

127
2eq.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

NUMERACION MAL COORDINADA



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

GENERACION Y CARACTERIZACION DE CLONAS DE CELULAS PRESENTADORAS DE ANTIGENO QUE EXPRESAN UN ANTIGENO ENDOGENO CON DISTINTAS LOCALIZACIONES INTRACELULARES

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO PRESENTA :
PATRICIA VALADEZ PACHECO



MEXICO, D. F.

1998

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

261557



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.

JURADO ASIGNADO AL TEMA

Presidente: Prof. Hernández Montes Homero
Vocal: Prof. López González José Sullivan
Secretario: Prof. Moreno Rodríguez José
1er Suplente: Prof. Ortega Muñoz Raquel
2do Suplente: Prof. Paniagua Solís Jorge Fernando

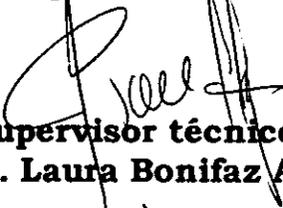
Trabajo desarrollado en:

**Hospital de Especialidades. Centro Médico S.XXI.
Laboratorio de Investigación en Inmunobiología**



Asesor

Dr. José Moreno Rodríguez



Supervisor técnico

M. en C. Laura Bonifaz Alfonzo



Sustentante

Patricia Valadez Pacheco

Las fórmulas protocolarias suelen ser recursos expresivos que enmascaran un gran vacío semántico. En este tenor están los brindis diplomáticos (¡ Larga vida a los reyes de Holanda ¡); las dedicatorias en una tesis a los sinodales (y al Dr. Gregorio Salvatierra, sabio donde los haya); los agradecimientos en la entrega de los óscares (agradezco a mi nana Lorenza el haberme castigado sin tregua durante mis primeros 17 años de vida. Sin sus regaños y constantes críticas hoy mi vida sería un páramo sin reflectores); y en las despedidas editoriales, ¿Cómo escapar a esta función fáctica de la lengua y decir algo con verdadero sentido?

Ricardo Cayuela .

Dedico esta tesis a:

Mi Madre, por haberme apoyado con amor y tenido paciencia en la realización de esta tesis.

Matrushka, sé que muchos fines de semana te preguntaste ¿qué hacía una niña loca como yo encerrada en un hospital hasta altas horas de la noche?; bueno he aquí lo que hacía, puede que no entiendas totalmente el contexto científico que encierra este trabajo, pero créeme es simplemente

¡maravilloso!

Mi padre, por entender lo que hago, por acompañar y llevar cuando se requería a una niña loca en sus incursiones nocturnas a áreas téticas del Hospital de especialidades (alias el área de investigación) a sacar del horno alguna que otra reacción colorida, de ligación, algún cultivo de células, bacterias y alguna que otra levadura. Simplemente

¡Gracias!

Mis hermanos, a Pepe porque sin ése aguijón de competencia, yo a estas alturas estaría casada con un burócrata y con hijos cumpliendo el papel histórico de la mujer. Gracias por jalarme en esta competencia de la vida. A Oscar, que en su aparente simpleza y liviandad me ha mostrado su nobleza de hermano y que en esta vida también se vale divertirse. Creo que esta será la única prueba escrita que diga lo mucho que los quiero

¡aunque no lo crean!

(procuraré que sólo exista un ejemplar con esta dedicatoria)

Esta dedicatoria es para.....¿cómo describirla?.....pués es para una familia, que no tiene comparación (sólo con los Adams), tiene una abuela que es un ser como el que no hay dos : dura, enérgica, a veces terca, con ideas del siglo pasado y que más de una vez me rompió la boca por andar con ideas subersivas, pero a pesar de todo esto no la cambio por nada es ¡bellísima!. Esta familia especial tuvo un abuelo como el de los cuentos, gordito, bonachón y buenísima onda, y que siempre me contaba historias de las antiguas culturas, política y hasta matemáticas desde muy chica, lo extraño, pero me alegro de haber sido la consentida de él por que me tocó conocerlo como nadie. También tiene esta familia tíos muy especiales y ejemplares como: Tavo , todos queremos ser como él, como el tío Caibo todos los varones quieren hacer lo que él, como el tío Vic Buenísima onda , junto con su esposa la tía Silvia(que nunca pierde el estilo por cierto), como el tío Nico bueno de él ni hablar, como la tía Lupe que junto con Memo, cuidó de mí y de mis hermanos desde muy chicos, la tía Mellitos que bueno haría todo un tratado de ella, el tío Paco que en su tiempo fue el mejor maratonista de México y su esposita Irma no se queda atrás.....¿qué más?.. ha pues los primos...hay los primos... toda una sociedad de locos reventados desde el más pequeño que tiene cinco años hasta el más grandulón que tiene 28, todos son igualitos viéndolos creo que soy adoptada(Gracias por ser mis primos Memito, Abraham, Vicky, Mariana, Gaby, Alis, Ale, Bibi, Luis y Carlos y por supuesto a la nueva prima Judith). Bueno a esta familia tan especial les dedico mi tesis aunque no creo que la lean alguna vez.

Ah! por poco se me olvida un ser especial ya que no pertenece a nuestro género y especie pero sí a la familia desde hace 12 años: te adoro Puchito y al nuevo miembro de sólo seis meses de estancia: Benjito. Bueno creo que ahora si es todo .

¡Los amo!

A mis amigos con los que desde la prepa compartí tantos momentos buenos y malos y a los que espero nunca perder Gracias **Rocio** por los momentos que compartimos juntas a lo largo de la carrera, gracias **Arturo**, por ser confidente, amigo y hermano a la vez, gracias **Gina**(donde quiera que estés) por los consejos valiosos que me escribiste, gracias **Gris** por hacerme soportable el primer semestre en la facultad. También agradezco a dos personitas maravillosas que espero nunca cambien, porque encontrar a gente noble como ustedes en este mundo es casi imposible, me siento afortunada de haberlas conocido, gracias **Juliana y Marthita**.

A un ser excepcional que quiero mucho, que me enseñó el principio de no intervención, a entender que el derecho al respeto ajeno es la paz, que las energías de activación también se aplican a las personas y que pueden llegar a ser de cero en las mismas, los balances de masa y de energía, que preocuparse cuando las cosas no tienen solución es inútil y que la ternura no está negada a los IQ's. Gracias **Julio** por ti y por ser único ¡Nunca te voy olvidar!

A dos grandiosísimas buenas amigas y maestras que me enseñaron que en esta vida no todo es ciencia, si no también dolor, injusticia, pobreza, hambre, desempleo y sobre todo que hay apatía a lo nuestro, gracias por hacerme volver a mirar mis raíces, hoy más que nunca me siento orgullosa de ser mexicana, porque eso implica tener un pasado cultural riquísimo (y no me refiero a lo que vinieron a dejar cierta raza de barbados blancos) Gracias **Silvia y Lili** por esta lección.

En la cultura maya a diferencia de la mexicana, los antiguos no ofrecían a corazones humanos a los dioses, si no mariposas, flores, esencias deliciosas y a veces su propio dolor. A mí me gustaría dedicar a manera de reconocimiento y como tributo humilde ésta tesis, no a los dioses tal vez, si no a todas las etnias que en este momento luchan por conseguir el respeto de una sociedad apática y el de un gobierno insensible así como su autonomía.

Y no es necesario viajar a la provincia para ver éstas injusticias. A veces las cosas se dificultan más para algunos por que para la sociedad actual, el exceso de melanina y nuestros rasgos indígenas no son "estéticos".

Quiero agradecer de manera muy especial al Dr. José Moreno y a la M. en C. Laura Bonifaz, asesor y supervisor técnico respectivamente de la presente tesis, el interés, formación apoyo y enseñanza brindada en la realización de este trabajo y en el tiempo de estancia (casi tres años) en el laboratorio de investigación de Inmunobiología del hospital de Especialidades del CMN S. XXI.

Tal vez este trabajo no resolvió muchas dudas, pero lo que si puedo garantizar es que se hizo de corazón.

Con agradecimiento a Mallinicrodt Baker, S.A. de C.V, Aparatos, S.A. de C.V y comercializadora APSA, S.A de C.V., por el apoyo económico brindado para la finalización de esta tesis, através del "Programa de Apoyo a la Investigación" que promueven.

INDICE GENERAL

Resumen	5
Introducción	6
1. Antecedentes	
1.2. Moléculas del MHC	9
1.2.1. Estructura de las moléculas clase II	9
1.2.2. Transporte intracelular del complejo MHC clase II	11
1.2.3. Cadena invariante	11
1.3 Vias de transporte intracelular	13
1.3.1. Vía exocítica	14
1.3.1.1. Proteínas de secreción	14
1.3.1.2. Proteínas de membrana	14
1.3.1.3. Proteínas residentes del retículo endoplásmico	15
1.3.1.4. Proteínas residentes de los lisosomas	15
1.3.1.5. Proteínas citoplásmicas	15
1.3.1.6. Proteínas nucleares y mitocondriales	15
1.3.2. Vía Endocítica	16
1.3.2.1. Micropinocitosis	16
1.3.2.2. Fagocitosis	16
1.3.2.3. Endocitosis mediada por receptores	17
1.3.3. Compartimentos endocíticos que participan en el procesamiento de antígeno	18
1.3.3.1. Compartimentos generales	
1.3.3.1.1. Endosomas tempranos	19
1.3.3.1.2. Endosomas tardíos	19
1.3.3.1.3. Lisosomas	19
1.3.3.2. Compartimentos Especializados	
1.3.3.2.1. MIIC	20
1.3.3.2.2. CIIV	21
1.4. Procesamiento y presentación de antígenos proteicos por moléculas clase II del MHC	21
1.4.1. Procesamiento y presentación de antígenos exógenos por moléculas clase II	22
1.4.2. Procesamiento y presentación de antígenos endógenos por moléculas clase II	24
1.4.2.1. Procesamiento de proteínas de membrana y secreción	24
1.4.2.2. Procesamiento de proteínas residentes del retículo endoplásmico	25

1.4.2.3. Procesamiento de proteínas citoplásmicas.....	26
1.4.2.4. Estudios de presentación de formas endógenas de lisozima de gallina.....	26
2. Justificación.....	29
3. Hipótesis.....	30
4. Objetivo general.....	30
5. Estrategia.....	31
6. Materiales	
6.1. Medio de cultivo.....	32
6.2. Amortiguador salino de fosfatos.....	32
6.3. Antibiótico usado en la selección de transfectantes.....	32
6.4. Plásmidos.....	33
6.5. Líneas celulares.....	36
7. Metodología	
7.1. Curvas de resistencia.....	37
7.2. Electroporación.....	37
7.3. Transfecciones.....	38
7.4. Clonación.....	39
7.5. Selección de las CPA transfectadas.....	40
7.6. Determinación de la eficiencia en la presentación de antígeno por las distintas CPA.....	41
7.6.1. Procedimiento para estudios de presentación de antígeno.....	41
7.6.2. Reducción del MTT.....	42
7.7. Determinación de la sensibilidad de los hibridomas T.....	42
7.8. Titulación de la LG endógena expresada por las CPA.....	43
8. Resultados	
8.1. Transfecciones.....	44
8.2. Formación de colonias resistentes.....	44
8.3. Selección de las CPA resistentes.....	45
8.4. Clonación.....	45
8.5. Estudios de presentación de antígeno	
8.5.1. Eficiencia de activación.....	47
8.5.2. Estudio de la sensibilidad de los hibridomas anti-LG.....	49
8.5.3. Titulación de la concentración de LG endógena.....	51
9. Discusión.....	54
10. Conclusiones.....	60
11. Referencias.....	61

RESUMEN

El procesamiento y presentación de péptidos inmunogénicos es un evento fundamental en la generación de la respuesta inmune. Específicamente la presentación de péptidos de proteínas endógenas por moléculas de clase II es de vital importancia en la generación y prevención de los fenómenos de autoinmunidad y las enfermedades autoinmunes. Sin embargo, la diversidad de los procesos degradativos en los diferentes compartimentos intracelulares ha generado preguntas en cuanto a los mecanismos moleculares mediante los cuales las proteínas endógenas son procesadas y presentadas en las moléculas clase II, para lo cual se ha sugerido la participación de más de un sitio en el procesamiento de antígenos endógenos.

Para ello, se realizaron estudios para determinar si proteínas endógenas con distinta localización intracelular tienen diferencias en su procesamiento y presentación por moléculas clase II del complejo mayor de histocompatibilidad.

Para eso se transfectaron linfocitos B murinos con cDNA que codifican la lisozima de gallina (LG) con señales de transporte intracelular hacia membrana (Tm), retículo endoplásmico (RE), citoplasma (Cito), lisosomas (Liso), compartimentos endocíticos especializados (MIIC) y de secreción (Soluble) y se realizaron estudios de presentación de antígeno para analizar si estas señales de tráfico intracelular ocasionan diferencias en la generación de péptidos de lisozima de gallina.

Se encontró que todas las transfectantes a excepción de la forma MIIC presentaron constitutivamente péptidos de lisozima de gallina endógena con diferente eficiencia. La generación y la alta eficiencia de presentación de péptidos parece ser la misma en las formas transmembranales y la soluble, no obstante la generación de péptidos varía en las formas de RE, cito y liso viéndose disminuida la eficiencia. Esos experimentos mostraron además que la diferencia en la generación de determinantes antigénicos de la lisozima de gallina endógena y de la lisozima de gallina exógena es contundente. Todos estos datos sugieren la importancia de la localización intracelular de una proteína para ser procesada y para la generación de los determinantes antigénicos.

INTRODUCCIÓN

A diferencia de la inmunoglobulina, el receptor del linfocito T (TCR) junto con el complejo multimolecular CD3 (formado por las cadenas polipeptídicas $\gamma, \delta, \epsilon, \eta, \zeta$) reconoce antígenos proteicos asociados a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) sobre la superficie de una célula presentadora de antígeno (CPA)²³.

Existen dos tipos de moléculas del MHC que difieren estructural y funcionalmente.

Las moléculas clase I generalmente unen y presentan péptidos derivados de proteínas sintetizadas dentro de la célula⁵⁰ y son reconocidas por los linfocitos T CD8+ ⁷⁵, mientras que la función de las moléculas clase II es unir péptidos derivados de proteínas endocitadas³² y presentarlos a linfocitos T CD4+.

La asociación preferente de péptidos derivados de proteínas endógenas o exógenas con las moléculas clase I o II, respectivamente, parece ser dictada por las diferentes rutas de transporte intracelular hacia la superficie celular. Así, las moléculas clase I son exportadas directamente desde el aparato de Golgi a la membrana plasmática a través de la vía secretora constitutiva, mientras que las moléculas clase II de neosíntesis, antes de alcanzar la superficie celular, pasan a través de compartimientos endocíticos en donde se encuentran con péptidos derivados de proteínas endocitadas^{52,21,28}. La acidificación de endosomas o lisosomas es un paso necesario para el procesamiento y presentación de antígenos por moléculas clase II^{86,47,30} pero no por moléculas clase I del MHC⁵⁰.

Desde luego, ahora se sabe y está ampliamente reportado que péptidos derivados de proteínas endógenas son presentados en el contexto de moléculas clase II del MHC^{36,84,24,54,78,17,83}. Estudios de elución han

determinado que el 50% de los péptidos asociados a moléculas MHC de clase II provienen de las mismas moléculas del MHC y de la cadena invariante (Ii), un 36% de otras proteínas endógenas (principalmente transmembranales) y sólo un 14% de proteínas son exógenas^{19,80}.

