

35

2ej



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

ENEP-IZTACALA

BIOLOGIA

**EVALUACION DE LA EFICIENCIA DE GENERACION
DE DISTINTOS DETERMINANTES ANTIGENICOS
A PARTIR DE FORMAS ENDOGENAS DE LA
PROTEINA LISOZIMA DE GALLINA (LG).**

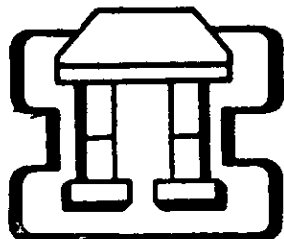
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

ALMA PATRICIA GARCIA HINOJOSA



IZTACALA

MEXICO, D. F.

ASESOR DE TESIS: DR. JOSE MORENO RODRIGUEZ

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

264727

1998.



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.

A SAUL

A MIS PADRES Y HERMANOS

**Por brindarme toda su confianza, amor y su apoyo y
por que gracias a ellos he podido lograr todo lo que soy.**

A mis amigos y compañeros por su amistad y paciencia.

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

Asesor: Dr. José Moreno Rodríguez

Quiero agradecer a :

Al Dr. José Moreno y a la M. en C. Laura Bonifaz por brindarme todos sus conocimientos y por haberme permitido colaborar en su laboratorio.

**EL IMPULSO PERMANENTE DEL SER HUMANO ES
BUSCAR EL ORDEN Y LA ARMONIA OCULTOS EN LO
HETEROGENEO Y CAMBIANTE DEL MUNDO VISIBLE.**

N.BOHR

INDICE

CAPITULO 1	<u>página</u>
LISTA DE ABREVIATURAS	5
CAPITULO 2	
RESUMEN	6
INTRODUCCION	8
CAPITULO 3	
ANTECEDENTES	
3.1 Moléculas del MHC.	11
3.2.- Estructura.	12
3.2.1.- Moléculas clase I.	12
3.2.2.- Moléculas clase II.	12
3.3.- Biosíntesis, ensamble y transporte	13
3.3.1.- Biosíntesis, ensamble y transporte para moléculas clase I.	13
3.3.2.- Biosíntesis, ensamble y transporte para moléculas clase II.	15
3.4.- Procesamiento de antígenos endógenos para ser presentado por moléculas clase II.	17
3.5.- Estudios de presentación de antígeno de LG endógena.	18
Figura1-Vía de procesamiento de antígeno para moléculas clase II.	22

CAPITULO 4**PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA** 23**HIPOTESIS** 24**OBJETIVOS** 25**CAPITULO 5****5.1.- Modelo experimental** 26**Figura 2- Modelos de CPAs transfectadas con la proteína de LG.** 27**CAPITULO 6****MATERIALES Y METODOS****Líneas celulares** 28**6.1.- Linfocitos B (CPA)** 29**6.2.- Tabla I-CPA.** 29**6.3.- Linfocitos T (Hibridomas)** 29**6.4.- Tabla II-Hibridomas de linfocitos T.** 30**6.5.- El receptor de IL-2** 30**6.6.- Reactivos** 31**6.7.- Metodología** 31**6.8.- Estudios de presentación de antígeno** 31**6.9.- Determinación de la producción de IL-2.** 32**6.10.- Incorporación de timidina.** 32

CAPITULO 7**RESULTADOS**

7.1.- Respuesta de presentación de LG exógena (LK-35.2).	34
Figura 3-Lisozima exógena.	35
7.2.- Presentación de antígenos endógenos de secreción (LK-HEL)	36
Figura 4- LK-HEL	37
7.3.- Presentación de un antígeno endógeno retenido en RE (LK-KDEL)	38
Figura 5- LK-KDEL	39
7.4.- Reconocimiento de diferentes determinantes antigenicos a partir de dos formas de lisozima de de endógena y lisozima exógena.	40
Figura 6- Respuesta de linfocitos T a dos formas lisozima endógena y exógena.	41
7.5.- Comparación final de la generación de distintos determinantes de LG a partir de dos formas endógenas comparadas entre si y comparadas con LG exógena.	42
Figura 7- Comparación final de linfocitos T endógenos y exógenos	43

CAPITULO 8

DISCUSIÓN	44
CAPITULO	
CONCLUSIONES	47
BIBLIOGRAFIA	48

LISTA DE ABREVIATURAS

CPA: Célula presentadora de antígeno

MHC: Complejo principal de histocompatibilidad

LG: Lisozima de gallina

RLT: Receptor de linfocitos T

RE: Retículo endoplásmico

B2M: Beta dos microglobulina

CLIP: Péptido de cadena invariante asociado a clase II

Ii: Cadena invariante asociada a las moléculas clase II del MHC

MIIC: Compartimento clase II

IL-2: Interleucina 2

LG(1-80)-Kk: Gen quimérico de LG con H-2Kk

TdR: Timidina

TGN Trans-Golgi

IFN α Interferon - α

RESUMEN

Los linfocitos T reconocen antígenos proteicos en forma de péptidos asociados a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) en la superficie de células presentadoras de antígenos (CPA).

Las moléculas clase I habitualmente captan péptidos derivados de proteínas endógenas (intracelulares) y son reconocidas por los linfocitos T CD8⁺, mientras que la función principal de las moléculas clase II es la presentación de antígenos derivados de proteínas exógenas que son internalizadas, transportadas a compartimientos endocíticos y presentados a linfocitos T CD4⁺. Sin embargo, un gran número de péptidos presentados por moléculas clase II provienen de proteínas endógenas propias de la células. Los mecanismos por los que un antígeno endógeno es presentado por moléculas clase II del MHC y las diferencias con los péptidos generados a partir del mismo antígeno de origen exógeno no están bien establecidas. En este trabajo de tesis, se realizaron estudios para determinar si, existen diferencias en el procesamiento de una proteína endógena (lisozima de gallina, LG) con dos localizaciones intracelulares distintas y se compararon con la misma proteína adicionada al medio (exógena). Se utilizaron células trasfectadas con genes que codifican la LG, una con señal

de retención en retículo endoplásmico (RE) y otra secretada. Con estas células se realizaron estudios de presentación de antígeno a un panel de linfocitos T específicos contra distintos péptidos de LG. Todos los determinantes fueron generados y presentados, independientemente de la localización intracelular de la LG, pero su eficiencia fue variable. Las mayores diferencias se observaron al comparar las formas endógenas con la forma exógena de LG. Los resultados sugieren que la vía presentación de antígenos endógenos por moléculas clase II difieren de la que siguen los antígenos exógenos.

INTRODUCCION

Tanto para la inducción de una respuesta inmune como para la tolerancia inmunológica se necesita del reconocimiento del antígeno por receptores específicos expresados en la superficie de los linfocitos B y T. En los linfocitos B el receptor es una forma transmembranal de inmunoglobulina, mientras que en los linfocitos T el receptor es un par de heterodímeros de 90 kD formado por una cadena α y una β unidas mediante un puente de disulfuro.¹ Y un segundo receptor son $\gamma\delta$, que al igual a $\alpha\beta$ ambos dependen de la coexpresión del complejo CD3 para llegar a la superficie celular.

