

03081

8
2y



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ESTIMULADORA DE
PEPTIDOS PRESENTADOS POR MOLECULAS
MHC-I DE CELULAS TUMORALES DE CARCINOMA
CERVICO UTERINO SOBRE LINFOCITOS T DE
SANGRE PERIFERICA,

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN INVESTIGACION BIOMEDICA
BASICA (BIOQUIMICA)

P R E S E N T A :

ALBERTO MONROY GARCIA

DIRECTOR TESIS: DR. BENNY WEISS STEIDER

MEXICO, D. F.

TESIS CON
ALLA DE ORIGEN

1999

273593

2000



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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

UACPyP DEL CCH

SEDE: INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR

TITULO DE TESIS DOCTORAL.

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ESTIMULADORA DE PEPTIDOS PRESENTADOS POR MOLECULAS MHC-I DE CELULAS TUMORALES DE CARCINOMA CERVICO UTERINO SOBRE LINFOCITOS T DE SANGRE PERIFERICA.

TESISTA.

**M en IBSH. ALBERTO MONROY GARCIA.
Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer.
Laboratorio de Inmunobiología, FES-Zaragoza, UNAM.**

COMITE TUTORIAL.

**Dr. BENNY WEISS STEIDER (DIRECTOR DE TESIS).
Dr. JAIME MAS OLIVA.
Dr. ALEJANDRO MANUEL GARCIA CARRANCA.
Dr. VIANNEY FRANCISCO ORTIZ NAVARRETE.**

Este trabajo se realizó en la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, bajo la dirección del Dr. Benny Weiss Steider y la tutoría de los Doctores: Jaime Mas Oliva (Instituto de Fisiología Celular); Alejandro Manuel García Carrancá (Instituto de Investigaciones Biomédicas); y Vianney Francisco Ortiz Navarrete (CINVESTAV).

Durante la realización de este trabajo, se contó con el apoyo económico de:

Beca para desarrollar tesis doctoral.

Subcomités: DGAPA-PUIS y FES-Zaragoza.

Períodos: 1992-1993, 1993-1994 y 1994-1995.

Apoyo PADEP-UNAM.

Claves: 030349, 030302 y 030368.

Apoyos a proyectos de Investigación.

PAPIIT-DGAPA UNAM: IN206993.

CONACyT: 25443-M.

PAPIIT-DGAPA UNAM: IN216597.

“a todos los que han muerto de cáncer y con toda la fe del mundo para quien lo padece”

A mi esposa María de Lourdes:

Con quien he compartido muchos ratos de felicidad; gracias por acompañarme en mi camino.

A mis hijos Katia Alhelí y Alberto:

Que constituyen mi razón de seguir adelante, una verdadera bendición de Dios.

A mis padres, Amalia y Carlos:

Quienes me han enseñado a nunca declinar, gracias por su apoyo total.

A mis hermanos, María Olaya, Carlos, Patricia, María Guadalupe y Rogelio:

Quienes me han apoyado y acompañado en todo momento, gracias por su apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Benny Weiss Steider, por darme la gran oportunidad de crecer y desarrollarme en esta hermosa disciplina, gracias por su confianza, gracias por sus enseñanzas y apoyo siempre incondicional.

Al Dr. Armando Isibasi Araujo, por su apoyo en todo momento para el desarrollo de este trabajo de investigación.

Al Dr. Vianney Francisco Ortiz Navarrete, por su gran ayuda que ha servido para fincar este trabajo. Gracias por su gran amistad.

Al Dr. Julio Granados Arriola, por sus sugerencias importantes para el desarrollo de este trabajo y por su amistad que me ha brindado.

A los Doctores: Alejandro Manuel García Carrancá; Carlos Rosales Ledezma; Fernando Esquivel Guadarrama; José Moreno Rodríguez; y Leopoldo Santos Argumedo, por la revisión crítica de este trabajo y por sus observaciones que contribuyeron al mejoramiento del trabajo escrito.

A los Señores Ranulfo Pedraza y José Chavarría, por su colaboración técnica.

A todos mis compañeros y amigos de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer, del Instituto Nacional de Cancerología y Centro Médico Nacional que me han apoyado en todo momento.

INDICE

TITULOS Y SUBTITULOS

PAGINAS

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCION	3
3. MARCO TEÓRICO	5
3.1. EL SISTEMA INMUNE, SUS COMPONENTES Y SU ESPECIFICIDAD.....	5
3.1.1. Origen de las células blancas del sistema inmune.....	5
3.1.2. El sistema inmune y su especificidad.....	7
3.2. INMUNIDAD.....	8
3.2.1. Inmunidad innata y adaptativa.....	8
3.2.2. Inmunidad humoral e inmunidad celular.....	9
3.3. PROCESAMIENTO Y PRESENTACION DE ANTIGENOS POR MOLECULAS MHC CLASE I.....	11
3.3.1. Moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad.....	12
3.3.2. Expresión de moléculas MHC entre los diferentes tejidos.....	13
3.3.3. Etapas del procesamiento y presentación de antígenos por moléculas MHC-I.....	15
A).- Generación de péptidos.....	15
B).- Translocación de péptidos del citoplasma al retículo endoplásmico.....	20
C).- Estabilización y ensamble de moléculas MHC-I.....	24
D).- Transporte de los complejos MHC-I/péptido a la superficie celular.....	26
3.3.4. Vías alternas de fuentes de péptidos antigénicos presentados por moléculas MHC-I.....	27
3.4. PRESENTACION DE ANTIGENOS POR MOLECULAS MHC CLASE Ib Y CD1.....	28
3.4.1. Presentación por moléculas MHC clase Ib.....	28
3.4.2. Presentación por moléculas HLA-G.....	29
3.4.3. Presentación de antígenos por moléculas CD1.....	29
3.5. POLIMORFISMO Y ESPECIFICIDAD EN LA PRESENTACION DE PEPTIDOS.....	30
3.6. IDENTIFICACION DE EPIPOPOS.....	34
3.7. TECNICAS UTILIZADAS PARA EL ANALISIS DE PEPTIDOS ASOCIADOS A MOLECULAS MHC-I.....	36
3.7.1. Purificación de péptidos.....	36
3.7.2. Secuenciación de la mezcla de péptidos.....	36
3.8. CANCER CERVICO UTERINO Y SU ETIOLOGIA CON VIRUS DE PAPILOMA HUMANO (HPV).....	37
3.9. PAPEL DEL SISTEMA INMUNE EN LAS INFECCIONES GENITALES POR EL HPV.....	42
3.9.1. Respuesta inmune humoral contra HPV.....	45
3.9.2. Respuesta inmune celular contra infecciones producidas por HPV.....	46
3.10. INEFICIENCIA DE LA RESPUESTA INMUNE PARA COMBATIR A LAS CELULAS TUMORALES INFECTADAS POR EL HPV.....	49
3.10.1. Expresión de moléculas MHC-I y II en tejido cervical sano y con lesiones tumorales.....	49
3.10.2. Citocinas producidas por los queratinocitos cervicales.....	52

4.- JUSTIFICACION, ANTECEDENTES Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	53
4.1. Justificación.....	53
4.2. Antecedentes.....	53
4.3. Planteamiento del problema.....	55
5. HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....	57
5.1. Hipótesis.....	57
5.2. Objetivos.....	58
5.2.1. Objetivos generales.....	58
5.2.2. Objetivos particulares.....	58
6. MATERIALES Y METODOS.....	59
6.1. Líneas celulares y sus características.....	59
6.2. Anticuerpos monoclonales y su purificación.....	60
6.3. Detección de moléculas MHC-I por inmunofluorescencia.....	61
6.4. Ensayos de estabilización de las moléculas HLA-A11 y -B27 con péptidos sintéticos.....	62
6.5. Análisis de RNAm.....	63
6.6. RT-PCR para la detección de las moléculas transportadoras (Tap-1, -2), catalíticas (LMP-2, -7 y 10) y activadoras (PA28 α y β) del proteasoma.....	63
6.7. Marcaje metabólico con [³⁵ S] e inmunoprecipitación de moléculas MHC-I.....	64
6.8. Obtención de péptidos a partir de células marcadas metabólicamente.....	65
6.9. Elución de péptidos para evaluar su actividad antigénica.....	66
6.10. Evaluación de la actividad antigénica de los péptidos disociados de las moléculas MHC-I.....	68
6.11. Caracterización bioquímica y antigénica de los péptidos.....	69
6.12. Ensayos de estabilización de la molécula HLA-Cw4.....	69
6.13. Evaluación de la estimulación de linfocitos T con los péptidos sintéticos....	70
6.14. Inducción in vitro, de la respuesta de linfocitos T citotóxicos de memoria...	70
6.15. Ensayos de citotoxicidad.....	70
7.- RESULTADOS.....	72
A.- EXPRESION Y FUNCIONALIDAD DE LAS MOLECULAS CLASE I DEL MHC EN LAS LINEAS CELULARES DE CARCINOMA CERVICO-UTERINO, CALO E INBL...	72
7.1. Las líneas celulares de carcinoma CaCu, CALO e INBL positivas para HPV-18, expresan moléculas MHC clase I de manera conformacional en la membrana celular.....	72
7.2. CALO e INBL expresan de manera diferencial alelos HLA-A y B en su membrana celular.....	75
7.3. La expresión de los alelos HLA-B27 y -A11 es incrementada a 26°C.....	79
7.4. Péptidos sintéticos que se unen específicamente a los alelos HLA-B27 y -A11, incrementaron la expresión de estos alelos en CALO e INBL.....	79
7.5. CALO e INBL tienen deficiente expresión de Tap-1.....	82
7.6. CALO e INBL expresan de manera deficiente, la subunidad catalítica LMP-10 del proteasoma.....	82
B.- OBTENCION DE PEPTIDOS ANTIGENICOS ASOCIADOS A MOLECULAS MHC-I DE LAS LINEAS CELULARES CALO E INBL.....	86

7.7. Obtención y detección de los péptidos asociados con moléculas MHC-I de CALO e INBL.....	86
7.8. Péptidos aislados de moléculas MHC-I de la línea INBL, estimularon a linfocitos T de una donadora con infección viral de HPV-18 en cérvix y portadora del alelo HLA-Cw4 en su haplotipo.....	90
7.9. La fracción 19, de péptidos eluidos de moléculas MHC-I de INBL, contiene péptidos homólogos a secuencias virales.....	91
7.10. La expresión del alelo HLA-Cw4 incrementa en presencia de péptidos virales sintéticos.....	98
7.11. El péptido 54-62 de la proteína L1 de HPV-18, estimula la proliferación de linfocitos T de donadores con el alelo HLA-Cw4 y positivos para la infección con HPV-18.....	99
7.12. Los linfocitos T provenientes de la donadora portadora del alelo HLA-Cw4 y con infección de HPV-18, lisaron a las células INBL.....	99
8.- DISCUSION	103
A.- EXPRESION Y FUNCIONALIDAD DELAS MOLECULAS CLASE I DEL MHC EN LAS LINEAS CELULARES DE CARCINOMA CERVICO-UTERINO, CALO E INBL.....	103
B.- OBTENCION DE PEPTIDOS ANTIGENICOS ASOCIADOS A MOLECULAS MHC-I DE LAS LINEAS CELULARES CALO E INBL.....	107
9.- PERSPECTIVAS	110
10.- CONCLUSIONES	112
11.- BIBLIOGRAFIA	113

FIGURAS**PAGINAS**

3.1. Modelo de las vías de diferenciación de células sanguíneas	6
3.2. Estructura de las moléculas clase I y clase II del MHC.....	14
3.3. Etapas del procesamiento y presentación de antígenos por moléculas MHC-I.	16
3.4. Esquema de las moléculas asociadas al procesamiento de antígenos Tap-1 y Tap-2.....	21
3.5. Interacción del péptido con moléculas clase I del MHC	32
3.6. Mapa genético del virus de papiloma humano tipo 16.....	40
3.7. Inactivación de la proteína p53 mediante la proteína E6 de HPV.....	43
3.8. Inactivación de la proteína pRB mediante la proteína E7 de HPV.....	44
7.1. Las líneas celulares CALO e INBL de carcinoma cérvico-uterino, son positivas para HPV-18.....	46
7.2. CALO e INBL expresan moléculas MHC-I de manera conformacional en la membrana celular.....	74
7.3. Expresión diferencial de alelos HLA-A y -B en CALO e INBL y su inducción con IFN- γ	76
7.4. Los alelos HLA-B27 y -A11 son débilmente expresados en las líneas celulares CALO e INBL respectivamente.....	77
7.5. Análisis de Northern blot de los alelos HLA-B27, -B78 en CALO y de HLA-A11, -B48 en INBL.....	78
7.6. Los alelos HLA-B27 y -A11 son estables a 26°C.....	80
7.7. Expresión de HLA-B27 y -A11 en presencia de péptidos específicos.....	81
7.8. Inmunoprecipitación de las moléculas HLA-B27 (CALO) y -A11(INBL) en presencia de péptidos específicos.....	84
7.9. Expresión de Tap-1, Tap-2, LMP-2, LMP-7, LMP-10, PA28 α y PA28 β , en las líneas celulares CALO e INBL.....	85
7.10.a Péptidos disociados de moléculas MHC-I de la línea CALO marcada metabólicamente	87
7.10.b Péptidos disociados de moléculas MHC-I de la línea INBL marcada metabólicamente.....	88
7.11. Presencia de las cadenas alfa y β 2-microglobulina en los inmunoprecipitados de las moléculas MHC-I de las líneas celulares CALO e INBL	89
7.12. Proliferación de linfocitos de sangre periférica de pacientes con CaCu y donadores normales, con péptidos eluidos de moléculas MHC-I de las líneas celulares CALO e INBL.....	92
7.13. Detección de HPV-18 en un raspado cervical de una donadora con el alelo HLA-Cw4 en su haplotipo.....	93
7.14. Péptidos eluidos de moléculas MHC-I de la línea celular INBL, son capaces de estimular linfocitos derivados de una donadora con infección de HPV-18 y HLA-Cw4+.....	94

7.15. Espectro de masas (MALDI) de la fracción 19 de péptidos eluidos de moléculas MHC-I de la línea celular INBL	95
7.16. Péptidos sintéticos derivados de fragmentos de proteínas virales, identificadas después de la secuenciación de la fracción 19, estabilizan al alelo HLA-Cw4 en la línea celular C1R.....	100
7.17. El péptido 54-62 de la proteína L1 de HPV-18, estimula de manera específica a linfocitos T de una donadora con infección de HPV-18 y con el alelo HLA-Cw4 en su haplotipo.....	101
7.18. Linfocitos T activados de la donadora con infección cervical de HPV-18 y con HLA-Cw4, lisaron a la línea celular INBL.....	102

TABLAS

PAGINAS

3.1. Expresión de moléculas MHC-I en diferentes tejidos	13
3.2. Principales aminoácidos de anclaje dominantes y auxiliares de péptidos que se asocian a algunos alelos del MHC-I humano.....	35
3.3. Tipos de HPV en varias lesiones.....	39
6.1. Selección de matriz para purificar anticuerpos monoclonales a partir de medios condicionados o ascites.....	61
7.1. Resultados obtenidos después de la secuenciación directa (Técnica de Edman), de la fracción 19 de péptidos eluidos de moléculas MHC-I de la línea Celular INBL de carcinoma cérvico-uterino.....	96
7.2. Péptidos identificados a partir de la secuenciación directa (Técnica de Edman) de la fracción 19 de los péptidos aislados de moléculas MHC-I de la línea celular INBL, y su homología con fragmentos de proteínas virales.....	97

ABREVIATURAS:

ADN. Ácido desoxiribonucleico.

ATP. Adenocina trifosfato.

β_2m . Beta 2 microglobulina.

CaCu. Cáncer cérvico-uterino.

CD. Marcador de diferenciación.

CPA. Célula presentadora de antígenos.

Da, kDa. Daltones, kilodaltones.

HCMV. Citomegalovirus humano.

HLA. Antígenos leucocitarios humanos.

HPLC. Cromatografía en líquido de alta resolución.

HPV. Virus de papiloma humano.

Hsp. Proteínas de choque térmico.

HSV. Virus de herpes simple.

IFN. Interferón.

IL. Interleucina

LMP-2, -7, -10. Subunidades proteolíticas de bajo peso molecular de los proteasomas.

LTC. Linfocitos T citotóxicos.

MHC-I/II. Complejo principal de histocompatibilidad clase I o II.

NIC. Neoplasia intraepitelial.

PA28. Subunidad activadora del proteasoma.

PBS. Solución amortiguadora de fosfatos.

PCR. Reacción en cadena de la polimerasa.

RE. Retículo endoplásmico.

RLT. receptor de linfocitos T.

SCCC. Cáncer cervical de células escamosas.

SFB. Suero fetal de bovino.

Tap-1, 2. Transportador asociado al procesamiento de antígenos-1 o 2.

Th1, Th2. Linfocitos T auxiliares tipo 1 o 2.

TNF. Factor de necrosis tumoral.

VLP. Partículas similares a virus.

1. RESUMEN.

La expresión de moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad Clase-I (MHC-I) en la membrana de células infectadas con virus y células tumorales, es de gran importancia para mediar el reconocimiento de linfocitos T citotóxicos (CD8⁺) contra estas células blanco. Los linfocitos T CD8⁺ reconocen péptidos de 8 a 9 aminoácidos que provienen, en su mayoría, de proteínas degradadas en el citosol de la célula presentadora de antígeno por el complejo multienzimático proteasoma. Los péptidos son transportados hacia el lumen del retículo endoplásmico (RE) por el dímero formado por las proteínas Tap1 y Tap2, donde se unen a las moléculas clase I del MHC (MHC-I), para finalmente viajar a la superficie celular donde cumplen la función de presentar el antígeno. Por lo tanto, la presentación de péptidos antigénicos por medio de las moléculas MHC-I, es uno de los aspectos más importantes en la inducción de respuesta inmune celular, en donde los linfocitos T citotóxicos participan en la eliminación de células infectadas con virus y en la regresión tumoral.

Con la finalidad de analizar la funcionalidad de moléculas MHC-I y de identificar a los péptidos antigénicos presentados por estas moléculas en células de cáncer cervical, en este trabajo, se evaluó la expresión de moléculas MHC-I en dos nuevas líneas celulares de cáncer cérvico uterino, CALO e INBL, positivas para la infección con el virus de papiloma humano tipo 18. En las células CALO, las moléculas HLA-B78 (Bw6) se expresan abundantemente, mientras que la expresión de HLA-B27 es baja; de manera similar, la línea INBL expresa grandes cantidades de HLA-B48 (Bw6) y bajas de HLA-A11. En ambas líneas celulares, los alelos de baja expresión no fueron inducibles con IFN- γ ; mientras que los de alta expresión sí lo fueron, además al cultivar a las células a 26°C o en presencia de péptidos alelo-específicos, se restableció parcialmente la expresión de HLA-B27 y -A11. En las dos líneas celulares, dicho defecto no está asociado con una expresión baja del RNAm de las cadenas pesadas de los alelos deficientes. Sin embargo, al analizar mediante RT-PCR, la expresión de las subunidades proteolíticas (LMP-2, -7, y 10) y las subunidades activadoras (PA28 α y PA28 β) del proteasoma, así como las subunidades transportadoras Tap-1 y Tap-2, se encontró que ambas líneas celulares fueron deficientes en LMP-10 y Tap-1, las cuales fueron ligeramente restablecidas cuando las células fueron tratadas con IFN- γ . Tomando en consideración que en tumores de cáncer cervical se ha encontrado una deficiencia importante de moléculas MHC-I asociada con la ausencia en la expresión de Tap-1

(aproximadamente en el 30% de tumores), nuestros resultados permiten sugerir que la deficiente expresión de moléculas MHC-I en este tipo tumoral, se asocia no sólo con defectos en el transporte de péptidos sino también con defectos en la generación de péptidos para unirse de manera alelo-específica a las moléculas MHC-I, afectando su expresión en la membrana celular. Por otro lado, de la línea INBL, se purificaron moléculas MHC-I y se aislaron los péptidos unidos a ellas. Una fracción de estos péptidos, estimuló a linfocitos T provenientes de una donadora con infección por HPV-18 y que presenta el alelo HLA-Cw4 al igual que INBL. La secuenciación de esta fracción de péptidos, indica que el péptido antigénico proviene de la región 54-62 (NQFPIMLQF) de la proteína L1 de HPV-18 y tiene los residuos de unión a la molécula HLA-Cw4. Empleando el péptido sintético: NQFPIMLQF y la línea celular C1R (solamente expresa moléculas HLA-Cw4 en membrana), se demostró la presencia de linfocitos T citotóxicos de la donadora HLA-Cw4⁺ y positiva para HPV-18. Estos resultados muestran respuesta de memoria inmunológica contra un determinante antigénico, naturalmente procesado por células de cáncer cérvico-uterino, que pudiese ser utilizado con fines terapéuticos.

2. INTRODUCCION.

En los últimos años la Inmunología tumoral ha tenido gran importancia gracias al estudio y caracterización de los antígenos de rechazo tumoral, la cual tiene como base dos aspectos fundamentales: primero; la identificación de los genes mutados que codifican para proteínas reguladoras y estructurales en diferentes tipos de cáncer y que constituyen los blancos con potencial antigénico en el rechazo tumoral y segundo; el papel de los linfocitos T citotóxicos (LTC's) en la detección de péptidos que derivan de estas proteínas intracelulares mutadas y que son presentados por moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad Clase I (MHC-I) en la membrana celular (Zinkernagel y Doherty, 1979).

La habilidad de linfocitos T para reconocer péptidos antígenos presentados por moléculas MHC-I, y de conferir actividad protectora contra tumores, ha sido demostrada en modelos de ratón (Lurquin et al, 1989; van den Eynde et al, 1991; y Feltkamp et al, 1993). Estos modelos han estimulado el interés de varios investigadores para tratar de identificar a los péptidos inmunogénicos expresados en tumores humanos, con la finalidad de implementar nuevas terapias anticancer con mayor efectividad (Robbins y Kawakami, 1996; Wang y Rosenberg, 1996; Rensing et al, 1996; Melief et al, 1996; y Velders et al, 1998). No obstante, la observación de que un gran número de tumores presentan deficiencias en la expresión de moléculas MHC-I en su membrana, ha originado la hipótesis del escape inmunológico, en donde la ausencia de la presentación de antígenos, potencialmente reconocibles por linfocitos T, proporciona una ventaja selectiva a las células malignas para evitar ser eliminadas (Möller y Hammerling, 1992). Este fenómeno ha permitido dirigir diversos estudios para identificar a los factores que influyen en la expresión de moléculas MHC-I en la membrana de las células tumorales. Encontrándose desde la desregulación de secuencias promotoras de alelos específicos HLA-A, -B, -C (Garrido et al, 1997); la desregulación de los elementos que participan en la vía de procesamiento y presentación de antígenos por moléculas MHC-I (Jhonsen et al, 1998); y mutaciones puntuales en los péptidos antigénicos (Ellis et al, 1995; y Ossendorp et al, 1996). Además se ha visto que la generación de una respuesta inmune efectiva también depende, en gran medida de la secreción de citocinas que regulan la expresión de moléculas MHC, y que son producidas por células activadas del sistema inmune (linfocitos T y macrófagos), por células infectadas con virus o por células transformadas (Bornstein et al, 1996).

En el caso particular del cáncer cérvico uterino (CaCu), el cual se asocia etiológicamente con el virus de papiloma humano (HPV), más del 90% de los tumores de CaCu presentan infección con HPV (van der Brule et al, 1991; y Torroella-Kouri et al, 1998), hace que este tumor sea potencialmente antigénico, y en consecuencia, factible de ser estudiado en su caracterización antigénica. No obstante, pocos estudios han sido dirigidos para analizar la expresión de moléculas HLA en células tumorales de CaCu, su regulación y su funcionalidad en la presentación de antígenos. Por ejemplo, en algunos estudios, se ha encontrado una asociación entre la deficiencia en la expresión de algunos alelos HLA-A y B y la deficiencia de la subunidad Tap-1 (Cromme et al, 1993; Garrido et al, 1993; Keating et al, 1995); asimismo, la inducción de la expresión de moléculas MHC-I con citocinas ha sido poco estudiada (Bornstein et al, 1996). También muy pocos estudios han sido dirigidos hacia la caracterización de péptidos inmunogénicos en CaCu; por ejemplo, en uno de ellos, se ha descrito la elución natural de un péptido endógeno derivado de la proteína E6 de HPV-16 a partir de células infectadas con el virus de vaccinia recombinante portando la información de E6 de HPV-16 (Bartholomew et al, 1994). En otros estudios, la identificación de péptidos antigénicos se ha realizado por medio de la predicción de péptidos derivados de las proteínas oncogénicas E6 y E7 de HPV-16 hacia algunos alelos HLA-A (Ressing et al, 1994; y Kast et al, 1994).

En el presente estudio, se describe la expresión diferencial de moléculas MHC-I en la membrana de dos nuevas líneas tumorales de cáncer cervical (CALO e INBL), en donde dos alelos de baja expresión (HLA-A11 en INBL y -B27 en CALO) no son inducidos con IFN- γ , pero son restablecidos parcialmente cuando las células son cultivadas a 26°C o en presencia de péptidos específicos para ellos. Al analizar la presencia de los transportadores así como de las subunidades catalíticas y activadoras de los proteasomas mediante RT-PCR, se encontró una deficiencia en la expresión de la subunidad Tap-1 y LMP-10 en ambas líneas celulares. Estos hallazgos, permiten sugerir que las deficiencias presentadas en la maquinaria del procesamiento de antígenos en estas líneas celulares, pueden influir de manera importante en la generación y transporte de péptidos específicos para alelos de baja expresión, como es el caso de HLA-B27 y -A11 mostrados por CALO e INBL respectivamente.

Por otra parte, se dan fuertes evidencias de que la línea celular INBL presenta en su membrana a un determinante antigénico (secuencia 54-62 de la proteína L1 de HPV-18), que es naturalmente procesado y presentado en el contexto de moléculas HLA-Cw4.

3. MARCO TEORICO.

3.1. EL SISTEMA INMUNE, SUS COMPONENTES Y SU ESPECIFICIDAD.

3.1.1. Origen de las células blancas del sistema inmune.

Todos los elementos celulares de la sangre, incluyendo a los eritrocitos que transportan el oxígeno, las plaquetas que participan en la coagulación de la sangre cuando existe daño tisular, y las células blancas del sistema inmune son llamadas células hematopoyéticas. Todas ellas derivan de un mismo progenitor o precursor celular común llamado célula madre hematopoyética, la cual se localiza en la médula ósea (Whetton y Dexter, 1993). Debido a la capacidad que tiene esta célula precursora de diferenciarse a prácticamente todos los linajes celulares sanguíneos, también es conocida como célula madre hematopoyética pluripotente o totipotente (Till y McCulloch, 1961). La célula madre hematopoyética, en primera instancia puede diferenciarse en dos tipos celulares más especializados: una célula madre linfoide (progenitor linfoide), la cual da lugar a los linfocitos T, B y células asesinas naturales (NK); y una célula madre mieloide (progenitor mieloide), la cual da lugar a los leucocitos polimorfonucleares, eritrocitos, mastocitos y a los megacariocitos que producen plaquetas (Figura 3.1).

Los linfocitos T y B al parecer provienen de un mismo precursor común; sin embargo, se distinguen por su sitio de diferenciación y por sus receptores. Los linfocitos T se diferencian en el timo, mientras que los B lo hacen en la médula ósea. Los linfocitos B efectores después de su activación se diferencian en células plasmáticas productoras de anticuerpos, mientras que los linfocitos T activados se diferencian a células que matan a células infectadas con virus o también pueden activar a otras células del sistema inmune (Janeway et al, 1997). Los leucocitos que derivan del precursor mieloide, son los monocitos, eosinófilos, basófilos y neutrófilos, los cuales colectivamente son llamados polimorfonucleares, debido a su forma irregular del núcleo, o también son denominados granulocitos, debido a que poseen gránulos citoplasmáticos y cuyas características de tinción son diferentes entre ellos. Los monocitos se diferencian a macrófagos, los cuales al migrar a los tejidos, se convierten en las principales células fagocíticas del sistema inmune. Los neutrófilos, las más importantes células fagocíticas, tienen funciones similares a los macrófagos, sin embargo permanecen en el torrente sanguíneo. Los eosinófilos son células involucradas en la inflamación, mientras que los basófilos que se localizan en la sangre, tienen funciones importantes en las respuestas alérgicas.

Finalmente, los mastocitos, los cuales algunos autores sugieren que derivan de precursores comunes a los basófilos, tienen funciones muy similares a ellos; después de salir de la médula ósea, completan su maduración en tejidos y se piensa que juegan un papel importante en la protección de la superficie de las mucosas del organismo, además de liberar sustancias que afectan la permeabilidad vascular (Ikuta et al, 1992; Lowry y Quesenberry, 1992; y Morrison et al, 1995).

3.1.2. El sistema inmune y su especificidad.

La sobrevivencia de un organismo depende de la habilidad para reconocer, interpretar y responder a los cambios del ambiente. Para ello, los vertebrados han desarrollado sistemas adaptativos, entre los cuales el sistema inmune ha permitido a través de la presión selectiva de agentes infecciosos y parasitarios, prevenir su invasión (Moreno, 1996). La piedra angular del conocimiento inmunológico es la distinción entre lo propio y lo extraño, una molécula reconocida específicamente por el sistema inmune es un antígeno o inmunógeno. La antigenicidad es propiedad primordial de macromoléculas complejas como proteínas o polisacáridos de alto peso molecular. Un antígeno tiene regiones reconocidas por el sistema inmune en forma específica e independiente, denominadas determinantes antigénicos o epítopos. La inmunogenicidad es la propiedad de un antígeno que determina la intensidad de la respuesta inmune hacia él. En términos generales, la inmunogenicidad aumenta en forma directamente proporcional a la distancia filogenética entre un organismo y el agente invasor (Austin et al, 1993; y Moreno, 1996).

Las bases de la especificidad de la respuesta inmune fueron establecidas en 1957 por el gran científico australiano MacFarlane Burnet quien, retomando ideas de Paul Ehrlich, Niels Jerne y David Talmage, propuso la Teoría de la selección clonal, según la cual: a) todos los individuos poseen clonas de células con receptores específicos, idénticos a los anticuerpos secretados por su progenie; b) cada clona produce anticuerpos de especificidad única para cada antígeno; c) la especificidad de una clona es determinada durante la diferenciación, antes del contacto con el antígeno; y d) al penetrar al organismo, un antígeno selecciona (y expande) las clonas específicas contra él.

La Teoría de la selección clonal, tuvo su máxima aceptación gracias a las propuesta sobre la recombinación de genes para generar anticuerpos con especificidades múltiples, sugerida inicialmente por Dreyer y Bennett en 1965 y confirmada posteriormente por los grupos de Susumu Tonegawa, Phil Leder y Leroy Hood en 1977, quienes demostraron que la especificidad (y diversidad) de las inmunoglobulinas es debida al rearreglo de sus

genes en los linfocitos B. De igual manera, se sabe que la diversidad y especificidad de los receptores de los linfocitos T (RLT), al igual que en los genes de inmunoglobulina, dependen del rearreglo de genes que codifican las regiones variables de ambas cadenas que los conforman y (Moreno, 1996; y Janeway, 1997).

3.2. INMUNIDAD.

La inmunidad es mediada por una variedad de diferentes células y moléculas, que como un todo, son responsables de dos diferentes, pero interrelacionadas, formas de inmunidad: la inmunidad innata y la adaptativa.

3.2.1. Inmunidad innata y adaptativa.

No todos los sistemas de defensa se basan en la selección clonal de linfocitos como la propuesta por MacFarlane Burnet en el siglo XIX. Los sistemas celulares de defensa con reconocimiento no-clonal son llamados Inmunidad Innata, debido a que todas las células que se diferencian de la célula progenitora tienen la misma capacidad de respuesta la cual no se adapta o cambia a una particular infección (Austyn et al, 1993).

El sistema inmune innato incluye un grupo de leucocitos llamados fagocitos, el cual comprende al linaje monocito-macrófago y a los polimorfonucleares o granulocitos (neutrófilos, basófilos y eosinófilos). Asimismo, también incluye a otro grupo de células llamadas asesinas naturales que son capaces de destruir a células infectadas con virus, embrionarias o células tumorales. Aunado a ello, el sistema innato también incluye megacariocitos que producen plaquetas las cuales están involucradas en la coagulación sanguínea y en la respuesta inflamatoria, la cual frecuentemente ocurre cuando hay alguna infección, conduciendo a los síntomas clásicos de dolor, calor, enrojecimiento e hinchazón. Las principales tipos celulares vistos en la respuesta inflamatoria en su fase inicial son los neutrófilos, seguido por los macrófagos (Ratcliffe et al, 1988; y van Furth, 1993).

Cuando el sistema innato fracasa en su intento por detener la invasión de patógenos o de la proliferación de las células tumorales, se pone en marcha el sistema inmune adaptativo, compuesto por linfocitos T y B, y se caracteriza por la especificidad celular y la generación de memoria para contrarrestar el efecto del patógeno en un segundo ataque (Roitt, 1991). La activación de los linfocitos, depende críticamente de su interacción con células fagocíticas quienes además de procesar, muestran fragmentos de antígenos a los linfocitos (Abbas et al, 1991).

Los linfocitos B y T, que maduran en la médula ósea y en el timo respectivamente, pueden generar cientos de variantes de sus receptores por medio de la recombinación de los genes que codifican para sus receptores. Entonces cada linfocito lleva receptores con sólo una especificidad, la cual es diferente entre uno y otro linfocito (Janeway et al, 1997). Por tanto, los millones de linfocitos en el organismo pueden dar lugar a millones de especificidades y sólo aquel linfocito que encuentra un antígeno para el cual su receptor se une, será activado a proliferar y diferenciarse a células efectoras. Por lo tanto, la especificidad dada en la respuesta inmune adaptativa se basa en la teoría de la selección clonal propuesta por McFarlane Burnet. La respuesta inmune adaptativa está dada por dos vías de reconocimiento antigénico llevadas a cabo por los linfocitos B y T, los cuales confieren la inmunidad humoral y celular respectivamente.

3.2.2. Inmunidad humoral e inmunidad celular.

La respuesta inmune humoral, se lleva a cabo por medio de la generación de anticuerpos o inmunoglobulinas que son las moléculas receptoras y efectoras de los linfocitos B (Roitt, 1991; Paul, 1993; y Janeway et al, 1997). Las inmunoglobulinas son proteínas en forma de "Y", y están constituidas por cuatro cadenas polipeptídicas: dos pesadas (H) con un peso de 50 a 70 kDa y dos ligeras (L) con un peso de 23 kDa, que en conjunto, constituyen un monómero de inmunoglobulina.

Las regiones constantes de las cadenas pesadas, son codificadas por segmentos génicos contiguos con propiedades funcionales diferentes, la unión de estas cadenas con una cadena ligera (κ o λ) constituyen un isotipo; en el humano existen 5 diferentes isotipos de anticuerpos (IgM, IgG, IgA, IgE e IgD) los cuales tienen propiedades biológicas distintas, como es el caso de IgM, IgG3 e IgG1 que activan el complemento, y de IgM e IgG que aglutinan bacterias y precipitan antígenos solubles haciéndolos más accesibles a las células fagocíticas (Weissman et al, 1993; y Nossal, 1993; Abbas et al, 1994; Moreno, 1996; y Janeway et al, 1997).

Los anticuerpos detectan, neutralizan y eliminan a los invasores extraños, bacterias o virus por medio de las proteínas del complemento; también recubren a los patógenos (opsonización) de tal forma que puedan ser fagocitados por los macrófagos o Células Presentadoras de Antígeno (CPA) y posteriormente procesar y presentar a los antígenos (Paul, 1993; y Moreno, 1996).

Un anticuerpo es concebido como una proteína producida como el resultado de la introducción de algún antígeno y que tiene la capacidad para combinarse con el antígeno

que estimuló su producción. Para su reconocimiento, los antígenos deben estar dispuestos en sitios accesibles, ya sea, en sitios extracelulares como en el suero, en forma de secreciones del patógeno o bien el patógeno completo (bacterias y algunos virus) (Nossal, 1993; Abbas et al, 1994; y Doherty et al, 1994). La maduración de la respuesta inmune ocurre en los centros germinales, localizados en los órganos linfoides (v.g. ganglios linfáticos). Es en los folículos linfoides donde los linfocitos B vírgenes son inducidos a diferenciarse y a proliferar mediante la ayuda de células dendríticas y linfocitos T para que finalmente se constituyan como células productoras de algún isotipo de Inmunoglobulina (Maclennan, 1994).

Por otro lado, el sistema inmune ha desarrollado una vía mediante la cual se pueda combatir a los patógenos intracelulares mediante indicaciones extracelulares. En este sentido, las células T juegan un papel muy importante en el rechazo de trasplantes, en la defensa inmune contra células infectadas por virus y células malignas (Greenberg, 1991; y Doherty et al, 1994). Las células T tienen funciones reguladoras y efectoras en la "inmunidad celular" mediante secreciones de moléculas con gran potencial lítico (Squier et al, 1994; Chau-Ching et al, 1995; y Berke, 1995).

Los linfocitos T se desarrollan y diferencian fenotípicamente en el timo a partir de un precursor (timocito), originado en la médula ósea. Anatómicamente y funcionalmente, el timo se divide en dos regiones: la Corteza, donde ocurren la mayoría de los eventos de diferenciación de los linfocitos T; y la Médula donde ocurre la selección negativa. Cuando se localizan en la Corteza, los timocitos llevan a cabo el rearrreglo de sus genes para conformar las dos cadenas (α y β) que forman su receptor RLT, además de expresar el complejo CD3 (formado por varias cadenas polipeptídicas conocidas como γ , δ , ϵ , ζ (2x), η), y los marcadores CD4 y CD8 (Clayton et al, 1990; Jeffrey et al 1992; Christmas et al, 1993; Bevan et al, 1994; y Heemels et al, 1995).

Los linfocitos T que han adquirido los marcadores CD8 y CD4, llamados también dobles positivos, entran a un proceso denominado selección positiva, que depende de moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad clase I y II (MHC-I/II) presentes en la superficie de las células epiteliales situadas en la corteza tímica. La selección positiva en el timo, permite obtener el repertorio de linfocitos T con que ha de contar un individuo (Campbell et al, 1993; y Jameson et al, 1995). Debido a que los rearrreglos del RLT son aleatorios, surgen timocitos con RLT que pueden reconocer moléculas del MHC propias y extrañas; al mismo tiempo, se da la selección de timocitos con un solo marcador, ya sea CD4⁺ o CD8⁺, y los timocitos dobles positivos mueren por apoptosis (Robey et al, 1991).

A continuación, los timocitos resultantes pasan por un proceso denominado selección negativa, la cual se lleva a cabo en la médula del timo y en la cual se eliminan timocitos que pueden llegar a reconocer moléculas propias del individuo. Como resultado final del proceso de selección, menos del 5% de los timocitos sale al torrente sanguíneo como linfocitos T maduros (Austyn et al, 1993; y Robey et al, 1994). Los timocitos que reconocen antígenos mediante moléculas clase I del MHC permanecen y maduran como CD8⁺, mientras que los timocitos que reconocen antígenos mediante moléculas clase II del MHC maduran como CD4⁺.

Los linfocitos T citotóxicos (LTC), producen citocinas como IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IFN- γ , TNF- α y tienen como cualidad la de producir y secretar vesículas que llevan en su interior moléculas con gran potencial lítico y dirigir las hacia la célula infectada o transformada (célula blanco) (Squier et al, 1994; Berke, 1994; Berke, 1995; y Peralta et al, 1995).

Los timocitos que maduran y mantienen la expresión de CD4⁺, se conocen como linfocitos T cooperadores (Robey et al, 1991). Los linfocitos CD4⁺ maduros después del contacto inicial con el antígeno secretan predominantemente IL-2 y se consideran indiferenciados (CD4⁺ o Th0); con el tiempo estos linfocitos se subdividen en dos poblaciones de linfocitos y se distinguen por las citocinas que producen para amplificar la respuesta contra el antígeno. Los linfocitos T CD4⁺ tipo1 (Th1) secretan principalmente IFN- γ , IL-2 y TNF- β y proliferan en respuesta a IL-2, favoreciendo así la inmunidad celular y los fenómenos inflamatorios. Los linfocitos T CD4⁺ tipo 2 (Th2) secretan IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, proliferan en respuesta a IL-2 o IL-4 y favorecen la inmunidad humoral; ambas poblaciones secretan IL-2, IL-3 y Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos y Macrófagos (GM-CSF) (Robey et al, 1991; Berke, 1994; Robey et al, 1994; y Moreno, 1996).

3.3. PROCESAMIENTO Y PRESENTACION DE ANTIGENOS POR MOLECULAS MHC CLASE I.

La respuesta inmune celular llevada a cabo por los linfocitos T, posee diferentes mecanismos para eliminar infecciones producidas por patógenos que residen en los diferentes compartimentos de la célula huésped. Las células infectadas por virus o bacterias que viven en el citosol son eliminadas por linfocitos T citotóxico CD8⁺, mientras que los patógenos y sus productos que residen en los compartimentos vesiculares son detectados por los receptores de los linfocitos CD4⁺. La generación de péptidos a

partir de un antígeno intacto que radica en cualquiera de los compartimentos intracelulares, es referida como procesamiento de antígenos, mientras que la disposición de estos péptidos en la membrana celular a través de moléculas MHC, es referida como presentación de antígenos (Moreno, 1996; y Janeway et al, 1997).

3.3.1. Moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad.

Las moléculas MHC son glicoproteínas que se expresan en la membrana celular y son el producto de un conjunto de genes altamente polimórficos, los cuales se localizan en el brazo corto del cromosoma 6 en el humano (York et al, 1996); esta región ha sido denominada HLA (Human Leukocyte Antigens), por haber sido inicialmente encontrada en los leucocitos humanos (Brodsky et al, 1991; Yewdell et al, 1992; Germain et al, 1993; y Cresswell, 1993).

La estructura que presentan estas proteínas ha sido dilucidada a partir del análisis cristalográfico por rayos X de la estructura tridimensional de las moléculas del MHC y ha permitido clasificarlas en dos grandes clases:

- Clase I: Estas moléculas consisten de una cadena polipeptídica pesada con peso molecular de 45,000 daltones (Da); unida no covalentemente a un péptido con un peso molecular de 12,000 Da; y que es conocido como β_2 -microglobulina (β_2m). La parte extracelular de la cadena pesada se encuentra organizada en tres dominios globulares denominados α_1 , α_2 y α_3 . Anclando a la molécula, en la membrana citoplásmica, se encuentra una pequeña sección hidrofóbica, y cercana a ella se encuentra una corta secuencia hidrofílica citoplásmica en el extremo carboxilo terminal. La β_2m y la región α_3 tienen una conformación similar a la de los dominios de inmunoglobulinas en cuanto a su patrón de plegamiento. Por otra parte, los dominios α_1 y α_2 presentan una estructura compuesta de dos hélices α extendidas, sobrepuestas sobre una base compuesta por láminas β -plegadas entrecruzadas entre sí, formándose con ello una pequeña cavidad en donde se aloja el péptido antigénico (Bjorkman et al, 1987a,b; Garret et al, 1989; Saper et al, 1991; Fremont et al, 1992; y Madden et al, 1992), (Figura 3.2).

- Clase II: Las moléculas MHC-II son, al igual que las moléculas de MHC I, glicoproteínas transmembranales, que están conformadas por dos cadenas polipeptídicas: una cadena alfa (α) con peso molecular de 32,000-34,000 Da y una cadena beta (β) con peso de 28,000 Da. Estas moléculas tienen una considerable homología secuencial con las moléculas clase I del MHC, en donde los dominios α_2 y β_2 , los cuales son los más cercanos a la membrana celular, asumen el patrón de plegamiento de las

inmunoglobulinas; mientras que los dominios α_1 y β_1 imitan a los dominios α_1 y α_2 de las moléculas MHC-I para formar la cavidad en donde se aloja el péptido (Brown et al, 1993a) (Figura 3.2).

3.3.2. Expresión de moléculas MHC entre los diferentes tejidos.

Las moléculas MHC-I y MHC-II, son expresadas de manera diferencial entre los diferentes tejidos: esencialmente, todas las células nucleadas expresan moléculas MHC-I, las cuales se expresan abundantemente en células linfoides; en menor cantidad en hígado, pulmón, riñón; y en muy poca cantidad en el cerebro y músculo esquelético (Tabla 3.1) (Germain et al, 1993; Germain, 1994; Heemels et al, 1995; y Janeway et al, 1997). Las moléculas de clase II se encuentran más restringidas, encontrándose asociadas especialmente a los linfocitos B, Células Presentadoras de Antígenos (CPA's) como son: Células de Langerhans, dendríticas foliculares, macrófagos y células epiteliales del timo (Tabla 3.1) (Unanue et al, 1987; Neefjes et al, 1992; y Moreno, 1996). En humanos, los linfocitos T activados expresan moléculas MHC II, mientras que en ratón la expresión de moléculas MHC-II puede ser inducida, utilizando péptidos virales específicos en presencia de IFN- γ (Thomas et al, 1996).

Tabla 3.1. Expresión de moléculas MHC-I en diferentes tejidos. Tomado de Janeway et al, 1997.

TEJIDO	MHC clase I	MHC clase II
Tejidos linfoides		
Linfocitos T	+++	+
Linfocitos B	+++	+++
Macrófagos	+++	++
Células de Langerhans	+++	+++
Células epiteliales del timo	+	+++
Otras células nucleadas		
Neutrófilos	+++	-
Hepatocitos	+	-
Riñón	+	-
Cerebro	+	-
Células no nucleadas		
Eritrocitos	-	-

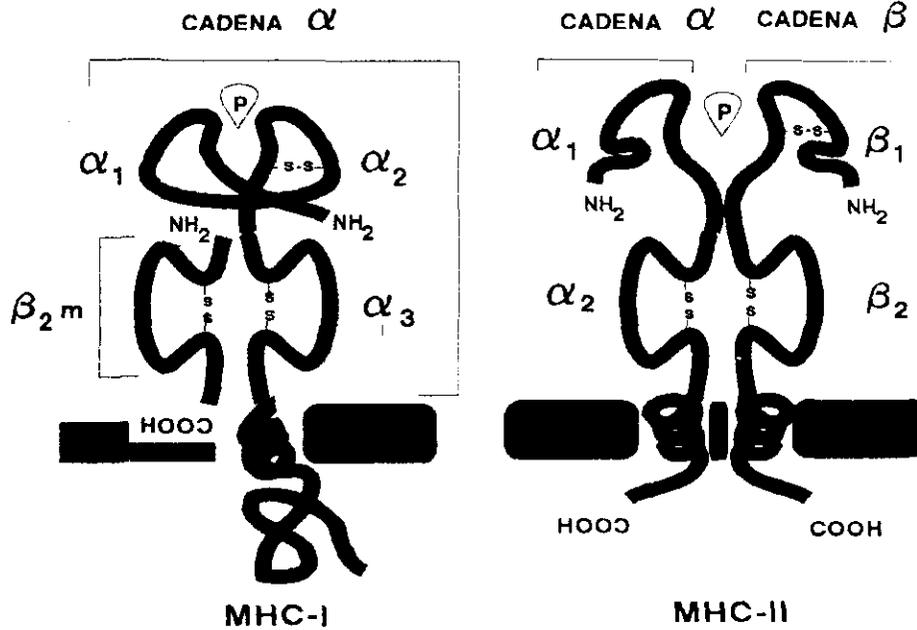


Figura 3.2. Estructura de las moléculas clase I y Clase II del Complejo Principal de Histocompatibilidad. Las moléculas MHC-I están constituidas de una cadena alfa, subdividida a su vez en tres dominios alfa y la cadena beta 2 microglobulina. El sitio de unión del péptido (P) lo conforman los dominios alfa 1 y alfa 2. Por su parte las moléculas MHC-II también están constituidas por dos cadenas, alfa y beta, subdivididas cada una por dos dominios, en esta molécula el péptido se une a la cavidad formada por el dominio alfa 1 y beta 1.

3.3.3. Etapas del procesamiento y presentación de antígenos por moléculas MHC-I.

Se han descrito 4 diferentes etapas que forman parte del mecanismo de procesamiento y presentación de antígenos por medio de moléculas MHC-I; para fines de la presente tesis, se describirán únicamente las etapas que intervienen en el procesamiento y presentación de antígenos por moléculas MHC-I. Las etapas son las siguientes: **A)** generación de péptidos en el citoplasma; **B)** transporte de péptidos hacia el interior del retículo endoplásmico; **C)** estabilización y ensamblaje de moléculas MHC-I; y **D)** glicosilación del complejo MHC-I/péptido y su transporte a la membrana celular (Figura 3.3).

A).- Generación de péptidos.

La principal fuente de péptidos que se unen a moléculas MHC-I, deriva de proteínas sintetizadas por los ribosomas celulares. No obstante, las proteínas introducidas en el citosol, ya sea de manera artificial o durante el proceso de infección viral o bacterial, pueden también contribuir a la generación de péptidos antigénicos para ser presentados por moléculas MHC-I (Matsumara et al, 1992; Driscoll et al, 1992; y Williams et al, 1996).

La mayor parte de la actividad proteolítica que ocurre en el citosol, es atribuida a los proteasomas, quienes se encargan de digerir a las proteínas citosólicas para producir péptidos de 8-10 residuos de longitud (Goldberg et al, 1992; Benham et al, 1995; y Lehner et al, 1996).

Un proteasoma es un complejo multicatalítico con un peso molecular entre 650 a 700 kDa (Goldberg et al, 1992). Basado en el coeficiente de sedimentación, este complejo es referido también como 20S. La obtención y purificación de proteasomas a partir de *Thermoplasma acidophilum*, permitió determinar la estructura cilíndrica de este complejo multienzimático, el cual consiste de 28 diferentes subunidades arregladas en 4 anillos conformados por siete subunidades cada uno; las subunidades que componen a los dos anillos centrales se conocen como subunidades β y las subunidades que componen a los anillos de los extremos, son las subunidades α (Löwe et al, 1995; y Yang et al, 1996). Cada una de las subunidades deriva de un gene distinto y su peso molecular se encuentra entre 21-31 kDa. Las subunidades β de los proteasomas 20S, pertenecen a la familia de las hidrolasas, las cuales cortan en la porción N-terminal (Ntn) de las proteínas (Brannigan et al, 1995). Al caracterizar la especificidad al sustrato, se ha demostrado que el proteasoma también corta en los extremos carboxilo terminal de residuos de aminoácidos hidrofóbicos, básicos y ácidos (Heemels et al, 1995).