El procesamiento de las proteínas endógenas para su presentación por las moléculas clase II ocurre en la vía endocítica³⁶. Sin embargo, las características necesarias de una proteína endógena para poder ser presentadas en las moléculas clase II, aún no son bien entendidas. Aparentemente, sólo las proteínas que son traslocadas hacia el RE son las mejor presentadas por las moléculas clase II⁸³. Sin embargo, otros estudios han encontrado la presentación restringida a clase II de proteínas citosólicas^{35,54,29}. El procesamiento de un antígeno proteico por ciertos tipos de células presentadoras de antígeno o en los diferentes compartimentos intracelulares podrían ser la causa de la generación de distintos determinantes antigénicos, esto puede explicarse por la distribución variable de proteasas en los diferentes compartimentos endocíticos, ya que los distintos determinantes de una proteína dada pueden ser el resultado de diferentes proteasas^{65,77}.

Diversos trabajos se han llevado a cabo para identificar los sitios de procesamiento de los antígenos endógenos para su presentación restringida por las moléculas clase II del complejo principal de histocompatibilidad.

En estas investigaciones *in vitro*, se ha utilizado ampliamente el modelo de la lisozima de gallina. Estas investigaciones han mostrado que formas de lisozima de gallina con distintas localizaciones intracelulares (Citosólicas, transmembranales, con señal de retención en RE) requieren de un procesamiento dependiente de la vía endosoma/lisosoma¹⁵.

La presentación de los antígenos endógenos por las moléculas clase II

podría potencialmente afectar muchas funciones del sistema inmune, como la selección positiva y negativa de linfocitos T en el timo (selección de clonas autorreactivas), tolerancia en la periferia, autoinmunidad, alorreactividad así como la generación de la respuesta inmune después de una infección especialmente viral. Por lo tanto, es importante identificar los mecanismos intracelulares que llevan a la presentación de los antígenos endógenos por las moléculas clase II del MHC.

1. ANTECEDENTES

1.2. MOLECULAS DEL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD (MHC)

Las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad son glucoproteínas presentes en la superficie celular de los animales vertebrados y su función es la presentación de péptidos derivados del procesamiento intracelular de los antígenos proteicos a los linfocitos T. Existen dos clases de moléculas del MHC que participan en la presentación de antígenos, denominadas moléculas clases I y II. Las moléculas clase I se expresan en la mayoría de las células nucleadas, son reconocidas por los linfocitos T CD8⁺ ⁷⁵ y presentan predominantemente péptidos derivados de proteínas biosintéticas como proteínas virales, tumorales ó proteínas propias de la célula. La mayoría de los péptidos presentados por moléculas clase I son generados en el citoplasma y trasladados al interior del retículo endoplásmico (RE) donde se unen a las moléculas clase I.

Por otro lado, las moléculas clase II tienen como función la presentación de antígenos derivados de proteínas exógenas que penetran en la célula por endocitosis ^{5,32} y son reconocidas por los linfocitos T CD4⁺⁷⁵. Las moléculas clase II son expresadas predominantemente por células especializadas en la presentación de antígenos, como son los linfocitos B, las células dendríticas y los macrófagos, además de algunas células epiteliales^{72,76,18}.

1.2.1. La Estructura de las moléculas clase II

Las moléculas clase II del MHC son heterodímeros formados por una

cadena α y una β que se expresan en la superficie celular. Sus pesos moleculares son 31-35 y 27-29 kDa, respectivamente³⁸. Cada cadena tiene dos dominios extracelulares, uno transmembranal (Tm) y uno intracitoplásmico. Los genes que codifican las moléculas clase II del MHC murino, denominados H-2, están situados en el cromosoma 17²⁵.

En humanos, el MHC se localiza en el brazo corto del cromosoma 6.

Las moléculas del MHC son altamente polimórficas, el número de alelos existentes para estas moléculas es mayor que para cualquiera otra proteína conocida⁵⁶. El polimorfismo de las moléculas del MHC, así como el hecho de que el receptor del linfocito T reconozca a la combinación de un péptido inmunogénico con una molécula clase II del MHC confiere a la respuesta de los linfocitos T una de sus características fundamentales: la restricción genética por el MHC. De acuerdo a ésta, un linfocito T, es capaz de reconocer solamente antígenos en el contexto de moléculas de histocompatibilidad autólogas pero no alogénicas.

En el ratón hay dos isotipos de moléculas clase II: las moléculas I-A, (en el humano HLA-DQ) en las que las dos cadenas son polimórficas y las moléculas I-E (HLA-DR en humanos), en las que sólo la cadena β es polimórfica.

La estructura tridimensional de las moléculas clase II HLA-DR1 y de otras moléculas clase II humanas y murinas, con y sin péptido, demuestra que el sitio de unión está formado por los dominios $\alpha 1$ y $\beta 1$, en donde ocho hojas β plegadas en antiparalelo forman el piso, con dos α hélices antiparalelas a los lados formando las paredes. Esta disposición permite el acomodo de péptidos de 12 a 24 aminoácidos ó más^{16,19}. El receptor del linfocito T reconoce la combinación de un péptido y los dominios $\alpha 1$ y $\beta 1$ de una molécula clase II, mientras que el correceptor CD4 interactúa con el dominio $\beta 2$ de las moléculas clase II⁸².

1.2.2. El transporte intracelular del complejo MHC clase II

La biosíntesis de las moléculas clase II se inicia en los polirribosomas unidos al RE rugoso⁴⁸. Desde el inicio de la biosíntesis, en forma cotraduccional, estas proteínas son traslocadas (vía el péptido señal hidrofóbico en su extremo amino terminal) al retículo endoplásmico. Dentro de éste, el péptido señal es escindido por la enzima señal-peptidasa, mientras la biosíntesis continúa hasta que el polipéptido es sintetizado en toda su extensión. Una vez en el RE, las cadenas clase II α y β se asocian con un tercer polipéptido denominado cadena invariante (Ii).

1.2.3. La Cadena Invariante

La cadena invariante es una glucoproteína transmembranal tipo II, no polimórfica codificada por un gen localizado en los cromosomas 18 murino y 5 humano. El gen de la cadena Ii en el ratón codifica los péptidos p31 y p41 que se generan por el procesamiento alternativo de su RNAm⁴⁸. En el RE, la cadena Ii forma inicialmente un homotrímero que sirve para que en él se ensamblen las cadenas α y β clase II, un dímero por cada monómero de cadena Ii, resultando por lo tanto en un nonámero^{70,71}. Este complejo pasa al aparato de Golgi y de ahí a la región trans del sistema de Golgi de donde es desviado hacia compartimentos endosómicos, donde la cadena Ii se degrada secuencialmente. En esto participan cisteín-proteasas como la catepsina S.

La cadena Ii es, al menos parcialmente, responsable del transporte de los dímeros clase II desde el RE hacia la vía endocítica, debido a las señales

de tráfico que tiene en su región citoplásmica (amino terminal). Las señales que se encuentran entre los aminoácidos 9-16 y 16-29 son responsables de dirigir las moléculas hacia los endosomas tempranos. Durante la proteólisis de la cadena Ii, persiste el péptido 81-104, denominado CLIP (péptido de cadena invariante asociado a clase II), el cual se encuentra unido de manera natural a la hendidura de los diferentes alelos de las moléculas MHC clase II. El CLIP evita la unión de péptidos a las moléculas clase II²². Una vez en los compartimientos endocíticos adecuados, el CLIP es sustituido por los péptidos ahí presentes, muchos de ellos provenientes de antígenos exógenos, para formar el complejo MHC clase II-péptido, que es la forma en que llega a la superficie celular.

La liberación del CLIP es mediada por una molécula clase II no clásica denominada HLA-DM en humanos y H-2M en ratones y no parecen participar las proteasas intracelulares. H-2M es codificada por los genes Ma y Mb de la región clase II del MHC murino.

Una vez cargadas con un péptido, las moléculas clase II son transportadas hacia la superficie celular; tal vez intersectando la vía exocítica o alguna vía alterna ²² y una vez en la superficie pueden incluso ser internadas en un proceso de reciclaje para un posible intercambio de péptidos en el cual también podría participar H-2M.

En células presentadoras de antígeno profesionales se han descrito compartimientos que difieren de los endosomas y de los lisosomas clásicos y que se caracterizan por ser abundantes en moléculas H-2M. Estos compartimientos son denominados MIIC (compartimento de moléculas clase II del MHC) y CIIV (vesículas de moléculas clase II), es en estos sitios donde la molécula H-2M promueve la liberación del CLIP²² lo

que permite la unión de los péptidos exógenos. En ausencia de H-2M se disminuye la eficiencia de presentación de los antígenos exógenos. Estos compartimentos se describen más adelante sección (1.3.3).

Por lo anterior, para entender la relación que existe entre la localización intracelular de una proteína y los posibles péptidos derivados de ellas que son presentados por las moléculas clase II del MHC es importante examinar aquí las vías de transporte intracelular.

1.3. LAS VIAS DEL TRANSPORTE INTRACELULAR

Existen por lo menos dos rutas a través de las cuales los antígenos proteicos pueden ser procesados y presentados por las moléculas del MHC, una exocítica o también llamada vía secretora biosintética y la vía endocítica⁷³.

Todas las proteínas que siguen la vía exocítica, independientemente de su destino son dirigidas hacia la membrana del RE por el mismo tipo de péptido señal y son traslocadas por el mismo mecanismo⁷⁴. Posteriormente, las proteínas son enviadas mediante vesículas al complejo de Golgi donde se les adicionan nuevas moléculas de carbohidratos que también pueden afectar su destino final.

El RE es el sitio donde se ensamblan las proteínas y donde se inicia la adición covalente de oligosacáridos preformados (compuestos de N-acetil-glucosamina, manosa y glucosa) al grupo amino de algunas asparaginas. (SxN ó TxN) donde x es cualquier aminoácido, excepto prolina⁶⁶.

1.3.1. La Vía exocítica

En la vía exocítica las moléculas proteicas viajan hacia la superficie celular a través de múltiples compartimentos a partir del RE⁵⁷, en los que la célula modifica las moléculas en una serie de pasos controlados. Las proteínas que siguen esta vía de transporte se clasifican de la siguiente manera:

1.3.1.1. Proteínas de secreción. Proteínas solubles que son totalmente traslocadas hacia la luz del retículo endoplásmico⁴³.

Las proteínas de secreción a su vez pueden ser:

- a) Constitutivas. Las cuales una vez en la vía exocítica viajan sin detenerse hasta ser secretadas, esto se debe a que no tienen ninguna señal de retención.
- b) Retenidas en vesículas de almacenaje de donde son liberadas ante diversos estímulos. Los ejemplos más típicos de éstas son los neurotransmisores.

1.3.1.2. Proteínas de la membrana plasmática. Para las proteínas transmembranales(Tm) el proceso de transporte se inicia de forma similar a la de las proteínas de secreción ya que el péptido señal inicia la traslocación al interior del RE. Sin embargo, a diferencia de éstas, las proteínas Tm tienen una segunda o más secuencias hidrofóbicas que hacen que se anclen en la membrana celular. Estas proteínas pueden expresarse tanto en las membranas de los organelos como en la superficie celular. Las señales responsables de su localización final aún

no están completamente caracterizadas^{43,34}.

1.3.1.3. Las Proteínas residentes en el retículo endoplásmico

(RE). Muchas de las proteínas que se encuentran en la luz del RE están en tránsito, mientras que otras son residentes de este organelo donde están presentes en altas concentraciones.

Algunas de las proteínas residentes del RE contienen una señal de retención en este sitio en los que los cuatro aminoácidos del extremo carboxilo terminal (KDEL) constituyen la señal responsable de retener la proteína en el RE⁸⁷.

1.3.1.4. Las proteínas contenidas en los lisosomas.

Las enzimas lisosomales son transportadas a los lisosomas por el receptor de manosa 6-fosfato (M6P)⁸⁸. Estas enzimas después de glucosiladas, se fosforilan en el carbono 6 de una de sus manosas, lo que permite su unión al receptor de M6P el cual las lleva a los endosomas tempranos de donde pasan, ya sin el receptor a los endosomas tardíos y a los lisosomas^{73,34}.

Hay otros tipos de proteínas endógenas que no residen en la vía exocítica ni en la endocítica, entre ellas están las:

1.3.1.5. Proteínas citoplásmicas. Estas proteínas son generadas en los ribosomas libres en el citoplasma. Estas proteínas no tienen péptido señal, por lo tanto no se dirigen al RE.

1.3.1.6. Proteínas nucleares y mitocondriales. Estas proteínas son traslocadas a esos organelos por la identificación de señales específicas en su secuencia que definen su localización en dichos sitios⁸⁹.

1.3.2. La vía endocítica

Las células incorporan macromoléculas y partículas por medio de un mecanismo peculiar. La sustancia a ser ingerida se rodea progresivamente de una pequeña porción de la membrana plasmática, formando una vesícula intracelular que contiene el material ingerido. Este proceso recibe el nombre de endocitosis. Hay varios tipos de endocitosis, que son :

1.3.2.1. Micropinocitosis. Prácticamente todas las células eucariontes están continuamente invaginando fragmentos de la membrana plasmática en forma de pequeñas vesículas endocíticas (pinocíticas). Los procesos de este tipo, que son continuos (y no inducidos), son constitutivos. El líquido extracelular (y todo lo que está disuelto en él) queda atrapado en las vesículas pinocíticas y es, por lo tanto, ingerido. Esas vesículas tienen una gran variedad de tamaños y formas (el diámetro generalmente oscila entre 50 y 400nm) y en la mayoría de las células, suelen fusionarse con unas vesículas denominadas endosomas tempranos, que son los primeros compartimentos formales de la vía endocítica³.

1.3.2.2. Fagocitosis. La fagocitosis implica la ingestión de partículas, tales como microorganismos o residuos celulares, mediante vacuolas fagocíticas, las cuales se fusionan con los lisosomas en los que se degrada el material ingerido. Las sustancias no digeribles permanecen en los lisosomas secundarios, formando cuerpos residuales.

Para poder ser fagocitadas, las partículas deben unirse primero a la

superficie del fagocito. Sin embargo, no se endocitan todas las partículas que se unen. Los fagocitos presentan en la superficie de su membrana, diversos tipos de receptores especializados que están unidos funcionalmente a la maquinaria fagocítica de la célula. De estos receptores, los mejor caracterizados son los que reconocen moléculas de anticuerpos (receptores Fc), la unión a estos receptores induce a la célula a emitir prolongaciones que rodean a la partícula y se fusionan formando una vacuola fagocítica. La fagocitosis al igual que la exocitosis, es una respuesta localizada de una región de la membrana plasmática y de las estructuras citoplasmáticas subyacentes. La interacción de las células blanco revestidas con anticuerpo con los receptores de la superficie del macrófago es insuficiente para desencadenar la ingestión. En sustitución, esta interacción inicial inicia un proceso progresivo de aposición de membrana y para que la célula blanco quede completamente rodeada por una vacuola fagocítica, requiere el continuo contacto de los receptores con el anticuerpo.

La mayoría de las células de los organismos pluricelulares son incapaces de ingerir eficazmente grandes partículas y dejan esta tarea a fagocitos profesionales. En los mamíferos existen dos clases de células que actúan como fagocitos: los macrófagos y los leucocitos polimorfonucleados³.

1.3.2.3. Endocitosis mediada por receptores⁹⁰. La mayoría de las células eucariontes presentan una clase especializada de vesículas, cuyo diámetro oscila entre 50 y 250nm y que en las micrografías electrónicas aparecen revestidas de un tipo único de proteína fibrilar. La mejor caracterizada de estas proteínas es la clatrina.

Se cree que otras proteínas asociadas a la membrana de la vesícula revestida son las responsables de fijar la cubierta de clatrina a la vesícula

y de atrapar los receptores de la membrana plasmática en las vesículas y depresiones revestidas⁶⁷.

