

8

0056224



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**IDENTIFICACION DE PROTEINAS ANTIGENICAS
DE LA LINEA CELULAR MURINA H-2 DEFICIENTE,
LR4**

T E S I S

para obtener el grado de

MAESTRIA EN CIENCIAS QUIMICAS (BIOQUIMICA)

presenta

CLAUDIA MARTINEZ ANAYA

ASESOR: DR. GUILLERMO ALFARO MARTINEZ



México, D. F.

1998

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

258576



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A MI FAMILIA

A MIS AMIGOS

A LUIS

**DESEO AGRADECER SINCERAMENTE A LOS SIGUIENTES INVESTIGADORES
POR SU VALIOSA ASESORIA**

**AL DR. GUILLERMO ALFARO
NO TENGO QUE DECIR PORQUE...**

**A LOS MIEMBROS DE MI COMITE TUTORIAL
DR. JORGE VAZQUEZ RAMOS
DR. RUY PEREZ MONFORT
POR SUS SUGERENCIAS Y COMENTARIOS**

**POR ULTIMO A LOS MIEMBROS DEL JURADO POR HABERME PRESTADO
UN POCO DE SU VALIOSO TIEMPO PARA REVISAR Y CORREGIR ESTA TESIS:**

**DR. ALEJANDRO ZENTELLA
DR. LIND DIAZ DE LEON
DR. JOSE PEDRAZA
DR. PASCAL HERION
DR. CARLOS LARRALDE**

**PARA LLEVAR A CABO LOS ESTUDIOS DE MAESTRIA SE CONTO CON EL APOYO ECONOMICO
DE CONACYT MEDIANTE EL PROGRAMA DE BECAS NACIONALES**

INDICE

• ABREVIATURAS	i
• RESUMEN	ii
• INTRODUCCION	1
1. Cáncer	1
Inmunidad contra el cáncer	2
Escape de la vigilancia inmunológica	3
Antígenos tumorales	4
2. Proteínas de la membrana celular	8
Generalidades	8
Proteínas de la membrana de linfocitos T	11
Superfamilia de receptores de citocinas	11
Superfamilia de las inmunoglobulinas	12
Superfamilia de las integrinas	14
Superfamilia de lectinas tipo C	15
Superfamilia de receptores de 4 dominios transmembranales	16
Superfamilia de receptores tirosina cinasas	17
Superfamilia de fosfotirosinas fosfatasas	17
3. Antecedentes relacionados con el proyecto	20
Modelo experimental	20
• JUSTIFICACION	22
• OBJETIVOS	23
• MATERIALES Y METODOS	24
• RESULTADOS Y DISCUSION	31
Obtención del suero inmune anti-LR4	31
Detección de antígenos mediante marcaje metabólico	36
Inmunoprecipitación de extractos totales de líneas de origen T	38
Cinética de síntesis	40
Precipitación con suero adsorbido	42
Antígenos membranales	45
Marcaje de proteínas de membrana sobre células completas vivas	45
Marcaje de proteínas aisladas de la membrana plasmática	47
Análisis de proteínas no marcadas	52
Análisis de proteínas de la membrana celular	55
• CONCLUSION	61
• APENDICE	63
• BIBLIOGRAFIA	65

ABREVIATURAS

BSA	albúmina de suero bovino
IL-2	interleucina 2
TNF	factor de necrosis tumoral
INF α,β,γ	interferón α,β,γ
LIF	factor inhibidor de leucemia
TGFR	receptor de factor de crecimiento transformante
EGFR	receptor de factor de crecimiento epidérmico
LFA-1	antígeno asociado a la función del linfocito 1
GLDH	deshidrogenasa de L-glutamato
ADA	desaminasa de adenosina
5'-ND	5'-nucleotidasa
HRP	peroxidasa de rábano (horseradish peroxidase)
CPH	Complejo principal de histocompatibilidad
LTC's	linfocitos T citotóxicos
CCDA	citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos
β 2-m	β 2-microglobulina
Hsp's	proteínas de choque térmico (heat shock proteins)
ATAT's	antígenos de transplante asociados a tumores
RE	retículo endoplásmico
HPV	virus del papiloma humano (human papilloma virus)
Ig	inmunoglobulina
TCR	receptor de las células T (T cell receptor)
MEC	matriz extracelular
VLA	antígenos de expresión tardía (very late antigens)
VEA	antígenos de expresión temprana (very early antigens)
RTK's	receptores tirosina-cinasas (receptors tyrosine-kinase)
PI3K	cinasa de inositol-3-fosfato (phosphate-3-inositole kinase)
MAPK's	proteínas cinasas activadas por mitógenos (mitogen activated protein kinases)
LPS	lipopolisacárido
MMC	mitomicina C
NP40	nonidato de sodio P40
PMSF	fluoruro de fenilmetil-sulfonilo
NaN ₃	azida de sodio
PPO	2,5-difeniloxazol
DMSO	sulfóxido de dimetilo
DAB	diaminobencidina
NADH	dinucleótido de nicotinamida adenina reducido
AMP	adenosina monofosfato
FITC	isotiocianato de fluoresceína (fluorescein isitiocianate)
IFI	inmunofluorescencia indirecta

• RESUMEN

La línea celular LR4 es poco antigénica en distintas cepas de ratones para las cuales resulta mortal. Se ha considerado que la baja antigenicidad de esta línea tumoral se debe a la falta de expresión de moléculas (clase I y clase II) del complejo principal de histocompatibilidad por una serie de mutaciones en su genoma. Sin embargo, al inducir un suero inmune en conejos mediante la inyección de células LR4 se logró obtener reactividad contra una serie de líneas de origen T. Lo que indica que a pesar de ser LR4 una célula poco inmunogénica, comparte una serie de epitopes con otras células de su misma estirpe.

Mediante distintas técnicas experimentales se logró la identificación de moléculas compartidas por tres líneas de origen linfóide T, LR4, L5178Y y EL4.4. Dos antígenos, uno de 95 kd y otro de 42-43 kd se detectaron en ensayos de marcaje metabólico e inmunoprecipitación. También tres antígenos de 121, 113 y 76 kd se reconocieron en ensayos de electrotransferencia en las tres diferentes líneas celulares. Se detectó un antígeno membranal de entre 80 y 84 kd presente en las líneas LR4 y EL4.4. Se desconoce si es que se trata de una misma proteína o son formas alélicas.

Bajo las condiciones experimentales, en ninguno de los ensayos se identificaron antígenos comunes entre las líneas celulares y las células normales de timos de ratones susceptibles o resistentes al tumor. Lo que podría indicar que las proteínas detectadas son el resultado de la transformación maligna.

Se logró llevar a cabo la identificación de lo que parece ser un antígeno propio de LR4, al precipitarlo después de eliminar la reactividad del suero inmune contra L5178Y y EL4.4. Esta proteína(s) presenta un peso molecular de 86 kd, sin embargo se desconoce si se trata de un antígeno tumoral.

• INTRODUCCION

1. CANCER

Para las células en proliferación, el intervalo entre cada división está definido como ciclo celular. El ciclo celular consiste de diferentes fases temporalmente ordenadas a las que se ha llamado: G1, S, G2 y M, donde G1 y G2 son las fases de aparente reposo celular y que dividen las fases de síntesis (replicación) de DNA (S) y la división mitótica (M) (Norbury, 1992; Hunter, 1993; Sheldrick, 1993).

La progresión a través del ciclo está regulada por una compleja cascada de señales que incluyen la actividad de factores de crecimiento (Marshall, 1995), sus receptores tirosina-cinasas (Fantl, 1993; Valius, 1993), la familia de GTPasas ras (Olson, 1995; Moodie 1993), cinasas de serinas y treoninas citoplásmicas (Chuang, 1994; Pines, 1993; Draetta, 1994), y los factores de transcripción (Oliner, 1993).

Cuando alguno de los componentes reguladores sufre una activación o inactivación inadecuada puede dar como resultado la transformación de una célula normal a maligna (Shirasawa, 1993; Nevins, 1993; Lu, 1992; Prendergast, 1995; White, 1995; Hamel, 1992). La transformación maligna de algún tipo celular en el organismo conduce al desarrollo de una de varias enfermedades designadas generalmente como cáncer. La característica principal de estas enfermedades es el crecimiento celular anormal. En algunos tipos de cáncer las células malignas logran entrar en el torrente sanguíneo y asentarse para formar tumores en órganos distintos al de origen, este proceso se conoce como metástasis.

A nivel molecular, las alteraciones genéticas y sus consecuencias bioquímicas iniciadoras del desarrollo de la transformación celular no se han determinado con toda precisión. Sin embargo, se ha determinado que las radiaciones, la exposición a ciertos compuestos químicos o algunas infecciones virales son capaces de producir neoplasias malignas, al provocar una serie de cambios a nivel genético que afectan la estructura o la expresión de oncogenes y genes supresores de tumores (Levine, 1993; Melief, 1993).

Las células transformadas presentan características que las diferencian de las células normales, tales como: a) pérdida de la inhibición del crecimiento y la movilidad por contacto en

cultivos *in vitro*, b) disminución de los requerimientos de factores de crecimiento (suero) y c) pérdida de la necesidad de anclaje al sustrato (matriz extracelular (Meredith, 1993; Steven, 1994).

INMUNIDAD CONTRA EL CANCER

Se tienen evidencias de que el organismo puede reaccionar contra los cambios producidos en las células neoplásicas para reconocerlas y, de ser posible, eliminarlas mediante mecanismos inmunes (Srivastava, 1991; Urban, 1992; Melief, 1993; Cheever, 1995). Para el reconocimiento inmune celular y/o humoral de una célula tumoral las proteínas presentes en las membranas celulares son de gran importancia.

En las respuestas celulares participan linfocitos T (CD4+ o CD8+) que detectan en la membrana de las células transformadas la asociación de péptidos antigénicos derivados de productos virales, proteínas celulares mutadas o sobreexpresadas (Melief, 1993), asociados a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (CPH) (Finn, 1993). La expresión de moléculas clase I del CPH en la membrana de las células malignas les confiere la habilidad de funcionar como blancos para los linfocitos T citotóxicos (LTC's). Tanto en modelos experimentales como en padecimientos humanos se han identificado células T reactivas contra el tumor, y se piensa que es el mecanismo inmune más efectivo contra el cáncer (Pardoll, 1993; Matsumura, 1994).