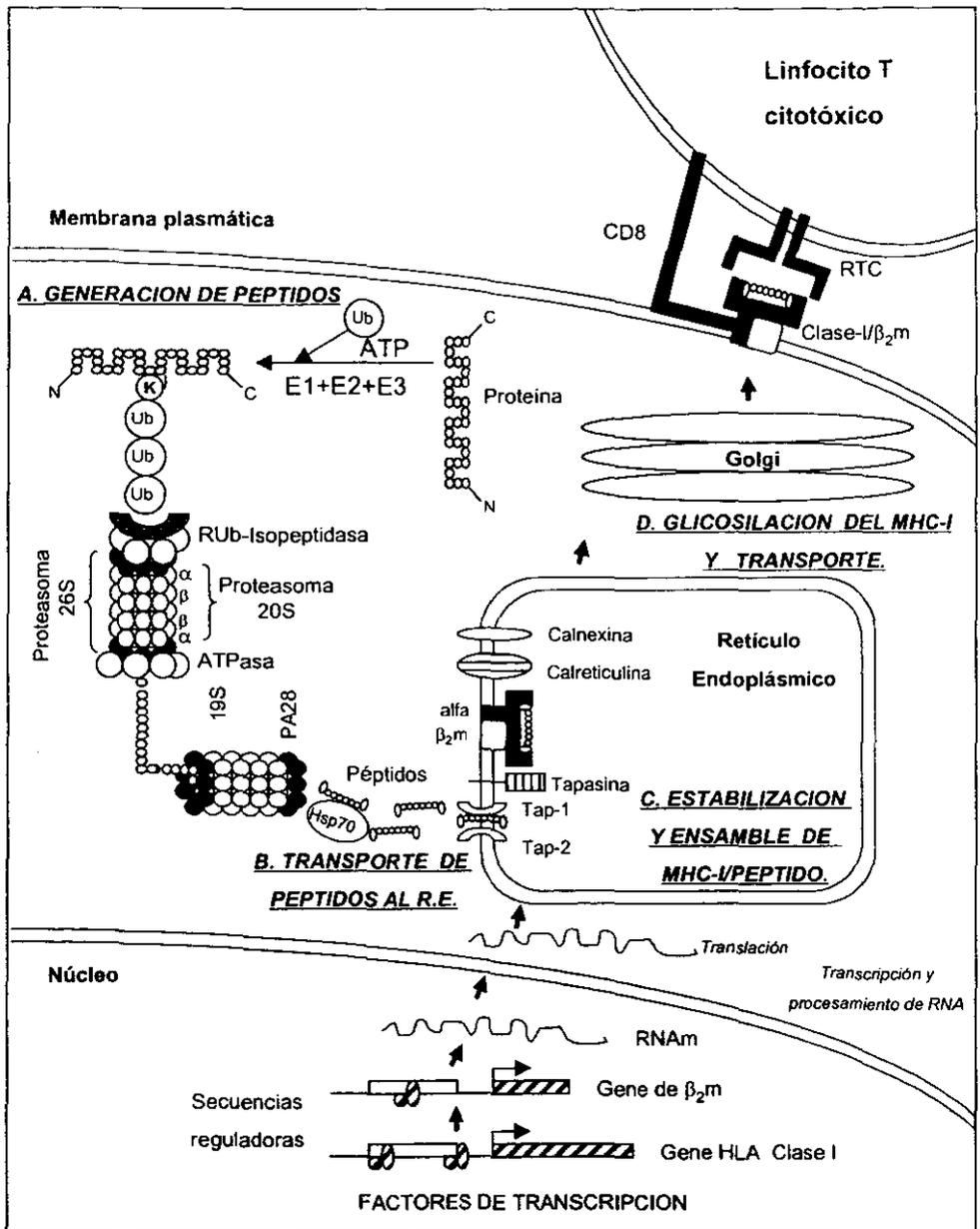


Figura 3.3. Etapas del procesamiento y presentación de antígenos por moléculas MHC-I. A) Generación de péptidos en el citoplasma; B) Transporte de péptidos hacia el interior del retículo endoplásmico; C) Estabilización y ensamble de moléculas MHC-I; y D) Glucosilación del MHC-I y transporte a la membrana. Para detalles, ver texto. Tomado y modificado de Garrido et al, 1993; Groettrup et al, 1996; Yang et al, 1996; y Tanaka et al, 1997.

Muy recientemente, a partir de pituitaria de bovino, se caracterizaron cinco diferentes especificidades de peptidasa de los proteasomas celulares, siendo estas: 1. Actividad semejante a quimi tripsina (ChT-L); 2. semejante a tripsina (T-L); 3. peptidilglutamil-péptido-hidrolizante (PGPH); 4. preferencia por aminoácidos ramificados (BrAAP); y 5. preferencia por aminoácidos neutros pequeños (SNAAP), (Orlowski et al, 1993; y Eleuteri et al, 1997).

Las subunidades catalíticas más conocidas del proteasoma corresponden a dos polipéptidos de bajo peso molecular, conocidos como LMP-2 y LMP-7. Ambas pertenecen a la familia de las subunidades β . Los genes que codifican a estos LMP's se encuentran localizados dentro de la región del MHC-II, muy cercanos a los genes que codifican para los Transportadores Asociados al Procesamiento de Antígenos (Tap's) (ver adelante), su limitada naturaleza polimórfica y su expresión inducida por el IFN- γ , son propiedades compartidas por la mayoría de los componentes que se encuentran involucrados en la presentación de antígenos (Brown et al, 1991; Glynn et al, 1991; Kelly et al, 1991; Martínez et al, 1991 y Ortiz-Navarrete et al, 1991a; y Yang et al, 1992). Se ha observado que los LMP's pueden alterar la actividad proteolítica del proteasoma y favorecer la generación de péptidos que se asocian a moléculas MHC (Martínez et al, 1991; Niederman et al, 1995; y Groettrup et al, 1996b). De hecho, se ha visto que deficiencias en la expresión de las unidades enzimáticas de los proteosomas LMP-2 y LMP-7 en ratones desprovistos de estos genes "Knock out", conduce a cambios importantes en la presentación de péptidos antigénicos y por tanto en la generación de respuesta inmune. La carencia de LMP-7 conduce a una disminución en la expresión de moléculas MHC clase I en la superficie celular (25-45% de reducción), influyendo de esta manera en la disponibilidad de péptidos restringidos por moléculas MHC clase I para ser reconocidos por linfocitos T CD8+ (Van Kaer, et al, 1994; Fehling et al, 1994; y van Endert, 1996). Por su parte, la eliminación del gene LMP-2 afecta la producción de distintos epítopes; ya que proteosomas extraídos de células de bazo e hígado de ratones mutantes, presentan una menor proporción de residuos básicos e hidrofóbicos y un considerable aumento de residuos ácidos. La infección con virus de influenza en ratones con carencia de LMP-2, manifestó una reducción de 5-6 veces la frecuencia de precursores CTL (Heemels et al, 1995).

El nivel de expresión de LMP-2 y LMP-7 y su inducibilidad con IFN- γ varía entre los diferentes tejidos (Brown et al, 1991; y Eleuteri et al, 1997). La exposición de las células a IFN- γ resulta en la inducción de los proteosomas 20S en donde las subunidades

constitutivas, X(MB1) y Y(δ) son reemplazadas con LMP-2 y LMP-7 (Belich et al, 1994; y Woodward y Monaco, 1995). Recientemente, se ha descrito una tercer subunidad de proteosoma conocida como MECL-1 (LMP-10), codificada en el brazo corto del cromosoma 16 (Tanaka et al, 1997), dicha subunidad es tambien inducible con IFN- γ y reemplaza a la subunidad de proteosoma Z (Nandi et al, 1996; y Groettrup et al, 1996b). Otra forma de proteosoma es la 26S, constituida básicamente por el proteosoma 20S y otras subunidades adicionales, por ejemplo el activador PA28 (también referido como regulador 11S) cuyo peso molecular es de 29-31kDa. Mediante microscopía electrónica, se ha visto que PA28 se une en un extremo del proteosoma 20S; asimismo, este compete con otro regulador, el 19S, el cual se une también al proteosoma 20S para conformar el proteosoma 26S que en conjunto pesa alrededor de 1,500 kDa (Hoffman et al, 1994). El activador PA28 consiste de seis subunidades que forman un anillo el cual puede unirse a los dos extremos terminales del proteosoma 20S (Gray et al, 1994). Dos diferentes subunidades, llamadas PA28 α y PA28 β estan presentes en iguales proporciones en los anillos del activador PA28 (Mott et al, 1994). Se ha visto que los activadores PA28 y el regulador 19S están en equilibrio dinámico con el proteosoma 20S, de hecho ambos activadores sinergizan con las subunidades LMP-2/LMP-7 para aumentar la proteólisis justamente después de la presencia de un aminoácido hidrofóbico en la secuencia de la proteína blanco (Hoffman et al, 1994; Ustrell et al, 1995; y Groettrup et al, 1996a). En adición, otros investigadores han purificado y caracterizado un complejo de 700kDa compuesto de 16 polipéptidos, llamado PA700, este complejo tiene actividad ATPasa y contiene múltiples subunidades con secuencias consenso para unir ATP. Este modulador, aumenta la actividad del proteosoma 20S en un factor de 8. Un posible papel atribuible a PA700 y otros moduladores, es que este complejo puede asistir en el desdoblamiento y la degradación potencial de sustratos (Ma et al, 1994; y DeMartino et al, 1996).

La degradación de muchas proteínas celulares es iniciada por su modificación con un polipéptido pequeño llamado ubiquitina (Ub); la ubiquitina, se une mediante un enlace isopeptídico, a su sustrato y hacia otras ubiquitinas a través de los residuos de lisina (K). Este proceso requiere de ATP y de varias enzimas que activan a la ubiquitina para interactuar con su sustrato protéico: E1, enzima activadora de la ubiquitina; E2, enzima acarreadora de proteínas; y E3, ligasa de la Ub-proteínas. De esta manera, la ubiquitina marca a las proteínas para su posterior degradación por el complejo 26S (Groettrup et al, 1996b). La identificación de inhibidores dipéptido y tripeptido-aldehídos sobre la actividad enzimática de los proteasomas, dió evidencia directa (in vivo) del papel de

estos complejos multicatalíticos en la generación de péptidos antigénicos a partir de proteínas celulares (Rock et al, 1994). Las subunidades reguladoras del proteasoma 20S están constituidas por varias proteínas accesorias para favorecer la degradación de las proteínas blanco-ubiquitinadas: estas incluyen a un receptor de Ub (Rub), el cual funciona como un sitio de unión para cadenas multiubiquitinadas (Deveraux et al, 1994); y una isopeptidasa, para la reutilización de residuos de ubiquitina (Hochstrasser, 1995). Además, las unidades reguladoras también contienen, al menos seis distintas, pero relacionadas, proteínas de la familia de las ATPasas, se piensa que estas ATPasas interactúan con las subunidades a del proteasoma 20S (Tanaka et al, 1997). Después de la degradación de las proteínas blanco a péptidos, los péptidos deben ser protegidos del ataque de exopeptidasas citosólicas y dipeptidil-peptidasas que los hidrolizan a aminoácidos libres; se piensa que uno de los candidatos idóneos en la protección de los péptidos sean las proteínas de choque térmico (Hsp 70/90), las cuales normalmente funcionan como proteínas chaperonas que se asocian a las proteínas de reciente síntesis en el citosol y también son las responsables de promover el correcto ensamblaje de la cadena alfa y β_2m en el retículo endoplásmico, (Tanaka et al, 1997).

Por otro lado, recientemente se han descrito algunas proteasas adicionales que participan en el procesamiento de antígenos. La presencia de diferentes proteasas fue inicialmente propuesta por Elliot y sus colaboradores al estudiar la naturaleza de los aminoácidos que preceden al residuo amino-terminal de los péptidos que derivaban de una proteína nativa, de la cual se habían identificado 64 epítomos presentables por moléculas MHC-I (Elliot et al, 1995). Este grupo de investigadores, observó que los péptidos, obtenidos de la degradación de esta proteína, eran cortados de manera azarosa. Al no obtener una secuencia lógica de los epítomos, postularon la existencia de otras proteasas, las cuales pudieran estar participando en el citosol o en el lumen del retículo endoplásmico. Más tarde, con ayuda de una vaccinia recombinante que codificaba para péptidos de 12 aminoácidos, un tamaño inapropiado para unirse a las moléculas MHC-I, se pudo lograr la obtención de secuencias de péptidos de 9aa en células deficientes de Tap^s. Asimismo, la presencia de la dipeptidil amino-proteasa expresada simultáneamente y dirigida al interior del retículo endoplásmico, condujo a un incremento en la producción de péptidos en el lumen del retículo endoplásmico (Elliot et al, 1995).

Por su parte, el uso de inhibidores de proteasomas, ha apoyado la idea de la existencia de otras proteasas presentes en el RE para la generación de péptidos (Rock et al, 1994). Otros grupos de investigadores, han descrito varios tipos de actividad enzimática

(endopeptidasas, carboxipeptidasas además de las aminopeptidasas) que cortan en diferentes posiciones de la proteína blanco, al analizar la digestión de fragmentos de nucleoproteínas en el RE (Heemels et al, 1995).

B).- Translocación de péptidos del citoplasma al retículo endoplásmico.

El proceso de translocación de los péptidos citoplasmáticos al RE y al cis-Golgi ocurre principalmente por un heterodímero constituido por las proteínas denominadas Tap-1 y Tap-2 con un peso de 76 kD y 70kD, respectivamente (Kleijmeer et al, 1992; Nefjes et al, 1993a; Androlewicz et al, 1993; y Shepherd et al, 1993). La distribución subcelular de estos transportadores, realizada por microscopía inmunoelectrónica y análisis confocal en RE y cis-Golgi, es consistente con la localización de moléculas MHC-I en este sitio (Kleijmeer et al, 1992).

Las subunidades Tap-1 y Tap-2 están asociadas de forma no covalente, cada proteína tiene 6 dominios transmembranales y un dominio dependiente de ATP, este último se encuentra orientado hacia el citoplasma (Figura 3.4) (Trowsdale et al, 1990; y York et al, 1996). Los genes que codifican para estas dos proteínas con actividad transportadora de antígenos procesados, son homólogos a la familia de genes que codifican para proteínas que median el transporte de compuestos de bajo peso molecular a través de las membranas (Familia de transportadores ABC dependientes de ATP), (York et al, 1996; y Lehner et al, 1996).

Después de que el péptido sale del proteasoma, éste es liberado cerca de los Tap's para poder ser bombeado al RE. La unión del péptido al Tap es independiente de ATP, pero en la traslocación del péptido al RE, es requerida la hidrólisis del ATP (Howard, 1995).

La importancia de los Tap's en la vía de procesamiento y presentación por moléculas MHC-I, fue determinada al observar que en líneas celulares defectuosas en el transporte y presentación de antígeno, al transfectarles los genes de Tap-1 y Tap-2, la expresión de moléculas MHC-I fue reestablecida (Hosken et al, 1990; Monaco, 1992; y Momburg et al, 1994a,b,c).

En estudios realizados *in vitro*, con membranas microsomaes provenientes de células normales, se pudo demostrar que las subunidades de Tap son esenciales para translocar péptidos antigénicos al lumen microsomal para asociarse con moléculas MHC-I, no obstante en membranas provenientes de células mutantes de Tap's no fue posible observar dicho transporte de péptidos (Koppelman et al, 1992).

Retículo Endoplásmico

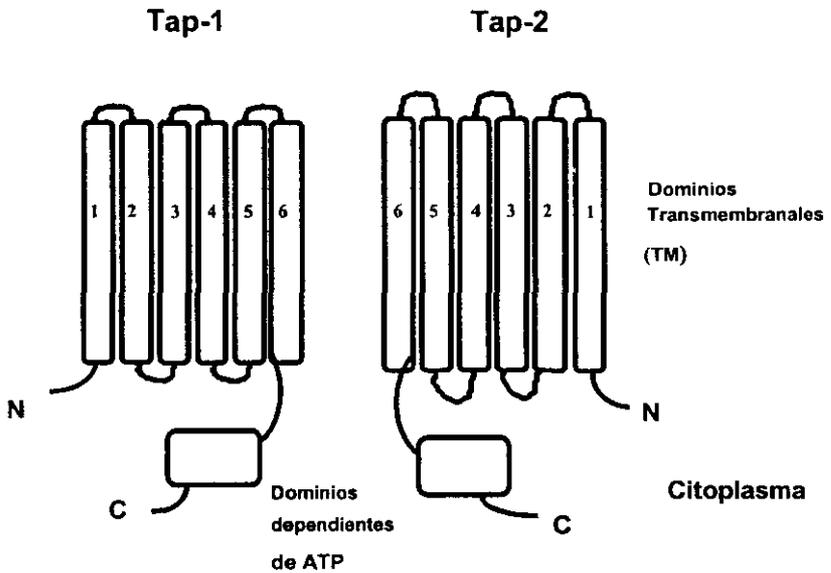


Figura 3.4. Esquema de las moléculas asociadas al procesamiento de antígeno Tap-1 y Tap-2. El heterodímero tiene dos sitios dependientes de ATP que están orientados hacia el citosol, cada proteína tiene seis dominios transmembranales (TM).

El tamaño de los péptidos transportados por los Tap's, también ha sido demostrado en ensayos *in vitro*, en donde se ha encontrado que los Tap's tienen una preferencia a transportar péptidos de entre 8 y 15 residuos aminoácidos, no obstante se ha encontrado que péptidos de mayor longitud (8-33 aminoácidos) pueden ser transportados y posteriormente asociados con moléculas HLA-B27 (Momburg et al, 1994c).

Por otro lado, algunas investigaciones se han enfocado a tratar de encontrar los sitios específicos donde los péptidos son reconocidos por los Tap's. Algunos investigadores han utilizado ensayos de unión de péptidos para medir la afinidad por el Tap, utilizando una gran cantidad de péptidos y variantes de ellos. Otros han encontrado sitios específicos de unión, en donde los grupos de aminoácidos hidrofóbicos en la posición 3 (P3) del péptido son preferidos por los Tap's, al igual que los residuos hidrofóbicos o cargados en la posición P2 (van Endert et al, 1995 y Androlewicz et al, 1996). El uso de péptidos fotomarcados, ha permitido detectar una estrecha asociación entre los Tap's y los péptidos, ya que durante el paso de péptidos al RE se pudo revelar que tanto el Tap-1 y el Tap-2 participan en la translocación de los péptidos (Nijenhuis et al, 1996a,b), sugiriendo que el sitio de unión del péptido está conformado por ambos Tap's (Androlewicz et al, 1992). Los Tap's expresados de manera individual, no mostraron fotomarcado, lo que indicó que ambas subunidades deben estar presentes para que el péptido sea translocado hacia el interior del RE (Russ et al, 1995; y Nijenhuis et al, 1996a).

Los aminoácidos que intervienen en la unión de los péptidos con los Tap's, son denominados "motifs" o aminoácidos ancla; por lo general se encuentran en las posiciones N-terminal y C-terminal de los péptidos y son específicos para cada uno de los alelos de las moléculas MHC-I. Los alelos de Clase-I que prefieren un aminoácido ancla o "motif", predicen la unión con el Tap, por ejemplo, la prolina es característica de la posición 2 en los epítopes de HLA-B7, en la cual los péptidos pueden ser preferencialmente transportados (Neising et al, 1995; van Endert et al, 1995; Androlewicz et al, 1996; y Nijenhuis et al, 1996a).

En células humanas, recientemente se han encontrado cuatro sitios de unión de péptidos con los Tap's; dos con el Tap-1 y dos con el Tap-2. Estos sitios de unión se encuentran localizados en regiones de las cadenas transmembranales (TM) conocidas como TM-6 y TM-5 de ambos Tap's (figura 3.4) y en sus continuaciones extramembranales (Nijenhuis et al, 1996b). Estos datos son consistentes con un modelo de Tap's en el cual los segmentos TM forman un poro en la membrana, lo cual también ha sido observado en

otros transportadores ABC de proteínas de resistencia a multidroga y en canales de cationes (Catteral, 1994).

Los péptidos podrían ser unidos por la entrada citosólica del poro, los cuales serían rodeados por los restantes segmentos TM, permitiendo que múltiples regiones entren en contacto con los péptidos simultáneamente (Nijenhuis et al, 1996b; y Nijenhuis y Hammerling, 1997).

En otros estudios, se ha observado una interacción física entre el complejo Tap y el complejo cadena pesada/ β_2m , al parecer esta interacción es mediada por la subunidad Tap-1 (Suh et al, 1994; y Ortmann et al, 1994). La disociación del transportador con la molécula clase I coincide con la salida del complejo MHC-I/péptido del RE, y al menos *in vitro*, esta disociación puede ser inducida por la adición de péptidos. El transportador se une a complejos pre-ensamblados únicamente, ya que no se ha detectado asociación entre cadenas pesadas libres y los Tap's. Estas observaciones sugirieron la posibilidad de un encauzamiento metabólico para el llenado de moléculas de clase I con péptidos, lo cual se lograría colocando a las recién sintetizadas moléculas de clase I en estrecha proximidad con el Tap-1. Recientemente se describió a una proteína denominada tapasina (ver adelante), la cual actúa como puente de unión entre el Tap-1 y el complejo formado por β_2m /cadena alfa. Esta asociación, además de conferir estabilidad, ayuda a que la implantación del péptido en la cavidad que forman los dominios α_1 y α_2 de las moléculas de clase I pueda ser facilitada, y de esta manera evitar la dilución, salida del RE, o bien la degradación de los péptidos por enzimas localizadas en el RE (Vinitsky et al, 1997).

Por otro lado, las variantes alélicas de Tap's pudieran estar implicadas en varias enfermedades. Antes de la identificación molecular de los Tap's, en rata se descubrió un locus polimórfico en la región del MHC clase II, el cual fue capaz de alterar la capacidad antigénica y bioquímica de una molécula MHC-I en rata, la molécula RT1A^a (Livingstone et al, 1989; Livingstone et al, 1991; y Powis et al, 1991). Más tarde se describió que dos variantes llamadas modificadoras del locus clase I (cim^a y cim^b) eran los responsables de estas alteraciones. En presencia del alelo cim^a, las moléculas clase I RT1A^a son rápidamente transportadas a la superficie celular; mientras que en presencia del alelo cim^b, el transporte de RT1A^a es deficiente y el reconocimiento por ciertas células T es inhibido. De hecho, la variación alélica de Tap-2 en rata altera el comportamiento de la molécula RT1A^a. Los péptidos asociados con moléculas clase I RT1A^a producidos por células con cim^a o cim^b, presentan diferentes patrones de elución, por ejemplo, aquellos

provenientes de cim^a fueron más hidrofílicos. Estos resultados establecieron que la variación alélica en los genes del transportador, al menos en rata, pueden alterar el repertorio de péptidos que se unen a moléculas MHC-I. Por su parte, el polimorfismo de los genes de Tap para humano y ratón parece ser más limitado y tienen poco o ningún efecto en la especificidad de translocación (Schumacher et al, 1994b; Marusiana et al, 1997; y Daniel et al, 1997). Para el ratón se han identificado 4 alelos de Tap-1 y 7 alelos de Tap-2 (Gaskins, 1992). Asimismo, mediante análisis de cadena sencilla de ADN, se han identificado 4 posibles alelos de Tap-1 y 8 posibles alelos de Tap-2 en humano. En adición, análisis basados en PCR de un grupo de líneas celulares homocigóticas y controles caucásicos, han revelado la existencia de 3 alelos de Tap-1 y 5 alelos de Tap-2 (Colonna et al, 1992; Powis et al, 1992; Carrington et al, 1993; y Powis et al, 1993).

La generación de la mayoría de los péptidos que se asocian a moléculas MHC-I proviene de la proteólisis citosólica, para que éstos a su vez sean transportados al RE por los Tap's. Sin embargo, poco se sabe acerca de cómo las proteínas son seleccionadas en el citosol para la producción de péptidos, y sobre la naturaleza de las proteasas participantes en la generación de los péptidos. En células deficientes en Tap's, se ha visto que una gran cantidad de péptidos puede ser liberada en el RE a partir de precursores de gran longitud, mediante la translocación vía péptidos señal en su porción N-terminal, lo que postuló que la presencia de exopeptidasas en el interior del RE pueda ocurrir (Snyder et al, 1994 y Elliot et al, 1995; y Hammond et al, 1995b). Una proteína denominada Jaw1, proteína residente en el RE y limitada a células hematopoyéticas, fue identificada como una endopeptidasa capaz de generar péptidos en el RE de manera independiente a la de los proteasomas y Tap's (Pamer y Cresswell, 1998). Esta ruta está basada en la alta eficiencia de liberación de péptidos a partir del extremo carboxilo-terminal de proteínas de membrana situadas o translocadas en el RE (Snyder et al, 1997). Otros mecanismos que involucran el retrotranslocamiento de péptidos desde el RE al citosol y la subsiguiente captura y retranslocación al RE por Tap's, también han sido considerados como fuentes de péptidos para ser presentados en el contexto de moléculas MHC-I (Roelse et al, 1994).

C).- Estabilización y ensamble de moléculas MHC-I.

Aunque algunos péptidos pueden unirse a cadenas pesadas libres (Elliot et al, 1991; y Machold et al, 1995), la mayoría de las cadenas pesadas de clase I se pliegan, se asocian con β_2m y luego unen al péptido (Burshtyn et al, 1993; y Nefjes et al, 1993b). A

pesar de que el ensamble puede ser reconstituido in vitro a partir de subunidades purificadas, las cadenas peptídicas recién sintetizados, deben de completar su plegamiento y ensamble antes de que lleguen a la superficie celular. Este proceso es mediado por interacciones transitorias con chaperonas moleculares que residen en el lumen del RE, tal como BiP, GRP94 y calnexina (Hurtley et al, 1989; y Gething, 1992).

La chaperona mejor caracterizada por su participación en los eventos de ensamble de moléculas MHC-I es la calnexina, una proteína de membrana residente en RE con un peso de 88 kDa (p88) en el ratón y 90 kDa en el humano (IP90) (Ahluwalia et al, 1992; y Galvin et al, 1992). Se sabe que en ratón, la calnexina se asocia con las recién sintetizadas cadenas pesadas de clase I durante, o poco después de su traslocación en el RE, además también se ha encontrada asociada con las cadenas pesadas y β_2m (Degen et al, 1992; y Rajagopalan et al, 1994). En ausencia de β_2m , el ensamble de los complejos de clase I no pueden ser completados, y consecuentemente, las cadenas pesadas permanecen unidas firmemente a la calnexina hasta que son degradadas, mientras que en la presencia de cadenas pesadas, β_2m y péptidos, la interacción con la calnexina es momentánea (Galvin et al, 1992; y Ahluwalia et al, 1992).

En células humanas, la calnexina se asocia preferentemente con la cadena pesada (Ortmann et al, 1994; Sugita et al, 1994; y Noessner et al, 1995). Asimismo, se ha encontrado que la disociación de la calnexina con la cadena pesada parece ser independiente de la presencia de péptidos, siendo la asociación entre la β_2m con la cadena pesada la que provoca la disociación con la chaperona (Sugita et al, 1994). Otra chaperona denominada BiP, se ha visto que tiene similar actividad que calnexina, actuando específicamente con la cadena pesada de las moléculas MHC-I (Noessner et al, 1995).

En una línea celular carente de calnexina, se ha encontrado que el ensamble y el transporte de moléculas MHC-I no son afectados (Scott et al, 1995), por lo que calnexina parece no ser esencial para el transporte de las moléculas MHC-I. Al analizar a otras chaperonas que podrían tener una función similar a la calnexina, se encontró que la calreticulina cumplía con una función similar (David et al, 1993). La calreticulina es una proteína de 46kD encontrada en el lumen del RE, tiene alto grado de homología a la calnexina y tiene alta afinidad por iones calcio que se localizan en el RE (Sonnichsen et al, 1994). Al igual que calnexina, la calreticulina se asocia a glicanos monoglucosilados por medio de uniones N-terminal (Hammond et al, 1994; Nauseef et al, 1995; Peterson et al, 1995; Wada et al, 1995; y Ware et al, 1995); recientemente, también se le ha

encontrado como chaperona de glicoproteínas tales como mieloperoxidasa, hemaglutinina de influenza y transferrina (Li et al, 1993; Nauseef et al, 1995; Peterson et al, 1995; y Wada et al, 1995).

Estudios más recientes, demuestran que calreticulina tiene un comportamiento marcadamente diferente al de calnexina, puesto que se asocia sólo con los dímeros formados por la cadena pesada y β_2m (Sadasivan et al, 1996). Al mismo tiempo, se encontró que en los precipitados de Tap's-MHC-I, una glicoproteína de 48 kDa fue identificada, después de ser caracterizada, se le asignó un papel de conectora entre las moléculas MHC-I y los Tap's, por tal motivo se le ha denominado tapasina (Ortmann et al, 1994; y Sadasivan et al, 1996).

La Tapasina es una glicoproteína transmembranal de 428 aminoácidos con un glicano unido a asparagina (Ortmann et al, 1997). La región hidrofóbica que forma el dominio transmembranal, contiene un residuo de lisina el cual puede participar en la interacción con otras proteínas, por ejemplo Tap-1. El gene que codifica para tapasina se encuentra codificado en la región del MHC, aproximadamente a 200kb del loci HLA-DP y 500kb de los genes Tap-1 y Tap-2 (Pamer y Cressell, 1998). El papel preciso de tapasina en el ensamble de las moléculas MHC-I resulta no claro, sin embargo se tienen evidencias de que tapasina pueda formar tetrámeros al asociarse con Tap-1, o dímeros o monómeros que independientemente se asocian con Tap-1 y Tap-2. Lo que ha sido claro, es que cada molécula de tapasina puede unir un dímero formado por la cadena alfa y β_2m , y probablemente una molécula de calreticulina asociada (Ortmann et al, 1997). En consecuencia, la interacción multimérica de tapasina con el complejo clase-I/ β_2m y Tap, puede jugar un papel importante para incrementar la posibilidad de que los péptidos translocados puedan unirse a las moléculas clase I asociadas a Tap (Pamer y Cresswell, 1998).

D).- Transporte de los complejos MHC-I/péptido a la superficie celular.

Cuando la molécula de clase I se encuentra ensamblada junto con su péptido, es transportada desde el RE hacia el aparato Golgi, donde es englobada en una vesícula secretoria y posteriormente transportada a la membrana citoplasmática para fusionarse con ella y dejar expuestas y ancladas a las moléculas clase I del MHC que expondrán su péptido para ser reconocido por los linfocitos T citotóxicos (Rock et al, 1991a; Benjamin, et al, 1991; Benham et al, 1995; y Uebel et al, 1995). Por lo general, muy pocas moléculas MHC-I que carecen de péptidos se encuentran en la membrana celular,

esto se debe a que muchas moléculas MHC-I vacías, son retenidas en el RE. No obstante, cuando las moléculas MHC-I presentes en la membrana pierden sus péptidos o éstos son disociados, el heterodímero (α/β_2 microglobulina) es inestable y se disocia rápidamente (Ortiz-Navarrete, et al, 1991b; Rock et al, 1991; y Neefjes et al, 1992a,b). Estos mecanismos limitan la asociación de péptidos exógenos y aseguran que los péptidos presentados sean los sintetizados por las células mismas (Rock et al, 1991).

La vida media de las moléculas MHC-I en la superficie celular, varía considerablemente dependiendo del tipo celular y de la clase particular del alelo; por ejemplo en linfoblastos T, la vida media de las moléculas en membrana es de 5h, mientras que en linfoblastos B es de 20h (Machy et al, 1989). En el caso de los alelos MHC-I, en el caso de H-2K^k, la vida media puede ser más de 20h (Machy et al, 1989), mientras que para H-2L^d, es de aproximadamente 2h, aunque esta vida media corta puede ser debida a la carencia de péptidos (Smith et al, 1992). Una característica importante en la estabilidad de moléculas MHC-I es la tasa de disociación de péptidos y β_2 -microglobulina. Cuando el heterodímero se disocia, la cadena pesada resultante es translocada hacia el citoplasma y entonces degradada por los proteasomas (Rock et al, 1991; Ortiz-Navarrete et al, 1991b; Otten et al, 1992; y Hughes et al, 1997). En muchos tipos celulares, el complejo trimolecular no es constitutivamente internalizado, aunque los ligandos multivalentes, pueden inducir su internalización (Machy et al, 1987). En linfocitos T y macrófagos, las moléculas MHC-I son espontáneamente endocitadas a través de clatrina mediante señales mediadas en la porción citoplasmática de la cadena pesada (Tse et al, 1984; Machy et al, 1987; Dasgupta et al, 1988; y Vega et al, 1989).

3.3.4. Vías alternas de fuentes de péptidos antigénicos presentados por moléculas MHC-I.

El análisis de la composición de péptidos asociados a moléculas MHC-I, permitido sugerir que existen varias vías alternativas en la generación de péptidos antigénicos. Se ha observado que la línea celular mutante T2, la cual carece de los genes que codifican a los Tap's y a los LMP's, presenta péptidos asociados a moléculas HLA-A2.1, comparable al de células normales. Al analizar la composición de sus péptidos, se observó que las moléculas se encontraban ocupadas por seis especies de péptidos que representaban el 50% del total (Henderson et al, 1992; y Wei et al, 1992). Debido a que estas seis especies de péptidos se originan a partir de proteínas translocadas al interior del RE o por dominios de secuencias señal, se propuso que los péptidos que se asociaban a

moléculas HLA-A2.1 eran producidos después de la proteólisis de las secuencia señal en el RE, por la acción de enzimas proteolíticas residentes en el RE (Henderson et al, 1992; y Wei et al, 1992). En el caso de la molécula HLA-B7 de células normales, también se han encontrado péptidos que provienen de secuencias señal (Huckzo et al, 1993). En moléculas MHC-I de ratón, se logró identificar a un péptido restringido a la molécula clase I de ratón H-2D^b del virus de la coriomeningitis linfocítica, el cual deriva de la secuencia señal del precursor glicoproteico GP-C (Buchmeier et al, 1992). Esta segunda vía puede dar lugar a péptidos que son potencialmente reconocidos por linfocitos T y puede considerarse como una vía alternativa durante una respuesta inmune normal, con lo que cabe la posibilidad de que existan epítomos peptídicos en el dominio de secuencias señal de proteínas. De esta manera, una gran variedad de proteínas de membrana pueden también ser presentadas en asociación con moléculas MHC-I, estas incluyen a: proteínas de cápside viral, antígenos tumorales, aloantígenos, moléculas MHC y varias moléculas que funcionan como receptores (Siliciano, et al 1995). Recientemente se ha propuesto que los productos defectuosos de los ribosomas (DRIP's), que consisten de polipéptidos terminados de manera prematura durante la síntesis de proteínas, puedan ser una fuente significativa de péptidos propios o virales (Yewdell et al, 1996). Las proteasas lisosomales, también funcionan como generadoras de péptidos, después de que las proteínas citosólicas reaccionan con los lisosomas en un proceso denominado autofagia (Janeway et al, 1997).

3.4. PRESENTACION DE ANTIGENOS POR MOLECULAS MHC CLASE Ib Y CD1.

Las moléculas MHC clase Ib (HLA-E, F y G) al igual que las moléculas MHC clase Ia (HLA-A, B y C), son codificadas en el cromosoma 6. Por su parte, las moléculas CD1 no son codificadas en el MHC, sin embargo, comparten características estructurales con las moléculas MHC-I, además de asociarse también con β_2m (Melian et al, 1996).

3.4.1. Presentación por moléculas MHC clase Ib.

Una de las moléculas clase Ib más estudiadas es la molécula de ratón H2-M3. Esta molécula fue identificada debido a que presenta péptidos mitocondriales a CTL's, específicamente péptidos que contienen N-formi-metionina en el extremo N-terminal (Lindahl et al, 1997). Estudios de cristalografía de rayos X y de elución de péptidos a partir de estas moléculas, han permitido caracterizar péptidos más cortos que aquellos presentados por las moléculas MHC-1a. Por ejemplo, se han identificado a los péptidos

fMYFINILTL, fMIGWIIA y f-MIVIL, provenientes de *Listeria monocitogenes*, asociados a la molécula H2-M3 (Gulden et al, 1996). Otras moléculas MHC-Ib de ratón, Qa-1 y Qa-2, han sido caracterizadas por presentar péptidos derivados de secuencias señales, en particular Qa-1 presenta péptidos de la molécula clase I H2-Dk de manera dependiente de Tap's (Aldrich et al, 1994). Asimismo, moléculas humanas como HLA-E también han sido caracterizadas por presentar péptidos de secuencias señal (Braud et al, 1997),

3.4.2. Presentación por moléculas HLA-G.

Estas moléculas se expresan preferencialmente en células citotrofobásticas de placenta y también sobre macrófagos inducidos con interferón- γ (Shawar et al, 1994; y Yang et al, 1996). Un aspecto interesante sobre estas moléculas, es que se le puede encontrar expresada naturalmente de manera soluble (Fuji et al, 1994), o también asociada a la membrana del RE con Tap. El espectro de péptidos unidos a ambas formas (soluble y de membrana), es similar y análisis de secuencias de péptidos disociados de esta molécula han reportado a dos motivos: una Prolina en la tercer posición y una Leucina en el carboxilo terminal (Lee et al, 1995).

3.4.3. Presentación de antígenos por moléculas CD1.

Aunque las moléculas CD1 humanas y de ratón tienen rasgos estructurales similares a los de las moléculas MHC-I, estas moléculas no son codificadas en el MHC (Melian et al, 1996). El papel funcional de las moléculas CD1 en la defensa contra infecciones, se determinó al encontrar que las moléculas CD1b y CD1c humanas presentan antígenos micobacterianos a linfocitos T (Porcelli et al, 1992; y Beckman et al, 1996). Las moléculas CD1b, a diferencia de las moléculas MHC-I, se caracterizan por presentar glicolípidos, más que péptidos a linfocitos T, por ejemplo ácido micólico y lipoarabinomanana (LAM) (Beckman et al, 1994; y Sieling et al, 1995). Las moléculas CD1 requieren de β_2m para ser transportadas a la superficie celular, no obstante, a diferencia de muchas moléculas MHC-I, el cargado de epítomos de estas moléculas, parece ser independiente de Tap's (Brutkiewicz et al, 1995; y Teitell et al, 1997). El mecanismo de procesamiento y presentación de antígenos por moléculas CD1 también tiene rasgos similares a los de la vía de moléculas MHC-II; las moléculas MHC-II son protegidas por la cadena invariante antes de recibir a los péptidos en los endosomas tardíos, mientras que las moléculas CD1 son protegidas mediante su dominio citoplasmático. En un estudio

reciente, se demostró que los macrófagos, a través de su receptor de manosa unen LAM sobre su superficie celular y después lo depositan en los endosomas tardíos, donde las moléculas CD1 los intersectan y presumiblemente unen al LAM (Sugita et al, 1996; y Prigozy et al, 1997).

Debido a que el mecanismo de procesamiento y presentación de CD1 coincide parcialmente con los mecanismos de MHC-I y MHC-II, y porque los antígenos presentados por CD1 son diferentes a los de MHC-I/II, se ha sugerido que esta vía podría ser considerada como una tercer vía de procesamiento y presentación de antígenos (Melian et al, 1996; y Pamer y Cresswell, 1998).

3.5. POLIMORFISMO Y ESPECIFICIDAD EN LA PRESENTACION DE PEPTIDOS.

El MHC-I ha evolucionado en términos de variabilidad entre los individuos, lo cual se muestra con un sistema altamente polimórfico basado en la presencia de alelos múltiples. Parte del polimorfismo del MHC precede a la divergencia de las especies, lo que sugiere que es el resultado de mutaciones acumuladas a través de millones de años de evolución. En los humanos, más de 100 estructuras distintas de moléculas de clase I y II han sido identificadas (Germain et al, 1993). Esta variación proviene de múltiples alelos en un locus; y en caso de las moléculas de clase II, a través de la transcomplementación entre las cadenas alélicas α y β (Heemels et al, 1995). En la superficie de las células de un individuo normal heterocigótico se pueden detectar hasta seis diferentes moléculas de clase I y por lo menos el mismo número de moléculas de clase II, estas moléculas son heredadas de manera codominante, es decir una proviene del padre y la otra de la madre (York et al, 1996; y Germain, 1994). La fuerza que dirige la expresión de múltiples isoformas, así como la variedad estructural que se encuentra dentro de las especies, es determinada casi en su totalidad por el incremento en las oportunidades de que al menos una molécula del MHC sea capaz de encontrar al menos un péptido derivado de cualquier patógeno. Sin embargo, debido a que cada individuo expresa sólo un pequeño número de diferentes moléculas MHC, cada isoforma debe de ser capaz de unir a una amplia cantidad de péptidos diferentes para así lograr una respuesta inmune a una gran variedad de patógenos (York et al, 1996).

La mayoría de los residuos polimórficos de las moléculas clase I se localizan en las α -hélices y en el piso de β -plegados que forman el nicho de unión de péptidos (Figura 3.5a); mientras que las orillas de la cavidad de la moléculas clase I del MHC se encuentran cerradas. A través de la cristalografía de rayos X, se ha podido analizar la interacción que

existe entre el péptido y la molécula MHC. Se ha podido revelar que los residuos N- y C-terminales del péptido están cubiertos o sujetos a las orillas de la cavidad mediante puentes de hidrógeno, los cuales se encuentran en residuos de aminoácidos que son constantes en todas las formas alélicas de las moléculas MHC-I (Williams et al, 1996). Las interacciones laterales del péptido con la cavidad son de gran relevancia, puesto que la energía de unión adicional proviene de las interacciones que involucran al esqueleto del péptido, lo que provoca una orientación común para los péptidos en los sitios de unión (Figura 3.5b). Estas interacciones delimitan un tamaño para los péptidos que se asocian a moléculas clase I, el cual es de nueve residuos en promedio, no obstante se ha observado que existen péptidos mayores a nueve aminoácidos (Guo et al, 1992; y Kubo et al, 1994).

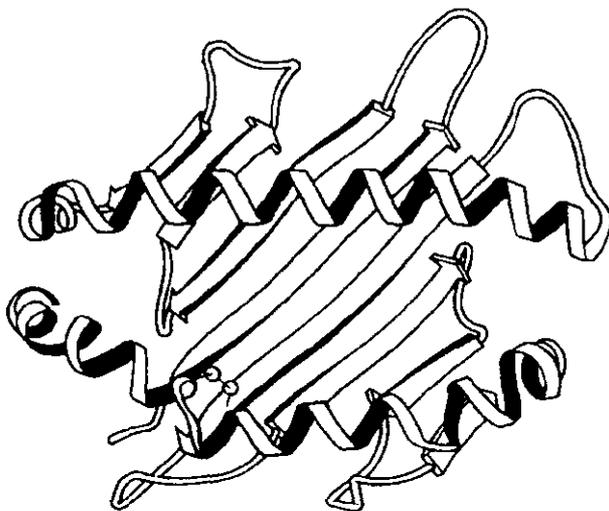
Los grupos de aminoácidos de la cavidad de la molécula MHC que forman los enlaces específicos con los péptidos, se denominan "receptáculos". Estas conformaciones se encuentran en el piso de la cavidad, lo constituyen las cadenas β -plegadas y las paredes de las α -hélices de la cavidad. Dependiendo del alelo, los receptáculos varían en su profundidad, orientación y naturaleza química, lo que le confiere la capacidad de poder unir a un péptido particular (Figura 3.5c), (Young et al, 1995).

Los aminoácidos de los péptidos que están orientados hacia la cavidad de las moléculas de clase I son denominados aminoácidos "ancla". Cada péptido posee de 1 a 3 residuos ancla, los cuales se localizan principalmente en los extremos o en la posición central del péptido y son característicos para cada alelo, (Grey et al, 1995).

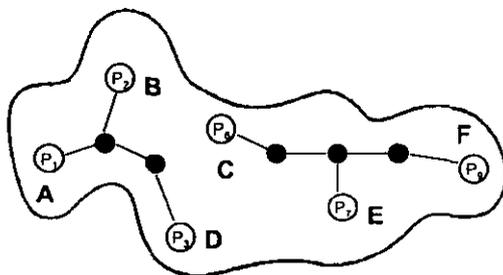
Los otros aminoácidos que forman el péptido se asocian en forma "laxa", lo cual explica que fuera de los aminoácidos ancla, existe una gran variabilidad de los aminoácidos presentes en los péptidos inmunogénicos, esto hace que múltiples péptidos puedan ser presentados bajo el mismo contexto alélico de moléculas MHC (Falk et al, 1991a,b; y Grey et al, 1995).

Un aspecto fundamental del reconocimiento del antígeno por las células T auxiliares y T citotóxicas, es que el linfocito se restringe a reconocer a un sólo péptido. Las combinaciones, asociadas con la amplia diversidad de péptidos que pueden formarse, hacen que el péptido pueda ser reconocido, sólo si está unido a un producto alélico característico del MHC. Este fenómeno es llamado restricción por el MHC, y las bases moleculares del reconocimiento del antígeno restringido por MHC mediante las Células T, han sido demostradas por estudios paralelos enfocados sobre la estructura del Receptor del Linfocito T (Young et al, 1995).

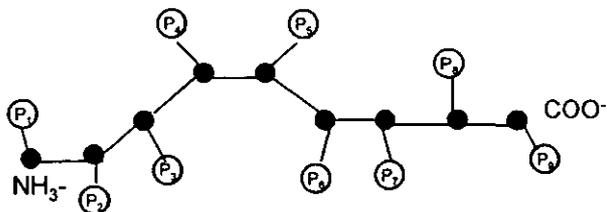
(A)



(B)



(C)



RECEPTACULOS

A B D C E F

Figura 3.5. Interacción del péptido con moléculas clase I del MHC. A) Vista superior de la cavidad de unión del péptido de una molécula MHC-I; B) Representación de la conformación del nonapéptido y la localización de sus cadenas laterales en la cavidad de la molécula MHC-I, la localización de los espacios de acoplamiento (receptáculos), también es mostrada. C) Representación de la orientación de las cadenas laterales de un nonapéptido; los residuos P1, P4 y P5 del péptido, sobresalen de la cavidad y son factibles de ser reconocidos por el linfocito CD8+. Los círculos negros representan el esqueleto de carbonos del péptido, y los círculos abiertos representan a las cadenas laterales del péptido (Tomados de Austyn et al, 1994; y Janeway et al, 1997).

La capacidad de las moléculas de clase I para unir a un gran número de péptidos distintos es de gran importancia para la función que desempeñan. El análisis de los péptidos mediante espectrometría de masas mediante ionización, ha proporcionado evidencia directa de esta capacidad. A partir de una evaluación de la complejidad de péptidos procesados naturalmente y asociados con moléculas del MHC, se han logrado detectar más de 2,000 péptidos distintos asociados con la molécula clase I HLA-A2.1 y -B7 (Huckzo et al, 1993; y Engelhard et al, 1994). La representación de péptidos individuales es absolutamente variable, por ejemplo, en un análisis espectrométrico de masas de péptidos asociados con HLA-A2.1, se observó que casi el 90% de los péptidos asociados estaba presente en una proporción de 0.01%-0.1% del total del extracto, o lo que es lo mismo 100-1000 complejos por célula. Con el uso de grandes cantidades de material (2×10^{10} células) y con ayuda de la separación adicional por HPLC, se han logrado visualizar péptidos que representan hasta una copia por célula (Engelhard et al, 1994). Tomando en consideración que una célula expresa de 10^5 - 10^6 moléculas de MHC en su superficie, y si tan sólo el 1% de las moléculas del MHC estuvieran ocupadas por péptidos de la abundancia referida, el número total de péptidos distintos presentados podrían ser más de 10,000. Mediante el análisis de espectrometría de masas y análisis de Edman se ha podido detectar que el péptido más abundante asociado con moléculas de clase I es de 0.4-1% con respecto al número total de péptidos (Hunt et al, 1992; Huckzo et al, 1993; DiBrino et al, 1993; y Engelhard, 1994). Interesantemente, un grupo de investigación logró estimar que un péptido del virus de estomatitis vesicular ocupaba más de 5% de las moléculas H-2K^b en una célula infectada (van Bleek et al, 1990). El determinar si este número tan alto e inusual proviene de una infección viral o de otros cambios en el metabolismo celular aún no ha sido dilucidado.

El impacto en el sistema inmune de esta amplia cantidad de péptidos es todavía incierta. Se ha estimado que el número mínimo de complejos MHC-péptido expresados en las células y que son reconocidos por los linfocitos T como epitopos están generalmente en el intervalo de 100-500 complejos por célula (Demotz et al, 1990; Rötzchke et al, 1991; Falk et al, 1991b; Christnick, et al, 1991; y Wallny et al, 1992). No obstante, algunos epitopos pueden estar presentes en cantidades significativamente mayores o menores, dependiendo quizás de la abundancia relativa de la proteína de origen (Zahang et al, 1993).

3.6. IDENTIFICACION DE EPITOPOS.

Actualmente existen algoritmos que permiten la identificación de la secuencia más probable de una proteína para poderse unir a moléculas MHC (Rothbard et al, 1988; Cornette et al, 1989; y Parker et al, 1995). La predicción de epítomos peptídicos restringidos a moléculas MHC-I que sean capaces de ser reconocidos por linfocitos T citotóxicos, ha sido más viable debido a las secuencias cortas de 8-10 aminoácidos y a su alta especificidad alélica (Rothbard et al, 1990). En contraste, la identificación de péptidos para moléculas MHC-II ha sido más problemático, en consecuencia, varios grupos han usado la información acerca de los aminoácidos ancla y su papel en la unión del péptido con las moléculas clase I, con la finalidad de poder definir péptidos que sean óptimos como epítomos (Rotzchke et al, 1991; Bednarek et al, 1991; Wallny, et al, 1992; Traversari, et al, 1992; y Bertoletti et al, 1993).

Por medio de HPLC en fase reversa, se ha podido establecer que los péptidos sintéticos utilizados en ensayos de unión, son idénticos a los péptidos que se producen de manera natural en la célula y que se asocian a moléculas MHC, además de reconstituir la actividad de extractos celulares y migrar en un patrón similar cuando son sometidos a HPLC de fase inversa (van Bleek et al, 1990; Rotzchke et al, 1990a; y Falk et al, 1991). Una extensión importante de este tipo de trabajos ha sido la identificación de epítomos peptídicos restringidos a moléculas MHC a partir de la secuencia de una proteína intacta (Rammensee et al, 1995).

Actualmente el uso de aminoácidos ancla específicos para algún alelo (Tabla 3.2), ha facilitado la identificación de epítomos por medio de ensayos de unión, estimulación y citotoxicidad de linfocitos CD8+ al utilizar un número relativamente pequeño de péptidos sintéticos (Hill et al, 1992; Pamer et al, 1992; Cossins et al, 1993; Skipper et al, 1993; y Parker et al, 1995).

Varios investigadores han intentado definir, mediante algoritmos de predicción, a péptidos provenientes de proteínas virales u otras proteínas con características altamente antigénicas, basándose en los residuos de anclaje y en un tamaño óptimo (8-11 residuos). En muchos casos, la unión de estos péptidos suele ser débil a pesar de la presencia del aminoácido ancla óptimo (Maryanski et al, 1991; Parker et al, 1992; Elliot et al, 1992; Jameson et al 1992; Rupert et al, 1993; Zhang et al, 1993; Nijman et al, 1993; y Parker et al, 1995), sin embargo al considerar al aminoácido del extremo C-terminal y residuos internos del péptido, como residuos ancla dominantes, se han podido identificar varios epítomos peptídicos que son reconocidos por las células T (Takahashi et al, 1991;

Hahn et al, 1992; Bertoletti et al, 1993; y Engelhard, 1994). Adicionalmente, muchos péptidos carecen de residuos principales para el anclaje, pero pueden expresar residuos secundarios inusuales (Huckzo et al, 1993; y Engelhard, 1994). Obviamente, aún queda mucho por descubrirse acerca de los factores que controlan la unión y estabilidad de un péptido a moléculas del MHC.