Las depresiones y vesículas revestidas proporcionan una vía especializada para absorber macromoléculas específicas del líquido extracelular, proceso denominado *endocitosis mediada por receptores*. Las macromoléculas del medio se unen a receptores específicos de la superficie celular que se incorporan a través de las depresiones revestidas a una velocidad muy superior a la velocidad con la que las sustancias disueltas en el líquido extracelular penetran en las células mediante la endocitosis de fase líquida. Por consiguiente, la endocitosis mediada por receptores es un mecanismo selectivo de concentración que permite que las células ingieran grandes cantidades de ligandos específicos sin absorber un volumen igualmente grande de líquido extracelular³.

1.3.3. Compartimientos endocíticos que participan en el procesamiento de antígeno.

En todos los compartimientos endocíticos existen abundantes proteasas, las cuales tienen actividad predominante a diferentes pH. De estas enzimas, algunas son serín-proteasas, otras son aspartil-proteasas (catepsinas C y D) y otras más, quizá las más importantes en el procesamiento de antígeno, las cistein-proteasas como las catepsinas A, D, E y S.

1.3.3.1. Compartimientos generales

1.3.3.1.1. Endosomas tempranos. Estos compartimientos son ricos en enzimas proteolíticas, como las catepsinas, lo cual los señala como un posible sitio donde ocurre la degradación del antígeno, previamente endocitado y degradado, con las moléculas clase II³³. Aquí también se encuentra la catepsina E, la cual, ha sido detectada en endosomas de linfocitos B murinos, y se le atribuye un 70% en la actividad proteolítica⁹¹. El pH de los endosomas tempranos varía de 6 a 6.5, estos compartimientos se identifican por la presencia de abundantes receptores de transferrina (TfR)³³.

1.3.3.1.2. Endosomas tardíos. Estos compartimientos intermedios de la vía endocítica tienen bajos niveles de TfR, pero altos niveles del receptor para manosa-6-fosfato (M6PR). En estos compartimientos el pH va de 5.5-6.0. El resto de componentes es similar a los endosomas tempranos³³.

1.3.3.1.3. Finalmente, los **Lisosomas** son el sitio de degradación final de las proteínas y se ha sugerido que también podrían participar en el procesamiento de antígeno³⁰. El ambiente de los lisosomas favorece la reducción de los puentes disulfuro y por lo tanto, la acción de cisteín-proteasas que son quizá las proteasas más activas de la vía endocítica²⁰. Este compartimiento tiene un pH ácido que va de 4.5-5.5. En este compartimiento M6PR y TfR ya no son detectados³³.

El dominio citoplásmico de varias proteínas de membrana lisosomales ha mostrado contener la información para su tráfico hacia los lisosomas y en

varias de las mismas, una tirosina ha demostrado ser crítica para esto. El TCR ha mostrado ser una rica fuente de ejemplos de destinos intracelulares alternativos⁴⁰. El TCR maduro se encuentra en la superficie celular de los linfocitos T y está compuesto de un heterodímero α, β ., dos dímeros CD3 no covalentes, $\epsilon\gamma$ y $\epsilon\delta$ y el homodímero ζ ^{45,41}. Muchos complejos parciales pueden ser formados⁹, pero solamente el complejo totalmente ensamblado es eficientemente transportado a la superficie celular⁴⁶. Se ha pensado que secuencias líder de cada subunidad individual del receptor del linfocito T son responsables de sus distintos destinos intracelulares. Estudios realizados con quimeras que contenían los dominios transmembranales extracelulares de la cadena α del receptor de IL-2 (Tac) y el dominio citoplásmico de cada una de las cadenas de CD3 mostraron que una secuencia en las colas citoplásmicas de CD3- γ y CD3- δ era la responsable tanto de una eficiente endocitosis como de la liberación hacia lisosomas⁹².

1.3.3.2. Compartimientos especializados

Además de lo anterior existen en la vía endocítica compartimientos aparentemente especializados en el procesamiento de antígeno y unión de péptidos a moléculas clase II, cuyas características morfológicas los distinguen de los endosomas tempranos, tardíos y de los lisosomas, estos son:

1.3.3.2.1. MIIC. Compartimientos enriquecidos con moléculas MHC clase II y H-2M. En los compartimientos multilaminares MIIC se lleva a cabo la liberación del CLIP y la unión de los péptidos exógenos derivados del procesamiento, a las moléculas clase II libres de cadena Ii^{61,52}. Están

ubicados entre los endosomas tardíos y los lisosomas³³.

1.3.3.2.2. CIIV. Por otro lado se ha descrito otro compartimento en linfocitos B, al parecer intermedio en el transporte del complejo MHC clase II-péptido hacia la membrana celular, que se caracteriza por poseer receptores para transferrina y ser negativo para marcadores de lisosomas, al cual se le ha denominado CIIV (vesículas que contienen moléculas clase II⁶. Este sitio es también abundante en H-2M. Su ubicación se estima entre los endosomas tempranos y los tardíos³³.

Hasta el momento no es completamente claro el papel individual de cada uno de los compartimentos mencionados y es posible que sean responsables de la generación de péptidos distintos de una misma proteína en diferentes tipos de CPA.

1.4. PROCESAMIENTO Y PRESENTACIÓN DE ANTÍGENOS PROTEICOS POR LAS MOLÉCULAS CLASE II DEL COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD

La mayoría de los péptidos presentados por moléculas clase II del MHC derivan de proteínas que en algún momento pasan por la vía endocítica. Estas proteínas pueden ser exógenas o propias de la célula. Como ya vimos, algunas proteínas endógenas tienen acceso a compartimentos endocíticos. Por lo tanto, su degradación podría generar constantemente péptidos con la posibilidad de unirse a moléculas clase II, una vez que éstas se encuentran libres de CLIP o en condiciones de liberarlo (i.e. en presencia de H-2M).

Los antígenos proteicos son degradados por proteasas, las cuales son determinantes en el tamaño de los péptidos resultantes, y por tanto responsables de generar péptidos inmunogénicos muy variados⁷⁹. Pero aún dentro del repertorio de péptidos generados a partir una proteína compleja, no todos los epitopos son presentados con la misma eficiencia por las moléculas del MHC. Hay péptidos que se presentan aún a concentraciones muy bajas, característica conocida como inmunodominancia⁹⁴. Esto parece definir la elección de los determinantes a presentarse ya que los péptidos inmunodominantes muestran, entre otras características, más afinidad por la molécula del MHC¹. La presentación preferencial de péptidos de alta afinidad no es la única explicación para la inmunodominancia ó selección de determinantes. Así, la química de los procesos degradativos así como otros eventos intracelulares, contribuyen a la selección de un limitado número de secuencias de péptidos de la poza de productos catabólicos^{1,53}. Después de la proteólisis los péptidos resultantes, generalmente de 12 a 24 aminoácidos de longitud, se asocian a las moléculas MHC clase II¹⁹.

1.4.1. PROCESAMIENTO Y PRESENTACIÓN DE ANTÍGENOS EXÓGENOS POR LAS MOLÉCULAS CLASE II

Como hemos mencionado, la función de las moléculas clase II es presentar péptidos derivados de proteínas exógenas que ingresan a la célula por endocitosis. La fuente proteica de los péptidos asociados con las moléculas clase II se encuentra a veces en el medio donde crece la célula: como agentes infecciosos o células anormales pero, con mayor frecuencia, éstos péptidos proceden de proteínas localizadas en la

membrana externa. Los estudios realizados por separado en los laboratorios de Emil R. Unanue y de Howard M. Grey llevaron a un descubrimiento de gran alcance. Estos investigadores observaron que, para estimular una respuesta inmune, las proteínas extracelulares debían penetrar mediante un proceso de endocitosis al interior de la CPA y allí degradarse a péptidos. El procesamiento de antígenos para su presentación por moléculas clase II (pero no por clase I) es inhibido por aminas que impiden la acidificación de endosomas y/o lisosomas, como la cloroquina y el cloruro de amonio⁸⁶. Las moléculas o partículas exógenas pueden, como fuente de antígenos, entrar en la vía endocítica por cualquiera de los tres mecanismos descritos: endocitosis mediada por receptores, pinocitosis o fagocitosis. En la superficie celular hay una gran variedad de receptores que transportan moléculas ó partículas del exterior a los endosomas y aumentan la eficiencia de presentación de antígeno. Es de especial importancia la inmunoglobulina de superficie en los linfocitos B, mediante la cual, éstos captan con gran afinidad el antígeno hacia el que son específicos. De esta manera, un linfocito B incorpora su antígeno específico en la vía endocítica con mayor eficiencia que cualquiera otra molécula presente en el medio extracelular.

Otro mecanismo que permite la entrada de antígenos exógenos a la vía endocítica es la pinocitosis (mecanismo fundamental en células dendríticas) y finalmente el mecanismo más importante cuando los antígenos son presentados por los macrófagos es la fagocitosis que puede ser facilitada por los receptores Fcγ. La presentación de antígenos por linfocitos B es un fenómeno predominante en la respuesta secundaria, mientras que la presentación de antígenos por macrófagos y células dendríticas posiblemente tenga mayor relevancia en la respuesta primaria.

1.4.2. PROCESAMIENTO Y PRESENTACIÓN DE ANTÍGENOS ENDÓGENOS POR LAS MOLÉCULAS CLASE II

Como se mencionó, la función de las moléculas clase II del MHC es presentar péptidos derivados de proteínas exógenas. Sin embargo, al eluir péptidos de moléculas clase II, se ha encontrado que la gran mayoría proviene de proteínas propias de la célula. Esto no debe sorprendernos ya que en los sitios donde se generan los péptidos que se unirán a las moléculas clase II las proteínas más abundantes son las endógenas. Así, una proteína exógena debe competir eficientemente con las endógenas para unirse a las moléculas clase II y ser presentada a los linfocitos T CD4+. Lo anterior hace necesario plantear que la unión de péptidos endógenos en forma persistente en las moléculas clase II es fundamental para la inducción de tolerancia inmunológica, ya sea por eliminación o por inactivación (anergia) de linfocitos T autorreactivos.

Los antígenos proteicos endógenos se pueden dividir en tres grupos fundamentales:

1.4.21. Procesamiento de proteínas de membrana y de secreción: este grupo de proteínas se puede considerar como exógeno si se toma en cuenta que las proteínas de membrana son, en algún momento, endocitadas como parte de los mecanismos de recambio natural de la célula. Para las proteínas transmembranales expresadas en la superficie celular, la utilización de sus ligandos favorece el entrecruzamiento y endocitosis mediada por receptores, haciendo más eficiente la presentación del antígeno^{17,90}. Las proteínas de secreción por otra parte, se liberan al medio para posteriormente seguir la vía de

endocitosis clásica. Lo anterior sugiere que estas proteínas son endocitadas para ser presentadas por la vía clásica de presentación. Sin embargo, existen ejemplos, tanto de proteínas de membrana como de secreción, que tienen diferentes requerimientos de procesamiento cuando se comparan con formas exógenas de la misma proteína^{8,83,49}.

1.4.2.2. Procesamiento de proteínas contenidas en el retículo endoplásmico (RE): estas proteínas son el mejor ejemplo de antígenos que son presentados con alta eficiencia por las moléculas clase II y que no tendrían por que llegar a la vía endocítica. Además, un porcentaje de péptidos naturalmente procesados unidos a moléculas clase II provienen de proteínas residentes del RE¹⁹. Entre las proteínas residentes de RE capaces de generar péptidos antigénicos presentados por las moléculas clase II se encuentran las que tienen una secuencia de retención que les permite permanecer en este compartimiento y que pueden ser continuamente recicladas entre el RE y la región del cis-Golgi^{93,85} mediante los receptores de KDEL. Además de lo anterior, muchas proteínas que no adquieren una conformación adecuada o complejos multiméricos que no se ensamblan adecuadamente se retienen en este sitio para su eventual degradación³⁹, ya que el RE cuenta con un sistema de transporte de degradación hacia citoplasma de proteínas que no tienen una conformación estable⁶³. Los productos de degradación de estas proteínas pueden entrar al RE mediante transporte activo a través del complejo TAP1/TAP2, o bien pueden ser transportadas por diversos mecanismos a lisosomas u otros compartimientos endocíticos para su degradación final. Estos últimos podrían ser también una fuente de péptidos presentados por moléculas clase II.

La presentación de antígenos proteicos retenidos en RE mediante la señal

KDEL es inhibida por cloroquina, lo que indica que en el procesamiento de estos antígenos intervienen algunos de los compartimientos de la vía endocítica.

1.4.2.3. Procesamiento de las proteínas citoplásmicas. Para que este tipo de proteínas se pueda presentar por moléculas clase II, es muy probable que sea degradado en el citoplasma y que utilicen ya sea el complejo TAP1-TAP2, (transportadores asociados con presentación de antígeno), o bien, sean transportados del citoplasma a los lisosomas, ya sea degradadas o completas, como podría ocurrir con las proteínas residentes del RE. Los estudios de presentación de este tipo de antígenos por moléculas clase II han generado controversia. Los trabajos de Long y colaboradores demuestran la existencia de al menos dos mecanismos para la presentación de antígenos citosólicos por moléculas clase II, uno independiente y otro dependiente del sistema TAP1-TAP2⁶⁴.

Con base en lo anterior, se puede concluir que, a la fecha, para ninguno de los antígenos descritos hay una regla que determine cual es la vía de procesamiento que utilizan para ser presentados por moléculas clase II del MHC.

1.4.2.4. Estudios de presentación de formas endógenas de lisozima de gallina (LG).

Los modelos de presentación de antígeno utilizando formas endógenas de LG, han sido utilizados para responder preguntas relacionadas con las vías de procesamiento de antígenos endógenos.

Se ha planteado la posibilidad de que el origen de una proteína ya sea endógeno u exógeno determina el patrón de procesamiento. Para responder a esta pregunta se han llevado a cabo diversos estudios para determinar la capacidad de las CPA de generar y presentar diferentes determinantes antigénicos de lisozima de gallina endógena a linfocitos T, comparados con la capacidad para generar los mismos determinantes a partir de LG exógena. Se observó una clara diferencia en la generación de determinantes antigénicos entre lisozima de gallina endógena y la lisozima de gallina exógena, sugiriendo fuertemente que el procesamiento de un antígeno endógeno y uno exógeno por células presentadoras de antígeno tiene lugar en diferentes compartimientos intracelulares^{49,2}.

Se investigó también si distintas localizaciones intracelulares de LG afectan su procesamiento, encontrando que la LG con señal de retención en membrana y la forma secretada son las que son presentadas con mayor eficiencia por moléculas clase II, mientras que las formas con señal de retención en retículo endoplásmico ó citoplasma no se presentan con la misma eficiencia¹⁵. Estas dos últimas discrepan de otros estudios publicados, tal como se mencionó.

Algunos estudios, habían postulado la existencia de un sistema de degradación en el retículo endoplásmico, pero investigaciones de nuestro grupo usando una forma de lisozima de gallina con señal de retención en retículo endoplásmico (KDEL) demostraron que este organelo no cuenta con un ambiente adecuado para la generación y unión de péptidos a las moléculas clase II del MHC, además la cloroquina inhibe la presentación de los péptidos de LG-KDEL, sugiriendo también la participación de compartimientos ácidos en el procesamiento de estas proteínas¹⁰.

Los mecanismos de generación y presentación de determinantes antigénicos en el citoplasma parecen estar relacionados con la vida media de las proteínas. Experimentos llevados a cabo con formas de LG citoplásmicas mostraron que estas proteínas tenían vidas medias muy cortas (10 min) y que no éran susceptibles de ser presentadas en el contexto de las moléculas clase II¹⁴.

