en la membrana citoplasmática se encuentra una pequeña sección hidrofóbica, y cercana a ella se encuentra una corta secuencia hidrofílica, que lleva el extremo carbono terminal hacia el citoplasma. Tanto la β_2 -m, como la región α_3 se ensamblan de una manera tal que recuerdan a los dominios de las inmunoglobulinas, en cuanto a su patrón de plegamiento. Por otra parte, los dominios α_1 y α_2 presentan una estructura compuesta de dos hélices α extendidas, sobrepuestas sobre una base compuesta por láminas β -plegadas entrecruzadas entre sí, formándose con ello una pequeña cavidad en donde se aloja el péptido antigénico(16-22) (Figura 1).

- Clase II: Las moléculas del CMH-II son, al igual que las moléculas de CMH I, glicoproteínas transmembranales, que están conformadas por dos cadenas polipeptídicas. La cadena α tiene un peso molecular de 34,000 Da y la de la cadena β es de 28,000 Da. También se ha observado una

FIGURA 1. Estructura tridimensional de moléculas clase I y II del CMH. A) Vista lateral de la molécula de clase I HLA-A2.1. B) Vista superior de la molécula HLA-A2.1, mostrando el sitio de unión del péptido. C) Vista lateral de una molécula de clase II. D) Vista superior de una molécula clase II, mostrando el sitio de unión del péptido. (Tomado de ref. 1)



considerable homología secuencial con las moléculas clase I del CMH, así como un patrón de plegamiento en el cual los dominios α_2 y β_2 , los cuales son los más cercanos a la membrana celular, asumen el patrón de plegamiento de las inmunoglobulinas, mientras que los dominios α_1 y β_1 imitan a los dominios α_1 y α_2 de las moléculas del CMH I, en cuanto a la formación de una cavidad que se encuentra rodeada por dos hélices α y una base β -plegada, y en la cual se aloja a un péptido (23). (Figura 1).

III. POLIMORFISMO DE MOLECULAS DEL CMH

Una de las características de las moléculas de clase I es su extraordinario polimorfismo. En los humanos, más de 100 estructuras distintas de moléculas de clase I y II han sido identificadas (24). Esta variación proviene de múltiples alelos en un *locus*, y en caso de las moléculas de clase II, transcomplementación entre las cadenas alélicas α y β (25). En la superficie de las células de un individuo normal heterocigótico se pueden detectar hasta seis diferentes moléculas de clase I y por lo menos el mismo número de moléculas de clase II. La fuerza que dirige la expresión de múltiples isoformas, así como la variedad estructural que se encuentra dentro de las especies, es determinado casi en su totalidad por el incremento en las oportunidades de que al menos una molécula del CMH sea capaz de encontrar al menos un péptido derivado de cualquier patógeno. Sin embargo, debido a que cada individuo expresa sólo un pequeño número de diferentes moléculas CMH, cada isoforma debe de ser capaz de unir a una amplia cantidad de péptidos diferentes para así lograr una respuesta inmune a una gran variedad de patógenos.

Esta aparente degeneración en la unión de péptidos contrasta fuertemente con la exquisita especificidad típica de la mayoría de las interacciones proteína-ligando. Esto es explicado al analizar en detalle a la hendidura en donde se une el péptido; se ha observado que dicha cavidad se encuentra circunscrita por residuos de aminoácidos, algunos de los cuales son los responsables del polimorfismo de las moléculas clase I, y es de considerable significado que ocurran esencialmente en la base β -plegada y en la superficie interna de las hélices α , lo cual influye en la

especificidad de unión del péptido o en su conformación. Varios de estos residuos contribuyen a la formación de sub-sitios, o "pockets", dentro de la hendidura. Así, la capacidad de cada una de las isoformas del CMH para unir a un diverso arreglo de péptidos está basado en interacciones específicas que involucran a los "pockets" y a un pequeño número de cadenas laterales del péptido, o "motifs", permitiendo al resto del péptido variar. La energía de unión adicional proviene de las interacciones que involucran al esqueleto del péptido, lo que provoca una orientación común para los péptidos en los sitios de unión (figura 2); por lo que se ha sugerido que estas interacciones delimitan un tamaño para los péptidos que se asocian a moléculas clase I, el cual es en la mayoría de nueve residuos; no obstante se ha observado que existen péptidos mayores a nueve aminoácidos, siendo el mayor de ellos de 14 restos aminoácidos (26-27).

IV. VIA PRINCIPAL DE PRESENTACION DE ANTIGENOS ASOCIADOS A MOLECULAS CLASE I DEL CMH

La presentación del antígeno por parte de las moléculas clase I del CMH en la membrana celular comienza cuando la proteína viral u oncogénica sintetizada en el citoplasma es degradada a péptidos en el citoplasma por el proteasoma; los péptidos son transportados al interior del retículo endoplásmico (RE) por medio de los transportadores asociados al procesamiento de antígenos (TAP's). Simultáneamente la molécula clase I (cadena α y β_2 -m) son sintetizadas por separado y traslocadas al RE. Inmediatamente después de su síntesis la cadena α se asocia con la calnexina, la cual a su vez se disocia cuando la β_2 -m se acopla a la cadena α ; posteriormente el complejo α/β_2 -m se asocia con la proteína BiP y posteriormente al TAP1. Cuando el péptido, bombeado por el TAP, se asocia al complejo cadena α/β_2 -m ocurre la disociación del complejo con el TAP1. Finalmente el nuevo complejo (cadena α/β_2 -m/péptido) accede al complejo de Golgi, lugar donde es glicosilado, y exportado por medio de vesículas intracelulares hacia la superficie celular, en donde el linfocito T citotóxico reconoce por medio de su receptor al péptido asociado a la molécula clase I (figura 3).

Figura 2. Interacción del péptido con moléculas CMH clase I. A) Vista superior de la cavidad de unión del péptido de una molécula CMH clase I. B) Representación de la conformación del péptido SEV-9 y localización de sus cadenas laterales en la cavidad de la molécula H-2K^b. Las localizaciones de los pockets son mostradas. C) Representación lateral de la orientación de las cadenas laterales del péptido SEV-9. Los residuos P1, P4 y P5 del péptido sobresalen de la cavidad y son factibles a ser reconocidos por el linfocito CD8⁺. Los círculos negros representan el esqueleto de C del péptido, y los círculos abiertos representan las cadenas laterales del péptido. (A) Tomado de ref. 1; B), C) Tomado de ref. 28)

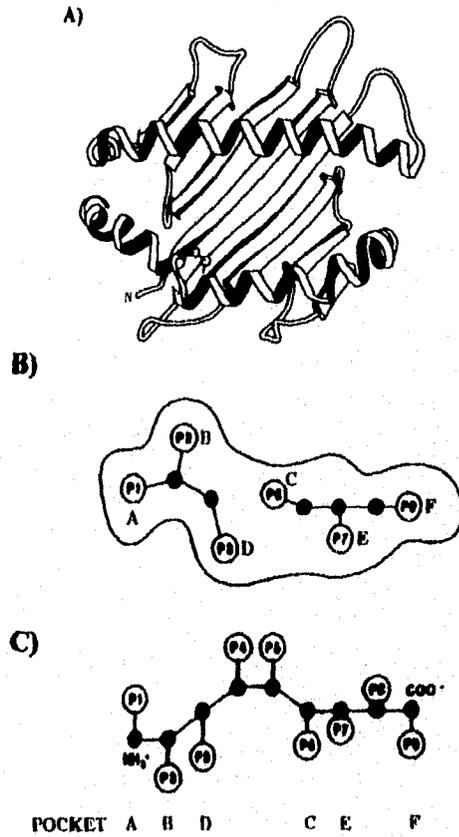
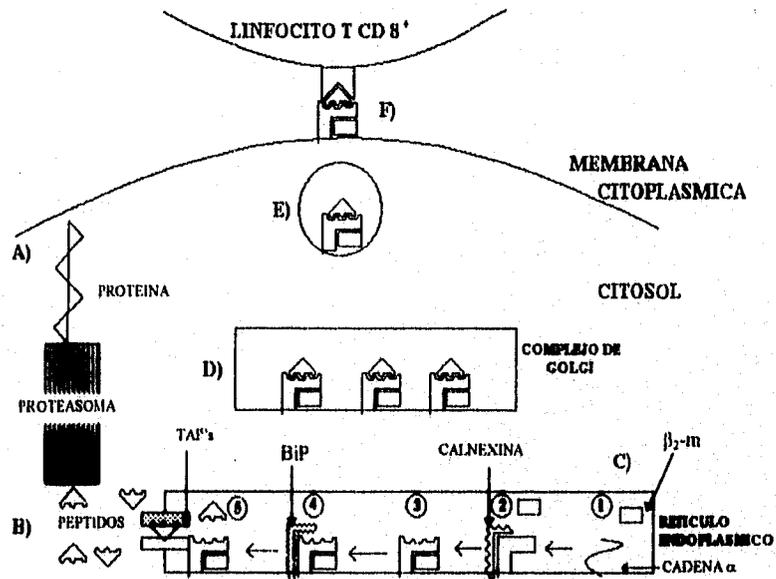


Figura 3. Vía principal de presentación de antígenos sintetizados endogenamente en moléculas del CMH-I (explicación en la página 10).



A) GENERACION DE PEPTIDOS

El citosol es el lugar principal en donde se originan los péptidos que se asocian a las moléculas clase I del CMH (28-29), es por ello que las proteínas a partir de las cuales se generan los péptidos deben de ser degradadas y procesadas antes de que el péptido sea presentado por la molécula clase I. La mayor parte de la actividad proteolítica que ocurre en el citosol es atribuida a la actividad de los proteasomas.

Un proteasoma es un complejo de multisubunidades con un peso de 700 kDa (30-31), su estructura cilíndrica se encuentra formada por al menos 13-15 subunidades distintas de aproximadamente 21-31 kDa; y desarrolla al menos tres actividades proteolíticas distintas *in vitro*. Al caracterizar su especificidad al sustrato, se ha demostrado que el proteasoma corta en los extremos carboxilo terminal de residuos de aminoácidos hidrofóbicos, básicos y ácidos. También se ha descrito que el proteasoma de 700 kDa puede formar parte de un complejo catalítico mayor (1,500 kDa), el cual se relaciona ampliamente con la proteólisis de proteínas modificadas con ubiquitina (30-31).

En lo que respecta a las subunidades que conforman al proteasoma, se ha logrado identificar a dos subunidades conocidas como polipéptidos de bajo peso molecular (*low molecular polipeptides*) LMP2 y LMP7 (32-36). Los genes que codifican estos LMP's se encuentran dentro de la región del CMH, su limitada naturaleza polimórfica, y su expresión inducida por el IFN γ (36-37), son propiedades compartidas por la mayoría de los componentes que se encuentran involucrados en la presentación de antígenos. De hecho, se ha observado que los LMP's pueden alterar la actividad proteolítica del proteasoma y favorecer la generación de péptidos que se asocian a moléculas clase I; más aún, se ha reportado que las subunidades del proteasoma codificadas por el CMH pueden unir físicamente el proteasoma a la maquinaria translocadora de péptidos (35), con lo que se aumenta la eficiencia de la presentación de péptidos, estableciéndose con ello un papel importante tanto para los LMP's como

para los proteasomas en la presentación de antígenos por moléculas clase I.

B) TRANSLOCACION DE PEPTIDOS DEL CITOPLASMA AL RETICULO ENDOPLASMICO

Una vez que los péptidos son generados en el citosol, éstos son transportados al interior del RE por un transportador de péptidos conocido como transportador asociado con la presentación de antígenos (TAP) (38-40) que se encuentra localizado en la membrana del RE y *cis*-Golgi (41). La importancia de su función fue descrita cuando se observó que en células mutantes había una deficiencia en el ensamblaje de moléculas de clase I y se atribuyó a la carencia de péptidos en el RE (42). Las mutaciones y deleciones en estas líneas se encontraban confinadas al CMH, donde dos genes adicionales lograron ser identificados: TAP1 y TAP2 (42-45). Cada gene codifica una proteína transportadora, y tras observar que la transfección de los cADN del TAP1 y el TAP2 en las líneas mutantes se restablecía el ensamblaje de las moléculas clase I y la presentación de antígenos (46-48), se demostraba que el producto de ambos genes es necesario para la formación de complejos péptido-moléculas clase I.

El TAP1 y el TAP2 son miembros de la familia de los transportadores ABC (49). Basándose en la estructura de los miembros de otros transportadores ABC, los cuales contienen dos sitios de unión de ATP y 12-16 segmentos transmembranales, se ha sugerido la formación de un heterodímero TAP1/TAP2 para que pueda desarrollar su función. Usando anticuerpos dirigidos contra el extremo carboxilo terminal del TAP1 se ha co-inmunoprecipitado al TAP2, estableciéndose al menos una asociación física entre ambas proteínas (42,50). Posteriormente se demostró que el transporte de péptidos mediado por el TAP es dependiente de ATP (38-39, 51).

En estudios recientes (52,53) se ha observado una interacción física entre el complejo TAP con el complejo cadena pesada- β_2 -m. Al parecer esta

interacción es mediada por la subunidad TAP1. La disociación del transportador de la molécula clase I coincide con la salida del complejo del RE, y al menos *in vitro*, esta disociación puede ser inducida por la adición de péptidos. El transportador se une a complejos pre-ensamblados únicamente, ya que no se ha detectado asociación entre cadenas pesadas libres y el TAP. Estas observaciones sugieren la posibilidad de un encauzamiento metabólico para el llenado de moléculas de clase I con péptidos, lo cual se lograría colocando a las recién sintetizadas moléculas de clase I en estrecha proximidad con el TAP, con lo que la implantación del péptido en la cavidad de unión del péptido de las moléculas de clase I puede ser facilitado y de esta manera evitar la dilución, salida del RE o degradación de los péptidos translocados.

C) CHAPERONAS EN EL ENSAMBLAJE DE MOLECULAS CMH CLASE I

A pesar de que algunos péptidos pueden unirse a cadenas pesadas libres (54-55), la mayoría de las cadenas pesadas de clase I se pliegan, se asocian con β_2 -m y luego unen al péptido (56-57). A pesar de que el ensamblaje puede ser reconstituido *in vitro* a partir de subunidades purificadas, las cadenas peptídicas recién sintetizadas deben de completar su plegamiento y ensamblaje antes de que lleguen a la superficie celular. Se piensa que este proceso es mediado por interacciones transitorias con chaperonas moleculares que residen en el lumen de el RE, tal como BiP, GRP94, y calnexina (58-59).

La chaperona mejor caracterizada en los eventos de ensamblaje en fases tempranas de las moléculas clase I es la calnexina, una proteína de membrana residente en RE con un peso de 88 kDa (p88) en el ratón y 90 kDa en el humano (IP90) (60-61). Se ha notado que la calnexina se asocia con las recién sintetizadas cadenas pesadas de clase I durante, o poco después, de su traslocación en el RE (62). En ausencia de β_2 -m, el ensamblaje de los complejos de clase I no pueden ser completados, y consecuentemente, las cadenas pesadas permanecen unidas firmemente a la calnexina hasta que son degradadas; mientras que en la presencia de

cadena pesada, β_2 -m, y péptidos, la interacción con la calnexina es momentánea.

En líneas celulares humanas la disociación de la calnexina de la cadena pesada parece ser independiente de la presencia de péptidos (63), siendo la asociación entre la β_2 -m con la cadena pesada la que provoca la disociación con la chaperona; por lo que se piensa que otra chaperona (BiP u otra) prevenga la salida del complejo sin péptido a la superficie celular. Más aún, se hipotetiza que existan otras moléculas chaperonas que interactúen en algún paso de la presentación de antígenos, tales como las proteínas de choque térmico residentes del RE (64-66), aunque no se conoce su función precisa.

V. VIA ALTERNA DE PRESENTACION DE ANTIGENOS

El análisis de péptidos asociados a moléculas clase I ha conducido a la identificación de una segunda vía para el procesamiento y la presentación de antígenos. Se observó que en la línea celular mutante T2, la cual carece de los genes que codifican a los TAP's y a los LMP's, presenta un campo de péptidos asociados a moléculas HLA-A2.1 comparable al de células normales, indicando que las moléculas se encuentran ocupadas por péptidos. Sin embargo, la complejidad de los péptidos era pobre, con seis especies representando el 50% del total (67-68). Debido a que las seis se originan a partir de proteínas translocadas al interior del RE o dominios de secuencias señal (67-68), se propuso que los péptidos que se asociaban a moléculas HLA-A2.1 eran producidos después de la proteólisis de las secuencias señal en el RE por la acción de enzimas proteolíticas residentes en el RE. Posteriormente se demostró que muchos péptidos aislados de la molécula HLA-B7 de células normales también se derivan de péptidos señal (69). Aunado a ello, se logró identificar a un epitopo peptídico restringido a la molécula clase I de ratón H-2D^b del virus de la coriomeningitis linfocítica derivado de la secuencia señal del precursor glicoproteico GP-C (70). Así, esta segunda vía puede dar lugar a péptidos que son reconocidos por linfocitos T durante una respuesta inmune

normal, con lo que cabe la posibilidad de que existan epitopos peptídicos en el dominio de secuencias señal de proteínas antigénicas.

VI. EXPRESION DE PEPTIDOS ASOCIADOS A MOLECULAS DEL CMH CLASE I

La capacidad que tienen las moléculas de clase I para unir a un gran número de péptidos distintos es de gran importancia para la función que desempeñan. La espectrometría de masas en tándem/ionización por electrospray ha proporcionado evidencia directa de esta capacidad a partir de un evaluación de la complejidad de péptidos procesados naturalmente y asociados con moléculas del CMH. Se ha logrado detectar más de 2.000 péptidos distintos asociados con la molécula de clase I HLA-A2.1 y -B7 (69,71). A pesar de ello, la representación de péptidos individuales es absolutamente variable. Por ejemplo, en un análisis espectrométrico de masas de péptidos asociados con HLA-A2.1 indicaba que casi el 90% de los péptidos asociados estaba presente en una proporción de 0.01%-0.1% del total del extracto, o lo que es lo mismo 100-1000 complejos por célula. Con el uso de cantidades más grandes de material inicial aunado a una fraccionación adicional por HPLC, se ha logrado visualizar péptidos que representan hasta una copia por célula.

Ya que la mayoría de las células consideradas en los estudios anteriores expresan de 10^5 - 10^6 moléculas de CMH por célula, si tan solo el 1% de las moléculas CMH estuvieran ocupadas por péptidos de la abundancia referida, el número total de péptidos distintos presentados podrían ser más de 10.000. Mediante el análisis de espectrometría de masas y análisis de Edman se ha podido detectar que el péptido más abundante asociado con moléculas de clase I es de 0.4-1% con respecto al número total de péptidos, considerándose entonces 4.000 complejos por célula (69,71-73). Interesantemente, un grupo de investigación logró estimar que un péptido del virus de estomatitis vesicular ocupaba más de 5% de las moléculas H-2K^b en una célula infectada (74). El determinar si este número tan alto e inusual proviene de una infección viral o de otros cambios en el metabolismo celular permanece por ser dilucidado.

El impacto en el sistema inmune de esta amplia cantidad de péptidos es aún incierta. Se ha estimado que el número mínimo de complejos CMH-péptido expresados en las células y que son reconocidos por los linfocitos T como epitopos están generalmente en el intervalo de 100-500 complejos por células (75-79), sin embargo, algunos epitopos pueden estar presentes en cantidades significativamente mayores o menores (71,80). También se ha observado una falta de correlación entre la afinidad de péptidos que se encuentran de manera natural con respecto a su abundancia relativa, sugiriendo que la abundancia de la proteína de origen aunado al procesamiento son importantes para el número de complejos que son presentados en la membrana celular.