En las respuestas humorales los antígenos son reconocidos por anticuerpos en su forma nativa a nivel de la membrana plasmática debido a su accesibilidad (Rettig, 1992). Los anticuerpos pueden ejecutar funciones efectoras, entre las que se encuentran la fijación del complemento (Bruggemann, 1987) y la citotoxicidad dependiente de anticuerpos (CCDA) (Davies, 1983).

Sin embargo, las respuestas inmunes por anticuerpos contra el cáncer son, en general, bajas. La detección de anticuerpos específicos contra el tumor resulta muy difícil debido a que en la mayor parte de los casos los anticuerpos generados por el organismo presentan reactividades cruzadas contra tejidos normales o irrelevantes ya que están formados por una mezcla heterogénea de anticuerpos con especificidades y funciones efectoras distintas (Chimori, 1991).

Una excepción son las estructuras altamente glicosiladas, contra las que se han detectado títulos elevados de anticuerpos específicos en algunas neoplasias humanas

(Reisfeld, 1986; Lloyd, 1989; Rodriguez-Thomas, 1995). Tal es el caso de los gangliósidos GD3, GD2, GM3 y GM2 presentes en melanomas (principalmente neuroectodérmicos) (Schulz, 1984; Hakomori, 1991; Cheresch, 1984), así como los productos del gen Muc-1 en cáncer de páncreas y mama (Jerome, 1991; Bamd, 1989).

Para la detección y caracterización bioquímica de los antígenos de la membrana se han desarrollado estrategias basadas en el uso de antisueros generados en especies diferentes inmunizadas (Mattes, 1987), anticuerpos monoclonales (Yoshinari, 1996; Garin-Chesa, 1990; Lin, 1996; Amoroso, 1996; Vijayasradhi, 1991; Fellingner, 1990), o anticuerpos monoclonales quiméricos recombinantes (Morrison, 1992).

ESCAPE DE LA VIGILANCIA INMUNOLOGICA

Además de adquirir propiedades distintas de las células normales, las células cancerosas han desarrollado una serie de mecanismos que les permiten escapar a la vigilancia inmune (ver adelante) (Tanaka, 1988; Browning, 1992; Ferrone, 1995). Estos mecanismos incluyen mutaciones o deleciones de los genes de $\beta 2$ -m, alteraciones que conducen a la falta de expresión de moléculas del MHC, disminución en el aporte de péptidos debido a la falta de actividad de las moléculas transportadoras TAP-1 y -2, que generan moléculas clase I inestables o "vacías" incapaces de ser reconocidas (Cromme, 1994). En algunos casos se ha observado que la sobreexpresión de ciertos genes como *N-myc* influyen en la disminución de moléculas clase I (Tanaka, 1988).

En tumores inducidos experimentalmente en ratones, se ha observado que en algunos casos el nivel de expresión de moléculas de clase I es variable y que esta heterogeneidad es responsable del comportamiento biológico del tumor respecto al crecimiento local y su capacidad metastásica (Algarraga, 1991).

Además de la falta de expresión de moléculas del CPH en las células transformadas, se ha determinado que otros factores les permiten evadir la vigilancia inmune o que evitan que las células efectoras lleven adecuadamente su función. En muchos casos la pobre inmunogenicidad puede deberse a la falta de expresión de las moléculas coestimuladoras por parte de la célula transformada que actúa como presentadora de antígenos. El caso más relevante está dado por las moléculas B7-1 y B7-2 que son el ligando para CD28 expresado en general en linfocitos T CD8+ y que permiten su activación citotóxica (Allison, 1995).

ANTIGENOS TUMORALES

Se ha determinado que los tumores inducidos en animales de experimentación (ratones principalmente) por diferentes medios tales como agentes carcinogénicos (metilcolantreno, benzopireno, dimetilaminoazobenceno), o radiaciones (UV), generalmente expresan antígenos propios del tumor. Estos determinantes se conocen como ATAT's (antígenos de transplantes asociados a tumores) (Algarraga, 1991; DuBois, 1986).

Se ha demostrado la presencia de ATAT's mediante los siguientes ensayos (Srivastava, 1988) :

- a) utilizando células tumorales completas tratadas con mitomicina C puede inmunizarse contra un reto de células vivas. En el caso de tumores poco inmunogénicos es posible inmunizar utilizando concentraciones crecientes de células en el huésped.
- b) en general, las células de un tipo de tumor no pueden inmunizar contra otro tumor.
- c) pueden inmunizarse pasivamente huéspedes sin tumor mediante la transferencia de células del sistema inmune o anticuerpos de ratones con tumor.

Los antígenos tumorales, que se han detectado en neoplasias de origen espontáneo, son expresados por las células de forma estable a través de diferentes pasajes de las células tanto *in vivo* como *in vitro* (Srivastava, 1988).

Los antígenos tumorales no restringen su expresión a modelos animales ya que se han logrado aislar, de pacientes, linfocitos T citotóxicos (LTC's) reactivos contra células alogénicas de diferentes neoplasias. En tumores humanos la respuesta mejor caracterizada de linfocitos T ha sido contra células de melanoma en las que se han identificado una serie de antígenos que han sido clasificados de la siguiente forma (Ikeda, 1997):

- clase 1: comprende a los antígenos codificados por los genes *MAGE1*, *MAGE3*, *BAGE*, *GAGE* y *PRAME* que se encuentran expresados en melanomas y con menor frecuencia en tumores de otros orígenes histológicos
- clase 2: contiene antígenos de diferenciación codificados por genes que se encuentran expresados únicamente en melanocitos y células de melanoma como *tirosinasa*, *Melan-A^{MART-1}*, *gp100^{Pmel17}* y *gp75^{TRP-1}*
- clase 3: incluye antígenos producidos por mutaciones puntuales en genes que se expresan ubicuamente como *MUM-1*, *CDK4*, *B-catenina* y *HLA-A2*

TABLA NO. 1
ANTIGENOS TUMORALES IDENTIFICADOS EN DIFERENTES SISTEMAS

RATON					
Antígeno	Origen	Tipo de Inmunidad	Antigenicidad	Comentario	Referencia
a) gp96 p84/86 p82 gp110	Sarcoma Meth A	Celular	Debida posiblemente a su asociación con péptidos antígenicos.	Hsp's del RE y la membrana celular Son antígenicos únicamente en células cancerosas Se consideran antígenos de rechazo	DuBois, 1986 De Leo, 1993 Udono, 1994
b) P1A	Mastocitoma P815	Celular	Sobreexpresión	No se ha encontrado expresión en precursores de líneas celulares y sólo en bajas concentraciones en el tejido adulto	Van den Eynde, 1991
c) p53 ras	Sarcoma Meth A	Celular y Humoral	Mutaciones puntuales	Son antígenos que pueden ser detectados en tumores de distintos tipos, y se consideran específicos del cáncer	Skipper, 1993
RATA					
HSN	Fibrosarcoma HSN	Humoral	?	Es un antígeno de la membrana plasmática	Léger, 1991

HUMANOS

Antígeno	Origen	Tipo de Inmunidad	Antigenicidad	Comentario	Referencia
a) MAGE-1 MAGE-3 BAGE-1 GAGE1-2 PRAME	Melanoma	Celular	Expresión desregulada	Se han encontrado también en otros tipos tumorales Se expresan sólo en células tumorales. En todas las células normales son silenciosos, excepto en el tejido testicular	Van der Bruggen, 1991 Traversari, 1992 Van der Bruggen, 1994 Boel, 1995 Ikeda, 1997
b) Tirosinasa Melan A gp100 gp75	Melanoma	Celular	Expresión desregulada	Antígenos de diferenciación celular Se expresan en los estadios tempranos de la diferenciación de melanocitos, pero no en las células ya diferenciadas	Keng, 1995 Kawakami, 1995 Wang, 1996
c) MUM-1 CDK-4 b-catenina HLA-A2	Melanoma	Celular	?	Productos de expresión ubicua pero que han sido detectados como antigénicos en el melanoma humano	Robbins, 1996 Brändle, 1996
d) Neu/erb B2 Her2/neu	Cáncer de mama y ovario	Celular y Humoral (IgG)	Amplificación génica y sobreexpresión	Receptor normal tirosina-cinasa homólogo del EGFR	Kallioniemi, 1992 Press, 1990
e) p53 ras	Diferentes orígenes	Celular y Humoral	Diferentes mutaciones puntuales	Se han detectado LTC's. Se genera protección al inyectar péptidos con la mutación contra tumores humanos. Además de los ensayos de protección en modelos murinos contra tumores humanos, se han encontrado respuestas de anticuerpos en pacientes	Yanuck, 1993

Humanos continuación

Antígeno	Origen	Tipo de Inmunidad	Antigenicidad	Comentario	Referencia
f) bcr/abl	Leucemias y linfomas	Celular y Humoral	Antigenicidad debida a la zona de fusión de la proteína quimérica	La proteína resultante de la fusión presenta actividad de tirosina-cinasa. Únicamente se expresa en células transformadas	VanDenderen, 1989
g) E6	Cáncer cervicouterino	Celular	Antígeno viral		Chen, 1992
h) Muc-1	Páncreas y mama	Celular y Humoral	Exposición de zonas proteicas por hipoglicosilación	La proteína normal altamente glicosilada se expresa normalmente en los epitelios. En el tumor el antígeno hipoglicosilado es capaz de estimular LTC's sin restricción por moléculas del CPH debido a la zona proteica repetitiva expuesta	Jerome, 1991 Bamd, 1989
i) GD2 GM2 GM3 GD3	Neuro-ectodérmico (principalmente melanomas)	Humoral principalmente	Exposición de sitios crípticos por glicosilación aberrante	De manera normal se encuentran ampliamente distribuidos en los tejidos. En el tumor se han relacionado con capacidades metastásicas por ser parte de moléculas de adhesión	Schulz, 1984 Hakomori, 1991 Cheresh, 1984

Dependiendo de la razón por la cual son antigénicas, las moléculas detectadas en los diferentes sistemas estudiados pueden pertenecer a las siguientes categorías (ver tabla no. 1):

- a) productos celulares normales sobreexpresados, como ErbB2 o P1A
- b) productos cuya expresión es anormal en ciertos tipos celulares, como la familia de genes MAGE
- c) productos celulares mutados, como p53 y ras
- d) productos virales, como E6 de papilomavirus
- e) productos de origen desconocido como las proteínas de choque térmico de los sarcomas murinos, cuya antigenicidad puede deberse a que se asocian con posibles péptidos antigénicos.

En la tabla no. 1 se presentan algunas características de ejemplos representativos de los antígenos mas estudiados hasta la fecha.