Tabla 3.2. Principales aminoácidos de anclaje dominantes y auxiliares de péptidos que se asocian a algunos alelos del MHC clase I en humanos (Tomado de Paker et al, 1995; y Rammensee et al, 1995).

POSICION	2	3	4	5	6	7	8	9
HLA-A1	T/I	E/D ¹	P			L/M/I		Y
HLA-A2	L/M				V			V/L
HLA-A3	L/V/M	F/Y			NC ²	L/F/Y		Y/K/F
HLA-A11	Hi ³							K
HLA-A24	Y			I/V	F			F/L/I
HLA-A31	L/V/Y/F	F/L/Y/W			L/F/V/I			R
HLA-A33	A/I/L/F/Y							R
HLA-Aw68	V/T							R/K
HLA-B7	P	R						L/F
HLA-B8	L/P	K/R		K/R			L ⁴	L
HLA-B14	R/K	L/Y/F		R/H	I/L			L
HLA-B27	R	Y/F/I						F/Y/I/L
HLA-B35	P							Y/Hi
HLA-B37	D/E			V/Hi				F/I/L/Hi
HLA-B38	H	D/E						F/L
HLA-B39	R/H/K/Q				I/V/L			L
HLA-B40	E	F/I/V						L/W/M/A
HLA-B44	E	I	P		V			F/Y
HLA-B51	A/P/G							F/I/V
HLA-B52	Q	F		L			I	I/V
HLA-Bw53	P		E					
HLA-B58	A/S/T		P					F/W
HLA-B60	E					I/V		L
HLA-B61	E	F/I/L/V/Y			I			V
HLA-B62	Q/L			I/V				F/Y
HLA-B78	P/A/G				I/L/F/V		A ⁴	
HLA-Cw3		Hi	P		F/Y			L/F/I/M
HLA-Cw4	Y/F/P				V/I/L			L/F/M
HLA-Cw6	P/R			I/L	V/I/L			L/I/V/Y
HLA-Cw7	Y/P			V/Y	V/I			Y/F/L

¹ Residuos ancla que son dominantes se encuentran en negrillas.

² NC indica residuos de aa no cargados.

³ Hi indica aa hidrofóbicos.

⁴ P8 es el aa C-terminal.

Los residuos de anclaje pueden ser de gran utilidad para la predicción de epítopos si se usan con flexibilidad. De acuerdo a un análisis sistemático de los péptidos que se unen a HLA-A2.1, se ha desarrollado un algoritmo capaz de predecir péptidos con gran capacidad de unión a esta molécula (Rupert et al, 1993; y Parker et al, 1995).

3.7. TECNICAS UTILIZADAS PARA EL ANALISIS DE PEPTIDOS ASOCIADOS A MOLECULAS MHC-I.

3.7.1. Purificación de péptidos.

Los péptidos procesados naturalmente que se asocian a moléculas clase I y II del MHC son, por lo general, aislados de material que ha sido previamente purificado por inmunoafinidad, seguido por una separación basada en el tamaño de proteínas purificadas (van Bleek et al, 1990; y Buus et al, 1988 y Rötzchke et al, 1990). La aplicación de estas técnicas en la obtención y purificación de los péptidos, ha permitido obtener un aprovechamiento de entre el 70-80% de las moléculas MHC aisladas de las células en cuestión (Hunt et al, 1992a,b; Henderson et al, 1992; Huckzo et al, 1993; y Chicz et al, 1993).

El análisis de los péptidos asociados a una amplia gama de moléculas MHC humanas ha sido obstaculizado por la falta de anticuerpos monoespecíficos para la purificación de isoformas del MHC, requiriéndose el uso de células homocigotas o transfectadas, o bien la eliminación secuencial de moléculas MHC usando de manera progresiva anticuerpos menos selectivos (Rötzchke et al, 1991).

Una de las primeras técnicas utilizadas en la purificación de péptidos, se basó en la extracción de proteínas de superficie celular, mediante el uso de células completas tratadas con ácido trifluoroacético aunque de esta manera los extractos contenían moléculas del MHC y péptidos asociados a ellas, también existía material protéico altamente inespecífico. No obstante, esta técnica ha tenido gran importancia en el aislamiento de péptidos que representan etapas intermedias en la purificación de antígenos (Wallny et al, 1990; y Rötzchke et al, 1990a,b).

3.7.2. Secuenciación de la mezcla de péptidos.

La identificación de péptidos individuales asociados con moléculas clase I a partir de la secuenciación de una mezcla de péptidos, puede ser facilitada si se consideran los residuos de anclaje correspondientes a alguno de los alelos de las moléculas MHC del cual derivó dicha mezcla. Sin embargo, como los péptidos extraídos a partir de un alelo

representan una mezcla compleja de distintas especies de baja abundancia, el aislamiento de péptidos individuales ha sido un factor limitante para su análisis. La estrategia más usada, emplea el HPLC en fase reversa para resolver parcialmente a la mezcla de péptidos, seguido por la secuenciación directa de Edman del material contenido en picos dominantes de mayor definición (Jardetzky et al, 1991; y Rudensky et al, 1991). El uso de este protocolo se encuentra limitado por el hecho de que los picos individuales obtenidos por HPLC aún contienen múltiples especies de péptidos. Este problema ha sido, en muchos casos, solucionado mediante el uso de espectrometría de masas para identificar a las masas individuales en fracciones de HPLC, cuyo tamaño puede ser correlacionado con la información de la secuencia obtenida por la degradación de Edman (Chicz et al, 1992; y Chicz et al, 1993).

Otra técnica usada para identificar a los péptidos asociados a moléculas del MHC, ha sido mediante el uso de HPLC microcapilar en combinación con ionización por electrospray/espectrometría de masas en tándem (Hunt et al, 1992a; y Hunt et al, 1992b). En esta técnica los péptidos son separados por uno o más pasos de HPLC en fase reversa, y luego por la relación masa/carga en el espectrómetro de masas. Las especies individuales son secuenciadas directamente en el espectrómetro de masas por el análisis de disociación activada por colisión (Hunt et al, 1986). La información de una secuencia puede ser obtenida hasta con 300 fmol de péptido, lo cual es significativamente menor a lo requerido en el análisis de Edman, que necesita de corridas adicionales en derivados del péptido modificado químicamente e interpretación de varios espectros de masa. Debido a su capacidad de resolver la secuencia de péptidos, la técnica de HPLC microcapilar proporciona la información más detallada acerca de la complejidad de la mezcla de péptidos asociados a moléculas MHC (Engelhard, 1994; y Rammensee et al, 1995).

3.8. CANCER CERVICO UTERINO Y SU ETIOLOGIA CON VIRUS DE PAPILOMA HUMANO (HPV).

En México la enfermedad neoplásica que ocupa el primer lugar de mortandad es el Cáncer Cérvico-Uterino (CaCu), que además tiene una alta incidencia en mujeres jóvenes en etapa reproductiva (Meneses et al, 1994).

Desde el punto de vista epidemiológico hace ya tiempo que se estableció que el carcinoma cervical es una enfermedad de transmisión sexual. La edad de inicio de la actividad sexual y el número de compañeros sexuales durante la vida, son los factores de

riesgo más importantes para este padecimiento. Recientemente se han descrito algunos otros cofactores como son: la inmunodepresión; influencias hormonales (esteroides) que favorecen la integración de HPVs de alto riesgo y la disminución en la expresión de moléculas HLA clase I en epitelios cervicales (Bartholomew et al, 1997); e infecciones con agentes sexualmente transmitidos tales como la *C trachomatis*, que han sido asociados con el desarrollo de neoplasias cervicales (Muñoz y Bosch, 1997).

El CaCu se ha asociado con una etiología viral. estudios epidemiológicos realizados desde la década de los 60's y 70's empiezan a correlacionar la presencia de algunos virus con esta enfermedad, en particular la seropositividad para el virus del Herpes simple (HSV). El entusiasmo inicial decayó cuando no pudo demostrarse la presencia de ADN viral en la mayoría de los carcinomas y por la falta de pruebas convincentes de una mayor frecuencia de cáncer en los estudios prospectivos, esta idea fue casi abandonada (Warness, 1995).

Posteriormente, en la década de los 80's se dio un gran avance en la etiología de esta enfermedad al detectar la presencia de varios agentes virales asociados con el CaCu, entre estos agentes se encontraron: al Virus de Papiloma Humano (HPV); Virus de Herpes Simple (HSV); y en menor grado al Citomegalovirus (HCMV). La mayoría de los estudios actuales consideran que el HPV es el principal agente etiológico del CaCu. En efecto, mediante el uso de la técnica de "reacción en cadena de la polimerasa" (PCR), utilizando oligonucleótidos universales para la proteína L1 de todos los papilomas, se ha encontrado que más del 90% de tumores cervicales están fuertemente asociados con la presencia de HPV (Bosch et al, 1995). No obstante algunos autores han detectado la presencia de HPV en casi el 100% de los tumores cervicales; esto ha sido posible mediante el uso de oligonucleótidos específicos para las proteínas virales E6 y E7, ya que durante la integración del genoma viral al genoma celular, en algunos casos, se pierde un segmento de la proteína L1, el cual no es amplificado por los oligonucleótidos universales de L1 (Walboomers et al, 1997).

De la familia de los HPV se han clasificado más de 80 tipos virales genéticamente diferentes, de los cuales los HPV tipo 11, 16, 18 y 31,33, 35, 45 están asociados con la transformación de células epiteliales del cérvix, así como las del cuello del útero, produciendo lesiones denominadas neoplasias intraepiteliales o NIC's (Tabla 3.3). En la mayoría de las lesiones, se ha confirmado la etiología viral mediante estudios citológicos e histológicos (Seedorf et al, 1986a,b; Pfister 1987; Kurman et al, 1988; Kaur et al, 1989; Matlashewski, 1989; Wright et al, 1989; y Storey et al, 1990). Los HPV tipo 5

y 8 están comúnmente asociados con epidermodisplasias que pueden progresar a cáncer de piel (Howley, 1991) (Tabla 3.3).

Tabla 3.3. Tipos de HPV en varias lesiones. Tomado de Howley et al, 1991 y Breitbart et al, 1996..

Tipo de lesión	Tipo de HPV
Piel	
Verrugas	1-4, 7,10,26-29,38,41,48,49,57,63, 65.
Quiste epidermoide	60.
Verruga de Carnicero	2,7.
Epidermodisplasia verruciforme	2,3,5,8,9,10,12,14,15,17,19-25,35, 47,50
Cambios bowenoides	16,34,35.
Carcinoma de células epidermoides	5, 8, 14,17,20,41,47.
Genital	
Condiloma acuminado	6,11,42-44,51-55,58,67,74.
Neoplasia intraepitelial (NIC) bajo grado	6,11,16,18,30-31,33-35,39,40,42-45, 51-52,56-59,68...
NIC alto grado	16,18,31,33,35,39 45,51-52,56,58-59,68
Carcinoma cérvico-uterino	16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58-59,68
Tumores de cabeza y cuello	
Papilomatosis	2,6,7,11,32,57.
Hiperplasia epitelial focal	13,32.
Carcinoma de amígdala	16,33.

Los tipos más frecuentes se indican en negritas.

En los países con mayor frecuencia de CaCu (principalmente países subdesarrollados), se ha observado que el HPV-16 es el de mayor proporción (50%), seguido por el HPV-18 con 12%, HPV-45 con 8%, y HPV-31 con 5% (Muñoz y Bosch, 1997). En México las proporciones son similares: el HPV-16 se encuentra en el 50% de los casos; el HPV-18 en el 15%; los HPV-31, 33 y 35, en conjunto, el 12%; y otros tipos virales, en el porcentaje restante (Berumen, 1994; y Berumen, 1995).

Los virus que pertenecen a la familia del Papiloma, tienen una estructura compuesta por una doble cadena de ADN que contiene aproximadamente 8,000 pares de bases. El genoma viral codifica para dos clases de proteínas: las proteínas de transcripción temprana (E, early proteins), y las de transcripción tardía (L, late proteins). La región que precede a los genes tempranos se llama región larga de control (RLC o LCR) y contiene secuencias promotoras y aumentadoras de la transcripción, así como secuencias que controlan el inicio de la replicación (Figura 3.6). De las proteínas de transcripción temprana, las E1 y E2 se encargan de regular la replicación del ADN y ARN viral; mientras que las proteínas que intervienen en la transformación celular son E4, E5, E6 y E7 (Seedorf et al, 1986a y b). Las proteínas de transcripción tardía conocidas como L1 y

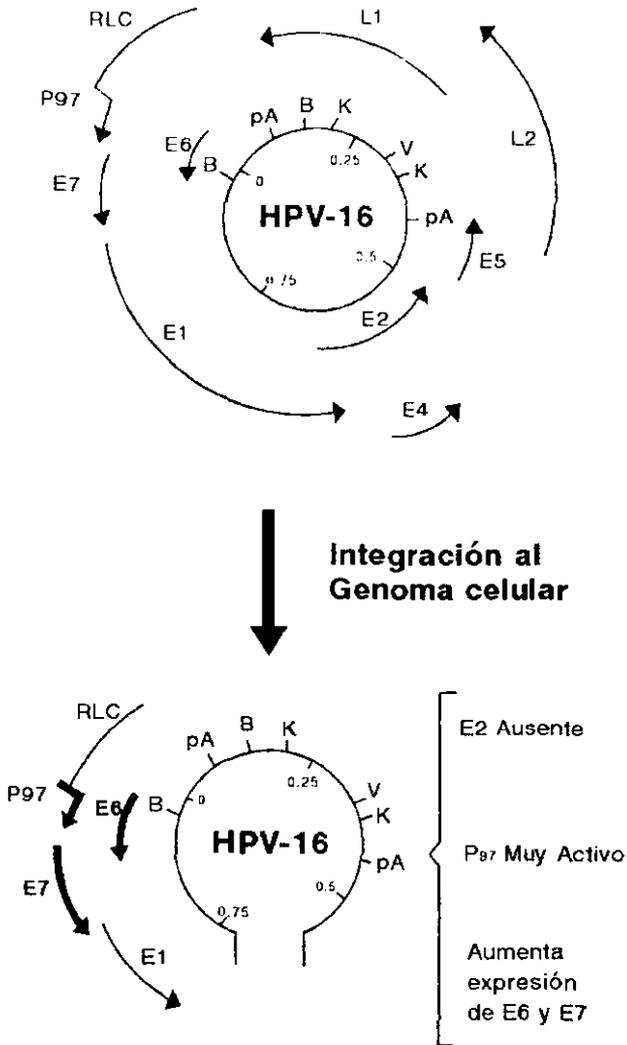


Figura 3.6. Mapa genético del virus de papiloma humano tipo 16 (HPV-16). El genoma del HPV contiene aproximadamente 8Kpb, es de doble cadena, contiene toda la información genética en una cadena, y está dividido en genes tempranos (E), tardíos (L) y una región larga de control (RLC). pA, señal de poliadenilación. B, BamHI; R, Eco RI; K, Kpn Y; V, Eco RV son sitios de restricción de HPV-16. P97 es el promotor temprano. Se indica la interrupción del genoma viral al integrarse al genoma celular, con el consiguiente bloqueo en la síntesis de la proteína E2 (transregulador negativo de la transcripción de los oncogenes E6 y E7 de los HPV genitales). En ausencia de E2, el promotor p97 es muy activo y se incrementa la expresión de los oncogenes virales E6 y E7. Tomado de Gariglio, 1998.

L2, son requeridas para el ensamblaje de partículas virales infecciosas de la cápside (Villa et al, 1990; Howley, 1991; Garcia-Carrancá et al, 1993; y Tzyy-Chou, 1994).

La proteína E1 se une a la ADN α -polimerasa e inicia la replicación del ADN; E2 es un factor de control transcripcional con propiedades de unión al ADN; E5 es un activador del Receptor para el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFr) y del Receptor del Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGFr), inhibe la acidificación de endosomas y también regula negativamente la expresión de moléculas clase I del MHC (Straight et al, 1995; y Tindle, 1996).

Entre las principales evidencias que indican que los HPV participan de manera causal en el CaCu están: 1) el ADN viral se encuentra en más del 90% de los tumores de CaCu; 2) el ADN del HPV se integra al genoma celular, inactivándose el gen E2 y favoreciendo la expresión de los oncogenes virales E6 y E7 (Figura 3.6); 3) en tumores y líneas celulares derivadas de carcinomas celulares se encuentra ARNm y proteína de los oncogenes E6 y E7 (provenientes de los HPV 16 o 18), los cuales son capaces de inmortalizar cultivos primarios de queratinocitos humanos y de transformarlos en cooperación con el oncogén ras activado. Se ha visto que al cultivar durante tiempos prolongados las células inmortalizadas por E6 y E7, éstas originan clonas malignas, lo que sugiere que genes celulares se modifican en dichos cultivos (Kaur et al, 1989; Zur Hausen, 1991).

El ADN viral existe en un estado episomal en la mayoría de las verrugas y displasias del cérvix, sin embargo, en los carcinomas, el genoma viral suele integrarse a los cromosomas de la célula huésped. En la transformación maligna relacionada con el HPV, el ADN viral se integra al ADN celular, lo que resulta en la ruptura de grandes fragmentos del genoma viral, perdiéndose normalmente los genes L1 y L2 y algunos genes tempranos (E1 y E2), quedando solamente los segmentos E6 y E7 como zonas de apertura de lectura frecuentemente encontrados en carcinomas (Matlashewski et al, 1989; Werness et al, 1995; y Tindle, 1996).

Se ha propuesto que las proteínas E6 y E7 del HPV, tienen dos funciones críticas para el desarrollo de neoplasias. Primero, se ha visto que la proteína E6 de HPV de alto riesgo para el desarrollo de CaCu (HPV-16 y 18), es capaz de inactivar la proteína p53, proteína supresora del tumor. Estudios bioquímicos han mostrado que ocurre la degradación de la proteína p53 por el proteasoma 26S, una vez que ésta es marcada (ubiquinada) por la proteína E6-AP/ligasa que se asocia con la proteína E6 (Huilbregtse y Braudenon, 1996), (Figura 3.7). En adición, se ha observado que E6 de HPV-16 estimula la actividad telomerasa (Klingelutz et al, 1996). Segundo, la proteína E7 puede

interactúan y evitar las actividades de inhibidores del ciclo celular (inhibidores cdk) que interactúan con los complejos cdk/ciclina tales como p27^{Kip1} y p21^{WAF1/Cip1}. (Figura 3.8). Además E7, al igual que otras proteínas oncogénicas de virus tumorales (SV40TAg y Ad5 E1A), puede inactivar a la proteína pRB, fosforilándola, para liberar al factor de transcripción E2F (Figura 3.8) y el ciclo celular puede avanzar de G1 a S, G2 y M. En condiciones normales, en la fase M la ppRB se desfosforila por acción de una fosfatasa; entonces, la proteína pRB puede unirse nuevamente a E2F y bloquear el ciclo celular en G1 (Jones y Münger, 1996) (Figura 3.8). Después del rompimiento del control del ciclo celular, las células epiteliales proliferantes, disminuyen los marcadores de diferenciación y son blancos de alteraciones genéticas adicionales para convertirse en células neoplásicas (Galloway y McDougall, 1996).

3.9. PAPEL DEL SISTEMA INMUNE EN LAS INFECCIONES GENITALES POR EL HPV.

Existen evidencias que indican que la inmunidad celular participa directamente en la infección primaria y en la progresión maligna de las lesiones por el HPV. Por ejemplo, se ha encontrado que en pacientes con inmunosupresión, el desarrollo de verrugas o neoplasias asociadas al HPV ocurren con alta frecuencia. De hecho este problema se detecta frecuentemente en pacientes que reciben trasplantes de órganos, con terapia inmunosupresora, en pacientes con SIDA e incluso mujeres embarazadas (Benton et al, 1992). No obstante, cuando la inmunosupresión disminuye o es eliminada, las verrugas a menudo desaparecen; en contraste, en la mayoría de estos pacientes que tienen lesiones neoplásicas, presentan alteraciones a nivel local probablemente inducidas por el HPV, a pesar de que sistémicamente su sistema inmune es normal. En las etapas previas al cáncer invasor, como son las neoplasias preinvasoras (NIC's) o el condiloma acuminado, el sistema inmunológico aún es capaz de combatir y promover la regresión o mantener el tumor localizado. Se ha encontrado que en los sitios de las lesiones producidas por HPV, existe un importante infiltrado celular compuesto por células mononucleares, incluyendo linfocitos T citotóxicos, células asesinas naturales y macrófagos que invaden la epidermis y destruyen las células neoplásicas (Tay et al, 1987; y Fierlbeck et al, 1989).

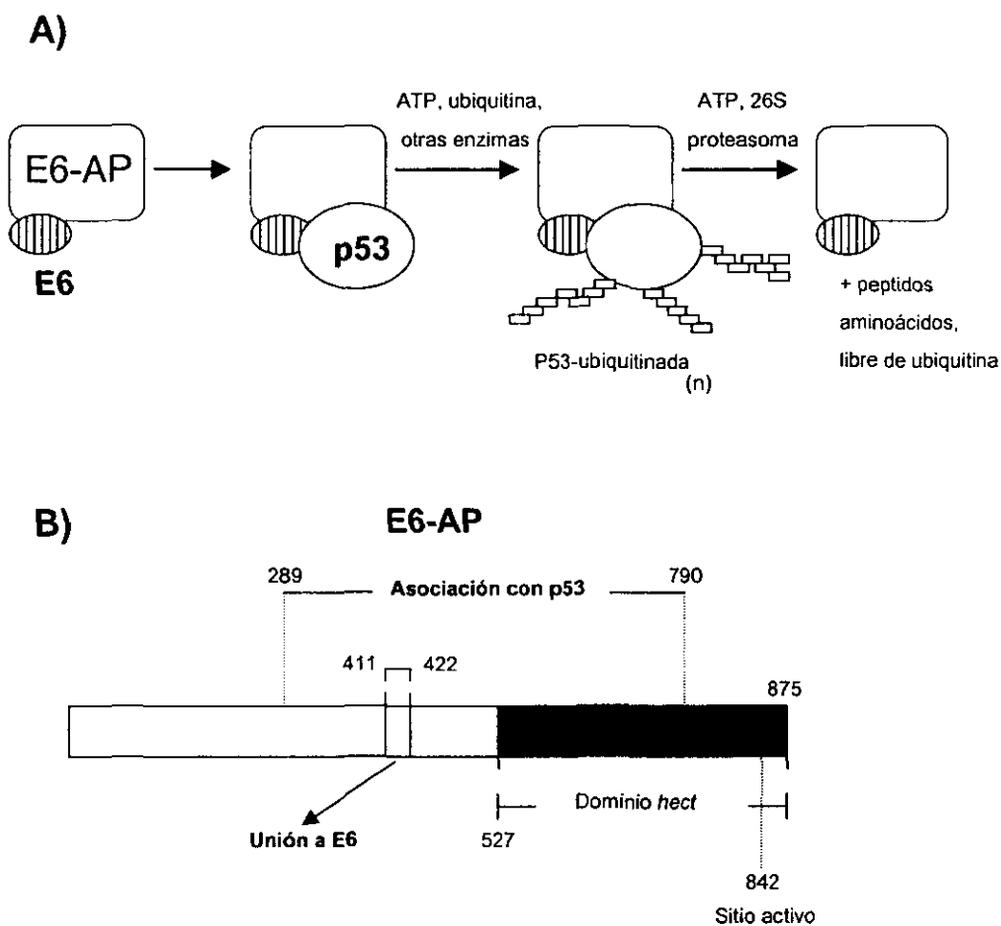


Figura 3.7. Inactivación de la proteína p53 mediante la proteína E6 del HPV. **A,** Orden de los eventos que conducen a la degradación de p53 dependiente de E6. La formación del complejo E6/E6-AP precede la asociación con p53; p53 es entonces multi-ubiquitinado, y degradado por el proteasoma 26S. **B,** Estructura /función de E6/AP. La numeración indica los segmentos importantes de unión con las proteínas E6 y p53. El dominio *hec1* cataliza la ligación de las unidades de ubiquitina al sustrato. Tomado de Huibregtse y Beaudenon, 1996.

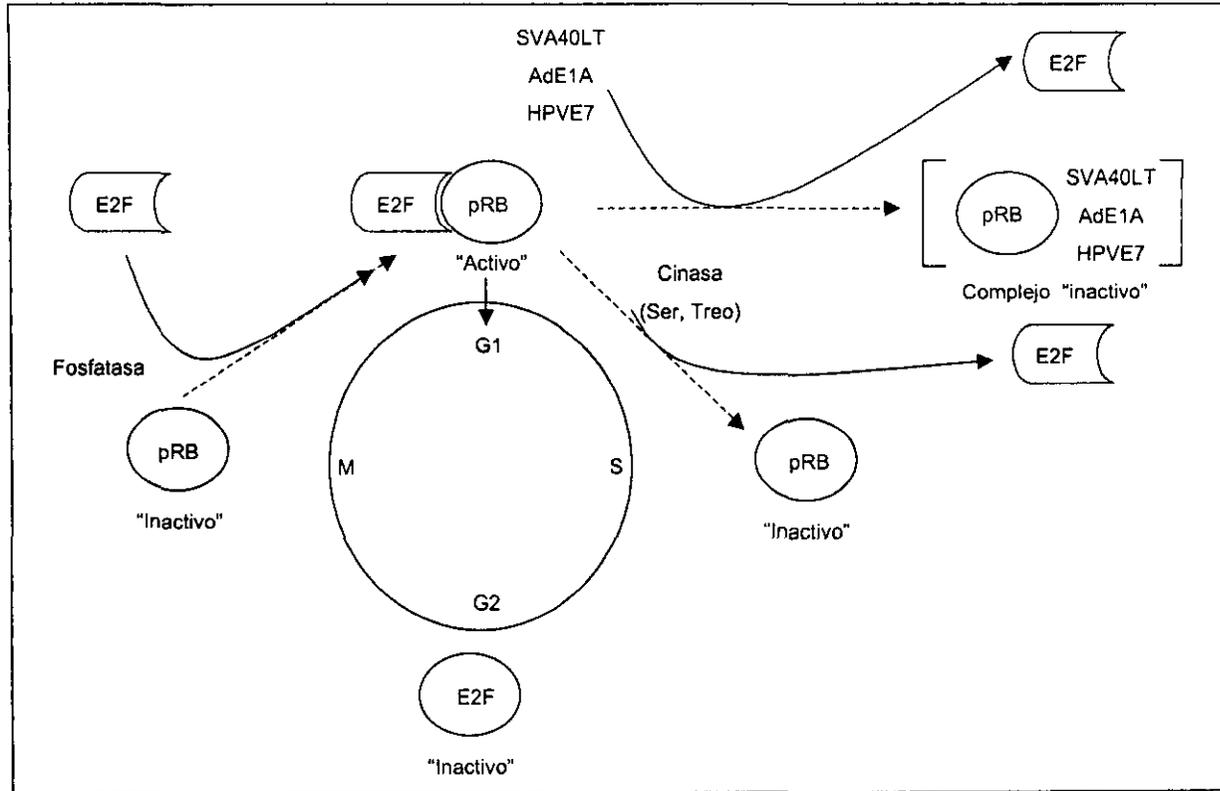


Figura 3.8. Inactivación de la proteína pRB mediante la proteína E7 de HPV y otros productos oncogénicos de virus tumorales. La proteína Rb se puede inactivar por fosforilación o por interacción con oncoproteínas virales tales como la E7 de los HPV de alto riesgo. Al encontrarse pRB en su forma inactiva se libera el factor de transcripción E2F y el ciclo celular puede avanzar de G1 a S, G2 y M, donde nuevamente se desfosforila por acción de una fosfatasa; ahora se puede unir a E2F y se bloquea el ciclo celular en fase G1. La formación de complejos entre pRB y las oncoproteínas virales puede llevar a un crecimiento celular descontrolado. Tomado de Gariglio, 1998.

3.9.1. Respuesta inmune humoral contra HPV .

Las infecciones de tipo viral son primariamente intracelulares, por lo que los antígenos virales escapan al alcance de los anticuerpos. La respuesta humoral es importante sólo para infecciones virales productivas, en las que las partículas virales salen al espacio extracelular por exocitosis o durante la lisis celular por efecto del propio virus o las células citotóxicas del paciente. En las infecciones no productivas, como ocurre en los casos de NIC avanzados y el cáncer invasor, solamente se producen proteínas tempranas del virus y no proteínas tardías, por lo que las partículas virales no se presentan en el espacio extracelular, en consecuencia se esperaría una baja respuesta humoral contra los antígenos virales (Berumen et al, 1997).

A pesar de ello, varios investigadores se han enfocado en demostrar la presencia de anticuerpos dirigidos a las proteínas virales del HPV, tanto de la cápside como de transcripción temprana. Con relación a las proteínas de la cápside, se sabe que la principal proteína que la constituye es la L1, la cual comprende a más del 90% de las proteínas del virión, y la proteína menor L2, cuya localización dentro de la cápside aún es incierta. Existen estudios en los cuales se demuestra que la infección con HPV, puede ser prevenida en conejos y bovinos al ser inmunizados con la proteína L1 y la proteína L2 desnaturalizada. No obstante, aún no se sabe de que manera éstas inmunizaciones, mediante exposición a mucosas, neutralizan al virus que infecta a las células epiteliales (Suzich et al, 1995; Jensen et al, 1995; y Kirnbauer et al, 1996).

En humanos, se ha demostrado la presencia de anticuerpos específicos o de reacción cruzada contra partículas parecidas a virus (virus like particles, VLP). Se ha encontrado que el 50-60% de las mujeres infectadas con HPV, tienen anticuerpos contra VLP de HPV-16. A diferencia de otros tipos de HPV, HPV-16 tiene varios subtipos y serológicamente presentan reacción cruzada (Yamada et al, 1995; y Cheng et al, 1995). En neoplasias intraepiteliales NIC-3, se ha demostrado la presencia de anticuerpos contra proteínas de la cápside, sin embargo, en cáncer invasivo HPV-16*, donde se están presentando proteínas de transcripción temprana y no viriones, no siempre se encuentran anticuerpos contra VLPs de HPV (Nonnenmacher et al, 1995). En estudios de seroreactividad contra los VLP's de los HPV's, se ha detectado que la presencia de anticuerpos contra la cápside son inducidos en infecciones severas y persistentes de HPV, los cuales disminuyen después de que pasa la infección productiva. Por tanto, anticuerpos específicos contra la cápside no son marcadores confiables para determinar las infecciones por HPV-16 recientes o pasadas en un individuo (Berumen et al, 1997).

Por otra parte, en el suero de las pacientes con cáncer cervical frecuentemente se han encontrado anticuerpos contra la proteína E7 de HPV-16 y HPV-18 (Muller et al, 1992; y Nindl et al, 1994). De forma paralela, se han detectado anticuerpos contra la proteína E2 de HPV-16 y HPV-18 (Lentinen et al, 1992a,b; y Dillner, 1994), así como de E4 (Villa et al, 1990; Kanda et al, 1992; y Onda et al, 1993) y E6 de HPV-16 en suero de pacientes con CaCu (Ghosh et al, 1993; y Nindl et al, 1994). Además se ha encontrado que los títulos de anticuerpos contra las proteínas E2, E6 y E7 se asocian en forma estrecha con la evolución de la enfermedad (Dillner, 1988; y Viscidi et al, 1993). No se sabe como se genera esta respuesta humoral, pero quizá durante la lisis de las células cancerosas por linfocitos T citotóxicos, salgan antígenos virales al espacio extracelular. Estos estudios han permitido sugerir que algunas de estas proteínas virales son inmunogénicas y pueden representar los blancos específicos de la vigilancia inmune hacia tumores relacionados con HPV (Tzyy-Choou, 1994).

El papel potencial de inmunoglobulinas específicas hacia HPV-16 o HPV-18 como indicadores de infecciones relacionadas al virus o como signo de inicio de cáncer, ha sido controvertido, debido a la gran heterogeneidad de resultados debida a: los diferentes tipos de antígenos estudiados; los diferentes métodos de detección empleados; la selección de las muestras usadas; la edad de la paciente; el nivel de estrógeno/progesterona; el hábito de tabaquismo y la cantidad de muestra de inmunoglobulina sérica hacia HPV. Otro factor que influye es que la recurrencia de la enfermedad, a menudo se relaciona con tipos adicionales de HPV, implicando que múltiples virus residen de forma local y que virus adicionales pueden contribuir a una nueva enfermedad y por tanto a la expresión de otros antígenos. Debido a estas variaciones, los resultados serológicos deben ser interpretados con precaución (Devesa et al, 1986; Dillner et al, 1989; y Tzyy-Chouu, 1994).

3.9.2. Respuesta inmune celular contra infecciones producidas por HPV.

La respuesta inmune mediada por células, ha sido demostrada en primera instancia en lesiones de piel con infección de HPV 5 y 8 (Ghosh et al, 1993) y en respuesta linfoproliferativa *in vitro* (Steele et al, 1993; y Chambers et al, 1994). El uso de proteínas de HPV-16 expresadas en bacterias, e inoculadas en piel de pacientes con lesiones NIC, ha permitido detectar respuestas hacia la proteína L1 del virión, pero no para la proteína E4 (Höpfel et al, 1991). Además se ha reportado que viriones de HPV-1 y proteína E4 purificada de verrugas, son capaces de despertar buena respuesta

linfoproliferativa en individuos asintomáticos (Steele et al, 1993). Como resultado de estos estudios, se ha podido describir que en la respuesta inmune celular contra lesiones producidas por los HPV's, participan varias células efectoras, entre las cuales destacan, las células asesinas naturales, macrófagos, células de Langerhans, linfocitos T citotóxicos, linfocitos T cooperadores o auxiliares y citocinas producidas por esas células. Es probable que los macrófagos y las células NK representen uno de los primeros mecanismos celulares para eliminar y controlar células tumorales infectadas por el HPV. Las células NK, pueden de manera espontánea, matar *in vitro* a células infectadas por el virus y células tumorales sin previa sensibilización por un proceso llamado muerte natural (Gildlund et al, 1981; Kasahara et al, 1983; y Ortaldo et al, 1995). Las células NK están presentes en muchas lesiones producidas por HPV y NIC's, no obstante, se ha encontrado que células HPV+ provenientes de cáncer cervical y células epiteliales cervicales humanas inmortalizadas, las cuales poseen propiedades similares a la de displasia cervical, son resistentes a células NK (Evans et al, 1993). De igual manera, en pacientes con displasias cervicales y lesiones precancerosas, también se ha encontrado una disminuída actividad de células NK (Malejczyk et al, 1993). Los macrófagos también son importantes mediadores celulares de la respuesta inmune antitumoral; se ha encontrado que células NIH-3T3 transfectadas con el oncogene E7 de HPV-16 son susceptibles de ser lisadas por macrófagos de ratón activados (Banks et al, 1991). Por otro lado, las células de Langerhans, son células especializadas de tejido epitelial y muestran una morfología dendrítica. Bajo condiciones normales, ellas son las células presentadoras de antígeno con mayor eficiencia. En lesiones verrucosas producidas por HPV, en áreas de condilomas y NIC's, se ha encontrado que las células de Langerhans se encuentran disminuídas de manera acentuada en relación con la epidermis normal (McArdle et al, 1986; Morelli et al, 1993; y Lehtinen et al, 1993). La generación de una respuesta inmune efectiva, depende en gran medida de la secreción de citocinas, las cuales reclutan y activan a las células efectoras en el sitio de la infección. Las células cervicales normales, secretan de manera constitutiva muchas linfocinas en cultivos celulares (Luger et al, 1990; y Barker et al, 1991). Una de esas linfocinas es la interleucina-1 (IL-1), la cual induce una amplia variedad de reacciones inflamatorias e inmunológicas, tal como la producción de IL-2 por linfocitos T cooperadores. Los mismos queratinocitos, son autoestimulados con IL-1 a proliferar (Ristow 1993), como resultado de ello, estos sintetizan y secretan otras linfocinas incluyendo a la IL-6 (Kirnbauer et al, 1989), IL-8 y GM-CSF y TNF- α (Woodworth et al,

1993). Cada una de estas citocinas ejercen efectos en reacciones inflamatorias o inmunológicas por mecanismos específicos, por ejemplo, el TNF- α y la IL-1 ejercen, además, una acción antiviral por medio de la represión de la expresión de genes virales (Kyo et al, 1994).

A diferencia de los queratinocitos normales, las células cervicales inmortalizadas y líneas de carcinoma, presentan una disminuída secreción de linfocinas (Woodworth et al, 1993). Por otra parte, los linfocitos T cooperadores participan de manera muy importante en la respuesta inmune celular, ya que las diferentes subpoblaciones que los constituyen (Th1 y Th2), producen citocinas con actividad específicas para activar o suprimir la respuesta inmune. Por ejemplo los Th1 secretan IL-2 e IFN- γ , que participan como los principales mediadores de la inmunidad celular contra microorganismos intracelulares y dirigen la defensa del huésped mediada por fagocitos. Las células Th2 secretan IL-4, IL-5 e IL-10, citocinas que suprimen la inmunidad mediada por células; por lo que Th2 es responsable de la respuesta independiente de la fagocitosis. De esta manera, la respuesta inmune celular antitumoral es inducida por citocinas de linfocitos Th1 e inhibida por los Th2 (Abbas et al, 1994). De hecho en neoplasias intraepiteliales se ha encontrado una gran proporción de linfocitos T CD3+ asociado con la expresión de TNF- α , IL-6, e IL-10 en el 60% de estas lesiones (Crowley-Nowich et al, 1993).

Los linfocitos T citotóxicos, que reconocen péptidos antigénicos presentados por moléculas MHC-I en la membrana de células infectadas con virus del HPV, son activados en presencia de IL-2 secretada por los linfocitos Th1, de tal manera que son capaces de producir la lisis de las células blanco mediante tres caminos diferentes: a) secretan perforinas y otras proteínas como las granzimas, que perforan la membrana celular; b) liberan sustancias que inducen la muerte celular programada (apoptosis) de las células blanco, y c) liberan citocinas como IFN- γ , el TNF y la Leucoregulina (LR) que limitan la actividad viral dentro de las células, atrayendo a macrófagos y otros fagocitos que pueden destruir a la célula. El IFN- γ y la LR inhiben la expresión de los genes virales y estimulan la expresión de moléculas MHC-I (Nickoloff et al, 1984; Furbert-Harris et al, 1989; y Woodworth et al, 1992).

El entendimiento de la inmunidad mediada por células hacia infecciones de HPV ha sido facilitado por la identificación de epitopos o péptidos provenientes de HPV que se unen a las moléculas Clase I y II del MHC (Tzyy-Choou, 1994). Varios grupos han intentado predecir en ratón (Davies et al, 1990; Comerford et al, 1991; Tindle et al, 1991; y Shepherd et al 1992) y en humano (Steele et al, 1993) epitopos de linfocitos Th a partir de

proteínas de HPV. Tindle, identificó un péptido para Th de ratón a partir de la proteína E7 de HPV-16 (aminoácidos 48-54). Este epitopo fue reconocido en asociación con cinco alelos MHC-II de tipo I-A e I-E, además de proveer ayuda para la producción de anticuerpos para varios epitopos de linfocitos B, incluyendo a un epitopo de la proteína E7 de HPV-18 para linfocitos B (Tindle et al, 1991). Aunado a ello, varios investigadores, han identificado epitopos para linfocitos T citotóxicos tanto en ratón (Stauss et al, 1992; Feltkamp et al, 1993; y Sadovnikova et al, 1994) como en humanos (Kast et al, 1993; Kast et al, 1994; y Tarpey et al, 1994) a partir de proteínas de HPV. El grupo de Feltkamp ha identificado un epitopo de la proteína E7 de HPV-16 que se une a moléculas H-2Kb y H-2Db en estudios e unión de péptidos en un modelo de ratón (Feltkamp et al, 1993). De manera similar, el grupo de Kast, ha identificado varios péptidos que se unen con alta afinidad a alelos de tipo HLA-A a partir de las proteínas E6 y E7 de HPV-16 (Kast et al, 1994).

3.10. INEFICIENCIA DE LA RESPUESTA INMUNE PARA COMBATIR A LAS CELULAS TUMORALES INFECTADAS POR EL HPV.

La ineficiente respuesta inmune para eliminar a células tumorales, puede estar asociada con múltiples fallas de los componentes del sistema inmune o de las células blanco, las cuales se van acumulando durante la evolución de la enfermedad. Las células malignas en etapas avanzadas, utilizan cuando menos tres caminos para evadir la respuesta inmune: a) la modulación de la expresión de moléculas del MHC; b) la modulación de otras moléculas de unión en la superficie celular, y c) la modulación de la secreción de citocinas celulares. Estos cambios repercuten sobre las células inmunocompetentes, de tal manera que reducen su número y capacidad de respuesta específica, lo cual pudiera contribuir a la progresión tumoral de las lesiones cervicales inducidas por el HPV (Tzyy.Choou, 1994; y Berumen et al, 1997).

3.10.1. Expresión de moléculas MHC-I y II en tejido cervical sano y con lesiones tumorales.

Las moléculas del MHC, tienen la capacidad de presentar una gran cantidad de antígenos virales, que son potencialmente reconocidos por los linfocitos T y llevar a cabo una respuesta específica para eliminar al tumor. Hay varios mecanismos que pueden alterar la expresión de moléculas MHC, como son: mutaciones o arreglos en el gen de la β_2 -microglobulina; cambios en la metilación y estructura de los genes de clase I; regulación negativa de la expresión de moléculas MHC por oncogenes o por proteínas

virales; inhibición en el transporte o glicosilación de moléculas MHC; o mutación en los genes de Tap's (Garrido et al, 1993; Cromme et al 1993a; Hilders et al 1994; Hilders et al, 1995; y Herrington 1995).

La expresión de moléculas MHC-I y de la β_2 -microglobulina, se encuentra ligeramente disminuída en los condilomas (Viac et al, 1993); de manera importante en las lesiones premalignas y es muy heterogénea o está ausente en 75% de los carcinomas invasores (Connor et al, 1990; Glew et al, 1992; Cromme et al, 1993a, b; Glew et al, 1993; Connor et al, 1990; y Carina et al, 1995).

Se ha encontrado que β_2 -microglobulina está disminuída en una gran proporción de tumores avanzados (90%) en relación con epitelio normal, lo cual concuerda con la falta de expresión de MHC-I en tumores que ya han penetrado las membranas basales (Petersen et al, 1993). La disminución de la expresión de las moléculas MHC-I ocurre principalmente a nivel postranscripcional y además se ha tratado de relacionar con el papel que pueda llevar cabo el HPV-16 (Keating et al, 1995). Las lesiones premalignas y malignas presentan una expresión negativa específica del locus MHC-I (HLA-A, B, y C) (Cromme et al 1993a). Se ha encontrado una expresión reducida de moléculas MHC-I en el 70% de los tumores estudiados, con un 50% de disminución en la expresión del alelo HLA-A2, 66% en A3, 56% en Bw4 y 37% en Bw6 (Hilders et al, 1994). De igual manera, se ha observado que la disminución de la expresión de moléculas MHC-I en células de tumores cervicales con metástasis es de 60%, mientras que en tumores primarios es de 21%, lo cual también se ha encontrado correlacionado con una disminución en la presencia de linfocitos infiltrantes del tumor, lo que sugiere que la pérdida de la expresión de MHC-I juega un papel decisivo en la vigilancia inmune, aumentando con ello el potencial metastásico de las células tumorales (Hilders et al, 1995).

Se ha encontrado que la pérdida de expresión de moléculas MHC-I en tumores, está relacionada con la pérdida de expresión de Tap-1 y esto a su vez con el grado de malignidad (Restifo et al, 1993; Kaktlamanis et al, 1995; Hailei et al, 1995; y Sanda et al, 1995). Algunos estudios encuentran que la expresión de HLA-A y HLA-B por células tumorales es regulada negativamente en uno o más alelos, por lo menos en 73% de carcinomas cervicales, y aproximadamente un 50% de estos tumores presentó la pérdida de la expresión de Tap-1, sugiriendo que la inhibición de Tap-1 es una estrategia potencial de las células malignas para evadir la respuesta inmune (Cromme et al, 1993a; Cromme et al, 1993b; Cromme et al, 1994a; Cromme et al, 1994b; y Keating et al, 1995).

En otros tipos de carcinomas humanos, se ha detectado una baja expresión de ARNm para las proteínas Tap-1 y Tap-2 junto con la baja expresión de las subunidades del proteasoma LMP-2 y LMP-7 (Restifo et al, 1993; y Sanda et al, 1995). La expresión deficiente de la subunidad LMP-10, codificada en otro cromosoma diferente al del MHC, ha sido encontrada de manera combinada con la deficiencia en la expresión de las subunidades LMP-2 y LMP-7, así como de Tap-1 y Tap-2, en varias líneas celulares derivadas de diversos tipos histológicos, lo que ha sugerido que varios genes que codifican para proteínas importantes en la vía del procesamiento y presentación de antígenos por moléculas MHC-I, están siendo regulados en las células malignas con la finalidad de evitar la presentación de antígenos tumorales al disminuir la expresión de moléculas MHC-I en su membrana (Johnsen et al, 1998).

Con relación a la expresión de moléculas MHC-II en células de tejido epitelial cervical, se ha observado que el epitelio escamoso ectocervical, no neoplásico, es negativo para la expresión de HLA-DR, aún en secciones mostrando importante infiltración linfocitaria. Sin embargo, en epitelio glandular endocervical, epitelio escamoso metaplásico inmaduro y carcinoma invasivo, existe expresión de HLA-DR (Raju et al, 1994). En células cervicales normales, existe una marcada ausencia en la expresión de HLA-DR, escasa expresión en NIC's primarios; pero en los NIC's avanzados, hay expresión de DR en los queratinocitos, que podría deberse en la producción de citocinas proinflamatorias liberadas por las células inmunocompetentes (Coleman et al, 1994). Al analizar la posible asociación de DR-DQ con carcinoma cervical HPV-16*, en mujeres hispánicas, se encontró que ciertos haplotipos clase II como: DRB1* 1501-DQB1*0602 y DRB1*0407-DR*0302, se asocian fuertemente al carcinoma cervical, mientras que el haplotipo DR13, lo hace negativamente (Apple et al, 1994; y Apple et al, 1995).

En pacientes caucásicos, se ha detectado una significativa asociación entre el haplotipo HLA clase II DQw3 y cáncer cervical de células escamosas (SCCC) HPV*, lo que sugiere que estas pacientes tienen una inhabilidad para eliminar la infección por HPV, que las predispone a desarrollar el SCCC (Wank et al, 1991). Asimismo, existe una ligera asociación de cáncer de células escamosas y HLA-DQB12, relacionado con un aumento no significativo de HLA-B12 (HLA-B44/45) (Wank et al, 1991). Otra de las asociaciones que se ha encontrado, es entre el haplotipo HLA-DQB1*0602, *301, *0303, y el riesgo de ciertos pacientes de desarrollar NIC's y carcinoma cervical (Wank et al, 1992).

3.10.2. Citocinas producidas por los queratinocitos cervicales.

Las células cervicales normales, constitutivamente secretan muchas citocinas. A diferencia de ello, las células cervicales inmortalizadas con HPV y líneas de CaCu, presentan una disminuida expresión de linfocinas (Woodworth et al, 1993). En el ejemplo clásico de la línea celular tumorigénica, SK-v derivada de una NIC HPV-16*, se expresan y secretan constitutivamente la IL-6 y el TNF α . Este último, ejerce en forma autócrina un efecto antiproliferativo, el cual al parecer se debe a la represión de la expresión de los oncogenes virales (Kirnbauer et al, 1989; Bavinck et al, 1993; y Apple et al, 1994). Igualmente, el factor de crecimiento transformante beta (TGF β), que es muy parecido de manera funcional al TGF α , también se expresa en queratinocitos humanos e inhibe en forma autócrina su crecimiento (Malejczyk et al, 1991). Esta inhibición, no se observa en queratinocitos transformados, ni en líneas celulares de carcinoma cérvico uterino (Petenpol et al, 1990; y Malejczyk et al, 1992). Estos datos sugieren que la secreción continua de citocinas por los queratinocitos cervicales, es parte de un mecanismo de inmunoprotección; mientras que la producción de IL-6 y TNF α en las células infectadas por HPV-16, pudiera representar un mecanismo de autocontrol para prevenir el crecimiento neoplásico. Resultados preliminares hechos en nuestro país, muestran la presencia de citocinas con actividad inmunosupresora, tal como la IL-10, en la mayoría de los tumores de CaCu analizados (Berumen, 1997). En adición, en otro estudio en el cual se analizó el patrón de producción de citocinas de los linfocitos Th, estimulados *in vitro*, de pacientes con NIC's avanzados y con infección de HPV 16 y 18, se encontró una alta producción de IL-4 e IL-10 (Th2) comparada con la de IL-2 e IFN- γ (Th1) (Clerici et al, 1997). Estos estudios, han permitido sugerir que además de la baja expresión de moléculas MHC-I y II encontrada en células tumorales de cáncer cervical, la presencia de citocinas que potencialmente promueven la inmunidad celular (citocinas Th1), pudiera estar inhibida, lo cual facilitaría el desarrollo del tumor.

4.- JUSTIFICACION, ANTECEDENTES Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

4.1. Justificación.

El cáncer cérvico-uterino es un problema de salud muy importante en nuestro país. Debido a su alta incidencia, esta enfermedad constituye la primer causa de muerte en las mujeres que sufren de neoplasias. En consecuencia, es de primordial importancia el realizar estudios que puedan aportar mejoras tanto en la prevención, en el diagnóstico, así como en el desarrollo de nuevas estrategias que conduzcan a un tratamiento oportuno. Actualmente, además de las terapias convencionales, que consisten principalmente en la cirugía, radioterapia y quimioterapia, la Inmunología Tumoral es una nueva área, que con base en la identificación de antígenos de rechazo tumoral, abre nuevas posibilidades para implementar terapias inmuno-específicas del cáncer. Al respecto, muy pocos antígenos tumorales han sido descritos, como es el caso de melanoma y cáncer de mama (Velders et al, 1998). En el caso particular del cáncer cérvico-uterino, debido a su asociación etiológica con el virus de papiloma humano (HPV), aproximadamente 90% de los tumores expresan HPV (van den Brule et al, 1991; y Bosch et al, 1995), hace que este tumor sea factible de ser estudiado en su caracterización antigénica (Bartholomew et al, 1994); de hecho, esta asociación ha llamado a proponer que proteínas derivadas de estos virus sean candidatos idóneos para presentarse como epitopos tumorales. Por lo tanto, el estudio de la identificación de los antígenos específicos del tumor y su expresión por moléculas MHC en la membrana celular, es de gran importancia para implementar terapias inmunespecíficas contra este tipo de cáncer.