VII. IDENTIFICACION DE EPITOPOS

Actualmente existen algoritmos que permiten la identificación de la secuencia más probable de una proteína para poderse unir a moléculas CMH (81,82), este sistema ha tenido más éxito para moléculas de clase II. La predicción de epitopos peptídicos restringidos a moléculas CMH que sean capaces de ser reconocidos por linfocitos T, ha sido posible al sintetizar péptidos a partir de una región de interés de una proteína, cuya secuencia es conocida (83). En contraste, la identificación de péptidos que se restringen a moléculas clase I ha sido más problemático debido a las secuencias cortas de 8-10 aminoácidos. En consecuencia, varios grupos han usado la información acerca de los "motifs" y su papel en la unión del péptido con las moléculas clase I, para poder definir péptidos que sean óptimos en la predicción de epitopos (76,79,84-86).

Por medio de HPLC en fase reversa se ha podido establecer que los péptidos sintéticos utilizados eran idénticos a los péptidos que se producen de manera natural en la célula y que se asocian a moléculas CMH, además de reconstituir la actividad de extractos celulares y migrar en un patrón similar cuando se les somete a HPLC de fase inversa (74,77,87). Una extensión importante de este tipo de trabajos ha sido la identificación de epitopos peptídicos restringidos a moléculas CMH a partir de la secuencia de una proteína intacta.

Actualmente el uso de "motifs" que sean específicos a un alelo (tabla 1) ha facilitado la identificación de epitopos por medio de la síntesis y la prueba de un número relativamente pequeño de péptidos. Esta técnica ha sido usada por cuatro grupos de investigación, los cuales han empleado esta idea para la localización de epitopos de linfocitos T restringidos a moléculas clase I (88-91). En un caso el péptido sintetizado ha sido idéntico al péptido producido por la célula (89).

Tabla 1. "Motifs" dominantes y auxiliares de péptidos que se asocian a algunos alelos del CMH clase I humanos (Tomado de Ref. 98)

	POSICION								
	2	3	4	5	6	7	8	9	
HLA-A1	T/I	E/D ¹	P			L/M/I		Y	
HLA-A2	L/M							V	
HLA-A3	L	F/Y			NC ²	L/F/Y		V/K	
HLA-A11	HI ³							K	
HLA-A24	V							F/L	
HLA-A31	L/V/Y/F	F/L/Y/W			L/F/V/I			R	
HLA-A33	A/I/L/F							R	
HLA-Aw68	V/T							R/K	
HLA-B7	P	R						L	
HLA-B8	L/P	K/R		K/R			L ⁴		
HLA-B14	R/K	L/V/F		R/H	I/L			L	
HLA-B27	R	Y/F/I						R/K	
HLA-B35	P							Y/HI	
HLA-B37	D/E			V/HI				HI	
HLA-B40	K	F/I						L	
HLA-B44	E	I	P		V			Y	
HLA-Bw53	P		E						
HLA-Cw3		HI	P		F/Y			L/F/M/I	
HLA-Cw4	Y/F/P				V/I/L			L/F/M	
HLA-Cw6	P/R			I/L	V/I/L			L/I/V/Y	
HLA-Cw7	Y/P			V/Y	V/I			Y/F/L	

¹ Residuos ancla que son dominantes se encuentran en **negritas**.

² NC indica residuos de aa no cargados.

³ HI indica aa hidrofóbicos.

⁴ PB es el aa C-terminal.

Mientras que estos estudios apoyan el uso de "motifs" para predecir epitopos de linfocitos T, otros estudios han demostrado que parte de los péptidos que se sitúan fuera de los sitios de anclaje tienen un efecto significativo y en muchos casos pueden abatir la unión totalmente. Varios

Investigadores han intentado definir péptidos que se unan a moléculas clase I provenientes de proteínas virales u otras basándose en los "motifs" de los residuos de anclaje y un tamaño óptimo. En muchos casos, la unión de estos péptidos suele ser débil a pesar de la presencia del "motif" óptimo (80,92-97). Un segundo problema relacionado para la predicción usando "motifs" es la definición de criterios que son muy restrictivos, en cuyo caso un epitopo peptídico que no cumpla los requisitos podría perderse.

Varios epitopos peptídicos que son reconocidos por las células T con un tamaño mínimo de 10 a 11 residuos aminoácídicos han sido identificados (84,99,100), y a pesar de que el uso del extremo C-terminal como un residuo ancla dominante es el más común, se ha encontrado evidencia para el uso de residuos internos del péptido (71). Adicionalmente, muchos péptidos pierden uno o más elementos de "motifs" más complejos, y algunos parecen expresar "motifs" secundarios inusuales (69,71). Obviamente, aún queda mucho por descubrirse acerca de los factores que controlan la fuerte unión de un péptido a moléculas del CMH. Los "motifs" estructurales pueden ser de gran utilidad para la predicción de epitopos si se usan con flexibilidad. De acuerdo a un análisis sistemático de los péptidos que se unen a HLA-A2.1, se ha desarrollado un algoritmo capaz de predecir péptidos con gran capacidad de unión con una alta frecuencia (94).

VIII. TECNICAS PARA EL ANALISIS DE PEPTIDOS PROCESADOS NATURALMENTE ASOCIADOS A MOLECULAS DEL CMH

A) PURIFICACIÓN

Los péptidos procesados naturalmente que se asocian a moléculas clase I y II del CMH son aislados por lo general a partir de material que ha sido previamente purificado por inmunofinidad, seguido por una fraccionación basada en el tamaño para poder eliminar las proteínas del CMH (74,101). La recuperación de péptidos por esta técnica se ha estimado en un intervalo de 70-80% de las moléculas totales de CMH (67,69,73,102), indicando que el material es una muestra representativa.

El análisis de los péptidos asociados con una amplia gama de moléculas CMH humanas ha sido obstaculizado por la falta de anticuerpos monoespecíficos para la purificación de isoformas del CMH, requiriéndose el uso de células homocigotas o transfectadas, o bien la eliminación secuencial de moléculas CMH usando de manera progresiva anticuerpos menos selectivos.

Una técnica alternativa para la purificación de péptidos involucra la extracción a partir de células completas con ácido trifluoroacético (103,104), aunque los extractos contendrían péptidos de varias moléculas del CMH, también existiría material que podría considerarse asociado a moléculas del CMH. Sin embargo, esta técnica puede ser de gran valor para el aislamiento de péptidos que representan etapas intermedias en el procesamiento de antígenos.

B) SECUENCIACION DE LA MEZCLA DE PEPTIDOS

El análisis de péptidos individuales asociados con moléculas clase I ha guiado a la identificación de un número significativo de péptidos que no contenga "motifs" predichos por la secuenciación de la mezcla de péptidos; sin embargo, como los péptidos extraídos a partir de un alelo representan una mezcla compleja de distintas especies de baja abundancia, el aislamiento de péptidos individuales ha sido un factor limitante para su análisis. La estrategia más usada emplea el HPLC en fase reversa para resolver parcialmente a la mezcla de péptidos, seguido por una degradación de Edman del material contenido en picos dominantes que se encuentran bien aislados y así obtener una secuencia (105,106). El uso de este protocolo se encuentra limitado por el hecho de que los picos individuales obtenidos por HPLC aún contienen múltiples especies de péptidos. El problema se solucionó mediante el uso de espectrometría de masa de desorción de láser para identificar masas individuales en fracciones de HPLC cuyo tamaño puede ser correlacionado con la información de la secuencia obtenida por la degradación de Edman (102,107).

Otra técnica usada para identificar a los péptidos asociados a moléculas del CMH ha sido mediante el uso de HPLC microcapilar en combinación con ionización por electrospray/espectrometría de masas en tándem (73,108). En esta técnica los péptidos son separados por uno o más pasos de HPLC en fase reversa, y luego por la relación masa a carga en el espectrómetro de masa. Las especies individuales son secuenciadas directamente en el espectrómetro de masas por el análisis de disociación activada por colisión (109). La información de una secuencia puede ser obtenida hasta con 300 fmol de péptido, lo cual es significativamente menor a lo requerido en el análisis de Edman, la cual requiere de corridas adicionales en derivados del péptido modificado químicamente e interpretación de varios espectros de masa. Pero debido a su capacidad de resolver la secuencia de péptidos la técnica de HPLC microcapilar proporciona la información más detallada acerca de la complejidad de la mezcla de péptidos asociados a moléculas CMH.

IX. CANCER CERVICO-UTERINO

A) ETIOLOGIA

El carcinoma cérvico-uterino es una de las principales causas de muerte entre las mujeres por cáncer en México (110,111), aunado a que afecta a mujeres relativamente jóvenes, lo que reduce su tiempo de vida de manera considerable. En términos globales, su amplia variación en la incidencia mundial indica que el impacto de este cáncer puede ser reducido aplicando el conocimiento actual a las poblaciones con mayor incidencia y tasa de mortalidad, tal como lo es México y países centroamericanos, en donde la incidencia es de 40-50 casos por 100,000 habitantes (110). Entre los métodos que se han empleado o sugerido para controlar a esta enfermedad se encuentran el modificar el comportamiento sexual, vacunación contra el virus del papilloma humano (VPH), realizar pruebas contra la infección del VPH, seguimiento citológico, detección clínica temprana y terapia improvisada.

La historia de un cáncer puede dividirse en dos partes: inducción y proliferación de las células transformadas. La inducción engloba a todos

los cambios persistentes que ocurren en una o más células, las cuales subsecuentemente se convierten en las generadoras de las poblaciones de células malignas de la etapa de proliferación. La inducción puede ser debida a factores genéticos hereditarios o a mutaciones, así como a factores epigenéticos.

En el caso del cáncer cérvico-uterino los factores de riesgo que se han establecido son una edad temprana en las relaciones sexuales, un alto número de compañeros sexuales, fumar (112,113), dieta pobre en fruta, vegetales y algunos micronutrientes (vitamina C, β -carotenos, folato) (114-116), uso de anticonceptivos orales (117-119), y la presencia de ciertas moléculas CMH clase II (120,121). Sin embargo, se asocia de manera más tangible con una etiología viral; estudios realizados desde 1966 empiezan a relacionar a agentes virales con este tipo de cáncer (122,123). Recientemente, se han descrito algunas evidencias moleculares, como es la presencia de antígenos virales en células de carcinoma cérvico-uterino, lo que apoya la hipótesis de que el desarrollo de esta neoplasia se relaciona estrechamente con la transformación celular por infección con virus (124). Entre los principales agentes virales se han encontrado: el VPH, el virus del herpes genital y en menor grado el citomegalovirus (125). La mayoría de los estudios actuales consideran que el VPH es el principal agente etiológico, además de proponerse un papel sinérgico del virus del herpes con el VPH en el desarrollo de la neoplasia (126).

Los VPH representan a un grupo heterogéneo de agentes que infectan tejidos epiteliales. Llegándose a clasificar a 70 tipos diferentes de VPH basándose en su material genético, de los cuales 23 pueden infectar al hombre y a la mujer, pero los que más frecuentemente se han detectado son los VPH 11, 16, 18 y 31 que están asociados con la transformación de células epiteliales del cérvix así como las del cuello del útero produciendo lesiones denominadas NIC (Neoplasia Intraepitelial Cervical). Su etiología se ha confirmado mediante estudios citológicos e

histológicos de tejidos infectados, en condilomas o epitelio cervical (122,127).

Los virus que pertenecen a la familia del *Papilloma* tienen una estructura compuesta por una doble cadena de ADN que contiene aproximadamente 7800-7900 pares de bases, además se caracterizan por presentar un virión no envuelto, una cápside icosaédrica y replicación dentro del núcleo de las células infectadas. El genoma viral codifica para dos clases de proteínas: las proteínas "tempranas" (*early proteins*) cuya función es la de regular la replicación del ADN viral (E1 y E2), la transcripción del ARN (E2) y la transformación celular (E5, E6 y E7); y las proteínas "tardías" (*late proteins*) L1 y L2, las cuales son requeridas para el ensamblaje de partículas virales infecciosas (122). El ADN viral se replica en forma extracromosomal. En la transformación maligna relacionada con el VPH, el ADN viral puede estar integrado al ADN celular, lo que resulta en la ruptura de grandes fragmentos del genoma viral. Los genes tardíos L1 y L2 y algunos genes tempranos (E1 y E2) generalmente se pierden, quedando solamente los segmentos E6 y E7 como zonas de apertura de lectura frecuentemente encontrados en carcinomas (124). La consiguiente transcripción de los genes E6 y E7 es acompañada de un aumento en la proliferación de las células infectadas y el aumento en las posibilidades de transformar malignamente a las células.

B) RESPUESTA INMUNE AL CANCER CERVICO-UTERINO

B.1) Inmunidad humoral

Varios investigadores han confirmado la presencia de anticuerpos contra proteínas E7 de VPH-16 y VPH-18 encontrados frecuentemente en suero de pacientes con cáncer cervical (128-136). Otros investigadores han detectado anticuerpos contra la proteína E2 de VPH-16 y VPH-18 (133) así como anticuerpos contra la proteína E4 (132) y E6 (136) de VPH-16 en suero de pacientes con CaCu. Estos estudios han permitido sugerir que algunas de estas proteínas virales son inmunogénicas y pueden representar los blancos específicos de la vigilancia inmune hacia tumores relacionados con VPH.

B.2) Inmunidad mediada por células

La inmunidad mediada por células desempeña un papel importante en el control de neoplasias asociadas a VPH, las cuales ocurren con mayor frecuencia en poblaciones con una inmunidad celular deprimida (137). En los últimos años, la inmunidad mediada por linfocitos T a infecciones por VPH ha sido facilitada por la identificación de epitopos o péptidos derivados de proteínas de VPH presentados por moléculas clase I y II del CMH. Varios grupos han intentado mapear en ratón y humano péptidos de proteínas de VPH para estimular linfocitos T auxiliares (T_h); por ejemplo un grupo logró identificar un péptido para linfocitos T_h a partir de la proteína E7 de VPH-16 (aminoácidos 48-54) (138). Aunado a ello, varios grupos de investigadores también han tratado de mapear péptidos para estimular a linfocitos T citotóxicos en ratones y en humanos (139-144) sobre proteínas de VPH. Por ejemplo, se ha reportado la identificación de un péptido para estimular linfocitos T a partir de la proteína E7 de VPH-16 a través de H-2K^b y H-2D^b en estudios de unión de péptidos sintéticos a estas moléculas, resultando en una auténtica protección del ratón inmunizado con estos péptidos, hacia un subsecuente reto contra el tumor (140). Otro grupo de investigación logró identificar a epitopos peptídicos en la proteína E6 del VPH-16 para linfocitos citotóxicos de ratones con el haplotipo H-2^b (143). Posteriormente, se ha logrado identificar varios péptidos sintéticos de proteínas E6 y E7 de VPH-16 que se unen con alta afinidad a alelos humanos HLA-A (143,144). Recientemente, se logró identificar por medio de ensayos *in vivo* e *in vitro* a péptidos de las proteínas E6 y E7 del VPH-16 que podían estimular a los linfocitos citotóxicos de ratones transgénicos y de donadores de sangre normales que expresaban el alelo HLA-A*0201 (146).

Estudios enfocados hacia la respuesta inmune local, a nivel de tejido cervical infectado, han demostrado una disminución en el número de células presentadoras profesionales, las cuales son de vital importancia para desarrollar una respuesta mediada por linfocitos T; en verrugas producidas por infección con VPH se ha encontrado que la densidad de células Langerhans es dramáticamente reducida en comparación con el

tejido normal de algunos pacientes (147-149). Otro aspecto importante es que las células cervicales normales, secretan muchas citocinas de manera constitutiva, mientras que en células cervicales inmortalizadas con VPH o líneas de carcinoma cervical, existe una disminución en la producción de citocinas (150,151).

También a nivel local, se ha encontrado que los macrófagos y células NK participan de manera importante en la eliminación de células cervicales infectadas con VPH (152). Finalmente, los macrófagos son importantes mediadores celulares de la inmunidad antitumor, ya que pueden reconocer de manera selectiva y destruir células neoplásicas asociadas con VPH-16 (153) al transfectar células con el oncogene E7 de VPH-16 y encontrar susceptibilidad de estas células a ser lisadas por macrófagos activados.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Hoy en día una de las principales causas de mortalidad en nuestro país es la originada por el cáncer, a pesar de que existen muchas estrategias para combatirlo, aún no se ha logrado el éxito en la mayoría de los casos, sobretodo en los que la detección no ha sido oportuna. En los últimos años se ha realizado una gran cantidad de estudios a nivel molecular, con la finalidad de crear vacunas que sean específicas en contra de antígenos presentes en las células cancerosas. En la actualidad, uno de los estudios con gran posibilidad de éxito es la obtención y caracterización de péptidos antigénicos, producto del procesamiento de proteínas sintetizadas endógenamente en la célula, que se encuentran asociados con moléculas clase I del CMH propias de células que han sufrido infecciones virales o bien, se han transformado en cancerosas. La purificación de moléculas del CMH para obtener a dichos péptidos, ha sido un problema limitante. Por esta razón en este trabajo se usaron anticuerpos monoclonales y técnicas cromatográficas con la finalidad de obtener y caracterizar a antígenos tumorales, con vías a la fabricación de vacunas específicas contra tumores que porten a estos antígenos; por lo que se tomó como modelo de estudio a dos líneas celulares de carcinoma de cérvix humano, denominadas Calo e Inbl, las cuales se asocian etiológicamente con una infección de VPH tipo 18

OBJETIVOS GENERALES

- a) Obtener péptidos antigénicos presentados por moléculas clase I del Complejo Mayor de Histocompatibilidad en las líneas Calo e Inbl de carcinoma cérvico uterino
- b) Analizar hidrofílicamente la presentación de péptidos en los diferentes alelos del Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase I de las líneas celulares Calo e Inbl.

OBJETIVOS PARTICULARES

- a) Obtener anticuerpos monoclonales que reconozcan a alelos del complejo mayor de histocompatibilidad clase I en las líneas Calo e Inbl.
- b) Purificar y verificar el reconocimiento específico de los anticuerpos monoclonales hacia su respectivo alelo del complejo mayor de histocompatibilidad clase I en las líneas celulares.
- c) Obtener moléculas de los alelos del complejo mayor de histocompatibilidad clase I de las líneas celulares Calo e Inbl.
- d) Eluir los péptidos asociados a cada uno de los alelos de las moléculas clase I del CMH en células de las líneas Calo e Inbl.
- e) Analizar la hidrofílicidad de los péptidos asociados a los diferentes alelos de cada línea celular.

HIPOTESIS

Se conoce que las moléculas del CMH-I presentan en la membrana de las células nucleadas, péptidos derivados de la síntesis y procesamiento de proteínas endógenas propias o producto de alguna infección viral, los cuales pueden ser potencialmente reconocidos por linfocitos T en la respuesta inmune celular. Por otra parte, recientemente se ha reportado que en tumores de carcinoma cérvico uterino con infección de VPH, la presentación de péptidos por moléculas clase I del CMH puede estar disminuida o nulificada (154), asociándose este fenómeno con la evasión de la respuesta inmune celular. Para este estudio, contamos con dos líneas celulares de carcinoma cérvico uterino (Calo e Iub1) las cuales presentan infección con VPH tipo 18. En consecuencia si obtenemos moléculas clase I del CMH de los diferentes alelos que constituyen el haplotipo de cada línea celular esperamos encontrar una disminución o nulificación en la expresión de péptidos con carácter antigénico asociados a alelos de las líneas celulares de carcinoma cérvico-uterino.

MATERIAL Y METODO

Con la finalidad de llevar a cabo los objetivos planteados anteriormente se realizó la siguiente metodología de trabajo.