La caracterización molecular de éstos antígenos ha sido difícil debido a lo complicado que resulta obtener células o anticuerpos específicos para detectarlos; sin embargo, actualmente se han generalizado las técnicas que permiten identificarlos. Los ensayos para la identificación de estos antígenos están basados en tres tipos de enfoques principales: a) se han aislado genes mediante la transfección de cDNAs de la célula transformada en células que provocan la activación de linfocitos reactivos, b) por elución directa de los péptidos asociados a las moléculas del CPH y c) mediante el análisis de la secuencia de proteínas mutadas o sobreexpresadas en las células tumorales (Van den Eynde, 1995).

2. PROTEINAS DE LA MEMBRANA CELULAR

GENERALIDADES

Los límites entre una célula y su medio están definidos por su membrana plasmática. Las membranas celulares presentan una naturaleza anfipática dada por la doble capa fosfolipídica de la que están compuestas y que permite generar una barrera hidrofóbica impermeable para la célula al mismo tiempo que es capaz de establecer interacciones iónicas con el medio acuoso intra y extra celular. Las evidencias experimentales han permitido definir una estructura membranai en la que los grupos polares de los lípidos y las proteínas integrales se encuentran en contacto directo con los alrededores acuosos, mientras que los residuos no polares se encuentran en el interior de la estructura alejados del agua (Harrison, 1980).

Dependiendo de la razón por la cual son antigénicas, las moléculas detectadas en los diferentes sistemas estudiados pueden pertenecer a las siguientes categorías (ver tabla no. 1):

- a) productos celulares normales sobreexpresados, como ErbB2 o P1A
- b) productos cuya expresión es anormal en ciertos tipos celulares, como la familia de genes MAGE
- c) productos celulares mutados, como p53 y ras
- d) productos virales, como E6 de papilomavirus
- e) productos de origen desconocido como las proteínas de choque térmico de los sarcomas murinos, cuya antigenicidad puede deberse a que se asocian con posibles péptidos antigénicos.

En la tabla no. 1 se presentan algunas características de ejemplos representativos de los antígenos mas estudiados hasta la fecha.

La caracterización molecular de éstos antígenos ha sido difícil debido a lo complicado que resulta obtener células o anticuerpos específicos para detectarlos; sin embargo, actualmente se han generalizado las técnicas que permiten identificarlos. Los ensayos para la identificación de estos antígenos están basados en tres tipos de enfoques principales: a) se han aislado genes mediante la transfección de cDNAs de la célula transformada en células que provocan la activación de linfocitos reactivos, b) por elución directa de los péptidos asociados a las moléculas del CPH y c) mediante el análisis de la secuencia de proteínas mutadas o sobreexpresadas en las células tumorales (Van den Eynde, 1995).

2. PROTEINAS DE LA MEMBRANA CELULAR

GENERALIDADES

Los límites entre una célula y su medio están definidos por su membrana plasmática. Las membranas celulares presentan una naturaleza anfipática dada por la doble capa fosfolipídica de la que están compuestas y que permite generar una barrera hidrofóbica impermeable para la célula al mismo tiempo que es capaz de establecer interacciones iónicas con el medio acuoso intra y extra celular. Las evidencias experimentales han permitido definir una estructura membranal en la que los grupos polares de los lípidos y las proteínas integrales se encuentran en contacto directo con los alrededores acuosos, mientras que los residuos no polares se encuentran en el interior de la estructura alejados del agua (Harrison, 1980).

La membrana plasmática cumple además las funciones de regular el flujo de sustancias (iones, nutrientes, hormonas, desechos del metabolismo, etc) hacia afuera o hacia dentro de la célula mediante distintos mecanismos de transporte activo mediado por sus componentes proteicos.

Los componentes de las membranas se encuentran en una dinámica continua en la que las proteínas experimentan una alta movilidad debida a la fluidez de sus lípidos (Harrison, 1980). Un ejemplo de esta dinámica está representado por el fenómeno de agrupamiento de los receptores de antígeno de las células B o células T que al entrar en contacto con su ligando se asocian en pequeños grupos en un principio, en grupos mas grandes después y finalmente se asocian todos en un punto de la célula (McCloskey, 1986). La formación de estructuras de este tipo es dependiente de los componentes del citoesqueleto, por lo que la movilidad de las proteínas membranales parece estar regulada también intracelularmente (Kupfer, 1989).

El grado de asociación de las diferentes proteínas con la membrana varía de proteína a proteína, pero han podido establecerse los tipos más comunes de interacción (figura 1). Así, de manera general se reconocen proteínas periféricas e integrales. En el primer caso las proteínas se encuentran unidas a la superficie mediante interacciones electrostáticas de los radicales de aminoácidos con la cabezas polares de los fosfolípidos membranales (Lever, 1994). Otro tipo de asociación de proteínas periféricas con la membrana está dada por modificaciones postraduccionales en las que se les adicionan grupos hidrofóbicos, como miristoilos en residuos de glicinas amino terminales o palmitoilos en radicales alcohol y/o tiol (serina, treonina y cisteína), que les permiten establecer uniones muy estables con la membrana tanto en su cara citoplasmática como en el exterior (Casey, 1995).

Las proteínas integrales contienen regiones de aminoácidos hidrofóbicos que atraviesan la bicapa. Las estructuras energéticamente favorables para este tipo de interacción son α -hélices y estructuras- β .

Muchas de las proteínas de las membranas celulares contienen residuos de carbohidratos que se extienden hacia el medio extracelular y se ha determinado que su función se da a nivel de reconocimiento célula-célula o célula-sustrato (componentes de la matriz extracelular). En muchos casos las técnicas de detección de glicoproteínas se han llevado a cabo mediante el uso de lectinas.

FIGURA 1.
TIPOS DE INTERACCIÓN DE LAS PROTEÍNAS
CON LA MEMBRANA PLASMÁTICA

a) Proteínas integrales con dominios extramembranales

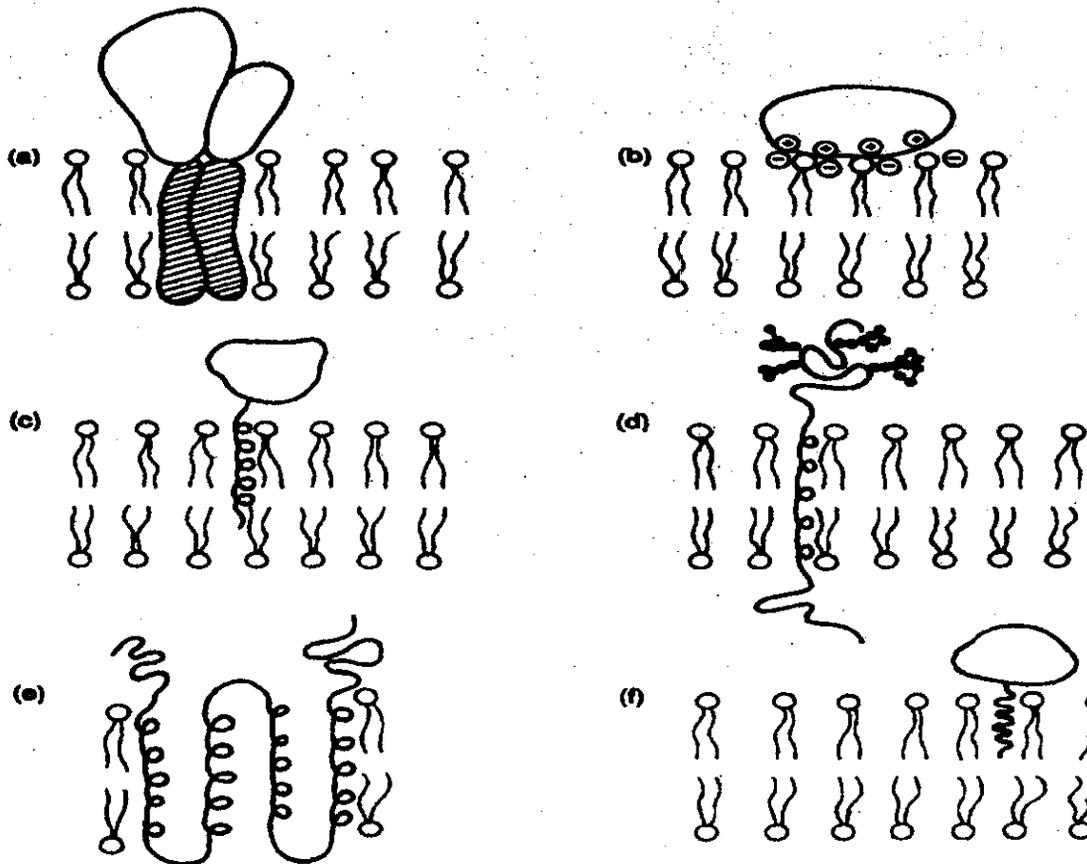
b) Proteína hidrofílica asociada a la membrana mediante interacciones electrostáticas con las cabezas polares de los fosfolípidos

c) Proteína anclada a la membrana por interacción de las cadenas de ácidos grasos y un pequeño fragmento peptídico N- o C- terminal

d) Proteínas con un único paso transmembranal hidrofóbico en alfa- hélice

e) Proteínas con múltiples pasos transmembranales en alfa-hélice

f) Proteínas ancladas a la membrana mediante la unión covalente a una cadena de ácido graso, miristato o palmitato.



El estudio de las proteínas de las membranas celulares resulta difícil debido a su naturaleza hidrofóbica ya que durante los procesos de extracción y purificación llega a perderse su estructura nativa y de ser el caso también su actividad catalítica, por lo que la clonación y el análisis de los genes que codifican a estos productos han permitido el entendimiento de su función hasta cierto grado. En muchos casos se han logrado expresar genes transitoriamente por la transfección de cDNA's de las moléculas de interés en células CHO (Wysocki, 1978), y más recientemente otros más se han aislado a través de expresiones estables mediante el uso de vectores retrovirales, con lo que se han estudiado un número de moléculas de superficie de células hematopoyéticas en el ratón (Zannettino, 1996).

PROTEINAS DE LA MEMBRANA DE LINFOCITOS T

La búsqueda de antígenos de las células neoplásicas mediante el empleo de antisueros o anticuerpos monoclonales, ha llevado a la identificación de un gran número de estructuras normales de la membrana celular (Rettig, 1992). En el caso de los linfocitos T este fenómeno no es la excepción. Para muchas moléculas identificadas se conocen ahora sus actividades definidas en los procesos de transducción de señales, adhesión y regulación del metabolismo celular. El estudio de las proteínas de la superficie de los linfocitos T ha permitido definir además las características de los diferentes estadios de su desarrollo, así como también el estado funcional (de reposo o activación) en el que se encuentran.