4.2. Antecedentes.

La expresión de moléculas MHC-I en cáncer cervical, ha sido documentada en diversos estudios inmunquímicos, utilizando anticuerpos monoclonales monomórficos contra locus ó alelos específicos HLA clase I. En varios estudios se ha encontrado una pérdida importante de moléculas MHC-I en la membrana de las células tumorales, se ha observado una pérdida completa de la expresión de moléculas MHC-I en un 5-48% de los especímenes analizados en células escamosas de carcinomas (Connor y Stern, 1990; Torres et al, 1993; Hilders et al, 1994; Duggan-Keen et al, 1996; Bartholomew et al,

1997; y Honma et al, 1994); asimismo, la pérdida de 1 o más alelos se ha reportado que ocurre entre un 30-78% de los tumores de cáncer cervical (Connor y Stern, 1990; Cromme et al, 1993a; Torres et al, 1993; y Keating et al, 1995); mientras que la de alelos comunes (HLA-A2, -A3, -A4; B7; -Bw4, -Bw6) fueron encontrados entre un 17-71% de los tumores analizados (Glew et al, 1993; Hilders et al, 1993; Cromme et al, 1993; Cromme et al, 1994a, b; Duggan-Keen et al, 1994). Estas deficiencias en la expresión de moléculas MHC-I en tumores cervicales, ha sido asociada con eventos postranscripcionales, que incluyen defectos en la expresión de la cadena pesada de algún alelo HLA (Cromme et al, 1993), o de la subunidad transportadora de péptidos Tap-1, la cual se ha visto que ocurre en un tercio de los carcinomas analizados (Cromme et al, 1994a, b; Keating et al, 1995). Estos eventos pueden conducir a una deficiente presentación de los péptidos antigénicos mediante alelos HLA clase I en las células tumorales de cáncer cervical.

A pesar de las deficiencias en la expresión de moléculas MHC-I reportadas en células tumorales de cáncer cervical, se han hecho grandes esfuerzos para caracterizar a los péptidos antigénicos propios de estas células malignas. En este sentido, uno de los primeros estudios relacionados con la respuesta inmune celular específica contra el virus de HPV, fue realizado en epitelios *in vivo* y de forma linfoproliferativa en ensayos *in vitro*. La respuesta celular en piel contra HPV, fue demostrada mediante el uso de proteínas de HPV expresadas en bacterias, las cuales al infectar piel de pacientes con neoplasias preinvasivas (NIC), indujeron una respuesta efectiva principalmente hacia la proteína L1 del virión (Höpfl et al, 1991). Además se demostró que viriones de HPV-1 y proteínas E4 purificadas de verrugas fueron capaces de iniciar una respuesta linfoproliferativa de individuos asintomáticos (Steele et al, 1993).

En los últimos años, el estudio de la inmunidad mediada por células T a infecciones por HPV, ha coincidido con el entendimiento de los mecanismos que participan en el procesamiento y la presentación de antígenos por las moléculas MHC-I en la membrana celular. En este contexto, uno de los primeros trabajos, fue la caracterización de un péptido procesado endógenamente y eluido de moléculas HLA-A0201 a partir de células infectadas con el virus de vaccinia recombinante expresando la proteína E6 de HPV-16 (Bartholomew et al, 1994).

Por otro lado, la identificación de los aminoácidos de anclaje de los péptidos unidos a alelos específicos de las moléculas HLA clase I (Falk et al, 1991a), ha permitido mediante estudios de unión (Parker et al, 1992), o por algoritmos de predicción (Parker et al, 1995), identificar epitopos derivados de proteínas oncogénicas (E6 y E7) de HPV.

Por ejemplo el grupo de Tindle identificó un epitopo para linfocitos T auxiliares a partir de la proteína E7 de HPV-16 (aminoácidos 48-54), (Tindle et al, 1991). Más tarde, Feltkamp identificó un epitopo derivado de la proteína E7 de HPV-16, a través de H-2K^b y H-2D^b en estudios de unión de péptidos sintéticos a estas moléculas, resultando en una auténtica protección del ratón inmunizado con estos péptidos hacia un subsecuente reto contra el tumor (Feltkamp et al, 1993). Posteriormente, Kast y Rensing identificaron varios péptidos sintéticos de proteínas E6 y E7 de HPV-16 con alta afinidad para alelos HLA-A0201. La inmunogenicidad de 9 de estos péptidos, fue evaluada *in vivo* en ratones transgénicos HLA-A0201K^b e *in vitro* en cultivos de CTL's inducidos a partir de linfocitos de sangre periférica de donadores sanos con el alelo HLA-A0201. Finalmente tres péptidos derivados de la proteína E7 y con alta afinidad para el alelo HLA-A0201, indujeron protección a los ratones transgénicos y además una respuesta CTL de los linfocitos de donadores normales. Además de ello, clones de CTL's dirigidos contra esos tres péptidos, fueron capaces de lisar a la línea celular Caski (HLA-A0201+), sugiriendo entonces que estos péptidos representan epitopos de HPV-16 naturalmente procesados (Kast et al, 1994; y Rensing et al, 1995).

En estudios más recientes, se ha encontrado que pacientes con infección de HPV-16 y lesiones cervicales (NIC y avanzadas), a menudo presentan linfocitos T de memoria contra epitopos predichos de la proteína E7 en el contexto del alelo HLA-A0201 (Rensing et al, 1996). En pacientes con similares afecciones, la presencia de linfocitos citotóxicos también ha sido detectado anatómicamente, ya sea en sangre periférica, infiltrados en el tumor, o en nódulos linfáticos (Evans et al, 1997). Estos datos, dan una evidencia de la respuesta inmune mediada por CTL's contra proteínas oncogénicas de HPV, lo cual sugiere que la identificación de los epitopos de rechazo tumoral para el CaCu así como su restricción alélica de las moléculas MHC-I, puede ser de gran importancia para su aplicación potencial como vacunas específicas del tumor.

4.3. Planteamiento del problema.

La expresión de moléculas HLA clase-I en la membrana de células infectadas con virus y células tumorales, es uno de los aspectos más importantes para mediar el reconocimiento de linfocitos T citotóxicos contra estas células blanco (Greenberg et al 1991; y Doherty et al, 1994). Por lo tanto, la pérdida en la expresión de ciertos alelos HLA-A, -B ó -C en membrana celular, puede conducir a una deficiencia en la respuesta inmune contra tumores (Restifo et al, 1993).

En el caso particular del CaCu, pocos estudios han sido dirigidos para analizar la expresión de moléculas HLA, su regulación y su funcionalidad en la presentación de antígenos. Por ejemplo, en algunos estudios, se ha encontrado una asociación entre la baja expresión de algunos alelos HLA-A y B y la deficiencia en la expresión de Tap-1 (Cromme et al, 1993; Garrido et al, 1993; Keating et al, 1995); asimismo, la inducción de la expresión de moléculas MHC-I con citocinas y la caracterización de péptidos inmunogénicos expresados por las células tumorales de CaCu han sido pocos (Bartholomew et al, 1994; y Bornstein et al, 1996).

El presente trabajo fue llevado a cabo con la finalidad de analizar la funcionalidad de las moléculas MHC-I, así como de identificar a péptidos antigénicos presentados por moléculas MHC-I en células de carcinoma cérvico-uterino. Para ello, se utilizó como modelo de estudio a dos nuevas líneas celulares de carcinoma cérvico-uterino denominadas CALO e INBL positivas para HPV-18. El estudio consistió en analizar: a) la expresión de las moléculas HLA clase I y su inducción bajo condiciones que se sabe promueven la expresión de moléculas HLA clase I en la superficie celular, como son el cultivo celular en presencia de IFN- γ (Brown et al, 1991; y Eleuteri et al, 1997); cultivo celular a 26°C (Ljunggren et al, 1990; y Rock et al, 1991); y el cultivo de las células en presencia de péptidos específicos (Elliot et al, 1991; Jardetzky et al, 1991; Benjamin et al, 1991; Kast et al, 1994; y Malnati et al, 1995); b) analizar la expresión de moléculas que participan en la maquinaria del procesamiento antigénico y presentación de péptidos por las moléculas HLA clase I: como son las proteínas catalíticas (LMP-2, LMP-7 y LMP-10) y activadoras (PA28 α y PA28 β) del proteasoma; así como de las subunidades transportadoras Tap-1 y Tap-2; c) finalmente, en este estudio se dirige un esfuerzo para analizar e identificar a los péptidos antigénicos presentados por moléculas HLA clase I, en la membrana de células tumorales de CaCu.

5. HIPOTESIS Y OBJETIVOS.

5.1. Hipótesis.

Se tienen evidencias de que las células tumorales de cáncer cérvico-uterino, expresan epitopos derivados de proteínas virales de HPV a través de moléculas HLA clase I en la membrana celular (Bartholomew et al, 1994; Kast et al, 1994; y Rensing et al, 1995). No obstante, se ha encontrado que un porcentaje importante (78%) de tumores de CaCu con infección de HPV-16/18 presentan deficiencias en la expresión de moléculas MHC-I (Keating et al, 1995), en donde en una tercera parte de ellos se ha reportado una deficiencia en la expresión Tap-1 (Cromme et al, 1993; Garrido et al, 1993; Keating et al, 1995). Por otro lado, se sabe que bajo ciertas condiciones, como son el cultivo celular en presencia de IFN- γ (Brown et al, 1991; Bornstein et al, 1996; y Eleuteri et al, 1997); cultivo celular a 26°C (Ljunggren et al, 1990; y Rock et al, 1991); y el cultivo de las células en presencia de péptidos específicos (Elliot et al, 1991; Jardetzky et al, 1991; y Malnati et al, 1995), la expresión de moléculas HLA clase I es incrementada en la membrana celular. En consecuencia, al analizar la expresión y funcionalidad de moléculas clase I del MHC en células de CaCu (líneas celulares CALO e INBL), se espera que la expresión deficiente de estas moléculas, sea restablecida bajo condiciones que la promueven: cultivo celular a 26°C, en presencia de IFN- γ y de péptidos específicos. Asimismo, es posible que la baja expresión de moléculas MHC-I se asocie con defectos en la expresión de proteínas asociadas con el procesamiento de antígenos. Finalmente se espera encontrar que epitopos derivados de proteínas virales de HPV sean presentados por moléculas MHC-I en estas líneas celulares.

5.2. Objetivos.

5.2.1 Objetivos generales.

- a) Analizar la expresión y funcionalidad de las moléculas HLA clase I, en las líneas celulares de cáncer cérvico uterino CALO e INBL.
- b) Analizar la expresión de moléculas que participan en el procesamiento y presentación de péptidos por moléculas MHC-I en estas líneas celulares.
- c) Identificar a los péptidos inmunogénicos presentados por moléculas MHC-I en CALO e INBL.

5.2.2. Objetivos particulares.

- a) Analizar la expresión de moléculas MHC-I en la membrana celular de las líneas CALO e INBL y su inducción con IFN- γ a 26°C, o en presencia péptidos específicos.
- b) Determinar la expresión de los transportadores asociados con el procesamiento de antígenos Tap-1 y Tap-2 en las líneas CALO e INBL.
- c) Determinar la expresión de las subunidades catalíticas LMP-2, LMP-7 y LMP-10 del proteasoma en las líneas celulares.
- d) Determinar la expresión de las subunidades reguladoras PA28 α y PA28 β del proteasoma en las líneas celulares.
- e) Aislar los péptidos asociados a moléculas MHC-I de las líneas celulares CALO e INBL.
- f) Evaluar la capacidad estimuladora de linfocitos T de los péptidos aislados
- g) Identificar y caracterizar a los péptidos con actividad inmunogénica.
- h) Evaluar la inducción de linfocitos T citotóxicos con los péptidos caracterizados.

6. MATERIALES Y METODOS.

6.1. Líneas celulares y sus características.

Las líneas celulares de carcinoma cérvico-uterino CALO e INBL, fueron establecidas en nuestro laboratorio a partir de dos tumores malignos, provenientes de dos pacientes con cáncer cervical y cuyos estadios clínicos fueron IIB y IVB respectivamente (Monroy et al, 1992). La línea celular de CaCu denominada HELA (HPV-18+); la línea SIHA (HPV-16+); y las líneas celulares CALO e INBL, fueron cultivadas en monocapas, utilizando medio RPMI-1640 (Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA) suplementado con 10% (vol/vol) de suero fetal de bovino (SFB) (HyClone, Inc. Laboratories Logan Utah, USA), penicilina G (100 IU/ml) (LAKESIDE, SA de CV México) y 100 µg/ml de sulfato de estreptomina (Sigma Chem. Co. St. Louis Mo, USA). La línea celular T2, híbrido de linfocitos T y B, negativa para los genes que codifican para las proteínas asociadas al procesamiento de antígenos (Tap-1 y 2 y LMP-2 y 7), fue utilizada como control negativo para estas moléculas (Salter y Cresswell, 1986).

Las líneas celulares CALO and INBL fueron tipificados para conocer su haplotipo de histocompatibilidad clase I (HLA-A, -B y -C) en tres lugares independientes, (Laboratorio de Inmunogenética INDRE; Laboratorio de Inmunología, CMN SXXI y Departamento de Inmunología del INNSZ, SSA), con la finalidad de obtener un haplotipo consenso. Las técnicas utilizadas para su determinación, fueron la técnica estandar de microcitotoxicidad y por técnicas de biología molecular a través de la hibridación del ADN celular con sondas específicas (Vargas-Alarcón et al, 1997). CALO presentó el haplotipo HLA-A26, -A68, -B27, -B78(Bw6), Cw1 y Cw5; mientras que INBL presentó el HLA-A11, -Aw33, -B39, -B48(Bw6), -Cw3 y -Cw4.

La tipificación de HPV para CALO e INBL, se llevó a cabo utilizando una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), seguida de un ensayo de Southern blot. Para identificar el tipo de HPV presente en el ADN de las líneas celulares, se utilizaron sondas de hibridación, las cuales corresponden a segmentos de la proteína L1 de HPV-16 y HPV-18 (Iwasawa et al, 1996). Brevemente, 200ng del ADN de cada línea celular fueron colocados en mezcla de reacción compuesta por 1U de Taq polimerasa (Perkin Elmer, U.S.A); 1ml de solución amortiguadora para PCR conteniendo MgCl₂ a 2mM; 200mM de cada uno de los nucleótidos dATP, dGTP, dCTP y dTTP (Boehringler, Germany); y 10pM de cada uno de los "primers" para amplificar los fragmentos: 7485-7804 de HPV-18 (Ong, et al, 1993) y 7478-7841 para HPV-16 (Ho et al, 1991). Se realizaron 25 ciclos de

amplificación y cada ciclo consistió en: 0.5 min a 94°C, 0.5 min a 54°C y 0.5 min a 72°C, con una temperatura media de 54°C en un termociclador (Techne, Cyclogene, U.S.A). Los oligonucleótidos fueron sintetizados en un Gene Assambler Plus (Pharmacia, Biotech Sweden).

6.2. Anticuerpos monoclonales y su purificación.

Para la detección de moléculas MHC clase I, en este trabajo se utilizaron anticuerpos monoclonales (MAb) provenientes de los siguientes hibridomas: B27M1(Anti HLA-B27, -B7), A11.1M(Anti HLA-A11, -A24) y SFR8-B6 (Anti HLA-Bw6), los cuales fueron comprados en la ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA). El hibridoma W6/32, el cual reconoce la fracción constante de las moléculas HLA-A, -B y -C, anticuerpo monomérico y de moléculas HLA no clásicas, fue generosamente proporcionado por el Dr. Gerd Moldenhauer del Centro Alemán de Investigación en Cáncer, Heilderberg, Alemania.

Los MAb fueron obtenidos a partir de sobrenadantes de cultivos, en el caso del anticuerpo anti HLA-Bw6; o mediante ascites para los demás anticuerpos. La ascites se obtuvo de la siguiente manera: para cada hibridoma, se utilizaron 5 ratones de la cepa BALB/c, los cuales fueron previamente sensibilizados con 1 ml de pristano (Sigma, U.S.A.) inyectado en la cavidad peritoneal. Después de una semana, a cada ratón se le inyectaron aproximadamente 5×10^6 células en 1 ml de solución amortiguadora de fosfatos (NaH_2PO_4 0.015M, K_2HPO_4 0.0011M, NaCl 0.15M, KCl 0.003M). Una o dos semanas después, se colectó la ascites mediante una punción en la cavidad peritoneal, el líquido se centrifugó por 10 minutos a 1500 x g, para después inactivar el sobrenadante a 56°C en baño maría por 45 minutos. Finalmente se centrifugó a 20,000 x g por 30 minutos, se diluyó 1:10 con PBS y se filtró a través de membranas de 0.45 μm (Coligan et al, 1992).

Los anticuerpos monoclonales contenidos en el medio condicionado y en la ascites fueron purificados por medio de una cromatografía de afinidad, usando una matriz de afinidad de proteína A-Sefarosa (Pharmacia, Biotech, Suecia), o bien de proteína G-Sefarosa (Sigma, U.S.A.) tomando en consideración la afinidad del anticuerpo por la matriz (Tabla 6.1).

Tabla 6.1. Selección de matriz para purificar anticuerpos monoclonales a partir de medios condicionados o ascites.

HIBRIDOMA	ISOTIPO DEL ANTICUERPO	MATRIZ USADA
A11.1M	IgG ₃	PROTEINA G
B27.M1	IgG _{2a}	PROTEINA A
SFR8-B6	IgG _{2b}	PROTEINA G
W6/32	IgG _{2a}	PROTEINA A

La matriz fue previamente lavada con PBS, y después empacada en columnas de 10 ml (Sigma, USA), se le hizo pasar el medio condicionado o la ascites diluída 1:10 con PBS, a una velocidad de 1 ml/minuto y a una temperatura de 4°C. Después de pasar todo el volumen del medio condicionado o de ascites, se lavó la columna con PBS, hasta que después de monitorear el eluyente a una longitud de onda de 280 nm, se obtuviera una lectura similar a la basal con PBS solo. A continuación se eluyó el anticuerpo haciendo pasar por la columna una solución de ácido clorhídrico y glicina con un pH de 2.8 (Glicina 0.1M, HCl 0.2M pH=2.8). La solución ácida que contenía el anticuerpo, fue neutralizada inmediatamente (pH= 7-7.5) adicionando una solución de Tris-Acido clorhídrico (0.166M) con un pH de 9. El anticuerpo desprendido fue cuantificado de acuerdo a la densidad óptica a 280 nm, para la cual 1mg de IgG corresponde a una OD de 1.35 (Harlow y Lane, 1988). Finalmente, los anticuerpos obtenidos fueron guardados en alícuotas.

Cuando los anticuerpos fueron utilizados para acoplarse de manera covalente en matrices de Sefarosa activada con CNBr (Pharmacia, Biotech, Suecia), éstos fueron previamente dializados, utilizando un amortiguador de acoplamiento (NaCl 0.5M, Na₂HCO₃ 0.1M, pH=8.3) en una membrana de 12 kDa de corte (Harlow y Lane, 1988).

6.3. Detección de moléculas MHC-I por inmunofluorescencia.

Para determinar la expresión en membrana de las moléculas MHC-I, 5 x 10⁵ células fueron incubadas durante 30 minutos con 10µg/ml de cada uno de los anticuerpos purificados. A continuación, las células fueron lavadas en PBS suplementado al 2% con SFB pH 7.2 (PBS-SFB). Después, las células fueron incubadas con anticuerpo de cabra anti-ratón marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Gibco Co. U.S.A) a una

dilución de 1:100 durante 20 minutos en hielo, seguido por dos lavados con PBS-SFB. Finalmente las células fueron resuspendidas en 0.5ml of PBS-SFB y 1µg/ml de Ioduro de Propidio (Sigma Chem. Co. U.S.A). Las células fueron analizadas en un citómetro de flujo (FACScan, Becton Dickinson & Co. Mountain View, CA, USA). Se seleccionó una ventana para analizar la fluorescencia de 10 000 eventos mediante un programa denominado lysis II.

En todos los experimentos la detección fue realizada por triplicado y la desviación estándar fue también considerada. El nivel de detección con el anticuerpo monoclonal secundario, cabra anti-ratón marcado con FITC, fue considerado como control negativo. La tinción con anticuerpos irrelevantes con similares isotipos, fue sustraída de los valores obtenidos; los valores del isotipo control fueron <10% de aquellos obtenidos por los anticuerpos específicos.

Para determinar la expresión de alelos HLA clase I en células sujetas a cambios de temperatura (26/37°C), las células CALO e INBL fueron cultivadas inicialmente a 26°C durante 24 hrs, posteriormente el medio de cultivo se renovó por un medio a 37°C y las células fueron cultivadas durante 4 hrs más a 37°C. La expresión de HLA fue detectada como se mencionó anteriormente. Paralelamente se determinó la expresión de moléculas HLA en células cultivadas a 26°C y a 37°C.

El efecto de IFN-γ en la inducción de HLA fue determinado en las líneas celulares cultivadas en presencia o ausencia de 100 U/ml of IFN-γ (Genzyme Diagnostics, Cambridge, U.S.A) durante 48 hrs.

6.4. Ensayos de estabilización de las moléculas HLA-A11 y -B27 con péptidos sintéticos.

La estabilización de los alelos HLA-A11 y B27 fue realizada con los siguientes nonámeros: FRYNGLIHR el cual corresponde a un péptido naturalmente unido a HLA-B2705 (Jardetzky et al, 1991; Benjamin et al, 1991 y Malnati et al, 1995); y la secuencia AVDLYHFLK, la cual se sabe que se une específicamente a HLA-A11 (Kast et al, 1994). Estas secuencias fueron sintetizadas en un sintetizador automático de fase sólida (Applied Biosystems, Synergy Personal Peptide Synthesizer 432, Perkin Elmer Foster, C.A) mediante ciclos repetidos con la adición de aminoácidos protegidos a una resina de poliestireno (Gausepohl et al, 1990). Los péptidos fueron removidos con una solución acuosa de ácido trifluoroacético. Finalmente los péptidos fueron analizados mediante cromatografía en líquido de alta resolución, liofilizados y disueltos en PBS y almacenados

a -70°C antes de su uso.

Los ensayos de estabilización de los alelos HLA-B27 y -A11 en las células CALO e INBL respectivamente, se realizaron en presencia de los péptidos específicos en células cultivadas por 24 h en presencia de 100µM de cada uno de los péptidos; o en células, en las cuales los péptidos (100µM) fueron permeados hacia su interior utilizando una solución al 1% del detergente saponina durante 1hr de cultivo a 37°C (Jacob et al, 1991). En este último caso, las células fueron lavadas con RPMI-1640 conteniendo 10% de SFB y se cultivaron durante 4 horas más a 37 °C, después de este tiempo se procedió a determinar la expresión de los alelos en superficie celular como previamente se mencionó.

6.5. Análisis de RNAm.

La extracción de RNA total de las células fue realizada mediante un método estándar con isotiocianato de guanidina, utilizando un lote de reactivos RNaid®PLUS Kit (BIO 101, La Jolla CA, U.S.A). Para detectar la expresión de los alelos HLA-A11, -B27, -B48 y -B78, RNA total de cada línea celular fue hibridado con sondas específicas para estos alelos. Estas sondas fueron generosamente donadas por el Prof. Alejandro Madrigal, del Instituto de Investigación Anthony Nolan, Londres U.K. El cDNA de GAPDH (utilizado como sonda para estimar igual cargado), fue obtenido del plásmido pVC18 mediante el uso de la enzima *Bgl-I*.

Para la hibridación, se utilizaron 40µg de RNA total, el cual se separó mediante electroforesis en un gel de agarosa y se transfirió a membrana de nylon (Zeta-Probe; Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA). La hibridación fue hecha en una solución con formamida a 42 °C incubándola durante toda la noche. Las membranas fueron lavadas tres veces en 0.3M NaCl-0.03M C₆H₅Na₃O₇ pH 7 a 60 °C por 30 min y expuestas en una placa para autoradiografía.

6.6. RT-PCR para la detección de las moléculas transportadoras (Tap-1, -2), catalíticas (LMP-2, -7 y 10) y activadoras (PA28α y β) del proteasoma.

Para este análisis, el ARN total de las células, se obtuvo mediante el protocolo anexo al reactivo Trizol (Life Technologies, Inc., USA). Brevemente, el botón celular fue disuelto con trizol, seguido por una extracción con cloroformo. La fase acuosa fue recuperada mediante centrifugación y el ARN fue precipitado con un volumen de alcohol isopropílico, lavado con etanol al 70% y finalmente resuspendido en 30 µl de agua tratada con

dietilpirocarbonato.

Para la transcripción reversa, 5 µg de ARN fueron combinados con 5µl de buffer 10X, 10µl de MgCl₂ 25mM, 2µl de dNTP's 100mM, 0.5 µl de inhibidores de ARNasas, 1µl de oligo-dT (5µg/µl), 5µl de DTT 0.1M, 1µl de enzima Mmlv-RT (200U/µl) (Life Technologies, USA), y H₂O cbp 50µl. Esta mezcla fue incubada durante una hora a 42°C.

El ADN resultante (ADNc) fue amplificado por PCR, combinando 5µl de solución de ADNc, 1.5µl de MgCl₂ 25mM, 0.2µl de dNTP's 100mM, 0.2µl de Taq Polimerasa (5U/µl) (Amplificasa, Biotecnologías Universitarias. Mex), 0.2mL de oligonucleótidos específicos para β-actina: GGGTCAGAAGGATTCCTATG y GGTCTCAAACATGATCTGGG (Sintetizados por Gibco, BRL, USA), 2.5 µl de buffer 10X y agua suficiente para un volumen final de 25µl. Los oligonucleótidos usados para amplificar específicamente las subunidades del proteasoma fueron los siguientes: LMP2: GGGATAGAAGTGGAGGAACC y AGATGACACCCCCGCTTGAG; LMP7: GAACACTTATGCCTACGGGGTC y TTTCTACTTTCACCCAACCATC; LMP10: ATTCTGGGCGCCGATACGCG y GCCAGGGCCGCTCCTGACC; PA28α: GAGCCAGCTCTCAATGAAGCC y CACCAGCTGCCGATAATCACC; PA28β: CACCCAAGGATGATGAGATGG y GCTCAGCATAGAAGGCCCTCAG (Johnsen et al, 1998). Las muestras fueron entonces incubadas en un termociclador modelo Cyclogene (Techne, USA) a 94°C por un minuto, seguido de 30 ciclos con los siguientes segmentos: 94°C por 30s, 60°C por 30s y 72°C por 1.5min. Después de estos ciclos, las muestras fueron incubadas a 72°C por 5 min. Para la amplificación de LMP10 se empleó el siguiente programa: 94°C por 5 min, y entonces 25 ciclos de: 94°C por 1min, 60°C por 1min y 72°C por 1.5min, seguidos por una incubación de 5 min a 72°C.

Los oligonucleótidos utilizados para amplificar las subunidades transportadoras fueron: Tap-1: GACAAGAGCCACAGGTATTTGG y TGATGAGAAGCACTGAGCGG; Tap-2: TACCTGCTCATAAGGAGGGTGC y ATTGGGATATGCAAAGGAGACG (Seliger et al, 1997). Para su amplificación, se utilizó el siguiente programa: 94°C por 5 min, seguido de 25 ciclos de 94°C por 1 min; 58°C por 1 min; y 72°C por 1min, seguidos por una incubación de 5 min a 72°C. Los productos de las reacciones fueron analizados en geles de agarosa al 3% a 90V en buffer TAE (Tris-acetato 40mM y EDTA 1mM).

6.7. Marcaje metabólico con [³⁵S] e inmunoprecipitación de moléculas MHC-I.

Para la inmunoprecipitación de las moléculas HLA-B27 y -A11, 2x10⁷ células de las

líneas CALO e INBL fueron cultivadas durante 45 minutos en RPMI-1640 libre de metionina, suplementado al 3% con SFB previamente dializado. Posteriormente, las células fueron marcadas con 400 μ Ci de metionina marcada [³⁵S] (Express labeling protein, DUPONT, Boston U.S.A) durante 30 minutos. Los botones celulares obtenidos fueron solubilizados mediante la adición de 500ml de una solución amortiguadora de lisis (Tris 50mM, NaCl 150mM, NP-40 1%, pH=7.8) suplementada con inhibidores de proteasas (EDTA 5mM, PMSF 0.2mM, Aprotinina 50 μ M, DTT 0.5mM).

Antes de inmunoprecipitar a las moléculas MHC-I, los lisados celulares fueron purificados mediante la adición de 5 μ l/ml de suero normal de ratón y 40 μ l/ml de una suspensión de *Staphylococcus aureus* Cowan I, el procedimiento se realizó durante toda la noche a 5°C y agitación constante. Al día siguiente, la bacteria fue removida por centrifugación y la detección de proteína marcada fue determinada en cada ensayo mediante la técnica de precipitación con ácido trifluoroacético (Harlow y Lane, 1988). Para los ensayos de inmunoprecipitación, se tomaron iguales cantidades de proteína marcada (determinada mediante las cpsm detectadas en los lisados celulares), en seguida, 100 μ l de esferas de Proteína G sefarosa (Farmacia, Uppsala Sweden) cargadas con anticuerpos monoclonales B27M1 y A11.1M fueron adicionadas. La inmunoprecipitación de las moléculas HLA-A11 y -B27 fue llevada a cabo en ausencia o en presencia de 100 μ M de péptidos alelo-específicos (FRYNGLIHR para HLA-B27 y AVDLYHFLK para HLA-A11) y el péptido SIINFEKL (258-266 de la proteína ovalbúmina), específico para la molécula H-2K^b de ratón (Falk et al, 1993), que fue utilizado como péptido irrelevante. La incubación de las esferas con los lisados celulares se hizo durante toda la noche a 5°C. Las esferas fueron lavadas 5 veces con una solución amortiguadora de lavado (Tris-HCl 50mM, NaCl 150mM, Nonidet P-40 0.1% y EDTA 5mM a un pH de 7.8), y otras 3 veces con solución de lavado sin NP-40. Las esferas fueron tratadas con solución de Laemmli y separadas en un gel de SDS-PAGE al 15%, finalmente los geles secos fueron expuestos a autoradiografía para detectar en placas fotográficas la presencia de las bandas protéicas.

6.8. Obtención de péptidos a partir de células marcadas metabólicamente.

Con la finalidad de obtener y detectar péptidos unidos a moléculas MHC-I de las líneas celulares CALO e INBL, 50x10⁶ células de ambas líneas, fueron lavadas en medio RSA compuesto por RPMI-1640 desprovisto de los aminoácidos Lys, Leu, Ala y Phe y suplementado al 2% con SFB dializado. Las células fueron incubadas en

estas condiciones durante 1 hora a 37°C, después fueron centrifugadas y el botón celular se resuspendió en RSA conteniendo 1mCi de cada uno de los siguientes aminoácidos tritados $^3\text{[H]}$ -Lys, Leu, Ala, y Phe, los cuales se sabe son altamente encontrados como aminoácidos de anclaje de los péptidos que se unen a las moléculas MHC-I (Rammensee et al, 1995).

Después de 7h de incubación a 37°C, los botones celulares colectados por centrifugación, fueron lavados en RSA y lisados en solución amortiguadora de lisis. El lisado de cada línea fue purificado con *Staphylococcus aureus* Cowan I y suero de ratón. En seguida se procedió a la inmunoprecipitación de las moléculas MHC-I utilizando esferas de Proteína-A sefarosa previamente cargada con MAb W6/32.

Los péptidos fueron eluidos de las moléculas MHC-I mediante el uso de ácido acético al 10% y calentamiento durante 1-2 minutos en baño de agua hirviendo. El sobrenadante fue ultrafiltrado en filtros de amicon centricon con corte <5000 Da (Ultrafree-CL, 5000 NMWL, Millipore, U.S.A). Finalmente los péptidos colectados fueron separados en cromatografía en líquido de alta resolución (HPLC), usando una columna de fase reversa (C-18; 5mm, 4.0x300 mm, Millipore U.S.A). Se utilizó un gradiente lineal de 0-60 %, con los solventes A:0.1% de ácido trifluoroacético (TFA) en agua y B: TFA 0.1% en Acetonitrilo, con orden creciente de acetonitrilo, las fracciones fueron colectadas a razón de 0.5m-1ml/min.

Cada una de las fracciones de péptidos obtenidas después de la separación por HPLC (Waters, U.S.A), fue cuantificada para evaluar el contenido de los péptidos mediante la radiactividad emitida (emisión- β) en un contador de centelleo (Beckmann, U.S.A).

Por otra parte, las cadenas de las moléculas MHC-I retenidas en los filtros de amicon centricon con corte <5000 Da, fueron colocadas en un gel de electroforesis SDS-PAGE al 15%, para corroborar la presencia de la cadena pesada de 45 kDa y la β_2m de 12 kDa.

6.9. Elución de péptidos para evaluar su actividad antigénica.

Para obtener péptidos, en proporciones suficientes para evaluar su actividad antigénica, se obtuvieron moléculas MHC-I a partir de 2×10^{10} células de cada una de las líneas de carcinoma de cérvix humano, CALO e INBL. La obtención se hizo mediante una cromatografía de afinidad, en la cual los lisados celulares, en una relación de volumen de 5:1 con un amortiguador de lisis, fueron centrifugados a 4,000 xg por 10 minutos, para así poder retirar los organelos más pesados, a continuación el

sobrenadante fue preadsorbido con 10 ml de proteína A de *Staphylococcus aureus* Cowan I (Sigma, U.S.A.), y se centrifugó a una velocidad de 30,000 xg durante 5h, a continuación el sobrenadante fue filtrado a través de una membrana de 0.45µm (Millipore, USA).

Simultáneamente se prepararon las columnas de inmunoafinidad con el anticuerpo W6/32 purificado. Para ello, 3.5 g de Sefarosa activada con CNBr (Pharmacia Biotech, Suecia) fueron lavados con 700 ml de HCl 1 mM para activar a la Sefarosa. Una vez activada se agregaron 60 mg de un anticuerpo purificado en un volumen de 20 ml de amortiguador de acoplamiento (Ver inciso 6.2) y se dejó incubar toda la noche a 4°C con agitación suave. Una vez que el anticuerpo se acopló a la Sefarosa, lo cual se verificó leyendo la absorbancia a 280 nm del sobrenadante, se inactivaron los sitios activos remanentes en la matriz, usando para ello una solución de inactivación (Glicina 0.2M, pH 8.0) por un lapso de 16 horas a 4°C. Después la columna fue lavada en tres ciclos, cada uno de los cuales consistió en un lavado con amortiguador de acetatos (Ac. Acético-Acetato de sodio 0.1 M, NaCl 0.5 M, pH=4) y otro lavado con Tris-HCl 0.1 M conteniendo NaCl 0.5 M a PH=8.0. Una vez lavada la matriz con el anticuerpo acoplado, ésta se empacó en una columna de vidrio de 10 ml (Sigma, USA).

Posteriormente, el filtrado obtenido de la lisis de las líneas celulares, se hizo fluir a través de columnas inespecíficas (Sefarosa sin anticuerpo e inactivada y sefarosa cargada con un anticuerpo inespecifico e inactivada) con ayuda de una bomba peristáltica a un flujo de 1 ml/minuto. Posteriormente los lisados, se hicieron fluir a través de las columnas cargadas con anticuerpo W6/32 (volumen de la matriz de 10ml). El paso del lisado a través de las columnas se hizo durante un lapso de 24 horas, al cabo del cual, las columnas fueron lavadas mediante el flujo de 500 ml de amortiguador de lavado (ver inciso 6.7) y finalmente con 4,000 ml de Tris-EDTA pH= 7.8. Una vez hecho lo anterior, y verificando que el líquido de la elución tuviera una O.D basal, las moléculas MHC-I unidas a la matriz fueron desprendidas con ayuda de una solución de ácido acético al 10%. El eluido se colectó en fracciones de 1 ml/minuto y se cuantificó la concentración de proteína en cada fracción con ayuda de un espectrofotómetro a una longitud de onda de 280 nm. Las fracciones con mayor absorbancia fueron reunidas y se introdujeron a un baño con agua en ebullición durante dos minutos. Por otra parte, inmediatamente después de haber eluido a las moléculas MHC-I de las columnas, éstas fueron reequilibradas con una solución de Tris-HCl 0.1 M conteniendo 0.5 M de NaCl pH= 8.0. Después de este procedimiento, se hizo pasar nuevamente el lisado celular. Se realizaron

dos eluciones de moléculas MHC-I mediante el procedimiento antes mencionado. Los mismos pasos fueron efectuados en el caso de la columna inespecífica para eliminar a los contaminantes que de manera inespecífica pueden unirse a la matriz (Coligan et al, 1992; y Harlow y Lane, 1988).

6.10. Evaluación de la actividad antigénica de los péptidos disociados de las moléculas MHC-I.

Para evaluar la actividad antigénica de los péptidos disociados de las moléculas MHC-I, se obtuvieron muestras de sangre periférica de varios donadores, "normales" y con CaCu. En seguida, se procedió a separar las células mononucleares mediante un gradiente de densidad (1.077 g/ml) con Ficoll-Histopaque (Microlab, México). Las células mononucleares fueron cultivadas (2.5×10^5 células por pozo de una placa de 96) y después de separar las células no adherentes, la fracción adherente fue tratada con solución amortiguadora de citratos (Ac. cítrico 0.265M, Na_2HPO_4 , pH=3.0-3.2) suplementada con albúmina sérica bovina 1% y $\beta_2\text{m}$ 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, para remover los péptidos naturales presentados por moléculas MHC de estas células (Celis et al, 1994).

Para evaluar la actividad antigénica de los péptidos, sobre los linfocitos T, cada una de las fracciones peptídicas separadas por HPLC fue liofilizada y disuelta en 1ml de PBS para ser filtrada estérilmente. 10 μl de cada una de estas fracciones fueron colocadas en diferentes pozos conteniendo a las células adherentes en presencia de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de $\beta_2\text{m}$. Las células fueron fijadas con glutaraldehído al 0.1% en PBS y lavadas 3 veces con PBS. A continuación, a cada uno de los pozos se les adicionó 10^5 linfocitos T obtenidos de la fracción no adherente y se procedió a co-cultivarlos durante 72 h bajo estas condiciones en medio completo consistente en medio Dulbecco Modificado (GibcoBRL) suplementado 10% con SFB, 100U de penicilina, 4mM de L-glutamina, 1mM de piruvato de sodio y 20 μM de β -mercaptoetanol. Después de las 72 hrs de cultivo, se adicionó 1 μCi de timidina tritiada a cada uno de los pozos y después de 18 h se determinó la incorporación de timidina tritiada, evaluando la actividad en un contador de centelleo. La estimulación de los linfocitos T en presencia de 10U/ml de IL-2 recombinante humana (R&D Systems) fue utilizada como control positivos. Mientras el uso de bradiquinina (INC, Laboratories) a una concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, fue utilizada como un péptido irrelevante. Por su parte, linfocitos T co-cultivados con células adherentes sin péptidos, fueron utilizados como controles negativos. Todos los

experimentos fueron realizados por duplicado y la desviación estándar fue evaluada a partir de 4 pozos en cada experimento.

6.11. Caracterización bioquímica y antigénica de los péptidos.

La fracción de péptidos con mayor capacidad en inducir la mayor estimulación de linfocitos T, fue llevada a un análisis de espectro de masas (MALDI-spectra) y posteriormente a la degradación amino-terminal de Edman, para conocer el contenido y la secuencia de aminoácidos de esta fracción. Estos procedimientos fueron llevados a cabo en la HHMI Biopolymer Laboratory & W.M. Keck Foundation Biotechnology Resource Laboratory, de la Universidad de Yale.

Mediante el uso de las secuencias de residuos más significativas, de los péptidos reportados, se procedió a realizar un análisis de homología con secuencias de diferentes proteínas en una base de datos (Blast Search Entrez) (Falk et al, 1991a).

Los péptidos NQFPFLQF, MQYEIMNYF y NQYEIINYF que fueron identificados de la secuenciación de una fracción de péptidos antigénicos de la línea INBL (fracción 19), así como sus homólogos que forman parte de las secuencias de proteínas virales, NVFPFLQM (54-62 de L1-HPV-18), MQYEIINYM (338-346 de la proteína accesoria polimerasa T6/GS de HSV) y NEYEILNYF (145-153 de UL1-HCMV); así como los péptidos FPIFLQMAL (56-64 L1 de HPV-18) altamente afín al alelo HLA-Cw4, y el péptido SIINFEKL (258-266 de la proteína ovoalbúmina) considerado como irrelevante, fueron sintetizados de manera similar a los péptidos específicos para HLA-A11 y -B27 (ver inciso 6.5) (Gausepohl et al, 1990).

6.12. Ensayos de estabilización de la molécula HLA-Cw4.

Para los ensayos de estabilización de la molécula HLA-Cw4, se utilizó la línea celular C1R, la cual presenta en su membrana celular únicamente a este alelo de manera detectable (Zemmour et al, 1992). Estos ensayos consistieron en cultivar a las células C1R a 37°C en presencia 50mM de cada uno de los péptidos durante 24 horas, colocando una cantidad de estos péptidos durante 12 horas y adicionando medio nuevo junto con más péptido en las siguientes 12 horas. Las moléculas MHC-I en la superficie de las C1R tratadas, fueron detectadas con el anticuerpo monomórfico W6/32, de acuerdo al procedimiento antes mencionado.

6.13. Evaluación de la estimulación de linfocitos T con los péptidos sintéticos.

Las células C1R fueron incubadas toda la noche en presencia de 50mM de cada uno de los péptidos sintéticos y de 5µg/ml de β₂m (Sigma, U.S.A) toda la noche a 37°C. Después, las células fueron lavadas 2 veces en medio completo consistente en: Medio Iscove's modificado (Gibco BRL), suplementado con 10% de suero fetal de bovino; 100U/ml de penicilina; 4mM de L-glutamina; 1mM de piruvato de sodio; y 20µM de β-mercaptoetanol. Posteriormente, 5x10⁴ células C1R cargadas, fueron fijadas con una solución al 0.1% de glutaraldehído en PBS y entonces co-cultivadas con 1x10⁵ linfocitos T purificados de donadores normales o de pacientes con CaCu a los cuales se les detectó la presencia del alelo HLA-Cw4 en su haplotipo. Linfocitos T provenientes de otros donadores con otros alelos HLA-C, fueron incluidos como controles irrelevantes. Después de 72 horas en cultivo, los linfocitos fueron pulsados con 1mCi de timidina tritiada y la incorporación de este radionúclido fue determinada 18 horas después del pulso. La estimulación de linfocitos T en presencia de 10U/ml de hrIL-2 (R & D Systems) fue usado como un control positivo; mientras que C1R cargadas con 5mg/ml del péptido de ovoalbúmina, específico para H-2Kb (Moore et al, 1988), fueron usadas como control irrelevante.

6.14. Inducción in vitro, de la respuesta de linfocitos T citotóxicos de memoria.

El método utilizado fue muy similar al realizado por (Evans et al, 1997). Brevemente, 4x10⁶ linfocitos de sangre periférica fueron resuspendidos en 1ml de medio completo e incubados con 10µg/ml de péptido en placas de 24 pozos. Al tercer día de cultivo, las células fueron enriquecidas con 1 ml de medio completo conteniendo 10U/ml de rhIL-2. Al séptimo día, y después semanalmente, las células fueron reestimuladas de la siguiente manera: a) las células C1R fijadas (4x10⁶ células) fueron incubadas durante 2 hrs a 37°C en 1ml de medio completo con 10µg/ml de péptido y 3µg/ml de β₂m; b) después de remover las células no adherentes mediante lavado, 10⁶ células T respondedoras fueron adicionadas en 1 ml de medio completo; y c) las células fueron suplementadas dos días después con 1ml de medio completo conteniendo IL-2 (concentración final de 10 U/ml). Los ensayos de citotoxicidad se llevaron a cabo con linfocitos T cultivados y reestimulados durante 21 días.

6.15. Ensayos de citotoxicidad.

La línea celular INBL fue marcada con ⁵¹[Cr] (Amersham) durante 1 hr. Diferentes

cantidades de células efectoras en 50ml de medio, fueron incubadas y entonces 2.5×10^3 células blanco marcadas con ^{51}Cr fueron adicionadas a cultivos por triplicado en placas de 96 pozos fondo U, en 200 μl de volumen final. Después de 4h de co-cultivo a 37°C , 100 μl de sobrenadante fueron cosechados y transferidos a viales para su cuantificación en un contador de emisión- β (Packard). Células INBL marcadas con ^{51}Cr , incubadas con una solución de Tritón X-100 al 5% ó con medio solo, fueron usadas para determinar la liberación máxima y espontánea respectivamente. La liberación espontánea fue usualmente menor del 10% y nunca excedió en un 15%. El porcentaje de lisis específico de cada ensayo fue calculado de la siguiente manera: % de citotoxicidad = $(\text{liberación experimental} - \text{liberación espontánea}) / (\text{liberación máxima} - \text{liberación espontánea}) \times 100$.

7. RESULTADOS.

A.- EXPRESION Y FUNCIONALIDAD DE LAS MOLECULAS CALSE I DEL MHC EN LAS LINEAS CELULARES DE CARCINOMA CERVICO-UTERINO, CALO E INBL.

7.1. Las líneas celulares de CaCu, CALO e INBL positivas para HPV-18, expresan moléculas MHC clase I de manera conformacional en la membrana celular.

Se sabe que más del 90% de los tumores de cáncer cervical expresan algún tipo de virus de papiloma humano de alto riesgo (HPV-16, 18, 31, 33) (Howley et al, 1991; y Breitburd et al, 1996). Con la finalidad de conocer el tipo de HPV presente en las líneas celulares CALO e INBL, las cuales fueron establecidas a partir de dos carcinomas epidermoides de cérvix con estadios clínicos IIB y IVA respectivamente (Monroy et al, 1992), el DNA de ambas líneas fue analizado con sondas específicas para la proteína L1 de HPV-16 y 18 (virus de alto riesgo frecuentemente asociados con CaCu). El análisis dió por resultado que ambas líneas celulares hibridaron con las sondas de HPV-18, al igual que el mostrado por el control positivo, HELA. Ninguna de las líneas celulares hibridó con la sonda de HPV-16, en la cual la línea SIHA (HPV-16+), dió positividad (Figura 7.1).

Por otro lado, una de las características más comunes que tienen las células malignas para evadir la respuesta inmune, es la de presentar una disminución en la expresión de moléculas clase I del complejo principal de histocompatibilidad en membrana, esta reducción puede estar relacionada con la pérdida en la expresión de alguno de sus componentes: ausencia de β_2 -microglobulina, de la cadena pesada, o de ambas cadenas (Connor y Stern, 1990). Por tal motivo, las líneas celulares CALO e INBL, fueron analizadas por citometría de flujo para detectar la presencia de β_2 -microglobulina (anticuerpo BBM.1), cadena pesada (anticuerpo B9.12) y ambas cadenas de manera conformacional (anticuerpo W6/32). Como se muestra en la figura 7.2, la expresión de β_2 -microglobulina y de la cadena pesada (alfa) en la membrana celular, es similar en ambas líneas celulares. Es interesante mencionar que la asociación de ambas cadenas, detectada con el anticuerpo monoclonal W6/32 (anticuerpo monomórfico que reconoce su asociación), presentó una intensidad de fluorescencia similar a la obtenida para β_2 -microglobulina o para la cadena alfa de manera independiente, lo que sugiere que ambas cadenas se encuentran asociadas conformacionalmente en la membrana celular de CALO e INBL.

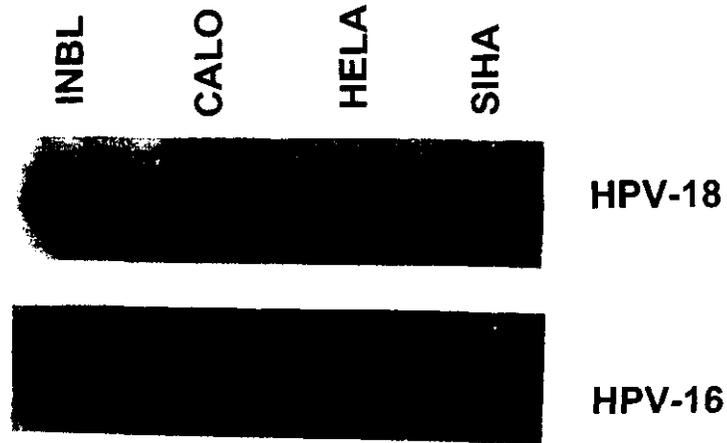


Figura 7.1. Las líneas celulares CALO e INBL de carcinoma cérvico-uterino, son positivas para HPV-18. Mediante un ensayo de Southern blot, usando sondas específicas para HPV-16 y 18, se encontró que las líneas celulares CALO e INBL fueron positivas para HPV-18 pero no para HPV-16 al ser comparadas con las líneas HELA (HPV-18+) y SIHA (HPV-16+).

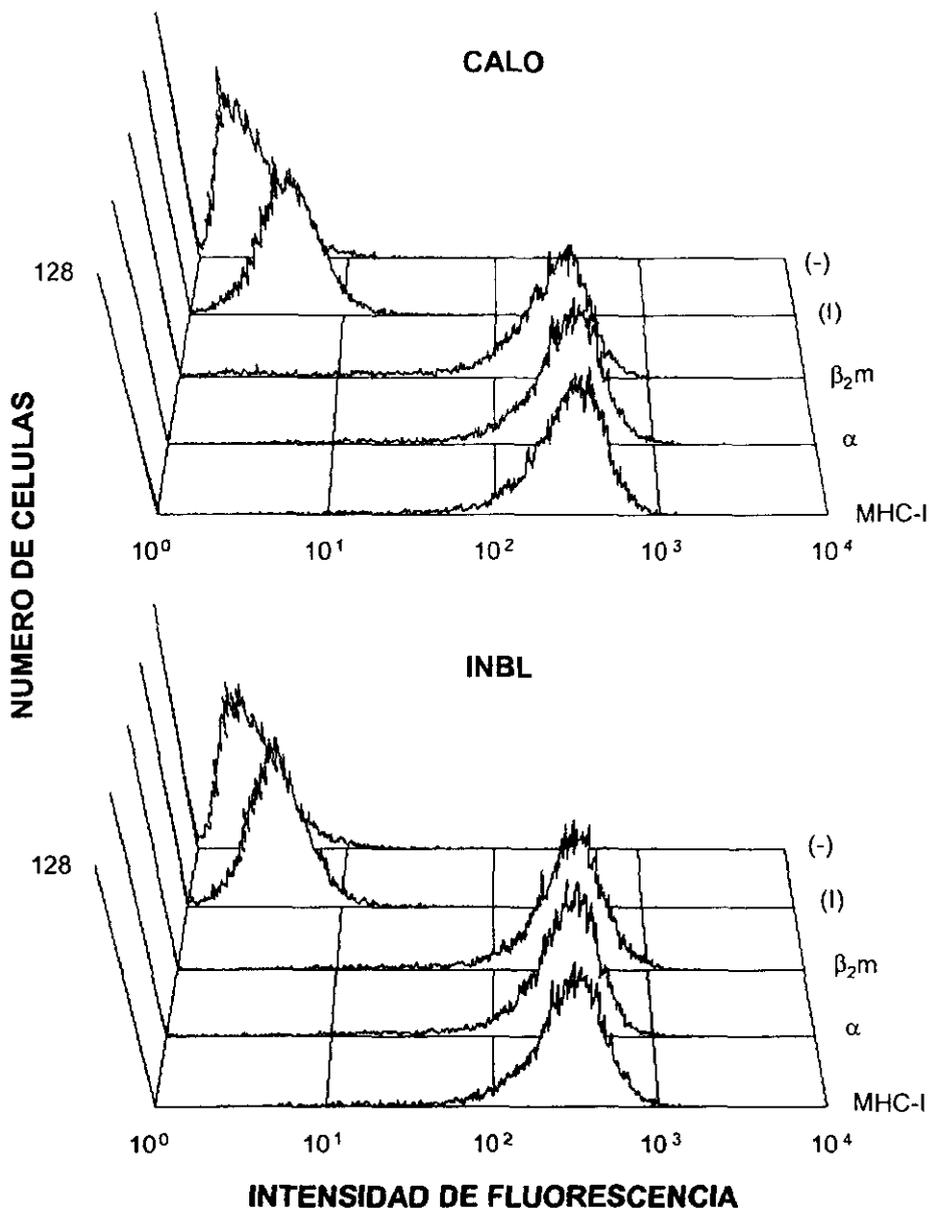


Figura 7.2. CALO e INBL expresan moléculas MHC-I de manera conformacional en la membrana celular. (-), control negativo, anticuerpo secundario marcado con GAM-FITC; (I), control de isotipo, anticuerpo monoclonal anti-CD3, ratón anti-humano. La expresión de β_2 -microglobulina (β_2m) y de la cadena pesada (α), así como su asociación (MHC-I), fueron determinadas mediante citometría de flujo empleando los anticuerpos monoclonales BBM.1, B9.12 y W6/32 respectivamente.