Ambos receptores poseen dominios variables y constantes que surgen de procesos de recombinación genética semejantes. Sin embargo, las formas en que los linfocitos B y T reconocen antígeno son diferentes. El anticuerpo (linfocitos B) reconoce antígenos solubles o sobre la superficie celular pero casi siempre en su conformación nativa. Mientras que el RLT solo puede reconocer antígenos en forma de péptidos asociados a moléculas propias del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) en la superficie de una célula presentadora de antígenos (CPA).²

El RLT solo puede reconocer antígenos después de que estos han sido endocitados y procesados por una CPA.² El procesamiento de un antígeno consiste en la digestión intracelular parcial del antígeno (proteico) a péptidos y la unión de péptidos a estas moléculas del MHC. En la degradación de los antígenos participan diversas proteasas intracelulares.^{3,4}

Existen por lo menos dos vías de procesamiento de antígeno para su presentación por moléculas del complejo principal de histocompatibilidad que participan en la presentación de antígenos a los linfocitos T.(figura 1) Las moléculas clase I del MHC (HLA-A, B Y C en humanos y H-2K, D y L en el ratón), presentan péptidos a los linfocitos T CD8⁺ que son los principales mediadores de la citotoxicidad mediada por células⁵⁻⁸. En esta vía endógena los antígenos son sintetizados en el interior de la célula, como las proteínas virales y tumorales, pero también las proteínas propias endógenas de la célula. Estos antígenos son degradados en el citosol y son predominantemente presentados por moléculas clase I del MHC. Por otro lado, los péptidos unidos a las moléculas clase II del MHC (HLA-DR, DQ y DP en humanos) son reconocidos por los linfocitos T CD4⁺ responsable de las funciones inductoras de la respuesta inmune.^{5,6,10,11} Las moléculas clase II del ratón tienen características y funciones muy similares a sus

equivalentes humanas. El equivalente murino de HLA-DR es H-2E, mientras que DQ corresponde a H-2A.¹² La mayoría de los antígenos presentados por moléculas clase II del MHC se originan fuera de la célula, de donde son endocitados ó fagocitados para ser degradados en los lisosomas.⁶⁴ De acuerdo a lo anterior, existen por lo menos dos fuentes de antígenos que pueden estar localizados en diferentes sitios de la célula y para poder presentarse necesitan ser procesados a péptidos capaces de encontrarse y unirse a dos clase distintas de moléculas MHC: moléculas clase I y clase II ambos tipos de moléculas comparten algunas características estructurales⁸ pero sus procesos de ensamblaje y transporte intracelular, son distintos. Aún no están bien definidos los compartimentos intracelulares donde ocurre la degradación de los antígenos endógenos para la unión a moléculas clase II. En este trabajo de tesis se plantea un modelo experimental que permite evaluar las diferencias entre las presentación de antígenos endógenos y exógenos por moléculas clase II del MHC.^{64,65}

ANTECEDENTES

3.1 MOLECULAS DEL MHC

Las moléculas del MHC son glucoproteínas presentes en la membrana celular, codificadas en el cromosoma 6 en humanos y 17 en ratones.⁸

Existen dos clases de moléculas del MHC que participan en la presentación de antígeno a los linfocitos T, denominadas moléculas clases I y II. Las moléculas clase I se expresan en la mayoría de las células nucleadas, mientras que las moléculas clase II son predominante expresadas por linfocitos B, células dendríticas y macrófagos, además de muchas células epiteliales.¹³ Las moléculas del MHC se caracterizan por un gran polimorfismo.

3.2 ESTRUCTURA.

3.2.1 MHC CLASE I

Las moléculas clase I del MHC son glucoproteínas formadas por una cadena α de 44 KDa, constituida por tres dominios extracelulares, una región transmembranal y una cola intracitoplasmática corta. La cadena α se asocia de manera no covalente a una cadena de β 2- microglobulina (β 2M), de 12 Kda .⁸

3.2.2 MHC CLASE II

Las moléculas clase II del MHC son heterodímeros expresados en la superficie celular y están formados por una cadena, α de (32-34 kDa) asociada en forma no covalente a una cadena β (26-28 kDa).^{5,14} Ambas cadenas tienen dos dominios extracelulares, uno transmembranal y uno intracitoplásmico.^{15,16} En ratones existen dos isotipos de moléculas clase II; IA e IE. Estudios cristalográficos realizados con la molécula clase II humana HLA-DR1 indican que los dominios $\alpha 1$ y $\beta 1$ forman la hendidura de anclaje de los péptidos. A diferencia de las moléculas clase I, las moléculas clase II tienen una estructura más abierta en los extremos, permitiendo que los péptidos se unan a ellas en conformación extendida, proyectándose en los extremos, debido a lo cual, los péptidos que se unen a las moléculas clase II muestran una gran variabilidad en su tamaño que pueden variar de 13 a 26 residuos de aminoácido.¹⁷

3.3 Biosíntesis, Ensamble y Transporte

3.3.1 MHC clase I

Durante la biosíntesis, la cadena α de la molécula clase I, $\beta 2M$ y péptido son translocadas hacia el interior del RE,¹⁸ donde son ensambladas para formar un dímero. El ensamble correcto y la adquisición de una estructura terciaria de las moléculas clase I dependen de la presencia de un péptido capaz de unirse a ellas. Los péptidos que se unen a clase I tienen una longitud de 8-11 aminoácidos.^{19,20} Un gran número de antígenos sintetizados en el citosol son presentados por las moléculas clase I. Su procesamiento se lleva a cabo mediante un sistema multicatalítico conocido como proteasoma que contiene 28 subunidades, cada una de aproximadamente de 20-30 kDa. Los péptidos derivados de proteínas citoplásmicas son presentados por las moléculas clase I que se localizan en el interior del RE. Por lo tanto, es indispensable la presencia de un transportador que permita el paso de péptido del citosol al interior del RE, donde se une a la molécula MHC clase I. El transportador es un heterodímero compuesto por subunidades TAP1 y TAP2 que se expresan en la membrana del RE.²²⁻²⁴

3.3.2 MHC clase II

Las cadenas α y β de las moléculas clase II son sintetizadas en los ribosomas asociados al RE¹⁹ y son translocadas cotraduccionalmente al interior de éste, donde tres dímeros de cadenas α y β se asocian con un homotrímero de una tercera proteína conocida como la cadena invariante (Ii) para formar un nonámero.²⁵ La cadena Ii se expresa en forma constitutiva en CPA profesionales.²⁵ Esta molécula es una glucoproteína tipo II no polimorfa, codificada en el cromosoma 18 en el ratón y en el 5 en humano. El nonámero tiene la conformación que le permite salir del RE y viajar a través del aparato de Golgi hasta la red de trans-Golgi (TGN), de donde es desviado a endosomas tempranos.²⁶⁻²⁹ Las moléculas MHC clase II permanecen en la vía endocítica un mínimo de 4 horas antes de ser expresadas en la membrana celular.^{26,27} Entre otras funciones, la cadena Ii constituye una señal de tráfico que dirige a las moléculas clase II de la red de trans-Golgi hacia compartimientos de la vía endocítica.³⁰⁻³³ (fig.1)

Por estudios de microscopía electrónica se determinó que las moléculas clase II y la cadena Ii pueden detectarse en endosomas tempranos.^{19,29} Sin embargo, estudios posteriores demuestran que existen compartimientos en

la vía endocítica en los que las moléculas clase II son más abundantes.³³ Estos compartimientos son diferentes de los endosomas y de los lisosomas clásicos. En ciertas células es un compartimiento endosómico tardío, mientras que en otras temprano, a los cuales las moléculas clase II llegan en un tiempo variable después de su biosíntesis. El compartimiento tardío especializado se denomina MIIC (compartimiento clase II), mientras que en linfocitos B no hay un MIIC clásico, sino un compartimiento temprano conocido como CIIV (vesículas ricas en moléculas clase II).³³

Para que los péptidos se unan a las moléculas clase II, la cadena Ii se disocia del dímero clase II en forma gradual, lo cual ocurre al llegar a la vía endocítica. La participación de diferentes proteasas ácidas, en especial la catepsina S, libera al heterodímero clase II de la cadena Ii, después de lo cual, las moléculas clase II están en condiciones de unir péptidos. La catepsina S es una cistein-proteasa clonada de macrófagos y es abundantemente expresada en varias CPAs, incluyendo a los linfocitos B su expresión es inducida por el interferon- α (IFN).³⁴

El último péptido derivado de la cadena Ii que permanece unido al dímero clase II se denomina CLIP (péptido-Ii asociado a moléculas clase II), que corresponde a los aminoácidos 81-104 de la cadena Ii. El CLIP permanece unido a las moléculas clase II hasta el compartimiento MIIC (o CIIV), donde los péptidos ahí presentes son intercambiados por el CLIP.³⁵ Las moléculas clase II no clásicas HLA-DM en humanos y H-2M en ratón facilitan el intercambio del CLIP por péptidos antigenicos.³⁶⁻³⁸ Después de la unión del péptido, los dímeros clase II adquieren una estructura estable que les permite ser transportadas a la superficie celular.