Un gran número de estos marcadores de superficie han sido clasificados anteponiendo la abreviatura CD seguido por un número de serie (Singer, 1994). Además, dependiendo de sus características estructurales o funcionales muchas de estas moléculas se han agrupado por familias según la tabla no. 2 (Immune Receptor Supplement; Immunol Today, oct 1996).

SUPERFAMILIA DE RECEPTORES DE CITOCINAS

Este grupo de proteínas, que son los receptores para factores extracelulares de transducción de señales, tienen participación en el metabolismo celular, promueven o inhiben la proliferación, inducen diferenciación, apoyan la sobrevivencia celular y en algunos casos inician los mecanismos de muerte (Stahl, 1993)

La mayoría de los receptores para citocinas comparten dominios estructurales en su región extracelular (figura 2), aunque difieren en el número de subunidades que los conforman. En las células T los receptores para IL-2, IL-4 e IL-7 comparten una subunidad llamada γ_c , pero presentan subunidades α y β específicas de cada uno (Ihle, 1995).

Los dominios estructurales que caracterizan a esta familia son:

- a) FIII que son dominios de fibronectina tipo III, compuestos de 2 estructuras- β plegadas de forma similar a los dominios de las inmunoglobulinas.
- b) CK son secuencias presentes en algunos miembros y que se localizan hacia el extremo amino de los dominios FIII, en ellos hay 4 cisteínas conservadas.

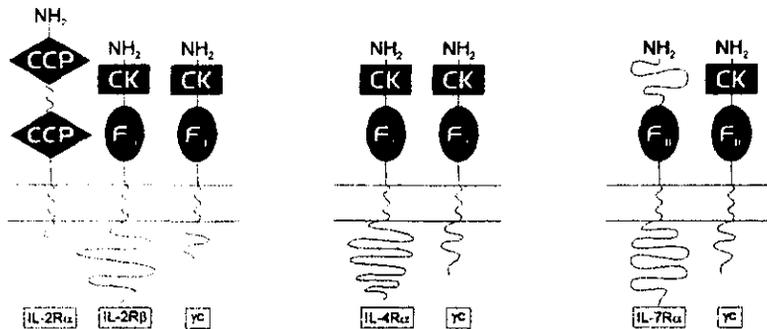


FIGURA 2. Representación esquemática de los receptores para IL-2, IL-4 e IL-7. La subunidad γ C se encuentra compartida por los tres receptores. La subunidad α del receptor para IL-2 no presenta los dominios característicos de esta superfamilia sino del tipo CCP típicos de los componentes del complemento.

SUPERFAMILIA DE LAS INMUNOGLOBULINAS

El número de receptores pertenecientes a este grupo es alto y está ampliamente distribuido en las células. Presentan una gran diversidad de funciones, pero la común para todos es la de reconocimiento célula-célula (Williams, 1988). Las funciones de adhesión de estas moléculas generan eventos subsecuentes de transducción de señales intracelulares.

El plegamiento característico de estas moléculas (figura 3) fue identificado primero en las inmunoglobulinas. Consisten de una estructura estable, formada por dos estructuras- β antiparalelas cuya interacción se estabiliza por puentes disulfuro conservados que generan asas, llamadas dominios Ig (inmunoglobulina) que pueden variar en número. Dan lugar a la estructura de reconocimiento específico del antígeno o de sus contrarreceptores celulares en interacciones homofílicas (Ig-Ig) o heterofílicas (Ig-integrina).

Según su función pueden clasificarse como sigue:

- Complejo del receptor de antígenos de células T (TCR): cadenas α , β , y las cadenas γ , δ , y ϵ del complejo CD3.
- Moléculas del complejo principal de histocompatibilidad: clase I (cadena H) y β 2-m, y clase II (cadenas α y β).
- Proteínas asociadas a la β 2-m: cadena H de TL, cadena H de Qa y cadena H de CD1a
- Moléculas de adhesión de células T: CD2, LFA-3.
- Correceptores de células T: CD4, CD8 (cadenas α y β) y CTLA4.
- Proteínas de diferenciación celular: Thy-1.

Los dominios estructurales de estas moléculas son:

- Este dominio se caracteriza por la semejanza en longitud y secuencia de la región variable entre los aminoácidos 65 y 75, y la formación de un enlace disulfuro entre ellos. Tienen la forma de estructuras- β plegada.
- Dominio que presenta semejanza en la región constante de las inmunoglobulinas y el TCR entre los aminoácidos 55 y 60, que también forman un enlace disulfuro
- Dominio homólogo entre la región constante de las inmunoglobulinas y el TCR

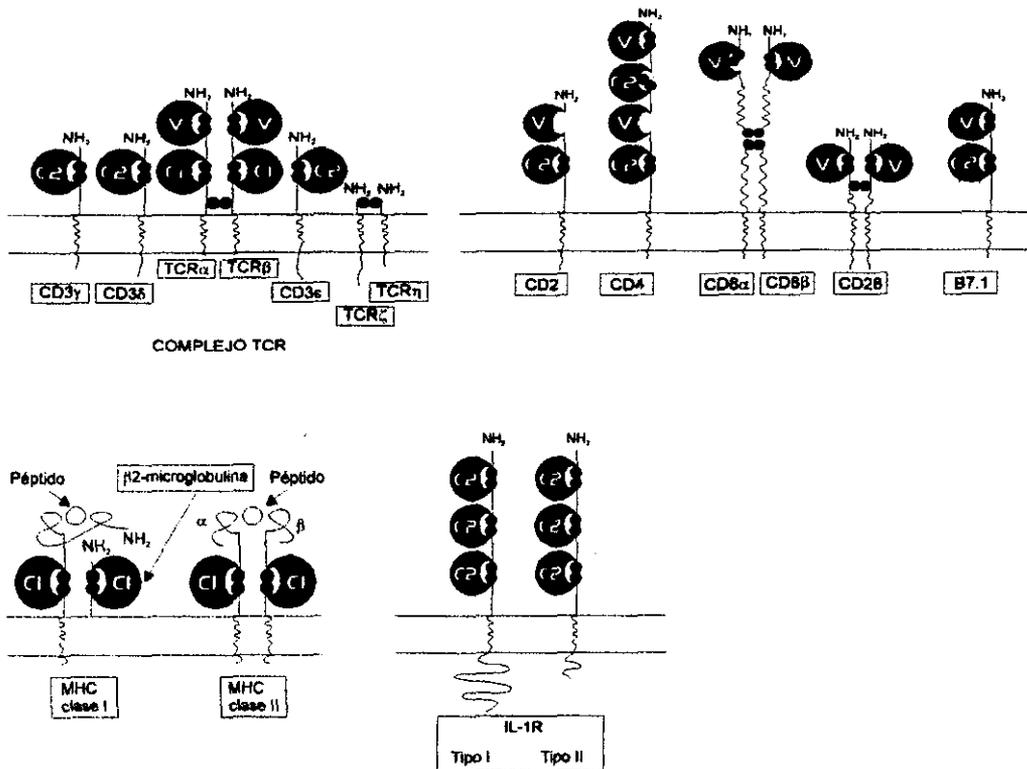


FIGURA 3. Representación esquemática de algunos miembros de la familia de las inmunoglobulinas en las que se muestran los dominios que forman las asas.

SUPERFAMILIA DE LAS INTEGRINAS

Estos receptores median interacciones célula-célula y célula-sustrato (componentes de la matriz extracelular <MEC>). Las señales generadas por estas interacciones modulan el crecimiento, diferenciación, formación de uniones y la polaridad celular. Las integrinas son moléculas heterodiméricas formadas por las subunidades α y β , asociadas no covalentemente (figura 4). Ambas subunidades son glicoproteínas integrales de la membrana celular. Los dominios extracelulares contienen la región de unión al ligando dependiente de calcio, mientras que los pequeños dominios citoplásmicos de las dos subunidades contienen regiones capaces de unir componentes del citoesqueleto.

Se ha determinado que existen al menos 8 subunidades β cada una capaz de unirse a una de diferentes subunidades α , aunque estas tienen la capacidad de unirse a más de una β a su vez (Akbelda, 1990; Mobley, 1993).

El mayor número de integrinas presentes en las células T pertenece a la subfamilia $\beta 1$ o VLA (que contiene al menos 7 receptores diferentes). Aparecen en las células T varios días después de la activación por mitógenos y funcionan como receptores para componentes de la MEC como fibronectina y laminina.

La subfamilia $\beta 2$ (LEU-CAMs o CD18) consiste de los receptores LFA-1, MAC-1 y gp150, 95. Permiten interacciones célula-célula y la adhesión a células endoteliales.

Las subfamilias $\beta 3$ y la $\beta 4$ prácticamente no se expresan en las células T. Las subfamilias $\beta 5$, $\beta 6$, $\beta 7$ y $\beta 8$ no se expresan en las células T.

Estructuralmente se componen de los siguientes dominios:

- Ca Es el dominio extracelular de unión a calcio (Ca^{2+}) presente en la subunidad α .
- C En la subunidad β se encuentran 4 secuencias repetidas ricas en cisteína.

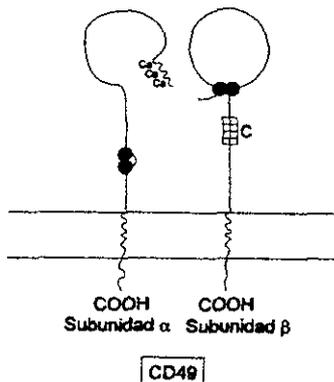


FIGURA 4. Representación esquemática de una integrina. El enlace disulfuro intracatenario del extremo amino de la subunidad β le confiere estabilidad.

SUPERFAMILIA DE LECTINAS TIPO C

Se ha reportado que el sistema inmune emplea carbohidratos como determinantes del reconocimiento en las diferentes interacciones celulares (Rosen, 1993). Se ha determinado que la familia de receptores de lectinas tipo C permite mediar una serie de interacciones célula-endotelio. Sus posibles funciones tienen que ver con la proliferación y diferenciación celulares; están involucradas en reacciones citotóxicas contra las células blanco, adhesión celular y permiten la movilidad a través de matrices que contienen hialuronato y/o a los sitios de asentamiento.