7.2. CALO e INBL expresan de manera diferencial alelos HLA-A y B en su membrana celular.

Tomando en consideración el hecho de que muchos carcinomas de cérvix presentan una pérdida significativa o disminución de la expresión de alelos HLA-A y -B en su membrana celular (Connor et al, 1990; y Cromme et al, 1994a), se procedió a evaluar el nivel de expresión de algunos alelos HLA clase I en CALO e INBL. Los alelos HLA-B27 y -A11 así como los alelos constituidos por la familia HLA-Bw6 el cual incluye al alelo HLA-B78 y -B48 fueron evaluados en CALO e INBL respectivamente. Los alelos restantes en cada una de las líneas celulares, no fueron determinados individualmente por el hecho de carecer de anticuerpos monoclonales alelo-específicos. Al analizar la expresión alélica, encontramos un nivel bajo de expresión de los alelos HLA-A11 y -B27 comparado con el mostrado por el de los alelos -B78 y -B48 (Figura 7.3, histogramas delgados).

Por otro lado, se sabe que IFN- γ es un regulador positivo de la expresión de moléculas MHC y de genes de algunas proteínas relacionadas con el procesamiento antigénico (Tap's, LMP's, PA28, etc) (Gaczynska et al, 1993; Groettrup et al, 1995; y Nandi et al, 1996). Por tal motivo, las líneas celulares CALO e INBL fueron incubadas en presencia de IFN- γ . La expresión conformacional de las moléculas MHC-I, detectada con el anticuerpo monoclonal W6/32, mostró un incremento importante en células cultivadas previamente en presencia de IFN- γ (Figura 7.3, histogramas gruesos). Al analizar la expresión de alelos individuales, se observó que los alelos HLA-B78 y -B48, mostraron un incremento en la membrana celular, mientras que los alelos HLA-B27 y -A11 no incrementaron su expresión en células tratadas con IFN- γ (Figura 7.3).

Por otro lado, al analizar la expresión de las moléculas HLA-B27 y -A11 en la membrana de células normales (linfocitos T de donadores sanos), se observó que la expresión de estos alelos fue mayor en las células normales que en las líneas de CaCu (Figura 7.4), sugiriendo una probable afección en la expresión de estos alelos en las líneas celulares. Con la finalidad de verificar si la expresión deficiente de los alelos era debida a una transcripción deficiente de las moléculas HLA-B27 y -A11, se procedió a realizar un ensayo de Northern Blot para comparar la expresión de HLA-B27 y -B78 en CALO y de HLA -A11 y -B48 en INBL. El análisis reveló que estos alelos expresan un patrón similar de ARNm (Figura 7.5), lo cual nos permite sugerir que esta afección no se debe a defectos en la expresión de los alelos HLA-B27 y -A11.

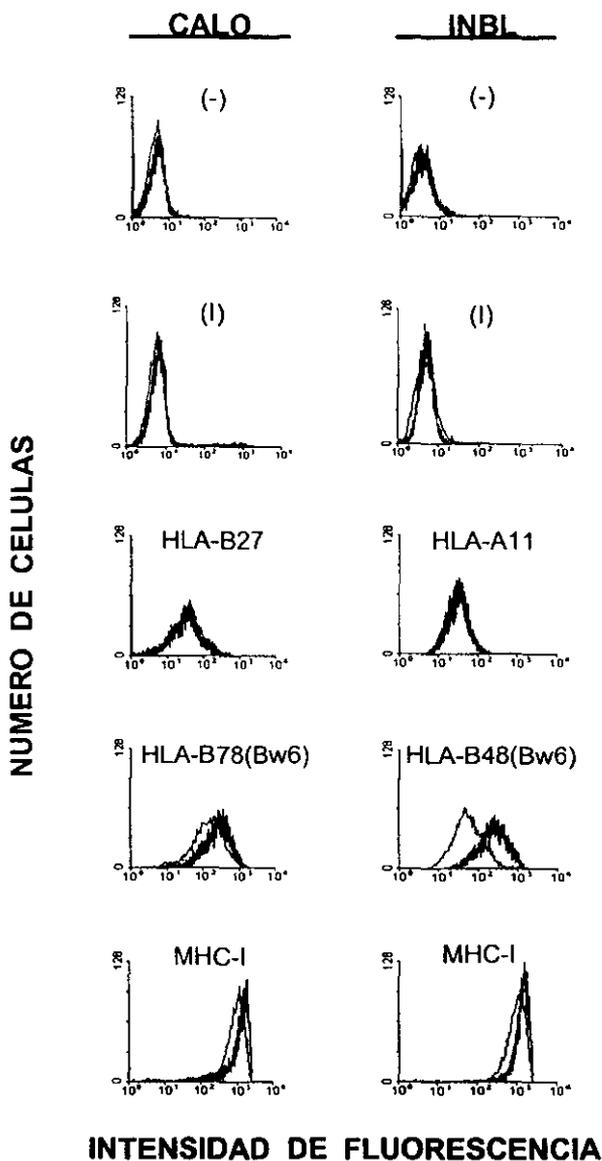


Figura 7.3. Expresión diferencial de alelos HLA-A y -B en CALO e INBL y su inducción con IFN- γ . La expresión de los productos alélicos y del total de moléculas MHC-I fue analizada en células no tratadas (histogramas delgados), o tratadas con 100U/ml de IFN- γ durante 48 horas (histogramas gruesos). (-), nivel de detección con anticuerpo secundario solo, GAM-FITC; (I), control de isotipo, anticuerpo monoclonal anti-CD3. Para la detección de los alelos se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales: B27M1 (anti HLA-B27, -B7); A11.1 (anti HLA-A11, -A24); y SFR8B6 (anti HLA-Bw6). El total de moléculas MHC-I fue determinado con el anticuerpo monomórfico W6/32.

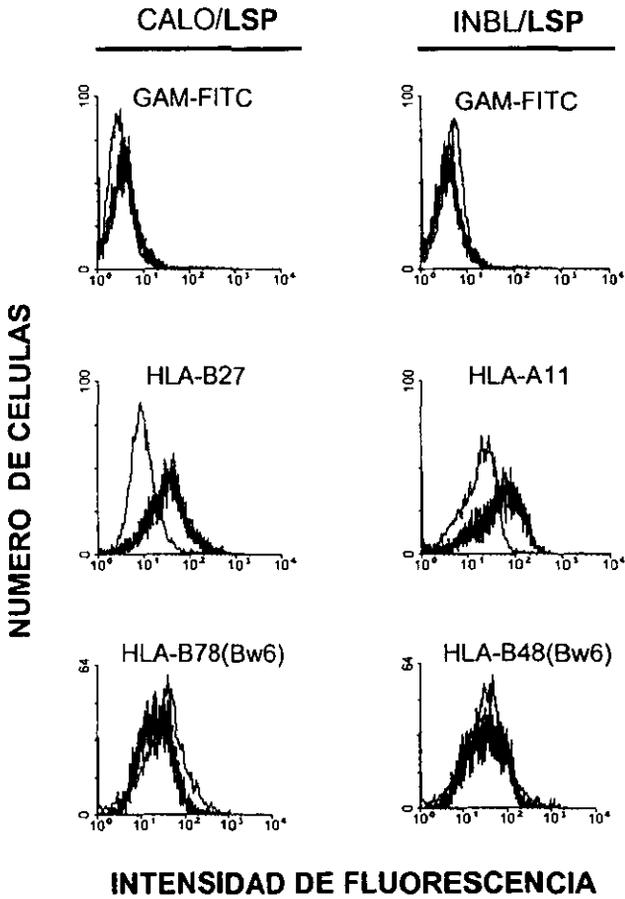


Figura 7.4. Los alelos HLA-B27 y -A11 son debilmente expresados en las líneas celulares CALO e INBL respectivamente. La expresión de los alelos HLA-B27, -A11, -B78(Bw6) y -B48(Bw6) fue determinada en las líneas CALO e INBL como indicado (histogramas delgados), y comparada con aquella expresada en linfocitos de sangre periférica de donadoras normales que contenían estos alelos en su haplotipo (histogramas gruesos). El nivel de tinción con anticuerpo secundario solo, GAM-FITC, fue considerado como control negativo.

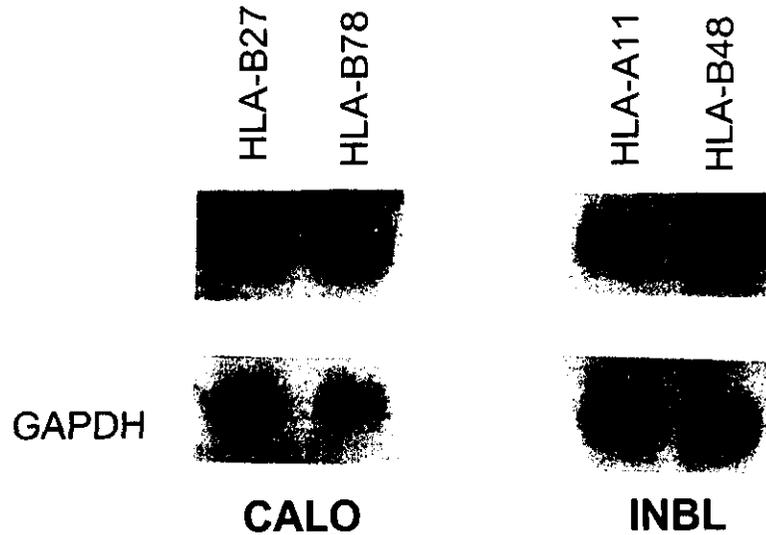


Figura 7.5. Análisis de Northern blot de los alelos HLA-B27, -B78 en CALO y de HLA-A11, -B48 en INBL. Después de obtener ARNm de las líneas CALO e INBL, se utilizaron sondas específicas para los alelos HLA-B27, -B78(Bw6) en CALO y para los alelos HLA-A11, -B48(Bw6) en INBL. Las mismas membranas fueron lavadas y utilizadas para determinar su reactividad con la sonda de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), la cual fue utilizada como control de cargado.

7.3. La expresión de los alelos HLA-B27 y -A11 es incrementada a 26°C.

Se sabe que el ensamble de los complejos constituidos por la cadena pesada/ β_2 m/péptidos, en células con expresión deficiente de moléculas MHC-I en membrana celular, es promovido al cultivar dichas células a 26°C, tal como se ha observado en la línea linfocítica humana T2 deficiente en Tap's (Ljunggren et al, 1990; Kosken y Bevan, 1990). En este sentido, considerando que la baja expresión y la nula inducción de los alelos HLA-B27 y -A11 en presencia de IFN- γ en las células CALO e INBL, fuera un fenómeno relacionado con el ensamble y la estabilidad de los complejos cadena pesada/ β_2 microglobulina/péptido, ambas líneas celulares fueron cultivadas a 26 °C durante 24 horas. Este tratamiento dio como resultado un importante incremento en la expresión de HLA-B27 en CALO y -A11 en INBL (Figura 7.6); no obstante, la expresión de estos alelos regresó a sus niveles basales, cuando las células que habían sido cultivadas a 26°C fueron nuevamente incubadas a 37°C por 4 hrs más (Figura 7.6). En contraste, los alelos HLA-B78 y -B48, no mostraron cambios en su expresión bajo las mismas condiciones (Figura 7.6), lo cual permite sugerir que probablemente existen deficiencias en la estabilidad y ensamble de los alelos HLA-B27 y -A11 comparados con los de -B78 y -B48 respectivamente.

7.4. Péptidos sintéticos que se unen específicamente a los alelos HLA-B27 y -A11, incrementaron la expresión de estos alelos en CALO e INBL.

Considerando la posibilidad de que, las deficiencias en la estabilidad y el ensamble de las moléculas HLA-B27 y -A11, pudiera deberse a un pobre aporte de péptidos para unirse a estos alelos, las líneas CALO e INBL fueron cultivadas y permeadas en presencia de péptidos sintéticos que se sabe se unen específicamente a los alelos HLA-B27 y -A11 (Elliot et al, 1991; Lie et al, 1990 y Benjamin et al, 1991). Se utilizó el péptido FRYNGLIHR para el alelo HLA-B27 (Jardetzky et al, 1991 y Malnati et al, 1995) y el péptido AVLDLYHFLK para -A11 (Kast et al, 1994). La expresión de los alelos HLA-B27 y -A11 fue incrementada únicamente cuando los péptidos fueron introducidos en las células 4 horas antes de evaluar su expresión en membrana celular (Figura 7.7).

Por otra parte, se ha visto que las moléculas clase I de MHC, retenidas en el retículo endoplásmico, pueden ser capturadas e inmunoprecipitadas con péptidos específicos adicionados a los lisados celulares (Townsend et al, 1990; y Kvist y Hamann, 1990). Con la finalidad de determinar si las moléculas HLA-B27 y -A11 eran ensambladas en condiciones similares, las líneas celulares CALO e INBL fueron marcadas

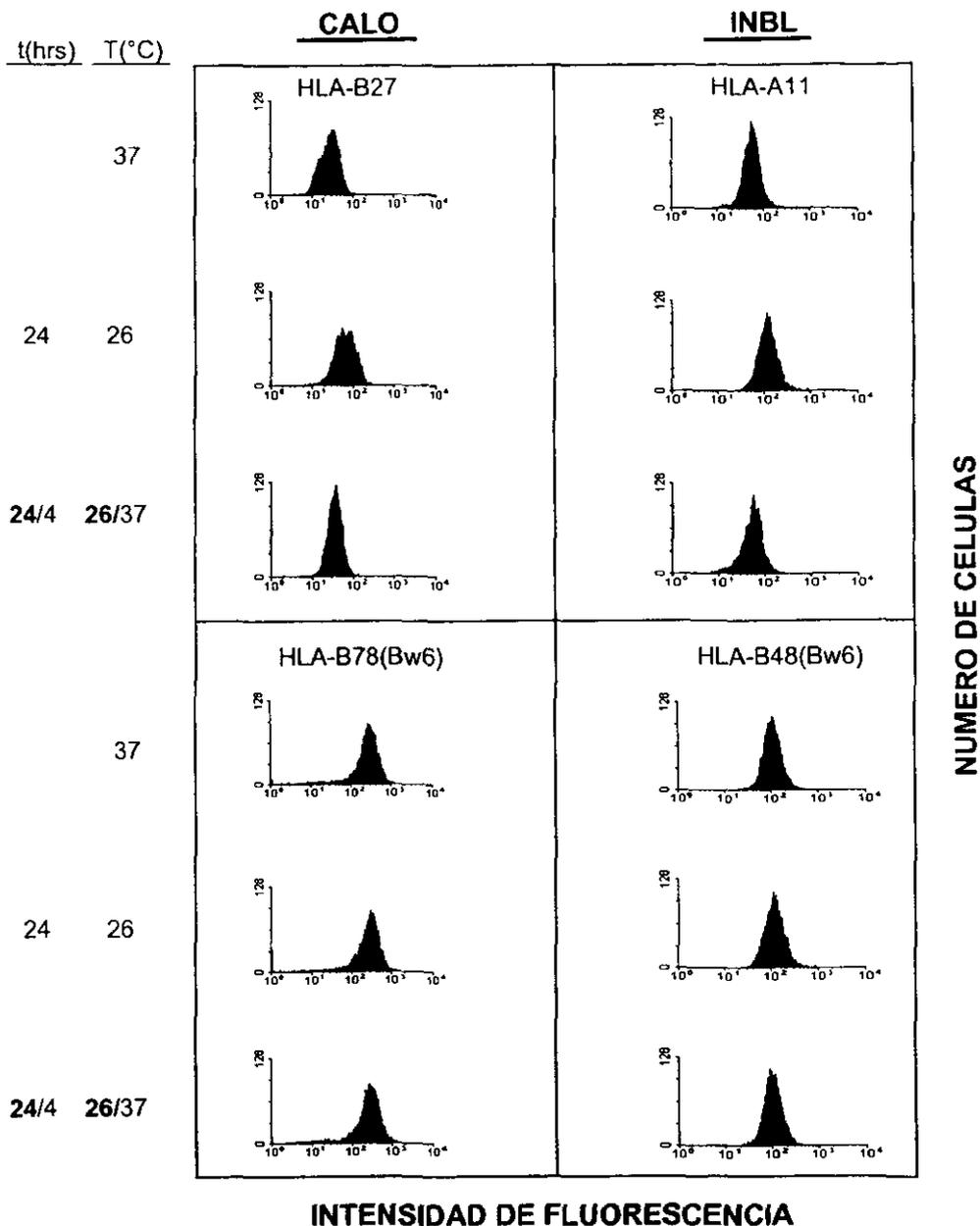


Figura 7.6. Los alelos HLA-B27 y -A11 son estables a 26°C. La expresión de los alelos HLA-B27 y -B78(Bw6) en CALO; y HLA-A11 y -B48(Bw6) en INBL, fue determinada sobre células cultivadas ya sea a 37°C; a 26°C durante 24 horas; o a 26°C durante 24 horas y después incubadas a 37°C por 4 horas más.

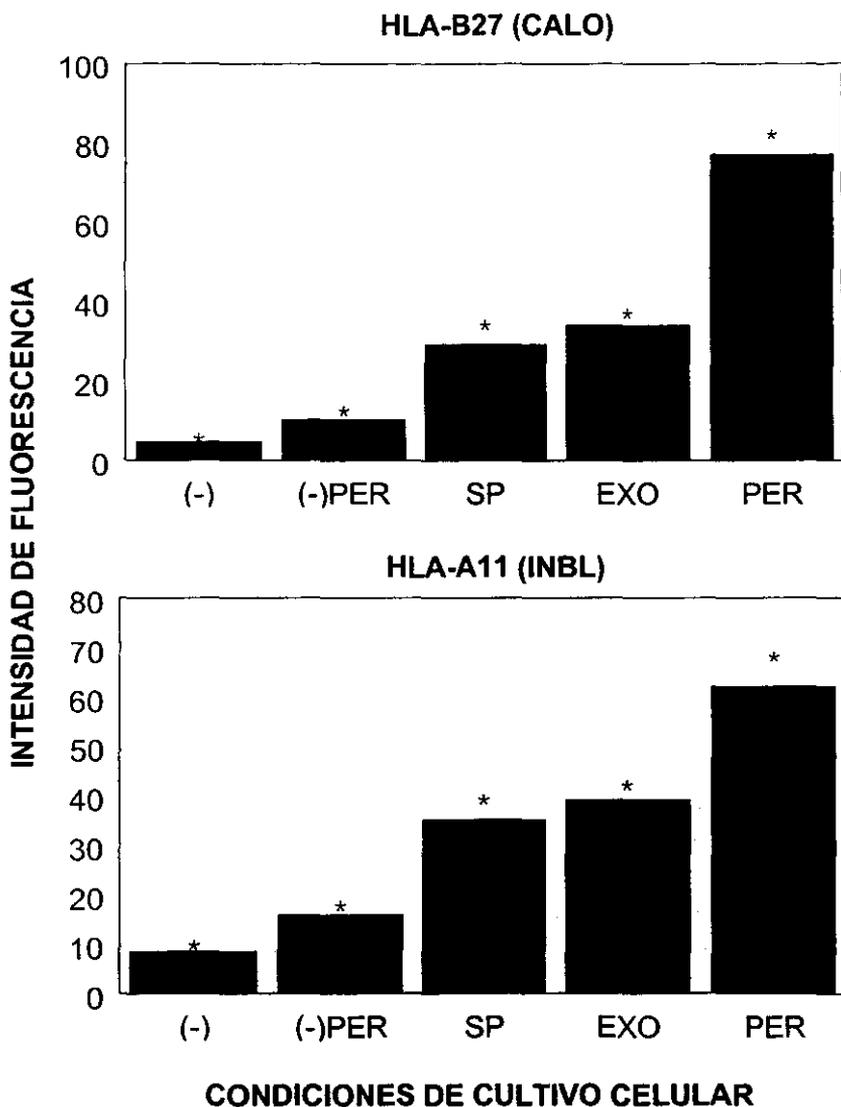


Figura 7.7. Expresión de HLA-B27 y -A11 en presencia de péptidos específicos. Para la detección de las moléculas HLA-B27 en CALO y -A11 en INBL, las líneas celulares fueron cultivadas ya sea sin péptidos (SP); o con péptidos adicionados exógenamente (EXO), FRYNGLIHR para HLA-B27 y AVDLYHFLK para -A11. Los péptidos también fueron permeados usando saponina 0.1% (PER). El nivel de tinción con el anticuerpo secundario GAM-FITC fue considerado como control negativo en células sin permear (-) o permeadas con saponina (-)PER. (*), indica la desviación estandar de dos experimentos hechos por cuadruplicado.

metabólicamente con metionina-³⁵[S] y posteriormente las moléculas HLA-B27 y -A11 fueron inmunoprecipitadas en presencia de péptidos alelo-específicos (100µM) adicionados en los lisados celulares. Después de inmunoprecipitar a estas moléculas, se observó un incremento en la captura de las moléculas HLA-B27 y -A11, cuando los péptidos específicos fueron adicionados a los lisados celulares (Figura 7.8). Estos datos, nos permiten sugerir que el nivel bajo de expresión de HLA-B27 y -A11 en la superficie celular de CALO e INBL respectivamente, está influenciado muy probablemente por una deficiencia en la generación de péptidos adecuados para permitir el ensamble de estas moléculas.

7.5. CALO e INBL tienen deficiente expresión de Tap-1.

Se sabe que una deficiencia en el transporte de péptidos específicos por los Tap's, puede contribuir a un ensamble deficiente de las moléculas MHC-I (Townsend et al, 1990; Kvist y Hamann, 1990; y Restifo et al, 1993). Además, en tumores cervicales se ha documentado una correlación entre la baja o nula expresión de alelos de tipo HLA-A y -B y la pérdida de Tap's, en especial Tap-1 (Keating et al, 1995). En este sentido, se procedió a determinar si la baja expresión de los alelos HLA-B27 y -A11 observada en las líneas INBL y CALO, era debida a la ausencia de alguna de las subunidades de Tap. Mediante ensayos de RT-PCR, utilizando primers apropiados para Tap-1 y Tap-2 (Seliger et al, 1997), se encontró que tanto CALO como INBL expresaron deficiencia en Tap-1, y además, cuando ambas líneas celulares se cultivaron en presencia de IFN- γ , esta subunidad incrementó su expresión. En contraste, la subunidad Tap-2 fue expresada de forma similar a la del control positivo (linfocitos de sangre periférica) en ambas líneas de CaCu (Figura 7.9 A).

7.6. CALO e INBL expresan de manera deficiente, la subunidad catalítica LMP-10 del proteasoma.

La expresión deficiente de moléculas MHC-I en la membrana de células tumorales, se ha visto frecuentemente asociada con la deficiente expresión de alguna de las subunidades catalíticas del proteasoma (Singal et al, 1996; y Seliger et al, 1996). Con la finalidad de analizar la expresión de las principales subunidades del proteasoma que participan en la fragmentación de las proteínas antigénicas, los cADN obtenidos de las líneas celulares mediante transcripción reversa, fueron utilizados para amplificar mediante PCR, un segmento específico de los genes LMP-2, LMP7, LMP-10, PA28 α y PA28 β , usando los

oligonucleótidos apropiados (Johnsen et al, 1998).

Como se muestra en la figura 7.9 B, las líneas celulares CALO, INBL y HELA presentaron una eficiente expresión de las subunidades LMP-2 y LMP7, así como de las subunidades activadoras del proteasoma PA28 α y PA28 β (Figura 7.9 C). Cabe mencionar que la línea celular CALO, presentó una expresión disminuída de LMP-2 en relación a las otras líneas de CaCu. De manera interesante, se encontró que la expresión de la subunidad LMP-10 del proteasoma, fue deficiente en las tres líneas celulares (Figura 7.9 B).

Por otro lado, se sabe que el tratamiento con IFN- γ promueve la expresión de Tap's, LMP's y PA28 (Groettrup et al, 1995; y Nandi et al, 1996). En las células CALO e INBL tratadas con 100U/ml de IFN- γ por 48 horas, las subunidades LMP-2, LMP-7, PA28 α y Pa28 β mantuvieron su expresión (Figura 7.9 B y C). En el caso particular de la línea celular CALO, el tratamiento con IFN- γ indujo un incremento en la expresión de la subunidad LMP-2 (Figura 7.9 B). Por su parte, la expresión de la subunidad LMP-10 en las células CALO e INBL tratadas con IFN- γ , fue incrementada ligeramente (Figura 7.9 B).

El conjunto de estos resultados, nos permiten sugerir que la baja expresión de los alelos HLA-B27 y -A11, encontrada en las células CALO e INBL, se asocian fuertemente con la expresión deficiente de la subunidad Tap-1 y de la subunidad LMP-10 del proteasoma. Estas deficiencias pueden modificar dos aspectos importantes de la vía del procesamiento de antígenos: el espectro de péptidos que son producidos por el proteasoma y el transporte de los peptidos que se unen a alelos específicos.

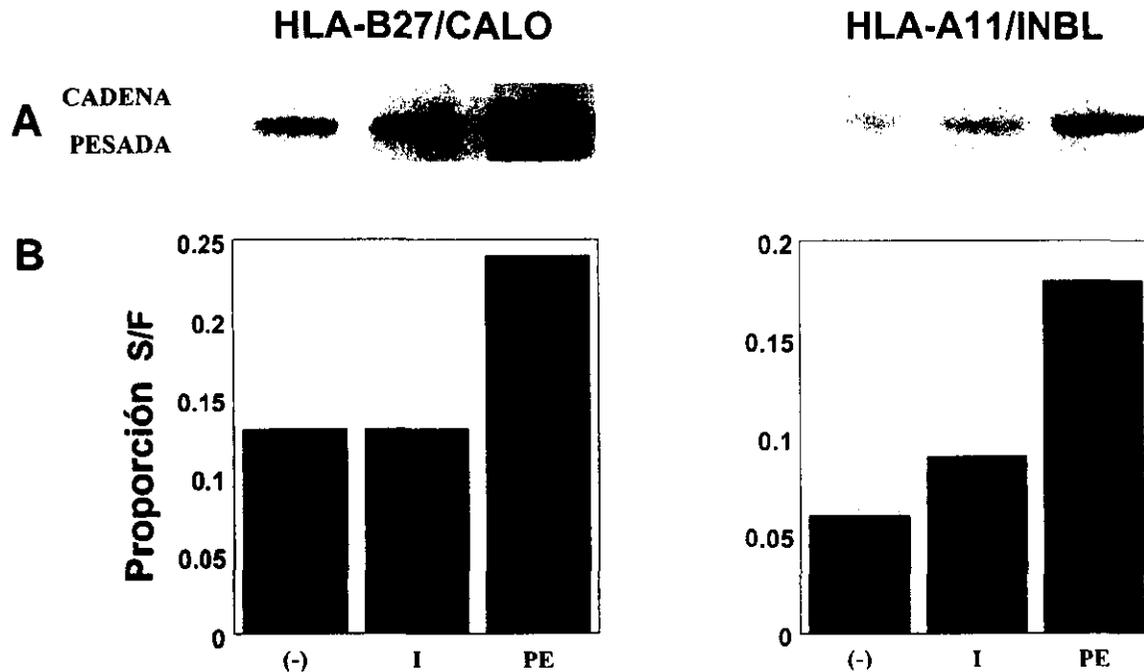


Figura 7.8. Inmunoprecipitación de las moléculas HLA-B27 (CALO) y -A11 (INBL) en presencia de péptidos específicos. (A), las líneas celulares CALO e INBL fueron marcadas metabólicamente con ^{35}S -metionina. Las moléculas HLA-B27 y -A11 fueron inmunoprecipitadas a partir de los lisados celulares solos (-); en presencia del péptido SIINFEKL (258-266 de la proteína ovoalbúmina), el cual fue usado como péptido irrelevante (I); o en presencia de los péptidos específicos FRYNGLIHR para HLA-B27 o de AVDLYHFLK para -A11 (PE). Para los inmunoprecipitados, se utilizaron las mismas cantidades de proteína marcada (500,000 cpm/5 μl). (B), después de revelar la autoradiografía de los gels, las cadenas pesadas (45 kDa) de las moléculas HLA-B27 y -A11 fueron analizadas por densitometría. Las gráficas muestran la proporción existente entre la lectura (píxeles) de la superficie de las bandas y la lectura de fondo existente en el gel (Proporción S/F).

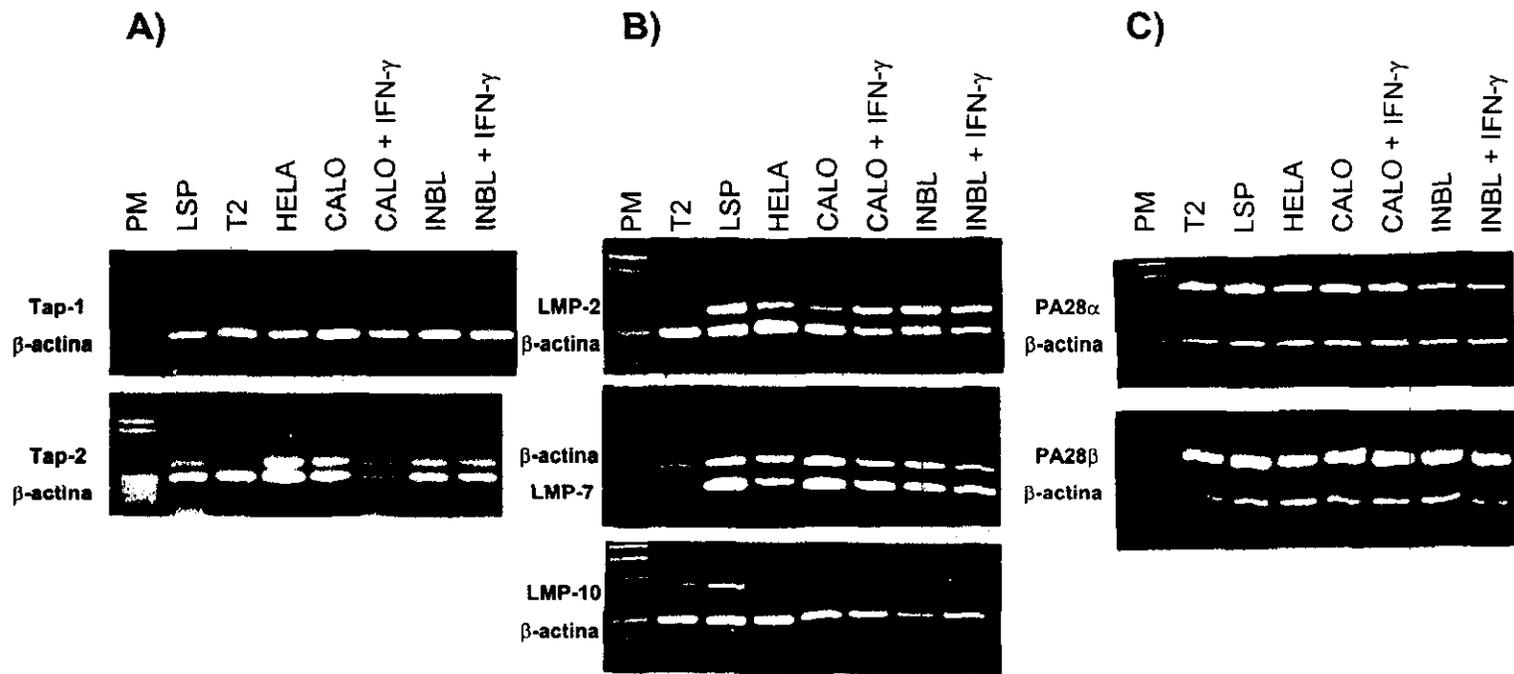


Figura 7.9. Expresión de Tap-1, Tap-2, LMP-2, LMP-7, LMP-9, PA28 α y PA28 β en las líneas celulares CALO e INBL. Los productos de RT-PCR de las moléculas arriba mencionadas, fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 3%, después de ser teñidos con bromuro de etidio. **A)**, expresión de un fragmento de 344 pares de bases (pb) y de 313 pb de las subunidades Tap-1 y Tap-2 respectivamente; **B)** muestra la expresión de un fragmento de 321 pares de bases (pb) de la subunidad LMP-2 del proteasoma, uno de 174pb de la subunidad LMP-7, y otro de 369pb de la subunidad LMP-10; **C)**, expresión de un fragmento de 467pb de la subunidad activadora del proteasoma PA28 α , y otro de 431pb de la subunidad activadora PA28 β . En todos los casos se determinó la expresión de un fragmento de 238pb de la proteína β -actina, el cual fue utilizado como control interno.

B.- OBTENCION DE PÉPTIDOS ANTIGENICOS ASOCIADOS A MOLECULAS MHC-I DE LAS LINEAS CELULARES CALO E INBL.

7.7. Obtención y detección de los péptidos asociados con moléculas MHC-I de CALO e INBL.

La presencia de HPV-18 en las células CALO e INBL, hace factible la posibilidad de que péptidos derivados de las proteínas de este virus puedan ser presentados en la membrana celular por medio de moléculas MHC-I. La identificación y caracterización de dichos péptidos resulta de gran relevancia, principalmente porque el HPV se encuentra asociado en 90% de los casos con CaCu invasor, siendo el HPV-18 el segundo tipo más abundante en esta asociación (Berumen et al, 1997). Con la finalidad de disociar péptidos presentados por las moléculas MHC-I de las líneas CALO e INBL y de esta manera poder iniciar la identificación de péptidos antigénicos a partir de estas líneas celulares, se procedió a marcar metabólicamente la síntesis proteica de CALO e INBL. Para ello se utilizaron los aminoácidos Leucina-³[H], Lisina-³[H], Alanina-³[H] y Fenilalanina-³[H], que se sabe, son frecuentemente encontrados como residuos de anclaje por los péptidos que se unen a la cavidad formada por los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de la cadena pesada de las moléculas MHC-I (Rammensee et al, 1995). Después del marcaje metabólico, las moléculas MHC-I fueron inmunoprecipitadas con ayuda del anticuerpo monomérico W6/32, y los péptidos antigénicos disociados de ellas fueron separados por HPLC en un gradiente lineal de acetonitrilo durante 30 minutos. En las figuras 7.10 a y b, se muestran los perfiles de elución cromatográfica y los contenidos de radiactividad- β (cpm, cuentas por minuto) de cada una de las fracciones colectadas. Como se puede apreciar, las lecturas de mayor radiactividad correlacionan con los picos de péptidos más prominentes de los perfiles cromatográficos.

Después de disociar y ultrafiltrar los péptidos, la fracción de material residual, fue separada en un gel de poliacrilamida al 15%, para analizar sus componentes. La autoradiografía del gel, reveló la presencia de la cadena pesada de 45kDa y de β_2 -microglobulina de 12kDa (Figura 7.11), con lo cual se demuestra que los perfiles de elución corresponden a péptidos disociados de las moléculas MHC-I obtenidas de las líneas celulares CALO e INBL.

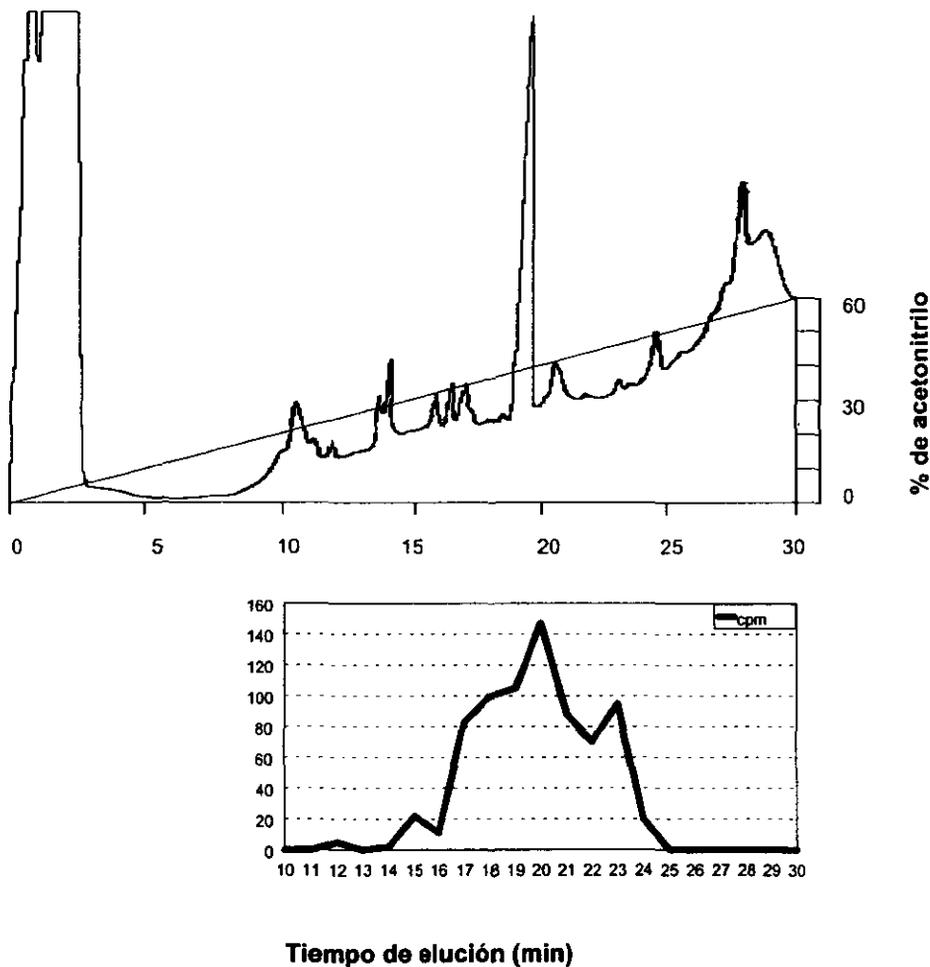
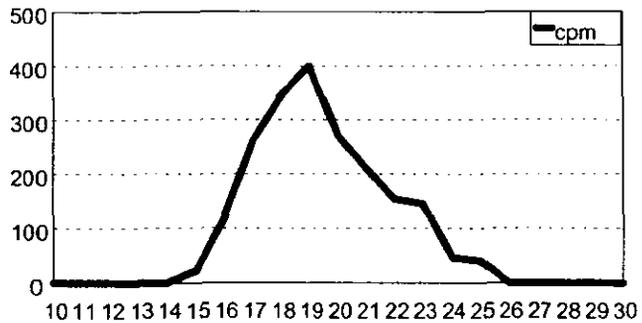
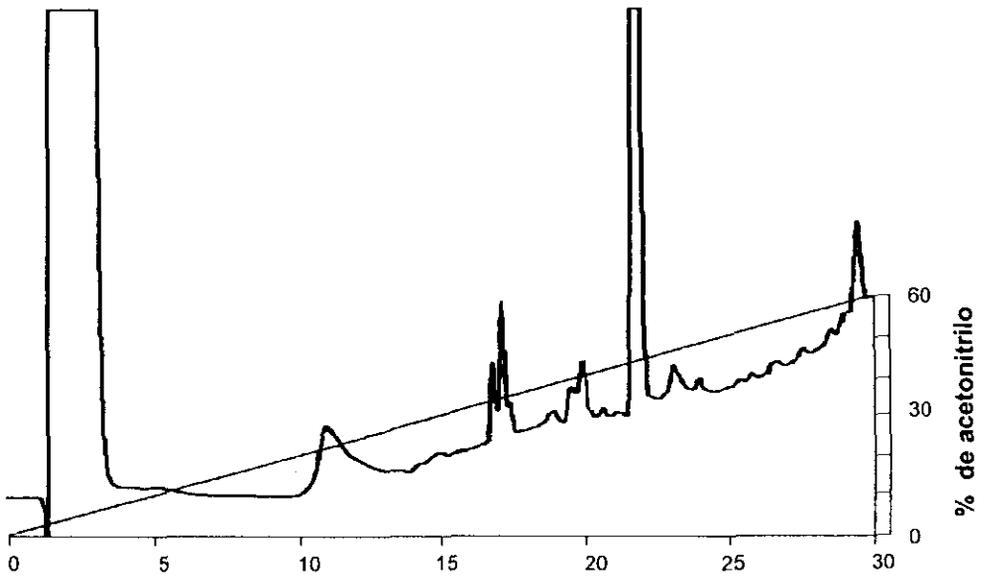


Figura 7.10 a. Péptidos disociados de moléculas MHC-I de la línea CALO marcada metabólicamente con Leucina- 3 [H], Lisina- 3 [H], Alanina- 3 [H] y Fenilalanina- 3 [H], correlacionan su marcaje, cuentas por minuto (cpm), con los perfiles de elución de péptidos separados por cromatografía de HPLC.



Tiempo de elución (min)

Figura 7.10 b. Péptidos disociados de moléculas MHC-I de la línea INBL marcada metabólicamente con Leucina- $^3\text{[H]}$, Lisina- $^3\text{[H]}$, Alanina- $^3\text{[H]}$ y Fenilalanina- $^3\text{[H]}$, correlacionan su marcaje, cuentas por minuto (cpm), con los perfiles de elución de péptidos separados por cromatografía de HPLC.

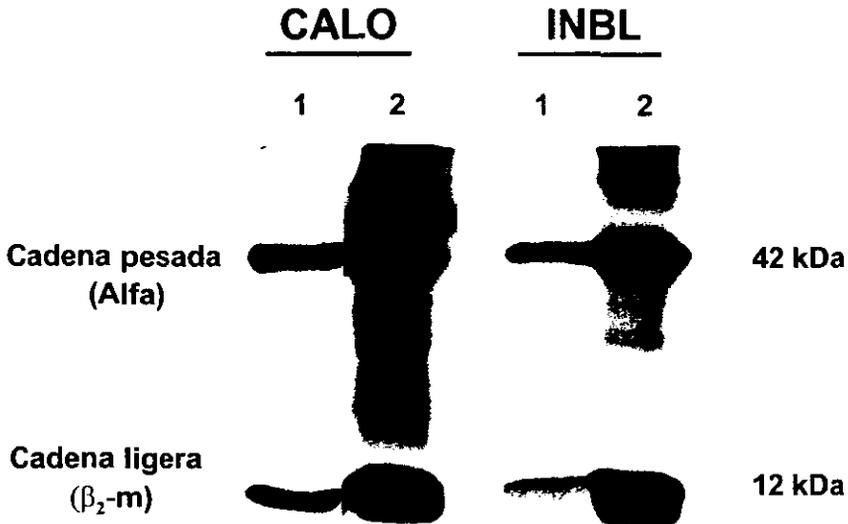


Figura 7.11. Presencia de las cadenas alfa y β_2 -microglobulina en los inmunoprecipitados de las moléculas MHC-I de las líneas celulares CALO e INBL. La cadena pesada (42kDa) y ligera (12kDa) fueron purificadas por cromatografía de afinidad, mediante la inmunoprecipitación de las moléculas MHC-I de CALO e INBL después de ser marcadas metabólicamente con los aminoácidos (Lisina, Alanina, Fenilalanina, y Leucina)-[H]³. Ambas cadenas fueron observadas en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE al 15%), ya sea a partir del material eluido de las esferas de Proteína-A sefarosa cargadas con anticuerpo monomórfico W6/32 (línea 1), o del material sin eluir (línea 2).

7.8. Péptidos aislados de moléculas MHC-I de la línea INBL, estimularon a linfocitos T de una donadora con infección viral de HPV-18 en cérvix y portadora del alelo HLA-Cw4 en su haplotipo.

Para iniciar la identificación de los péptidos antigénicos obtenidos de moléculas MHC-I de CALO e INBL, se procedió al aislamiento de péptidos a partir de 2×10^9 células de cada una de estas líneas a partir de cultivos celulares. Las fracciones de péptidos eluidos en el intervalo entre 10 y 30 minutos de la cromatografía de HPLC, fueron evaluadas en ensayos biológicos de estimulación de linfocitos T totales (CD4+ y CD8+) obtenidos de sangre periférica de diferentes donadores, incluyendo pacientes con cáncer cérvico-uterino. En la Figura 7.12 A-D, se muestran algunos de los resultados de la estimulación de linfocitos T de varios donadores, con las fracciones de péptidos eluidas, liofilizadas y reconstituídas 1:10 con el medio de cultivo. En estos ensayos se puede apreciar que en sólo uno de los casos (Figura 7.12 D), una fracción de péptidos derivados de la línea INBL, fracción 21, fue capaz de estimular la proliferación de linfocitos T de una donadora.

Posteriormente, se procedió a analizar si la donadora compartía algunas características propias para favorecer un probable reconocimiento de los péptidos antigénicos, tales como el haplotipo de histocompatibilidad clase I y la presencia de infección con HPV. Tomando en consideración que la donadora había presentado antecedentes de lesión cervical, se procedió a realizar un ensayo de Southern blot para detectar la presencia de HPV-18 en células derivadas de un frotis cervical. A través de este ensayo, se pudo detectar que la donadora presentaba infección con HPV-18 (Figura 7.13), la cual fue corroborada por la presencia de coilocitos en su exámen citológico de Papanicolau (datos no mostrados). Al tipificar el haplotipo de histocompatibilidad en linfocitos de esta donadora, se encontró que presentaba los alelos HLA-A2, -B44(12), -B72(70) y -Cw4. La presencia de infección con HPV-18 y la presencia del alelo HLA-Cw4 en el haplotipo HLA clase-I de esta donadora, nos permiten sugerir que la estimulación de los linfocitos T de esta donadora, probablemente esté asociada con péptidos virales eluidos de la línea celular INBL en el contexto HLA-Cw4, el único alelo con el cual existe homología de histocompatibilidad entre el haplotipo de la línea INBL y el haplotipo de la donadora.

Por otro lado, en otro de los casos estudiados, los linfocitos T obtenidos de una paciente con CaCu que presentaba infección viral con HPV-18, no fueron estimulados con péptidos eluidos de moléculas HLA clase I de la línea celular CALO,

a pesar de portar al alelo HLA-A68 en su haplotipo de histocompatibilidad, homólogo al presentado por la línea CALO (Figura 7.12 A). Tampoco se observó proliferación de linfocitos T de una donadora normal, negativa para HPV-18, a pesar de que compartía el alelo HLA-Cw1 con CALO (Figura 7.12 C). Finalmente, en el caso de una paciente con CaCu e infección de HPV-18, la cual no compartía alelos con la línea celular INBL, sus linfocitos no mostraron proliferación al cultivarse en presencia de péptidos aislados de moléculas HLA clase I de INBL (Figura 7.12 B).

Con el propósito de obtener una gran cantidad de péptidos antigénicos para llevarlos a su secuenciación de aminoácidos, se procedió a disociar péptidos de una cantidad de células 10 veces mayor que la utilizada en las pruebas biológicas de estimulación de linfocitos T. Los péptidos obtenidos de esta disociación, fueron separados por HPLC en un gradiente lineal de 60 minutos de corrida y las fracciones de péptidos colectadas a razón de 1 ml/min, fueron evaluadas biológicamente para estimular a los linfocitos T de la misma donadora. En los ensayos biológicos, se pudo detectar que la máxima proliferación fue promovida por la fracción 19 de péptidos obtenidos de la nueva elución (Figura 7.14). La proliferación inducida por esta fracción, fue similar a aquella obtenida cuando se adicionaron 10 U/ml de IL-2 recombinante, la cual fue usada como control positivo. Cabe mencionar que las fracciones de péptidos inmediatas a la 19, promovieron en menor proporción, la proliferación de los linfocitos de esta donadora. En este mismo ensayo, la Bradicinina, utilizada como péptido irrelevante, no indujo proliferación alguna de los linfocitos T.

7.9. La fracción 19, de péptidos eluidos de moléculas MHC-I de INBL, contiene péptidos homólogos a secuencias virales.

El análisis del espectro de masas de la fracción 19, presentó dos pares de picos que correspondían a 699/715 y 743/759 Da, también se encontraron varias especies menores en el intervalo de 867-1200 Da (Figura 7.15). La separación de todas las especies detectadas en el espectro de masas, no fue posible realizarla, por lo que se procedió a la secuenciación directa de los péptidos contenidos en toda la fracción 19. A partir de la secuenciación protéica, por la técnica de digestión de Edman, se pudo detectar una mezcla de péptidos correspondiente a 9 aminoácidos de longitud. La tabla 7.1 nos muestra los datos crudos de dicha secuenciación, en donde los valores subrayados en cada ciclo, representan los residuos de aminoácidos con valores significativos con respecto al ciclo anterior (comunicación personal, Dr Ed Papacoda).