Diversas proteasas participan en la generación de péptidos capaces de unirse a las moléculas clase II.³ Entre las mejor caracterizadas se encuentran las que tienen actividad de cistein proteasas como las catepsinas A, B, L y S.³⁹

3.4 Procesamiento de antígenos endógenos para ser presentados por moléculas clase II.

Los antígenos endógenos derivados de proteínas propias de la célula pueden dividirse en: proteínas citosólicas, proteínas mitocondriales y nucleares, proteínas de la vía exocítica las cuales pueden ser residentes de RE, Golgi y proteínas de membrana y de secreción. Es generalmente aceptado que las moléculas clase II presentan péptidos derivados de proteínas degradadas en compartimientos de la vía endocítica. ^(14,28,30,38-47) Esto ha sido interpretado erróneamente, en el sentido de que las moléculas clase II del MHC presentarían predominantemente o exclusivamente péptidos de proteínas exógenas. Sin embargo en estudios de elusión de péptidos naturalmente procesados, unidos a moléculas clase II humanas y murinas, se ha encontrado que los péptidos predominantes en ellas son de proteínas transmembranales ⁴⁸⁻⁵² especialmente moléculas relacionadas con el MHC (hasta un 50 %). Así sólo el 16% de los péptidos provienen de proteínas exógenas⁵². A lo anterior debe agregarse el hecho de que el 5% de los péptidos provienen de proteínas que normalmente no llegan a la vía endocítica⁵². La presentación de péptidos de proteínas endógenas por las moléculas clase II es de vital importancia en la génesis y prevención de los

fenómenos de autoinmunidad y las enfermedades autoinmunes. Es posible que una misma proteína con diferentes rutas de acceso a los sitios de procesamiento de antígeno genere repertorios distintos de péptidos. Los péptidos generados con la forma más habitual de la proteína serían los más frecuentes y los que mayor posibilidad de inducir tolerancia inmunológica tendrían, mientras que los péptidos derivados de otras formas podrían considerarse como determinantes crípticos y su aparición, en un momento dado, ante un sistema inmune normal, podrían dar como resultado la activación de linfocitos T autorreactivos y, consecuentemente, enfermedad autoinmune. Por lo tanto, es relevante el estudio de los mecanismos por los cuales una proteína endógena es presentada preferentemente sobre otra por las moléculas clase II.

3.5 Estudios de presentación de formas endógenas de LG.

Los modelos de presentación de antígeno de formas endógenas de lisozima de gallina (LG), ha sido de gran utilidad para conocer diversos aspectos relacionados con las vías de procesamiento de antígenos endógenos.^{44,53,54}

En estudios realizados por otros grupos, utilizando células B como CPA, se demostró que una forma soluble de LG, liberada al medio, sintetizada de manera endógena, se comporta igual que la LG exógena. Sin embargo, una

CPA que codifica una forma de LG con secuencia de retención en RE fue incapaz de generar el epitopo 112-124. Además, el uso de inhibidores de proteasas impide la generación de algunos epitopos pero no de otros.¹⁶ Esto sugiere distintos tipos de procesamiento para formas endógenas de un antígeno. En otros trabajos utilizando LG retenida en el RE se encontró inhibición de presentación de los epitopos evaluados, mediante cloroquina.⁴⁴ Lo anterior indica la participación de compartimientos ácidos en el procesamiento del LG-KDEL. Sin embargo, trabajos realizados por nuestro grupo realizan estudios en CPA que expresan LG sintetizada de manera endógena, demostrando que ciertos epitopos inhibidos con cloroquina pudieron ser presentados aun en presencia de la cloroquina. Sin embargo todos los epitopos fueron sensibles a Brefeldina A sin embargo la presencia de monensina no determino inhibición alguna para algunos determinantes.

En estudios realizados por nuestro grupo se utilizaron diferentes CPA que expresa diferentes formas de LG sintetizadas de manera endógena LK-LG-TM, LK-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 pueden variar.⁵⁴

Diversos estudios han demostrado que el procesamiento de antígenos exógenos para ser presentados por moléculas clase II es un proceso complejo y con gran variabilidad que depende, tanto de las características de la molécula clase II estudiada, como de la proteína antigénica.^{16,19,55} Así, no todos los alelos clase II tienen los mismos requerimientos para unir péptidos o para adquirir una estructura estable.^{16,19} Además, parece haber diferencias en los sitios de procesamiento de distintos antígenos.

La mayoría de los estudios acerca del procesamiento de antígenos para ser presentados por moléculas clase II han sido realizados con antígenos exógenos. La función de estas moléculas es la presentación de antígenos que llegan a la vía endocítica y, dentro de los antígenos no propios la mayoría son exógenos a la célula, salvo excepciones como los antígenos virales.⁵⁶ Sin embargo, en diversos estudios se ha encontrado que los péptidos naturalmente procesados eluidos de moléculas clase II, más del 80% corresponden a proteínas endógenas.⁵⁷ La mayoría de ellas son proteínas que ingresan al RE, ya sean transmembranales, de secreción o retenidas en el RE.⁵⁸ Debido a ello, consideramos de importancia llevar a cabo el presente estudio.

En estudios previos realizados con diversos antígenos endógenos, se ha demostrado que muchos de ellos pueden ser presentados por moléculas

clase II con eficiencia variable . Así, mientras la presentación de péptidos derivados de proteínas citosólicas por moléculas clase II es excepcional,^{19,59} prácticamente cualquier proteína transmembranal o secretoria puede ser presentada por éstas, lo cual no es sorprendente, ya que dichas proteínas, en un momento dado llegan a la vía endocítica. Sin embargo, es notable el hecho de que algunas proteínas con la señal de retención KDEL, característica de las proteínas residentes del RE,⁶⁰ también son presentadas con gran eficiencia por las moléculas clase II. Aunque en un estudio se encontró que la presentación de proteínas con la señal de retención KDEL es sensible a cloroquina⁵⁹; no se ha determinado el sitio exacto de procesamiento de dichas proteínas.

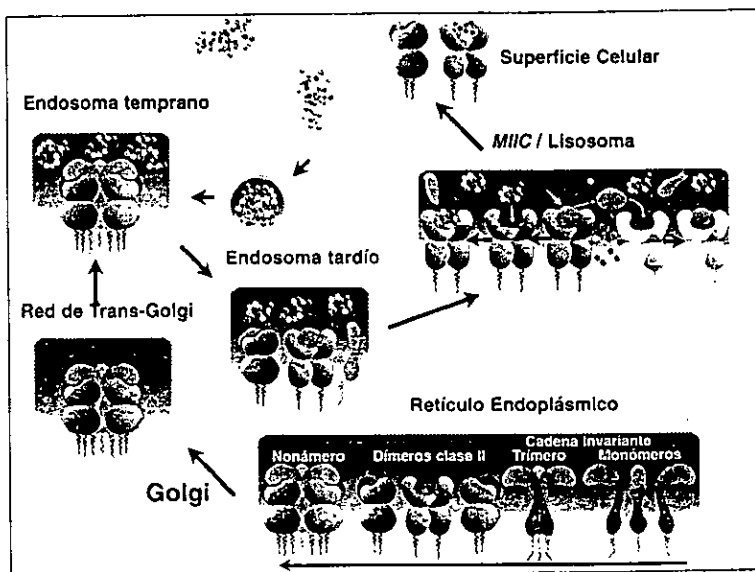


Figura 1. Esquema de las vías de procesamiento de antígeno para presentación por moléculas clase II (ver texto).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Las moléculas clase II del MHC presentan los diferentes determinantes antigenicos derivados de proteínas endógenas y exógenas con la misma eficiencia?

HIPOTESIS

1. Existen diferencias en la eficiencia de presentación de los péptidos generados a partir de formas endógenas de una proteína comparadas con la misma proteína de origen exógeno.

OBJETIVO

1.-Evaluar las diferencias en los péptidos generados a partir de una proteína con distintas localizaciones intracelulares, comparada con la misma proteína de origen exógeno.

MODELO EXPERIMENTAL.

El antígeno utilizado fue LG, que tiene gran capacidad inmunogénica en ratones H-2k. La CPA fue el hibridoma B LK-35.2.⁶¹ Se utilizaron diferentes transfectantes de células LK-35.2 con el objeto de contar con diferentes formas endógenas de una misma proteína (tabla 1). Se realizaron experimentos de presentación de antígeno con las diferentes CPA y se compararon siempre con la presentación de LG exógena presentada por células LK-35.2 sin transfectar.