Se hicieron estudios de elución de péptidos en diversas células presentadoras de antígeno que expresaban LG-Tm, LG secretada, una forma secretada con baja expresión y una LG retenida en RE. Se encontró que un gran porcentaje de los péptidos eluidos contenían el núcleo 52-61 y que dependiendo de la localización intracelular del antígeno, la eficiencia de activación de hibridomas podía variar, siendo las formas Tm y las de secreción las que mejor activación generaron y la de RE y la forma secretada con baja expresión las que menos activación produjeron. Esto da pauta para pensar en otros factores: el papel tan importante que juega el nivel de expresión en superficie de complejos I-A^K/péptido¹⁴ o la concentración en la que se expresa la proteína (LG).

En otros estudios, utilizando células presentadoras de antígeno que expresan una forma Tm de LG que codifica los aminoácidos 1-80 (LK-LG-TM), se encontró que el epitopo 25-43 no fué generado a partir de formas exógenas pero sí de formas endógenas de la proteína, al utilizar fibroblastos como CPA, sugiriendo distintos sitios de generación para péptidos endógenos⁴⁹.

Utilizando diferentes células presentadoras de antígeno que expresan formas de lisozima de gallina sintetizadas de manera endógena, LK-LG-TM, LG-KDEL y una forma de secreción LK-LG, se demostró que,

dependiendo de la localización del antígeno, la eficiencia de activación de hibridomas que reconocen el mismo epitopo puede variar¹⁰.

De acuerdo a lo anterior, son entonces las proteínas de la vía exocítica las que mejor se presentan por las moléculas clase II. Las citosólicas y las del RE lo hacen, pero en menor grado¹⁵, aunque en el caso de RE existen resultados contradictorios.

Además de los estudios de procesamiento, el modelo de lisozima de gallina ha sido útil para realizar estudios en cuanto al reconocimiento por parte del linfocito T y su activación. Específicamente el epitopo inmunodominante de LG 52-61, ha sido usado extensamente en estudios de reconocimiento por el TCR. Dichos estudios han demostrado la importancia de los triptofanos ubicados en las posiciones 62 y 63 de la lisozima de gallina para el reconocimiento por algunos hibridomas murinos⁸¹.

2. JUSTIFICACIÓN.

Conociendo la diversidad de procesos catabólicos que existen en los distintos compartimentos intracelulares y que diversos estudios sugieren la participación de más de un sitio celular en el procesamiento de los antígenos (endógenos o exógenos), para su unión a las moléculas clase II del complejo principal de histocompatibilidad, este proyecto examina la forma en que la localización intracelular de una proteína (en este caso la lisozima de gallina) afecta la generación y la presentación de péptidos antigénicos.

3. HIPÓTESIS.

Diferentes señales de transporte en una proteína determinan el espectro de péptidos que a partir de ellos presentan las moléculas clase II del MHC.

4. OBJETIVO GENERAL.

Estudiar como la presencia de distintas señales de transporte intracelular en una proteína afectan la generación y presentación de péptidos por células presentadoras de antígeno

OBJETIVOS PARTICULARES.

* Generar y caracterizar líneas celulares que expresen:

Lisozima de gallina transmembranal.

Lisozima de gallina de secreción.

Lisozima de gallina transmembranal mutada en los residuos 62-63.

Lisozima de gallina con señal de retención en citoplasma

Lisozima de gallina con señal de retención en lisosomas

Lisozima de gallina con señal de retención en MHC/CIIV

Lisozima de gallina con señal de retención en retículo endoplásmico

5. ESTRATEGIA

Generar líneas celulares que expresen diferentes formas endógenas de lisozima de gallina mediante la transfección de los cDNA que codifican la lisozima de gallina con diferentes señales de tráfico intracelular en un linfoma B.

Estudiar la expresión de los genes mediante la evaluación de la capacidad de presentación del antígeno empleando hibridomas T anti-lisozima de gallina.

Analizar la eficiencia de presentación de cada célula presentadora de antígeno mediante un panel de hibridomas T comparándolos con la activación que induce la lisozima de gallina exógena presentada por un linfoma B murino(LK-35.2).

6. MATERIALES

6.1 Medio de cultivo.

RPMI 1640 (Gibco), con NaHCO_3 al 0.2%, suplementado con suero fetal bovino al 10%, 2-mercaptoetanol $50\mu\text{M}$, HEPES 25mM, glutamina 2mM, piruvato de sodio 0.05M, gentamicina 100U/ml y ciprofloxacina 200u/ml.

6.2 Amortiguador salino de fosfatos (PBS) pH 7.4

K_2HPO_4 0.01M, KH_2PO_4 0.01M, NaCl 0.15M.

6.3 Antibiótico empleado en la selección de transfectantes

alícuotas del aminoglucósido G418 en PBS estéril y filtrado (50mg/ml).

6.4. Plásmidos: (Fig. 1)

(Colaboración de Kate Vignali y Dario Vignali del St Jude Children's Research Hospital, Memphis, TN. USA)

En todas las construcciones el gen de la LG se encuentra bajo el promotor de expresión del citomegalovirus humano (CMVH) y además cuentan con un cassette de resistencia a neomicina (G418) que permite la selección de las transfectantes al cultivarlas en el medio con dicho antibiótico.

TmHEL 48-61 WW. cDNA de lisozima con la región transmembranal de CD4., donde WW significa que en las posiciones 62-63 tiene los triptofanos originales de la LG

Secuencia de la lisozima transmembranal:

1 KVFGRCELAA AMKRHGLDNY RGYSLGNWVC VAKFESNFNT QATNRNTDGS
51 TDYGILQINS RWWCNDGRTP GSRNLCNIPC SALLSSDITA SVNCAKKIVS
101 DGNMGSAWVA WRNRCKGTDV QAWIRGCRLS RGVNOIVFLA CVLGGSFGFL
151 GFLGLCILCC VRCRHO*

TmHEL 48-61 KK. Es igual que el anterior excepto que los triptofanos de las posiciones 62 y 63 fueron sustituidos por lisinas.

Secuencia de la lisozima transmembranal mutada:

1 KVFGRCELAA AMKRHGLDNY RGYSLGNWVC VAKFESNFNT QATNRNTDGS
51 TDYGILQINS RKKCNDGRTP GSRNLCNIPC SALLSSDITA SVNCAKKIVS
101 DGNMGSAWVA WRNRCKGTDV QAWIRGCRLS RGVNOIVFLA CVLGGSFGFL
151 GFLGLCILCC VRCRHO*

SHEL 48-61 WW. Codifica una forma soluble de LG de secreción (tipo silvestre)

Secuencia de la lisozima:

1 KVFGRCELAA AMKRHGLDNY RGYSLGNWVC VAKFESNFNT QATNRNTDGS
51 TDYGILQINS RWWCNDGRTP GSRNLCNIPC SALLSSDITA SVNCAKKIVS
101 DNGGMSAWVA WRNRCKGTDV QAWIRGRL*

REHEL 48-61 WW. cDNA para una forma soluble de LG asociada a la señal de retención en el retículo endoplásmico : SEKDEL

Secuencia de la lisozima de RE :

1 KVFGRCELAA AMKRHGLDNY RGYSLGNWVC VAKFESNFNT QATNRNTDGS
51 TDYGILQINS RWWCNDGRTP GSRNLCNIPC SALLSSDITA SVNCAKKIVS
101 DNGGMSAWVA WRNRCKGTDV QAWIRGRLS EKDEL*

CytoHEL 48-61 WW. cDNA para la forma citoplásmica de la LG generado por la remoción de la secuencia que codifica el péptido señal y un péptido bandera en el extremo carboxilo terminal.

Secuencia de la lisozima citoplásmica:

1 MAKVFGRCEL AAAMKRHGLD NYRGYSLGNW VCVAKFESNF NTQATNRNTD
51 GSTDYGILQI NSRWWCNDGR TPGSRNLCNI PCSALLSDI TASVNCAKKI
101 VSDNGGMSAW VAWNRCKGT DVQAWIRGCR LSGDYKDDDD K*

LysoHEL 48-61 WW. cDNA para una forma transmembranal de la LG que lleva además una señal de tráfico directo hacia los lisosomas: la región transmembranal de CD4 y la región citoplásmica de CD3δ.

Secuencia de la lisozima con tráfico a lisosomas:

1 KVFGRCELAA AMKRHGLDNY RGYSLGNWVC VAKFESNFNT QATNRNTDGS
51 TDYGILQINS RWWCNDGRTP GSRNLCNIPC SALLSSDITA SVNCAKKIVS
101 DGNMGSAWVA WRNRCKGTDV QAWIRGCRLS RGVNQTVFLA CVLGGSPGFL
151 GFLGLCILCC VHETGRPSGA AEVOALLKNE QLYOPLRDRE DTOYSRLGGN
201 WP*

MIIC HEL 48-61 WW. cDNA para LG transmembranal con una señal de tráfico hacia los compartimentos **MIIC**: una región transmembranal y una sección citoplásmica de la molécula H-2Mβ.

Secuencia de la lisozima de que se localiza en los compartimientos MIIC:

1 KVFGRCELAA AMKRHGLDNY RGYSLGNWVC VAKFESNFNT QATNRNTDGS
51 TDYGILQINS RWWCNDGRTP GSRNLCNIPC SALLSSDITA SVNCAKKIVS
101 DGNMGSAWVA WRNRCKGTDV QAWIRGCRLS RGVNQTVFLA CVLGGSPGFL
151 GFFRWRKSHS SSYTPLPGST YPEGRH*

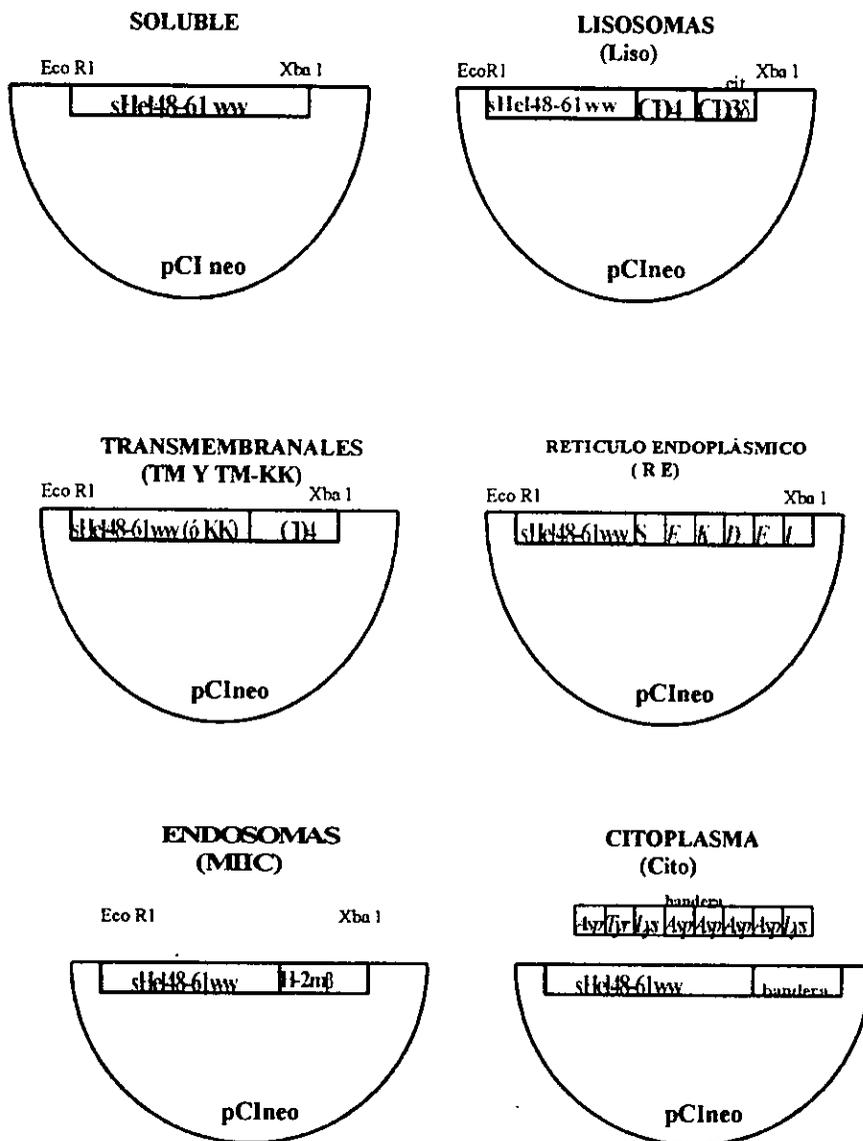


Figura 1. Construcciones transfectadas en la línea LK35.2., todas fueron clonadas en el vector pCIneo bajo el promotor de expresión del CMVH y con el gen de resistencia para neomicina.

6.5. Líneas Celulares

La línea utilizada para las transfecciones fué LK-35.2³⁷ que es derivada de la fusión somática de una sublínea del linfoma A20 (derivada de ratones Balb/c, H-2^d) con esplenocitos de ratones B10.BR (H-2^k). Por lo tanto, expresa H-2^{d,k}. Su capacidad de funcionar como células presentadoras de antígeno ha sido demostrada en múltiples estudios.

La línea CTLL-2 es una línea de linfocitos T citotóxicos dependientes de interleucina 2²⁷.

Los hibridomas T anti-LG empleados en los estudios de presentación de antígeno, se mencionan en la *tabla 1*.

Tabla 1. Hibridomas T anti-LG

HIBRIDOMA	ESPECIFICIDAD	RESTRICCIÓN	REFERENCIA
A6.B3	34-45	I-A ^K	4
C10	46-61	I-A ^K	4
E907.D	Δ1-80	I-A ^K	48
3A9.P4	46-61	I-A ^K	4
2B6.3	25-43	I-A ^K	51
2D4.1	112-124	I-A ^K	1

7. METODOLOGÍA:

7.1. CURVAS DE RESISTENCIA

Inicialmente, para determinar la sensibilidad de las células LK-35.2 al antibiótico G418 se hicieron curvas de resistencia en placas de cultivo de 12 pozos empleando 100,000 células por pozo en 2ml de medio suplementado y variando la concentración de G418. (0.8, 1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6 1.7, 1.8, 1.9 y 2mg/ml) La curva se incubó por 7días. Se eligió la concentración de G418 que ocasionara la muerte de todas las células en 3 a 5 días.

7.2. ELECTROPORACIÓN.

La membrana celular actúa como un capacitor el cual es incapaz de pasar corriente, por lo tanto si las membranas se sujetan a una corriente eléctrica de alto voltaje sufren una desestabilización temporal con la formación de poros tan grandes que permiten la entrada y/o salida de macromoléculas. Durante el tiempo que los poros están abiertos, los ácidos nucleicos pueden entrar a la célula y en última instancia al núcleo.

7.3. TRANSFECCIONES

Se transfectó la línea celular LK-35.2 mediante el método de electroporación con las construcciones: TmHel 48-61 WW (forma transmembranal), REHel 48-61 WW (forma retenida en retículo endoplásmico), SHel 48-61 WW (forma soluble) y MIICHel 48-61 (forma con localización en compartimientos MIIC).

Después de la transfección de las formas de lisozima de gallina, cada lote de CPA consistente de 20×10^6 de células, se repartieron en cuatro cajas de cultivo con 20 ml de medio, marcadas del 1 al 4, (incluyendo otras cuatro como controles que no fueron transfectadas, que se marcaron del 1' al 4'). Pasado el tiempo de selección, cada lote de CPA fue contado y analizado en experimentos de presentación de antígeno. De las cuatro cajas siempre hubo una que inducía mejor activación en los hibridomas. Así que sólo se escogió la mejor caja de cada lote. Como control positivo, se utilizó la activación de los hibridomas por LK-35.2 con 1mg/ml de LG exógena.