CULTIVO DE LINEAS CELULARES

Se cultivaron las líneas celulares de carcinoma cérvico-uterino Calo e Inbl (cuyo haplotipo de moléculas clase I se muestra en la tabla 2), que fueron obtenidas de dos biopsias diferentes de pacientes con carcinoma cérvico-uterino (155). Los hibridomas PA2.1, A11.1M, B27.M1, SFR8-B6 (comprados en el American Tissue Cell Culture, U.S.A.), que reconocen a los alelos HLA-A28, HLA-A11, HLA-B27, HLA-Bw6 respectivamente (156-159). El hibridoma W6/32 (donado por el Dr. Gerld Moldehauer del Centro de Investigación en Cáncer en Heidelberg, Alemania) reconoce a la totalidad de moléculas clase I (160). El medio de cultivo usado fue RPMI 1640 (Microlab, México) con 10% de suero fetal de bovino (HyClone, USA). La incubación de las células se efectuó a una temperatura de 37°C, con una atmósfera de 5% de CO₂ y ambiente saturado de humedad (161).

Tabla 2. Tipificación de las moléculas de histocompatibilidad clase I presentadas por las líneas celulares de carcinoma cérvico-uterino Calo e Inbl.

LÍNEA CELULAR	MOLECULAS HLA
CALO	HLA-A23 HLA-A28 HLA-B27 HLA-B45 HLA-Bw6
INBL	HLA-A11 HLA-Aw33 HLA-B14 HLA-B38 HLA-Bw6 HLA-Cw3 HLA-Cw4

SUBCULTIVO DE LINEAS CELULARES

Las células Calo o Inbl en fase de crecimiento exponencial fueron resembradas de la siguiente manera. El medio de cultivo fue desechado y se adicionó 50 ml de verseno dejando incubar a 37°C por 10 minutos y después de ligera resuspensión, la solución celular fue centrifugada a 250 xg durante un tiempo de cinco minutos. Una vez realizado esto, se colectaron los botones celulares y fueron lavados una vez con solución amortiguadora de fosfatos (SAF) (Apéndice 1), se cuantificó el número de células por medio de hemocitómetro y el botón celular se congeló a -70°C. En el caso de los hibridomas el medio de cultivo fue centrifugado a 1,500 xg por 10 minutos y al sobrenadante se le centrifugó nuevamente a 20,000 xg por 30 minutos, finalmente se colectó el medio condicionado en un recipiente de vidrio estéril y de color ámbar. Los botones celulares fueron resuspendidos con el medio de cultivo y se cuantificó la viabilidad de los hibridomas con ayuda del colorante azul de tripano (Sigma, U.S.A.), el cual tiene la propiedad de teñir de azul a las células que han sufrido ruptura de su membrana plasmática. Las células fueron cuantificadas con un hemocitómetro y se colocaron de 1×10^6 a 2×10^6 de células vivas por botella (Corning, U.S.A.) de 900 ml (162).

CRIOPRESERVACION DE LAS LINEAS CELULARES

Con la finalidad de preservar a las líneas celulares en diversos pasajes y de manera indefinida se realizó la técnica de criopreservación, la cual consistió en colocar a células que se encontraban en fase de crecimiento exponencial en medio de congelación, compuesto de suero fetal de bovino (Hyclone, U.S.A.) al 90% y dimetil sulfoxido (Sigma, U.S.A.) al 10%. Inmediatamente después, las células se repartieron en viales de criopreservación de 1.8 ml (Nalge, U.S.A.) de manera tal que en cada vial hubieran de 1×10^6 a 2×10^6 de células, y finalmente fueron congelados a -70°C y posteriormente colocados en nitrógeno líquido (163).

OBTENCION DE ASCITES

Para poder obtener una mayor cantidad de anticuerpo en el menor tiempo posible se sensibilizó a ratones de la cepa Balb/C con 1 ml de pristano

(Sigma, U.S.A.) inyectado en la cavidad peritoneal; y después de una semana se inyectó a cada ratón de manera individual 5×10^6 células en 1 ml de SAF de los hibridomas PA2.1, A11.1M, B27.M1 y W6/32 en la cavidad peritoneal. Después de otra semana se colectó la ascites por medio de una punción en la cavidad peritoneal y se centrifugó por 10 minutos a 1500 xg; para después inactivar el sobrenadante a 56°C en baño maría por 45 minutos, y finalmente se centrifugó a 20,000 xg por 30 minutos y se filtró por membranas de 0.45 μ diluido a una relación 1:10 con SAF (162).

SEPARACION DE ANTICUERPOS POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD

Los anticuerpos monoclonales contenidos en el medio condicionado y en la ascites fueron purificados por medio de una cromatografía de afinidad usando una matriz de afinidad de proteína A-Sefarosa (Pharmacia, Biotech, Suecia), o bien de proteína G-Sefarosa (Sigma, U.S.A.) (Tabla 3)

TABLA 3. Selección de matriz para purificar anticuerpos monoclonales a partir de medios condicionados o ascites.

HIBRIDOMA	ISOTIPO DEL ANTICUERPO	MATRIZ USADA
PA2.1	IgG ₁	PROTEINA G
A11.1M	IgG ₁	PROTEINA G
B27.M1	IgG _{1a}	PROTEINA A
SFR8-B6	IgG _{2b}	PROTEINA G
W6/32	IgG _{2a}	PROTEINA A

La matriz fue previamente lavada con SAF, y después empacada en columnas de 10 ml (Sigma, USA), se le hizo pasar el medio condicionado o la ascites diluida 1:10 con SAF, a una velocidad de 1 ml/minuto, y a una temperatura de 4°C. Después de pasar todo el volumen del medio condicionado o de ascites, se lavó la columna con una solución SAF hasta que no se obtuvo ningún residuo de proteína en el eluyente, lo cual se

determinó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 280 nm. A continuación se eluyó el anticuerpo haciendo pasar por la columna una solución de ácido clorhídrico y glicina con un pH de 2.8 (Apéndice 2). A la solución ácida que contenía el anticuerpo se le neutralizó a un pH= 7-7.5 con Tris-Acido clorhídrico con un pH de 9. El anticuerpo desprendido fue cuantificado de acuerdo a la densidad óptica a 280 nm para IgG de 1.35 para 1 mg de anticuerpo por ml. de solución, finalmente el anticuerpo fue dializado contra un amortiguador de acoplamiento en una membrana de 12 kDa, para así dejarlo listo para su acoplamiento a la Sefarosa activada con CNBr (Pharmacia, Biotech, Suecia) (164).

VERIFICACION DEL RECONOCIMIENTO DE LOS ANTICUERPOS HACIA LOS ALELOS DEL CMH CLASE I

Para verificar el reconocimiento de los anticuerpos hacia cada uno de los alelos del CMH-I se usó la técnica de citofluorimetría de flujo, en la cual por cada 500.000 células de la línea de carcinoma de cérvix Calo e 1nb1 previamente lavadas dos veces con una solución consistente en SAF al 98% y suero fetal de bovino (Hyclone, U.S.A.) al 2%, se incubaron con 10 µl del anticuerpo primario. (el que se deseara probar), a una concentración de 1 µg/100µl SAF-suero fetal de bovino, y se dejó reposar durante 30 minutos a una temperatura de 4°C. Una vez que transcurrió este tiempo se centrifugaron a 300 xg por cinco minutos y se lavaron dos veces con la solución SAF-suero fetal de bovino. Posteriormente se le adicionó al botón celular el anticuerpo secundario GAM-FITC (Dako, USA), el cual reconoce a la región Fc del anticuerpo primario, además de estar marcado con isotiocianato de fluoresceína; y se procedió a incubar por 30 minutos a 4°C; enseguida se lavaron dos veces por centrifugación a 300 xg. Finalmente se adicionó 300 µl de yoduro de propidio con una concentración de 1 µg/ml en SAF-SFB, y se leyó la fluorescencia en el citofluorómetro de flujo Facscan (Beckman, U.S.A.) (162).

OBTENCION DE LOS ALELOS DEL CMH CLASE I

La separación de las moléculas del CMH clase I humano se efectuó por medio de una cromatografía de inmunofinidad, en la cual primeramente

se lisaron a 2×10^{10} células de cada una de las líneas de carcinoma de cérvix humano Calo e Inbl en una relación de volumen de 5:1 con un amortiguador de lisis (Apéndice 3), después se centrifugó a 4.000 xg por 10 minutos, para así poder retirar los organelos más pesados, a continuación el sobrenadante fue preadsorbido con 10 ml de proteína A insoluble (Sigma, U.S.A.), y se centrifugó a una velocidad de 30.000 xg toda la noche, a continuación el sobrenadante fue filtrado a través de una membrana de 0.45μ (Millipore, USA).

Simultáneamente se prepararon las columnas de inmunoadfinidad con los anticuerpos purificados. Para esto 3.5 g de Sefarosa activada con CNBr (Pharmacia Biotech, Suecia) fueron lavados con 700 ml de HCl 1 mM para activar a la Sefarosa. Una vez activada se agregó 60 mg de un anticuerpo purificado en un volumen de 20 ml de amortiguador de acoplamiento y se dejó incubar toda la noche a 4°C con agitación suave. Una vez que el anticuerpo se acopló a la Sefarosa, lo cual se verificó leyendo la absorbancia a 280 nm del sobrenadante, se inactivaron los sitios activos remanentes en la matriz, usando para ello una solución de inactivación por un lapso de 16 horas a 4°C . Después la columna fue lavada en tres ciclos, cada uno de los cuales consistió en un lavado con amortiguador de acetatos 0.1 M conteniendo 0.5 M de NaCl; y otro lavado con un amortiguador 0.1 M Tris-HCl conteniendo 0.5 M de NaCl. Una vez lavada la matriz (Sefarosa-anticuerpo) se empacó en una columna de plástico de 10 ml (Sigma, USA).

Posteriormente se hizo pasar el filtrado obtenido de la lisis de las líneas celulares a través de una columna inespecífica (Sefarosa sin anticuerpo e inactivada), y después a través de las diferentes columnas específicas de los anticuerpos acoplados a la matriz de Sefarosa. El lisado se hizo pasar con ayuda de una bomba peristáltica y a un flujo de 1 ml/minuto, el lisado se hizo pasar por las columnas durante un lapso de 24 horas, al cabo del cual se lavaron las columnas con 500 ml de amortiguador de lavado y finalmente con 4.000 ml de Tris-EDTA pH= 7.8. Una vez hecho lo anterior se desprendieron los alelos pasando por la columna de Sefarosa-

anticuerpo una solución de ácido acético al 10% por 25 minutos. El eluido se colectó en fracciones de 1 ml/min, enseguida se cuantificó la concentración de proteína en cada fracción, con un espectrofotómetro con longitud de onda de 280 nm. Las fracciones con absorbancias altas de proteína fueron reunidas y se introdujeron a un baño con agua en ebullición durante dos minutos. Inmediatamente después de haber eluido a las moléculas CMH-I de las columnas, estas fueron reequilibradas con la solución de Tris-HCl 0.1 M conteniendo 0.5 M de NaCl pH= 8.0. Después de este procedimiento, se hizo pasar nuevamente el lisado celular. Se realizaron dos eluciones en total para cada uno de los anticuerpos utilizados. Los mismos pasos fueron efectuados en el caso de la columna inespecífica para descartar a contaminantes que se acoplaron a la sefarsa de manera inespecífica (162,164).

OBTENCION Y CROMATOGRAFIA DE PEPTIDOS ASOCIADOS A MOLECULAS DE LOS ALELOS DEL CMH CLASE I

La obtención de los péptidos de los alelos se realizó filtrando las fracciones hervidas a través de membranas "Ultrafree-CL" (Millipore U.S.A.), que tienen un poro que permite el paso de moléculas con pesos moleculares menores a 5 kDa. Esta filtración se efectuó por centrifugación a una velocidad no mayor de 5.000 xg. El filtrado, que contenía a los péptidos menores a 5 kDa, fue reducido a un volumen de 500 µl mediante liofilización. Enseguida fue nuevamente filtrado a través de membranas de 5 kDa. Posteriormente se tomaron 20 µl del filtrado y fueron inyectados en un cromatógrafo en líquido de alta resolución (HPLC) (Waters, U.S.A.) a través de una columna de fase reversa Delta Pak 5 µ C₁₈ 300 Å 3.9 x 150 mm (Millipore, U.S.A.) a una temperatura constante de 37°C. La separación de los péptidos se hizo en base a su hidrofiliidad usando un gradiente con crecimiento lineal del 0-60% de acetonitrilo con ácido trifluoroacético (ATF) 0.08% (Fase B) y utilizando una fase hidrofílica de agua con ATF 0.08% pH=2.3 (Fase A). La cromatografía fue realizada en un lapso de 70 minutos, con cinco minutos finales de fase B al 60%. Los picos principales de los péptidos fueron detectados a 218 nm con un módulo de detección de absorbancia (Waters,

U.S.A.) y analizadas en un módulo de datos Waters 746 a condiciones constantes para todos los casos (PT=4,000; PW=6). Las fracciones fueron colectadas a razón de 1 ml cada dos minutos. Para eliminar los posibles contaminantes de fondo contenido en los reactivos, antes de inyectar las muestras se inyectó 20 µl de la fase A, bajo las condiciones ya mencionadas. Los picos obtenidos de las lecturas de fondo eran descartados en las cromatografías efectuadas sobre los péptidos. Para descartar contaminantes de la cromatografía de inmunofinidad, a las fracciones obtenidas de la columna inespecifica se les practicó el mismo tratamiento que a los péptidos de los alelos; los picos obtenidos durante la cromatografía fueron descartados en las cromatografías de los péptidos (67,69,73,102).

VERIFICACION DE LA OBTENCION DE ALELOS DEL CMH CLASE I Y PEPTIDOS.

Para verificar la obtención de alelos de moléculas del CMH clase I y no otras moléculas se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS al 15%, usando patrones de corrida para poder tener una mejor referencia, y como muestras a las moléculas que quedaban atrapadas por el filtro "Ultrafree-CL" de 5 kDa (Millipore, U.S.A.). El voltaje usado fue de 30 mA. Para detectar a las proteínas se empleó la técnica de tinción no amoniacal con plata, la cual consistió en colocar al gel en solución fijadora (Apéndice 4) por 30 minutos, después de retirarla se agregaba solución desestabilizadora por 30 minutos, después de los cuales se retiraba y se agregaba una solución de glutaraldehído por una hora, al cabo de la cual se lavaba varias veces con agua, y se agregaba una solución de DTT por 30 minutos, después de los cuales se retiraba y agregaba AgNO₃ 0.1% en obscuridad por 30 minutos. Se lavaba brevemente con agua y rápidamente con solución desarrolladora, dejándose incubar en esta hasta obtener el patrón de bandeó desecado, para lo cual se agregaba 5 ml de ácido cítrico 2.3 M por cada 100 ml de solución desarrolladora; se lavaba varias veces con agua y el gel era secado a 60°C al vacío durante 3 horas (162).

RESULTADOS

Purificación y acoplamiento de anticuerpos.

Para poder realizar la obtención de los péptidos antigénicos presentados por alelos del CMH-I de las líneas Calo e Inbl fue necesario obtener anticuerpos monoclonales que reconocieran a los alelos del CMH-I de manera específica. Estos anticuerpos fueron purificados a partir de medios condicionados o ascites de hibridomas por medio de cromatografía de afinidad. A continuación se acopló la totalidad de los anticuerpos purificados a sefarsa activada con BrCN, observándose que la cantidad de anticuerpo que se acoplaba era variable (tabla 4).

Tabla 4. Cantidad de anticuerpo acoplado a sefarsa activada con BrCN.

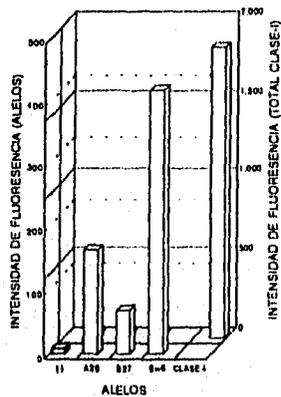
ANTICUERPO	CANTIDAD INICIAL DE ANTICUERPO (mg)	CANTIDAD DE ANTICUERPO ACOPLADO (mg)
α -HLA-A28	59.25	43.12
α -HLA-A11	39.52	39.16
α -HLA-B27	51	44.34
α -HLA-Bw6	88	83.8
α -HLA-A, -B, -C	73	72.76

Especificidad de los anticuerpos purificados

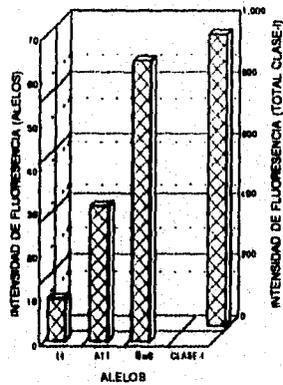
Para cerciorarse que los anticuerpos obtenidos reconocieran de manera específica a los alelos del CMH-I de las respectivas líneas celulares, se realizó una citofluorimetría de flujo, en donde se observó la especificidad de los anticuerpos hacia sus alelos (figura 4); en donde se destaca una alta expresión del alelo HLA-Bw6 en la membrana celular de ambas líneas en comparación a los alelos HLA-A11 para Inbl y HLA-A28, -B27 para Calo (Figura 4), que fueron superiores al control negativo; y sumada la expresión de los alelos HLA-A28, -B27, -Bw6 corresponde aproximadamente al 30% del total de moléculas clase I presente en la línea Calo en el total de moléculas clase I (figuras 4a), mientras que los alelos HLA-A11, -Bw6 cuantifican aproximadamente para el 15% del total de moléculas clase I de la línea Inbl (figura 4b).

Figura 4. Expresión de algunos alelos del CMH-I en dos líneas celulares de carcinoma cérvico-uterino. a) Expresión de algunos alelos del CMH-I en relación al total de moléculas clase I de la línea Calo. b) Expresión de algunos alelos del CMH-I en relación al total de moléculas clase I de la línea Inbl.

a) EXPRESION DE ALGUNOS ALELOS DE LA LINEA DE CaCU CALO EN RELACION AL TOTAL DE MOLECULAS CLASE I



b) EXPRESION DE ALGUNOS ALELOS DE LA LINEA DE CaCU INBL EN RELACION AL TOTAL DE MOLECULAS CLASE I



Obtención de moléculas CMH clase I

Después de acoplar a cada uno de los anticuerpos a la sefarosa, se prepararon las columnas de inmunoadinidad utilizando a los complejos anticuerpo-sefarosa como matrices para aislar a los diferentes alelos que se encontraban en los lisados de las líneas celulares Calo e Inbl (2×10^{10} células por lisado aproximadamente). Las curvas de desprendimiento de alelos aislados después de dos cromatografías se muestran en las figuras 5 y 6 para cada línea celular. En ellas podemos observar que la mayor cantidad de proteína se obtiene entre los primeros diez minutos de elución. También se observó que en una segunda elución es posible recuperar una cantidad importante de moléculas de clase I. Para el alelo HLA-Bw6, se encontró que la máxima cantidad de proteína es obtenida entre los minutos 10 a 15. En algunos desprendimientos observamos un pico de absorbancia hacia el final de la cromatografía (minutos 20-25), que probablemente corresponda a β_2 -m cuyo peso es inferior al de la cadena pesada del CMH-I.

Figura 5 Obtención de moléculas del CMH-I por cromatografía de inmunoafinidad sobre el lisado de la línea Inbl.