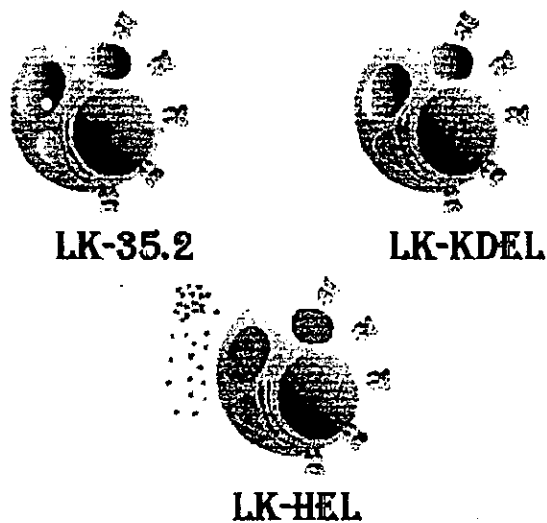


Figura 2. Representación esquemática de la localización intracelular de las distintas formas de LG en CPA utilizadas en este trabajo.

Linfoma de B LK35.2, lisozima de secreción LKHEL, lisozima con señal de retención en RE.

MATERIALES Y METODOS.

Lineas Celulares

6.1 Linfocitos B (CPA).

Como CPA (Tabla I) se utilizó el hibridoma murino LK-35.2 (H-2^{kd})^{59,62} de la American Type Culture Collection (ATCC), que es derivado de la fusión somática de una sublinea de A20 (derivada de ratones Balb/c, H-2^d) con esplenocitos de ratones B10.BR (H-2^k). Se utilizaron además células LK-35.2 transfectadas con diferentes formas de LG. La línea LKHEL que está transfectada con un plásmido que contiene el DNA complementario (cDNA) de LG soluble (secretoria) y la línea LK-KDEL que está transfectada con un plásmido que contiene el cDNA de LG que en el extremo 5' (carboxilo terminal) a nucleotidos que codifican para el tetrapeptido KDEL (lys-asp-glu-leu), (Frank Momburg, Adorini et al 1993) que aportan para su retención en el RE. Ambos fueron donados por (Frank Momburg). Los dos plásmidos tienen el promotor β -actina humana, lo cual les confiere expresión constitutiva y ubicua .

6.2 Tabla I. Células Presentadoras de Antígeno.

Linea celular	MHC clase II	Características
LK35.2	I-A ^k	Linfoma de B.
LKHEL	I-A ^k	Lisozima de secreción
LK-KDEL	I-A ^k	Lisozima con señal de retención en RE.

6.3 Linfocitos T (Hibridomas). Se utilizaron los siguientes hibridomas de linfocitos T específicos para diferentes péptidos de LG (ver tabla II): C10, A6B3 (Ambos obsequio de la de la Dra. Laurie Glimcher, Harvard), 2B6.3 (del Dr. Luciano Adorini), donde C10, IC5.1, A22B.2, 4G4.1, 3A9.A, responde al péptido 46-61, A6B3 al péptido 34-45, 2B6.3 al péptido 25-43, 2D4.1 al péptido 112-124, E.907D al péptido Δ 1-80 (Moreno et. al., 1990) asociados a la molécula clase II murina IA^k; 4C1.6 al péptido 108-116, 2G7.1 al péptido (1-18 IEk).

6.4 Tabla II. Hibridomas de Linfocitos T.

Línea celular .	Restricción	Especificidad	Referencia.
C10	A ^K	LG 46-61	Allen et.al 1985
IC5.1	A ^K	LG 46-61	Adorini 1993
A2.2B2	A ^K	LG 46-61	Allen y Unanue,1998
4G4.1	A ^K	LG 46-61	Allen et.al 1985
3A9.A	A ^K	LG 46-61	Allen y Unanue,1998
A6.B3	A ^K	LG 34-45	Adorini 1993
2B6.3	A ^K	LG 25-43	Adorini 1993
2D4.1	A ^K	LG 112-124	Adorini 1993
E.907D	A ^K	LG Δ1-80	Moreno et al,1990
4C1.6	E ^K	LG 108-116	Adorini 1993
2G7.1	E ^K	LG 1-18	Adorini 1993

El receptor de IL-2

La IL-2 es una citocina derivada de LT y participa en la regulación del crecimiento y la diferenciación de una variedad de células que expresan el receptor de IL-2 (IL-2R), tales como LT, LB y macrófagos. Las células CTLL-2 Dependientes de IL-2. Son derivados de la cepa C57BL/6 (H-2b), dependientes de IL-2.

6.6 Reactivos.

La LG utilizada fue de Sigma Chemical Company. El medio de cultivo: RPMI 1640 (GIBCO), suplementado con suero fetal bovino descomplementado, con 2-mercapto-etanol 10^{-5} M, Heps 25mM, glutamina 2mM, piruvato de sodio, aminoácidos no esenciales, gentamicina 50 μ g/ml, anfotericina B 2.5 μ g/ml. Solución balanceada de fosfatos (PBS), a pH 7.4. Marca radiactiva timidina tritiada (3 H-TdR) de marca Amersham.

6.7 Metodología.

6.8 Estudios de presentación de antígeno.

Estos ensayos consistieron en poner en contacto la CPA en los diferentes hibridomas de LT en la que se cultivaron 5×10^4 células de hibridoma T con 2.5×10^4 CPA (LK-35.2), en placas de 96 pozos en un volumen final de 200 μ l, de RPMI suplementado con SFB al 10%. Las células fueron contadas en una cámara de Neubauer. Para poder contar exclusivamente las células vivas se utilizó el colorante azul de tripano el cual tiñe las células muertas (dilución 1:10). Una vez cosechadas las CPA y hibridomas se incubaron durante 24h a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% y 95% de humedad, en presencia de diferentes concentraciones de antígeno (0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000 μ g/ml) esto fue para CPA LK-35.2. Se hizo

lo mismo utilizando como CPA LK-KDEL y LK-HEL con un número progresivo de células (387-100,000) por pozo sólo que a estas líneas celulares se les omitió las concentraciones del antígeno .

6.9 Determinación de la producción de IL-2.

La eficacia de la presentación de antígeno se evaluó por medio de la cuantificación de IL-2 ésta es liberada por el LT al activarse por la interacción de su TCR con las moléculas del MHC con el péptido unido.

Para medir la cantidad de IL-2 secretada se utilizan, 100µl del sobrenadante del ensayo de presentación de antígeno y las células dependientes de IL-2 (CTLL-2), por lo tanto la actividad metabólica será proporcional a la cantidad de IL-2 y esta a su vez será proporcional al grado de activación del LT durante el ensayo de presentación de antígeno. La actividad metabólica se evaluó por la incorporación de ³ H-timidina .

6.10 Incorporación de timidina.

Para realizar esta técnica se recolectaron 100µl del sobrenadante de las placas de cultivo en donde se realizó el ensayo de presentación de antígeno. Las CTLL-2 se cosecharon, se resuspendieron en PBS y se lavaron tres veces con la misma solución. Después del último lavado se resuspendieron

en RPMI-1640 suplementado y se contaron las células en la cámara de Neubauer utilizando azul tripano. Después de esto se colocaron 10,000 células por cada 100 μ l de sobrenadante ajustando el volumen final a 200 μ l ,los cuales se incubaron 20h a 37°C. Después de esto se añadieron 20 μ l de ³H-timidina (1 μ Ci) y se incubó 10 horas bajo las mismas condiciones. Posteriormente las placas fueron cosechadas en un cosechador semiautomático y medidas en cuentas por minuto (c.p.m) en un contador de centelleo.

RESULTADOS

7.1 Respuesta de presentación de LG Exógena LK-35.2 .

Inicialmente se determino la capacidad de presentación de la CPA con respecto a los hibridomas dentro de este estudio se utilizó como CPA LK-35.2 para presentar concentraciones variables de LG, a los hibridomas 3.A9, 4C1.6, E.907D, 2D4.1, A6.B3, A2.2B2, 1C5.1 ó C10. Como puede verse en la figura 3 los hibridomas más sensibles son 3A9 (48-62), A6B3 (34-65) y A2.2B2 (46-61) que responde a $1\mu\text{g/ml}$. A continuación se encuentra E.907D ($\Delta 1-80$), 2D4.1 (114-126), C10 (48-62) y que responde a $3-10\mu\text{g/ml}$. Finalmente, dos hibridomas 1C5.1 (48-62) y 4C1.6 (118-129 [IE^k]) requiere de 30 a $100\mu\text{g/ml}$. Esto indica que la sensibilidad es independiente de los determinantes antigenico.