Método:

Antes de la transfección, las células que se encontraban en la fase logarítmica de crecimiento, se lavaron tres veces y se resuspendieron en PBS sin suero. Para la transfección se utilizaron 500 μ l con 2.0×10^7 células las cuales fueron colocadas en celdas de 4mm (Biorad). Se utilizaron 20 μ g de cada construcción linearizada. Las células recibieron una corriente eléctrica con una intensidad de 150 mV y con una capacitancia de 975 μ F.

Selección:

La selección se realizó adicionando al medio de cultivo la concentración óptima del aminoglucósido G418, determinada mediante las curvas de resistencia (Sección 7.1) que fue de 1.5 mg/ml y el cultivo se mantuvo en esas condiciones hasta que las células de caja control (células que no fueron electroporadas en presencia de los cDNA) murieron totalmente lo cual ocurrió a los 5 días, después de éste tiempo las células transfectantes positivas empezaron a generar colonias y cuando formaron una monocapa en la caja de cultivo se analizó la capacidad de presentar el antígeno.

Recibimos ya transfectadas las formas Liso y KK, clonada sólo la Cito. Para completar nuestro grupo de células presentadoras de antígeno se transfectaron las formas Tm, RE, soluble y MIIC en nuestro laboratorio.

7.4. CLONACIÓN

Las CPA resistentes fueron clonadas a 0.5 células/pozo para garantizar obtener una sola célula por pozo ó ninguna y las mejores clonas fueron seleccionadas por su capacidad para presentar al antígeno.

La mejores clonas fueron de nuevo clonadas por dilución limitante a 0.3 células/pozo y seleccionadas nuevamente en estudios de presentación de antígeno.

Método:

En placas de 96 pozos con fondo redondo se colocaron 0.5 o 0.3 células de las CPA según el caso, con medio RPMI 1640 suplementado con SFB al 20%. Después de 2 a 3 semanas, las clonas que ya habían formado monocapa en la base del pozo se emplearon para llevar a cabo los experimentos de presentación del antígeno.

7.5. SELECCIÓN DE LAS CELULAS PRESENTADORAS DEL ANTÍGENO TRANSFECTADAS

Se realizaron experimentos de presentación del antígeno y se seleccionaron aquellas CPA que fueran capaces de activar al hibridoma C10 que reconoce al epitopo inmunodominante 46-61 y al hibridoma A6.B3 específico contra el péptido 34-45 (se escogió este hibridoma por la sensibilidad mostrada en experimentos anteriores y por que no depende de la región mutada de la forma transmembranal KK). Las CPA fueron clonadas a 0.5 células/pozo y a 0.3 células/pozo de acuerdo al método descrito (sección 7.4).

Para escoger las clonas más eficientes se escogió un procedimiento diferente de presentación dado el número tan grande de clonas a probar: Se tomó un volumen constante de 20 μ L del medio de cada pozo conteniendo un número indeterminado de CPA y se cocultivaron con un número constante de hibridomas C10 y A6.B3 (50,000 células).

7.6. DETERMINACIÓN DE LA EFICIENCIA EN LA PRESENTACIÓN DE ANTÍGENO POR LAS DISTINTAS CÉLULAS PRESENTADORAS DE ANTÍGENO.

Una vez caracterizada cada una de las distintas CPA con sus respectivas formas de LG se realizó un experimento de presentación de antígeno con diversos hibridomas anti-LG restringidos por I-A^K y con afinidades hacia diferentes epitopos de la proteína (*Tabla 1*), como control positivo se emplearon las células LK-35.2, que procesan LG exógena (1mg/mL).

Las determinaciones se realizaron por triplicado.

7.6.1. Procedimiento para el estudio de presentación del antígeno

1. En una placa de cultivo de 96 pozos se colocaron 25,000 CPA por triplicado por pozo en 100 μ L de medio y 50,000 células de hibridoma T en un volumen igual. La mezcla se incubó 24 horas.
2. Al término de las 24 horas se centrifugó la placa y se recolectaron 50 μ L del sobrenadante de cada pozo y se sembraron 20,000 células CTLL-2 en un volumen de 50 μ L de medio y se incubó por 24 horas a 37°C.
3. Se adicionaron 20 μ L de MTT (sección 7.6.2.) y se incubó 5 horas a 37°C.
4. Al término se adicionaron 100 μ L de SDS al 10% con HCl 0.01N y se incubó toda la noche a 37°C.
5. Se leyó absorbancia a 570nm.
6. con estos datos se obtuvo el índice relativo (I.R.)

$$\text{I.R} = \frac{\text{Absorbancia problema} - \text{Absorbancia control de reactivos}}{\text{Absorbancia de control de células}}$$

Donde:

Control reactivos son 100 μ L de RPMI, 20 μ L de MTT y 100 μ L HCl/SDS

Control de células son 50 μ L de RPMI, 50 μ L con 20000 CTLL-2, 20 μ L MTT y 100 μ L de HCl/SDS.

7.6.2. Reducción del MTT.

La reducción del anillo de la sal de tetrazolium MTT (bromuro de 3-(4,5 dimetil tiazol-2 il)-2,5 difeniltetrazolium) provoca la formación de un producto azul cristalino denominado formazán. Este compuesto colorido se utilizó para estudiar la viabilidad celular ya que la cantidad de formazán producida es proporcional al número de células vivas presentes.

Cuando la sal es reducida a cristales éstos deben disolverse con una mezcla de HCl y SDS para obtener una solución homogénea que pueda ser leída a 570 nm. De este modo, la intensidad de la reacción se puede cuantificar colorimétricamente.

7.7 DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE LOS HIBRIDOMAS T

Siguiendo el procedimiento descrito para estudiar la presentación de antígeno, se cultivó la célula presentadora de antígeno (LK35.2) con los diferentes hibridomas (*Tabla 1*) usando concentraciones semilogarítmicas de lisozima de gallina exógena : 0.03 μ g/mL. 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100, 300 y 1000 μ g/mL.

7.8.TITULACIÓN DE LA LISOZIMA DE GALLINA ENDÓGENA EXPRESADA POR LAS CÉLULAS PRESENTADORAS DE ANTÍGENO.

Se cultivaron cantidades crecientes de cada CPA: 100,1000,10000 y 100,000 células con 50,000 células de los distintos hibridomas T, como sistema de comparación se empleó el linfoma LK-35.2 con tres distintas concentraciones de lisozima de gallina exógena (1, 3 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), lo siguiente se describe en el procedimiento para estudios de presentación de antígeno (sección 7.6.1) .

8.RESULTADOS.

8.1.Transfecciones

Condiciones iniciales : 0.150 volts a 975 μ F, las finales fueron las siguientes:

Tabla 2. Condiciones de electroporación

cDNA	No de intentos	Condiciones de electroporación en transfectantes	Condiciones de electroporación en control
TmHel 48-61 WW	1	16.5 msec 0.160 volts	15.5 msec 0.160 volts
Shel 48-61 WW	1	19.4 msec 0.160 volts	18.4 msec 0.160 volts
ReHel 48-61 WW	1	15.3 msec 0.158 volts	14.5 msec 0.160 volts
EndoHel48-61 WW	2	1er intento: 18.6 msec 0.160 volts 2º intento: 11.2 msec 0.172 volts	1er intento: 17.4 msec o.160 volts 2º intento: 13.7 msec 0.172 volts

8.2. Formación de las colonias resistentes

Los primeros cuatro días posteriores a la transfección se observó la muerte masiva de las células electroporadas. A los seis días podía ya apreciarse formación de colonias de 4 a 5 células y a los 12 días las células ya habían formado monocapa en la caja de cultivo.

8.3. Selección de las CPA resistentes

Para determinar la expresión de cada forma, se realizaron experimentos de presentación de antígeno con los hibridomas T : A6.B3 (LG 34-45) y C10 (LG 48-62). El reconocimiento de una CPA por hibridomas de linfocitos T anti-lisozima de gallina es indicativo de la expresión de las diferentes formas de lisozima de gallina, así como de su procesamiento, generación y asociación de los determinantes resultantes a las moléculas clase II del complejo principal de histocompatibilidad.

De acuerdo a lo realizado (sección 7.3) se escogieron las clonas de CPA: TM.1 (LG-Transmembranal), RE.3 (LG-Reticulo endoplásmico) y LKSOLHel.2 (LG-Secreción). La forma MIIC no dió respuesta., así que se decidió transfectar nuevamente la construcción, obteniéndose el mismo resultado negativo.

Además de las anteriores, cada una de las líneas que recibimos ya transfectadas (Tm-KK, Liso y Cito como se mencionó en la sección 7.3), se clonaron para obtener poblaciones homogéneas.

Recibimos también una clona de MIIC (MIICHelk.11) que no dió respuesta, concordando éste resultado con los obtenidos en las dos transfecciones hechas por nosotros de la misma construcción de LG.

8.4. Clonación

Todas las líneas se clonaron inicialmente a 0.5 células/pozo.

Los criterios que se siguieron para escoger las mejores clonas fueron:

*Que las clonas activaran eficientemente a los hibridomas utilizando

como punto de referencia un control positivo con 1mg/ml de LG exógena en el medio, y

*Que estas clonas se originaran de una sola célula

De acuerdo al primer criterio, se escogieron las siguientes clonas: TM.1.C2, KK.2.H9, Liso.2.D2, RE.3.G9 y LKSOLHel.2.F4.

Para asegurar la clonalidad, cada una de éstas CPA fue subclonada a 0.3 células/pozo y re-seleccionada nuevamente de acuerdo a los mismos criterios. De esta subclonación se eligieron las clonas: TM.1.C2.E7, KK.2.H9.B5.2, Liso.2.D2.E1, RE.3.G9.B1 y LKSOLHel.2.F4.F12. (**Tabla3**)

Para mayor facilidad de entendimiento a partir de aquí se omiten los sufijos arbitrarios de cada clona y se denominan solamente como Tm, KK, Soluble, RE, Liso y Cito.

Las formas de MIIC transfectadas no pudieron ser clonadas por no haber manera de identificar la proteína por el método de presentación de antígeno.

Tabla 3. Seguimiento de las clonaciones

CPA original	1ª clonación	2ª clonación	Designación
	0.5 células/pozo	0.3 células/pozo	
Tm.1	Tm.1.C2	Tm.1.C2.E7	Tm
RE.3	RE.3.G9	RE.3.G9.B1	RE
LkSOLHel.2	LkSolHel.2.F4	LkSolHel.2.F4.F12	Soluble
Tm KK	Tm KK.2.H9	Tm KK.2.H9.B5.2	KK
Lyso	Lyso.2.D2	Lyso.2.D2.E1	Lyso
CytoHelLk.8	-	-	Cyto

8.5. Estudios de presentación de antígeno

8.5.1. Eficiencia de activación

Una vez clonadas todas las líneas celulares hasta asegurar que provenían de una sola célula y de seleccionar las mejores células presentadoras de antígeno, se hicieron experimentos comparativos con varios hibridomas T anti-LG : A6.B3, C10, 3A9, E907 y 2D4.1 para evaluar la eficiencia de activación de cada hibridoma con cada CPA. Se usó como control positivo 1mg/ml de LG exógena adicionada al medio usando como CPA el linfoma B LK35.2

En las *figuras 1,2,3,4,5* puede observarse que la eficiencia de presentación de las CPA a los hibridomas T es:

C10 : Soluble > Tm = RE = exógena > Cito > Liso > KK = MIIC.,

3A9 es :Soluble >Exógena > Tm = KK > RE > Cito > Liso > MIIC.,

A6.B3 : Tm = Soluble > KK = exógena > RE >Liso >Cito > MIIC.,

E907 : Tm > Soluble > KK = exógena > RE > Cito > Liso > MIIC.,

2D4.1 es: exógena > Tm > Soluble > KK > RE > Cito > Liso = MIIC.

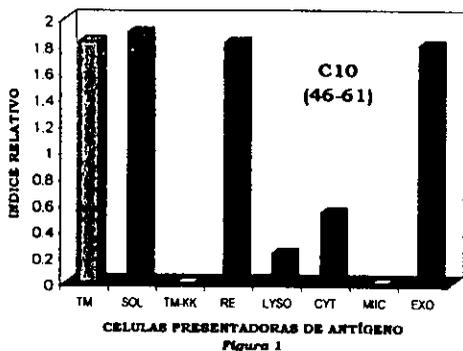


Figura 1

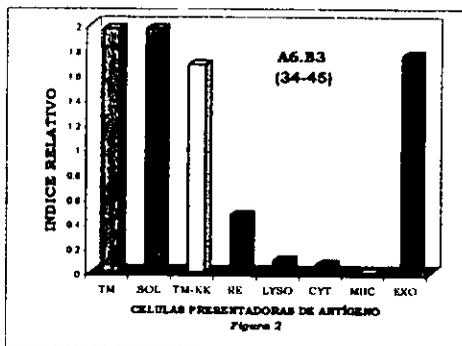


Figura 2

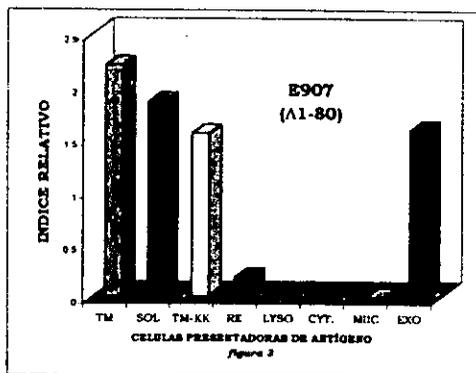


Figura 3

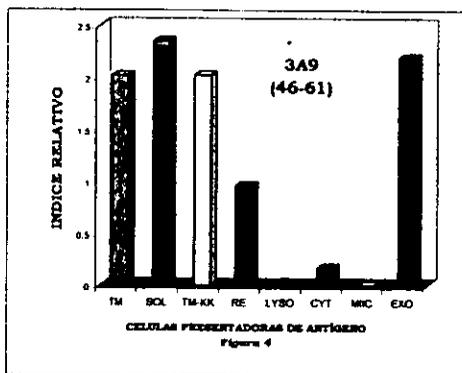


Figura 4

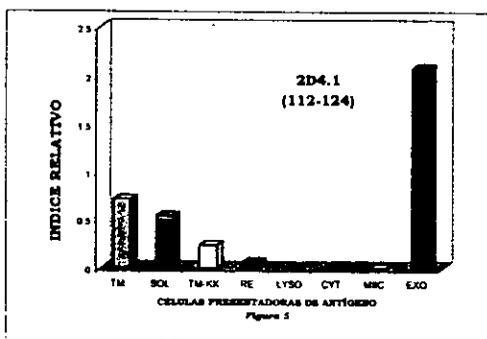


Figura 5

Figuras 1,2,3,4,5. Eficiencia de presentación de las CPA que expresan diferentes formas estructurales de LG hacia un panel de hibridomas T que reconocen distintos determinantes antigénicos. En placas de 96 pozos, se pusieron en cocultivo 25,000 CPA de c/forma de LG con 50,000 cél. de hibridomas T en un vol de 200mcl, se incubaron 24hs y se recolectaron 50mcl del sobrenadante y se sembraron 20,000 CTLL-2 en un vol de 50mcl. Se incubó 24hs y se adicionó 100mcl de SDS 10%, HCl 0.01N, se incubó toda la noche y se leyó absorbancia a 570nm.

Por lo tanto las formas Tm, soluble (**Grupo I**) y la exógena son las que mejor indujeron activación a todos los hibridomas. La forma KK que es la forma mutada en los residuos 62,63 no activó a C10 (**Fig. 1**) lo que indica que este hibridoma depende de los triptofanos 62, 63 de la LG nativa para su activación.

Las formas de RE, Liso, Cito y MIIC generaron activación en diferentes grados en los hibridomas, pero fue mucho menor si se compara con la activación producida por las formas del grupo I y la exógena. La forma RE tuvo un comportamiento excepcional con el hibridoma C10 ya que llegó a activarlo en la misma proporción que el grupo I, pero su comportamiento con otros hibridomas no permite clasificarla dentro de este grupo.