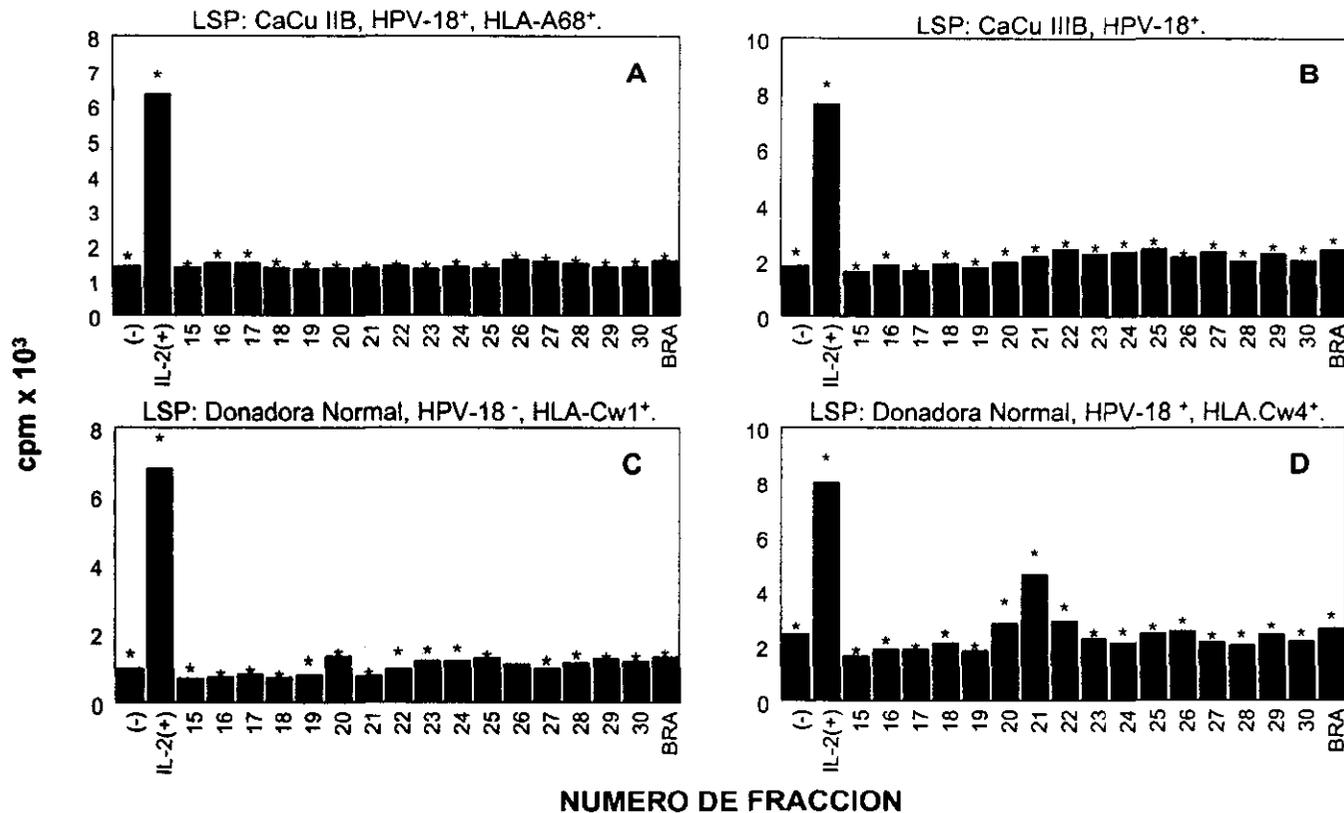


Figura 7.12. Proliferación de linfocitos de sangre periférica de pacientes con CaCu y donadores normales, con péptidos eluidos de moléculas MHC-I de las líneas celulares CALO e INBL. Linfocitos T obtenidos de sangre periférica de pacientes con CaCu o de donadoras "normales", fueron estimulados con fracciones de péptidos eluidas de moléculas MHC-I, ya sea de la línea celular CALO (A y C) o de INBI (B y D). Los cultivos de LSP sin péptidos fueron considerados como control negativo, el péptido Bradicinina (BRA), 5µg/ml, fue utilizado como irrelevante, mientras que Interleucina-2 recombinante humana (rhIL-2), 10U/ml, fue considerada como control positivo. (*), desviación estándar de dos experimentos hechos por cuadruplicado.

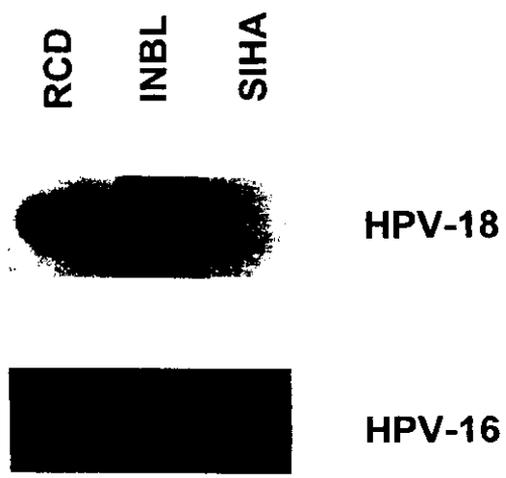


Figura 7.13. Detección de HPV-18 en un raspado cervical de una donadora con el alelo HLA-Cw4 en su haplotipo. A partir de las células obtenidas de un frotis cervical, el ADN aislado, fue hibridado con sondas específicas para HPV-16 y 18; se encontró que la donadora presentó positividad para HPV-18 al igual que la línea celular INBL (HPV-18+). El ADN de la donadora, no mostró reactividad con la sonda para HPV-16, tal como lo hizo la línea SIHA (HPV-16+). RCD, raspado cervical de la donadora HLA-Cw4+.

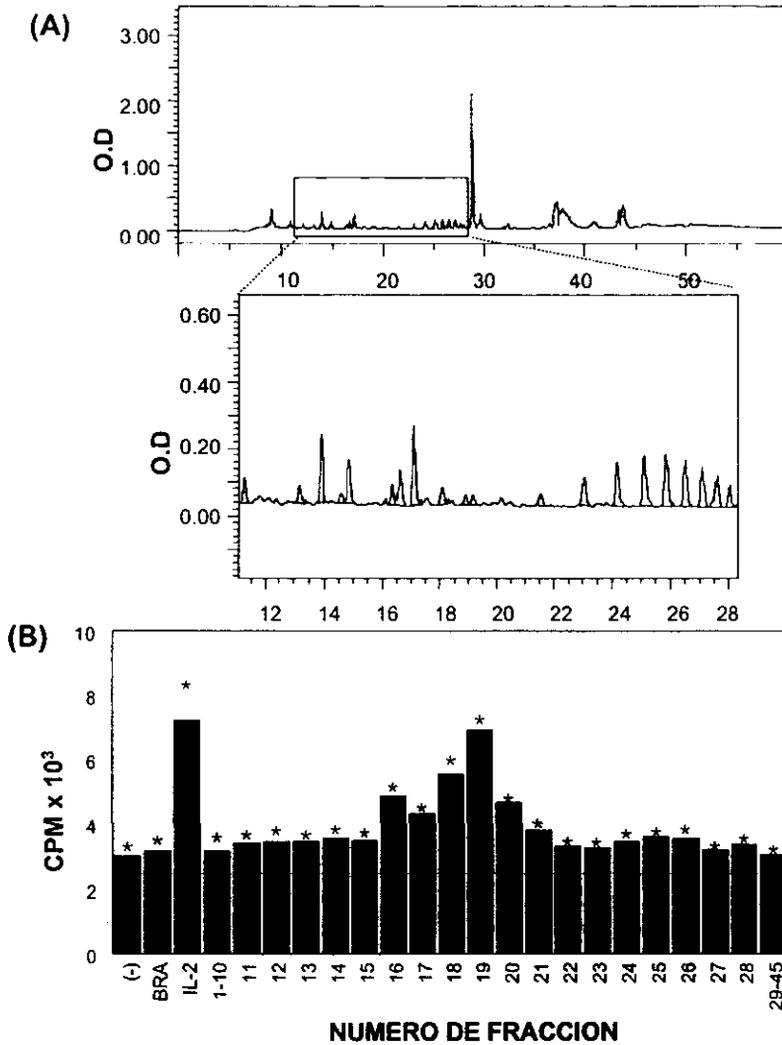


Figura 7.14. Péptidos eluidos de moléculas MHC-I de la línea celular INBL, son capaces de estimular linfocitos derivados de una donadora con infección de HPV-18 y HLA-Cw4+. (A), Perfiles de HPLC de péptidos procesados naturalmente y eluidos del total de moléculas MHC-I expresadas por INBL. (B), la fracción 19 de péptidos eluidos de moléculas MHC-I de INBL, indujo la máxima proliferación de LSP de la donadora HPV-18+ y con HLA-Cw4 en su haplotipo. El control positivo de estimulación de linfocitos T fue hecho con 10U/ml de rhIL-2, mientras que bradisinina (BRA), 5µg/ml, fue usado como irrelevante. LSP sin péptidos, fue usado como control negativo (-). (*), desviación estándar de dos experimentos hechos por cuadruplicado.

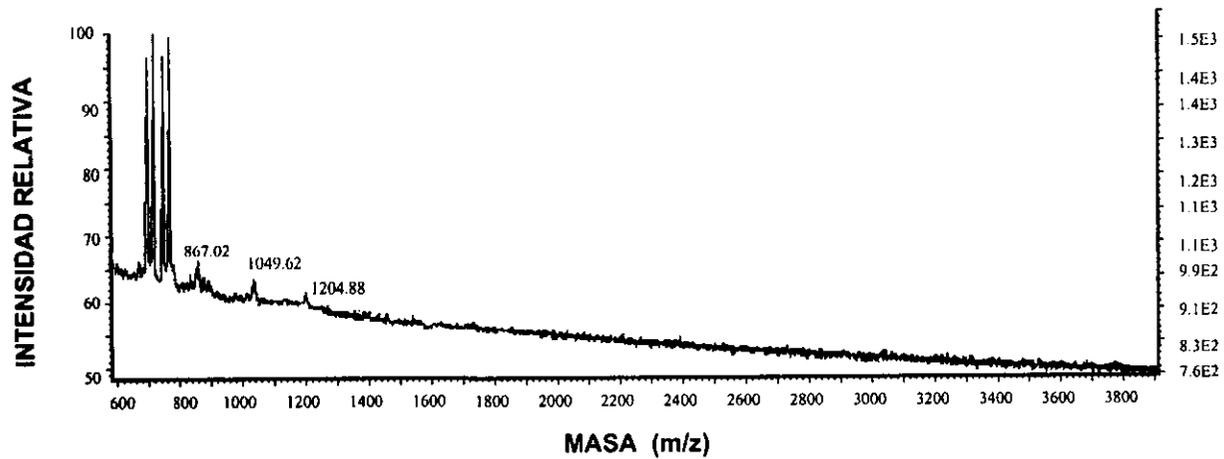


Figura 7.15. Espectro de masas (MALDI) de la fracción número 19 de péptidos eluidos de moléculas MHC-I de la línea celular INBL.

Tabla 7.1 Resultados obtenidos después de la secuenciación directa (técnica de Edman), de la fracción 19 de péptidos eluidos de moléculas MHC-I de la línea celular INBL de carcinoma cérvico-uterino.

Aminoácidos (pmol)																			
C	Asp	Asn	Ser	Gln	Thr	Gly	Glu	Ala	His	Tyr	Arg	Pro	Met	Val	Trp	Phe	Ile	Lys	Leu
1	13.2	0.84	12.7	1.95	4.44	22.1	4.2	19.5		2.58		2.51	0.85	4.44	0.59	1.79	1.78	3.11	2.55
2	4.68	0.63	3.61	<u>2.15</u>	1.59	10.6	1.7	3.83		0.88		1.24	0.99	1.97		0.45	0.52	2.43	1.15
3	3.16	0.99	1.99	0.84	0.88	7.87	1.42	3.26		<u>1.75</u>		1.42	0.44	1.18		<u>1.81</u>	1.04	1.24	1.21
4	2.48	0.73	1.01	0.82	0.53	6.28	<u>1.89</u>	1.55		0.74		<u>2.46</u>	0.59	0.7		0.76		0.83	0.99
5	2.06	1.4	0.73	0.85	0.62	5.7	1.26	1.32		0.80		1.73	0.5	<u>1.45</u>		0.82	<u>1.51</u>	0.84	1.2
6	1.88	0.84	0.67	0.85	0.56	5.05	1.08	1.24		0.6		1.56		1.29		<u>0.84</u>	1.47	0.81	1.18
7	1.38	<u>1.7</u>	0.63	0.67	0.67	4.82	1.27	1.51		0.82		1.12	0.14	1.57		0.66	0.98	0.75	<u>1.57</u>
8	1.36	0.96	0.63	<u>0.78</u>	0.47	4.34	1.16	1.09		<u>0.84</u>		0.8	0.48	1.21		0.52		0.58	1.16
9	1.06	0.37	0.53	0.51	0.34	3.68	0.76	0.93		<u>0.92</u>		0.58	0.52	1.22		<u>0.99</u>		0.51	1.04

Tabulación de la cuantificación de los aminoácidos (PTH), obtenidos después de la secuenciación de la fracción 19 (HPLC) de péptidos eluidos de moléculas MHC-I de la línea celular INBL. Los valores subrayados, representan un incremento significativo con respecto al valor obtenido en un ciclo previo. Estos valores fueron corroborados y tienen alta confiabilidad (Dr. Ed Papacoda, HHMI Biopolymer Laboratory & W.M. Keck Foundation Biotechnology Resource Laboratory, Yale University). C, representa el número de ciclos llevados a cabo en la secuenciación. Los aminoácidos están simbolizados de acuerdo con su código de tres letras.

La secuencia XQFPFLQF presentó homología en un 85% con la secuencia 54-62 de la proteína L1 de HPV-18; el péptido XQYEIMNYF tuvo una homología del 85% con la secuencia 338-346 de la proteína accesoria polimerasa del virus Herpes; asimismo, el péptido XQYEIINYF también tuvo homología del 85% con la secuencia 145-183 de la proteína de transcripción temprana, ULC1, del citomegalovirus humano cepa AD169. Un aspecto interesante, fue el hecho de que estos péptidos presentaron residuos de anclaje reportados para el alelo HLA-Cw4, entre ellos: Phe (F) y Met (M) en la 9ª posición; Ile (I) en la 6ª posición; y Tir (Y) en la 2ª y 3er posiciones (Johnson et al, 1993; y Rammensee et al, 1995). Estos resultados abren la posibilidad de que estos péptidos pudieran ser candidatos idóneos para inducir la respuesta inmunológica mediante este alelo.

7.10. La expresión del alelo HLA-Cw4 incrementa en presencia de péptidos virales sintéticos.

Tomando en consideración la posibilidad de que los péptidos identificados a partir de la fracción 19, así como sus homólogos de las proteínas virales (Tabla 7.2), pudieran ser presentados en el contexto del alelo HLA-Cw4, se realizaron ensayos para determinar su capacidad de unión y estabilidad con la molécula HLA-Cw4. Para ello, estos péptidos fueron producidos sintéticamente e incubados con la línea celular C1R, la cual expresa como único alelo detectable en membrana celular a HLA-Cw4 (Zemmour et al, 1992). Los péptidos identificados mediante la digestión por Edman, fueron sintetizados con el mismo residuo aminoterminal de sus respectivos péptidos virales homólogos. Al analizar el efecto de cada péptido, se obtuvo que los péptidos de secuencias virales: NEYEILNYF fracción 145-153 de la proteína ULC-1 de HCMV (Figura 7.16 G); NVFPFLQM fracción 54-62 de la proteína L1 de HPV-18 (Figura 7.16 H); el péptido MQYEIMNYF (Figura 7.16 F) y su homólogo viral MQYEIINYM de la fracción 339-346 de la proteína accesoria de la polimerasa tipo 6/GS de HSV (Figura 7.16 I), indujeron un aumento en la expresión de moléculas HLA-Cw4 detectadas por el anticuerpo W6/32 sobre las células C1R. El mismo nivel de expresión fue obtenido con el péptido FPIFLQMAL (testigo positivo) (Figura 7.16 F), el cual, de acuerdo a una predicción por algoritmos se une fuertemente al alelo HLA-Cw4. En contraste, los péptidos NQYEIINYF y NQFPIMLQF (Figuras 7.16 D y E), tuvieron un efecto muy pobre sobre el incremento de la

expresión de la molécula HLA-Cw4. Por su parte, el péptido irrelevante SIINFEKL, específico para el alelo H-2Kb de ratón (Moore et al, 1988), no tuvo efecto alguno en la expresión de HLA-Cw4.

7.11. El péptido 54-62 de la proteína L1 de HPV-18, estimula la proliferación de linfocitos T de donadores con el alelo HLA-Cw4 y positivos para la infección con HPV-18.

Tomando en consideración que las secuencias peptídicas virales estabilizaron al alelo HLA-Cw4 en una proporción mayor a la obtenida por los péptidos derivados de la secuenciación directa de la fracción 19, a continuación, se procedió a analizar su efecto sobre la proliferación de linfocitos T de la donadora con infección de HPV-18 y con presencia del alelo HLA-Cw4 en su haplotipo, así como de donadores normales conteniendo el alelo HLA-Cw4 en su haplotipo. Nosotros observamos que el péptido NVFPIFLQM, fragmento 54-62 de la proteína L1 de HPV-18, fue el único capaz de inducir la estimulación de linfocitos en estos donadores (Figura 7.17 A y B). Este péptido no indujo la estimulación de linfocitos de donadores que portaban los alelos HLA-Cw1 o -Cw3 (Figura 7.17 C y D). Estos resultados, permiten sugerir fuertemente que el péptido NVFPIFLQM de la proteína L1 de HPV-18 esta siendo presentado por la línea celular INBL en una forma restrictiva al alelo HLA-Cw4.

7.12. Los linfocitos T provenientes de la donadora portadora del alelo HLA-Cw4 y con infección de HPV-18, lisaron a las células INBL.

Con la finalidad de determinar si los linfocitos T obtenidos de la donadora con infección de HPV-18 y HLA-Cw4+, así como de donadores sanos con el alelo HLA-Cw4+ eran capaces de lisar a las células tumorales INBL, ambos fueron estimulados con el péptido 54-62 de la proteína L1 de HPV-18, y en seguida se procedió a evaluar su capacidad citotóxica sobre las células INBL. Nosotros observamos que sólo los linfocitos T derivados de la donadora con infección de HPV-18, fueron capaces de lisar a las células INBL (Figura 7.18). Este resultado sugiere fuertemente que el péptido 54-62 de la proteína L1 de HPV-18 es un epítipo natural presentado en la membrana celular de INBL en el contexto HLA-Cw4.

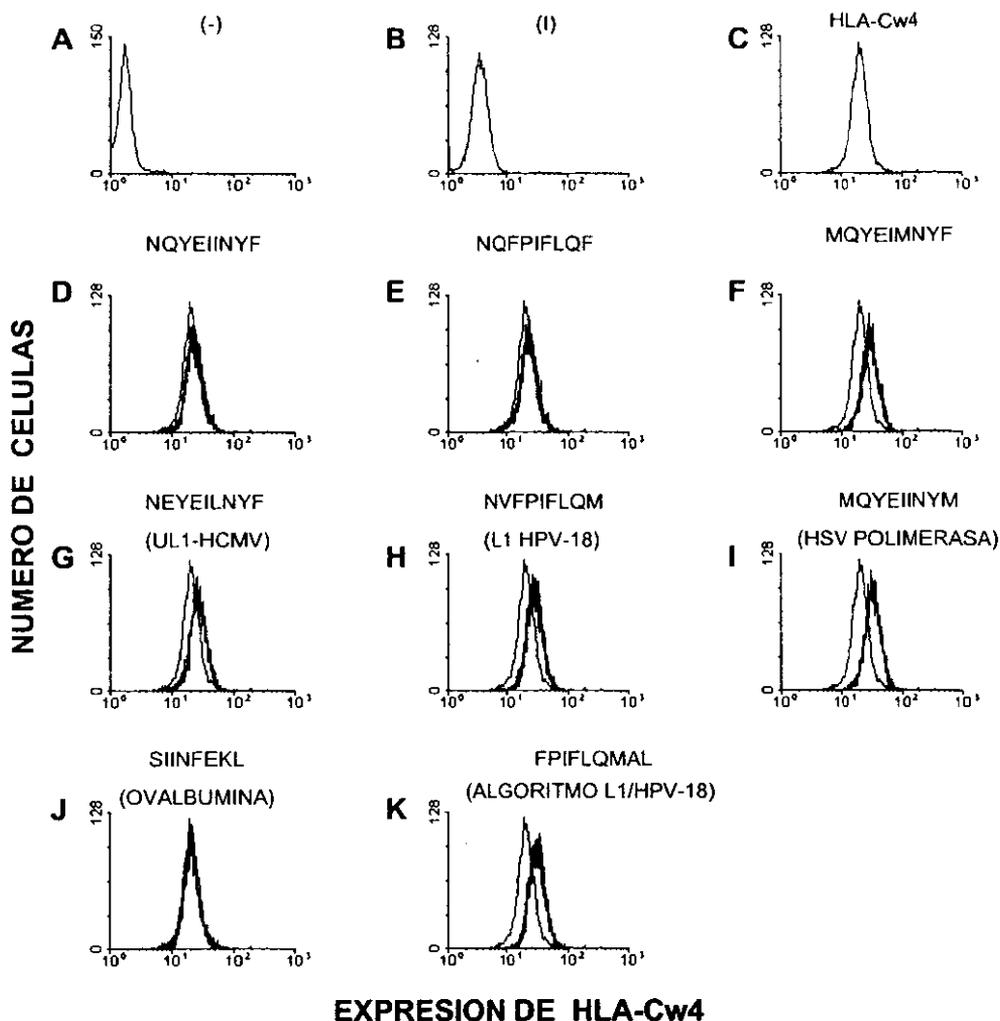
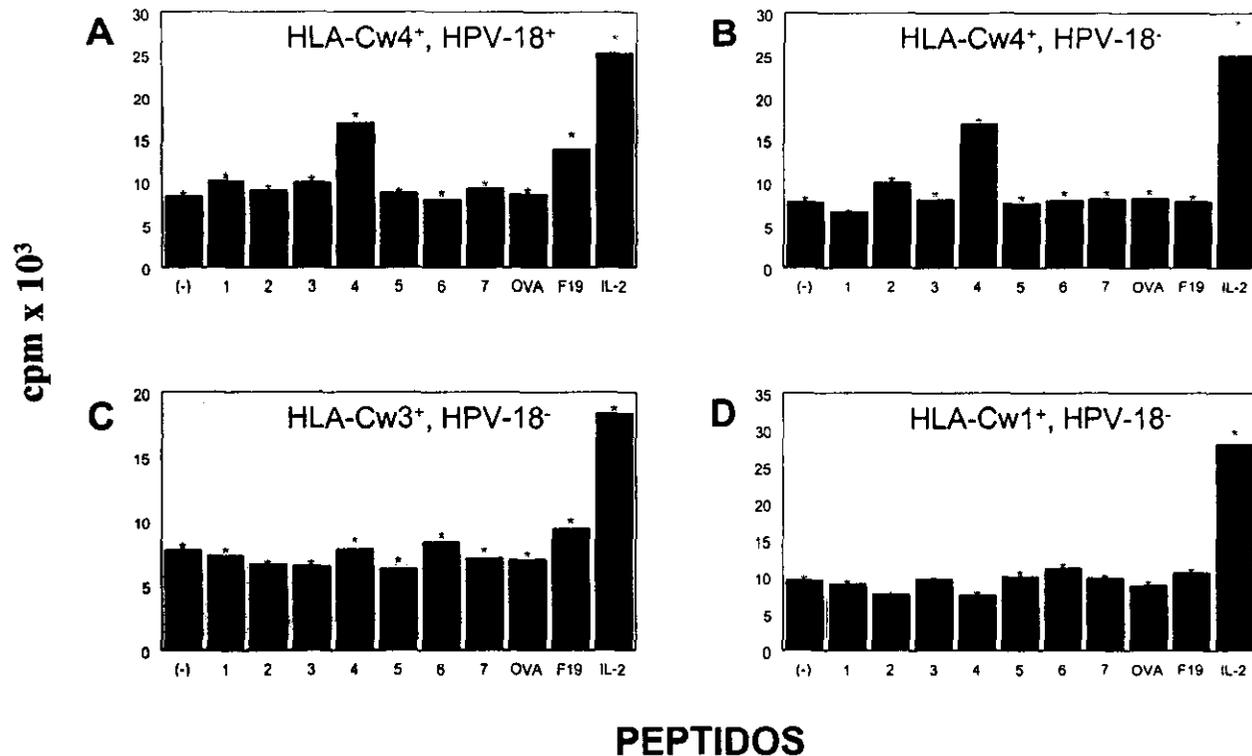


Figura 7.16. Péptidos sintéticos derivados de fragmentos de proteínas virales, identificadas después de la secuenciación de la fracción 19, estabilizan el alelo HLA-Cw4 en la línea celular C1R. El análisis de la expresión de la molécula HLA-Cw4 en la línea C1R en presencia de péptidos sintéticos, se hizo de la siguiente manera: (A), control negativo, anticuerpo secundario marcado con FITC; (B), control de isotipo (I), anticuerpo monoclonal anti-CD3, ratón anti-humano. La expresión del alelo HLA-Cw4 en la línea celular (único alelo detectable en su membrana) fue detectado con el anticuerpo monomórfico W6/32 en ausencia de péptido (C), o en presencia de péptidos sintéticos (histogramas gruesos), derivados ya sea de las secuencias identificadas a partir de la fracción 19 (D, E y F), o de sus respectivas secuencias virales homólogas (G, H e I) como indicado. El péptido 258-266 de la proteína de ovoalbúmina, específico para el alelo de ratón K^b, fue utilizado como irrelevante (J); mientras el péptido 56-64 de la proteína L1 de HPV-18, que de acuerdo a la predicción por algoritmos se une fuertemente a HLA-Cw4, fue utilizado como control positivo (K).



PEPTIDOS

Figura 7.17. El péptido 54-62 de la proteína L1 de HPV-18, estimula de manera específica a linfocitos T de una donadora con infección de HPV-18 y con el alelo HLA-Cw4 en su haplotipo. Las células C1R fueron previamente incubadas con 50 μ M de péptidos sintéticos derivados, ya sea de secuencias identificadas después del análisis por Edman de la fracción 19: (1) NQFPIFQF; (2) MQYEIMNYF; (3) NQYEIINNYF; o sus respectivas secuencias virales homólogas, (4) NVFPIFLQM (54-62 de la proteína L1 de HPV-18); (5) MQYEIINYM (338-346 de la proteína polimerasa de HSV); y (6) NEYEILNYF (145-153 de la proteína UL1 de HCMV). El péptido FPIFLQMAL (7), 56.64 de la proteína L1 de HPV-18, el cual se une fuertemente a HLA-Cw4, fue también utilizado; (OVA) SIINFEKL (258-266 de la proteína ovoalbúmina) específico para el alelo K^b de ratón, fue utilizado como péptido irrelevante. La fracción 19 de péptidos de moléculas MHC-I de INBL (F19), fue usado como control positivo; mientras que las células C1R sin péptido (-), fueron usadas como control negativo. Las células C1R cargadas con los diferentes péptidos, se usaron para estimular linfocitos T derivados de 4 diferentes donadoras (A-D). (*), desviación estándar de dos experimentos hechos por cuadruplicado.

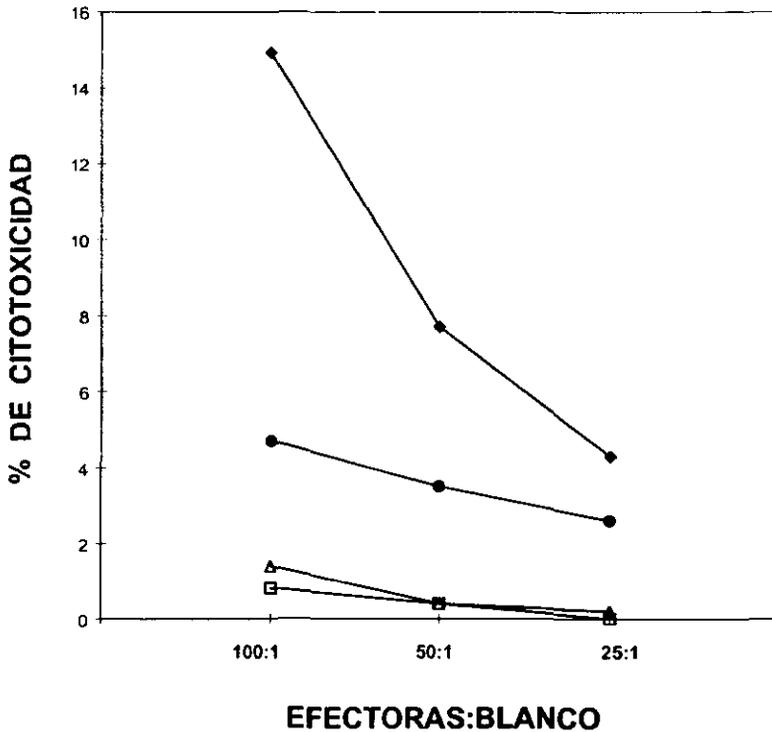


Figura 7.18. Linfocitos T activados de la donadora con infección cervical de HPV-18 y con HLA-Cw4, lisaron a la línea celular INBL. Linfocitos T derivados de la donadora HPV-18+ y HLA-Cw4+, fueron previamente estimulados con la línea celular C1R cargadas con el péptido 54-62 de la proteína L1 de HPV-18 (◆) o sin péptido (●). Después de 21 días de estímulo, los linfocitos T fueron utilizados para evaluar la citotoxicidad sobre células de la línea INBL marcadas con ^{51}Cr . Los linfocitos T obtenidos de una donadora con el alelo HLA-Cw4 en su haplotipo y sin infección con HPV-18, fueron también estimulados con C1R cargadas con el péptido 54-62 de la proteína L1 de HPV-18 (△) o sin este péptido (□).

8. DISCUSION .

A.- EXPRESION Y FUNCIONALIDAD DE LAS MOLECULAS CALSE I DEL MHC EN LAS LINEAS CELULARES DE CARCINOMA CERVICO-UTERINO, CALO E INBL.

La función principal de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase I (MHC-I) es la de presentar, en la membrana de las células blanco (células infectadas por virus o células tumorales), péptidos antigénicos provenientes de las proteínas virales y oncoproteínas, con la finalidad de que el linfocito T citotóxico lleve a cabo la eliminación de las células blanco (Lehner, et al, 1996). Sin embargo, uno de los mecanismos utilizados por las células malignas y células infectadas por virus, para escapar al reconocimiento inmune, es la pérdida de la expresión de moléculas MHC-I en la membrana (Ehrlich, 1995). Esta pérdida puede incluir desde un alelo, un locus o el haplotipo completo HLA-A, -B, -C (Connor et al, 1990; Cromme et al, 1993; Cromme et al, 1994 a, b; y Keating et al, 1995), la cual puede afectar también la respuesta mediada por las células NK (Garrido et al, 1997). Esta observación ha conducido a que varios grupos de investigación dirijan su atención al estudio de la expresión de las moléculas MHC-I, y en su caso, la expresión alélica HLA-A, -B, -C, utilizando anticuerpos que reconocen a estas moléculas de manera conformacional (Cromme et al, 1994 a, b; Garrido et al, 1994). A pesar de ello, poco se sabe acerca de los alelos específicos que pueden ser clave en la presentación de los determinantes antigénicos y que en algún momento pudieran estar disminuidos, aún ante la presencia de citocinas potenciadoras de su expresión (Neeffjes et al, 1988; Piccini et al, 1990; Lahat et al, 1989). Por lo que el análisis de la expresión de los productos alélicos HLA clase I sobre células tumorales y su inducción por citocinas resulta importante.

En estudios recientes, se ha reportado que alrededor de un 78% de tumores de CaCu presentan deficiencias en la expresión de moléculas HLA clase I (Keating et al, 1995), estos estudios se basan en técnicas inmunohistoquímicas hechas en cortes histológicos de las muestras tumorales. Evidentemente estas técnicas no permiten el análisis de la funcionalidad de las moléculas HLA ni su respuesta inductiva a citocinas. En el presente trabajo, utilizamos dos líneas celulares de carcinoma cérvico-uterino denominadas CALO e INBL, en las cuales encontramos positividad para HPV-18 y baja expresión de los alelos HLA-B27 en CALO y -A11 en INBL, en relación a alelos de la familia -Bw6 expresados en estas líneas celulares. El primer punto a analizar fue la funcionalidad de las moléculas HLA-B27 y -A11 bajo condiciones que se sabe promueven su expresión en la membrana celular, como son: el cultivo celular en presencia de IFN- γ (Brown et al,

1991; y Eleuteri et al, 1997); cultivo celular a 26°C (Ljunggren et al, 1990; y Rock et al, 1991); y el cultivo de las células en presencia de péptidos específicos que estabilizan a estos alelos (Elliot et al, 1991; Jardetzky et al, 1991; Benjamin et al, 1991; Kast et al, 1994; y Malnati et al, 1995). Este análisis permitió encontrar defectos asociados con la estabilidad y ensamble de estas moléculas, debidos, muy probablemente a deficiencias en la generación de péptidos dando como resultado la inestabilidad de las moléculas para viajar hacia la membrana celular. En este sentido, los cultivos celulares a 26°C y el rescate de moléculas HLA-B27 y A11 mediante la introducción de péptidos sintéticos al citosol de las células, favorecieron el ensamble de estas moléculas, reflejándose en un incremento de su expresión en membrana celular. De igual manera, la adición de péptidos específicos para los alelos HLA-B27 y -A11 en los lisados celulares de CALO e INBL, favorecieron su captura durante las inmunoprecipitaciones al utilizar los anticuerpos monoclonales específicos. Esta baja expresión de HLA-B27 y -A11 encontrada en estas líneas, no se relacionó con una deficiente transcripción de estos alelos, puesto que en el análisis de ARNm para estas moléculas, se encontraron patrones similares de expresión al de los alelos Bw6 (HLA-B78 para CALO y -B48 para INBL), cuya presencia en membrana es mucho mayor a la mostrada por HLA-B27 y -A11.

Varios mecanismos han sido propuestos para explicar la baja expresión de moléculas MHC en la membrana de las células tumorales (Neefjes y Ploegh, 1988; Ehrlich, 1995; y Keating et al, 1995), entre ellos se encuentran: la deficiencia en la fragmentación de las proteínas en el citosol, en donde los proteasomas tienen un papel importante en la generación de péptidos antigénicos (Rock et al, 1994); la deficiencia en el transporte de péptidos específicos hacia el lumen del retículo endoplásmico, mediante los transportadores ABC asociados al procesamiento antigénico (Tap-1 y 2) (Restifo et al, 1993; y Cromme et al, 1994a y b); y un ensamble inestable de los péptidos con las moléculas MHC clase I específicas debido a la generación de péptidos poco afines (Powis et al, 1991; Ortiz-Navarrete y Hämmerling, 1991; y Spies y DeMars, 1991). También se ha postulado que cambios de aminoácidos en la estructura de las moléculas MHC-I, puedan alterar su expresión en membrana celular (Möller et al, 1994). Estos cambios en las secuencias de las moléculas MHC-I, pueden también ser debidos a mutaciones puntuales por recombinación génica, o mediante eventos de conversión que involucran alelos relacionados (Vargas-Alarcón et al, 1997).

La disminución o carencia en la expresión de algún locus HLA-A ó B, o de un alelo

específico de HLA clase-I ha sido reportado en un gran número de tumores y líneas celulares derivadas de ellos, misma que ha sido asociada con importantes pérdidas en la expresión de moléculas que participan en la vía del procesamiento antigénico, y que son codificadas en el MHC, tal como las subunidades transportadoras Tap-1, Tap-2, LMP-2 y LMP-7 (Restifo et al, 1993; Keating et al, 1995; Singal et al, 1996; Seliger, et al, 1996; Maeurer et al, 1996a; Chen et al, 1996; Maeurer et al, 1996b; Kokolopoulou et al, 1996). En el caso particular de tumores de CaCu, se ha encontrado que una gran cantidad de estos tumores expresan deficiencia en Tap-1 (Cromme et al, 1994a, b; y Keating et al, 1995). En este estudio, encontramos que las líneas CALO e INBL mostraron deficiencias en la expresión de Tap-1 y LMP-10, en donde pudimos observar que el tratamiento de estas células con IFN- γ indujo un modesto incremento en la expresión de estas moléculas.

Estos datos en conjunto apoyan la idea de que la expresión deficiente de los alelos HLA-B27 en CALO y HLA-A11 en INBL, esta asociada con defectos en el procesamiento de antígenos y en el transporte de péptidos alelo-específicos para unirse adecuadamente a estas moléculas HLA clase I.

La expresión deficiente de la subunidad catalítica LMP-10 en células tumorales de CaCu, de acuerdo a nuestros resultados, resulta ser novedosa puesto que aun no se ha reportado tal deficiencia en este tipo de tumor. Recientemente, se ha reportado una marcada deficiencia de la subunidad LMP-10 en líneas celulares de neuroblastoma y tumores de cáncer pulmonar (Johnsen et al 1998); la deficiencia combinada de LMP-10 (que se codifica en el cromosoma 16, diferente al MHC), junto con la deficiencia de LMP-2, LMP-7, Tap-1 y Tap-2 (codificados en el cromosoma 6), llevó a tales autores a proponer que existen mecanismos reguladores, diferentes a las mutaciones y deleciones de ciertos genes, que conducen al descontrol de los diferentes componentes del mecanismo de procesamiento de antígenos para alterar el procesamiento y la presentación de antígenos tumorales (Johnsen et al, 1998). Lo cual suponemos esté también sucediendo en el CaCu.

Por otro lado, como se mencionó previamente, en nuestros resultados encontramos que al cultivar las células CALO e INBL en presencia de IFN- γ , los alelos HLA-B27 y -A11 no incrementaron su expresión en membrana celular, sin embargo, los alelos relacionados a HLA-Bw6 (-B48 y -B78) si la incrementaron; este fenómeno, es interesante puesto que como es sabido, la adición de IFN- γ recupera la expresión de MHC-I en células deficientes, al inducir la expresión de moléculas relacionadas con el procesamiento de

antígenos (IFN- γ , induce la expresión de LMP-2, -7 y -10 así como de PA28 α/β y Tap's). De acuerdo a nuestros resultados, la inducción de las moléculas Tap-1 y LMP-10 con IFN- γ fue ligeramente incrementada, pudiendo resultar en una incompleta generación y transporte de los péptidos antigénicos de manera específica. En este sentido, se ha reportado que la actividad de los proteasomas tiene un papel importante para el cargado de péptidos en diferentes alelos de moléculas MHC-I (Benham et al, 1998); asimismo, se ha visto que las subunidades de Tap pueden tener cierta selectividad por epitopos definidos; en el caso particular de HLA-B27 se ha encontrado que el aprovisionamiento de péptidos para esta molécula depende de la expresión eficiente de los Tap's (Daniel et al, 1998), por lo que una deficiente expresión o inducción de estas subunidades influye notablemente en el transporte de los péptidos para ensamblarse a las moléculas adecuadas. En adición, la participación de otras moléculas que se asocian a los Tap's para favorecer la unión y el acoplamiento del péptido a la molécula MHC-I, como es el caso de Tapasina y Calreticulina, pueden verse afectadas para llevar a cabo su función (Ortmann et al, 1997; Solheim et al, 1997; y van Endert, 1999).

Por otro lado, la selectividad en la inducción de alelos HLA clase-I con IFN- γ , pudiera explicar la respuesta deficiente en ciertos tipos de tumores a la terapia con IFN- γ (Koop et al, 1993). En este sentido, la baja respuesta a la inducción con IFN- γ debería ser considerada cuando esta citocina es utilizada en las intervenciones inmunológicas.

Por otra parte, la desregulación de la expresión y función de Tap's en líneas celulares de ratón, se ha relacionado con la presencia de IL-10 producida por estas mismas líneas celulares (Salazar-Onfray et al, 1997). Recientemente, se ha encontrado que tumores cervicales producen una mayor proporción de citocinas inmunosupresoras del tipo Th2, principalmente IL-4 e IL-10 (Alcocer et al, en prensa, citado en Gariglio et al, 1998); en consecuencia, este fenómeno podría estar relacionado con defectos en la expresión y función de los Tap's, como el reportado por otros autores y el descrito en el presente trabajo.

Por último, tomando en consideración que nuestros resultados convergen con la expresión deficiente de moléculas HLA clase I en células de cáncer cervical, debido probablemente deficiencias en la generación y transporte de péptidos específicos para ensamblarse con su alelo particular, de acuerdo a las deficiencias de Tap-1 y LMP-10 observadas en CALO e INBL, apoya la idea de que en pacientes con cáncer cervical, la deficiencia en la expresión de moléculas MHC-I resulte en la evasión de la respuesta inmune mediada por CTL's y células NK, puesto que estudios recientes han reportado

que la insuficiente expresión de algunos alelos que favorecen el reconocimiento de CTL's junto con la expresión de alelos que confieren resistencia a la lisis por NK, pueden conjugarse para lograr el escape inmunológico de tumores y relacionarse con procesos metastásicos (Gavioli et al, 1996; Geldhof et al, 1996; Garrido et al, 1997; y Pende et al, 1998).

B.- OBTENCION DE PÉPTIDOS ANTIGENICOS ASOCIADOS A MOLECULAS MHC-I DE LAS LINEAS CELULARES CALO E INBL.

En estudios previos, las líneas celulares CALO e INBL, fueron utilizadas en ensayos de co-cultivo con linfocitos de sangre periférica de estas mismas pacientes. En estos cultivos autólogos, se encontró que los linfocitos T sensibilizados durante varios días en presencia de rHL-2, fueron eficientes en lisar a estas células utilizadas como blanco en los ensayos de citotoxicidad INBL. (Monroy, 1991). Estos resultados, permitieron sugerir la posibilidad de que en la membrana celular de estas líneas se presentaran antígenos tumorales, reconocidos por los linfocitos T de las pacientes. Por lo que en este estudio, se decidió explorar la posibilidad de identificar epitopos naturalmente presentados por moléculas MHC-I en la membrana celular de las líneas CALO e INBL.

El uso de las líneas celulares CALO e INBL como modelo para identificar epitopos tumorales o virales asociados a moléculas MHC-I, presenta varias ventajas, puesto que son líneas celulares muy jóvenes (menos de 50 pasajes), evitando con ello el uso de líneas celulares altamente transformadas como es el caso de HELA, Caski, etcétera, además de la gran dificultad que existe en obtener *in vitro* a células infectadas con HPV para ser utilizadas como material biológico de investigación.

Una manera de identificar a los epitopos asociados al CaCu, ha sido la de utilizar vectores virales para expresar alguna proteína de HPV en las células en cuestión; por ejemplo en un modelo de células infectadas con virus de vaccinia recombinante que portaba la proteína E6 de HPV-16, fue posible identificar al péptido (18-26) de E6, a partir de la elución de los péptidos presentados por la molécula HLA-A0201 (Bartholomeu et al, 1994). De manera similar, también se han identificado varios péptidos derivados de la proteína E7 de los virus HPV-6b y HPV-11; o de las proteínas E6 y E7 de HPV-16 asociados a la molécula HLA-A2 (Tarpey et al, 1994); o mediante el uso de péptidos antigénicos de las proteínas E6 y E7 de HPV-16 obtenidos por

algoritmos de predicción, para asociarse a moléculas clase I de ratón (Kast et al, 1993) o de humano (Ressing et al, 1995).

En nuestros experimentos, después de analizar la actividad estimuladora de diferentes fracciones de péptidos asociados de manera natural a las moléculas MHC-I de CALO e INBL, logramos identificar a una fracción de péptidos disociados de moléculas clase I del MHC de la línea INBL (HPV-18+, HLA-Cw4+), la cual tuvo la propiedad de estimular *in vitro* a linfocitos T de una paciente con infección cervical de HPV-18 y también positiva para el alelo HLA-Cw4.

Un aspecto muy interesante de este estudio, fue el hecho de que la secuenciación directa de esta fracción de péptidos estimuladores, permitió identificar a tres secuencias que presentaban alta homología con segmentos de proteínas virales, de virus que se han asociado etiológicamente al desarrollo de cáncer cervical, como son: el HSV, el HCMV y principalmente el HPV (Peto y zurHausen, 1986). En nuestros ensayos encontramos que únicamente el péptido correspondiente a la secuencia 54-62 de la proteína L1 de HPV-18 fue capaz de inducir la estimulación y citotoxicidad de los linfocitos T de la donadora con infección para HPV-18. Este hecho nos indica que linfocitos T de memoria, específicos para este tipo de antígeno de papiloma, están presentes en la sangre periférica de esta donadora, como consecuencia de su respuesta inmunológica natural contra la infección del HPV-18.

La respuesta proliferativa de linfocitos T de pacientes con neoplasia intraepitelial con infección de HPV-16 y de donadores sanos, ha sido reportada utilizando péptidos de las proteínas E6 y E7 de HPV-16 (Kadish et al, 1997) y péptidos derivados de la proteína E2 de HPV-16 (Konya et al, 1997). Recientemente se encontró que péptidos sintéticos (15aa) derivados de la proteína L1 de HPV-16 (aa 199-409), fueron capaces de estimular linfocitos T de pacientes con displasia cervical (63%) y de controles sanos (45%), en su mayoría CD4⁺ y algunos CD8⁺ (Shepherd et al, 1996). En nuestro estudio, encontramos que únicamente el péptido 54-62 de la proteína L1 de HPV-18 indujo una respuesta proliferativa tanto de los linfocitos obtenidos de la donadora HPV-18+ y HLA-Cw4⁺, como de los linfocitos obtenidos de una donadora normal que también presentaba el alelo HLA-Cw4. Sin embargo, sólo encontramos citotoxicidad (16%) en los linfocitos obtenidos de la donadora con infección de HPV-18, lo cual nos permite sugerir que en esta donadora la respuesta linfoproliferativa producida por este péptido, puede estar asociada con la eliminación

de la infección viral.

En cáncer cervical, es frecuentemente observado que el virus de papiloma se integra en el genoma celular, en donde algunas regiones virales como E2 y L1 son eliminadas, dando como consecuencia su baja o nula expresión (Mullocandov et al, 1996); no obstante recientemente se ha logrado detectar la presencia de E2/E1 y la proteína L1 en tumores de cáncer cérvico-uterino avanzado (Berúmen et al, 1994; y Taja et al, 1995), sugiriendo que estos segmentos virales también son expresados como formas episomales en las células de cáncer cervical. En nuestro caso, nosotros recientemente encontramos la presencia de ARNm para la proteína L1 de HPV-18 en las células de INBL mediante RT-PCR, sugiriendo entonces su localización de manera episomal en esta línea celular, por lo que péptidos derivados de esta proteína pueden ser presentados por moléculas MHC-I. En nuestros resultados encontramos que los péptidos identificados mediante la secuenciación, tienen varios aminoácidos que han sido reportados como residuos ancla específicos para el alelo HLA-Cw4: Phe (F) y Met (M) en la novena posición; Ile (I) en la sexta posición; y Tyr (Y) en la 2ª y 3ª posiciones (Johson et al, 1993; y Rammensee et al, 1995).

Además otro dato interesante en este estudio, fue que al analizar la capacidad de estabilización del alelo HLA-Cw4 (en la línea C1R) con péptidos sintéticos, los péptidos que provienen de secuencias de las proteínas virales, estabilizan más eficientemente a la molécula HLA-Cw4. Estos resultados, nos permiten fuertemente sugerir, que péptidos pertenecientes a la proteína L1 de la cápside de HPV-18, están siendo presentados de manera natural, como epitopes, en la membrana de las células INBL en el contexto del alelo HLA-Cw4.

Por otra parte, se ha observado que tumores que expresan el alelo HLA-Cw4 y otros de tipo -Cw, presentan resistencia a la lisis por células asesinas naturales (Garrido et al, 1997), por lo que sería importante averiguar, en estudios posteriores, el papel del péptido 54-62 de la proteína L1 de HPV-18 en la resistencia de las células tumorales de CaCu a la lisis por NK.

9. PERSPECTIVAS.

En el presente trabajo encontramos que la expresión baja de alelos HLA clase I en células de cáncer cervical, está asociada con defectos en la maquinaria del procesamiento de antígenos, debido a la deficiencia en la expresión de las subunidades LMP-10 y Tap-1, los cuales tienen un papel importante en la fragmentación de proteínas antigénicas a péptidos y en el transporte de estos para unirse a las moléculas HLA clase I respectivamente. En estudios posteriores, será importante analizar si restableciendo estas subunidades de manera adecuada, la baja expresión de alelos se revierte; además de saber la participación de la subunidad LMP-10 del proteasoma en la generación de péptidos alelo-específicos. También será importante conocer si un número importante de tumores de cáncer cervical presenta deficiencias combinadas en la expresión de LMP-10 y Tap-1 y su asociación con alelos HLA clase I. Estos datos son de gran relevancia, puesto que la baja expresión de algún alelo HLA-clase I, puede estar relacionada con deficiencias en la presentación de determinantes antigénicos que pudieran ser blancos en el rechazo inmune medido por los linfocitos CD8⁺. Lo cual sería importante considerar, si se plantean estrategias para restablecer la respuesta inmune en pacientes con cáncer cervical.

Por otro lado, en nuestro trabajo también logramos identificar, a partir de péptidos eluidos de moléculas MHC-I de una línea celular de carcinoma cérvico-uterino (INBL), un péptido antigénico (secuencia NVFPIFLQM) que pertenece al fragmento 54-62 de la proteína L1 de HPV-18. Empleando a este péptido de manera sintética, se demostró la presencia de linfocitos T citotóxicos en la sangre periférica de una donadora con infección de HPV-18 y positiva para HLA-Cw4. Consideramos que este hallazgo es de gran importancia, puesto que se describe a un antígeno procesado de manera natural por células de cáncer cervical, además de que este antígeno proviene de la principal proteína de la cápside del HPV-18. La posible expresión de péptidos virales por moléculas HLA del locus C, abre la posibilidad de que estos alelos sean importantes en el reconocimiento inmune mediado por linfocitos T, además sería importante averiguar el papel de estos alelos en la resistencia de tumores cervicales a la lisis por NK.

Por otro lado, poco se sabe sobre las propiedades inmunogénicas de la proteína L1 de los HPV de alto riesgo (HPV-16, 18 etc) en tumores cervicales avanzados, puesto que se sabe que en un porcentaje importante de tumores mantienen segmentos virales de esta proteína en forma episomal. En consecuencia sería importante indagar el papel inmunogénico de L1 en este tipo de tumores.

Finalmente podemos indicar que existe un gran potencial en la identificación y caracterización de epitopos provenientes de proteínas virales de HPV asociadas con cáncer cervical, dicha caracterización asociada con alelos HLA clase I de alta frecuencia en la población Mexicana, podría ser de gran trascendencia para la asignación de vacunas específicas para diferentes alelos expresados en las pacientes con CaCu.

10. CONCLUSIONES.

9.1. Existe expresión alélica diferencial de moléculas clase I del MHC en las líneas celulares de cáncer cérvico-uterino CALO e INBL.

9.2. La baja expresión de los alelos HLA-B27 y -A11 en CALO e INBL respectivamente, se asocia muy probablemente con defectos en la generación y transporte de los péptidos hacia el retículo endoplásmico para unirse con moléculas MHC-I, puesto que estas líneas celulares fueron deficientes en la expresión de las subunidades LMP-10 del proteasoma y Tap-1.

9.3. Los ensayos de estimulación de linfocitos T de la donadora (HLA-Cw4+ y positiva para HPV-18), con péptidos eluidos de moléculas MHC-I de la línea celular INBL (HLA-Cw4+ y positiva también para HPV-18), y la identificación del péptido NQFPFLQF de alta homología con la secuencia 54-62 de la proteína L1 de HPV-18, sugieren la existencia de que epítopes virales de HPV-18 están siendo presentados por las células tumorales INBL, mediante moléculas MHC-I.

9.4. La presencia de aminoácidos de anclaje para el alelo HLA-Cw4 en el péptido NQFPFLQF altamente homólogo a la secuencia 54-62 de la proteína L1 de HPV-18 (secuencia NVFPFLQM), y la afinidad mostrada por este último hacia el alelo HLA-Cw4 expresado en la línea celular C1R, sugieren que este péptido antigénico se esté presentando en el contexto de moléculas HLA-Cw4 en la línea celular INBL.