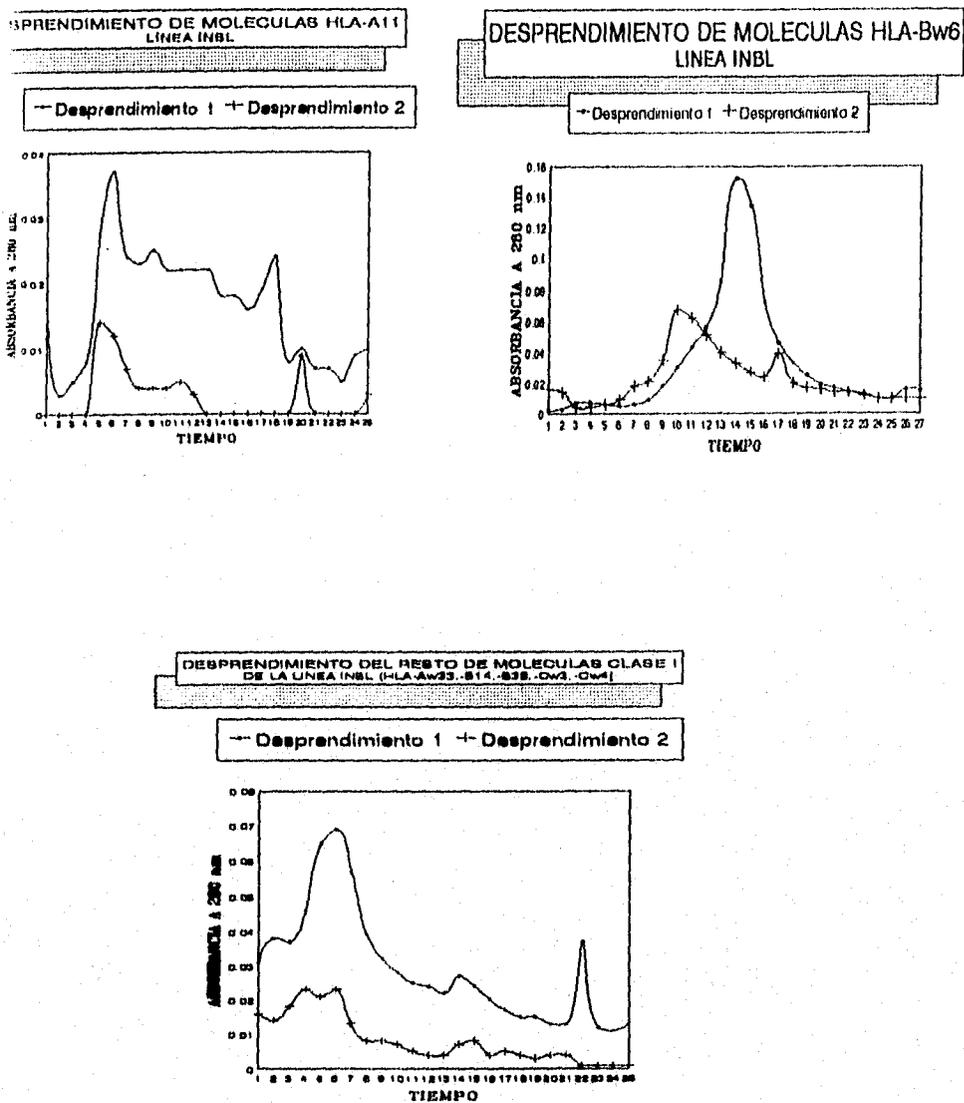


Figura 6 Obtención de moléculas del CMH-I por cromatografía de inmovinoafinidad sobre el lisado de la línea Calo.

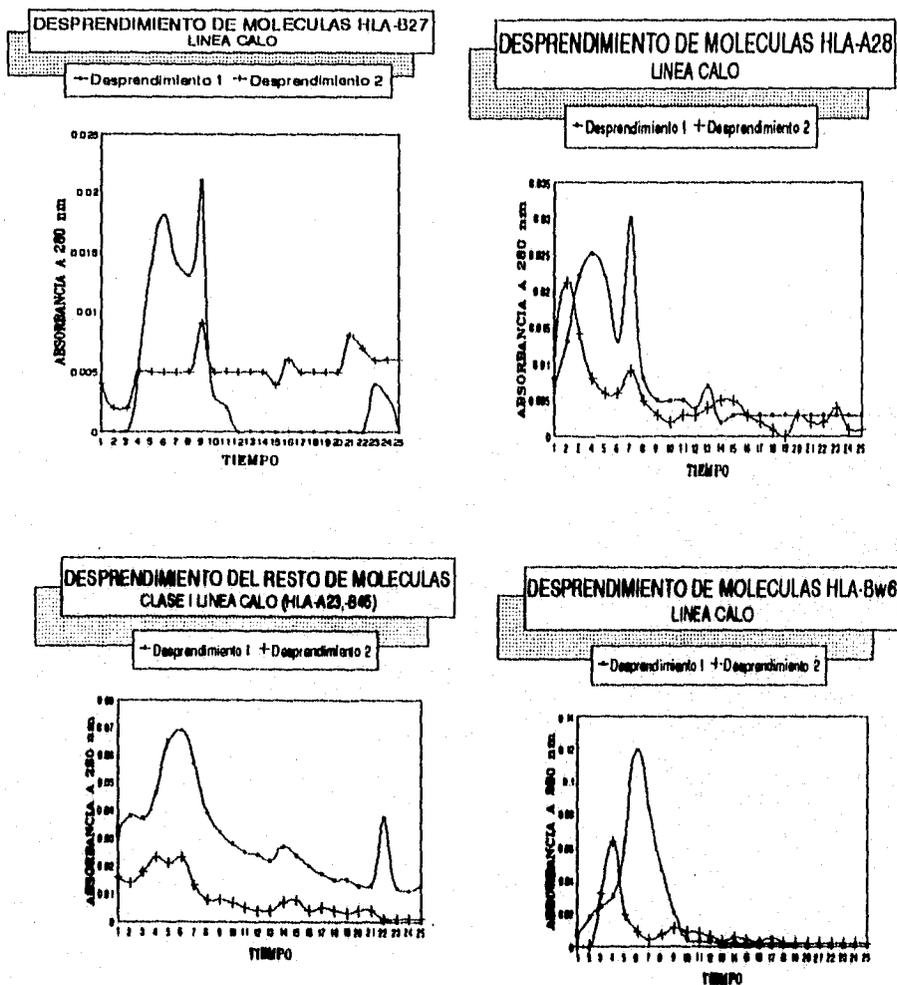
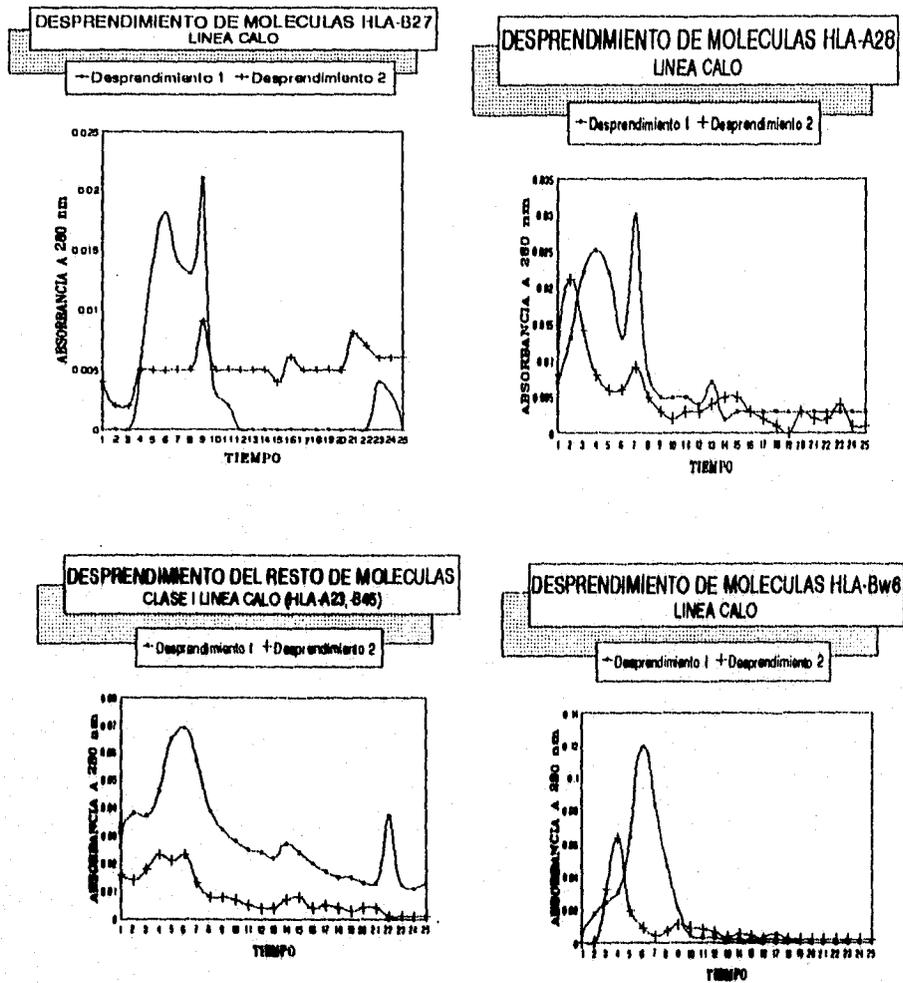


Figura 6 Obtención de moléculas del CMH-I por cromatografía de inmunoadfinidad sobre el lisado de la línea Calo.



Obtención y cromatografía HPLC de péptidos asociados a moléculas CMH clase I

Después del tratamiento ácido y ebullición de los complejos CMH-péptido y de la separación de los péptidos por filtración, se procedió a realizar la cromatografía HPLC utilizando una columna Delta Pack 5 μ 300 Å de fase reversa. Se evaluaron los principales picos a una absorbancia de 218 nm. Los cromatogramas de los péptidos eluidos de los alelos se muestran en las figuras 7-13 cada uno con repetición. Para descartar a contaminantes inespecíficos de la cromatografía de inmunoafinidad se hizo una cromatografía de HPLC de las muestras provenientes de una columna en donde la sefarosa se encontraba inactivada con glicerina (columna inespecífica) y en la cual se hizo pasar cada uno de los lisados celulares (figura 14).

Figura 7. Perfil cromatográfico de péptidos asociados a moléculas HLA-A28 de la línea Calo.

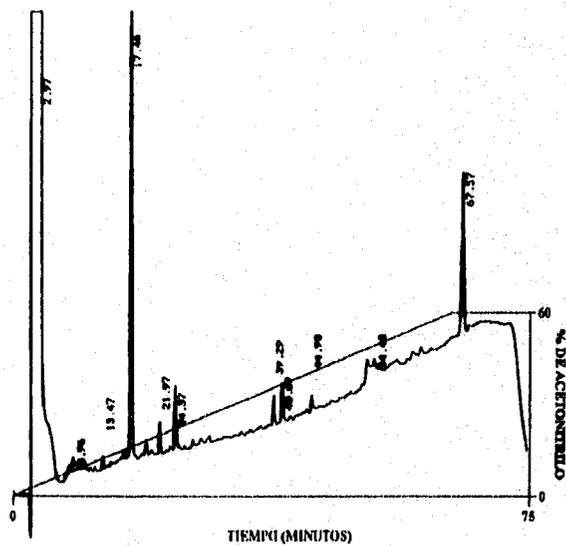
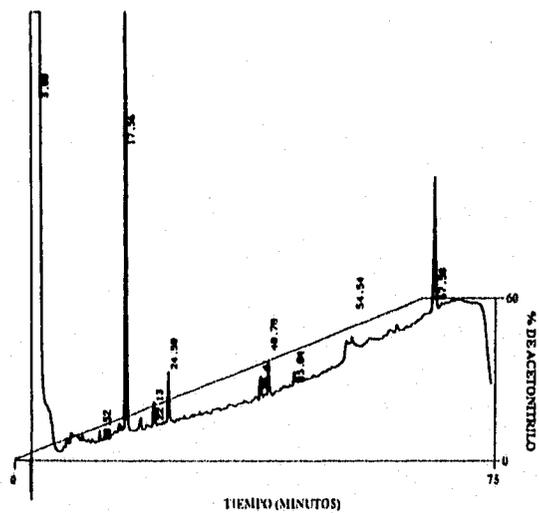


Figura 8. Perfil cromatográfico de péptidos asociados a moléculas HLA-B27 de la línea Colo.

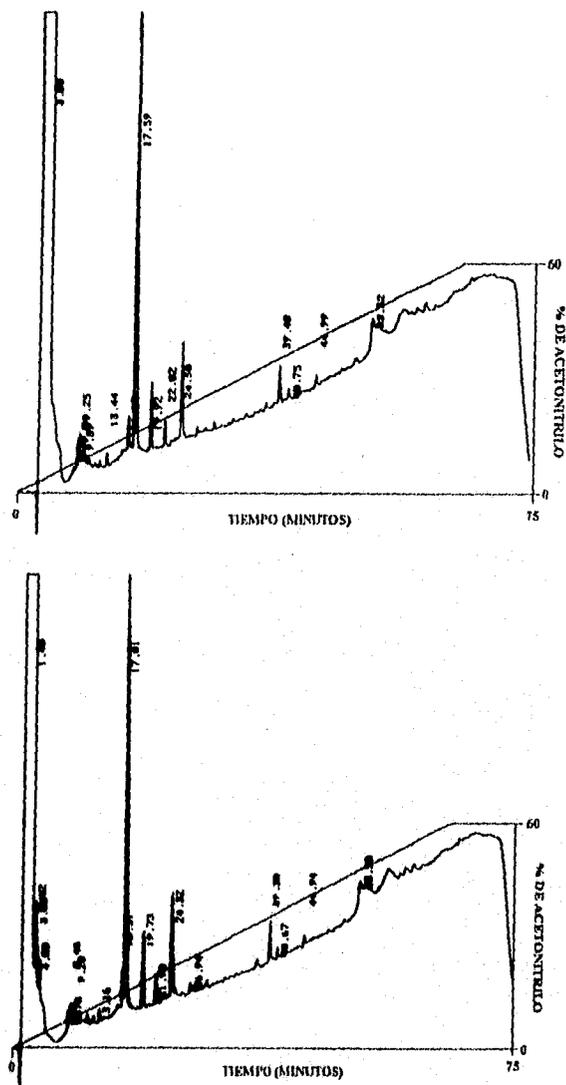


Figura 9. Perfil cromatográfico de péptidos asociados a moléculas HLA-Bw6 de la línea Calo.

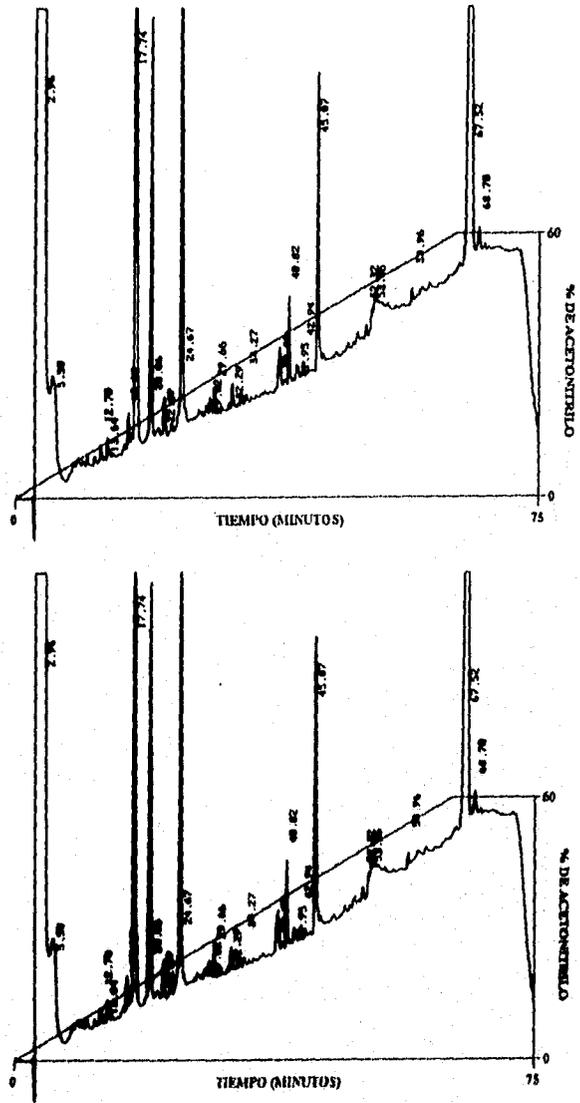


Figura 10. Perfil cromatográfico de péptidos asociados a moléculas HLA-A23, -B45 de la línea Calo.

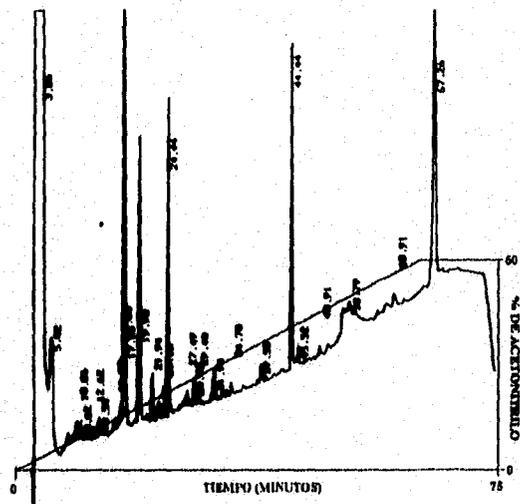
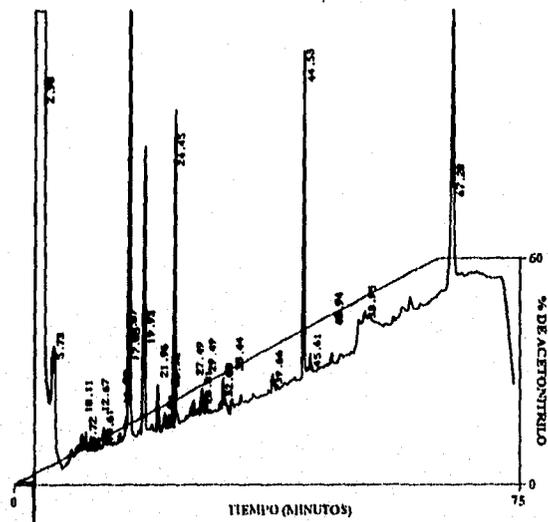


Figura 11. Perfil cromatográfico de péptidos asociados a moléculas HLA-A11 de la línea Inbl.

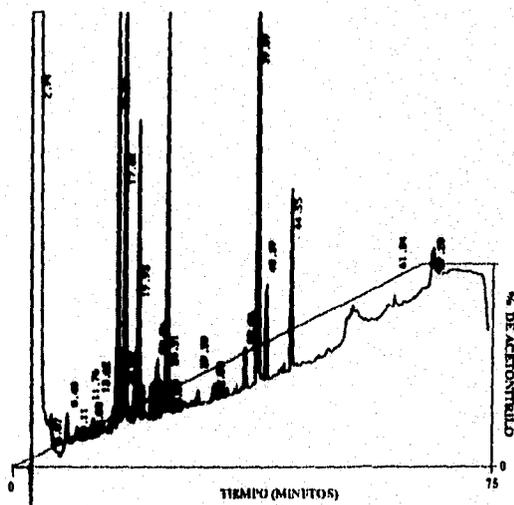
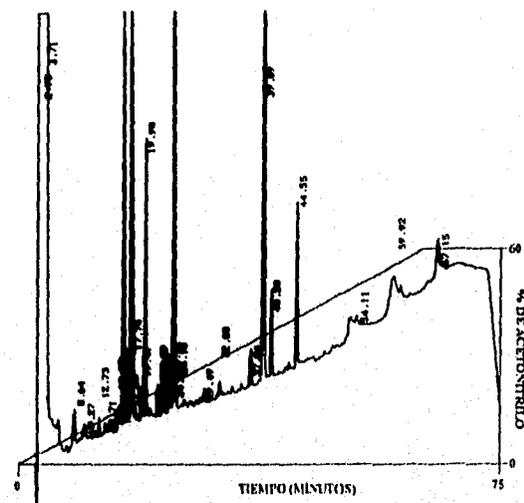


Figura 12. Perfil cromatográfico de péptidos asociados a moléculas HLA-Bw6 de la línea Inbl.