Como también puede verse en las figuras **1,2,3,4y 5** hay determinantes como los 46-61 y el 34-45, que independientemente de la localización intracelular de la LG están siendo generados constantemente aunque en diferentes proporciones dependiendo de la forma estructural de la proteína.

En resumen: las formas Tm, KK y soluble generan los determinantes: 34-45, 46-61, Δ 1-80 y 112-124. La forma exógena, al igual que las anteriores, genera todos los determinantes. La forma de RE genera los péptidos 46-61 y en menor grado los 34-45, Δ 1-80 y de manera muy deficiente el 112-124. La forma cyto genera en baja proporción los péptidos 46-61, 34-45 y casi inexistentemente los péptidos Δ 1-80 y 112-124. La forma Lyso genera muy deficientemente los determinantes 46-61, 34-45 y Δ 1-80, sin generación del péptido 112-124. La forma MIIC no genera ningún determinante.

El orden de generación de determinantes muestra que :

Tm = Soluble = exógena > RE > Cito > Liso > MIIC

8.5.2. Estudio de la sensibilidad de los hibridomas anti-LG

Para comprobar si la localización intracelular de la lisozima de gallina es la que determina las diferencias en la generación de estos determinantes o bien sólo se deba a diferente concentración de las formas de LG se realizaron estudios de sensibilidad de los hibridomas y titulación de LG endógena, comparando con dosis variables de LG exógena.

Se realizó un experimento para evaluar la sensibilidad de cada hibridoma hacia la LG exógena (En este estudio se incluyó el hibridoma 2B6.3 que reconoce el péptido 25-43). Se usó el linfoma LK-35.2 como CPA (**Figura 6**).

Como puede observarse: C10 ,3A9 y A6.B3 son de los hibridomas que responden con mayor sensibilidad a concentraciones bajas de la LG exógena (1µg/ml) empleando 25,000 CPA.

En la **figura 6 y la tabla 4** puede verse que el hibridoma 2D4.1 no responde a concentraciones bajas de lisozima de gallina exógena. El primer indicio de activación se logró hasta los 10µg/mL y su respuesta tuvo un máximo de respuesta hasta los 1000µg/mL y mostró ser el hibridoma que mayor activación desencadenó a esta concentración, lo que indica que el máximo grado de activación en este hibridoma depende de elevadas concentraciones de lisozima de gallina exógena.

También puede observarse que la óptima activación para E907.D y 2B6.3 no depende de una elevada concentración de lisozima de gallina, por lo que los determinantes 25-43 y Δ 1-80 son generados en baja proporción, independientemente de la concentración de LG presente en el medio. El análisis de este comportamiento se puede observar en la **tabla 4**.

Sensibilidad de hibridomas T

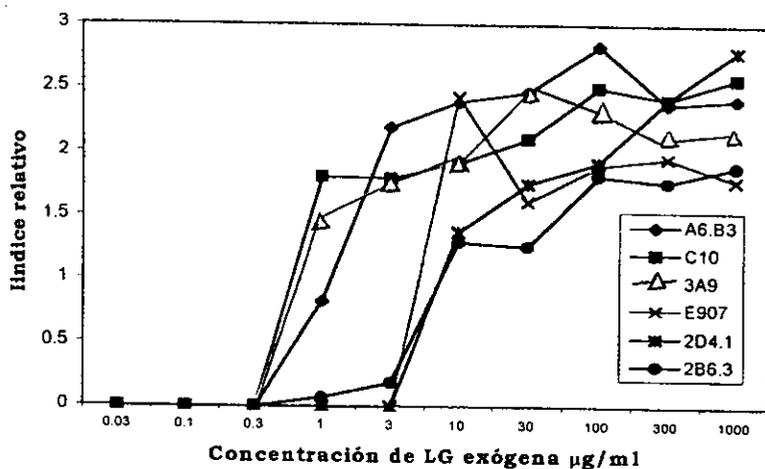


Figura 6. Evaluación de la sensibilidad de los hibridomas anti-LG a diferentes concentraciones de LG exógena. En placas de 96 pozos se pusieron en cocultivo 25,000 CPA (Lk-35.2) con 50,000 células de los hibridomas T en un volumen de 200µL y se adicionaron diferentes concentraciones de LG exógena (0.3,1,3,10,30,100,300 y 1000µg/ml), se incubó por 24h y se recolectaron 50µL del sobrenadante y se adicionaron 20,000 CTLL-2 en un volumen de 50µL, se incubó por 24h y se adicionaron 20µL de una alícuota de MTT(5mg/ml), se incubó por 5h y se adicionaron 100µL de SDS al 10% con HCl 0.01N y se incubó toda la noche. Al día siguiente se leyó absorbancia a 570nm.

Tabla 4. Análisis de la sensibilidad de los hibridomas a diferentes concentraciones de LG exógena.

1µg/ml	3µg/ml	10µg/ml	30µg/ml	100µg/ml	300µg/ml	1000µg/ml
C10	A6.B3	A6.B3/E907	A6.B3	A6.B3	C10/2D41	2D4.1
3A9	C10	C10	3A9	C10/3A9	A6.B3	C10
A6.B3	3A9	3A9	C10	2D4.1	3A9	A6.B3
2B6.3	2B6.3	2D4.1	2D4.1	E907	E907	3A9
*2D4.1	*2D4.1	2B6.3	E907	2B6.3	2B6.3	2B6.3
*E907	*E907		2B6.3			E907

*Hibridomas que no mostraron activación.

8.5.3. Titulación de la concentración de la Lisozima de gallina endógena

Una vez establecida la sensibilidad de cada hibridoma a diferentes concentraciones de LG exógena se buscó titular la concentración de las diferentes formas de LG endógena en las células presentadoras de antígeno.

En las figuras **7,8,9,10,11 y 12** se puede ver que la generación de los determinantes antigénicos está en función del número de CPA que refleja indirectamente la dosis de antígeno (LG). Así, las formas transmembranales y soluble son de las más eficientes para activar, con sólo 1000 células, a los hibridomas A6.B3 , E907 y C10 , lo que implica que se están generando los determinantes 34-45, Δ 1-80 y 46-61. El hibridoma 3A9 es menos sensible que C10 ya que se requieren 10,000 células para inducir activación. Los determinantes 25-43 y 112-124 se producen en menor grado, ya que sólo fueron detectados con 100,000 CPA (**Figuras 7,8,9**).

La CPA con LG retenida en **retículo endoplásmico** necesitó 10,000 células para activar a los hibridomas C10(46-61) y A6.B3(34-45), sugiriendo una baja expresión de la proteína o una baja generación de estos péptidos en comparación con las formas de membrana y soluble. Esta forma activó en menor proporción al hibridoma E907.D (Δ 1-80) usando 100,000 CPA y fue negativa con los otros.

La forma de **citoplasma**, con 10,000 CPA activó en forma mínima al hibridoma A6.B3, (péptido 34-45) y en muchísima menor proporción a los hibridomas C10(46-61), 3A9(46-61) y E907.D(Δ 1-80), estos últimos determinantes fueron detectados con 100,000 CPA.

La forma de **lisosomas** requirió de un total de 100,000 CPA para activar sólo de manera deficiente, a los hibridomas A6.B3(34-45) y C10(46-61), sugiriendo esta forma la más baja expresión de LG o lo inadecuado del compartimiento para la generación de los determinantes 34-45 y 46-61 y la total ineficiencia para los otros.

A una concentración de 1 µg/ml de LG **exógena** en el medio se necesitaron de 1000 CPA para activar a C10; 10,000 CPA para activar a A6.B3(34-45) y 10,000 para 3A9 (46-61) sin lograr activación en E907(Δ1-80), 2B6.3(25-43) y 2D4.1(112-124).

Con 3 µg/ml se necesitaron 10,000 para activar a C10(46-61); 1000 para A6.B3; 10,000 para 3A9 y 10,000 para 2B6.3 sin activación de E907 y 2D4.1.

A 10 µg/ml se requirieron de 10,000 CPA para activar a C10, 1000 para A6.B3; 1000 para E907; 10,000 para 3A9; 10,000 para 2D4.1 y 10,000 para 2B6.3 (**Tabla 5**).

En todas las CPA fue común denominador la activación deficiente de los hibridomas 2D4.1(112-124) y 2B6.3(25-43).

2D4.1 no reaccionó con las formas de **RE**, **Cito** y **Liso** ni a concentraciones de LG exógena de 1 y 3 µg/ml, pero llama la atención que reaccionó débilmente con la forma **Tm mutada** usando 100,000 CPA mientras que 2B6.3 con esta forma no mostró ningún tipo de activación (**Figuras 11,12**), mientras que la forma **Tm** y la **soluble** si ocasionaron activación en estos hibridomas.

Tabla 5. Variación de la sensibilidad de los hibridomas dependiente del origen de la proteína. La flecha indica el orden decreciente de la sensibilidad de los hibridomas a cada forma de LG.

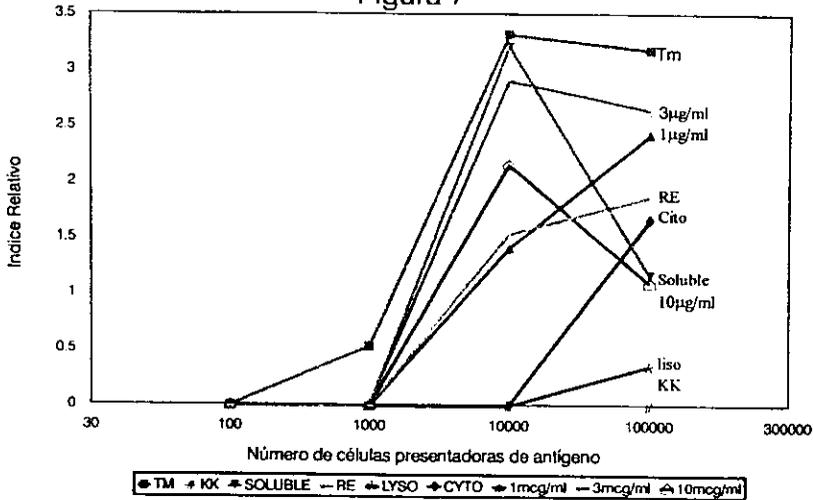
** hibridomas que no presentaron activación*

Tm	Soluble	KK	RE	Cyto	Lyso	Exógena
A6.B3	A6.B3	A6.B3	C10	A6.B3	A6.B3	C10
E907	E907	E907	A6.B3	3A9	C10	3A9
C10	C10	3A9	E907	C10	*E907	A6.B3
3A9	3A9	2D4.1	3A9	E907	*3A9	2B6.3
2D4.1	2D4.1	*2B6.3	*2D4.1	*2D4.1	*2D4.1	E907
2B6.3	2B6.3	*C10	*2B6.3	*2B6.3	*2B6.3	2D4.1

S e n s i b i l i d a d ↓

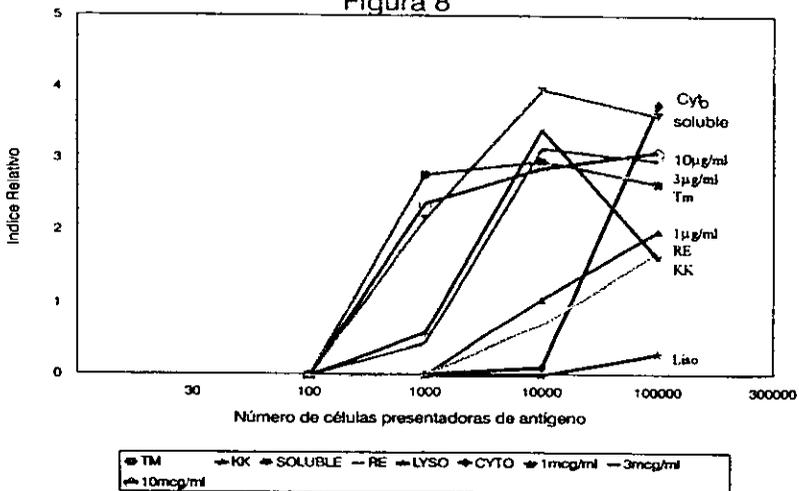
C10

Figura 7



A6.B3

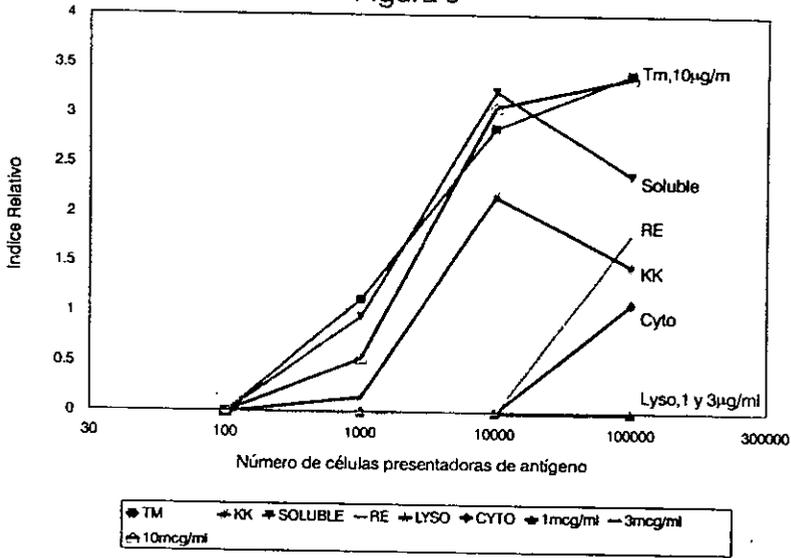
Figura 8



Figuras 7,8,9,10,11 y 12. Titulación de la I.G endógena. Comparación con diferentes concentraciones de I.G exógena. En placas de 96 pozos se pusieron en cocultivo cantidades variables de CPA (100,1000,10000 y 100000) con cantidades constantes de hibridomas T (50000) todo a un volumen de 200µl y se probaron tres concentraciones diferentes de I.G exógena (1,3y 10µg/ml), se incubó 24hrs y se recolectaron 50µl de sobredante y se le adicionaron 20000CTLL-2 en 50 µl de medio, se incubó 24hrs y se adicionó 20µl de MTT, se incubó por 5hrs y se adicionaron 100 µl de SDS 10%, HCL0.01N y se incubó toda la noche. Se leyó la absorbancia a 570nm.