9.5. La existencia de linfocitos T citotóxicos contra el péptido NVFPFLQM en la sangre periférica de la donadora (HLA-Cw4+ y positiva para HPV-18), dan una fuerte evidencia de respuesta de memoria inmunológica contra un determinante antigénico (péptido 54-62 de la proteína L1 de HPV-18) endógenamente procesado por las células de cáncer cérvico-uterino INBL.

10. BIBLIOGRAFIA.

- Abbas, A.K.**, Andrew, H.L., Jordan, S. P. 1994. Cellular and Molecular Immunology. 2a. De. Saunders Company.U.S.A. pp: 37-40.
- Abbas, A.K.**, Lichtman, A.H., Pober, J.S. 1991. Cellular and Molecular Immunology. W.B. Saunders Company. U.S.A. pp. 417.
- Ahluwalia, N.**, Bergeron, J.J.M., Degen, E., Williams, D.B. 1992. The p88 molecular chaperone is identical to the endoplasmic reticulum membrane protein, calnexin. *J. Biol. Chem.* 267:10914-18.
- Aldrich, C.J.**, DeCloux, A., Woods, A.S., Cotter, R.J., Soloski, M.J., Forman, J. 1994. Identification of a Tap dependent leader peptide recognized by alloreactive T cells specific for a class Ib antigen. *Cell* 79:649-58.
- Androlewicz, M.J.**, Anderson, K.S., Cresswell, P. 1993. Evidence that transporters associated with antigen processing translocate a major histocompatibility complex Class I-binding peptide into the endoplasmic reticulum in an ATP-dependent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:9130-34.
- Androlewicz J. M.**, Peter Cresswell. 1996. How selective is the transporter associated with antigen processing?. *Immunity* 5: 1-5.
- Androlewicz M.J.**, Ortmann B, van Endert P.M., Spies T, Cresswell P. 1992. Characteristics of peptide and class I/β₂m binding to the transporters associated with antigen processing (TAP-1 and TAP-2). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 12716-20.
- Apple, R.J.**, Becker, T.M., Wheeler, C.M., Erlich, H.A. 1995. Comparison of human leukocyte antigen DR-DQ disease associations found with cervical dysplasia and invasive cervical carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 87:427-36.
- Apple, R.J.**, Erlich, H.A., Klitz, W., Manos, M.M., Becker, T.M., Wheeler, C.M. 1994. HLA-DR-DQ associations with cervical carcinoma show papillomavirus-type specificity. *Nature Genetics.* 6:157-62.
- Arnold, D.** Driscoll, J., Androlewicz, M., Hughes, E., Cresswell, P., Spies, T. 1992. Proteasome subunits encoded in the MHC are not generally require for the processing of peptide bound by MHC classI molecules. *Nature* 360:171-74.
- Austyn M. J.** and Kathryn J. Wood. 1993. Principles of Cellular and Molecular Immunology. Ed. Oxford University Press. 50-57.
- Banks, L.**, Moreau, F., Vousden, K., Pim, D., Matlashewski, G. 1991. Expression of the

human Papillomavirus E7 oncogene during cell transformation is sufficient to induce susceptibility to lysis by activated macrophages. *J. Immunol.* 146:2037-42.

Barker, J.N.W.N., Milra, R.S., Griffiths, C.E.M., Dixit, V.M., Nickoloff, B.J. 1991. Keratinocytes as initiators of inflammation. *Lancet.* 337:211-14.

Bartholomew, J.S., Stacey, S.N., Coles, B., Burt, D.J., Arrand, J.R., Stern, P.L. 1994. Identification of a naturally processed HLA A0201-restricted viral peptide from cells expressing human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein. *Eur. J. Immunol.* 24:3175-79.

Bartholomew, J.S., Glenville, S., Sarkar, S., Burt, D. J., Stanley, M.A., Ruiz-Cabello, F., Chengang, J., Garrido, F., Stern, P.L. 1997. Integration of high-risk human papillomavirus DNA is linked to the downregulation of class I human leukocyte antigens by steroid hormones in cervical tumor cells. *Cancer Res.* 57:937-942.

Bavinck, J.N.B., Gissmann, L., Claas, F.H.J., Van der Woude, J.J., Persijn, C.G., Ter Schegget, J., Vermeest, B.J., Jochmus, I., Muller, M., Steger. 1993. Relation between skin cancer, humoral responses to human papillomaviruses, and HLA class II molecules in renal transplant recipients. *J. Immunol.* 151:1579-86.

Beckman, E.M., Melian, A., Behar, S.M., Sieling, P.A., Chatterjee, D., Furlong, S.T., Matsumoto, R., Rosat, J.P., Modlin, R.L., Porcelli, S.A. 1996. CD1c restricts responses of mycobacteria-specific T cells. Evidence for antigen presentation by a second member of the CD1 family. *J. Immunol.* 157:2795-803.

Beckman, E.M., Porcelli, S.A., Morita, C.T., Behar, S.M., Furlong, S.T., Brenner, M.B. 1994. Recognition of a lipid antigen by CD1-restricted alpha/beta T cells. *Nature* 372:691-94.

Bednarek, M.A., Sauma, S.Y., Gammon, M.C., Porter, G., Tsmhankar, S., Williamson, A.R., Zweerink, H.J. 1991. The minimum peptide epitope from the influenza virus matrix protein. Extracellular and intracellular loading of HLA-A2. *J. Immunol.* 147:4047-53.

Belich, M.P., Glynne, R.J., Senger, G., Sheer, D., Trowsdale, J. 1994. Proteasome components with reciprocal expression to that of the MHC-encoded LMP proteins. *Curr. Biol.* 4:769-76.

Benham, A., Tulp, A., Neefjes J. 1995. Synthesis and assembly of MHC-peptide complex. *Immunol. Today.* 16: 17-25.

Benham, A.M., Gromme, M., Neefjes, J. 1998. Allelic differences in the relationship between proteasome activity and MHC class I peptide loading. *J.Immunol.* 161:83-89.

Benjamin, R.J., Madrigal, J.A., Parham, P. 1991. Peptide binding to empty HLA-B27 molecules of viable human cells. *Nature.* 351:74-77.

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

Berke Gideon. 1995. The CTL's Kiss of Death. *Cell.* 81: 9-12.

Berke, G. 1994. The binding and lysis of target cells by cytotoxic lymphocytes: Molecular and Cellular Aspects. *Annu. Rev. Immunol.* 12: 735-73.

Bertoletti, A., Chisari, F.V., Penna, A., Guilhot, S., Galati, L., Missale, G., Fowler, P., Schlicht, H.J., Vitiello, A., Chesnut, R.C., Fiaccadori, F., Ferrari, C. 1993. Definition of a minimal optimal cytotoxic T-cell epitope within the hepatitis B virus nucleocapsid protein. *J. Virol.* 67:2376-80.

Berumen, J., Casas, L., Segura, E., Amezcua, J.L., García-Carrancá, A. 1994. Genome amplification of human papillomavirus types 16 and 18 in cervical carcinomas is related to the retention of E1/E2 genes. *Int. J. Cancer.* 56:640-45.

Berumen, J., Unger, E.R., Casas, L., Figueroa, P. 1995. Amplification of human papillomavirus types 16 and 18 in invasive cervical cancer. *Hum. Pathol.* 26:676-81.

Berumen, C.J., Villegas, N. 1997. Vacunas terapéuticas recombinantes contra el cáncer del cuello uterino. *Salud Pública de México.* 39:288-97.

Bevan, M.J., Hogquist, K.A., Jameson, S.C. 1994. Selecting the T cell receptor repertoire. *Science.* 264:796-97.

Bjorkman, P.J., Saper, M.A., Samraoui, B., Bennet, W.S., Strominger, J.L., Wiley, D.C. 1987a. The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature.* 329:512-18.

Bjorkman, P.J., Saper, M.A., Samraoui, B., Bennet, W.S., Strominger, J.L., Wiley, D.C. 1987b. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature.* 329:506-12.

Bornstein, J., Lahat, N., Kinary, A., Revel, M., Abramovici, H., Shapiro, S. 1996. Interferon- β and γ , but not tumor necrosis factor- α , demonstrate immunoregulatory effects on carcinoma cell lines infected with human papillomavirus. *Cancer* 79:924-34.

Borysiewicz, L.K., Fiander, A., Nimako, M., Man, S., Wilkinson, G.W., Westmoreland, D., Evans, A.S., Adams, M., Stacey, S.M., Bournsmell, M.E., Rutherford, E., Hickling, J.K., Inglis, S.C. 1996. A recombinant vaccinia virus encoding human papillomavirus types 16 and 18, E6 and E7 proteins as immunotherapy for cervical cancer. *Lancet* 347:1523-7.

Bosch, F.X., Manos, M., Muñoz, N., Sherman, M., Jansen, A.M., Peto, J., Schiffman, M.H., Moreno, V., Kurman, R., Shah, K. 1995. EBSCC Study Group: Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *J. Natl. Cancer Inst.* 87:796-

- Brannigan, J.A.,** Dodson, G., Duggleby, J.J., Moody, P.C.E., Smith, J.L., Tomchick, K.R., Murzin, A.G., 1995. A protein catalytic framework with an N-terminal nucleophile is capable of self-activation. *Nature* 378:416-19.
- Braud, V.,** Jones, E.Y., McMichael, A. 1997. The human major histocompatibility complex class Ib molecule HLA-E binds signal sequence-derived peptides with primary anchor residues at positions 2 and 9. *Eur. J. Immunol.* 27:1164-69.
- Breitburd, F.,** Ramoz, N., Salmon, J., Orth, G. 1996. HLA control in the progression of human papillomavirus infections. *Sem. Cancer Biol.* 7:359-371.
- Brodsky M. F.,** Lyeme. E., Guagliardi. 1991. The biology of antigen processing and presentation. *Annu. Rev. Immunol.* 9: 707-44.
- Brown, J.H.,** Jardetzky, T.S., Gorga, J.C., Stern, L.J., Urban, R.G., Strominger, J.L. Wiley, D.C. 1993a. The three dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature.* 364:33-39.
- Brown, M.G.,** Driscoll, J., Monaco, J.J. 1991. Structural and serological similarity of MHC-linked LMP and proteasome complexes. *Nature.* 353:355-57.
- Brutkiewicz, R.R.,** Bennink, J.R., Yewdell, J.W., Bendelac, A. 1995. Tap-independent, beta 2-microglobulin-dependent surface expression of functional mouse CD1.1. *J. Exp. Med.* 182:1913-19.
- Buchmeier M.J.** ZinkeARNget R.M. 1992. Immunodominant T cell epitope from signal sequence. *Science,* 257: 1142-44.
- Burnet, F.M.** 1959. The clonal selection theory of acquired immunity. Cambridge University Press. London.
- Burshtyn, D.B.,** Barber, B.H. 1993. Dynamics of peptide binding to purified antibody-bound H-2D^b and H-2D^b b₂m complexes. *J. Immunol.* 151:3082-93.
- Buus, S.,** Sette, A., Colon, S.M., Grey, H.M. 1988. Autologous peptides constitutively occupy the antigen binding site on Ia. *Science.* 242:1045-47.
- Campbell, R.D.,** Trowsdale, J. 1993. Map of the human MHC. *Immunology Today* 14:349-52.
- Cabrera, T.,** Concha, A., Ruiz-Cabello, F., Garrido, F. 1991. Loss of HLA heavy chain and β 2-microglobulin in HLA-negative tumours. *Scand. J. Immunol.* 34:147-52.
- Carina G.J.M.,** Hiiders M., Morgado M. I., Nooyen Y., and Jan F.G. 1995. Altered HLA expression by metastatic cervical carcinoma cells as a factor in impaired immune surveillance. *Gynecologic Oncology* 57: 366-75.

- Carrington, M., Colonna, M., Spies, T., Stephens, J.C., Mann, D.L.** 1993. Haplotypic variation of the transporter associated with antigen processing (TAP) genes and the extension of HLA class II region haplotypes. *Immunogenetics*. 37:266-73.
- Catterall, W.A.** 1994. Molecular properties of a superfamily of plasma-membrane cation channels. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6: 607-50.
- Cellis, E., Tsai, V., Crimi, C., De Mars, R., Wentworth, P.A., Chesnut, R.W., Grey, H.M., Sette, A., Serra, H.M.** 1994. Induction of anti-tumor cytotoxic T lymphocytes in normal humans using primary cultures and synthetic peptide epitopes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:2105-9.
- Clayton, L.K., Bauer, A., Jin, Y.J., D'Adams, L., Koyasu, R., Reinherz, E.L.** 1990. Characterization of thymus-derived lymphocytes expressing Ti alpha-beta CD3 gamma delta epsilon zeta-zeta, Ti alpha-beta CD3 gamma delta epsilon eta-eta or Ti alpha-beta CD3 gamma delta epsilon zeta-zeta/zeta-eta-eta antigen receptor isoforms: analysis by gene transfection. *J. Exp. Med.* 172:1243-53.
- Clerici, M., Merola, M., Ferrario, E., Trabattoni, D., Villa, M.L., Stefanon, B., Venzon, D.J., Shearer, G.M., De Palo, G., Clerici, E.** 1997. Cytokine production patterns in cervical intraepithelial neoplasia: association with human papillomavirus infection. *J. Natl. Cancer Inst.* 89:245-250.
- Coleman N., Stanley, M.A.** 1994. Analysis of HLA-DR expression on keratinocytes in cervical neoplasia. *Int. J. Cancer.* 56:314-19.
- Coligan, J.E., Kruisbeek, A.M., Margulies, D.H., Shevach, E.M., Strober, W.** 1992. Current Protocols in immunology. Greene Publishing Associates & Wiley-Intersciences. pp. 2.6.1-2.6.6, 5.0.3-5.8.5, 8.2.1-8.2.6, 8.4.1-8.4.7, 8.9.1-8.9.7.
- Comerford, S.A., McCance, D.J., Dougan G., Tite, J.P.** 1991. Identification of T- and B-cell epitopes of the E7 protein of human papillomavirus type 16. *J. Gen. Virol.* 65:4681-90.
- Connor M. E., Stern P. L.** 1990. Loss of MHC class I expression in cervical carcinomas. *Int. J. Cancer.* 46: 1029-34.
- Cordon-Cardo, C., Fuks, Z., Drobnakaj, M., Moreno, C., Eisenbach, L., Feldman, M.** 1991. Expression of HLA-A,B,C antigens on primary and metastatic tumor cell populations of human carcinomas. *Can. Res.* 51:6372-80.
- Cornette, J.L., Margalit, H., DeLisi, C., Berzofsky, J.A.** 1989. Identification of T-cell epitopes and use in construction of synthetic vaccines. *Methods Enzymol.* 178:611-34.
- Cossins, J., Gould, K.G., Smith, M., Driscoll, P., Brownlee, G.G.** 1993. Precise prediction

of a K^b-restricted cytotoxic T cell epitope in the NS1 protein of influenza virus using an MHC allele-specific motif. *Virology* 193:289.

Cresswell, P. 1993. Antigen processing. *Ann. Rev. Immunol.* 12:259-93.

Cromme F.V., Meijer C.J.L.M., Sniijders, P., Uyterlinde, A., Kenemans, P., Helmerhorst T., Stern P.L., van den Brule A.J.C., Walboomers J.M.M. 1993a. Analysis of MHC class I and II expression in relation of presence of HPV genotypes in premalignant and malignant cervical lesions. *Br. J. Cancer.* 67:1372-80.

Cromme, F.V., Sniijders, P.J.F., van den Brule, A.J.C., Kenemas, P., Meijer, C.J.L.M., Walboomers, J.M.M. 1993b. MHC class I expression in HPV 16 positive cervical carcinomas is post-transcriptionally controlled and independent from c-myc overexpression. *Oncogene.* 8: 2969-75.

Cromme, F.V., Airey, J., Heemels, M.-T., Ploegh, H.L., Keating, P.J., Stern, P.L., Meijer, C.J.L.M., Walboomers, J.M.M. 1994a. Loss of transporter protein, encoded by the TAP-1 gene, is highly correlated with loss of HLA expression in cervical carcinomas. *J. Exp. Med.* 179:335-40.

Cromme F.V., van Bommel P.F.J., Walboomers J.M.M., Gallee M.P.W., Stern P.L., Kenemans P., Helmerhorst Th.J.M., Stukart M.J., Meijer C.J.L.M. 1994b. Differences in MHC and TAP-1 expression in cervical cancer lymph node metastases as compared with the primary tumours. *Br. J. Cancer.* 69: 1176-81.

Crowley-Nowick, P., Bell, M.C., Bull, R., Edwards, R.P., Partridge, E.E., 1993. Cytokine expression by T cells isolated from cervical intraepithelial neoplasia lesions. 12th international papillomavirus conference. *Abstracts Book* p:7.

Chacón, S.R. 1996. Obtención de péptidos a partir de moléculas del complejo Mayor de Histocompatibilidad clase I y Análisis de su expresión alélica en dos líneas celulares de carcinoma de cérvix humano. Tesis de Licenciatura en Biología, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. Octubre.

Chambers, M.A., Wei, Z., Coleman, N., Nash, A.A., Stanley, M.A. 1994. Natural presentation of human papillomavirus type 16 E7 protein to immunocompetent mice results in antigen-specific sensitization or sustained unresponsiveness. *Eur. J. Immunol.* 24: 738-45.

Chau-Ching, Liu., Wals, C.M., John, D. Y. 1995. Perforin: structure and function. *Immunol. Today* 16:4 194-201.

Chávez, B.A.D. 1997. Análisis de la expresión de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase I (MHC-I) en dos líneas celulares de cáncer cérvico-uterino

(CaCu) CaLo e InBI y el efecto de la transfección con las moléculas transportadoras asociadas con el procesamiento de antígenos (TAP1 y TAP2). Tesis de Licenciatura en Biología, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. Octubre.

Cheng, G., Icenogle, J.P., Kimbauer, R., Hubbert, N.L., St. Louis, M.E., Han, C.L., Svare, E.L., Kjaer, S.K., Lowy, D.R., Schiller, J.T. 1995. Divergent human papillomavirus type 16 variants serologically cross-reactive. *J.Infect. Dis.* 172:1584-87.

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

Chicz, R.M., Urban, R.G., Lane, W.S., Gorga, J.C., Stern, L.J., Vignali, D.A., Strominger, J.L. 1992. Predominant naturally processed peptides bound to HLA-DR1 are derived from MHC-related molecules and are heterogeneous in size. *Nature.* 358:764-68.

Christmas, S.E., Brew, R., Denis, G., Taylor, J. 1993. T-cell receptor heterogeneity of γ - δ T-cell clones from human female reproductive tissues. *Immunology* 78:436-43.

Christnick, E.R., Luscher, M.A., Barber, B.H., Williams, D.B. 1991. Peptide binding to class I MHC on living cells and quantitation of complexes required for CTL lysis. *Nature.* 352:67-70.

Daniel, S., Caillant-Zucman, C., Hammer, J., Bach, J-F., van Endert, P.M. 1997. Absence of functional relevance of human TAP polymorphism for peptide selection. *J. Immunol.* 159:2350-7.

Daniel, S., Brusic, V., Caillat-Zucman, s., Petrovsky, N., Harrison, L., Riganelli, D., Sinigaglia, F., Gallazzi, F., Hammer, J., van Endert, P.M. 1998. Relationship between peptide selectivities of human transporters associated with antigen processing and HLA class I molecules. *J. Immunol.* 161: 617-624.

Dasgupta, J.D., Watkins, S., Slayter, H., Yunis, E.J. 1988. Receptor -like nature of class I HLA: endocytosis via coated pits. *J Immunol.* 141:2577-80.

David, V., Hochstenbach, F., Rajagopalan, S., Brenner, M.B. 1993. Interaction with newly synthesized and retained proteins in the endoplasmic reticulum suggests a chaperone function for human integral membrane protein IP90 (calnexin). *J. Biol. Chem.* 268:9585-92.

Davies, D.H., Hill, C.M., Rothbard, J.B., Chain, B.M. 1990. Definition of murine T helper cell determinants in the major capsid protein of human papillomavirus type 16. *J. Gen Virol.* 71:2691-98.

de la Salle, H. 1994. Homozygous human TAP peptide transporter mutation in HLA class I deficiency. *Science.* 265:237-41.

- Degen, E.,** Cohen-Doyle, M.F., Williams, D. B. 1992. Efficient dissociation of the p58 chaperone from major histocompatibility complex class I molecules requires both β 2-microglobulin and a peptide. *J. Exp. Med.* 175:1653-65.
- DeMartino, G.N.,** Proske, R.J., Moomaw, C.R., Strong, A.A., Song, X., Hisamatsu, H., Tanaka, K., Slaughter, C.A. 1996. Identification, purification and characterization of a PA700-dependent activator of the proteasome. *J. Biol. Chem.* 271:3112-18.
- Demotz, S.,** Grey, H.M., Sette, A. 1990. The minimal number of class II MHC antigen complexes needed for T cell activation. *Science.* 249:1028-30.
- Deveraux, Q.,** Ustrell, V., Pickart, C., Rechsteiner, M. (1994). A 26S protease subunit that binds ubiquitin conjugates. *J. Biol. Chem.* 269:7059-61.
- Devesa, S. S.,** Young, J. L. Jr., Brinton, L.A., Fraumeni, J.F., Jr. 1989. Recent trends in cervix uteri cancer. *Cancer* 64:2184-90.
- DiBrino, M.,** Parker, K.C., Shiolach, J., Knierman, M., Lukszo, J., Turner, R.V., Biddison, W.E., Coligan, J.E. 1993. Endogenous peptides bound to HLA-A3 possess a specific combination of anchor residues that permit identification of potential antigenic peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:1508-12.
- Dillner, J.,** Dillner, L., Robb, J., Willems, J., Jones, Y., Lancaster, W., Smith, R., Lerne, R.R. 1989. A synthetic peptide defines a serologic IgA response to Human Papillomavirus-encoded nuclear antigen expressed in virus carrying cervical neoplasia. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 3838-41.
- Dillner, J.** 1994a. Antibody responses to defined HPV epitopes in cervical neoplasia. *Papillomavirus Rep.* 5:35-41.
- Dillner, J.,** Lenner, P., Lehtinen, M., Eklund, C., Heino, C., Wiklund, F., Hallmans, G., Stendahl, U. 1994b. Population-based seroepidemiological study of cervical cancer. *Cancer Res.* 54:1341-41.
- Dillner, L.,** Heino, P., Moreno-López, J., Dillner, J. 1991. Antigenic and immunogenic epitopes shared by human papillomavirus type 16 and bovine, canine, and avian papillomavirus. *J. Virol.* 65:6862-71.
- Doherty, P.C.,** Sam, H., Ralph, A. Tripp. 1994. CD8⁺ T-Cell to viruses. *Curr. Opi. Immunol.* 7:547-52.
- Driscoll, J.,** Finley, D. 1992. A controlled breakdown: Antigen processing and the turnover of viral peptides. *Cell* 68:823-25.
- Duggan-Keen, M.,** Keating, P.J., Cromme, F.V., Walboomers, J.M.M., Stern, P.L. 1994. Alterations in major histocompatibility complex expression in cervical cancer: possible

consequences for immunotherapy. *Papillomavirus Rep.* 5:3-9.

Duggan-Keen, M.F., Keating, P.J., Stevens, F.R.A., Sinnott, P., Snijders, P.J.F., Walboomers, J.M.M., Davidson, S., Hunter, R.D., Dyer, P.A., Stern, P.L. 1996. Immunogenetic factors in HPV-associated cervical cancer: influence on disease progression. *Eur. J. Immunogenet.* 23:275-284.

Eggers, M., Boes-Fabian, B., Ruppert, T., Kloetzel, P.M., Korzinowski, U.H. 1995. The cleavage preference of the proteasome governs the yield of antigenic peptides. *J. Exp. Med.* 182:1865-70.

Ehrlich, R. 1995. Selective Mechanisms utilized by Persistent and Oncogenic Viruses to Interfere with Antigen Processing and Presentation. *Immunol. Res.* 14:77-97.

Eleuteri, A.M., Kahanski, R.A., Cardozo, C., Orlowski, M. 1997. Bovine spleen multicatalytic proteinase complex (proteasome). Replacement of X, Y and Z subunits by LMP2, LMP7 and MECL1 and changes in properties and specificity. *J. Biol. Chem.* 272:11824-31.

Elliot, T., Cerundolo, V., Elvin, J., Townsend, A. 1991. Peptide-induced conformational change of the class I heavy chain. *Nature.* 351:402-6.

Elliot, T., Elvin, J., Cerundolo, V., Allen, H., Townsend, A. 1992. Structural requirements for the peptide-induced conformational change of free major histocompatibility complex class I heavy chains. *Eur. J. Immunol.* 22:2085-91.

Elliot, T., Willis, A., Cerundolo, V., Townsend, A. 1995. Processing of major histocompatibility class I-restricted antigens in the endoplasmic reticulum. *J. Exp. Med.* 181:1481-91.

Ellis, J.R.M., Keating, P.J., Baird, J., Hounsell, E.F., Renouf, D.V., Rowe, M., Hopkins, D., Duggan-Keen, M.F., Bartholemew, J., Young, L.S., Stern, P.L. 1995. The association of a HPV 16 oncogene variant with HLA-B7 has implications for vaccine design in cervical cancer. *Nature Med.* 1:464-70.

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

Evans, CH., Flugelman, A.A., DiPaolo, J. A. 1993. Cytokine modulation of immune defenses in cervical cancer. *Oncology.* 50:245-51.

Evans, E.M., Man, A.S., Borysiewicz, L.K. 1997. Infiltration of cervical tissue with human papillomavirus-specific cytotoxic T-lymphocytes. *Cancer Res.* 57:2943-50.

Falk, K., Rötzchke, O., Stevanovic, S., Jung, G., Rammensee, H.-G. 1991a. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from molecules HLA-A2. *Nature*

351:290-96.

Falk, K., Rötzchke, O., Deres, K., Metzger, J., Jung, G., Walden, P., Rammensee, H.G. 1991b. Identification of naturally processed viral nonapeptides allows their quantification in infected cells and suggests an allele-specific T cell epitope forecast. *J. Exp. Med.* 174:425-34.

Fehling, H.J., Swat W., Laplace C., Kühn R., Rajewsky K., Müller U., von Bohemer A. 1994. MHC class I expression in mice lacking the proteasome subunit LMP-7. *Science.* 265: 1234-37.

Feltkamp, M.C., Smits, H.L., Vierboom, M.P., Minnaar, R.P., de Johgh, B.M., Brijfhout, J.W., Ter Schegget, J., Melief, C. J., Kast, W. M. 1993. Vaccination with cytotoxic T lymphocyte epitope containing peptide containing against a tumor induced by human Papillomavirus type 16 - transformed cells. *Eur. J. Immunol.* 23:2242-49.

Ferrone, S., Marincola, F.M. 1995. Loss of HLA class I antigens by melanoma cells: molecular mechanisms, functional significance and clinical relevance. *Immunol. Today* 16:487-94.

Fierlbeck, G., Schiebel, U., Muller, C. 1989. Immunohistology of genital warts in different stages of regression after therapy with interferon. *Dermatologica* 179:191-95.

Fremont, D.H., Matsumara, M., Stura, E.A., Peterson, P.A., Wilson, I.A. 1992. Crystal structures of two viral peptides in complex with murine MHC class I H-2K^b. *Science.* 257:919-27.

Fuji, T., Ishitani, A., Geraghty, D.E. 1994. A soluble form of the HLA-G antigen is encoded by a messenger ribonucleic acid containing intron 4. *J Immunol.* 153:5516-24.

Furbert-Harris, P.M., Evans, C.H., Woodworth, C.D., Dipaolo, J.A. 1989. Loss of leukoregulin of natural killer but not lymphokine-activated killer lymphocytotoxicity in human papillomavirus 16 DNA-immortalized cervical epithelial cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 81:1080-85.

Gaczynska, M., Rock, K.L., Goldberg, A.L. 1993. γ -Interferon and expression of MHC genes regulates peptide hydrolysis by proteasomes. *Nature* 365:254-67.

Galvin, K., Krishna, S., Ponchel, F., Frohlich, M., Cummings, D.E. 1992. The major histocompatibility complex Class I antigen-binding protein p88 is the product of the calnexin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:8452-56.

Galloway, D.A. 1996. Papillomavirus oncoproteins as vaccine candidates. *Lancet* 347:1498-99.

Galloway, D.A., McDougall, J.K. 1996. The disruption of the cell cycle checkpoints by

papillomavirus oncoproteins contributes to anogenital neoplasia. *Sem. Cancer Biol.* 7:309-315.

García -Carrancá A., Gariglio P. 1993. Aspectos moleculares de los *papilomavirus* humanos y su relación con el cancer cérvico-uterino. *Rev. Inv. Clin.* 45: 85-92.

Gariglio, P.V. Cáncer cérvico-uterino. Influencia de los genes celulares y de los virales. Implicaciones en el desarrollo de vacunas. *Gac. Méd. Méx.* 134:297-307.

Gariglio, P., Benítez-Bribiesca, L., Berumen, J., Alcocer, J.M., Tamez, R., Madrid, V. 1998. Therapeutic uterine-cervix cancer vaccines in humans. *Archives of Med. Research.* 29:279-284.

Garret, T.P.J., Saper, M.A., Bjorkman, P.J., Strominger, Wiley, D.C. 1989. Specificity pockets for the side chains of peptide antigens in HLA-Aw68. *Nature.* 342:692-96.

Garrido, F., Cabrera, T., Concha, A., Glew, S., Ruiz-Cabello, F., Stern, L.P. 1993. Natural history of HLA expression during tumor development. *Immunol. Today.* 14: 491-99.

Garrido, F., Ruiz-Cabello, F., Cabrera, T., Pérez-Villar, J.J., López-Botet, M., Duggan-Keen, M., Stern, P.L. 1997. Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol. Today* 18:89-95.

Gausepohl, H., Kraft, M., Boulin, C., Frank, R.W. 1990. "In Proceedings of the 11th American Peptide Symposium", Leiden.

Gavioli, R., Zhang, Q.J., Masucci, M.G. 1996. HLA-A11-mediated protection from NK cell-mediated lysis: role of HLA-A11-presented peptides. *Hum. Immunol.* 49:1-12.

Germain, R.N. 1994. MHC-Dependent antigen processing and peptide: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* 76:287-99.

Germain, R.N., Margulies, D.H. 1993. The biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation. *Ann. Rev. Immunol.* 11:403-50.

Gething, M.J. 1992. Protein folding in the cell. *Nature.* 355:33-45.

Ghosh, A. K., Smith, N. K., Stacey, S. N., Glew, S.S., Connor, M.E., Arand, J.R., Stern, P.L. 1993. Serological response to HPV-16 in cervical dysplasias and neoplasia: correlation of antibodies to E6 with cervical cancer. *Int. J. Cancer.* 53:591-96.

Gjildlund, M., Orn, A., Pattengal, P.K., Jansson, M., Wigzell, H., Nilsson, K. 1981. Natural killer cells kill tumour cells at a given stage of differentiation. *Nature* 292:848.

Glew, S.S., Connor, E. M., Snijders, P. J. F., Stanbridge, C. M., Buckley, C. H., Walboomers, J. M.M., Meijer, C.J.L.M., Stern, P. L. 1993. HLA Expression in pre-invasive cervical neoplasia in relation to human papilloma virus infection. *Eur. J. Cancer.* 29:1963-70.

- Glew, S.S.,** Duggan-Keen M., Cabrera T., Stern P. L. 1992. HLA Class II Antigen expression in human papillomavirus-associated cervical cancer. *Cancer Research*, 52:4009-16.
- Glynn, R.,** Powis, S.H., Beck, S., Kelly, A., Kerr L.A., Trowsdale, J. 1991. A proteasome-related gene between the two ABC transporter *loci* in the Class II region of the human MHC. *Nature* 353:357-60.
- Goldberg, A.L.,** Rock K.L. 1992. Proteolysis, proteasomes and antigen presentation. *Nature* 357: 375-379.
- Gray, C.W.,** Slaughter, C.A., DeMartino, G.N. 1994. PA28 activator protein forms regulatory caps on proteasome stacked rings. *J. Mol. Biol.* 236:7-15.
- Greenberg, P.D.** 1991. Adoptive T cell Therapy of tumors: mechanisms operative in the recognition and elimination of tumor cells. *Adv. Immunol.* 49: 281-85.
- Grey, H.M.,** Ruppert, J., Vitiello, A., Sidney, J., Kast, W.M., Kubo, R.T., Sette, A. 1995. Class I MHC-peptide interactions. Structural requirements and functional implications. In: Molecular mechanisms of the immuneresponse. Editors: Bodmer, W.F y Owen, M.J. De. Cold Spring Harbor Laboratory Press. PP:37-49.
- Groettrup, M.,** Sosa, A., Kuckelkorn, U., Kloetzel, P-M. 1996a. Peptide antigen production by the proteasome: complex provides efficiency. *Immunol. Today* 9:429-35.
- Groettrup, M.,** Kraft, R., Kostka, S., Standera, S., Strohwasser, R., Kloetzel, P.M. 1996b. A third interferon-gamma-induced subunit exchange in the 20S proteasome. *Eur. J. Immunol.* 26:863-69.
- Groettrup, M.,** Ruppert, T., Kuchn, L., Seeger, M., Standera, S., Koszinowski, U., Kloetzel, P.M. 1995. The interferon- γ -inducible 11S regulator (PA28) and the LMP17 LMP7 subunits govern the peptide production by the 20S proteasome *in vitro*. *J Biol. Chem.* 270:23808-15.
- Gulden, P.H.,** Fischer, P., Sherman, N.E., Wang, W., Engelhard, V.H., Shabanowitz, J., Hunt, D.H., Pamer, E.G. 1996. A *Listeria monocytogenes* pentapeptide is presented to cytolytic T lymphocytes by the H2-M3 MHC class Ib molecule. *Immunity* 5:73-79.
- Guo, H-C.,** Jardetzky, T.S., Garret, T.P.J., Lane, W.S., Strominger, J.L., Wiley, D.C. 1992. Different length peptides bind to HLA-Aw68 similarly at their ends but bulge out in the middle. *Nature*. 360:364-67.
- Hahn, Y.S.,** Hahn, C.S., Braciale, T.J., Rice, C.M. 1992. CD8⁺ T cell recognition of an endogenously processed epitope is regulated primarily by residues within the epitope. *J. Exp. Med.* 176:1335-41.

- Hailei, L. C.,** Grabrilovich, D., Tamper, R., Girgis, K. R., Nadai, S., Carbone, D. P. 1996. A functionally defective allele of TAP-1 results in loss of MHC class I antigen presentation in a human lung cancer. *Nature Genetics*. 13: 210-13.
- Hammond, C.,** Braakman, I., Helenius, A. 1994. Role of N-linked oligosaccharide recognition, glucose trimming, and calnexin in glycoprotein folding and quality control. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:913-17.
- Hammond, S.A.,** Johnson, R.P., Kalams, S.A., Walker, B.D., Takiguchi, M., Safrit, J.T., Koup, R.A., Siliciano, R. F. 1995b. An epitope-selective, transporter associated with antigen presentation (TAP)-1/2-independent pathway and a more general (TAP)-1/2-dependent antigen-processing pathway allow recognition of the HIV-1 envelope glycoprotein by CD8+ CTL. *J. Immunol.* 154:6140-56.
- Harlow, E.,** Lane, D. 1988. Antibodies. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. U.S.A. pp. 313-315, 519-21, 616-19.
- Hay, R.J.** 1988. Preservation and characterisation. Ed. Freshney, F.I. Animal cell culture. A practical approach. 2a. de. IRL Press. England. pp. 71-111.
- Heemels, M.-T.,** Ploegh, H. 1995. Generation, translocation, and presentation of MHC Class I-Restricted Peptides. *Annu. Rev. Biochem.* 64: 463-91.
- Henderson, R.A.,** Michel, H., Sakaguchi, K., Shabanowitz, J., Appella, E., Hunt, D.F., Engelhard, V.H. 1992. HLA-A2.1 associated peptides from a mutant cell line: a second pathway of antigen presentation. *Science.* 255:1264-66.
- Hilders, C. G.,** Houbiers, J.G., van Ravenswaay Claasen, H.H., Valdhuizen, R.W., Fleuren G.J. 1993. Association between HLA-expression and infiltration of immune cells in cervical carcinoma. *Lab. Invest.* 69:651-59.
- Hilders, G.J.M.C.,** Houbiers, G.A.J., Krul J.T.E., Fleuren G.J. 1994. The expression of Histocompatibility-related Leukocyte Antigens in the Pathway to cervical Carcinoma. *Am. J. Clin. Pathol.* 101: 5-12.
- Hilders, C.G.,** Muños, I.M., Nooyen, Y., Fleuren, G.J., 1995. Altered HLA expression by metastatic cervical carcinoma cells as a factor in impaired immune surveillance. *Gynecol. Oncol.* 57:366-75.
- Hill, A.V.S.,** Elvin, J., Willis, A.C., Aidoo, M., Allsopp, C.E.M., Gotch, F.M., Gao, X.M., Takiguchi, M., Greenwood, B.M., Townsend, A.R.M., McMichael, A.J., Whittle, H.C. 1992. Molecular analysis of the association of HLA-B35 and resistance to severe malaria. *Nature.* 360:434-39.
- Ho, L.,** Chan, S.Y., Chow, V., Chong, T., Tay, S.K., Villa, L.L., Bernard, H.V. 1991.

Sequence variants of human papillomavirus type 16 in clinical samples permit verification and extension of epidemiological studies and construction of a phylogenetic tree. *J. Clin Microbiol.* 29:1765-72.

Hochstrasser, M. 1995. Ubiquitin, proteasomes, and the regulation of intracellular protein degradation. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 7:215-23.

Hoffman, L., Rechsteiner, M. 1994. Activation of the multicatalytic protease. The 11S regulator and 20S ATPase complexes contain distinct 30-kilodalton subunits. *J. Biol. Chem.* 269:16,890-95.

Honma, S., Tsukada, S., Honda, S., Nakamura, M., Takakuwa, K., Maruhashi, T., Kodama, S., Kanazawa, K., Takahashi, T., Tanaka, K. 1994. Biological-clinical significance of selective loss of HLA class-I allelic product expression in squamous-cell carcinoma of uterine cervix. *Int. J. Cancer.* 57:650-655.

Höpfel, R., Sandbichler, M., Sepp, N., Heim, K., Müller-Holzner, E., Wartusch, B., Dapunt, O., Jochmus-Kudielka, I., Ter, M.I., Gissmann, L., Fritsch, P. 1991. Skin test for HPV Type 16 proteins in cervical intraepithelial neoplasia. *Lancet* 337:373-74.

Hosken, N.A., Bevan, M.J. 1990. Defective presentation of endogenous antigen by a cell line expressing class I molecules. *Science* 248:367-70.

Howard, J.C. 1995. Supply and transport of peptides presented by class I MHC molecules. *Curr. Opin. Immunol.* 7: 69-76.

Howley, P. M. 1991. Role of the human papillomaviruses in human cancer. *Cancer Res.* 51:5019-22.

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

Hughes, E.A., Hammond, C., Cresswell, P. 1997. Misfolded major histocompatibility complex class I heavy chains are translocated into the cytoplasm and degraded by the proteasome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:1896-1901.

Huibregtse, J.M., Beaudenon, S.L. 1996. Mechanism of HPV E6 proteins in cellular transformation. *Semin Cancer Biol.* 7:317-326.

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

Hunt, D.F., Michel, H., Dickinson, T.A., Shabanowitz, J., Cox, A.L., Sakaguchi, K.,

- Appella, E., Grey, H.M., Sette, A. 1992b. Peptides presented to the immune system by the murine class II major histocompatibility complex molecule I-A^d. *Science*. 256:1817-20.
- Hunt, D.F., Yates, J.R., Shabanowitz, J., Winston, S., Hauer, C.R. 1986. Protein sequencing by tandem mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 83:6233-37.
- Hurtley, S.M., Helenius, A. 1989. Protein oligomerization in the endoplasmic reticulum. *Ann. Rev. Cell. Biol.* 5:277-307.
- Ikuta, K., Uchida, N., Friedman, J., Weissman, I.L. 1992. Lymphocyte development from stem cells. *Annu. Rev. Immunol.* 10:759-83.
- Iwasawa, A., Nieminen, P., Lehtinen, M., Paavonen, J. 1996. Human papillomavirus DNA in uterine cervix squamous cell carcinoma and adenocarcinoma detected by polymerase chain reaction. *Cancer* 77:2275-9.
- Jacob, M, CH., Favre, M., Bensa, J-C. 1991. Membrane cell permeabilization with saponin and multiparametric analysis by flow cytometry. *Cytometry* 12: 550-558.
- Jameson, C.S., Kristin A. H., Michael J.B. 1995. Positive selection of thymocytes. *Annu. Rev. Immunol.* 13: 93-126.
- Jameson, S.C., Bevan, M.J. 1992. Dissection of major histocompatibility complex (MHC) and T cell receptor contact residues in a K^b-restricted ovalbumin peptide and an assessment of the predictive power of MHC-binding motifs. *Eur. J. Immunol.* 22:2663-67.
- Janeway, C. A. Jr., Travers, P., Simon, H., Walport, M. 1997. Immunobiology: the Immune System in Health and Disease. Ed. Current biology limited. New York, U.S.A. pp:4:1-4:46.
- Jardtzyk, T.S., Lane, W.S., Robinson, R.A., Madden, D.R., Wiley, D.C. 1991. Identification of self peptides bound to purified HLA-B27. *Nature*. 353:326-29.
- Jeffrey, L.J., Philip, A., Reay, Elliot, W. E., Davies, M. M. 1992. Molecular components of T-cell recognition. *Ann. Rev. Immunol.* 10:835-73.
- Jensen, K.U., Rosolowsky, M., Shultz, L.D., Markus, H.Z., Cook, J.C., Donnelly, J.J., Martínez, D., Ellis, R.W., Shaw, A.R. 1995. Vaccination with yeast-expressed cottontail rabbits from CRPV-induced papilloma formation. *Vaccine*. 13:1509-14.
- Johnsen, A., France, J., Sy, M-S., Harding, C.V. 1998. Down-regulation of the transporter for antigen presentation, proteasome subunits, and class I major histocompatibility complex in tumor cell lines. *Cancer Res.* 58:3660-67.
- Johnson, R.P., Trocha, A., Buchanan, T.M., Walker, B.D. 1993. Recognition of a highly conserved region of human immunodeficiency virus type 1 gp120 by an HLA-Cw4-restricted cytotoxic T-lymphocyte clone. *J. Virol.* 67:438-45.
- Jones, D.L., Münger, K. 1996. Interactions of the human papillomavirus E7 protein with

cell cycle regulators. *Sem Cancer Biol.* 7:327-337.

Kadish, A.S., Ho, G.Y., Burk, R.D., Wang, Y., Romney, S.L., Ledwidge, R., Angeletti, R.H. 1997. Lymphoproliferative responses to human papillomavirus (HPV) type 16 proteins E6 and E7: outcome of HPV infection and associated neoplasia. *J. Natl. Cancer. Inst.* 89:1285-93.

Kaklamanis, L., Leek, R., Koukourakis, M., Gatter, K. C., Harris, A. L. 1995. Loss of transporter in antigen processing 1 transport protein and major histocompatibility complex class I molecules in metastatic versus primary breast cancer. *Cancer Res.* 55: 5191-94.

Kanda, T., Onda, T., Zanma, S., Yasugi, T., Furuno, A., Watanabe, S., Kawana, T., Sugase, M., Ueda, K., Sonoda, T. 1992. Independent association of antibodies against human Papillomavirus type 16 E1/E4 and E7 proteins with cervical cancer. *Viol.* 190:724-32.

Kasahara, T., Djeu, J.Y., Dougherty, S.F., Oppenheim, J.J. 1983. Capacity of human large granular lymphocytes (LGL) to produce multiple lymphokines: Interleukin 2, interferon, and colony stimulating factor. *J. Immunol.* 131:2379-85.

Kast, W., Brandt, R., Sidney, J., Drijhout, J. W., Kubp, R.T., Grey, H.M., Melief, C.J., Sette, A. 1994. Role of HLA-A motifs in identification of potential CTL epitopes in human Papillomavirus type 16 E6 and E7 proteins. *J. Immunol.* 152: 3904-12.

Kast, W.M., Brandt, R., Drijhout, J.W., Melief, C.J. 1993. Human leukocyte antigen-A2.1 restricted candidate cytotoxic T-lymphocyte epitopes of human papillomavirus type-16 E6-protein and E7-protein identified by using the processing-defective human cell line-T2. *J. Immunother.* 14:115-20.

Kaur, P., McDougall, J.K., Cone, R. 1989. Inmortalization of primary human epithelial cell by cloned cervical carcinoma ADN containing human papillomavirus Type 16 E6/E7 open reading frames. *J. Gen. Virol.* 70:1261-66.

Keating, P.J., Cromme, F.V., Duggan-Keen, M., Sniders, P.J.F., Walboomers, J.M.M., Hunter R.D., Dyer, P.A., Stern, P.L. 1995. Frequency of down-regulation of individual HLA-A and -B alleles in cervical carcinomas in relation to TAP-1 expression. *Br. J. Cancer.* 72: 405-11.

Kelly, A., Powis, S.H., Glynne, R., Radley, E., Beck, S., Trowsdale, J. 1991. Second proteasome-related gene in the human MHC Class II. *Nature* 353:667-68.

Khanna, R., Burrows, S.R., Arguet, V., Moss, D. 1994. Endoplasmic reticulum signal sequence facilitated transport of peptide epitopes restores immunogenicity of an antigen processing defective tumor cell line. *Int. Immunol.* 6:639-45.

- King, L.A.**, Tase, T., Twiggs, L.B. 1989 Prognostic significance of the presence of human Papillomavirus ADN in patientes with invasive carcinoma of the cervix. *Cancer* 63:897-900.
- Kirnbauer, R.**, Chandrachud, L.M., O'Neil, B.W., Wagner, E.R., Grindlay, G.J., Armstrong, A.A., McGarvie, G.M., Schiller, J.T., Lowy, D.R., Campo, M.S. 1996. Virus-like particles of bovine papillomavirus type 4 in prophylactic and therapeutic immunisation. *Virology* 219:37-44.
- Kirnbauer, R.**, Kock, A., Schwarz, T., Urbansk, A., Krutmann, J., Borth, W., Damm,D., Shipley, G., Ansel, J.C., Luger, T.A. 1989. IFN- β /2 , B cell differentiation factor 2, or hibridoma growth factor (IL-6) is expressed and released by human epidermal cells and epidermoid carcinoma cell lines. *J. Immunol.* 142:1922-28.
- Kleijmeer, M.**, Kelly, A., Geuze, H.J., Slot, J.W., Townsend, A., Trowsdale, J. 1992. Location of MHC-encoded transporters in the endoplasmic reticulum and cis-Golgi. *Nature* 357:342-44.
- Klingelutz, A.J.**, Foster, S.A., McDougall, J.K., 1996. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature.* 380:79-82.
- Konya, J.**, Eklund, C., af Geijerstam, V., Yuan, F., Stuber, G., Dillner, J. 1997. Identification of a cytotoxic T-lymphocyte epitope in the human papillomavirus type 16 E2 protein. *J. Gen Virol.* 78:2615-20.
- Kopp, W.C.**, Smith, J.W2d., Ewel, C.H., Alvord, W.G., Main, C., Guyre, P.M., Steis, R.G., Longo, D.L., Urba, W.J. 1993. Immunomodulatory effects of interferon-gamma in patients with metastatic malignant melanoma. *J. Immunother.* 13:181-90
- Koppelman, B.**, Zimmerman, D.L., Walter, P., Brodsky, F.M. 1992. Evidence for peptide transport across microsomal membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:3908-12.
- Korkolopoulou, P.**, Kaklamanis, L., Pezzella, F., Harris, A.L., Gatter, K.C. 1996. Loss of antigen-presenting molecules (MHC class I and TAP-1) in lung cancer. *Br. J. Cancer.* 73:148-53.
- Kurman, R.J.**, Schiffman, M.H., Lancaster, W.D. 1988. Analysis of individual human Papillomavirus types in cervical neoplasia. A possible role for type 18 in rapid progression. *Am. J. Obstet, Gynecol.* 159:293-96.
- Kvist, S.**, Hamann, U. 1990. A nucleoprotein peptide of influenza A virus stimulates assembly of HLA-B27 class Y heavy chains and b2-microglobulin translated *in vitro*. *Nature.* 348:446-448.
- Kyo, S.**, Inoue, M., Hayasaka, N., Inoue, T., Yutsudo, M., Tnizawa, O., et al. 1994.

Regulation of early gene expression of human papillomavirus type 16 by inflammatory cytokines. *Virology* 200:130-39.

Lahat, N., Hirose, W., Davies, T.F. 1989. Enhanced induction of thyroid cell MHC class II antigen expression in rats highly responsive to thyroglobulin. *Endocrinology*. 124:1754-9.

Lee, N., Malacko, A.R., Ishitani, A., Chen, M-C., Bajorath, J., Marquardt, H., Geraghty, D.E. 1995. The membrane-bound and soluble forms of HLA G bind identical sets of endogenous peptides but differ with respect to TAP association. *Immunity* 3:591-600.

Lehner, J. P., Creswell, P. 1996. Processing and delivery of peptides presented by MHC class I molecules. *Curr. Opin. Immunol.* 8: 59-57.

Lehtinen, M., Rantala, I., Toivonen, A., Luoto, H., Aine, R., Lauslahti, K., Ylaoutinen, A., Romppanen, U., Paavonen, J. 1993. Depletion of Langerhans cells in cervical HPV infection is associated with replication of the virus. *Apmis*. 101:833-37.

Lentinen, M., Leminen, A., Kuoppala, T., Tiikkainen, M., Lehtinen, T., Lehtovirta, P., Punnonen, R., Vesterinen, E., Paavonen, J. 1992. Pre- and post-treatment serum antibody responses to HPV-16 E2 and HSV 2 ICP8 proteins in women with cervical carcinoma. *J. Med. Virol.* 37:180-86.

Li, Z., Srivastava, P.K. 1993. Tumor rejection antigen gp96/grp94 is an ATPase: implications for protein folding and antigen presentation. *EMBO J.* 12: 3143-51.

Lie, W.R., Myers, N.B., Gorka, J., Rubocki, R.J., Connolly, J.M., Hansen. 1990. Peptide ligand-induced conformation and surface expression of the Ld class I MHC molecule. *Nature* 344:439-41.

Lindahl, K.F., Byers, D.E., Dabhi, V., Hovik, R., Jones, E.P., Smith, G.P., Wang, C-R., Xiao, H., Yoshino, M. 1997. H2-M3, a full service class Ib histocompatibility antigen. *Annu. Rev. Immunol.* 15:851-79.

Livingstone, A.M., Powis, S.J., Günter, D., Cramer, D.V., Howard, J.C., Butcher, G.W. 1991. Cim: an MHC class II-linked allelism affecting the antigenicity of a classical class I molecule for T lymphocytes. *Immunogenetics* 34:157-63.