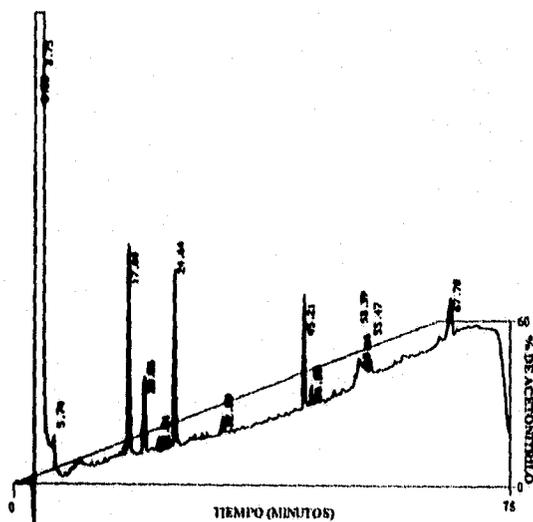
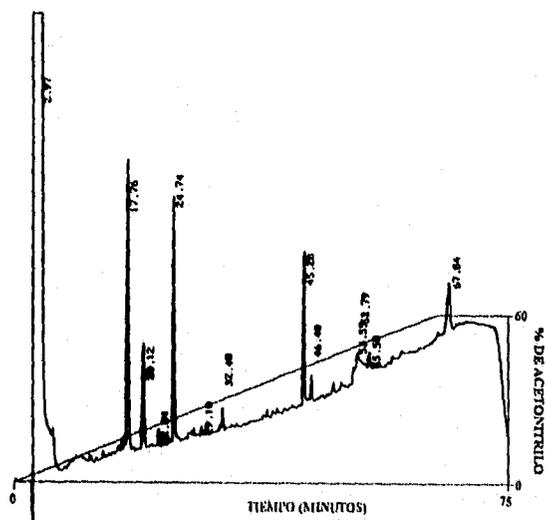


Figura 13. Perfil cromatográfico de péptidos asociados a moléculas HLA-Aw33, -B14, -B38, -Cw3, -Cw4 de la línea Inbl.

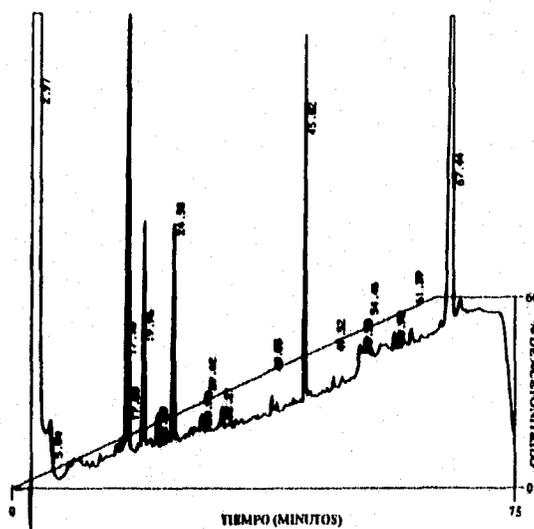
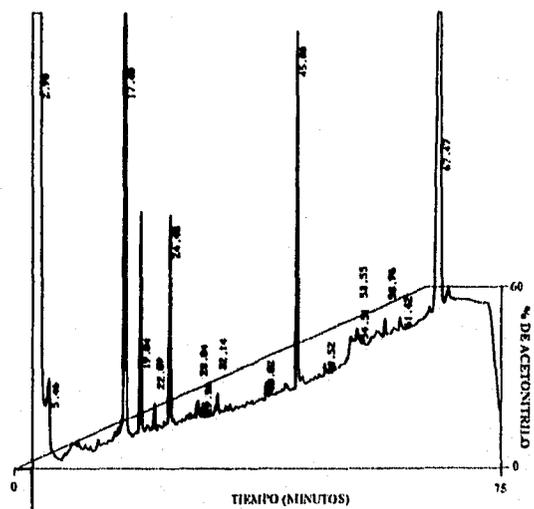
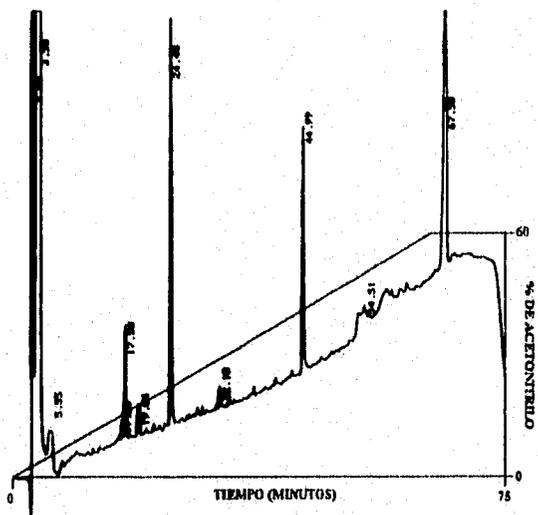
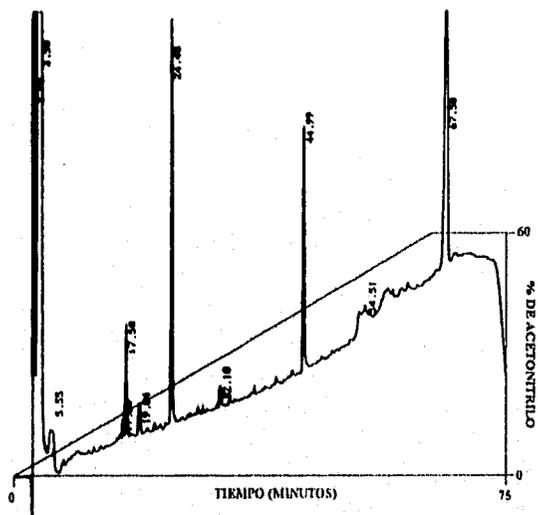


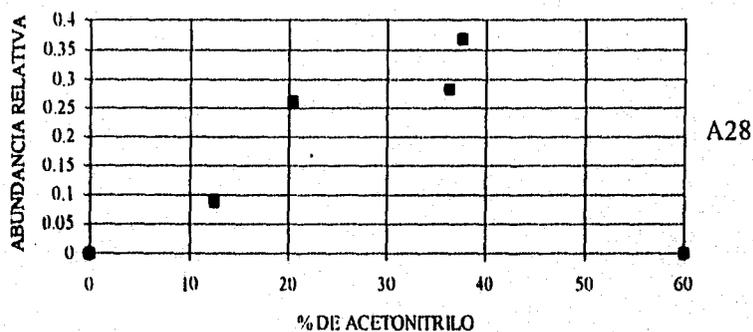
Figura 14. Perfil cromatográfico de impurezas asociadas a columnas inespecíficas menores a 5 kDa que absorben a 218 nm.



Comportamiento de especies peptídicas asociadas a moléculas CMH clase I

Los principales picos de elución de péptidos a 218 nm, descartando a los picos obtenidos de la columna inespecífica y su comportamiento a través del gradiente de acetonitrilo, así como su abundancia relativa se resume en las figuras 15-20. Así, en la figura 15 observamos que el alelo HLA-A28 de la línea Calo presenta un perfil cromatográfico pobre, con sólo cuatro especies peptídicas cuantificando para el total de péptidos asociados, de las cuales predominan dos especies peptídicas comprendidas entre el 30% y 40% de acetonitrilo, que conjuntamente cuantifican cerca del 75% de péptidos asociados a este alelo, remarcando una alta proporción de péptidos con una relativa hidrofobicidad.

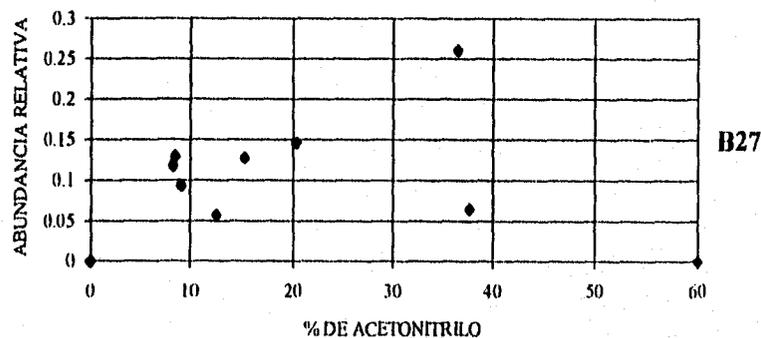
Figura 15. Distribución hidrofóbica y proporción de especies peptídicas asociadas al alelo HLA-A28 de la línea de cáncer cérvico-uterino Calo.



En lo que respecta al alelo HLA-B27 de la línea Calo (figura 16), se observa una distribución de las especies peptídicas desde 8% hasta 37.6% de Ac. En este caso la mayor parte de las especies peptídicas (34.11% del total de péptidos asociados) se localizan en una región con características hidrofílicas, (entre 8.34% y 9.12% de Ac). No obstante, también se encuentra una sola especie que se localiza en una región más hidrofóbica

(36.36% de Ac), y cuya abundancia relativa es de 26% del total de péptidos eluidos.

Figura 16. Distribución hidrofóbica y proporción de especies peptídicas asociadas al alelo HLA-B27 de la línea de cáncer cérvico-uterino Calo.



En lo referente al alelo HLA-Bw6 de la línea Calo (figura 17), se observa un perfil cromatográfico más rico, con trece especies peptídicas en total, de las cuales dos que se encuentran entre entre 36% y 37% de Ac cuantifican para un 32% del total de péptidos asociados; sin embargo, la distribución de los péptidos a lo largo del gradiente de hidrofobicidad es más homogénea que en la de los alelos anteriores (11.72%-60% de Ac). Por el contrario, el alelo HLA-Bw6 de la línea Inbl (figura 18), presenta sólo cuatro especies peptídicas que cuantifican para el total de péptidos asociados, con dos especies, localizadas entre 42% y 50% de Ac, que cuantifican para el 66% del total de péptidos asociados a este alelo. Comparando las especies peptídicas eluidas del alelo HLA-Bw6 de ambas líneas celulares, podemos observar que en la línea Inbl hay una pérdida de las especies con características más hidrofílicas, que se encuentran comprendidas entre el 10% y 20% de Ac; así como las que se encuentran entre el 30% y 40% de Ac, y las especies con alta hidrofobicidad comprendidas entre el 50% y 60% de Ac.

Figura 17. Distribución hidrofóbica y proporción de especies peptídicas asociadas al alelo HLA-Bw6 de la línea de cáncer cérvico-uterino Calo.

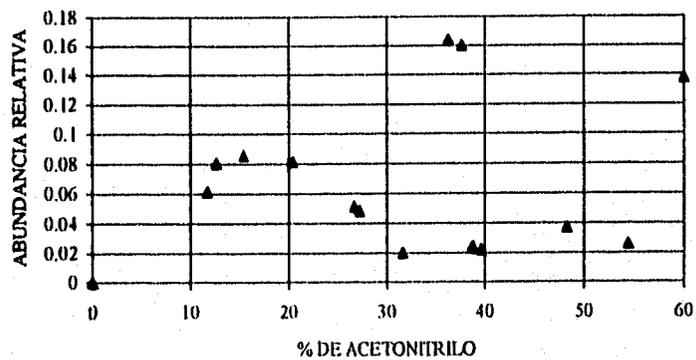
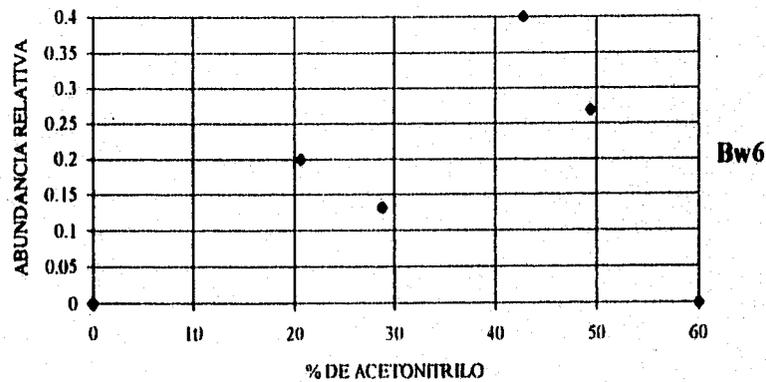


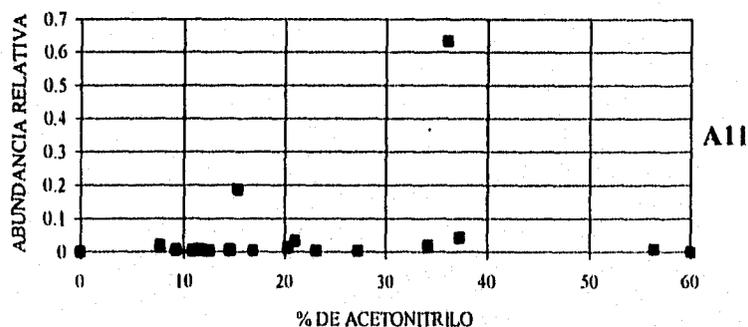
Figura 18. Distribución hidrofóbica y proporción de especies peptídicas asociadas al alelo HLA-Bw6 de la línea de cáncer cérvico-uterino Inbl.



En el alelo HLA-A11 de la línea Inbl (figura 19), se observa una gran cantidad de especies peptídicas (17 especies) distribuidas a lo largo del gradiente de Ac; sin embargo, sólo una de ellas se encuentra en gran abundancia, con el 63% del total de péptidos, localizándose en un 36.08%

de Ac. Otra especie abundante (18.74% del total de péptidos) se localiza en una región más hidrofílica (16.58% de Ac). Las otras especies se encuentran en muy poca cantidad, cuantificando cada una de ellas menos del 4% del total de péptidos asociados a este alelo, localizándose desde el 7.82% hasta 56.34% de Ac.

Figura 19. Distribución hidrofóbica y proporción de especies peptídicas asociadas al alelo HLA-A11 de la línea de cáncer cérvico-uterino Inbl.



En cuanto a los péptidos asociados a los alelos HLA-A23 y -B45 de la línea Calo (figura 20) observamos 15 especies peptídicas en total, con un perfil cromatográfico homogéneo distribuido en un amplio rango de hidrofobicidad, el cual abarca desde 9.33% hasta 45.17% de Ac, siendo la única especie sobresaliente la localizada en 20.27% de Ac que cuantifica para un 20.33% del total de péptidos. Por otro lado, los péptidos asociados a los alelos HLA-Aw33, -B14, -B38, -Cw3, -Cw4 de la línea Inbl (figura 21), muestran un perfil cromatográfico más pobre con 8 especies, de las cuales la más abundante cuantifica para el 38.58% del total de péptidos asociados, localizándose en una región con características hidrofóbicas (53.55% de Ac). Cabe destacar que este perfil cromatográfico muestra una carencia de especies peptídicas con características muy hidrofílicas (10%-20% de Ac), concentrándose la mayoría de especies en regiones más hidrofóbicas (20.39%-56.62% de Ac).

Figura 20. Distribución hidrofóbica y proporción de especies peptídicas asociadas a los alelos HLA-A23, -B45 de la línea de cáncer cérvico-uterino Calo.

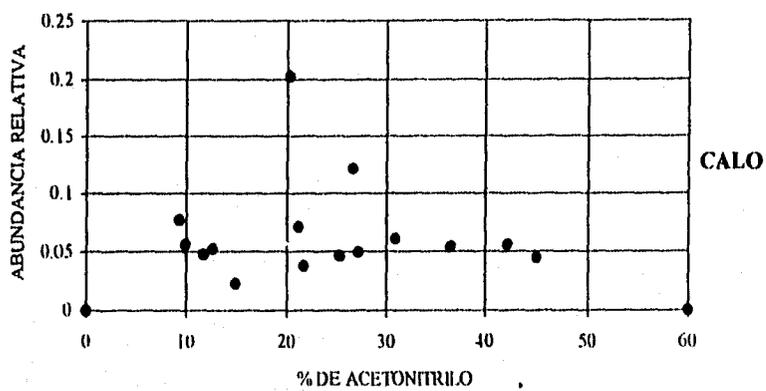
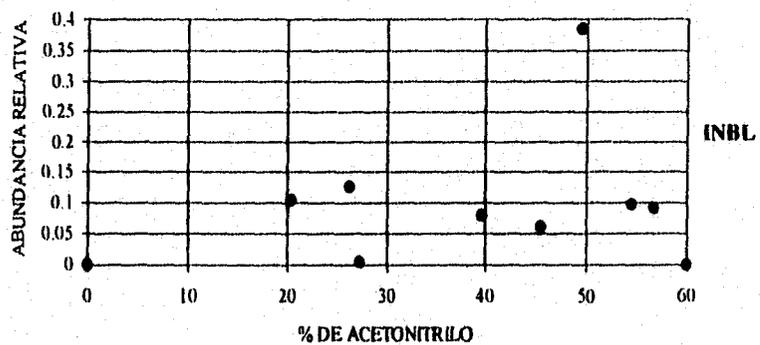


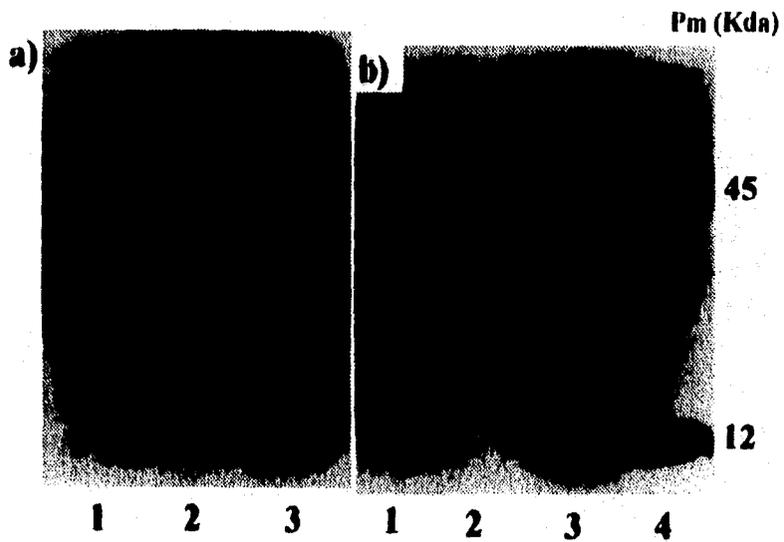
Figura 21. Distribución hidrofóbica y proporción de especies peptídicas asociadas a los alelos HLA-Aw33, -B14, -B38, -Cw3, -Cw4 de la línea de cáncer cérvico-uterino Inbl.



Verificación de la obtención de moléculas CMH clase I

La obtención de moléculas del CMH-I por cromatografía de inmunofinidad se verificó por medio de una electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 15% y revelando estos por medio de una tinción en plata en condiciones no amoniacaes. Las fotografías de los geles se muestran en la figura 22, en donde se logró detectar a la cadena pesada (45 kD) y β_2 -m (12 kDa) de las cromatografías de inmunofinidad realizadas con los anticuerpos W6/32 (el cual reconoce a la totalidad de moléculas clase I del CMH), y con el cual se obtuvieron a los alelos HLA-A23, -B45 de la línea Calo, y los alelos HLA-Aw33, -B14, -B38, -Cw3, -Cw4 de la línea Inbl; asimismo sólo pudo ser detectada la cadena pesada y β_2 -m del alelo HLA-Bw6 expresado en ambas líneas celulares, mas no así para las cadenas pesadas de los alelos que fueron expresados en baja cantidad como fueron HLA-A11 en la línea Inbl y HLA-A28 y -B27 en Calo.