Los ligandos para lectinas, a través de sus dominios de reconocimiento, pueden ser antagonizados por carbohidratos aniónicos, tales como la manosa-6-fosfato, fructosa-1-fosfato, ceramida galactosa-3-sulfato y otros polisacáridos ricos en fucosa-6-sulfato. Se ha determinado que los requisitos estructurales de los ligandos para los receptores de lectinas deben tener ácido siálico o hialurónico.

Las selectinas son una familia de receptores de adhesión expresados en los leucocitos (L-selectinas), plaquetas (P-selectinas) y células endoteliales (E-selectinas). Todos comparten una estructura común (figura 5) que puede consistir de un extremo amino terminal con un dominio de unión a calcio, un dominio tipo EGF, varias secuencias consenso cortas repetidas similares a los de los componentes del complemento, un dominio transmembranal y una cola intracitoplásmica de tamaño variable. En esta familia existe un gran número de moléculas con el extremo carboxilo extracelular y el extremo amino intracitoplásmico.

Dominios estructurales presentes en miembros de la familia de lectinas tipo C:

- a) C-L Dominio para la unión de carbohidratos dependiente de calcio (Ca^{2+}).
- b) CCP Dominio característico de los elementos de la cascada del complemento. Su forma en general, está representada por 2 estructuras- β y una pequeña región triple de estructura β .

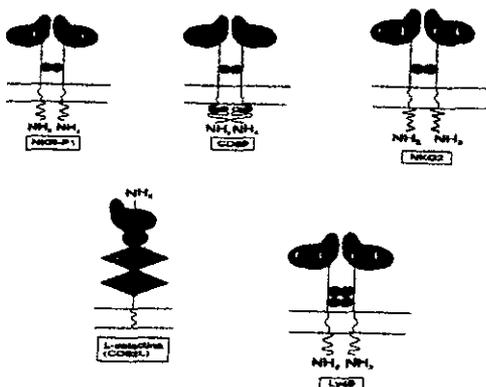


FIGURA 5. Representación esquemática del CD69, NKR-P1, NKG2, Ly49 y L-selectina.

SUPERFAMILIA DE RECEPTORES DE 4 DOMINIOS TRANSMEMBRANALES

Esta familia, recientemente descrita, comprende al menos 15 miembros expresados en diferentes tejidos. Se caracterizan por poseer 4 dominios hidrofóbicos altamente conservados que atraviesan la membrana (figura 6). Los extremos amino y carboxilo forman pequeñas colas intracitoplásmicas (de 5 a 14 aa de longitud) en contraste con los dominios extracelulares que muestran gran divergencia en términos de longitud, secuencia y grado de glicosilación (Wright, 1994). El alto grado de conservación en las regiones transmembranales es consistente con una función efectora y de transducción de señales intracelulares. La divergencia entre los dominios extracelulares de cada miembro sugiere especificidad del sitio de unión del ligando.

Una posible función de estos receptores es la de canales iónicos activados por ligando, particularmente de los del tipo de receptores para acetilcolina. Otras funciones en las que pudieran tener participación incluyen la regulación del desarrollo, proliferación, activación y movilidad celulares. Se expresan temporalmente tanto en las células T como en linfocitos B, y en ambos casos se han visto acoplados a vías de transducción de señales.

Existen otras superfamilias de moléculas con múltiples dominios transmembranales, sin embargo, el número de miembros es reducido en cada una. La figura 6 muestra además del CD9, perteneciente a la superfamilia de receptores de cuatro dominios transmembranales, un ejemplo de la superfamilia de receptores de quimiocinas y de la superfamilia EGF-TM7. El IL-8RA mostrado tiene 7 regiones transmembranales conservadas con otros miembros; se sabe que se encuentra acoplado a proteínas G triméricas intracelularmente. El CD97 perteneciente a la familia EGF-TM7 se caracteriza por presentar 7 dominios que atraviesan la membrana, y extracelularmente tiene dominios típicos del factor de crecimiento epidérmico (EGF).

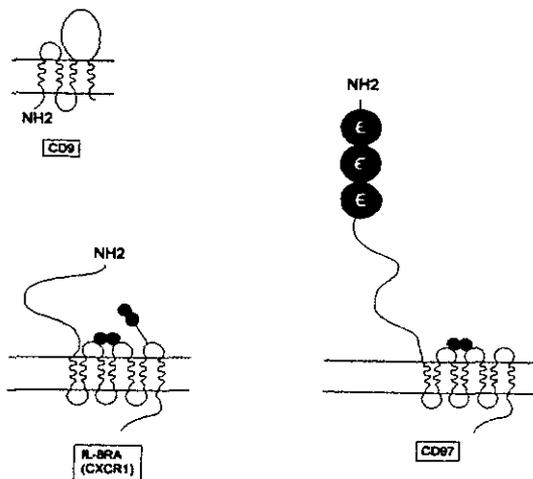


FIGURA 6. Representación de receptores con múltiples dominios transmembranales. Ejemplos de los miembros de la superfamilia de receptores de 4 dominios transmembranales son CD9, CD53, CD63, CD81 y CD82. El receptor A para IL-8 y el CD97 pertenecen a grupos distintos: superfamilia de receptores de quimiocinas y superfamilia EGF-TM7 respectivamente.

SUPERFAMILIA DE RECEPTORES TIROSINA CINASAS

Se dividen a su vez en subfamilias, cuyos miembros comparten características estructurales comunes. A pesar de la diversidad de receptores tirosina cinasas (RTKs) existe un alto grado de homología en las vías intracelulares que inician. La unión del ligando a la región extracelular del receptor activa el dominio citoplásmico con actividad de tirosina-cinasa, provocando la activación de moléculas comunes de transducción de señales que incluyen la fosfolipasa C γ , la fosfatidilinositol-3 cinasa (PI3K), proteínas activadoras de GTPasas src, ras, Raf-1 cinasa, ERK1 y ERK2 cinasas (MAPKs), S6 cinasa, involucradas en la proliferación celular.

Estructuralmente, los RTKs contienen un dominio catalítico intracitoplásmico, un dominio transmembranal, y presentan dominios extracelulares ricos en cisteína, dominios tipo inmunoglobulina, dominios ácidos y secuencias repetidas tipo III de fibronectina (figura 7) (Fanti, 1993).

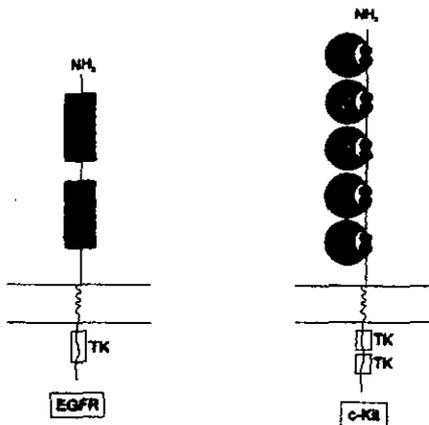


FIGURA 7. Representación esquemática de un receptor tirosina cinasa. Ejemplos de los miembros de esta familia son el receptor para el factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y c-Kit. C = dominio rico en cisteínas; TK = dominio catalítico de tirosina cinasa; Ig = dominios tipo inmunoglobulinas.

SUPERFAMILIA DE FOSFOTIROSINAS FOSFATASAS

El prototipo de esta familia de fosfatasa es PTP1B. Actualmente han sido identificados y clonados 15 receptores tipo PTPasa (entre ellos CD45). El dominio catalítico reside en la porción amino terminal que corresponde al 55% de la proteína total. Estos receptores pueden presentar uno o dos dominios catalíticos, un dominio hidrofóbico transmembranal, secuencias repetidas tipo III de fibronectina, dominios de inmunoglobulina, dominios SH2 y en la región intracelular dominios de asociación al citoesqueleto (figura 8) (Walton, 1993).

Excepto en algunos casos, aún no se ha identificado las funciones particulares de estas moléculas. Algunas PTPasas se expresan específicamente en ciertos tejidos. Otras como CD45, que se expresa en la mayor parte de las células hematopoyéticas, es sólo funcional en células T. Sin embargo, se ha observado que su regulación transcripcional depende de varios efectores celulares. Existe un incremento significativo de HePTP cuando se estimula con concanavalina A, LPS o anti CD3.

Las PTPasas han sido identificadas en las cascadas de transducción de señales a través de proteínas G triméricas y en las iniciadas por $INF\alpha$.

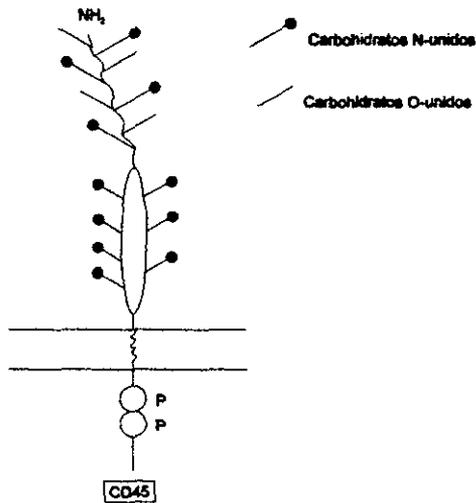


FIGURA 8. Representación esquemática de CD45. P = dominio de fosfotirosina fosfatasa. Sólo uno presenta actividad catalítica.

TABLA No. 2
 SUPERFAMILIAS DE MOLECULAS DE SUPERFICIE DE CELULAS T

SUPERFAMILIA	FUNCION	EJEMPLO	REF.
Receptores de Citocinas	Intervienen en el metabolismo. Promueven la proliferación. Inducen diferenciación, sobrevivencia o apoptosis	Receptor para IL-3; IL-5; LIF Receptores de interferones	Stahl, 1993 Ihle, 1995 Miyajima, 1992
Inmunoglobulinas	Median reconocimientos célula-célula	TCR; CD3; Moléculas de CPH	Williams, 1988
Integrinas	Permiten interacciones célula-célula o célula-sustrato Modulan el crecimiento y diferenciación	LFA-1; MAC-1; VLA; CD18	Albelda, 1990 Mobley, 1993
Selectinas	Llevan a cabo interacciones celulares o con los endotelios a través de carbohidratos como determinantes del reconocimiento	L-, E- y P-selectinas (receptores de asentamiento >homing<)	Rosen, 1993
Receptores de 4 Dominios Transmembranales	Funcionan como canales iónicos activados por ligando, regulan el desarrollo, proliferación, activación y movilidad	CD9; CD37; CD53; CD81	Wright, 1994
Receptores Tirocinas Cinasas	Transducción de señales intracelulares para crecimiento, proliferación y diferenciación	TGFR; EGFR, Receptor de insulina	Fantl, 1993
Fosfotirosinas Fosfatasas	Tienen actividades antagónicas del crecimiento y se les considera genes supresores	CD45	Walton, 1993

3. ANTECEDENTES RELACIONADOS CON EL PROYECTO

MODELO EXPERIMENTAL

La línea celular LR es una variante celular derivada del linfoma de células T, L5178Y. Este tumor se indujo químicamente con metilcolantreno en ratones DBA/2 (H-2^d). La línea celular LR4 fue seleccionada mediante la exposición a concentraciones crecientes de 5-bromodeoxiuridina, es sensible a medio HAT por una posible mutación en el gen TK. Fue seleccionada por su capacidad de crecer a través de barreras alogénicas en ratones de diferentes haplotipos (H-2k, d, b) (Nava, 1992).