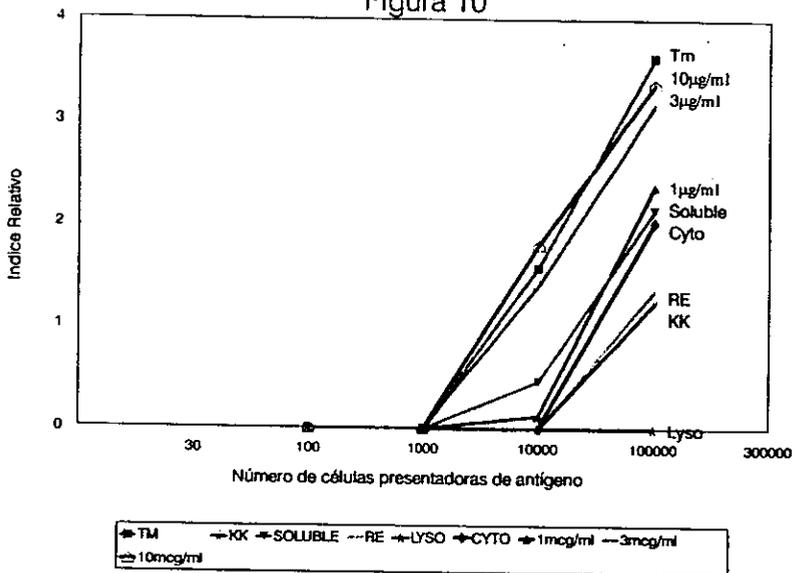
E907

Figura 9



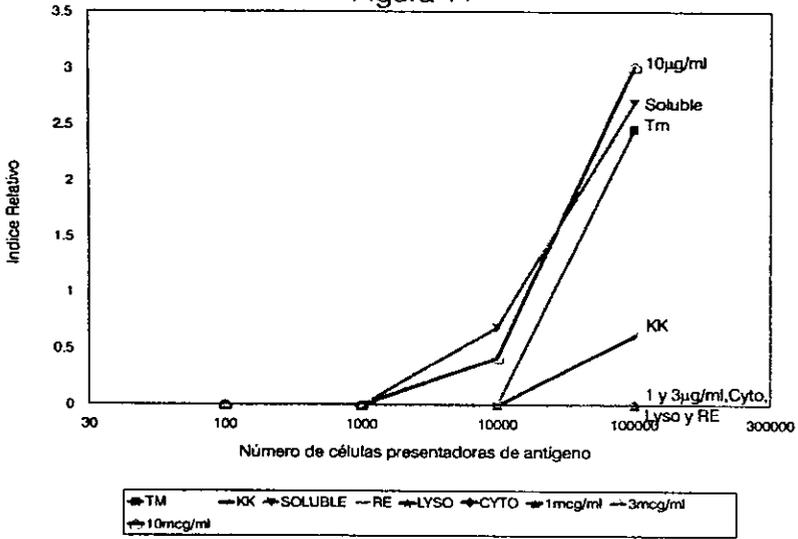
3A9

Figura 10



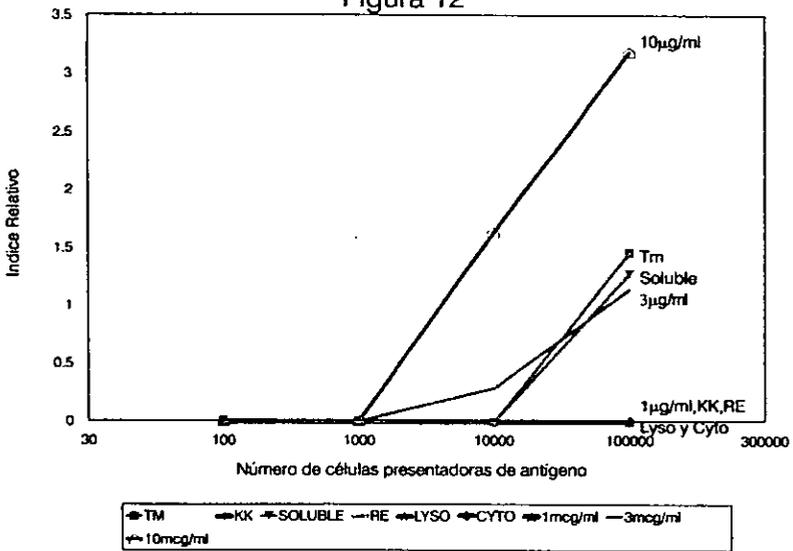
2D4.1

Figura 11



2B6.3

Figura 12



9.DISCUSIÓN

Estos experimentos se llevaron a cabo para generar una serie de células presentadoras de antígeno que expresaran formas de LG endógena con diferentes señales de tráfico intracelular, para el estudio del efecto de la localización intracelular de la proteína en los péptidos generados mediante el procesamiento de antígeno. Se transfectaron linfocitos B murinos con los cDNA que codifican LG con diferentes señales de tráfico intracelular, con las que se realizaron experimentos de presentación de antígeno a hibridomas T restringidos a I-A^k y que reconocen diferentes epitopos a lo largo de la secuencia peptídica de la LG.

Los principales hallazgos derivados de este trabajo son: **1)** Las líneas transfectadas con los genes que codifican para diferentes formas estructurales de LG, generan y presentan péptidos a los hibridomas T anti-LG excepto la forma MIIC, **2)** los péptidos 46-61 y 34-45 son generados independientemente de la localización intracelular, pero son presentados con diferente eficiencia de acuerdo a la misma. Sin embargo, la generación de otros péptidos (Δ 1-80 y 112-124) sí parece verse afectada por este factor.

3) Las formas transmembranales y la soluble parecen seguir una misma ruta de procesamiento por lo cual se les considera como un solo grupo (Grupo I), estas formas son las que más eficientemente activan a todos los hibridomas T y mantiene diferencias en cuanto a su procesamiento, con las formas de RE, cyto y lyso , **4)** la forma de RE es la que más eficientemente presenta después del Grupo I, **5)** Las formas cyto y lyso son las que menos eficientemente activan a los hibridomas T, **6)** la forma MIIC a pesar de dirigirse a un compartimiento de la vía endocítica, no

genera ningún determinante. 7) Todas las formas endógenas de LG, incluyendo al grupo I tienen requerimientos de procesamiento diferentes a los de la LG exógena. 8) Sin embargo, en todas estas diferencias observadas, no puede descartarse que la causa sea alguna de las siguientes posibilidades: a) capacidad de generación de los determinantes de acuerdo a la localización intracelular o b) sobreexpresión de la LG en formas Tm y soluble.

Previamente se consideraba que las moléculas clase II estaban restringidas a presentar sólo péptidos de proteínas exógenas. Sin embargo, investigaciones recientes han demostrado que éstas moléculas presentan preferencialmente péptidos de proteínas endógenas. La generación y presentación de péptidos difiere dependiendo del origen de la proteína, sin embargo las diferencias no sólo se restringen al origen de la proteína, sino también a su localización intracelular.

En este trabajo se encontró que todas las formas transfectadas (excepto MIIC) generan y presentan péptidos de LG a hibridomas T anti-LG, confirmando la expresión de los genes electroporados.

La generación de los determinantes 46-61 y 34-45 parece ser independiente de la localización intracelular, concordando con otros estudios realizados por Unanue y colaboradores donde se encontró que el epitopo inmunodominante 46-61 era generado en diversas formas estructurales de LG y presentados con diferente eficiencia.

No obstante, la generación de otros determinantes: Δ 1-80 y 112-124, si parece verse afectada por la localización ya que las formas como de RE, cito y liso lo generaron deficientemente. La generación de los determinantes inmunodominantes 46-61 y 34-45 se vé aumentada en las formas transmembranales y la soluble, sugiriendo que estas formas

puedan estar llegando a compartimientos donde la generación de estos epitopos se vea favorecida. Sin embargo en estas formas también es detectable la generación de los epitopos $\Delta 1-80$ y 112-124 (lo que no ocurre con las formas de RE, cito y liso), esto podría sugerir otra posibilidad: que tal vez una sobreexpresión de las proteínas transmembranales y soluble esté contribuyendo a que estos determinantes sean detectados. Brooks y McCluskey reportaron en formas de LG transmembranales y de secreción de alta y baja expresión, que las formas de alta expresión mostraron la mejor generación de determinantes. Fue necesario hacer estudios para descartar ésta última posibilidad, titulando la lisozima de gallina endógena y al igual que en los resultados anteriores y en los reportados, se encontró nuevamente que las proteínas de la vía exocítica (Tm y Soluble) son las que mejor se presentan por moléculas clase II del complejo principal de histocompatibilidad, ya que se ha postulado que esta vía podría intersectar la endocítica^{10,52}.

El estudio del procesamiento y generación de péptidos a partir de proteínas residentes de RE ha dado lugar a controversias, pues mientras algunos estudios muestran gran eficiencia, otros no lo han corroborado, los resultados obtenidos en este trabajo indican que después de las formas del Grupo I, la forma de **RE** fue la que ocasionó mayor eficiencia de generación de péptidos, y específicamente en el caso de la generación del determinante 46-61 mostró desencadenar una activación comparable con las formas del Grupo I. Datos anteriores habían demostrado que este compartimiento es inapropiado para la generación y unión de péptidos a las moléculas clase II. El mecanismo por el que se pueda estar procesando esta proteína podría depender de un sistema de transporte de

degradación hacia citosol⁶³, en donde los péptidos generados serían traslocados al RE o bien viajar del citoplasma hacia los endosomas/lisosomas o bien que la señal de retención en RE no sea suficiente y esté permitiendo la salida de proteínas del RE hacia una intersección con la vía endocítica.

En cuanto a las proteínas citoplásmicas, las moléculas clase II sólo las presentan en casos excepcionales. Lo anterior depende de la vida media además de los niveles de expresión y posiblemente de otras características aún no definidas¹⁵.

La forma de citoplasma estudiada en nuestro laboratorio tuvo baja eficiencia de presentación tal vez a que al igual que en los estudios mencionados esta forma tenga una vida media muy corta en la que esté siendo completamente degradada sin darle tiempo de llegar a compartimentos de unión con las moléculas clase II, o que los niveles de expresión de las proteínas son muy bajos., el tipo de procesamiento de estas proteínas podría seguir un mecanismo parecido a las proteínas del RE.

La forma de expresión en lisosomas fué la más ineficiente en generación de péptidos, aún los inmunodominantes (46-61,34-45). Esto podría deberse nuevamente a una menor expresión de la lisozima de gallina o a que alternativamente los lisosomas no son un sitio adecuado para la generación de determinantes. Es posible que los péptidos generados en este compartimento estén siendo degradados rápidamente. En el momento actual no podemos distinguir entre estas dos posibilidades.

Todas las formas estudiadas generaron determinantes antigénicos en

diferentes grados, excepto la forma MIIC. Tal vez aquí se pueda estar observando un efecto de procesamiento que depende directamente de la localización intracelular. Es posible que los compartimentos MIIC no sean un lugar adecuado para el procesamiento de antígeno, a pesar de que aparentemente son el sitio de unión. Esto indica que es posible que el procesamiento dependa entonces de otros factores a lo largo de toda la ruta endocítica. No obstante, no podemos descartar que esto sea secundario a una baja expresión, lo que parece improbable, pues se realizaron tres transfecciones independientes y en ningún caso se obtuvieron resultados.

También se encontró que el patrón de procesamiento de las formas de LG endógena varía del de la exógena y al igual que en los estudios hechos por Moreno et al, 1991, llama la atención que las formas del grupo I, que en algún momento pueden endocitarse y seguir la vía clásica de endocitosis, son procesadas en forma distinta que la forma exógena. Una posible explicación para estas diferencias sería si los péptidos derivados de estas proteínas fueran presentados por las moléculas clase II recicladas⁶². Esto implicaría que la unión de péptidos se está dando en un lugar que no intersecta con moléculas recién sintetizadas, es decir un compartimento ajeno a la ruta exocítica.

En todas las CPA los péptidos 112-124 y 25-43 fueron generados deficientemente, lo que podría sugerir que las formas endógenas de LG no alcanzan los compartimentos donde estos péptidos son generados. En la lisozima de gallina exógena estos determinantes fueron generados eficientemente, confirmando la diferencia que hay en el procesamiento de la lisozima de gallina endógena y la exógena.

Si bien las diferencias observadas en el procesamiento y presentación de

antígeno pudieran estar relacionadas con la localización celular, no se puede ser totalmente concluyente ya que parece haber una variable más que es la concentración de la lisozima de gallina endógena.

Lo que queda por realizar es escoger clonas de cada célula presentadora de antígeno que expresen cantidades equimolares de la lisozima de gallina para así eliminar ésta variable y poder observar si la localización intracelular afecta el procesamiento y presentación de antígenos endógenos por las moléculas clase II del complejo principal de histocompatibilidad.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

10. CONCLUSIONES:

Las transfectantes presentaron constitutivamente determinantes antigénicos de la lisozima de gallina endógena excepto la forma MIIC.

Parece no haber diferencias en la generación de péptidos de las formas estructurales de la lisozima de gallina transmembranal, la lisozima de gallina transmembranal mutada (KK) y la lisozima de gallina soluble, pero éstas difieren de las otras formas con señales de retención en retículo endoplásmico, citoplasma y lisosomas .

Hay claras diferencias entre el procesamiento de las formas de lisozima de gallina endógenas y la exógena.

Lo anterior podría reflejar simplemente distintos niveles de expresión de las proteínas codificadas por los genes transfectados o que la generación de los determinantes depende de la localización intracelular.

11. REFERENCIAS.

1. Adorini L., Appella E., Doria G., Nagy Z.A. (1988). Mechanisms influencing the immunodominance of T cell determinants. *J. Exp. Med.* 168:2091-2104.
2. Adorini, L., Guéry, J., Fuchs, S., Ortiz, V., Hammerling, G., Momburg, F.(1993).processing of endogenously synthesized hen egg-white lysosyme retained in the endoplasmic reticulum or in secretory form gives rise to a similar but not identical set of epitopes recognized by class II-restricted T cells. *J. Immunol.* 151:3576-3586.
3. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D., (1994). *Molecular biology of the cell.* 3 ed. Garland Publishing. Nueva York.
4. Allen, P. M., Unanue E. R., (1984). Differential requirements for antigen processing by macrophages for lysozyme-specific T cell hybridomas. *J. Immunol.* 132: 1077-1079.
5. Allen, P. M., Babbit, B. P., Unanue, E. R.. (1987). T cell recognition of lysozyme the biochemical basis of presentation. *Immunol. Rev.* 98, 171-186.
6. Amigorena, S., Drake J.R., Webster, P., Mellman, I. (1994). Transient accumulation of new class II MHC molecules un a novel endocytic compartment in B lymphocytes. *Nature.* 369:113-120.
7. Bennet, K., Levine, T., Ellis, J. S., Peanasky, R. J., Samloff, M. I., Kay, J., Chain, B. M.. (1992). Antigen processing for presentation by class II major Histocompatibility complex requires cleavage by cathepsin E. *Eur. J. Immunol.* 22: 1519-1524.
8. Bodmer, H., Viville, S., Benoist, C., Mathis, D. (1994). Diversity of endogenous epitopes bound to MHC class II molecules limited by invariant chain. *Science.* 263:1284-1286.
9. Bonifacino, J.S., Chen, C., Lippincott-Schwartz, J., Ashwell, J.D., Klausner, R.D. (1988). Su bunit interactions within the T cell antigen receptor: clues from the study of partial complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 35,6929-6933.
10. Bonifaz, L. (1996). Vías de procesamiento de antígenos endógenos para su presentación por moléculas clase II del complejo principal de histocompatibilidad. Tesis para obtener el grado de Maestría en ciencias biomédicas con especialidad en inmunología. UNAM. Facultad de Medicina.
11. Bjorkman, P.J., Saper, M.A., Samraoui, B., Bennet, W.S., Strominger, J.L., Wiley, D.C.. (1987a). Structure of the human class I histocompatibility antigen HLA-A2. *Nature* 329: 506-512.