Figura 22. Obtención de moléculas del CMH clase I. a) Moléculas CMH-I de la línea Inbl; carril 1 inmunoprecipitado HLA-A11; carril 2 inmunoprecipitado HLA-Bw6; carril 3 inmunoprecipitado HLA-Aw33, -B14, -B38, -Cw3, -Cw4. b) Moléculas CMH-I de la línea Calo; carril 1 inmunoprecipitado HLA-A28; carril 2 inmunoprecipitado HLA-B27; carril 3 inmunoprecipitado HLA-A23, -B45; carril 4 inmunoprecipitado HLA-Bw6.



DISCUSION DE RESULTADOS

La caracterización de antígenos asociados a moléculas del CMH es de gran importancia para poder desarrollar vacunas que sean eficaces en contra de una gran gama de enfermedades infecciosas y de tipo neoplásico (78,86,96,140,142,144,146,165,166). Un paso fundamental para lograr este objetivo ha sido el de identificar a péptidos antigénicos expresados por moléculas del CMH clase I. Varias estrategias se han desarrollado con este fin, basándose generalmente en la síntesis de péptidos (8-10 residuos) que se encuentran en secuencias de proteínas consideradas como antigénicas y a su afinidad por moléculas específicas del CMH. Sin embargo, no siempre se ha observado que estos péptidos sean presentados de manera natural (76,79,81-86,88-97). Por lo que el empleo de estrategias que involucren la obtención y caracterización de péptidos presentados naturalmente pueden permitir una identificación más eficiente de antígenos que generen una respuesta inmune específica. Es por ello que en este trabajo, con ayuda de un panel de anticuerpos monoclonales específicos hacia alelos del CMH-I, que se sabe son muy frecuentes en la población mexicana con incidencia en cáncer cérvico-uterino (167), logramos obtener péptidos asociados a moléculas purificadas del CMH-I de dos líneas celulares de carcinoma de cérvix que presentan infección con VPH-18.

Una de las problemáticas encontradas en el uso de anticuerpos monoclonales dirigidos hacia productos específicos de HLA, ha sido su baja detección, muy probablemente debida a que su uso en cortes histológicos embebidos en parafina o criopreservados desnaturalicen a los antígenos de histocompatibilidad y en consecuencia no puedan ser detectados (154). En nuestro trabajo, fue demostrado mediante citofluorimetría de flujo (Figura 4) que los anticuerpos eran específicos para alelos del CMH clase I expresados en las membranas de las líneas celulares Calo e Inbl; asimismo la obtención de moléculas de clase I mediante cromatografía de inmutafinidad fue demostrada en ensayos de electroforesis (Figura 15). Una observación importante en estos

experimentos, fue el haber detectado una expresión diferencial de los alelos CMH-I en las membranas de las células tumorales de cérvix; al respecto algunos investigadores han reportado una baja expresión de algunos alelos de tipo HLA-A y B y su correlación con la deficiencia en la vía de presentación de antígenos en tumores cervicales (168), lo cual puede explicar en parte la variabilidad encontrada en nuestras líneas. Cabe mencionar que recientemente hemos encontrado una importante retención intracelular de los alelos HLA-A11 y -B27 de estas líneas celulares a través de ensayos bioquímicos (169). La baja detección observada en el alelo HLA-A28 de la línea Calo en ensayos de electroforesis puede deberse a la baja afinidad del anticuerpo producido por el hibridoma PA2.1 dirigido al alelo HLA-A28 (156), no obstante por citofluorimetría de flujo logramos detectar una cantidad significativa de este alelo expresado en la membrana.

La alta expresión del alelo HLA-Bw6 junto con la baja expresión de otros alelos expresados en la membrana de las líneas Calo e Inbl, también puede ser explicada por las diferencias en el patrón de síntesis de moléculas HLA y a las diferencias en los tiempos de glicosilación durante su paso a través del aparato de Golgi (170). Este fenómeno nos puede dar indicios de que el reconocimiento de antígenos por linfocitos T es favorecido más en algunos alelos que en otros. No hay que descartar que alelos que se expresan pobremente en la membrana puedan ser los encargados de la presentación de determinantes antigénicos (168).

Por otro lado, como era de esperarse en las cromatografías del material menor a 5 kDa realizadas por HPLC (figuras 7-13), se observaron diferentes picos distribuidos a través del gradiente de acetonitrilo; lo cual nos hace sugerir, de acuerdo a lo reportado por algunos autores (77,104), que estas fracciones corresponden a especies peptídicas con diferente composición de aminoácidos. De hecho el uso del gradiente de 0-60% de acetonitrilo se realizó con la finalidad de separar de manera eficiente a los péptidos con base a sus características hidrofílicas. Este gradiente ha sido utilizado comúnmente y se ha demostrado su eficacia en

la separación de péptidos con distinta composición en varios experimentos (102-108).

La composición química de los péptidos tiene un papel fundamental tanto en la unión específica a moléculas CMH-I, como en el reconocimiento por linfocitos T (80,90,93,97,145). Además, se ha demostrado el papel que desempeñan los residuos hidrofílicos de péptidos antigénicos en el reconocimiento y estimulación de linfocitos T (74,78,79,86,92,143,144), lo cual nos hace pensar que las especies peptídicas más hidrofílicas son las más factibles de ser reconocidas por linfocitos T. En este trabajo, interesantemente observamos que en la línea Inbl hay una remarcada ausencia o disminución en la presentación de péptidos de carácter hidrofílico (10%-20% Ac), predominando aquellos con características hidrofóbicas. En contraste los péptidos presentados por la línea Calo mostraron distinta hidrofiliidad. Consideramos que la baja presentación de especies peptídicas de carácter hidrofílico se encuentra relacionado con el estado de malignidad de cada línea celular; es de resaltar que la línea Inbl proviene de un estadio clínico IVA, mientras que la línea Calo proviene de un estadio clínico IIB (155), además de que ambas comparten etiología viral con VPH-18. En consecuencia, es factible que en el proceso de transformación celular se desarrollen mecanismos que provoquen la pérdida o disminución en la presentación de péptidos con características hidrofílicas, sobretudo en tumores más avanzados como es el caso de Inbl, dando como consecuencia el escape de la respuesta inmune.

La presentación deficiente de péptidos por moléculas CMH-I también puede relacionarse con las vías de procesamiento y presentación de antígenos: en donde las deficiencias en la función de los proteasomas (171-173); en el transporte de los péptidos hacia el interior del RE por medio de los TAP's (171,174-177) o bien, la retención y degradación de moléculas CMH-I en el interior de las células (178-181), han sido consideradas como las causas principales de esta carencia. La baja presencia de péptidos hidrofílicos en Inbl puede ser correlacionado con la

retención de algunas moléculas del CMH-I en el RE (169). Por lo que se hace necesario efectuar más estudios con la finalidad de analizar las probables alteraciones en las vías de procesamiento y presentación de antígenos, en especial en los TAP's y los LMP's; así como el papel que desempeña el VPH en este proceso. Por ejemplo, se ha encontrado que la deficiencia de presentación de antígenos en diversos tumores humanos es debida a la carencia o pérdida de función de TAP's o de LMP's (174-177).

Por otra parte el uso de anticuerpos monoclonales puede restringir la obtención de péptidos a partir de moléculas CMH-I, ya que se ha demostrado en modelos murinos que algunos epítopos reconocidos por anticuerpos dirigidos contra alelos del CMH-I, son dependientes de la conformación que estos presentan (182,183). Dicha conformación molecular se encuentra relacionada ampliamente con los péptidos que se asocian a estas moléculas, limitando por tanto la obtención de péptidos de diferentes características. No obstante, en este trabajo las diferencias encontradas en el comportamiento de péptidos cluidos de moléculas CMH-I de ambas líneas celulares parece no ser influenciada por los anticuerpos. Por ejemplo, en el caso del alelo HLA-Bw6 (presente en ambas líneas), el uso del anticuerpo monoclonal (SFR8-B6), nos permitió discernir importantes diferencias en el patrón de hidrofiliidad de péptidos asociados a este alelo en las líneas celulares; remarcando este hecho, que su uso en esta técnica no es un factor limitante en la obtención de péptidos antigénicos.

Los péptidos obtenidos a partir de moléculas CMH-I en este trabajo, serán de gran utilidad para identificar a aquellos que sean factibles de ser reconocidos por linfocitos citotóxicos de manera eficiente y específica. Su caracterización bioquímica permitirá conocer el origen proteico de estos fragmentos peptídicos, y su potencial de ser aplicados de manera terapéutica.

Finalmente, el empleo de las técnicas llevadas a cabo en este trabajo pueden ser de gran utilidad en la obtención y caracterización de antígenos

presentados por células malignas o infectadas con virus, como es el caso del carcinoma de cérvix. Además esta metodología podría extrapolarse a una amplia gama de padecimientos infecciosos, neoplásicos y autoinmunes con vías a la generación de estrategias tanto de carácter profiláctico como terapéutico.

CONCLUSIONES

- 1.- El uso de anticuerpos monoclonales específicos permitió la detección de diferencias en la expresión de los alelos CMH-I en la membrana de las líneas Calo e Inbl.
- 2.- El uso de anticuerpos monoclonales específicos hacia alelos particulares del CMH-I no fue factor limitante en la obtención de distintos péptidos asociados a estas moléculas.
- 3.- La línea Inbl mostró una baja presentación de péptidos con carácter hidrofílico, en relación a los mostrados por la línea Calo.
- 4.- El uso de las técnicas descritas pueden ser de gran utilidad para obtener a antígenos de una amplia gama de enfermedades, y así poder caracterizarlos y desarrollar estrategias que sean efectivas en su tratamiento.

LITERATURA CITADA

- 1.- Janeway, C.A., Travers, P. 1994. Immunobiology. Current Biology Ltd, U.S.A. pp. 1:1-1:47.
- 2.- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pober, J.S. 1991. Cellular and Molecular Immunology. W.B. Saunders Company. U.S.A. pp. 417.
- 3.- Paul, W.E. 1993. Fundamental Immunology. 3a. ed. Ed. Raven Press. U.S.A. pp. 1427.
- 4.- Shimonkevitz, R., Colon S., Kappler, J.W., Marrack, P.C., Grey, H.M. 1984. Antigen recognition by H-2 restricted T cells. II. A tryptic ovalbumin peptide that substitutes for processed antigen. *J. Immunol.* 133:2067-74.
- 5.- Buus, S., Sette, A., Colon, S.M., Jenis, D.M., Grey, H.M. 1986. Isolation and characterization of antigen-Ia complexes involved in T cell recognition. *Cell.* 47:1071-77.
- 6.- Babbitt, B.P., Allen, P.M., Matsueda, G., Haber, E., Unanue, E.R. 1985. Binding of immunogenic peptides to Ia histocompatibility molecules. *Nature.* 317:359-61.
- 7.- Townsend, A., Bodmer, H. 1989. Antigen recognition by class I-restricted T lymphocytes. *Ann. Rev. Immunol.* 7:601-24.
- 8.- Yewdell, J.W., Bennink, J.R. 1992. Cell biology of antigen processing and presentation to MHC class I molecule restricted T lymphocytes. *Adv. Immunol.* 52:1-123.
- 9.- Germain, R.N., Margulies, D.H. 1993. The biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation. *Ann. Rev. Immunol.* 11:403-50.
- 10.- Cresswell, P. 1993. Antigen processing. *Ann. Rev. Immunol.* 12:259-93.
- 11.- DeMars, R., Rudersdorf, R., Chang, C., Petersen, J., Strandtmann, J., Korn, N., Sidwell, B., Orr, H.T. 1985. Mutations that impair a posttranscriptional step in expression of HLA-A and -B antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82:8183-87.
- 12.- Salter, R.D., Cresswell, P. 1986. Impaired assembly and transport of HLA-A and -B antigens in a mutant TxB cell hybrid. *EMBO J.* 5:943-49.

- 13.- Townsend, A.R., Öhlén, C., Bastin, J., Ljunggren, H-G, Foster, L., Karre, K. 1989. Association of class I major histocompatibility heavy and light chains induced by viral peptides. *Nature*. 340:443-48.
- 14.- Ljunggren, H.G., Stam, N.J., Öhlén, C., Neefjes, J.J., Hoglund, P., Heemels, M., Bastin, J., Schumacher, T.N.M., Townsend, A., Karre, K., Ploegh, H.L. 1990. Empty MHC class I molecules come out in the cold. *Nature*. 346:476-80.
- 15.- Hosken, N.A., Bevan, M.J. 1990. Defective presentation of endogenous antigen by a cell line expressing class I molecules. *Science*. 248:367-70.
- 16.- Bjorkman, P.J., Saper, M.A., Samraoui, B., Bennet, W.S., Strominger, J.L., Wiley, D.C. 1987. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature*. 329:506-12.
- 17.- Bjorkman, P.J., Saper, M.A., Samraoui, B., Bennet, W.S., Strominger, J.L., Wiley, D.C. 1987. The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature*. 329:512-18.
- 18.- Garret, T.P.J., Saper, M.A., Bjorkman, P.J., Strominger, Wiley, D.C. 1989. Specificity pockets for the side chains of peptide antigens in HLA-Aw68. *Nature*. 342:692-96.
- 19.- Saper, M.A., Bjorkman, P.J., Wiley, D.C. 1991. Refined structure of the human histocompatibility antigen HLA-A2 at 2.6 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 219:277-319.
- 20.- Fremont, D.H., Matsumara, M., Stura, E.A., Peterson, P.A., Wilson, I.A. 1992. Crystal structures of two viral peptides in complex with murine MHC class I H-2K^b. *Science*. 257:919-27.
- 21.- Zhang, W., Young, A.C.M., Imarai, M., Nathenson, S.G., Sacchettini, J.C. 1992. Crystal structure of the major histocompatibility complex class I H-2K^b molecule containing a single viral peptide: Implications for peptide binding and T-cell receptor recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* 89:8403-7.
- 22.- Madden, D.R., Gorga, J.C., Strominger, J.L., Wiley, D.C. 1992. The three-dimensional structure of HLA-B27 at 2.1 Å resolution suggests a general mechanism for tight peptide binding to MHC. *Cell*. 70:1035-48.

- 23.- Brown, J.H., Jardetzky, T.S., Gorga, J.C., Stern, L.J., Urban, R.G., Strominger, J.L. Wiley, D.C. 1993. The three dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature*. 364:33-39.
- 24.- Bodmer, J.G., Marsh, S.G., Albert, E.D., Bodmer, W.F., Dupont, B., Erlich, H.A., Mach, B., Mayr, W.R., Parham, P., Sasaki, T. 1992. Nomenclature for factors of the HLA system, 1991. *Human Immunol.* 34:4-18.
- 25.- Lechler, R.I. 1988. MHC class II molecular structure-permitted pairs? *Immunol. Today*. 9:76-78.
- 26.- Kubo, R.T., Sette, A., Grey, H.M., Appella, E., Sakaguchi, K., Zhu, N.Z., Arnott, D., Sherman, N., Shabanowitz, J., Michel, H., Bodnar, W.M., Davis, T.A., Hunt, D.F. 1994. Definition of specific peptide motifs for four major HLA-A alleles. *J. Immunol.* 152:3913-24.
- 27.- Guo, H-C, Jardetzky, T.S., Garret, T.P.J., Lane, W.S., Strominger, J.L. Wiley, D.C. 1992. Different length peptides bind to HLA-Aw68 similarly at their ends but bulge out in the middle. *Nature*. 360:364-67.
- 28.- Matsumara, M., Fremont, D.H., Peterson, P.A., Wilson, J.A. 1992. Emerging principles for recognition of peptide antigens by MHC class I molecules. *Science*. 257:927-34.
- 29.- Williams, D.B., Vassilakos, A., Suh, W.K. 1996. Peptide presentation by MHC class I molecules. *Trends Cell Biol.* 6:267-73.
- 30.- Driscoll, J., Finley, D. 1992. A controlled breakdown: Antigen processing and the turnover of viral peptides. *Cell*. 68:823-25
- 31.- Goldberg, A.L., Rock, K.L. 1992. Proteolysis, proteasomes and antigen presentation. *Nature*. 357:375-79.
- 32.- Brown, M.G., Driscoll, J., Monaco, J.J. 1991. Structural and serological similarity of MHC-linked LMP and proteasome complexes. *Nature*. 353:355-57.
- 33.- Glynn, R., Powis, S.H., Beck, S., Kelly, A., Kerr L.A., Trowsdale, J. 1991. A proteasome-related gene between the two ABC transporter loci in the Class II region of the human MHC. *Nature*. 353:357-60.
- 34.- Kelly A., Powis, S.H., Glynn, R., Radley, E., Beck, S., Trowsdale, J. 1991. Second proteasome-related gene in the human MHC Class II. *Nature*. 353:667-68.

- 35.- Martinez, C.K., Monaco, J.J. 1991. Homology of proteasome subunits to a major histocompatibility complex-linked LMP gene. *Nature*. 353:664-67.
- 36.- Ortiz-Navarrete, V., Seelig, A., Gernold, M., Frentzel, S., Kloetzel, P.M., Hammerling, G.J. 1991. Subunit of the '20s' proteasome encoded by the major histocompatibility complex. *Nature*. 353:662-64.
- 37.- Yang, Y., Waters, J.B., Früh, K., Peterson, P.A. 1992. Proteasomes are regulated by Interferon γ : Implications for antigen processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89:4928-32.
- 38.- Androlewicz, M.J., Anderson, K.S., Cresswell, P. 1993. Evidence that transporters associated with antigen processing translocate a major histocompatibility complex Class I-binding peptide into the endoplasmic reticulum in an ATP-dependent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90:9130-34.
- 39.- Neefjes, J.J., Momburg, F., Hammerling, G. 1993. Selective and ATP-dependent translocation of peptides by the MHC-encoded transporter. *Science*. 261:769-71.
- 40.- Shepherd, J.C., Schumacher, T.N.M., Ashton-Rickardt, P.G., Imaeda, S., Ploegh, H.L. 1993. TAP1-Dependent peptide translocation *in vitro* is ATP dependent and peptide selective. *Cell*. 74:577-84.
- 41.- Kleijmeer, M., Kelly, A., Geuze, H.J., Slot, J.W., Townsend, A., Trowsdale, J. 1992. Location of MHC-encoded transporters in the endoplasmic reticulum and *cis*-Golgi. *Nature*. 357:342-44.
- 42.- de la Salle, H. 1994. Homozygous human TAP peptide transporter mutation in HLA class I deficiency. *Science*. 265:237-41.
- 43.- Deverson, E.V., Gow, I.R., Coadwell, W.J., Monaco, J.J., Butcher, G.W., Howard J.C. 1990. MHC Class II region encoding proteins related to the multidrug resistance family of transmembrane transporters. *Nature*. 348:738-41.
- 44.- Monaco, J.J., Cho, S., Attaya, M. 1990. Transport protein genes in the murine MHC: Possible implications for antigen processing. *Science*. 250:1723-26.