El estudio de las características poco inmunogénicas de LR4 reveló una serie de mutaciones que impiden el correcto ensamblaje de las moléculas clase I y II del CPH, por lo que es incapaz de presentar antígenos para su reconocimiento por parte de las células T. Estas alteraciones reducen su antigenicidad y aumentan su capacidad para formar tumores en ratones de diferentes estirpes (Nava, 1992).

Los defectos en la expresión de moléculas del CPH están determinados por: una alta metilación de los genes de moléculas clase I; mutaciones en los genes de $\beta 2m$, de los cuales se piensa incluso que se haya perdido un alelo completo; mutaciones en IA β y ausencia de transcritos para IE α e IE β (para moléculas clase II). El rearme improductivo de la cadena β del TCR, impide que el dímero $\alpha\beta$ sea expresado en la superficie (Nava, 1992). A nivel de la expresión de los productos proteicos, en ensayos de inmunofluorescencia, se ha determinado la ausencia de los correceptores CD4, CD8, y de CD25.

La cepa de ratones C57BL/6J, sin embargo, es capaz de rechazar al tumor después de un período de crecimiento inicial. En otros casos algunos animales pueden mantener el tumor por periodos largos (mayores a 100 días) sin deterioro. Se piensa que el rechazo y/o control se debe, al menos en parte, a una respuesta inmune humoral contra el tumor, caracterizada por la presencia de anticuerpos anti-LR4, que *in vitro* son capaces de mediar la lisis celular (Nava, 1992; Verástegui, 1997).

En estudios recientes, se determinó que la capacidad de rechazo y/o control del tumor que presentan los ratones C57BL/6J es heredable y dominante. Al inocular células en ratones híbridos B6C el tumor crece durante un período y posteriormente es controlado, al menos por ciertos periodos, de la misma forma que en los ratones resistente (del Río, 1997).

La inmunidad generada presenta memoria y puede ser transferida. Al inyectar un inóculo de células vivas en ratones que han rechazado al tumor o que fueron inmunizados con células tratadas con MMC, no son capaces de crecer. Y tampoco lo hacen en ratones a los que se les ha transferido pasivamente suero inmune anti LR4 (Del Río, 1997).

• JUSTIFICACIÓN

Los modelos de tumores inducidos experimentalmente en el ratón han permitido avanzar en el entendimiento de muchos aspectos de la transformación celular. Entre los mas relevantes se encuentran: la forma en la que diferentes alteraciones tienen repercusión en el ciclo celular para favorecer la transformación maligna; y como ocurre el establecimiento, la progresión y metástasis de las células neoplásicas hacia otros tejidos y órganos.

Por otro lado han permitido establecer, hasta cierto grado, la base de los mecanismos que el organismo es capaz de generar para identificar y erradicar el tumor. En este respecto la investigación ha sido especialmente fructífera en el ámbito de la inmunología celular.

La incapacidad de los distintos tipos de respuesta celular para reconocer y destruir a la línea LR4 ha ofrecido una oportunidad para estudiar si la inducción de anticuerpos específicos puede constituir una forma de actividad antitumoral. De hecho, la estirpe de ratones C57BL/6J es capaz de inducir una respuesta humoral contra la línea en estudio y de mediar su destrucción a través de CCDA.

La razón por la que LR4 puede crecer a través de barreras alogénicas podría ser debida a su baja inmunogenicidad dada por todos los defectos de su membrana celular, además de los de las moléculas clase I y II del CPH, por lo que resulta también importante la detección de aquellas moléculas de su superficie que sean relevantes tanto para el rechazo como por su propia naturaleza tumoral. Debido a que los títulos de anticuerpos en los ratones C57BL/6J (resistentes al tumor) son bajos y en consecuencia no satisfactorios desde el punto de vista experimental, se decidió usar un modelo experimental interespecie para la identificación de proteínas de interés inmunológico de la línea LR4.

• OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Identificación de proteínas antigénicas de la línea celular de ratón H-2 deficiente, LR4

OBJETIVOS PARTICULARES

Caracterización de la capacidad discriminativa de un suero inmune de conejo anti LR4 frente a otras líneas celulares.

Determinación de los patrones de proteínas antigénicas extraídas de diferentes compartimentos celulares reconocidos por el antisuero mediante diferentes técnicas experimentales.

Determinación de algunas características bioquímicas de los antígenos reconocidos (estimación de la cinética de síntesis).

Determinación de la expresión de los antígenos identificados en LR4, en otras líneas celulares o en células normales del timo de ratones C57BL/6J y BALB/c.

• MATERIALES Y METODOS

CELULAS

* PROPAGACION *IN VIVO*

Las diferentes líneas celulares usadas en este trabajo fueron propagadas *in vivo* en la cavidad peritoneal de ratones que presentaban el haplotipo apropiado (tabla 3). El crecimiento tumoral fue monitoreado por el aumento del volumen de la cavidad abdominal, en general 5 y 8 días postransplante.

TABLA No. 3
TIPOS CELULARES MURINOS Y CEPAS DE PROPAGACION

LINEA CELULAR	ESTIRPE	HAPLOTIPO	CEPA MURINA
LR4	T	H-2 ^c	C3H y/o C57BL/6J*
L5178Y	T	H-2 ^d	BALB/c
EL4.4	T	H-2 ^b	C57BL/6J

* LR4 fue propagada en ratones H-2^k o H-2^b con el propósito de evitar la aparición de revertantes H-2^c.

* CULTIVOS *IN VITRO*

Las células se obtuvieron del líquido de ascitis de ratones portadores de una de las diferentes líneas celulares en condiciones de esterilidad y fueron lavadas 2 veces con PBS a 4°C y solución de lisis de glóbulos rojos (ACK), cuando fue necesario (Alfaro, 1992).

Los cultivos *in vitro* se hicieron en medio RPMI 1640 (GIBCO-BRL) suplementado con aminoácidos no esenciales, piruvato de sodio, antibióticos (estreptomomicina y fungizone) y 10% de suero bovino fetal (ver apéndice). Se incubaron a 37°C bajo atmósfera húmeda y 5% de CO₂.

En el caso de las líneas K562, L929 y Yac-1 se realizaron únicamente cultivos *in vitro*. Los timocitos fueron obtenidos directamente por extirpación del timo de ratones C57BL/6J de 4 semanas de edad.

* LISIS CELULAR

Los extractos celulares se obtuvieron incubando 1×10^7 células lavadas 2x en PBS en 1 ml de solución de lisis a 4°C durante 30 minutos, en presencia de detergente no iónico Nonidet P40 (NP40) e inhibidores de proteasas (PMSF, yodoacetamida, aprotinina y/o pepstatina). Debido a que este procedimiento permite la solubilización de todas las membranas celulares, a los lisados obtenidos de esta manera se les refiere en el presente trabajo como "extractos totales". Las proteínas solubles fueron separadas de los ácidos nucleicos por centrifugación a 50 000 g a 4°C durante 15 minutos (Alarcón, 1991; Alarcón 1988).

Los sobrenadantes fueron recuperados y almacenados en alícuotas a -20 y -70°C. La cuantificación de proteínas de los extractos se realizó por el método de Lowry. Las curvas estándar se prepararon con las siguientes concentraciones de BSA: 25, 50, 75, 100 y 125 µg/ml, leídas a 750 nm.

OBTENCION DE SUERO INMUNE CONTRA LR4

Se administraron 6 inyecciones intraperitoneales de 1 ml del paquete celular, (LR4 completas), semanalmente en conejos hembras de la cepa NZW. Dos semanas después de la última aplicación se sangró a blanco. El suero se clarificó por centrifugación.

INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

Se llevó a cabo con células obtenidas por cultivo *in vitro*, mediante el uso de diferentes diluciones de los sueros normal e inmune de conejo y un segundo anticuerpo comercial cabra anti-conejo marcado con fluoresceína.

Antes de la incubación con el suero de conejo, 10^6 células fueron incubadas con suero normal de cabra (1:100 en PBS) para bloquear los sitios de unión inespecífica. Todas las incubaciones se realizaron en solución BSA-Na₂S₂O₈-PBS durante una hora en hielo, con 2 lavados entre cada incubación.

Al final de las incubaciones se adicionó formaldehído al 10% en PBS para fijar las células. La intensidad de la fluorescencia se determinó por citofluorometría (EPICS COULTER, BECTON DICKINSON) a más tardar 5 días después de haber realizado la tinción.

MARCAJE METABOLICO

Los marcajes metabólicos de las diferentes líneas se realizaron con células en fase de crecimiento exponencial. Previo al pulso radiactivo las células se lavaron 2 veces en PBS y se contaron. Se resuspendieron 5×10^6 células en 1.0 ml de medio RPMI 1640 libre de metionina y cisteína suplementado (ver apéndice), (GIBCO-BRL) y se incubaron durante 15 minutos a 37°C para depletar las pozas endógenas de metionina. Después de este período de incubación las células se recolectaron y se incubaron en 1.0 ml medio RPMI 1640 libre de metionina suplementado adicionado con 50 μ Ci de L-metionina [35 S] (DUPONT). La duración del pulso varió de acuerdo con los distintos experimentos entre 15 minutos y 3 horas. Después de lo cual las células se lavaron una vez en PBS y se lisaron (Harlow, 1988).

OBTENCION DE PROTEINAS DE LA MEMBRANA PLASMATICA

Debido a la gran cantidad de células que son necesarias para la extracción de las proteínas de la membrana plasmática, las células tumorales se obtuvieron directamente del líquido de ascitis de los animales, o del timo de ratones C57BL/6J.