Liozima Exógena

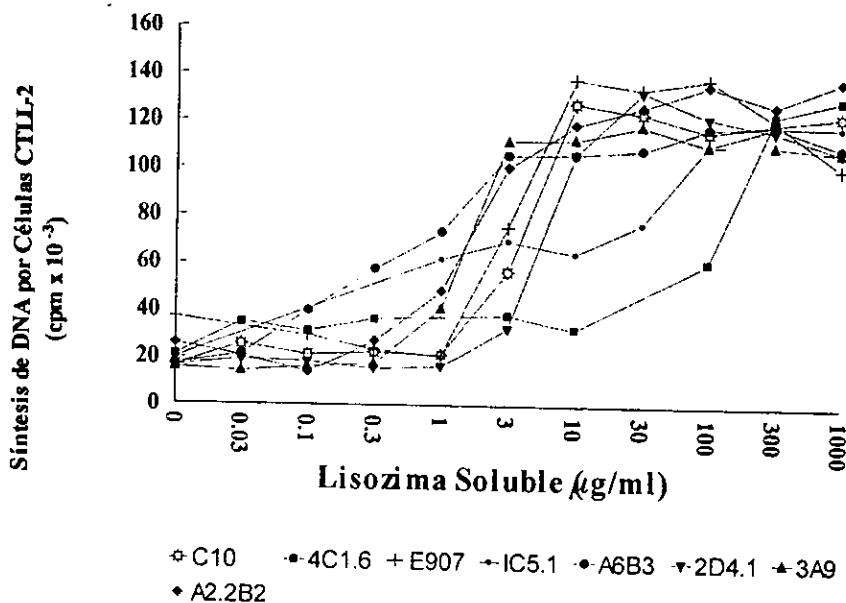


Figura 3.- Respuesta de ocho hibridomas de linfocitos T específicos, contra LG exógena. Se cultivaron 5×10^4 células de hibridomas T con 2.5×10^4 células presentadoras de antígeno (LK35.2) en placas de 96 pozos en un volumen final de $200 \mu\text{l}$, en presencia de las concentraciones de LG indicadas en cada línea. Después de 24 horas se colectaron $100 \mu\text{l}$, de sobrenadante, los cuales se cultivaron 20 horas con células dependientes de IL-2, CTLL-2. Durante las últimas 10 horas se agregó $1 \mu\text{Ci}$ de $^3\text{H-TdR}$ por pozo, después, las placas fueron cosechadas en un cosechador semiautomático y medidas en un contador de centelleo. Los resultados son expresados en cuentas por minuto $\times 10^{-3}$.

7.2 Presentación de Antígeno Endógeno de secreción (LK-HEL).

A continuación se probó la capacidad de las células LK-HEL (LG de secreción) de generar los determinantes reconocidos por los distintos hibridomas. Para esto se cultivaron números progresivos de células LK-HEL con hibridomas. Como puede verse en la figura 4, la sensibilidad de los hibridomas es C10=E.907D=A6B3=1C5.1 > 4G4.1=2G7.1=A2.2B2 > 2D4.1=4C1.6. Estos resultados indican que el procesamiento de LG endógena, aún siendo de secreción, difiere de la LG exógena.

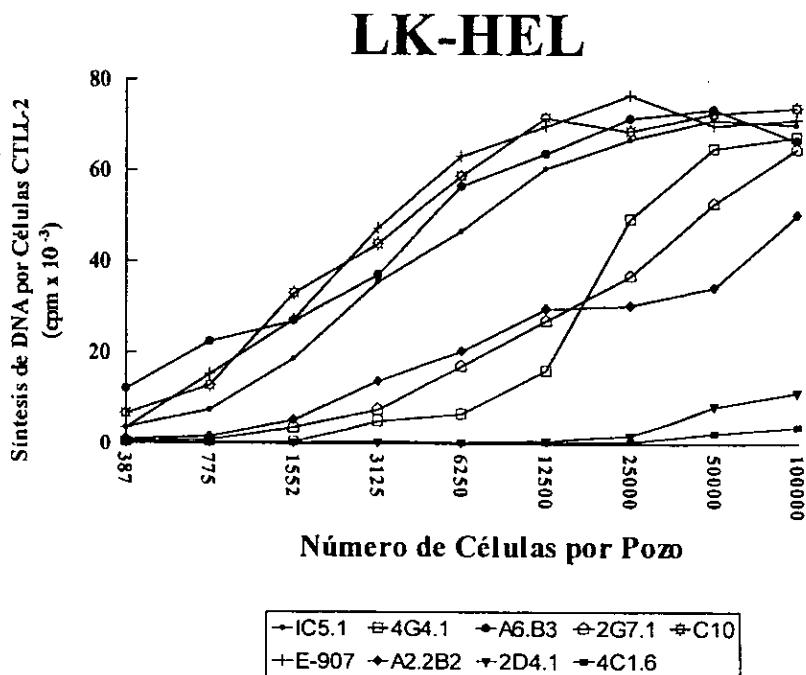


Figura 4.- Respuesta de nueve hibridomas T a LG endógena LK-HEL. Se cultivaron en placas de cultivo de 96 pozos, colocando 5×10^4 células de hibridomas de linfocitos T con un número progresivo de LK-HEL, en un volumen de $200 \mu\text{l}$. Los cultivos se realizaron en ausencia de antígeno exógeno. Después de 24 horas en cultivo, se tomaron $100 \mu\text{l}$ de sobrenadante, los cuales se pasaron a una nueva placa de cultivo con 10^4 células CTLL-2 en un volumen total de $200 \mu\text{l}$. Después de 20 horas se agregó $1 \mu\text{Ci}$ de $^3\text{H-TdR}$ y las células fueron cultivadas durante 10 horas, fueron cosechadas y contadas mediante un contador de centelleo. Los resultados son expresan en cuentas por minuto $\times 10^{-3}$

Presentación de un Antígeno Endógeno retenido en RE (LK-KDEL).

A continuación se probó la capacidad de las células LK-KDEL (con señal de retención en RE) de generar determinantes reconocido por los distintos hibridomas. Para esto se cultivaron un número progresivo de células LK-KDEL con hibridomas. Como puede verse en la figura 5, la sensibilidad de los hibridomas es C10=A6.B3=1C5.1 >4G4.1=E.907D=A2.2B2=2G7.1 >4C1.6=2D4.1. Los resultados de las dos formas de LG endógena, independientemente de su localización intracelular son procesadas en forma similar, pero diferente de la LG exógena.

LK-KDEL

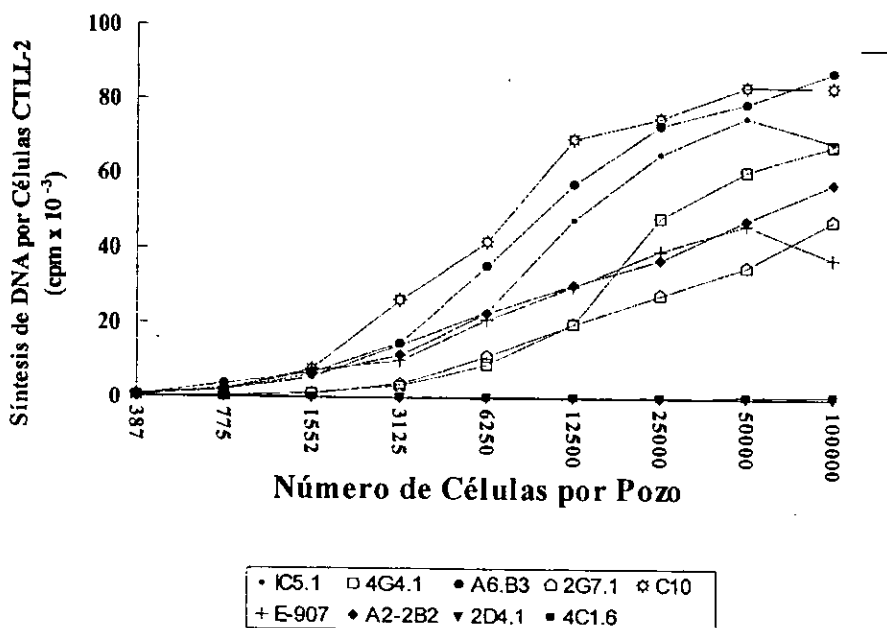


Figura 5- Respuesta de nueve hibridomas T contra a LG endógena LK-KDEL. Se cultivaron 5×10^4 células de hibridomas de linfocitos T con el número progresivo de LK-KDEL, en microplacas de 96 pozos, en un volumen de 200 μ l. Los cultivos se realizaron en ausencia de antígeno exógeno. Después de 24 horas en cultivo, se tomaron 100 μ l de sobrenadante, los cuales se pasaron a una placa de cultivo con 10,000 células CTLL-2 en un volumen final de 200 μ l. A las 20 horas se agregó 1 μ Ci de 3 H-TdR por 10 horas más y los resultados son expresados cpm.