- 45.- 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*. 348:741-44.
- 46.- Powis, S.J., Townsend, A., Deverson, E.V., Bastin, J., Butcher, G.W., Howard, J.C. 1991. Restoration of antigen presentation to the mutant cell line RMA-S by an MHC-linked transporter. *Nature*. 354:528-31.
- 47.- Spies, T., DeMars, R. 1991. Restored expression of major histocompatibility Class I molecules by gene transfer of a putative peptide transporter. *Nature*. 351:323-24.
- 48.- Attaya, M., Jameson, S., Martinez, C.K., Hermel, E., Aldrich, C. 1992. Ham-2 corrects the Class I antigen-processing defect in RMA-S cells. *Nature*. 355:647-49.
- 49.- Higgins, C.F. 1992. ABC transporters: From microorganisms to man. *Ann. Rev. Cell. Biol.* 8:67-113.
- 50.- Kelly, A., Powis, S.H., Kerr, L-A, Mockridge, I., Elliot, T. 1992. Assembly and function of the two ABC transporter proteins encoded in the human major histocompatibility complex. *Nature*. 355:641-44.
- 51.- Androlewicz, M.J., Cresswell, P. 1994. Human transporters associated with antigen processing possess a promiscuous peptide-binding site. *Immunity*. 1:7-14.
- 52.- Suh, W-K, Cohen-Doyle, M.F., Fruh, K., Wang, K., Peterson, P.A., Williams, D.B. 1994. Interaction of MHC Class I molecules with the transporter associated with antigen processing. *Science*. 264:1322-26.
- 53.- Ortman, B., Androlewicz, M.J., Cresswell, P. 1994. MHC Class I/ β_2 -microglobulin complexes associate with TAP transporters before peptide binding. *Nature*. 368:864-67.
- 54.- Elliot, T., Cerundolo, V., Elvin, J., Townsend, A. 1991. Peptide-induced conformational change of the class I heavy chain. *Nature*. 351:402-6.
- 55.- Machold, R.P., Andr e S., Van Kaer, L., Ljunggren, H-G, Ploegh, H.L. 1995. Peptide influences the folding and intracellular transport of free major histocompatibility complex class I heavy chains. *J. Exp. Med.* 181:1111-22.

- 56.- Burshtyn, D.B., Barber, B.H. 1993. Dynamics of peptide binding to purified antibody-bound H-2D^b and H-2D^b β_2m complexes. *J. Immunol.* 151:3082-93.
- 57.- Neefjes, J.J., Hammerling, G.J., Momburg, F. 1993. Folding and assembly of major histocompatibility complex class I heterodimers in the endoplasmic reticulum of intact cells precedes the binding of peptide. *J. Exp. Med.* 178:1971-80.
- 58.- Hurtley, S.M., Helenius, A. 1989. Protein oligomerization in the endoplasmic reticulum. *Ann. Rev. Cell. Biol.* 5:277-307.
- 59.- Gething, M.J. 1992. Protein folding in the cell. *Nature.* 355:33-45.
- 60.- Ahluwalia, N., Bergeron, J.J.M., Degen, E., Williams, D.B. 1992. The p88 molecular chaperone is identical to the endoplasmic reticulum membrane protein, calnexin. *J. Biol. Chem.* 267:10914-18.
- 61.- Galvin, K., Krishna, S., Ponchel, F., Fröhlich, M., Cummings, D.E. 1992. The major histocompatibility complex Class I antigen-binding protein p88 is the product of the calnexin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:8452-56.
- 62.- Rajagopalan, S., Xu, Y., Brenner, M.B. 1994. J. Calnexin retains unassembled major histocompatibility complex Class I free heavy chains in the endoplasmic reticulum. *J. Exp. Med.* 180:407-12.
- 63.- Sugita, M., Brenner, M.B. 1994. An unstable β_2 -microglobulin: Major histocompatibility complex Class I heavy chain intermediate dissociates from calnexin and then is stabilized by binding peptide. *J. Exp. Med.* 180:2163-71.
- 64.-Booth, C., Koch, G.L.E. 1989. Perturbation of cellular calcium induces secretion of luminal ER proteins. *Cell.* 59:729-37.
- 65.- Rothman, J.E. 1989. Polypeptide chain binding proteins: Catalysts of protein folding and related processes in cells. *Cell.* 59:591-601.
- 66.- Li, Z., Srivastava, P.K. 1993. Tumor rejection antigen gp96/grp94 is an ATPase: implications for protein folding and antigen presentation. *EMBO J.* 12:3143-51.
- 67.- Henderson, R.A., Michel, H., Sakaguchi, K., Shabanowitz, J., Appella, E., Hunt, D.F., Engelhard, V.H. 1992. HLA-A2.1 associated

peptides from a mutant cell line: a second pathway of antigen presentation. *Science*. 255:1264-66.

68.- Wei, M.L., Crosswell, P. 1992. HLA-A2 molecules in an antigen-processing mutant contain signal sequence derived peptides. *Nature*. 356:443-46.

69.- Huckzo, E.L., Bodnar, W.M., Benjamin, D., Sakaguchi, K., Zhu, N.Z., Shabanowitz, J., Henderson, R.A., Appella, E., Hunt, D.F., Engelhard, V.H. 1993. Characteristics of endogenous peptides eluted from the class I MHC molecule HLA-B7 determined by mass spectrometry and computer modeling. *J. Immunol.* 151:2572-88.

70.- Buchmeier, M.J., Zinkernagel, R.M. 1992. Immunodominant T cell epitope from signal sequence. *Science*. 257:1142.

71.- Engelhard, V.H. 1994. Structure of peptides associated with class I and class II MHC molecules. *Ann. Rev. Immunol.* 12:181-207.

72.- DiBrino, M., Parker, K.C., Shiota, J., Kuierman, M., Lukszo, J., Turner, R.V., Biddison, W.E., Coligan, J.E. 1993. Endogenous peptides bound to HLA-A3 possess a specific combination of anchor residues that permit identification of potential antigenic peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90:1508-12.

73.- Hunt, D.F., Henderson, R.A., Shabanowitz, J., Sakaguchi, K., Michel, H., Sevilir, N., Cox, A., Appella, E., Engelhard, V.H. 1992. Characterization of peptides bound to the class I MHC molecule HLA-A2.1 by mass spectrometry. *Science*. 255:1261-63.

74.- van Bleek, G.M., Nathenson, S.G. 1990. Isolation of an endogenously processed immunodominant viral peptide from the class I H-2K^b molecule. *Nature*. 348:213-16.

75.- Demotz, S., Grey, H.M., Sette, A. 1990. The minimal number of class II MHC antigen complexes needed for T cell activation. *Science*. 249:1028-30.

76.- Rötzchke, O., Falk, K., Stevanovic, S., Jung, G., Walden, P., Rammensee, H.G. 1991. Exact prediction of a natural T cell epitope. *Eur. J. Immunol.* 21:2891-94.

77.- Flak, K., Rötzchke, O., Deres, K., Metzger, J., Jung, G., Walden, P., Rammensee, H.G. 1991. Identification of naturally processed viral

- nonapeptides allows their quantification in infected cells and suggests an allele-specific T cell epitope forecast. *J. Exp. Med.* 174:425-34.
- 78.- Christnick, E.R., Luscher, M.A., Barber, B.H., Williams, D.B. 1991. Peptide binding to class I MHC on living cells and quantitation of complexes required for CTL lysis. *Nature.* 352:67-70.
- 79.- Walluy, H.J., Deres, K., Faath, S., Jung, G., Van Pel, A., Boon, T., Rammensee, H.G. 1992. Identification and quantification of a naturally presented peptide as recognized by cytotoxic T lymphocytes specific for an immunogenic tumor variant. *Int. Immunol.* 4:1085-90.
- 80.- Zhang, Q.J., Gavioli, R., Klein, G., Masucci, M.G. 1993. An HLA-A11-specific motif in nonamer peptides derived from viral and cellular proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:2217-21.
- 81.- Rothbard, J.B., Taylor, W.R. 1988. A sequence pattern common to T cell epitopes. *EMBO J.* 7:93-100.
- 82.- Cornette, J.L., Margalit, H., DeLisi, C., Berzofsky, J.A. 1989. Identification of T-cell epitopes and use in construction of synthetic vaccines. *Methods Enzymol.* 178:611-34.
- 83.- Rothbard, J.B., Geftter, M.L. 1990. Interactions between immunogenic peptides and MHC proteins. *Ann. Rev. Immunol.* 9:527-66.
- 84.- Bertoletti, A., Chisari, F.V., Penna, A., Guilhot, S., Galati, L., Missale, G., Fowler, P., Schlicht, H.J., Vitiello, A., Chesnut, R.C., Fiaccadori, F., Ferrari, C. 1993. Definition of a minimal optimal cytotoxic T-cell epitope within the hepatitis B virus nucleocapsid protein. *J. Virol.* 67:2376-80.
- 85.- Bednarek, M.A., Sauma, S.Y., Gammon, M.C., Porter, G., Tshankar, S., Williamson, A.R., Zweerink, H.J. 1991. The minimum peptide epitope from the influenza virus matrix protein. Extracellular and intracellular loading of HLA-A2. *J. Immunol.* 147:4047-53.
- 86.- Traversari, C., van der Bruggen, P., Luescher, I.F., Lurquin, C., Chomez, P., Van Pel, A., De Plaen, E., Amar-Costesec, A., Boon, T. 1992. A nonapeptide encoded by human MAGE-1 is recognized on HLA-A1 by cytotoxic T lymphocytes directed against tumor antigen MZ2-E. *J. Exp. Med.* 176:1453-57.

- 87.- Rotzchke, O., Falk, K., Deres, K., Schild, H., Norda, M., Metzger, J., Jung, G., Rammensee, H.G. 1990. Isolation and analysis of naturally processed viral peptides as recognized by cytotoxic T cells. *Nature*. 348:252-54.
- 88.- Hill, A.V.S., Elvin, J., Willis, A.C., Aidoo, M., Allsopp, C.E.M., Gotch, F.M., Gao, X.M., Takiguchi, M., Greenwood, B.M., Townsend, A.R.M., McMichael, A.J., Whittle, H.C. 1992. Molecular analysis of the association of HLA-B35 and resistance to severe malaria. *Nature*. 360:434-39.
- 89.- Pamer, E.G., Harty, J.T., Bevan, M.J. 1992. Precise prediction of a dominant class I MHC-restricted epitope of *Lysteria monocytogenes*. *Nature*. 353:852-55.
- 90.- Cossius, J., Gould, K.G., Smith, M., Driscoll, P., Brownlee, G.G. 1993. Precise prediction of a K^b-restricted cytotoxic T cell epitope in the NS1 protein of influenza virus using an MHC allele-specific motif. *Virology*. 193:289.
- 91.- Skipper, J., Slauss, H.J. 1993. Identification of two cytotoxic T lymphocyte-recognized epitopes in the ras protein. *J. Exp. Med* 177:1493-98.
- 92.- Nijman, H.W., Houbiers, J.G., Vierboom, M.P., van der Berg, S.H., Drijfhout, J.W., Kast, W.M. 1993. Identification of peptide sequences that potentially trigger HLA-A2.1-restricted cytotoxic T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 23:1215-19.
- 93.- Parker, K.C., Bednarek, M.A., Hull, L.K., Utz, U., Cunningham, B., Zweerink, H.J., Biddison, W.E., Coligan, J.E. 1992. Sequence motifs important for peptide binding to the human MHC class I molecule, HLA-A2. *J. Immunol.* 149:3580-87.
- 94.- Rupert, J., Grey, H.M., Sette, A., Kubo, R.T., Sidney, J., Celis, E. 1993. Prominent role of secondary anchor residues in peptide binding to A2.1 molecules. *Cell*. 74:929-37.
- 95.- Elliot, T., Elvin, J., Cerundolo, V., Allen, H., Townsend, A. 1992. Structural requirements for the peptide-induced conformational change of free major histocompatibility complex class I heavy chains. *Eur. J. Immunol.* 22:2083-91.

- 96.- Maryanski, J.L., Romero, P., Van Pel, A., Boon, T., Salemme, F.R., Cerollini, J.C., Corradin, G. 1991. The identification of tyrosine as a common key residue in unrelated H-2K^d restricted antigenic peptides. *Int. Immunol.* 3(10):1035-42.
- 97.- Jameson, S.C., Bevan, M.J. 1992. Dissection of major histocompatibility complex (MHC) and T cell receptor contact residues in a K^b-restricted ovalbumin peptide and an assessment of the predictive power of MHC-binding motifs. *Eur. J. Immunol.* 22:2663-67.
- 98.- Parker, K.C., Shields, M., DiBrino, M., Brooks, A., Coligan, J.E. 1995. Peptide binding to MHC class I molecules: Implications for antigenic peptide prediction. *Immunol. Res.* 14:34-57.
- 99.- Hahn, Y.S., Hahn, C.S., Braciato, T.J., Rice, C.M. 1992. CD8⁺ T cell recognition of an endogenously processed epitope is regulated primarily by residues within the epitope. *J. Exp. Med.* 176:1335-41.
- 100.- Takahashi, K., Dai, L.C., Forest, T., Biddison, W.E., Earl, P., Moss, B., Ennis, F.A. 1991. Specific lysis of human immunodeficiency virus type I-infected cells by a HLA-A3.1-restricted CD8 cytotoxic T-lymphocyte clone that recognizes a conserved peptide sequence within the gp41 subunit of the envelope protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:10277-81.
- 101.- Buus, S., Sette, A., Colon, S.M., Grey, H.M. 1988. Autologous peptides constitutively occupy the antigen binding site on Ia. *Science.* 242:1045-47.
- 102.- Chicz, R.M., Urban, R.G., Gorga, J.C., Vignali, D.A., Lane, W.S., Strominger, J.L. 1993. Specificity and promiscuity among naturally processed peptides bound to HLA-DR alleles. *J. Exp. Med.* 178:27-47.
- 103.- Wallny, H.J., Rammensee, H.G. 1990. Identification of classical minor histocompatibility antigen as cell-derived peptide. *Nature.* 343:275-78.
- 104.- Rötzchke, O., Falk, K., Wallny, H.J., Faath, S., Rammensee, H.G. 1990. Characterization of naturally occurring minor histocompatibility peptides including H-4 and H-Y. *Science.* 249:283-87.

- 105.- Jardtzyk, T.S., Lane, W.S., Robinson, R.A., Madden, D.R., Wiley, D.C. 1991. Identification of self peptides bound to purified HLA-B27. *Nature*. 353:326-29.
- 106.- Rudensky, A.Y., Preston-Hurlburt, P., Hong, S.C., Barlow, A., Janeway, C.A. Jr. 1991. Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules. *Nature*. 353:622-27.
- 107.- Chicz, R.M., Urban, R.G., Lane, W.S., Gorga, J.C., Stern, L.J., Vignali, D.A., Strominger, J.L. 1992. Predominant naturally processed peptides bound to HLA-DR1 are derived from MHC-related molecules and are heterogeneous in size. *Nature*. 358:764-68.
- 108.- Hunt, D.F., Michel, H., Dickinson, T.A., Shabanowitz, J., Cox, A.L., Sakaguchi, K., Appella, E., Grey, H.M., Sette, A. 1992. Peptides presented to the immune system by the murine class II major histocompatibility complex molecule I-A^d. *Science*. 256:1817-20.
- 109.- Hunt, D.F., Yates, J.R., Shabanowitz, J., Winston, S., Haucy, C.R. 1986. Protein sequencing by tandem mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 83:6233-37.
- 110.- Parkin, D.M., Pisani, P., Ferlay, J. 1993. Estimates of the worldwide incidence of eighteen major cancers in 1985. *Int. J. Cancer*. 54:594-606.
- 111.- Pisani, P., Parkin, D.M., Ferlay, J. 1993. Estimates of the worldwide mortality from eighteen major cancers in 1985. Implications for prevention, and projections of the future burden. *Int. J. Cancer*. 55:891-901.
- 112.- Brisson, J., Roy, M., Fortier, M., Bouchard, C., Meisels, A. 1988. Condyloma and intraepithelial neoplasia of the uterine cervix- a case-control study. *Amer. J. Epidemiol.* 128:337-42.
- 113.- Daling, J.R., Sherman, K.J., Weiss, N.S. 1986. Risk factors for condyloma acuminatum in women. *Sex. Transm. Dis.* 13:16-18.
- 114.- Rogers, A.E., Longnecker, M.P. 1988. Biology and disease. Dietary and nutritional influences on cancer: a review of epidemiological and experimental data. *Lab. Invest.* 59:729-59.

- 115.- Schneider, A., Shah, K. 1989. The role of vitamins in the etiology of cervical neoplasia: an epidemiological review. *Arch. Gynecol. Obstet.* 246:1-13.
- 116.- Ziegler, R.G., Brinton, L.A., Hamman, R.F., Lehman, H.F., Levine, R.S., Mallin, K., Norman, S.A., Rosenthal, J.F., Trumble, A.C., Hoover, R.N. 1990. Diet and the risk of invasive cervical cancer among white women in the United States. *Amer. J. Epidemiol.* 132:432-45.
- 117.- Brinton, L.A. 1991. Oral contraceptives and cervical neoplasia. *Contraception.* 43:581-95.
- 118.- Reeves, W.C., Brinton, L.A., Brenes, M.M., Quiroz, E., Rawls, W.E., De Britton, R.C. 1985. Case-control study of cervical cancer in Herrera province. *Int. J. Cancer.* 36:55-60.
- 119.- Vessey, M., Grieco, D. 1989. Carcinoma of the cervix and oral contraceptives: epidemiological studies. *Biomed. Pharmacother.* 43:157-60.
- 120.- Wank, R., Thomssen, C. 1991. High risk of squamous cell carcinoma of the cervix for women with HLA-DQw3. *Nature.* 352:723-24.
- 121.- Apple, R.J., Erlich, H.A., Klitz, W., Manos, M.M., Becker, T.M., Wheeler, C.M. 1994. HLA-DR-DQ associations with cervical carcinoma show papillomavirus-type specificity. *Nature. Genetics.* 6:157-62.
- 122.- Wright, T.C., and Richart, R.M. 1989. Review. Role of human Papillomavirus in the pathogenesis of genital tract warts and cancer. *Gynecologic. Onc.* 37:151-164.
- 123.- Peto, R., and zurHausen. 1986. Viral etiology of cervical cancer. 21 Branbury Report. Cold Spring Harbor Lab. pp:245.
- 124.- Matlashewski G. 1989. The cell biology of human Papillomavirus transformed cells. *Anticancer Res.* 9:1447-1456.
- 125.- Devesa, S. S., Young, J. L. Jr., Brinton, L.A., and Fraumeni, J.F., Jr. 1989. Recent trends in cervix uteri cancer. *Cancer.* 64:2184-90.
- 126.- Howley, P. M. 1991. Role of the human Papillomaviruses in human cancer. *Cancer Res.* 51:5019-22.
- 127.- Pfister, H. 1987. Papillomaviruses: General description, taxonomy and classification. In the papovaviridae Edited by Salzman NP, Howley P.M., New York Plenum: t-38.

- 128.- Jochmus, K.I., Schneider, A., Brann, R., Kimming, R., Koldovsky U., Schneeweis, K.E., Seedorf, K., Glassmann, L. 1989. Human Papillomavirus type 16 early proteins in human sera: correlation of anti-E7 reactivity with cervical cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 81:1698-1704.
- 129.- Mann, V. M. de L.S., Brenes, M., Briton, L. A., Rawls, J.A., Green, M., Reeves, W.C., Rawls, W.E. 1990. Occurrence of IgA and IgG antibodies to select peptides representing human papillomavirus type 16 among cervical cancer cases and controls. *Cancer Res.* 50:7815-7819.
- 130.- Muller, M., Viscidi, R. P., Sun, Y., Guerrero, E., Hill, P. M., Shah, F., Bosch, F.X., Munoz, N., Gissmann, L., Shah, K.V. 1992. Antibodies to HPV-16 E6 and E7 proteins as markers for HPV-16-associated invasive cervical cancer. *Virology* 187:508-514.
- 131.- Kanda, T., Onda, T., Zama, S., Yasugi, T., Furuno, A., Watanabe, S., Kawana, T., Sugase, M., Ueda, K., Sonoda, T. 1992. Independent association of antibodies against human Papillomavirus type 16 E1/E4 and E7 proteins with cervical cancer. *Virology* 190:724-732.
- 132.- Onda, T., Kanda, T., Zama, S., Yasugi, T., Watanabe, S., Kawana, T., Ueda, K., Yoshikawa, H., Taketani, Y., Yoshiike, K. 1993. Association of the antibodies against human Papillomavirus 16 E4 and E7 proteins with cervical cancer positive for human Papillomavirus DNA. *Int. J. Cancer.* 54:624-628.
- 133.- Viscidi, R. P., Sun, Y., Tsuzaki, B., Bosch, F.X., Munoz, N., Shah, K.V. 1993. Serologic response in human Papillomavirus-associated invasive cervical cancer. *Int. J. Cancer.* 55:780-784.
- 134.- Lehtinen, M., Leminen, A., Kuoppala, T., Tilkkainen, M., Lehtinen, T., Lehtovirta, P., Punnonen, R., Vesterinen, E., Paavonen, J. 1992. Pre- and post-treatment serum antibody responses to HPV-16 E2 and HSV 2 ICP8 proteins in women with cervical carcinoma. *J. Med. Virol.* 37:180-186.
- 135.- Dillner, J., Lenner, P., Lehtinen, M., Eklund, C., Heino, C., Wiklund, P., Hallmans, G., Stendahl, U. 1994. Population-based seroepidemiological study of cervical cancer. *Cancer Res.* 54:134-141.
- 136.- Ghosh, A. K., Smith, N. K., Stacey, S. N., Glew, S. S., Connor, M.E., Arand, J.R., Stern, P.L. 1993. Serological response to HPV-16 in

cervical dysplasias and neoplasia: correlation of antibodies to E6 with cervical cancer. *Int. J. Cancer*. 53:591-596.