Livingstone, A.M., Powis, S.J., Diamond, A.G., Butcher, G.W., Howard, J.C. 1989. A trans-acting major histocompatibility complex-linked gene whose alleles determine gain and loss changes in the antigenic structure of a classical class I molecules. *J. Exp. Med.* 170:777-95.

Ljunggren, H.G., Stam, N.J., Öhlén, C., Neefjes, J.J., Hoglund, P., Heemels, M., Bastin, J., Schumacher, T.N.M., Townsend, A., Karre, K., Ploegh, H.L. 1990. Empty MHC class I molecules come out in the cold. *Nature* 346:476-80.

- Ljunggren, H.G., Stan, N.J., Öhlén, C., Neefjes, J.J., Höglund, P., Heemels, M-T., Bastin, J., Schumacher, T.N.M., Townsed, A., Kärre, K., Ploegh, H.L.** 1990. Empty MHC class I molecules come out in the cold. *Nature* 346:476-80.
- Löwe, J., Stock, D., Jap, B., Zwickl, P., Baumeister, W., Huber, R.** 1995. Crystal structure of the 20S Proteasome from the *Archaeon T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science* 268: 533-39.
- Lowry, P.A., Quesenberry, P.J.** 1992. Overview of haematopoiesis. In: Haematopoietic growth factors: from the basic to clinical applications. S. Symann, P.J. Quesenberry and G. Morstyn (eds). (United Kingdom: Gardiner-Caldwell Communications LTD), pp: 9-15.
- Luger, T.A., Schwarz, T.** 1990. Evidence for an epidermal cytokine network. *J. Invest. Dermatol.* 95: 100S-104S.
- Ljunggren, H.G., Stan, N.J., Öhlén, C., Neefjes, J.J., Höglund, P., Heemels, M-T., Bastin, J., Schumacher, T.N.M., Townsed, A., Kärre, K., Ploegh, H.L.** 1990. Empty MHC class I molecules come out in the cold. *Nature* 346:-80.
- Lurquin, C., van Del, A., Mariamé, B., De Plaen, E., Szikora, J.P., Janssens, C.** 1989. Structure of the gene of tum' transplantation antigen P91A: the mutated exon encodes a peptide recognized with Ld by cytolytic T cells. *Cell* 58:293-303.
- Luxton, J.C., Rowe, A., Cridland, J.C., Coletart, T., Wilson, P., Shepherd, P.S.** 1996. Proliferative T cell responses to the human papillomavirus type 16 E7 protein in women with cervical dysplasia and cervical carcinoma and in healthy individuals. *J. Gen. Virol.* 77:1585-93.
- Ma, C-P., Vu, J.H., Proske, R.J., Slaughter, C.A., DeMartino, G.N.** 1994. Identificación, purification and characterization of a high molecular weight, ATP-dependent activator (PA700) of the 20S proteasome. *J. Biol. Chem.* 269:3539-47.
- Maclennan, L.C.M.** 1994. Germinal centers. *Ann. Rev. Immunol.* 12: 117-39.
- Machold, R.P., Andrée, S., Van Kaer, L., Ljunggren, H-G, Ploegh, H.L.** 1995. Peptide influences the folding and intracellular transport of free major histocompatibility complex class I heavy chains. *J. Exp. Med.* 181:1111-22.
- Machy, P., Truneh, A.** 1989. Differential half-life of major histocompatibility complex encoded class I molecules in T and B lymphoblasts. *Mol. Immunol.* 26:287-96.
- Machy, P., Truneh, A., Gennaro, D., Hoffstein, S.** 1987. Endocytosis and the novo expression of major histocompatibility complex encoded class I molecules: kinetic and ultrastructural studies. *Eur. J. Cell Biol.* 45:126-36.
- Madden, D.R., Gorga, J.C., Strominger, J.L., Wiley, D.C.** 1992. The three-dimensional

structure of HLA-B27 at 2.1 Å resolution suggests a general mechanism for tight peptide binding to MHC. *Cell*. 70:1035-48.

Malejczyk, J., Malejczyk, M., Kock, A., Urbansky, A., Majewski, S., Hunzelmann, N., Jablonska, S., Orth, G., Luger, T.A. 1992. Autocrine growth limitation of human papillomavirus type 16-harboring keratinocytes by constitutively released tumor necrosis factor-alpha. *J. Immunol.* 149:2702-08.

Malejczyk, J., Malejczyk, M., Majewski, S., Orth, G., Jablonska, S. 1993. NK-cell activity in patients with HPV 16-associated anogenital tumors: Defective recognition of HPV16-harboring keratinocytes and restricted unresponsiveness to immunostimulatory cytokines. *Int. J. Cancer.* 54:917-21.

Malejczyk, J., Malejczyk, M., Urbansky, A., Kock, A., Jablonska, S., Orth, G., Luger, T.A. 1991. Constitutive release of IL-6 by human papillomavirus type 16 (HPV 16)- harboring keratinocytes: A mechanism augmenting the NK-cell-mediated lysis of HPV-bearing neoplastic cells. *Cell. Immunol.* 136:155-64.

Malnati, M.S., Peruzzi, M., Parker, K.C., Biddison, W.E., Ciccone, E., Moretta, A., Long, E.O. 1995. Peptide specificity in the recognition of MHC class I by natural killer cell clones. *Science* 267:1016-18.

Marchand, M., Weynants, P., Rankin, E., Arienti, F., Belli, F., Parmiani, G., Cascinelli, N., Bourlond, A., Vanwijck, R., Humblet, Y. 1995. Tumor regression responses in melanoma patients treated with a peptide encoded by genes MAGE-3. *Int. J. Cancer* 63:883-85.

Martinez, C.K., Monaco, J.J. 1991. Homology of proteasome subunits to a major histocompatibility complex-linked LMP gene. *Nature.* 353:664-67.

Marusina, K., Iyer, M., Monaco, J.J. 1997. Allelic variation in the mouse Tap-1 and Tap-2 transporter genes. *J. Immunol.* 158:5251-56.

Matlashewski, G. 1989. The cell biology of human Papillomavirus transformed cells. *Anticancer Res.* 9:1447-56.

Matsumara, M., Fremont, D.H., Peterson, P.A., Wilson, I.A. 1992. Emerging principles for recognition of peptide antigens by MHC class I molecules. *Science.* 257:927-34.

McArdle, J. P., Muller, K. 1986. Quantitative assessment of Langerhans cells in human cervical intraepithelial neoplasia and wart virus infection. *J. Am. J. Obstet. Gynecol.* 154:509-15.

McCance, D.J., Cromme, F.V., Straight, S.W., Tsao, G., Ploegh, H.L., Meijer, C.S.C.M., Walboomers, J.M.M. 1995. Expression of HPV-16 E5 protein in keratinocytes leads to post transcriptional loss of MHC-I and TAP-1. *J. Cell. Bioch. Supplement.* 194:292.

- Melian, A., Beckman, E.M., Porcelli, S.A., Brenner, M.B.** 1996. Antigen presentation by CD1 and MHC encoded class I-like molecules. *Curr. Opin. Immunol.* 8:82-8.
- Melief, C.J.M., Ofringa, R., Toes, R.E.M., Kast, M.** 1996. Peptide-based cancer vaccines. *Curr. Opin. Immunol.* 8:651-57.
- Meneses, G. F., Cos-A. Ma. T.** 1994. Evaluación de las actividades de detección y seguimiento del Cáncer Cérvicouterino en población bajo cobertura de la Secretaría de Salud. Mexico, 1992. *Rev. Inst. Nal. Cancerología.* 40, 4, 168-77.
- Möller, P., Hämmerling, G.J.** 1992. The role of surface HLA-A,B,C molecules in tumor immunity. *Cancer Surveys* 13:101-27.
- Momburg, F., Zugler, A., Harpprecht, J., Möller, P., Moldenhauer, G., Hämmerling, G.J.** 1989a. Selective loss of HLA-A or HLA-B antigen expression in colon carcinoma. *J. Immunol.* 142:352-58.
- Momburg, F., Koch, S.** 1989b. Selective loss of β 2-microglobulin RNA in human colon carcinoma. *J. Exp. Med.* 169:309-14.
- Momburg, F., Neeffes J.J., Hammerling G.J.** 1994a. Peptide Selection by MHC-encoded TAP transporters. *Curr. Opin. Immunol.* 6: 32-7.
- Momburg, F., Roelse, J., Howard, J.C., Butcher, G.W. Hammerling, G.W., Neeffes, J.J.** 1994b. Selectivity of MHC-encode peptide transporters from human, mouse and rat. *Nature.* 367: 648-51.
- Momburg, F., Roelse, J., Hammerling, G. J., Neeffes, J.J.** 1994c. Peptide size selection by the major histocompatibility complex-encoded peptide transporter. *J. Exp. Med.* 179:1613-23.
- Monaco, J.J** 1992. Major Histocompatibility complex-linked transport proteins and antigen processing. *Immunol. Res.* 11: 125-35.
- Monroy, G.A.** 1991. Citotoxicidad de linfocitos de sangre periférica sobre células provenientes de tumores de cáncer cérvico uterino en presencia de interleucina-2 recombinante humana. Tesis de Maestría en Investigación en Biología de los Sistemas Humanos. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. Diciembre.
- Monroy, G.A., Rangel C.R., Rocha, Z.L., Trejo, B.C., Dario, M.R., Weiss S.B.** 1992. Establecimiento de siete estirpes celulares provenientes de biopsias de cérvix normal y con cáncer cérvico uterino y sus diferentes contenidos y localizaciones de desmogleína 1. *Rev. Mex. Oncología.* 7: 69-76.
- Moore, M.W., Carbone, F.R., Bevan, M.J.** 1988. Introduction of soluble protein into the class I pathway of antigen processing and presentation. *Cell* 54:777-85.

- Morelli, A. E.,** Sananes, C., Di, P.G., Paredes, A., Fainboim, L. 1993. Relationship between types of human Papillomavirus and Langerhans cells in cervical condyloma and intraepithelial neoplasia neoplasia. *Am. J. Clin. Pathol.* 99:200-206.
- Moreno, R. J.** 1996. Respuesta Inmune y Mecanismos de Autoinmunidad. Ed. Limusa, México, pp: 40-45.
- Morrison, S.J.,** Uchida, N., Weissman, I.L. 1995. The biology of hematopoietic stem cells. *Annu. Rev. Dev. Biol.* 11:35-71.
- Mott, J.D.,** Pramanik, B.C., Moomaw, C.R., Afendis, S.J., DeMartino, G.N., Slaughter, C.A. 1994. PA28, an activator of the 20S proteasome, is composed of two nonidentical but homologous subunits. *J. Biol. Chem.* 269:31,466-71.
- Muller, M.,** Viscidi, R. P., Sun, Y., Guerrero, E., Hill, P. M., Shah, F., Bosch, F.X., Munoz, N., Gissmann, L., Shah, K.V. 1992. Antibodies to HPV-16 E6 and E7 proteins as markers for HPV-16-associated invasive cervical cancer. *Virology* 187:508-14.
- Muñoz, N.,** Bosch, F.X. 1997. Cervical cancer and human papillomavirus: epidemiological evidence and perspectives for prevention. *Salud Pública de México.* 39:274-82.
- Nandi, D.,** Jiang, H., Monaco, J.J. 1996. Identification of MECL-1 (LMP-10) as the third IFN-gamma-inducible proteasome subunit. *J. Immunol.* 156:2361-64.
- Nauseef, W.M.,** McCormick, S.J., Clark, R.A. 1995. Calreticulin functions as a molecular chaperone in the biosynthesis of myeloperoxidase. *J. Biol. Chem.* 270:4741-47.
- Neefjes, J.J.,** Momburg, F., Hämmerling, G.J. 1993a. Selective and ATP-dependent translocation of peptides by the MHC-encoded transporter. *Science.* 261: 769-71.
- Neefjes, L. J.,** Ploegh, H. L. 1992a. Intracellular transport of MHC class II molecules. *Immunol. Today.* 5: 179-84.
- Neefjes, J.J.,** Hämmerling, G.J., Momburg, F. 1993b. Folding and assembly of major histocompatibility complex class I heterodimers in the endoplasmic reticulum of intact cells precedes the binding of peptide. *J. Exp. Med.* 178:1971-80.
- Neefjes, J.J.,** Ploegh, H.L. 1988. Allele and locus-specific differences in cell surface expression and the association of HLA class I heavy chain with β_2 -microglobulin: differential effects of inhibition of glycosylation on class I subunit association. *Eur. J. Immunol.* 18:801-10.
- Neefjes, J.J.,** Smit, L., Gehrmann, M., Ploegh, H.L. 1992b. The fate of the three subunits of major histocompatibility complex class I molecules. *Eur. J. Immunol.* 22:1609-14.
- Neisig, A.,** Roelse, J., Sijts, A.J.A.M., Ossendorp, F., Feltkamp, M.C.W., Kast, W.M., Melief, C.J.M., Neefjes, J.J. 1995. Major differences in transporter associated with

antigen presentation (TAP)- dependent translocation of MHC class I-presentable peptides and the effect of flanking sequences. *J. Immunol.* 154: 1273-79.

Nickoloff, B.J., Basham, T.Y., Merigan, T.C., Morhenn, V.B. 1984. Antiproliferative effects of recombinant interferons on cultured human keratinocytes. *Lab. Invest.* 51: 697-701.

Niederman, G., Butz, S., Ihlenfeldt, H.G., Grimm, R., Lucchiarri, M., Hoschützky, H., Jung, G., Maier, B., Eichmann, K. 1995. Contribution of proteasome mediated proteolysis to the hierarchy of epitopes presented by major histocompatibility complex class I molecules. *Immunity.* 2: 289-99.

Nijenhuis, M., Schmitt, S., Armandola, E.A., Obst, R., Brunner, J., Hammerling, G.J. 1996a. Identification of a contact region for peptide on the TAP-1 chain of the transporter associated with antigen processing. *J. Immunol.* 156, 2186-95.

Nijenhuis, M., Hammerling, G.J. 1996b. Multiple regions of the Transporter Associated with Antigen Processing (TAP) contribute to its peptide binding site. *J. Immunol.* 157: 5467-77.

Nijman, H.W., Houbiers, J.G., Vierboom, M.P., van der Berg, S.H., Drijfhout, J.W., Kast, W.M. 1993. Identification of peptide sequences that potentially trigger HLA-A2.1-restricted cytotoxic T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 23:1215-19.

Nindl, I., Benitez-Bibriesca, L., Berumen, J., Farmanara, N., Fisher, S., Gross, G., López-Carrillo, L., Müller, M., Tommasino, N., Vázquez-Curiel, A., Gissmann, L. 1994. Antibodies against linear and conformational epitopes of the human papillomavirus (HPV) type 16 and E7 oncoproteins in sera of cervical cancer patients. *Arch. Virol.* 137:341-53.

Noessner, E., Parham, P. 1995. Species-specific differences in chaperone interaction of human and mouse histocompatibility complex class I molecules. *J. Exp. Med.* 181:327-37.

Nonnenmacher, B., Hubbert, N.L., Kirnbauer, R., Shah, K.V., Muñoz, N., Bosch, F.X., De Sanjose, S., Viscidi, R., Lowy, D.R., Schiller, J.T. 1995. Serologic response to human papilloavirus-16 virus-like particles in HPV-16+ invasive cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia grade III patients and controls from Colombia and Spain. *J. Infect. Dis.* 172:19-24.

Nossal G. 1993. Sistema Inmunitario entre la vida y la muerte. *Investigación y Ciencia.* Nov: 9-12.

Onda, T., Kanda, T., Zanma, S., Yasugi, T., Watanabe, S., Kawana, T., Ueda, K., Yoshikawa, H., Taketani, Y., Yoshiike, K. 1993. Association of the antibodies against human Papillomavirus 16 E4 and E7 proteins with cervical cancer positive for human

Papillomavirus DNA. *Int. J. Cancer*. 54:624-28.

Ong, C.K., Chan, S.Y., Campo, M.S., Fujinaga, K., Maoromara-Nazos, P., Labropoulou, V., Pfister, H., Tay, S.K., TerMeulen, J., Villa, L.L., Bernard, H.V. 1993. Evolution of human papillomavirus type 18: an ancient phylogenetic root in Africa and intratype diversity reflect coevolution with human ethnic groups. *J. Virol.* 67:6424-31.

Orlowski, M., Cardozo, C., Michaud, C. 1993. Evidence for the presence of five distinct proteolytic components in the pituitary multicatalytic components cleaving bonds on the carboxyl side of branched chain and small neutral amino acids. *Biochemistry* 32:1563-73.

Ortaldo, J.R., Mason, A.T., O'shea, J.J. 1995. Receptor-induced death in human natural killer cells: Involvement of CD16. *J. Exp. Med.* 181: 339-44.

Ortiz-Navarrete, V., Hämmerling, G.J. 1991b. Surface appearance and instability of empty H-2 class I molecules under physiological conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88:3594-97.

Ortiz-Navarrete, V., Seelig, A., Gernold, M., Frentzel, S., Kloetzel, P.M., Hämmerling, G.J. 1991a. Subunit of the '20s' proteasome encoded by the major histocompatibility complex. *Nature*. 353:662-64.

Ortmann, B., Androlewicz, M., Cresswell, P. 1994. MHC class I/β₂ microglobulin complexes associated with TAP transporters before peptide binding. *Nature*. 368:864-67.

Ortmann, B., Copeman, J., Lehner, P.J., Sadasivan, B., Herbert, J.A., Grandea, A.G., Riddell, S.R., Tampe, R., Spies, T., Trowsdale, J., Cresswell, P. 1997. A Critical role for tapasin in the assembly and function of multimeric MHC class I-TAP complexes. *Science* 277:1306-9.

Ossendorp, F., Eggers, M., Neising, A., Ruppert, T., Goettrup, M., Sijts, A., Mengede, E., Kloetzel, P.M., Neeffjes, J., Koszinowski, U.H., Melief, C.A. 1996. A single residue exchange within a viral CTL epitope alters proteasome-mediated degradation resulting in lack of antigen presentation. *Immunity* 5:115-22.

Otten, G.R., Bikoff E., Ribaldo, R.K., Kosłowski, S., Margulie, D.H., Germain, R.N. 1992. Peptide and β₂-microglobulin regulation of cell surface MHC class I conformation and expression. *J. Immunol.* 148:3723-32.

Pamer, E., Cresswell, P. 1998. Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing. *Annu. Rev. Immunol.* 16:323-58.

Pamer, E.G., Harty, J.T., Bevan, M.J. 1992. Precise prediction of a dominant class I MHC-restricted epitope of *Lysteria monocytogenes*. *Nature*. 353:852-55.

Parker, K.C., Bednarek, M.A., Hull, L.K., Utz, U., Cunningham, B., Zweerink, H.J.,

- Biddison, W.E., Coligan, J.E. 1992. Sequence motifs important for peptide binding to the human MHC class I molecule, HLA-A2. *J. Immunol.* 149:3580-87.
- Parker, K.C., Shields, M., DiBrino, M., Brooks, A., Coligan, J.E. 1995. Peptide binding to MHC class I molecules: Implications for antigenic peptide prediction. *Immunol. Res.* 14:34-57.
- Paul, W.E. 1993. Fundamental Immunology. 3a. Ed. Raven Press. N.Y. U.S.A. pp. 809-13.
- Pende, D., Accame, L., Pareti, L., Mazzocchi, a., Moretta, A., Parmiani, G., Moretta, L. 1998. The susceptibility to natural killer cell-mediated lysis of HLA class I-positive melanomas reflects the expression of insufficient amounts of different HLA class I alleles. *Eur. J. Immunol.* 28:2384-94.
- Peralta, Z.O., Sánchez, M. T., Barrera, R. R., Madrid, M. V. 1995. Estructura y función del receptor de antígeno de linfocitos T y su papel en enfermedades infecciosas. *Rev. Invest. Clin.* 48: 69-79.
- Petenpol, J.A., Stein, R.W., Moran, E., Yaciuk, P., Schlegel, R., Lyons, R.M. 1990. TGF-beta inhibition of *c-myc* transcription and growth in keratinocytes is abrogated by viral transforming proteins with pRB binding domains. *Cell* 61:777-85.
- Petersen, B.L., Petersen, C.L., Braendstrup, O., Mourtsen, S., Engel, A.M., Svane, .M., Werdeling, O. 1993. Expression of beta 2-microglobulin by premalignant epithelium. *APMIS.* 101:529-36.
- Peterson, J.R., Ora, A., Van, P.N., Helenius, A. 1995. Transient, lectin-like association of calreticulin with folding intermediates of cellular and viral glycoproteins. *Mol. Biol. Cell.* 6:1173-84.
- Peto, R., and zurHausen. 1986. Viral etiology of cervical cancer. 21 Branbury Report. Cold Spring Harbor Lab. pp:245.
- Pfister H. 1987. Papillomaviruses: General description, taxonomy and classification. In: the papovaviridae. Ed. Salzman NP, Howley P.M., New York Plenum, 1-38.
- Piccini, L.A., Mackenzie, W.A., Platzer, M., Davies, T.F. 1990. Lymphokine regulation of HLA-DR gene expression in human thyroid cell monolayers. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 64:543-54.
- Pisani, P., Parkin, D.M., Ferlay, J. 1993. Estimates of the worldwide mortality from eighteen major cancers in 1985. Implications for prevention, and projections of the future burden. *Int. J. Cancer.* 55:891-901.
- Porcelli, S.A., Morita, C.T., Brenner, M.B. 1992. CD1b restricts the response of human

CD4-8- T lymphocytes to a microbial antigen. *Nature* 360:593-97.

Powis, S.H., Mockridge, I., Kelly, A., Kerr, L.A., Glynn, R., Gileadi, U., Beck, S., Trowsdale, J. 1992. Polymorphism in a second A B C transporter gene located within the class II region of the human major histocompatibility complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:1463-67.

Powis, S.H., Tonks, S., Mockridge, I., Kelly, A.P., Bodmer, J.G., Trowsdale, J. 1993. Alleles and haplotypes of the MHC-encoded A B C transporters TAP-1 and TAP-2. *Immunogenetics* 37:373-80.

Powis, S.J., Howard, J.C., Butcher, G.W. 1991. The major histocompatibility complex class II-linked aim locus controls the kinetics of intracellular transport of a classical class I molecule. *J Exp. Med.* 173:913-21.

Prigozy, T.I., Sieling, P.A., Clemens, D., Stewart, P.L., Behar, D.M., Porcelli, S.A., Brenner, M.B., Modlin, R.L., Kronenberg, M. 1997. The mannose receptor delivers lipoglycan antigens to endosomes for presentation to T cells by CD1b molecules. *Immunity* 6:187-97.

Rajagopalan, S., Xu, Y., Brenner, M.B. 1994. J. Calnexin retains unassembled major histocompatibility complex Class I free heavy chains in the endoplasmic reticulum. *J. Exp. Med.* 180:407-12.

Raju, G.C., Thel, M., Wee, A. 1994. The expression of HLA-DR antigen in cervical neoplasia. *Cancer Detect Prev.* 18:367-73.

Rammensee, H.G., Friede, T., Stevanović. 1995. MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics*. 41:178-28.

Ratcliffe, D.R., Nolin, S.L., Cramer, E.B. 1988. Neutrophil interaction with influenza-infected epithelial cells. *Blood* 72:142-49.

Ressing, M.E., Sette, A., Brandt, R.M.P., Ruppert, J., Wentworth, P.A., Hartman, M., Oseroff, C., Grey, H.M., Melief, C.J.M., Kast, M. 1995. Human CTL epitopes encoded by human Papillomavirus type 16 E6 and E7 identified through *in vivo* and *in vitro* immunogenicity studies of HLA-A*0201-binding peptides. *J. Immunol.* 154:5934-43.

Ressing, M.E., Offringa, R., Toes, R.E.M., Ossendorp, F., de Jong, J.H., Brandt, R.M.P., Kast, W.M., Melief, C.J.M. 1996a. Immunotherapy of cancer by peptide-based vaccines for the induction of tumor-specific T cell immunity. *Immunotechnology* 2:241-51.

Ressing, M.E., Van Driel, W., Celis, E., Sette, A., Brandt, R.M.D., Hartman, M., Anholts, J.D.H., Schrevder, G.M.T. Ter Harsel, W.B., Fleuren, G.J., Trembos, B.J., Kast, W.M., Melief, C.V.M. 1996b. Occasional memory cytotoxic T-cell responses of patients with

human papillomavirus type 16-positive cervical lesions against a human leukocyte antigen-A*0201-restricted E7-encoded epitope. *Cancer Res.* 56:582-88.

Restifo, P.N., Esquivel, F., Kawakami, Y., Yewdell, J. W., Múle, J. J., Rosenberg, S. A., Bennink, J. R. 1993. Identification of human cancer deficient in antigen processing. *J. Exp. Med.* 177: 265-72.

Ristow, H.J. 1987. A major factor contributing to epidermal proliferation in inflammatory skin diseases appears to be interleukin-1 or a related protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84:1940-44.

Robey, E., Fowlkes, B.J. 1994. Selective events in T cell development thymic selection. *Annu. Rev. Immunol.* 12:265-705.

Robey, E.A., Fowlkes, B. J., Gordon, J.W., Kioussis, D., von Boehmer, H., Ramsdell, F., Axel, R. 1991. Thymic selection in CD8 transgenic mice supports an instructive model for commitment to a CD4 or CD8 lineage. *Cell.* 64:99-107.

Robbins, P.F., Kawakami, Y. 1996. Human tumor antigens recognized by T cells. *Curr. Opin. Immunol.* 8:628-36.

Rock, K.L., Gamble, S., Rothstein, L., Gramm, C., Benacerraf, B. 1991a. Dissociation of β_2 -microglobulin leads to the accumulation of a substantial pool of inactive class I MHC heavy chains on the cell surface. *Cell.* 65:611-20.

Rock, K.L., Gramm, C., Benacerraf, B. 1991b. Low temperature and peptides favor the formation of class I heterodimers on RMA-S cells at the cell surface. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88:4200-204.

Rock, K.L., Gramm, C., Rothstein, L., Clark, K., Stein, R., Dick, L., Hwang, D., Goldberg, A.L. 1994. Inhibitors of the proteasome block the degradation of the proteasome, block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell.* 78:761-71.

Roelse, J., Gromme, M., Momburg, F., Hammerling, G.J., Neefjes, J. 1994. Trimming of TAP-translocated peptides in the endoplasmic reticulum and in the cytosol during recycling. *J. Exp. Med.* 180:1591-97.

Roitt, I.M. 1991. Essential Immunology. 7th. Blackwell Scientific Publications. U.S.A. pp 35-64.

Rothbard, J.B., Taylor, W.R. 1988. A sequence pattern common to T cell epitopes. *EMBO J.* 7:93-100.

Rothbard, J.B., Geftler, M.L. 1990. Interactions between immunogenic peptides and MHC proteins. *Ann. Rev. Immunol.* 9:527-66.

- Rötzchke, O.**, Falk, K., Deres, K., Schild, H., Norda, M., Metzger, J., Jung, G., Rammensee, H.G. 1990a. Isolation and analysis of naturally processed viral peptides as recognized by cytotoxic T cells. *Nature*. 348:252-54.
- Rötzchke, O.**, Falk, K., Stevanovic, S., Jung, G., Walden, P., Rammensee, H.G. 1991. Exact prediction of a natural T cell epitope. *Eur. J. Immunol.* 21:2891-94.
- Rötzchke, O.**, Falk, K., Wallny, H.J., Faath, S., Rammensee, H.G. 1990b. Characterization of naturally occurring minor histocompatibility peptides including H-4 and H-Y. *Science*. 249:283-87.
- Rudensky, A.Y.**, Preston-Hurlburt, P., Hong, S.C., Barlow, A., Janeway, C.A. Jr. 1991. Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules. *Nature* 353:622-27.
- Rupert, J.**, Grey, H.M., Sette, A., Kubo, R.T., Sidney, J., Celis, E. 1993. Prominent role of secondary anchor residues in peptide binding to A2.1 molecules. *Cell* 74:929-37.
- Russ, G.**, Esquivel, F., Yewdell, J., Cresswell, W.P., Spies, T., Bennink, J. 1995. Assembly, intracellular localization, and nucleotide binding properties of the human peptide transporters TAP1 and TAP2 expressed by recombinant vaccinia viruses. *J. Biol. Chem.* 270:21312-18.
- Sadasivan, B.**, Lehner, P.J., Ortmann, B., Spies, T., Cresswell, P. 1996. Roles for calreticulin and a novel glycoprotein, tapasin, in the interaction of MHC class I molecules with TAP. *Immunity* 5:103-14.
- Sadovnikova, E.**, Zhu, K.J., Collins, S.M., Zhou, J., Vousden, K., Crawford, L., Beverley, P., Stauss, H.J. 1994. Limitation of predictive motifs revealed by cytotoxic lymphocyte-T epitope mapping of the human papillomavirus E7 protein. *Int. Immunol.* 6:289-96.
- Salazar-Onfray, F.**, Charo, J., Petersson, M., Freland, S., Noffz, G., Qin, Z., Blankenstein, T., Ljunggren, H.G., Kiessling, R. 1997. Down-regulation of the expression and function of the transporter associated with antigen processing in murine tumor cell lines expressing IL-10. *J. Immunol.* 159:3195-202.
- Sanda, M.G.**, Restifo, N.P., Walsh, J.C. 1995. Molecular characterization of defective antigen processing in human prostate cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 85:280-85.
- Saper, M.A.**, Bjorkman, P.J., Wiley, D.C. 1991. Refined structure of the human histocompatibility antigen HLA-A2 at 2.6 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 219:277-19.
- Scott, J.**, Dawson, J. 1995. MHC class I expression and transport in a calnexin-deficient cell line. *J. Immunol.* 155:143-48.
- Schumacher, T.N.M.**, Kantesaria, D.V., Heemels M.-T., Asthon-Rickardt P.G., Shepherd J.C., Fruh K., Yang Y., Peterson P.A., Tonegawa S., Ploegh H.L. 1994a. Peptide length

- and sequence specificity of the mouse TAP1/TAP2 translocator. *J. Exp. Med.* 179: 533-40.
- Schumacher, T.N.M.**, Kantesaria, D., Serreze, D.V., Roopenian, D.C., Ploegh, H.L. 1994b. Transporters from H-2^b, H-2^d, H-2^s, H-2^k, and H-2^{g7} (NoD/Lt) haplotype translocate similar peptides. *Proc Natl. Acad. Sci. USA.* 91:13,004-8.
- Seedorf, J.**, Scheindr, H., Shah, K., 1986a. Detection of papillomavirus Antigen and DNA in Cells and tissues. in "Viral Etiology of Cervical Cancer" 21 Branbury Report. Col. Spring Harbor Lab. pp 247.
- Seedorf, K.**, Oltersdorf, P., Kramer, G., Rowekamp, W. 1986b. Identification of early proteins of the human Papillomavirus type (HPV-16) and type 18 (HPV-18) in cervical carcinoma cells. *EMBO J.* 6:139-45.
- Seliger, B.**, Dunn, T., Schwenzer, A., Casper, J., Huber, C., Schmoll, H.J. 1997. Analysis of the MHC class Y antigen presentation machinery in human embryonal carcinomas: Evidence for deficiencies in TAP. LMP and MHC class Y expression on their upregulation by IFN- γ . *Scand. J. Immunol.* 46:625-632.
- Shawar, S.M.**, Vyas, J.M., Rodgers, J.R., Rich, R.R. 1994. Antigen presentation by major histocompatibility complex class I-B molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 12:839-80.
- Shepherd, J.C.**, Schumacher, T.N.M., Ashton-Rickardt, P.G., Imaeda, S., Ploegh, H.L. 1993. TAP1-Dependent peptide translocation *in vitro* is ATP dependent and peptide selective. *Cell* 74:577-84.
- Shepherd, P.S.**, Tran, T.T., Rowe, A.J., Cridland, J.C., Comerford, S.A., Chapman, M.G., Rayfield, L.S. 1992. T cell responses to the human papillomavirus type 16 E7 protein in mice of different haplotypes. *J. Gen. Virol.* 73:1269-74.
- Shepherd, P.S.**, Rowe, A.J., Cridland, J.C., Coletart, T., Wilson, P., Luxton, J.C. 1996. Proliferative T cell responses to human papillomavirus type 16 L1 peptides in patients with cervical dysplasia. *J. Gen. Virol.* 77(Pt.4):593-602
- Sieling, P.A.**, Chatterjee, D., Porcelli, S.A., Prigozy, T.I., Mazzaccaro, R.J., Soriano, T., Bloom, B.R., Brenner, M.B., Kronenberg, M., Brennan, P.J., Modlin, R.L. 1995. CD1-restricted T cell recognition of microbial lipoglycan antigens. *Science* 269:227-30.
- Sijts, A.J.A.M.**, Villanueva, M.S., Pamer, E.G. 1996. CTL epitope generation is tightly linked to cellular proteolysis of a *Listeria monocytogenes* antigen. *J. Immunol.* 156:1497-503.
- Siliciano, R.F.**, Soloski, M.J. 1995. MHC class I restricted processing of transmembrane proteins. Mechanism and biologic significance. *J. Immunol.* 155:2-5.
- Skipper, J.**, Stauss, H.J. 1993. Identification of two cytotoxic T lymphocyte-recognized

epitopes in the ras protein. *J. Exp. Med.* 177:1493-98.

Smith, M.E.F., Bodmer, J.C., Kelly, A.P., Trowsdale, J., Kirkland, S.C., Bodmer, W.F. 1989. Variation in HLA expression on tumors: an escape from immune response. In: Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology. Vol:LIV. pp:581-86.

Smith, J.D., Lie, W.R., Gorka, J., Kindle, C.S., Myers, N.B., Hansen, T.H. 1992. Disparate interaction of peptide ligand with nascent versus mature class I major histocompatibility complex molecules: comparisons of peptide binding alternative forms of L^d in cell lysates and the cell surface. *J. Exp. Med.* 175:191-202.

Snyder, H.L., Bacik, I., Bennink, J.R., Kearns, G., Behrens, T.W., Bachi, T., Orłowski, M., Yewdell, J.W. 1997. Two novel routes of transporter associated with antigen-processing (TAP)-independent-major histocompatibility complex class I antigen processing. *J. Exp. Med.* 186:1087-98.

Snyder, H.L., Yewdell, J.W., Bennink, J.R. 1994. Trimming of antigenic peptides in early secretory compartment. *J. Exp. Med.* 180:2389-94.

Solheim, J.C., Harris, M.R., Kindle, C.S., Hanse, T.H. 1997. Prominence of β_2 -microglobulin, class-I heavy chain conformation, and tapasin in the interactions of class-I heavy chain with calreticulin and the transporter associated with antigen processing. *J. Immunol.* 158:2236-41.

Sonnichsen, B., Fullenkrag, J., Van, P.N., Diekmann, W., Robinson, D.J., Mieskes, G. 1994. Retention and retrieval: both mechanisms cooperate to maintain calreticulin in the endoplasmic reticulum. *J. Cell. Sci.* 107:2705-17.

Spies, T., DeMars, R. 1991. Restored expression of major histocompatibility Class I molecules by gene transfer of a putative peptide transporter. *Nature.* 351:323-24.

Squier, M. K.T., John, J. C. 1994. Cell-mediated cytotoxic mechanisms. *Curr. Opin. Immunol.* 6:447-52.

Straight, S.W., Herman, B., McCance, D.J. 1995. The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 inhibits the acidification of endosomes in human keratinocytes. *J. Virology.* 69:3185-92.

Stauss, H.J., Davies, H., Sadovnikova, E., Chain, B., Horowitz, N., Sinclair, C. 1992. Induction of cytotoxic T lymphocytes with peptides in vitro: Identification of candidate T-cell epitopes in human papilloma virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:7871-75.

Steele, J.C., Stankovic, T., Gallimore, P.H. 1993. Production and characterization of human proliferative T-cell clones specific for human papillomavirus type 1 E4 protein. *J. Virol.* 67: 2799-806.

- Storey, A., Osborn, K., Crawford, L.** 1990. Co-transformation by human Papillomavirus type 6 and 11. *J. Gen. Virol.* 71: 165-171.
- Sugita, M., Brenner, M.B.** 1994. An unstable β_2 -microglobulin: Major histocompatibility complex Class I heavy chain intermediate dissociates from calnexin and then is stabilized by binding peptide. *J. Exp. Med.* 180:2163-71.
- Sugita, M., Jackman, R.M., Donselaar, E.V., Behar, S.M., Rogers, R.A., Peters, P.J., Brenner, M.B., Porcelli, S.A.** 1996. Cytoplasmic tail-dependent localization of CD1b antigen presenting molecules to MHCs. *Science* 273:349-52.
- Suh, W-K., Cohen-Doyle, M.F., Froh, K., Wang, K., Peterson, P.A., Williams, D.B.** 1994. Interaction of MCH class I molecules with the transporter associated with antigen processing. *Science.* 264: 1322-26.
- Suzich, J.A., Ghim, S.J., Palmer-Hill., White, W.I., Tamura, J.K., Bell, J.A., Newsome, J.A., Jensen, A.B., Schlegel, R.** 1995. Systemic immunization with papillomavirus L1 protein completely prevents the development of viral mucosal papillomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92:11553-57.
- Taja, C.L.G., Salcedo, V.M., Vargas, Osornio, V.A.R.** 1996. Presencia de la proteína tardía del virus del papiloma humano en tejido cervicouterino con lesiones de bajo y alto grado de malignidad. *Rev. Inst. Natl. Cancerología* 42:181-87.
- Takahashi, K., Dai, L.C., Furest, T., Biddison, W.E., Earl, P., Moss, B., Ennis, F.A.** 1991. Specific lysis of human immunodeficiency virus type 1-infected cells by a HLA-A3.1-restricted CD8 cytotoxic T-lymphocyte clone that recognizes a conserved peptide sequence within the gp41 subunit of the envelope protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:10277-81.
- Tanaka, K., Tanahashi, N., Tsurumi, C.H., Yokota, K., Shimbara, N.** 1997. Proteasomes and antigen processing. *Adv. Immunol.* 64:1-38.
- Tarpey, I, Stacey, S., Hickling, J., Dirley, H.D.L., Renton, A., Mcinod, A., Davies, D.H.** 1994. Human cytotoxic T lymphocytes stimulated by endogenously processed human papillomavirus type 11 E7 recognize a peptide containing a HLA-A2(A*0201) motif. *Immunology* 81:222-27.
- Tay, S.K., Jenkins, D., Singer, A.** 1987. Natural killer cells in cervical intraepithelial neoplasia and human papillomavirus infection. *Br. J. Obstet Gynaecol.* 94:901-906.
- Teitell, M., Holcombe, H.R., Brossay, I., Hagenbaugh, A., Jackson, M.J., Pond, L., Balk, S.P., Therhorst, C., Peterson, P.A., Kronenberg, M.** 1997. Nonclassical behaviour of the mouse CD1 class I-like molecule. *J. Immunol.* 158:2143-49.

- Thomas, D.B.,** Smith, C.A., Graham, C.M., 1996. Viral peptide specific induction of MHC class II expression by murine T cell clones. *J. Immunol.* 157:2386-94.
- Till, J.E., McCulloch, E.A.** 1961. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat. Res.* 14:213-46.
- Tindle, R.W.** 1996. Human papillomavirus vaccines for cervical cancer. *Current Opin Immunol.* 8: 643-50.
- Tindle, R.W.,** Fernando, G.J., Sterling, J.C., Frazer, I.H. 1991. A "public" T helper epitope of the E7 transforming protein of human papillomavirus 16 provides cognate help for several E7 B-cell epitopes from cervical cancer-associated human papillomavirus genotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88:5887-91.
- Torres, L.M.,** Cabrera, T., Concha, A., Oliva, M.R., Ruiz-Cabello, F., Garrido, F. 1993. HLA class-I expression and HPV-16 sequences in premalignant and malignant lesions of the cervix. *Tissue Antigens.* 41:65-71.
- Torroella-Kouri, M.,** Morsberger, S., Carrillo, A., Mohar, A., Meneses, A., Ibarra, M., Ghaffari, A.M., Solorza, G., Shah, K.V. 1998. HPV prevalence among Mexican women with neoplastic and normal cervixes. *Gynecologic Oncol.* 70: 115-120.
- Townsend, A.,** Elliot, T., Cerundulo, V., Foster, L., Barber, B., Tse, A. 1990. Assembly of MHC Class II Molecules Analysed *In Vitro.* *Cell.* 62:285-295.
- Traversari, C.,** van der Bruggen, P., Luescher, I.F., Lurquin, C., Chomez, P., Van Pel, A., De Plaen, E., Amar-Costesec, A., Boon, T. 1992. A nonapeptide encoded by human MAGE-1 is recognized on HLA-A1 by cytotoxic T lymphocytes directed against tumor antigen MZ2-E. *J. Exp. Med.* 176:1453-57.
- Trowsdale, J.,** Hanson, I., Mockridge, I., Beck, S., Townsend, A., Kelly, A. 1990. Sequences Encoded in the class II region of the MHC related to the 'ABC' superfamily of transporter *Nature.* 348: 741-44.
- Tse, D.B.,** Pernis, B. 1984. Spontaneous internalization of class I major histocompatibility complex encoded class I molecules in T lymphoid cells. *J. Exp. Med.* 159:193-207.
- Tzzy-Chou, Wu.** 1994. Immunology of the papilloma virus in relation to cancer. *Curr. Opin. Immunol.* 6: 746-54.
- Uebel, S.,** Meyer, T.H., Kraas, W., Kiente, S., Jung, G., Wiesmüller, K-H., Tampé, R. 1995. Requirements for peptide binding to the human transporter associated with antigen processing related by peptide scans and complex peptide libraries. *J. Biol. Chem.* 270: 18512-16.
- Unanue, E. R.,** Allen, P.M. 1987. The basis for the immunoregulatory role of

macrophages and other accessory cells. *Science*. 236: 551-57.

Ustrell, V., Realini, C., Pratt, G., Rechsteiner, M. 1995. Human lymphoblast and erythrocyte multicatalytic preteases: differential peptidase activities and responses to the 11S regulator. *FEBS Lett*. 376:155-58.

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

van den Eynde, B., Lethé, B., van Pel, A., De Plaen, E., Boon, T. 1991. The gene coding for a major tumor rejection antigen of tumor P815 is identical to the normal gene of synthetic DBA/2 mice. *J. Exp. Med.* 1173:1373-84.

van Endert, P. M., Riganelli, D., Greco, Giulia., Fleschhauer, K., Sidney, J., Sette, A., Bach, J-F. 1995. The Peptide-binding motif for the human Transporter Associated with Antigen Processing. *J. Exp. Med.* 182, 1883-95.

van Endert, P.M. 1996. Peptide Selection for Presentation by HLA Class I: A role for the Human Transporter Associated with Antigen Processing?. *Immunol Res.* 15: 256-79.

van Endert, P.M. 1999. Genes regulating MHC class Y processing of antigen. *Curr. Opi. Immunol.* 11:82-88.

van Furth., R. 1993. Cell biology of molecular phagocytes. In: Hemopoietic growth factors and molecular phagocytes. R. Van Furth (ed). (basel:Karger), p.1-9.

van Kaer, L., Ashton-Rickard, P.G., Eichelberg, M., Gaczynska, M., Nagashima, K., Rock, K.L., Goldberg, A.L., Doherty, P.C. Tonegawa, S. 1994. Altered peptidase and viral-specific T cell response in LMP mutant mice. *Immunity.* 1: 533-41.

Vargas-Alarcón, G., Gómez-Casado, E., Martínez-Laso, J., Granados, J., Layriasse, Z., Alegre, R., Arnaiz-Villena, A. 1997. Differences in intron 2 sequences between B*39061 and B*39062 in Amerindians: comparison with those of B*3901, B*5101 and B*52012 alleles. *Immunogenetics* 45:436-9.

Vassilakos, A., Cohendoyle, M. F., Peterson, P.A., Jackson, M. R., Williams, D.B. 1996. The molecular chaperone calnexin facilitates folding and assembly of class I histocompatibility molecules. *EMBO J.* 15: 1495-506.

Vega, M.A., Strominger, J.L. 1989. Constitutive endocytosis of HLA class I antigens requires a specific portion of the intracytoplasmic tail that shares structural features with other endocytosed molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:2688-92.

Vegh, Z., Wang, P., Vanky, F., Klein, E. 1993. Selectively down-regulated expression of major histocompatibility complex class Y alleles in human solid tumors. *Cancer Res.* 53(S10): 2416-20.

- Velders, M.P.**, Nieland, J.D., Rudolf, M.P., Loviscek, K., Weijzen, S., de Visser, K.E., Macedo, M.F., Carbone, M., Kast, M. 1998. Identification of peptides for immunotherapy of cancer. It is still worth the effort. *Crit. Rev. Immunol.* 18:7-27.
- Viac, J.**, Soler, C., Chardonnet, Y., Euvrard, S., Schmitt, D. 1993. Expression of immune associated surface antigens of keratinocytes in human papillomavirus-derived lesions. *Immunobiology* 188:392-402.
- Villa, L.L.**, Brentani, R. R. 1990. Human papillomavirus up date. *Int. J. Cancer* 48: 163-6.
- Vinitzky, A.**, Antón, L.C., Snyder, H.L., Orlowski, M., Bennink, J.R., Yewdell, J.M. 1997. The generation of MHC class I associated peptides is only partially inhibited by proteasome inhibitors: involved of non-proteasomal proteases in antigen processing?. *J. Immunol.* 159:554-64.
- Viscidi, R.P.**, Sun, Y., Tsuzaki, B., Bosch, F.X., Munoz, N., Shah, K.V. 1993. Serologic response in human Papillomavirus-associated invasive cervical cancer. *Int. J. Cancer.* 55:780-4.
- Wada, I.**, Imai, S., Kai, M., Sakane, F., Kanoh, H. 1995. Chaperone function of calreticulin when expressed in the endoplasmic reticulum as the membrane-anchored and soluble forms. *J. Biol. Chem.* 270:20298-304.
- Wallny, H.J.**, Deres, K., Faath, S., Jung, G., Van Pel, A., Boon, T., Rammensee, H.G. 1992. Identification and quantification of a naturally presented peptide as recognized by cytotoxic T lymphocytes specific for an immunogenic tumor variant. *Int. Immunol.* 4:1085-90.
- Wang, R-F.**, Rosenberg, S.A. 1996. Human tumor antigens recognized by T lymphocytes: implications for cancer therapy. *J. Leukocyte Biol.* 60:296-309.
- Wank, R.**, Meulen, J.T., Luade, J., Eberhardt, H.C., Pawlita, M. 1992. Cervical intraepithelial neoplasia, cervical carcinoma, and risk for patients with HLA-DQB1*0602.*301, *0303 alleles. *Comment in Lancet.* 342:553.
- Wank, R.**, Thomssen, C. 1991. High risk of squamous cell carcinoma of the cervix for women with HLA-DQw3. *Nature.* 352:723-24.
- Ware, F.E.**, Vasilakos, A., Peterson, P.A., Jackson, M.R., Lehrman, M.A., Williams, D.B. 1995. The molecular chaperone calnexin binds Glc1Man9GlcNAc2 oligosaccharide as an initial step in recognizing unfolded glycoproteins. *J. Biol. Chem.* 270:4697-704.
- Wei, M.L.**, Cresswell, P. 1992. HLA-A2 molecules in an antigen-processing mutant contain signal sequence derived peptides. *Nature* 356:443-46.
- Weissman, Y.L.**, Max D. C. 1993. Formación y Desarrollo del Sistema Inmunitario.

Investigación y Ciencia. Nov:12-25.

Werness, A. Bruce. 1995. Cáncer cervicouterino: en busca de una etiología infecciosa. *Contemporary Oncology*, Julio/Agosto: 13-21.

Whetton, A.D., Dexter, T.M. 1993. Influence of growth factors and substrates on differentiation of haematopoietic stem cells. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 5:1044-9.

Williams, D.B., Vassilakos, A., Suh, W.K. 1996. Peptide presentation by MHC class I molecules. *Trends Cell Biol.* 6:267-73.

Woodward, E.C., Monaco, J.J. 1995. Characterization and mapping of the gene encoding mouse proteasome subunit delta (LMP19). *Immunogenetics* 42:28-34.

Woodworth, C.D., Lichti, U., Simpon, S., Evans, C.H., Dipaolo, J. 1992. Leukoregulin and γ -interferon inhibit human papillomavirus type 16 gene transcription in human papillomavirus immortalized human cervical cells. *Cancer Res.* 52:456-63.

Woodworth, C.D., Simpson, S. 1993. Comparative lymphokine secretion by cultured normal human cervical keratinocytes, Papillomavirus-immortalized, and carcinoma cell lines. *Am. J. Pathol.* 142:1544-55.

Wright, T.C., Richart R.M. 1989. Review. Role of human Papillomavirus in the pathogenesis of genital tract warts and cancer. *Gynecologic. Onc.* 37:151-64.

Yamada, T., Wheeler, C.M., Halpern, A.L., Stewart, A.C.M., Hildesheim, A., Jenison, S.A. 1995. Human papillomavirus-16 variant lineages in United States populations characterized by nucleotide sequence analysis of the E6, L2, and L1 coding segments. *J. Virol.* 69:7743-53.

Yang, Y., Sempé, P., Peterson, P.A. 1996. Molecular mechanisms of class-I major histocompatibility complex antigen processing and presentation. *Immunol. Res.* 15:208-33.

Yang, Y., Chu, W., Geraghty, D.E., Hunt, J.S. 1996. Expression of HLA-G in human mononuclear phagocytes and selective induction by IFN-gamma. *J. Immunol.* 156:4224-31.

Yang, Y., Waters, J.B., Früh, K., Peterson, P.A. 1992. Proteasomes are regulated by interferon γ : Implications for antigen processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:4928-32.

Yewdell, J.W., Anton, L.C., Benink, J.R. 1996. Defective ribosomal products (DRiPs). A major source of antigenic peptides for MHC class I molecules?. *J. Immunol.* 157:1823-6.

Yewdell, J.W., Bennink, J.R. 1992. Cell biology of antigen processing and presentation to MHC class I molecule restricted T lymphocytes. *Adv. Immunol.* 52:1-123.

York, I A., Rock, K. L. 1996. Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. *Annu. Rev. Immunol.* 14, 369-96.

Young, A.C.M., Zhang, W., Sacchettini, J.C., Nathenson, S.G. 1995. MHC class I-peptides interactions and TCR recognition. In: Molecular mechanisms of the immunoresponse. Editors: Bodmer, W.F y Owen, M.J. De. Cold Spring Harbor Laboratory Press. PP:17-36.

Zemmour, J., Little, A.M., Schendel, D.J., Parham, P. 1992. The HLA-A,B "negative" mutant cell line C1R expresses a novel HLA-B35 allele, Wich also has a point mutation in the traslation initiation codon. *J. Immunol.* 148:1941-8.

Zhang, Q.J., Gavioli, R., Klein, G., Masucci, M.G. 1993. An HLA-A11-specific motif in nonamer peptides derived from viral and cellular proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:2217-21.

Zinkernagel, R.M., Doherty, P.C., 1979. MHC-restricted cytotoxic. T cells: studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigens determines T cell restriction-specificity, function and responsiveness. *Adv. Immunol.* 27:51-177.

Zur Hausen, H. 1991. Viruses in human cancer. *Science.* 254:1167-70.