7.4 Reconocimiento de diferentes determinantes antigenicos a partir de dos formas de lisozima endógena y lisozima exógena.

Para definir si la LG exógena y las dos formas de LG endógena generan los mismos determinantes, se realizaron experimentos similares a los descritos pero en forma simultanea comparando las dos formas de LG endógena con la LG exógena. En la figura 6 puede verse que los hibridomas E.907D (Δ 1-80), A6.B3 (34-45) y 2B6.3 (25-46), responden igual a LG endógena y LG exógena. Sin embargo C10 (48-62) responde mejor a la endógena, mientras 2D4.1 (114-128) responde solamente a la LG exógena y paralelamente a LK-HEL. Lo anterior confirma que los endógenos son procesados en una forma similar y de diferente manera es procesada la LG exogena.

Respuesta de linfocitos T a dos formas de lisozima endógena y a lisozima exógena

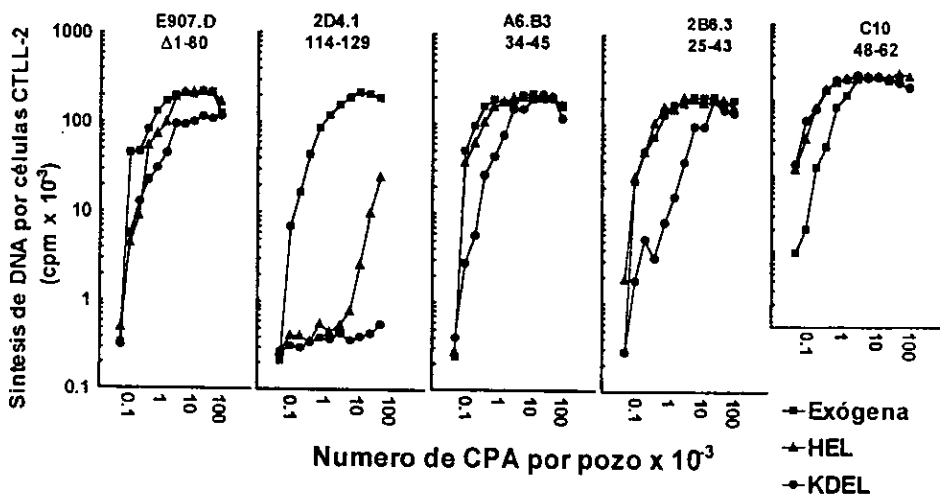


Figura 6- Se realizaron ensayos de presentación de antígeno utilizando 5×10^4 de hibridomas T y un número progresivo de la CPA (LK-KDEL, LK-HEL y LK35.2) de 0.01 a 1000 células por pozo. Para LG exógena se utilizó una concentración de 0.3 $\mu\text{g/ml}$ del antígeno con un volumen de 200 μl . Los resultados son expresados en síntesis de DNA por células CTLL-2 ($\text{cpm} \times 10^3$).

7.5 Comparación final de la generación de distintos determinantes de LG a partir de dos formas endógenas comparadas entre si y comparadas con LG exógena.

Finalmente, para establecer posibles diferencias en la generación de péptidos entre las dos formas endógenas y LG exógena se promediaron los resultados de tres experimentos independientes de presentación de LG exógena, LG-HEL y LG-DEL y se graficaron de acuerdo a su capacidad de inducir respuesta para cada hibridoma. Para esto se tomo el número de CPA y de indujo el 50% del optimo de respuesta para cada hibridoma; divididos entre el máximo de respuesta para dichos hibridomas y convertidos a valores inversos. En la figura 5 puede verse que las dos formas de endógenas la posibilidad en cuanto a la inducción de respuesta para los hibridomas estudiados, mientras LG exógena graficada contra cada una de las formas endógenas muestra una distribución totalmente descartada. Lo anterior demuestra que las dos formas endógenas son procesadas en compartimientos similares pero ambos se dividen del procesamiento de la LG exógena

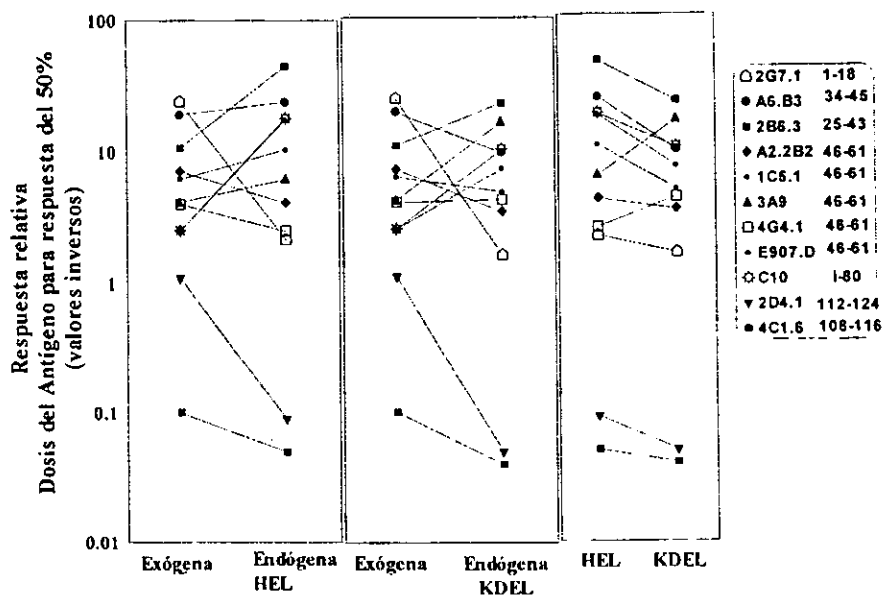


Figura 7- Resumen de los resultados de presentación de AG. Se realizaron ensayos de presentación de antígeno utilizando 5×10^4 de hibridomas T y un número progresivo de CPA (LK-KDEL Y LK-HEL) para LK35.2 fueron 2.5×10^4 , los resultados, se expresan como la respuesta relativa de la dosis del antígeno para 50% de respuesta óptima /cpm (valores inversos). Estos resultados son el promedio de tres experimentos consecutivos realizados con los dos tipos de lisozima endógena y LG exógena.

DISCUSION.

Estos estudios se llevaron acabo con el fin de desarrollar un modelo experimental que permitiera determinar posibles diferencias en la presentación, por moléculas clase II, de un antígeno exógeno, comparado con formas endógenas del mismo antígeno. Se utilizaron CPA que expresan la misma cantidad de LG sintetizadas de manera endógena; LK-KDEL, que se expresa de forma retenida en el RE y LK-HEL, que expresa una forma de secreción. En la primera parte de este trabajo se determinaron las diferencias entre distintas CPA para estimular once diferentes hibridomas de células T y se comparó con la estimulación de los mismos hibridomas en respuesta a LG exógena.

Los principales hallazgos derivados de este trabajo son: 1) Todos los epitopos estudiados fueron generados a partir de LG endógena pero con eficiencia variables. 2) Existen diferencias entre los péptidos derivados de las dos formas endógenas de una misma proteína, la cual sugiere que posiblemente presente diferentes sitios de procesamiento.