137.- Benton, C., Shahidullah, H., Hunter, J. 1992. Human Papillomaviruses. *Papillomavirus Rep.* 3:23-26.

138.- Tindie, R. W., Fernando, G.J., Sterling, J.C., Frazer, I.H. 1991. A "public" T-helper epitope of the E7 transforming protein of human Papillomavirus 16 provides cognate help for several E7 B-cell epitopes from cervical cancer-associated human Papillomavirus genotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*. 88: 5887-5891.

139.- Dillner, L., Heino, P., Moreno-López, J., Dillner, J. 1991. Antigenic and immunogenic epitopes shared by human Papillomavirus type 16 and bovine, canine, and avian Papillomaviruses. *J. Virology*. 65: 6862-6871.

140.- Feltkamp, M.C., Smits, H.L., Vierboom, M.P., Mlnaar, R.P., de Johgh, B.M., Brijfhout, J.W., Ter Schegget, J., Melief, C. J., Kast, W. M. 1993. Vaccination with cytotoxic T lymphocyte epitope containing peptide containing against a tumor induced by human Papillomavirus type 16 - transformed cells. *Eur. J. Immunol.* 23:2242-2249

141.- Sadovnikova, E., Zhu, K. J., Collins, S.M., Zhou, J., Vonsden, K., Crawford, L., Beverley, P., Stauss, H. J. 1994. Limitations of predictive motifs revealed by cytotoxic lymphocyte-T epitope mapping of the human Papillomavirus E7 protein. *Int. Immunol.* 6:289-296.

142.- Ellis, J.R.M., Keating, P.J., Baird, J., Hounsell, E.F., Renouf, D.V., Rowe, M., Hopkins, D., Duggan-Keen, M.F., Bartholemew, J., Young, L.S., Stern, P.L. 1995. The association of a HPV 16 oncogene variant with HLA-B7 has implications for vaccine design in cervical cancer. *Nature Med.* 1.

143.- Kast, W., Brandt, R., Sidney, J., Drijhout, J. W., Kubp, R.T., Grey, H.M., Melief, C.J., Sette, A. 1994. Role of HLA-A motifs in identification of potential CTL epitopes in human Papillomavirus type 16 E6 and E7 proteins. *J. Immunol.* 152: 3904-3912.

144.- Rensing, M. E., Sette, A., Brandt, R.M.P., Ruppert, J., Wentworth, P. A., Hartman, M., Oseroff, C., Grey, H. M., Melief, C. J. M., Kast, W. M. 1995. Human CTL epitopes encoded by human Papillomavirus type 16

- E6 and E7 identified through *in vivo* and *in vitro* immunogenicity studies of HLA-A 0201-binding peptides. *J. Immunol.* 154:5934-5943.
- 145.- Gao, L., Walter, J., Travers, P., Stauss, H., Chain, B.M. 1995. Tumor-associated E6 protein on human Papillomavirus type 16 contains an unusual H-2K^b-restricted cytotoxic T cell epitope. *J. Immunol.* 155:5519-26.
- 146.- Rensing, M.E., Sette, A., Brandt, R.M.P., Ruppert, J., Wentworth, P.A., Hartman, M., Oseroff, C., Grey, H.M., Melief, C.J.M., Kast, M. 1995. Human CTL epitopes encoded by human Papillomavirus type 16 E6 and E7 identified through *in vivo* and *in vitro* immunogenicity studies of HLA-A*0201-binding peptides. *J. Immunol.* 154:5934-43.
- 147.- McArdle, J. P., Muller, K. 1986. Quantitative assessment of Langerhans cells in human cervical intraepithelial neoplasia and wart virus infection. *J. Am. J. Obstet. Gynecol.* 154:509-515.
- 148.- Morelli, A. E., Sananes, C., Di, P.G., Paredes, A., Fainboim, L. 1993. Relationship between types of human Papillomavirus and Langerhans cells in cervical condyloma and intraepithelial neoplasia. *Am. J. Clin. Pathol.* 99:200-206.
- 149.- Splnillo, A., Tenti, P., Zappatore, R., De S. F., Silini, E., Guaschino, S. 1993. Langerhan's cell counts and cervical intraepithelial neoplasia in women with human immunodeficiency virus infection. *Gynecol. Oncol.* 48:210-213.
- 150.- Woodworth, C.D., Simpson, S. 1993. Comparative lymphokine secretion by cultured normal human cervical keratinocytes, Papillomavirus -Immortalized, and carcinoma cell lines. *Am. J. Pathol.* 142:1544-1555.
- 151.- Evans, CH., Flugelman, A. A., DiPaolo, J. A. 1993. Cytokine modulation of immune defenses in cervical cancer. *Oncology.* 50:245-251.
- 152.- Malejczyk, J., Malejczyk, M., Majewski, S., Orth, G., Jablonska, S. 1993. NK-cell activity in patients with HPV 16-associated anogenital tumors: Defective recognition of HPV16-harboring keratinocytes and restricted unresponsiveness to immunostimulatory cytokines. *Int. J. Cancer.* 54:917-921.

- 153.- Banks, L., Moreau, F., Vousden, K., Pim, D., Matlashewski, G. 1991. Expression of the human Papillomavirus E7 oncogene during cell transformation is sufficient to induce susceptibility to lysis by activated macrophages. *J. Immunol.* 146:2037-2042.
- 154.- Cromme, F.V., Airey, J., Heemels, M.-T., Ploegh, H.L., Keating, P.J., Stern, P.L., Meijer, C.J.L.M., Walboomers, J.M.M. 1994. Loss of transporter protein, encoded by the TAP-1 gene, is highly correlated with loss of HLA expression in cervical carcinomas. *J. Exp. Med.* 179:335-40.
- 155.- Monroy, G.A., C.R., Rocha, Z.L., Trejo, B.C., Ramirez, G.J., Dario, M.R., Weiss, S.B. 1992. Establecimiento de siete estirpes celulares provenientes de biopsias de cérvix normal y con cáncer cérvico-uterino y sus diferentes contenidos y localizaciones de desmogleína I. *Oncología.* 7:69-76.
- 156.- Parham, P., Bodmer, W.F. 1978. Monoclonal antibody to a human histocompatibility alloantigen, HLA-A2. *Nature* 276:397-99.
- 157.- Fong, S.K.H., Taidi, B., Ness, D., Grumet, F.C. 1986. A monoclonal antibody against HLA-A11 and -A24. *Human Immunol.* 15:316-19.
- 158.- Grumet, F.C., Brian, M.F., Engleman, E.G. 1981. Monoclonal anti-HLA-B27 antibody (B27M¹): Production and lack of detectable typing difference between patients with ankylosing spondylitis, Reiter's syndrome, and normal controls. *Lancet.* 2:174-75.
- 159.- Radka, S.F., Kostyu, D.D., Amos, D.B. 1982. A monoclonal antibody directed against the HLA-Bw6 epitope. *J. Immunol.* 128:2804-06.
- 160.- Parham, P., Barnstable, C.J. & Bodmer, W.F. 1979. Properties of an anti-HLA-A,-B,-C monoclonal antibody. Use of a monoclonal antibody (W6/32) in structural studies of HLA-A,-B,-C antigens. *J. Immunol.* 123:342-349.
- 161.- Griffiths, B. 1988. Scaling-up of animal cell cultures. Ed. Freshney, R.I. Animal cell culture. A practical approach. 2a. ed. IRL Press, England. pp. 33-69.
- 162.- Coligan, J.E., Kruisbeck, A.M., Margulies, D.H., Shevach, E.M., Strober, W. 1992. Current Protocols in Immunology. Greene Publishing Associates & Wiley-

- Intersciences. pp. 2.6.1-2.6.6, 5.0.3-5.8.5, 8.2.1-8.2.6, 8.4.1-8.4.7, 8.9.1-8.9.7.
- 163.- Hay, R.J. 1988. Preservation and characterisation. Ed. Freshney, F.I. Animal cell culture. A practical approach. 2a. ed. IRL Press, England. pp. 71-111.
- 164.- Harlow, E., Lane, D. 1988. Antibodies. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, U.S.A. pp. 313-315, 519-21, 616-19.
- 165.- Zitvogel, L., Mayordomo, J.I., Tjandrawan, T., De Leo, A.B., Clarke, M.R., Lotze, M., Storkus, W.J. 1996. Therapy of murine tumors with tumor peptide-pulsed dendritic cells: Dependence on T cells, B7 costimulation, and T helper cell 1-associated cytokines. *J. Exp. Med.* 183:87-97.
- 166.- Celluzi, C.M., Mayordomo, J.I., Storkus, W.J., Lotze, M.T., Falo, L.D. 1996. Peptide pulsed dendritic cells induce antigen-specific, CTL-mediated protective tumor immunity. *J. Exp. Med.* 183:283-87.
- 167.-
- 168.- Keating, P.J., Cromme, F.V., Duggan-Keen, M., Sniijders, P.J.F., Walboomers, J.M.M., Hunter, R.D., Dyer, P.A., Stern, P.L. 1995. Frequency of down-regulation of individual HLA-A and -B alleles in cervical carcinomas in relation to TAP-I expression. *Br. J. Cancer* 72:405-11.
- 169.- Monroy, G.A. 1996.
- 170.- Neefjes, J.J., Ploegh, H.L. 1988. Allele and locus-specific differences in cell surface expression and the association of HLA class I heavy chain with β_2 -microglobulin: differential effects of inhibition of glycosylation on class I subunit association. *Eur. J. Immunol.* 18:801-10.
- 171.- Sanda, M.G., Restifo, N.P., Walsh, J.C. 1995. Molecular characterization of defective antigen processing in human prostate cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 85:280-85.

172. - Eggers, M., Boes-Fabian, B., Ruppert, T., Kloetzel, P.M., Korzinowski, 1995. The cleavage preference of the proteasome governs the yield of antigenic peptides. *J. Exp. Med.* 182:1865-70.
173. - Grant, E.P., Michalek, M.T., Goldberg, A.L., Rock, K.L. 1995. Rate of antigen degradation by the ubiquitin-proteasome pathway influences MHC class I presentation. *J. Immunol.* 155:3750-58.
174. - Chen, H.L., Gabrilovich, D., Tampé, R., Girgis, K.R., Nadaf, S., Carbone, D.P. 1996. A functionally defective allele of TAP-1 results in loss of MHC class I antigen presentation in a human lung cancer. *Nature Genetics.* 13:210-13.
175. - Korkolopoulou, P., Kaklamanis, L., Pezzella, F., Harris, A.L., Gatter, K.C. 1996. Loss of antigen-presenting molecules (MHC class I and TAP-1) in lung cancer. *Br. J. Cancer.* 73:148-53.
176. - Khanna, R., Burrows, S.R., Argact, V., Moss, D. 1994. Endoplasmic reticulum signal sequence facilitated transport of peptide epitopes restores immunogenicity of an antigen processing defective tumor cell line. *Int. Immunol.* 6:639-45.
177. - Kaklamanis, L., Leek, R., Koukourakis, M., Gatter, K.C., Hams, A.L. 1995. Loss of transporter in antigen processing 1 transport protein and major histocompatibility complex class I molecules in metastatic breast cancer. *Cancer Res.* 55:5191-94.
178. - Campbell, A.E., Slater, J.S. 1994. Down-regulation of major histocompatibility complex class I synthesis by murine cytomegalovirus early gene expression. *J. Virol.* 68:1805-11.
179. - Hengel, H., Lucin, P., Jonjic, S., Ruppert, T., Korzinowski, U.H. 1994. Restoration of cytomegalovirus antigen presentation by gamma interferon combats viral escape. *J. Virol.* 68:289-97.

- 180.- Andersson, M., Paabo, T., Nilsson, T., Peterson, P.A. 1985. Impaired intracellular transport of class I MHC antigen as a possible means for adenoviruses to evade immune surveillance. *Cell*. 41:215-22.
- 181.- Beier, D.C., Cox, J.H., Vining, D.R., Cresswell, P., Engelhard, V.H. 1994. Association of human class I MHC alleles with the adenovirus E3/19K protein. *J. Immunol.* 152:3862-72.
- 182.- Catipovic, B., Dal Porto, J., Mage, M., Johansen, T.E., Schneck, J.P. 1992. Major histocompatibility complex conformational epitopes are peptide specific. *J. Exp. Med.* 176:1611-18.
- 183.- Bluestone, J.A., Jameson, S., Miller, S., Dick, R. 1992. Peptide-induced conformational changes in class I heavy chain alter major histocompatibility recognition. *J. Exp. Med.* 176:1757-61.

APENDICE 1

SOLUCIONES PARA EL CULTIVO DE CELULAS

Medio de Cultivo RPMI 1640: 800 ml H₂O + 16.4 g de medio RPMI 1640 en polvo (Microlab, México) + 3.7 g de bicarbonato de sodio + 100 U/ml de estreptomicina + 100 U/ml de penicilina. Ajustar el pH=7.2 y aforar a un litro. Esterilizar por filtración con membrana de 0.22 µ.

Verseno: 800 ml H₂O + 3.04 g de Tris base (Sigma, U.S.A.) + 8 g Cloruro de sodio (Microlab, México) + 0.4 g Cloruro de potasio (Baker, México) + 0.2 g Etilen-diamin-tetra-acético (EDTA) (Sigma, U.S.A.). Ajustar pH=7.7 y aforar a un litro. Esterilizar en autoclave a 20 lb por 20 minutos.

Solución Amortiguadora de Fosfatos: 800 ml H₂O + 8 g Cloruro de sodio (Baker, México) + 2.16 g Fosfato de sodio monobásico (Baker, México) + 0.2 g Fosfato de potasio (Baker, México) + 0.2 g Cloruro de potasio (Baker, México). Ajustar pH=7.2 y aforar a un litro. Esterilizar por autoclave a 20 lb por 20 minutos.

APENDICE 2

SOLUCIONES PARA PURIFICACION DE ANTICUERPOS

Solución de desprendimiento de anticuerpo: 3.7525 g Glicina (Sigma, U.S.A.) aforar a 250 ml. Llevar a pH=2.8 con HCl 0.2 M y aforar a 500 ml.

Solución de neutralización: 250 ml H₂O + 6.055 g Tris base (Sigma, U.S.A.)

Amortiguador de acoplamiento: 800 ml H₂O + 29.22 g Cloruro de sodio (Microlab, México) + 8.401 g Bicarbonato de sodio (Baker, México). Ajustar pH=8.3 y aforar a un litro.

APENDICE 3

SOLUCIONES PARA OBTENCION DE MOLECULAS CMH-I

Amortiguador de lisis: 800 ml de H₂O + 6.055 g Tris base (Sigma, U.S.A.) + 8.766 g Cloruro de sodio (Microlab, México) + 1.8612 g EDTA (Sigma, U.S.A.) + 10 ml Nonidet P-40 (NP-40) (Sigma, U.S.A.) + 0.03484 g

Fluoruro de fenilmetilsulfonil (PMSF) (Sigma, U.S.A.) (Diluirlo en etanol puro y usarlo inmediatamente) + 0.0771 g Dithiothreitol (DTT) (Sigma, U.S.A.) (Usarlo inmediatamente). Ajustar el pH=7.8 y aforar a un litro. Agregar 1 ml de Aprotinina (Sigma, U.S.A.)

Solución de lavado de Sefarosa: 11.6 µl Acido clorhídrico y aforar a un litro.

Solución de inactivación: 800 ml de H₂O + 15.014 g Glicina (Sigma, U.S.A.). Ajustar pH=8.0 y aforar a un litro.

Amortiguador de acetatos: 800 ml de H₂O + 29.22 g Cloruro de sodio (Microlab, México) + 13.6085 g Acetato de sodio (Baker, México) + 5.72 ml Acido acético glacial (Merck, México). Ajustar pH=4 y aforar a un litro.

Amortiguador Tris-HCl: 800 ml H₂O + 6.055 g Tris base (Sigma, U.S.A.) + 29.22 g Cloruro de sodio (Microlab, México). Ajustar pH=8.0 y aforar a un litro.

Amortiguador de lavado: 800 ml de H₂O + 6.055 g Tris base (Sigma, U.S.A.) + 1.8612 g EDTA (Sigma, U.S.A.) + 8.766 g Cloruro de sodio (Microlab, México) + 1 ml NP-40 (Sigma, U.S.A.). Ajustar el pH=7.8 y aforar a un litro.

Solución Tris-EDTA: 800 ml H₂O + 6.055 g Tris base (Sigma, U.S.A.) + 1.8612 g EDTA (Sigma, U.S.A.)

Solución de ácido acético: 10 ml Acido acético glacial (Merck, México) + 90 ml H₂O

APENDICE 4

SOLUCIONES PARA TINCION DE GELES

Solución fijadora: 50 ml Metanol (Sigma, U.S.A.) + 10 ml Acido acético glacial (Merck, México) + 40 ml H₂O

Solución desnaturalizadora: 5 ml Metanol (Sigma, U.S.A.) + 7 ml Acido acético glacial (Merck, México) + 88 ml de H₂O.

Solución de glutaraldehído: 10 ml Glutaraldehído (Sigma, U.S.A.) + 100 ml H₂O.

Solución de DTT: 100 ml H₂O + 100 µg DTT (Sigma, U.S.A.)

Solución desarrolladora: 150 ml H₂O + 4.5 g Carbonato de sodio (Merck, U.S.A.) + 72.97 µl Formaldehído (38%) (Merck, México).
Solución ácido cítrico: 4.8333 g Acido cítrico (Merck, U.S.A.) + 10 ml H₂O.

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer de la manera más sincera y firme al M. en I.B.S.H. Alberto Monroy García y al Dr. Benny Weiss Steider quienes me han enseñado los primeros pasos de una labor científica.

De igual forma, deseo agradecer profundamente a los doctores Armando Isibasi, Vianey Ortiz Navarrete, José Moreno, Antonio Ramírez, al Químico Marco Antonio Chávez de la Unidad de Investigación en Inmunoquímica del Centro Médico Nacional Siglo XXI; a la M. en C. Lourdes Mora, al Dr. Edelmiro Santiago y a la M. en C. Roslava Rangel de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer de la F.E.S. Zaragoza, quienes de manera incondicional asesoraron y ayudaron en la realización de este trabajo.

Expreso mis agradecimientos al M. en C. Carlos Bautista, a los Biólogos Fabián Flores y Jorge Hernández por sus atinadas observaciones en la revisión de la presente tesis.

Asimismo deseo agradecer a todos mis amigos y compañeros de la carrera y de la Unidad de Investigación, con quienes tuve a lo largo de la carrera la oportunidad de aprender y convivir.

Finalmente deseo agradecer a los técnicos Ranulfo Pedraza y José Chavarría quienes fueron una gran ayuda en la realización de este trabajo.