12. Bjorkman, P.J., Saper, M.A., Samroui, B., Bennet, W.S., Strominger, J.L., Wiley, D.C. (1987b). The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature* 329: 512-518.
13. Blum, J., y Cresswell, P. (1988). Role for intracellular proteases in the processing and transport of class II HLA antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 3975-3979.
14. Brooks, A., Hartley, S., Nielsen, L. K., Perera, J., Goodnow, C. C., Basten, A., McCluskey, J.. (1991). Class II- restricted presentation of an endogenously derived immunodominant T-cell determinant of hen egg lysozyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA .* 88: 3290-3294.
15. Brooks, A.G., McCluskey, J., (1993). Class II-restricted presentation of a hen egg Lysozyme determinant derived from endogenous antigen sequestered in the cytoplasm or endoplasmic reticulum of the antigen presenting cells. *J. Immunol.* 150: 3690-3697.
16. Brown, J., Jardetzky, T., Gorga, J.C., Stern, L.J., urban, R.G., Strominger, J.L., Wiley, D.C.(1993). Three dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature.* 332:845-850.
17. Chen, B. P., A. Madrigal, P. Parham. (1990). Cytotoxic T cell recognition of an endogenous class I HLA peptide presented by a class II HLA molecule. *J. Exp. Med.* 172:779-788.
18. Chesnut, R.W., Colon, S.M., Grey, H.M.(1982). Requirements for thye porcessing of antigens by antigen antigen-presenting B cells.I. Functional comparison of B cell tumors and macrophages. *J. Immunol.* 129:2382-2388.
19. Chicz R.M., Urban R.G., Lane W.S., 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 heterogenous in size. *Nature* 358: 764-768.
20. Collins, D.S., Unanue, E. R., Harding C.V.(1991). Reduction of disulfide bonds within Lysosomes is a key step in antigen processing. *J. Immunol.* 147: 4054-4059.
21. Cresswell, P. (1985). Intracellular class II antigens are accesible to transferrin-neuraminidase conjugates internalized by receptor-mediated endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:8188-8192.
22. Cresswell, P.(1994). Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 12:259-293.
23. Davis, M. M., Bjorkman, P.J (1989). T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* 334:395-402.
24. Eisenlohr, L.C., C.J. Hackett. (1989). Class II major histocompatibility complex-restricted T cells specific for a virion structural protein that do not recognize exogenous influenza virus. Evidence that presentation of labile T cell determinants

- is favored by endogenous antigen synthesis. *J. Exp. Med.* 169:921-931.
25. Flavell, R.A., Allen, H., Burkly, L.C., Sherman, D.H., Waneck G.L., Widera, G., (1986). Molecular biology of the H-2 histocompatibility complex. *Science* 233: 437-443.
 26. Germain, R.N. (1993). The biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation. *Ann. Rev. Immunol.* 11: 403-450.
 27. Gillis, S.M., M. Ferm, W. Ou, and K. A. Smith. (1978). T cell growth factor: parameters of induction and a quantitative assay. *J. Immunol.* 120:2027-2032.
 28. Guagliardi, L. E., B. Koppelman, J.S. Blum, M. S. Marks, P. Creswell, F. M. Brodsky. (1990). Co-localization of molecules involved in antigen processing and presentation in an early endocytic compartment. *Nature* 343:133-138.
 29. Hackett, C.J., Yewdell, W. J., Bennink, J. R., Wysocka, M. (1991). Class II MHC-restricted T cell determinants processed from either endosomes or the cytosol show similar requirements for host protein transport but different kinetics of presentation. *J. Immunol.* 146: 2944-2951.
 30. Harding, C.V., Collins, D. S., Slot, J.W., Geuze, H.J., Unanue, E.R.. (1991). Liposome-encapsulated antigens are processed in lysosomes, recycled, and presented to T cells. *Cell* 64:393-401.
 31. Harding, C.V., Roof, R.W., Allen, P.M., Unanue, E. R. (1991). Effects of pH and polysaccharides on peptide binding to class II major histocompatibility complex molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 2740-2744.
 32. Harding, C.V., y Unanue, E. R. (1990) Cellular mechanisms of antigen processing and the function of class I and II major histocompatibility complex molecules. *Cell regulation.* 1:499-509.
 33. Harding, C.V. (1996). Class II Antigen Processing: Analysis of Compartments and functions. *Crit. Rev. in Immunology.* 16:13-29.
 34. Hoffman M. (1991). Playing Tag with membrane proteins. *Science* 254:650-651.
 35. Jarquemada, D., M. Marti, E.O. Long. (1991). An endogenous processing pathway in vaccinia virus-infected cells for presentation of cytoplasmic antigens to class II-restricted T cells. *J. Exp. Med.* 172:947-952.
 36. Jin, Y., J.W.K. Shih, I. Berkower. (1988). Human T cell response to the surface antigen of hepatitis B virus (HbsAg). Endosomal and nonendosomal processing pathways are accessible to both endogenous and exogenous antigen. *J. Exp. Med.* 168:293-306.
 37. Kappler, J., J. White, D. Wegmann, E. Mustain., P. Murrack. (1982). Antigen presentation by Ia B cell Hybridomas to H-2 restricted T cell hybridomas. *Proc. Natl acad. Sci. USA* 79:3604-3607.

38. Kaufman, J.F., Auffray, C., Korman, A.J., Shackelford, D.A., Strominger, J., (1984). The class II molecules of human and murine histocompatibility complex. *Cell* 36, 1-13.
39. Klausner, R.D., Sitia, R. (1990). Protein degradation in the endoplasmic reticulum. *Cell*. 62:611-614.
40. Klausner, R.D., Lippincot-Schwartz, J., Bonifacino, J.S. (1990). The T cell antigen receptor: insights into organelle biology. *Annu. Rev. Cell Biol.* 6, 403-431.
41. Koning, F., Maloy, W.L., Coligan, J.E. (1990) The implications of subunit interactions for the structure of the T cell receptor-CD3 complex. *Eur. J. Immunol.* 20, 299-305.
42. Lambert, I.E., Unanue, E.R., (1989). Analysis of the interaction of peptide hen egg white lysozyme (34-45) with the I-A^k molecule. *J Immunol.* 143:802.
43. Leitinger, B., Brown, J.L. (1994). Tagging secretory and membrane proteins with sialylation site. *J. Biol. Chem.* 269 (11):8115-8121.
44. Malnati, M. S., Marti, M., La Vaute, T., Jaraquemada D., Biddison, W., DeMars, R., Long, E. O.. (1992). Processing pathways for presentation of cytosolic antigen to MHC class II-restricted T cells. *Nature* 357: 702-704.
45. Manolios, N., Letourner, F., Bonifacino, J.S., Klausner, R.D. (1991). Pairwise, cooperative and inhibitory interactions describe the assembly and the probable structure of the T cell antigen receptor. *EMBO J.* 10, 1643-1651.
46. Minami, Y., Weissman, A.M., Samelson, L.E., Klausner, R.D. (1987). Building a multichain receptor: synthesis, degradation, and assembly of the T-cell antigen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 2688-2692.
47. McCoy, K.L., J. Miller, M. Jenkins, F. Ronchese, R.N. Germain., R.S. Schwartz. (1989). Diminished antigen processing by endosomal acidification mutant antigen-presenting cells. *J. Immunol.* 143:29-33.
48. Moreno, J., L. Adorini, G.J. Hammerling. (1990). Co-dominant restriction by a mixed haplotype I-A determinat for the lysozyme peptide 52-61 in H-2^k X H-2^b F1 mice. *J. Immunol.* 144:3296-3304.
49. Moreno, R. J., Vignali, A. D., Nadimi, F., Fuchs, S., Adorini, L., Hammerlig, G.J. (1991). Processing of an endogen protein can generate MHC class II-restricted T cell determinants distinct from those derived from exogenous antigen. *J. Immunol.* 147: 3306-3313.
50. Morrison, L.A., A.E. Lukacher, V.L. Braciale, D.P. Fan, T.J. Braciale. (1986). Differences in antigen presentation to MHC class I and class II-restricted influenza virus specific cytolytic T lymphocyte clones. *J. Exp. Med.* 163:903-909.
51. Nadimi, F., J. Moreno, F. Momburg, A. Heuser, S. Fuchs, L. Adorini, G.J.

- Hammerling. (1991) Antigen presentation of hen egg-white lysozyme but not ribonucleasa A is augmented by the major histocompatibility complex class II-associated invariant chain. *Eur. J. Immunol.* 21:1255-1263.
52. Neefjes, J.J., Stollorz, V., Peters, P.J., Geuze, H.J., Ploegh, H.L. (1990). The biosynthetic pathway of MHC class II but not class I molecules intersects the endocytic route. *Cell.* 61:171-183.
53. Nelson, A.C., Roof, W.R., McCourt, W. D., Unanue, E. R. (1992). Identification of the naturally processed form of hen egg white Lysozyme bound to the murine major histocompatibility complex class II molecule I-A^K. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 7380-7383.
54. Nuchtern, J.G., W.E. Biddison, R.D. Klausner. (1990). Class II MHC molecules can use the endogenous pathway of antigen presentation. *Nature.* 343:74-76.
55. Parra-López, C.A., Lindner, R., Vidavsky, I., Gross, M., Unanue E.R. (1997). Presentation on Class II MHC Molecules of Endogenous Lysozyme Targeted to the Endocytic Pathway. *J. Immunol.* 158: 2670-2679.
56. Pease, L.R., Horton, R.M., Pullen, J. K., y Cai, Z.. (1991). Structure and origin of diversity in the major histocompatibility complex. *CRC Crit. Rev. Immunol.*
57. Pelham, H.R.B. (1989). Control of protein exit from the endoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 5:1-23.
58. Peters, P.J., Neefjes, J.J., Oorschot, V., Ploegh, H.L., Geuze, H.J. (1991). Segregation of MHC molecules from MHC class I molecules in the golgi complex for transport to lysosomal compartments. *Nature.* 349:669-676.
59. Peterson, M., y Miller, J.. (1990) Invariant Chain influences the immunological recognition of MHC class II molecules. *Nature* 345: 172-174.
60. Pfeffer, S.R., y Rothman, J. R.. (1987). Biosynthetic protein transport and sorting by the endoplasmic reticulum and Golgi. *Annu. Rev. Biochem.* 56: 829-856.
61. Pieters, J., (1997). MHC class II restricted antigen presentation. *Immunol.* 9: 89-96.
62. Pinet, V., Vergelli, M., Martín, R., Bakke, O., Long E. (1995). Antigen presentation mediated by recycling of surface HLA-DR molecules. *Nature.* 375:603-606.
63. Plemper, K.R., S. Bohmler, Bordallo, J., Sommer, T., Wolf H. D. (1997). Mutant Analysis links the translocon and BIP to retrograde protein transport for ER degradation. *Nature.* 388:891-895.
64. Poirier, G., Chain, B. (1993) Analysis of the cellular requirements for the binding of exogenous peptide to MHC Class II molecules. *Cell. Immunol.* 152:456-467.
65. Puri, J., y Factorovich, Y., (1988). Selective Inhibition of antigen Presentation to cloned T cells by protease inhibitors. *J. Immunol.* 141: 3313-3317.

66. Rabouille, C., Hui, N.n Huinte, F., Fieckbusch, R., Berger, E.G., Warren, G., Nilsson, T. (1995). Mapping the distribution of golgi enzymes involved in the construction of complex oligosaccharides. *J. Cell Sci.* 108:1617-1627.
67. Ramezani, R.M., Phan, H.L., Kirchrath, L., Tan, P.K., Kirchhausen, T., Hollenberg, C.P., Payne, G.S.(1995). *Sacharomyces cerevisiae* Ap 12p, an homology of the mammalian clathrin Ap subunit, plays a role in clathrin-dependent golgi function. *J. Cell. Sci.* 108:1605-1615.
68. Reyes, V. A., Lu, S., Humpreys, R. E.. (1991). Cathepsin B cleavage of Ii from class II MHC alpha- and beta-chains. *J. Immunol.* 146: 3877-3880.
69. Roche, P.A., y Cresswell, P.. (1990) Invariant Chain association with HLA-DR molecules inhibits immunogenic peptide binding. *Nature* 345: 615-618.
70. Roche, P.A., Cresswell, P.. (1991) Proteolysis of class II-associated invariant chain generates a peptide binding site in intracellular HLA-DR molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:3150-3154.
71. Roche, P.A., Marks, M.S., Cresswell, P. (1991). Formation of a nine subunit complex by HLA class II glycoproteins and the invariant chain. *Nature.* 354:392-394.
72. Rosenthal, A.S., Shevach, E.M.(1973). Function of macrophages in antigen recognition by guinea pig T lymphocytes. I. Requirements for histocompatible macrophages and lymphocytes. *J. Exp. Med.* 138:1194-1212.
73. Rothman, J.E., Wieland, F.T.(1996). Protein sorting by transport vesicles. *Science* 259:227-234.
74. Salama, N.R., Schekman, W.R.(1995). The role of coat protein in the biosystem of secretory proteins. *Curr. Op. Cell Biol.* 7:536-543.
75. Sprent, J., Webb, S. R., (1987). Function and specificity of T cell subsets in the mouse. *Adv. Immunol.* 41: 39-133.
76. Steinman, R.S., Witmer, M.D.(1978). Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75:5132-5136.
77. Takahashi, H., K.B. Cease, J. A. Berzofsky. (1989). Identification of proteases that process distinct epitopes on the same protein. *J. Immunol.* 142:2221-2229.
78. Thomas, D.B., J. Hodgson, P.F. Riska, C.M. Graham. (1990). The role of the endoplasmic reticulum in antigen processing. N-glycosylation of influenza hemagglutinin abrogates CD4+ cytotoxic T cell recognition of endogenously processed antigen. *J. Immunol.* 144: 2789-2794.
79. Vidard L., Rock K.L., Benacerraf B.(1991). The generation of immunogenic peptides can be selectively increased or decreased by proteolytic enzyme inhibitors.

J. Immunol. 147:1786-1791.

80. Vignali, D.A., Urban, R. G., Chicz, R.M., Strominger, J. L.(1993). Minute quantities of a single immunodominant foreign epitope are presented as large nested sets by major histocompatibility complex class II molecules. *Eur. J. Immunol.* 23: 1602-1607.
81. Vignali, D.A., Carson, R.T., Chang, B., Mittler, R.S., Strominger, J.L. (1996). The two membrane proximal Domains of CD4 Interact with the T cell receptor. *J. Exp. Med.* 183:2097-2101.
82. Vignali, D.A., Moreno, J., Schiller, D., Hammerling G.J. (1992). Species-specific binding of CD4 to the b2 domain of Major histocompatibility complex class II molecules. *J. Exp. Med.* 175:925-929.
83. Weiss, S., B. Bogen. (1991) MHC class II-restricted presentation of intracellular antigen. *Cell.* 64:767-776.
84. Weiss, S., B. Bogen.(1989). B lymphoma cells process and present their endogenous immunoglobulin to major histocompatibility complex-restricted T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:282-286.
85. Zagouras, P., Rose , K.. (1989). carboxy- terminal SEKDEL sequences retard but do not retain two secretory proteins in the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 109:2633-2640.
86. Ziegler, H.K., E.R. Unanue. (1982). Decrease in macrophage antigen catabolism caused by ammonia and chloroquine is associated with inhibition of antigen presentation to T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:175-178.
87. Munro, S., Pelham, H.R.B.(1987). A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* 48,899-907.
88. Kornfeld, S., Mellman, I.(1989). The biogenesis of lysosomes. *Annu. Rev. Cell Biol.* 5,483-525.
89. Dingwall, C., Sharnick, S.V., Laskey, R.A.(1982). A polypeptide domain that specifies migration of nucleoplasm into the nucleus. *Cell* 30,449-458.
90. Chen, W.J., Goldstein, J.L., Brown, M.S.(1990). NPXY, a sequence often found in cytoplasmic tails, is required for coated pit mediated internalization of the low density lipoprotein receptor. *J. Biol. Chem.* 263, 3116-3123.
91. Bennet, K., Levine, T., Ellis, J.S., Peanasky, R.J., Samloff, I.M., Kay, J., Chain, B.M. (1992). Antigen processing for presentation by class II major histocompatibility complex requires cleavage by cathepsin E. *Eur. J. Immunol.* 22, 1519-1524.
92. Letourner, F., Klausner, R.D. (1992). A novel Di-leucine motif and a tyrosine-based motif independently mediate lysosomal targeting and endocytosis of CD3 chains. *Cell.* 69, 1143-1157.

94. Nelson, C., Roof, R., McCourt, D., Unanue, E. (1992). Identification of the naturally processed form of hen egg white lysozyme bound to the murine major histocompatibility complex class II molecule I-A^K. 89,7380-7383.