Diversos estudios han demostrado que el procesamiento de antígenos exógenos, para su presentación por moléculas clase II, es un proceso complejo y con gran variabilidad que depende, de las características de la molécula clase II, como de la proteína antigénica estudiada.

Los resultados presentados en esta tesis demuestran la sensibilidad de los linfocitos T e independiente del determinante antigénico. Todos los péptidos se presentan con diferente eficiencia como se muestra en la figura 3. En el caso de LG de secreción reconoció distintos determinantes antigénicos, determinando que la más sensible fue C10=E.907D=A6.B3=1C5.1 > 4G4.1=2G7.1= 2.2B2 y los que no presentan sensibilidad alguna son 2D4.1=4C1.6 . Trabajos realizados por Bonifaz. L. et.al y Brooks et.al demostraron que no todos los péptidos derivados de antígenos endógenos son presentados con la misma eficiencia. Aunque las proteínas de secreción son liberadas al medio para posteriormente seguir la vía de endocitosis clásica, la LG de secreción, tienen diferentes requerimientos de procesamiento cuando son comparados con formas exógenas de la misma proteína. Una posible explicación de estas diferencias sería si los péptidos derivados de estas proteínas fueran presentados por moléculas clase II recicladas. La capacidad de LK-KDEL (con señal de retención en el RE) de generar determinantes reconocidos por diferente hibridomas, donde la sensibilidad es similar a la de LK-HEL (figura 5). Una posible explicación para las diferencias entre el procesamiento de formas endógenas y exógenas de la misma proteína, es la generación y unión de péptidos a moléculas clase II pueden presentar distintos patrones

de péptidos. Es posible que estas diferencias se deban a su localización intracelular ya que ambas formas de lisozima pudieron degradarse en distintos sitios de la célula y así generar diferentes perfiles de péptidos.⁵⁴

Los resultados que comparan las dos formas endógenas con la exógena, demuestran que las endógenas son procesadas en una forma similar, siendo el hibridoma C10 (48-62), responde mejor mientras que para exógenas es 2D4.1 (114-129). Las posibles diferencias en la generación de péptidos entre la forma exógena y el hecho que contra cada una de las formas endógenas estimulan preferentemente a los hibridomas que reconocen un péptido u otro es indicativo de que las diferencias observadas no reflejan una menor tasa sintética de la proteína en estudio por la CPA correspondiente. Así, al igual que como ha sido demostrado para los antígenos exógenos, hay variabilidad en los requerimientos para la generación de péptidos inmunogénicos a partir de LG endógena. Estos resultados sugieren que la vía de presentación de antígenos endógenos por moléculas clase II difieren de la que siguen los antígenos exógenos.

CONCLUSIONES

1.-Todos los epitopos estudiados fueron generados a partir de LG endógena y exógena pero con eficiencia variable.

2.-Se encontraron diferencias en la generación de péptidos derivados de formas endógenas comparando con LG exógena.

BIBLIOGRAFIA

- 1.-Davis, M.M., Bjorkman, P.J. (1998). T-Cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature*. 334.395-402.
- 2.-Unanue, E.R. (1994). Antigen presenting function of the macrophage. *Ann.Rev. Immunol.*2,395-428.
- 3.-Dimet, S., Sthal, P., (1985) Macrophage endosomes contain proteases which degrade endocytosed protein ligands. *J.Biol.Chem.* 260, 15311-15317.
- 4.- Hershko,A., Ciechanover, A.(1992). The ubiquitin system for protein degradation *Rev Biochem.*61, 761-807.
- 5.-Harding, C.V., Collins, D.S., Slot, J. W., Geuze, H.J., y Unanue, E.E., (1991). Liposome-encapsulated antigens are processed in lysosomes, recycled, and presented, to T cell. *Cell* 64 393-401.
- 6.- Germain, R. N.. (1986). The ins and outs of antigen processing and presentation. *Nature* 322, 687-689.

- 7.- Salter, R. D., Benjamin, R. J., Wesley, P. K., Buxton, S. E., Garrett T., Clayberger, C., Krensky, A. M., Norment, A. M., Litman, D. R., and Parham, P.. (1990). A binding site for the T cell co-receptor CD8 on the a domain of HLA-A2. *Nature*. 345, 1-46
- 8.- Flavell, R. A., Allen, H., Burkly, L. C., Sherman, D. H., Waneck G. L., y Widera, G.. (1986) *Molecular Biology of the H-2 histocompatibility complex*. *Science* 233, 437-443.
- 9.-Michalek, MT., Granr, EP., Gramm,C., Golberg, AL., Rock, KL.,(1993). A role for ubiquitin-dependently proteolytic pathway in MHC class-I-restricted antigen presentation. *Nature* 363, 552-554.
- 10.- Urban, R. G., Chicz, R M., Vignali, D. A. A., y Strominger, J. L.. (1993) The dichotomy of peptide presentation by class I and class II MHC proteins. En *Chemical Immunology*, Editado por Adorini, L., Arai, K., y Fitch, F. W.. Ishizaka, K., Lachmann, P. J., y Waksman, B. H.. S. Kager, Basilea, 1993 pp 197-234.
- 11.- Vignali, D. A. A., Moreno, J., Schiller, D., y Hammerling, G. J.. (1992). Species-specific binding of CD4 to the β 2 domain of Major Histocompatibility complex class II molecules. *J. Exp. Med.* 175, 925-932.

- 12.- Bjorkman, P.J., Burmeister, W.P.(1994) Structures of two class of MHC molecules elucidated: crucial differences and similarities. *Current Opinion in Structural Biology*. 4, 852-856.
- 13.- Knight S.C., & Stagg A.J.1993. Antigen-presenting cell types. *Curr Opin Immunol*.5:374-382.
- 14.- Hammerling, G. J. y Moreno, J.. (1990). The function of the invariant chain in antigen presentation by MHC class II molecules. *Immunology Today* 11, 337-340
- 15.- Brown, J., Jardetzky, T., Gorga, J. C., Stern, I. J.; Urban, R. G., Strominger, J. L., y Wiley, D. C. (1993). Three dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* 332, 845-850.
- 16.- Kaufman, J.F., Auffray C., Korman A.J., Shakelford D.A. and Strominger J., (1984). The class II molecules of the human and murine histocompatibility complex. *Cell* 36,1-12
- 17.- Vignali, D. A. A., y Strominger, J. L., (1994). Coreceptor function and the characteristics of MHC-bound peptides. A common link? *The Immunologist* 2, 112-118.

- 18.- Williams, DB., Boriello, F., Zeff, RA., Nathenson, SG.(1988). Intracellular transport of class I Histocompatibility molecules. *J.Biol Chem.* 263, 45498-4560.
- 19.- Germain, R. N..(1993). The biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation. *Ann Rev Immunol.* 11, 403-450.
- 20.- Rammensee, H.G (1995) .Chemistry of peptides associated with MHC class I and class II molecules. *Curr. Opin. Immunol.*7:85.
- 21.- Degen, E., Williams. (1991). Participation of a novel 88-kD protein in the biogenesis of murine class I histocompatibility molecules. *J Cell Biol.* 112, 1099-1115.
- 22.- Deverson, E.V., Grow, I, R., Coadwell, w,J., Monaco, J, J., Butcher, G, W ., Howard, J, C., (1990). MHC class II region encoding proteins related to the multidrug resistance family of transmembrane transporters. *nature.* 348, 738-741.
- 23.- Kleijmerr, M, J., Kelly, A., Geuze, H, J., Slot, J, E., Townsed, A., Trowsdale, J., (1992) . Location of MHC-encoded transporters in the endoplasmic reticulum and cis-golgi. *Nature.* 357, 342-344.
- 24.- Trowsdale, J., Hanson, I., Mockridge, I., Beck, S., Townsend, A., Kelly, A., (1990). Sequences encoded in the class II of the MHC related to the ABC superfamily of transporters. *Nature.* 348,741-744.