Las células lavadas 2x en PBS se resuspendieron adicionando un volumen equivalente de solución de cosecha y se lisaron por choque osmótico en 100 volúmenes de solución de extracción (ácido bórico-EDTA pH 10.2). El citoplasma liberado se dispersó agitando vigorosamente en vórtex durante 5 minutos. Se agregaron 8 volúmenes de solución de boratos y se continuó la agitación durante 3 minutos más. Para eliminar los restos celulares se filtró a través de 2 gasas y después se centrifugó 10 minutos a 450 g a 4°C (2500 rpm Sorval Super T 21). Se recuperó el sobrenadante y nuevamente se centrifugó 30 minutos a 1200 g a 4°C para obtener un botón rico en membranas y el citoplasma en el sobrenadante (del cual se tomó una alícuota únicamente). El botón se resuspendió en 3 volúmenes de solución salina de fosfatos y se ultracentrifugó a 24 000 g (15 500 rpm rotor SW50.1 BECKAMN) durante 1 hora a 4°C sobre un colchón de sacarosa al 35%. Las proteínas de la interfase se aspiraron cuidadosamente con una pipeta pasteur (Thom, 1977).

La concentración de proteínas en las fracciones correspondientes al citoplasma y a las membranas se cuantificó por el método de Lowry.

ACTIVIDAD 5'-NUCLEOTIDASA

El grado de enriquecimiento de proteínas de la membrana se determinó mediante la medición de la actividad enzimática de la 5'-nucleotidasa, tanto en la fracción correspondiente

al citoplasma como en la de membranas. La reacción mide el consumo de NADH en muestras que contienen la enzima (Sigma No. 265-UV).

A 26.6 μ l de muestra (fracciones citoplasmáticas o membranales) se adicionaron 400 μ l de reactivo con los sustratos (ver apéndice) previamente incubados a 30°C (temperatura óptima de actividad). Después de adquirir la temperatura de reacción (aproximadamente 3 minutos más tarde) se midió la absorbencia a 340 nm (A1), exactamente 5 minutos después se registró la absorbencia (A2). La determinación cuantitativa de la actividad se calculó como sigue:

$$\Delta A = A1 - A2$$

$$\text{Factor} = (426.6 \times 1000) / (6.22 \times 26.6 \times 5 \times 0.1)$$

donde: 426.6 = vol. total de reacción

1000 = conversión de actividad por ml a actividad por L

6.22 = absortividad milimolar de NADH a 340 nm

26.6 = volumen de muestra

5 = conversión de ΔA por 5 min a A por minuto

0.1 = longitud de la celda en cm

$$5\text{-ND (U/L)} = \Delta A \cdot \text{Factor} \cdot \text{TCF}$$

donde : TCF = factor por corrección de temperatura

(tablas)

Las actividades específicas en cada fracción se calcularon en mU/g de proteínas. Se determinó la proporción membrana/citoplasma para cada muestra. Todas la lecturas se hicieron por duplicado.

INMUNOPRECIPITACION

Para los experimentos de inmunoprecipitación (Ipp) se partió de extractos totales o fracciones membranales (ver adelante) de las distintas líneas celulares. Se tomó el equivalente a 200 cpm de los extractos celulares marcados o 300 μ g de proteínas frías y se

ajustó el volumen a 200 µl con amortiguador de lisis. Se adicionaron 2 µl de suero normal de conejo en dos incubaciones sucesivas para remover la unión inespecífica del suero (preaclara). Los complejos antígeno-anticuerpo formados fueron recolectados con 40 µl de proteína A-agarosa (GIBCO-BRL) diluida 1:2 en amortiguador de lisis por centrifugación a 3000 g durante 2 minutos y se desecharon. La precipitación específica se realizó con 1.5 µl de suero inmune (y normal como control) o 2 µl de los sueros adsorbidos. Nuevamente se recolectaron los complejos con 40 µl de proteína A-agarosa (diluida 1:2 en amortiguador de lisis) por centrifugación, y se desechó en este caso el sobrenadante. El botón precipitado se lavó 4 veces con 400 µl de las siguientes soluciones: 2x con solución de lisis, TSA y Tris.

Todas las incubaciones, con suero y/o proteína A-agarosa fueron de 1 hora a 4°C y con agitación suave.

Los antígenos reconocidos se analizaron por electroforesis en condiciones reductoras (SDS-PAGE) en geles al 7.5%. Después de la electroforesis los geles se incubaron en solución fijadora y, de ser el caso, se trataron para fluorografía y se secaron (24 horas al aire o 12 horas a 50°C) para exponerlos a placas de rayos X.

WESTERN BLOT

* TRANSFERENCIA

Las diferentes mezclas proteicas (extractos totales o fracciones celulares) se separaron por electroforesis (SDS-PAGE, 7.5%; y 30 µg de proteína por carril). Las proteínas se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa en una cámara BioRad aplicando 300 mA de corriente durante 2 horas. Posteriormente las membranas fueron lavadas y teñidas con colorante negro amido o bloqueadas con BSA al 3% en PBS a 37°C por una hora.

* REVELADO

La detección de proteínas antigénicas se realizó incubando las membranas de nitrocelulosa en presencia de los sueros inmune o normal (como control de inespecificidad) a las diluciones apropiadas durante 1 hr a 37°C y con agitación ligera. De igual forma las membranas se incubaron con el segundo anticuerpo (cabra anticonejo-biotina 1:1000) y el conjugado avidina-HRP (1:500) (ZYMED). Entre las incubaciones se realizaron 2 lavados de 5 minutos cada uno con tween 20-PBS, y se reveló usando DAB y H₂O₂ como sustratos. La reacción se detuvo con agua corriente inmediatamente después de la aparición de las bandas (Harlow, 1988).

MARCAJE RADIOACTIVO DE LAS PROTEINAS DE LA MEMBRANA PLASMATICA

* DE CELULAS COMPLETAS

Para marcar radiativamente las proteínas de la membrana plasmática en las células completas se utilizó la reacción de lactoperoxidasa que cataliza la adición de iones yoduro (^{125}I) a las cadenas laterales de los residuos tirosina en presencia de H_2O_2 .

Para evitar la endocitosis de las proteínas membranales todo el ensayo se realizó a 4°C .

La secuencia de pasos para el marcaje con yodo radiactivo se describe a continuación (Coligan, 1994):

- a) se resuspendieron 10^8 células en 1.0 ml de PBS suplementado en un tubo eppendorf
- b) a esta suspensión celular se adicionaron los siguientes reactivos uno a uno como se indica:
 1. 100 μl de lactoperoxidasa 2 mg/ml en PBS
 2. 50 μCi de $\text{Na}[^{125}\text{I}]$
 3. 25 μl de H_2O_2 0.03% (recién diluida en solución de fosfatos de sodio)
- c) se adicionaron 25 μl de H_2O_2 agitando ligeramente a intervalos de 3 minutos por 3 veces más
- d) la reacción se detuvo lavando 3 veces con KI 15 mM en PBS
- e) se determinó la viabilidad por exclusión de azul tripano
- f) se prepararon los extractos totales de las células y se analizaron por lpp y autoradiografía

* DE PROTEINAS AISLADAS DE MEMBRANA

El procedimiento experimental fue esencialmente el mismo (ver adelante) que se describió en la sección anterior. A 1.0 ml de solución de proteínas [1mg/ml] obtenidas de acuerdo al protocolo descrito en "Obtención de proteínas de la membrana plasmática", se adicionaron 10 μl de lactoperoxidasa 2 mg/ml en PBS, 50 μCi de $\text{Na}[^{125}\text{I}]$, y 4 adiciones de 5 μl de H_2O_2 0.03% a intervalos de 1 minuto; la reacción se realizó a 4°C . Para detener la reacción se agregaron 500 μl de KI 15 mM.

* CROMATOGRAFIA

Para la separación del isótopo no incorporado se filtraron las proteínas marcadas a través de una columna desechable de 15 ml (BioRad) cargada con Sephadex G25-80, preeluida con 1 ml de BSA 10 mg/ml y 30 ml de PBS a temperatura ambiente. Una vez adicionada la muestra se recolectaron 20 fracciones de 1 ml. Los picos de radiactividad se registraron en un contador de centelleo para partículas y (ABBOTT y PACKARD INSTRUMENTS) con ventana para ^{125}I , impregnando un papel filtro con 1 μl de muestra.

Las fracciones del pico de proteínas se recuperaron y se concentraron por centrifugación en tubos Centricon, con poro de exclusión de 10 kd, durante 1 h a 9500 rpm a 4°C en rotor de ángulo fijo (SS34) (Coligan, 1994).

DETERMINACION DE LOS PESOS MOLECULARES EN ELECTROFORESIS

Se realizó una mezcla de las proteínas calibradoras (COMBITHEK, BOEHRINGER MANNHEIM BIOCHEMICA): α 2-macroglobulina 170 kd, β -galactosidasa 116.4 kd, fructosa 6-fosfato cinasa 85.2 kd, glutamato deshidrogenasa 55.5 kd, aldolasa 39.2 kd y triosa fosfato isomerasa 20.1 kd, para ser usadas como marcadores de peso molecular. La mezcla de proteínas calibradoras se incubó 5 minutos a 100°C en presencia de β -mercaptoetanol y se colocó en geles de poliacrilamida al mismo tiempo que las muestras problema. En todos los casos los marcadores de peso molecular fueron teñidos con solución de azul de coomasie. El peso molecular de las proteínas problema se determinó por interpolación sobre una gráfica de log PM vs Rf de los marcadores comerciales, donde:

$$R_f = \text{distancia recorrida por la proteína (cm)} / \text{distancia del frente de corrimiento (cm)}$$

OBTENCION DEL SUERO INMUNE ANTI-LR4

Los modelos murinos en los que se han descrito respuestas inmunes contra tumores involucran, en la mayoría de los casos, la actividad de células T y/o NK (Browning, 1992). Por el contrario, la información que se tiene del rechazo de las células neoplásicas debido a la actividad de anticuerpos específicos es menos abundante (Léger, 1991; Verástegui, 1997).

Como se ha mencionado, los ratones C57BL/6J son capaces de producir una respuesta inmune humoral contra la línea tumoral LR4 (Verástegui, 1997). Se ha sugerido que los anticuerpos, tanto del suero como del líquido de ascitis, son, al menos inicialmente, responsables del rechazo. En ensayos *in vitro* de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA), se ha observado que la presencia de anticuerpos específicos es indispensable para llevar a cabo una actividad efectora contra las células tumorales. Sin embargo, el título de anticuerpos en los ratones, aunque posiblemente eficaz para el proceso de rechazo *in vivo*, es muy bajo, y en ensayos de citofluorometría, un método altamente sensible, las células tumorales son marcadas únicamente por el suero muy poco diluido o no diluido.