- 25.- Roche, P. A., Marks, M. S., y Cresswell, P.. (1991). Formation of nine-subunit complex by HLA class II glycoproteins and the invariant chain. *Nature* 354, 392-394.
- 26.- Neefjes J. J., Stollorz, V., Peters, P. J., Geuze, H. J., y Ploegh, H. L. (1990). The biosynthetic pathway of MHC class II but not class I molecules intersects the endocytic route. *Cell* 61, 171-183.
- 27.- Peters, P. J., Neefjes, J.J., Oorschot, V., Ploegh, H. L., and Geuze, H.J.. (1991). Segregation of MHC class II molecules from MHC class I molecules in the Golgi complex for transport to lysosomal compartments. *Nature*. 349, 669-676.
- 28.- Cresswell, P. (1994). Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 12, 259-293.
- 29.- Romagnoli, P., Layet, C., Yewdell, J., Bakke, O., y Germain, R. N.. (1993). Relationship between invariant chain expression and major histocompatibility complex class II transport into early and late endocytic compartments. *J. Exp. Med.* 177, 583-596.
- 30.-Guagliardi, L E., Koppolman, B., Blum, J. S., Marks., Cresswell, P., y Brodsky, F. M., (1990). Co-localization of molecules involved in antigen

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

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

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

33.- Amigorena, S., Drake J. R., Webster, P., y Mellman, I. (1994). Transient accumulation of new class II MHC molecules in a novel endocytic compartment in B lymphocytes. *Nature* 369, 63-66.

34.- Riese RJ., Wolf PR., Bromme D.. (1996). Essential role for cathepsin S in MHC class II-associated invariant chain processing and peptide loading. *Immunity* 4:357-66.

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

36.- Denzin, L K., Cresswell, P. (1995). HLA-DM induce CLIP dissociation from MHC class II alpha beta dimers and facilitates peptide loading. *Cell* 62, 155-165.

37.- Sloan, V. S., Cameron, P., Porter, G., Gammon, M., Amaya, M., Mellins, E., Zaller, D. M. (1995). Mediation by HLA-DM and HLA-DMB. *The Journal of Biological Chemistry* 269, 18834-18838.

38.- Jensen, P. E. (1992). Long-lived complexes between peptide and class II major histocompatibility complex are formed at low pH with no requirement for pH neutralization. *J. Exp. Med.* 176, 793-798.

39.- Takahashi, H., Cease, K. B., y Berzofsky, J. (1989). Identification of proteases that process distinct epitopes on the same protein. *J. Immunol.* 142, 2221-2229.

40.- Pieters, J., Bakke, O., y Dobberstein, B. (1993). The MHC class II-associated invariant chain contains two endosomal targeting signals within its cytoplasmic tail. *J. Cell. Sci.* 106, 831-846.

41.- Harding, C. V., y Geuze, H. J. (1993). Immunogenic peptides bind to class II MHC molecules in an early lysosomal compartment. *J. Immunol.* 151, 3988-3998

42.- Ziegler, H. K., y Unanue, E. R.. (1982). Decrease in macrophage antigen catabolism caused by ammonia and chloroquine is associated with inhibition of antigen presentation to T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 175-178.

43.- Adorini, L., Guéry, J., Fuchs, S., Ortiz, V., Hammerling, G. J., and Momburg, F.. (1993). Processing of endogenously synthesized hen egg-white lysozyme retained in the endoplasmic reticulum or in secretory form gives rise to a similar but not identical set of epitopes recognized by class II restricted T cells. *J Immunol* 151, 3576-3586.

44.- Brooks, A. G., y McCluskey, J.. (1993). Class II-restricted presentation of a hen egg lysozyme determinant derived from endogenous antigen sequestered in the cytoplasm or endoplasmic reticulum of the antigen presenting cells. *J. Immunol.* 150, 3690-3697.

45.- Davidson, H. W., Reid, P. A., Lanzavecchia, A., y Watts, C.. (1991). Processed antigen binds to newly synthesized MHC class II molecules in antigen-specific B lymphocytes. *Cell* 67, 105-116.

46.- Eisenlohr, L. C., Gerhard, W., y Hackett, C. J.. (1988). Individual class II-restricted antigenic determinants of the same protein exhibit distinct

kinetics of appearance and persistence on antigen-presenting cells. *J. Immunol.* 141, 2581-2584.

47.- Hackett, C. J., Yewdell, J. W., Bennink, J. R., y 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.

48.- Nelson, C. A., Roof, R. W., Mc Court, D. W., y Unanue, E. E. (1992). Identification of the naturally processed form of hen egg white lysozyme bound to the murine major histocompatibility complex molecule I-A^k. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 7380-7383

49.- Chicz, R.M., Urban, R. G., Gorga, J. C., Vignali, D. A. A., Lane, W. S., y Strominger, J. L. (1993). Specificity and promiscuity among naturally processed peptides bound to HLA-DR alleles. *J. Exp. Med.* 178, 27-47.

50.- Rudensky, A. Y., Preston- Hurlburt, P, Al-Ramadi, B. K., Rothbard, J., y Janeway C. A.. (1992). Truncation variants of pepetides isolated from MHC class II suggest sequence motifs. *Nature* 359, 429-431.

- 51.- Rudensky, A. Y., Preston- Hurlburt, P, Hong, S-. C. H., Barlow, A, y Janeway C. A. (1991). Sequence analysys of peptides bound to MHC class II molecules. *Nature* 353, 622-627.
- 53.- Moreno, J., Vignali, D. A. A., Nadimi, F., Fuchs, S., Adorini, L., y Hammerling, G. J., (1991) Processing of an endogenous antigen can generate MHC class II- restricted determinants distinct from those generated after the processing of exogenous protein. *J. Immunol.* 147, 3306-3313 *Imminol.*5:374-382.
- 54.- Bonifaz, L, C.(1996). Tesis. Vias de procesamientos de antigenos endogenos para su presentación por moléculas clase II del complejo principal de histocompatibilidad. Facultad de Química. UNAM.
- 55.- Castelino, F., y Germain, R. N., (1995). Extensive trafficking of MHC class II-invariant chain complexes in the endocytic pathway and appearance of peptide-loaded class II in multiple compartments. *Immunity* 2, 73-88.
- 56.- Poirier, G., Chain, B. (1993). Analysis of the cellular requeriments for the binding of exogenous peptide to MHC class II Molecules. *Cellular Immunology* 152,456-467.
- 57.- Urban, R.G., Chicz, R M., Vignali, D.A.A., y strominger, J,L., (1993). Tthe dichotomy of peptide presetation by class I and class II MHC proteins. En *chemical Immunology*, Editado por Adorini, L., Arai,K., y

- Fitch, F.W., Ishizaka, K., Lachmann, P.J., y Waksman, B H., S. Kager, Pasilea, 1993pp. 197-234.
- 58.- Klausner, R D., Sitia, R.(1990). Protein degradation in the endoplasmic reticulum. *Cell*, 62, 611-614.
- 59.- Brooks, A. G., y Mc Cluskey, J., (1993). Class II-restricted presentation of a hen egg lysozyme determinant derived from endogenous antigen sequestered in the cytoplasm of endoplasmic reticulum of the antigen presenting cell. *J. Immunol.* 150, 3690-3697.
- 60.- Weiss, S., and Bogen, B. (1991). MHC class II-restricted presentation of intracellular antigen. *Cell* 64. 767-776.
- 61.- Allen, P.M., McKean, D.J., Beck, B.N. Sheffield, J., Glimcher, L. H.(1985). Direct evidence that a class II molecule and a simple globular protein generate multiple determinants. *J. Exp. Med.* 162, 1264-1274.
- 62.- Kappler J., White J., Wegmann D., Mustain E., y Marrack P. (1982). Antigen presentation by I-A⁺ B cell hybridomas to H-2 restricted T cell hybridomas. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 79: 3604-3607.
- 63.- Serdovai I., Pla M., Sperisen p., Ghysdael J., et al. (1997). E1f-1 contributes to the function of the complex IL-2-responsive enhancer in the mouse IL-2 receptor alpha gene. *J. Exp. Med.* 7:1211-1221.
- 64.- Nelson, Ca., Vidavsky, I., Viner, N J., and Unanue, E.R.(1997).

Amino terminal trimming complex class II molecules. Proc. Natl. Acad. Sci. USA .94, 628-633.

65.-Parra lopez, C,A., linder, R., Vidavsky, I., gross, M.L., and Unanue, E, R.(1997).Presentation on class II MHC molecules of endogenous lysozime target to the endocytic pathway. J. Immunology. 158, 2670-2679.

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