Para la realización de los experimentos destinados a la identificación de las moléculas con propiedades antigénicas y que pudieran ser relevantes en el reconocimiento por ratones C57BL/6J, era necesario inducir un antisuero con títulos elevados de anticuerpos contra LR4. Para este propósito se llevó a cabo la inmunización de conejos mediante inyecciones de células completas.

En la determinación del título y especificidad del antisuero se incluyeron las líneas celulares L5178Y (parental de LR4) y EL4.4 (de haplotipo H-2^b). El suero fue capaz de reconocer aún a las diluciones más altas (1:1000) a todos los tipos celulares (figura 9 y tabla 4) de manera específica ya que en todos los casos el suero normal presentó valores mínimos de reconocimiento.

**Titulación de suero inmune de conejo
contra diferentes líneas celulares de origen T**

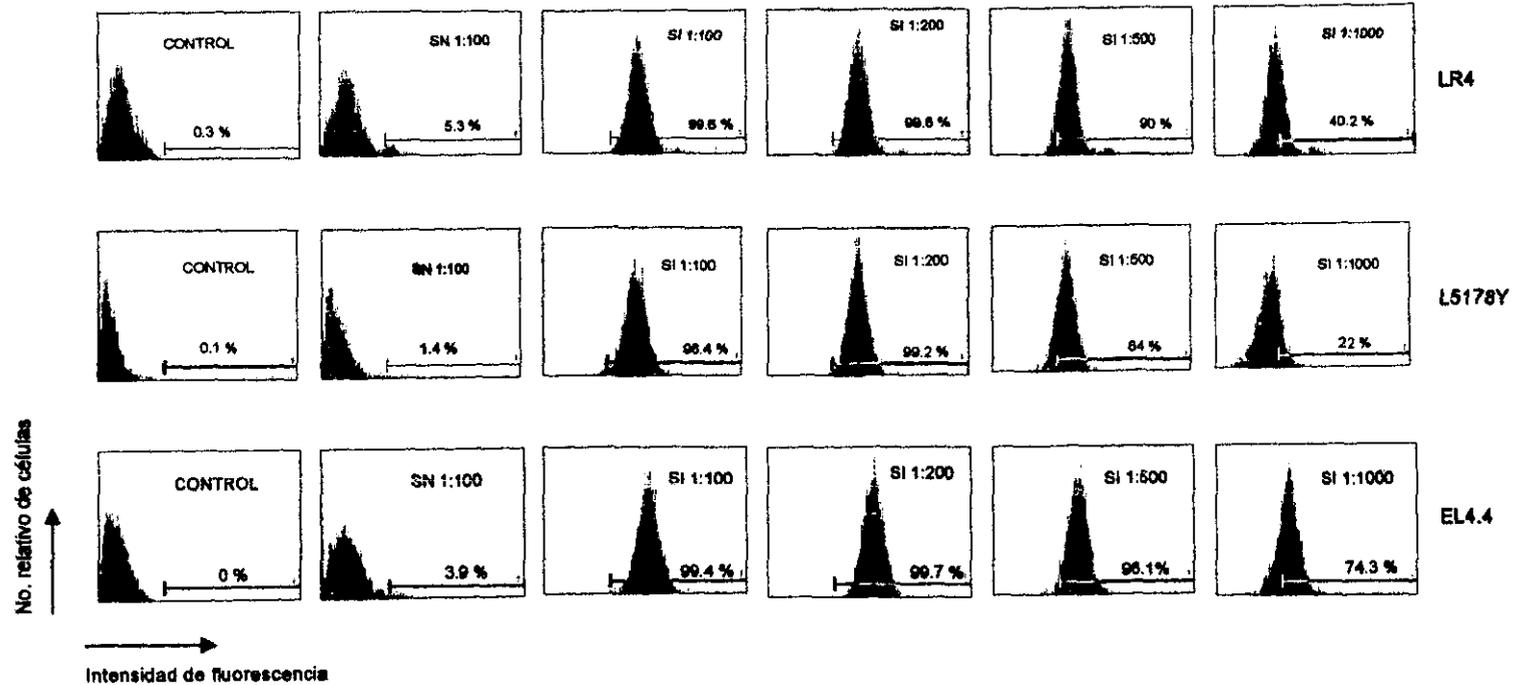


FIGURA 9. Título de suero inmune contra células de origen T. Para los ensayos de IFI fueron incubadas 1×10^6 células de cada línea con 100 μ l de suero normal (SN) ó suero inmune (SI) de conejo a las diluciones indicadas. Para cada dilución de SI se realizó una correspondiente de SN. Únicamente se muestra la dilución 1:100 para la comparación. Como control se comparó contra el mismo número de células incubadas con el segundo anticuerpo (cabra anti conejo 1:50) marcado con FITC. Los valores mostrados indican el porcentaje de positividad respecto al control.

TABLA No. 4
TITULACION DEL SUERO INMUNE ANTI-LR4 DE CONEJO
CONTRA LINEAS CELULARES DE ORIGEN T

Línea Celular	LR4		L5178Y		EL4.4	
	SN	SI	SN	SI	SN	SI
1:100	5.3	99.6	4.1	98.4	3.9	99.4
1:200	2.3	99.6	0.6	99.2	1.7	99.7
1:500	2.1	90.0	0.2	84.0	1.4	96.1
1:1000	1.1	40.2	0.2	22.0	0.6	74.3

SN: suero normal, SI: suero inmune. Los valores indican porcentaje de positividad respecto a un control de células incubadas en presencia de un anticuerpo anti conejo marcado (FITC).

Para todas las diluciones ensayadas el reconocimiento del antisuero respecto al control de suero normal es significativo, aún a la dilución más alta de 1:1000 el 40% de las células sigue siendo reconocido.

El hecho de que las células de L5178Y y de EL4.4 fueran también reconocidas y EL4.4 aún mas que LR4 en dilución 1:1000, no es sorprendente ya que todas son líneas de la misma estirpe (linfoide T) por lo que la reactividad cruzada pudiera deberse a la presencia de antígenos que compartidos debido a su origen, además de aquellos propios de la especie murina reconocidos por el conejo. La reacción mayor del suero con la línea EL4.4 podría deberse a un nivel de expresión diferente de algún o algunos antígenos compartidos entre las distintas líneas celulares.

Con estos ensayos se decidió trabajar con la dilución que permitió el reconocimiento de todas las células (1:500), por lo que en adelante todos los experimentos de este tipo se realizaron utilizando esta dilución.

En otro ensayo equivalente (figura 10 y tabla 5) se determinó que la reactividad del antisuero es mayor contra células de origen T. Al incluir a la línea linfoide T (Yac-1) a la dilución de 1:500 el reconocimiento fue del orden de los determinados para las células anteriores (99.1%). Por otra parte, contra fibroblastos de ratón (L929) y una línea humana como control de especie (K562), el reconocimiento fue significativamente menor.

Especificidad del suero inmune de conejo contra líneas celulares de diferentes estirpes

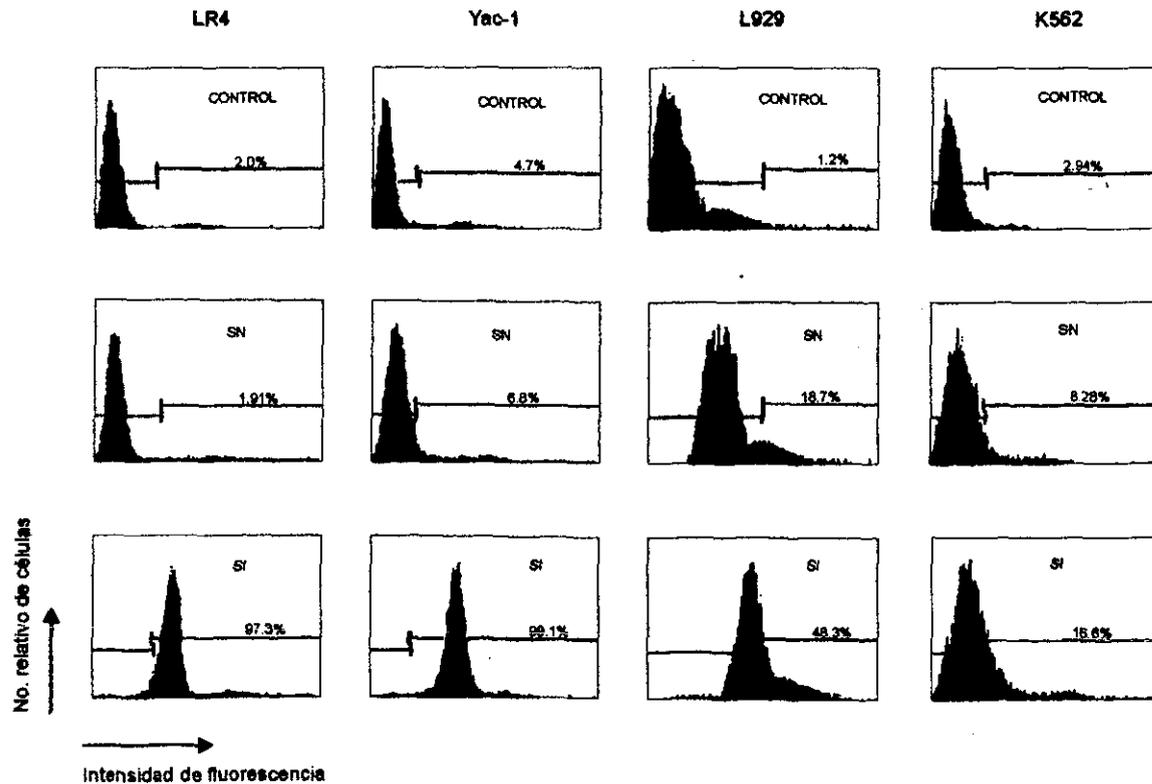


FIGURA 10. Especificidad del suero inmune contra líneas celulares de diferentes estirpes. Para este ensayo fueron incubadas 1×10^6 células de cada línea con los sueros normal (SN) e inmune (SI) de conejo a dilución de 1:500. Los resultados fueron comparados contra un control de células incubadas en presencia de un segundo anticuerpo (cabra anti conejo 1:50) marcado con FITC. Los valores indican porcentaje de positividad respecto al control.

Mediante estos ensayos se determinó que una gran parte de los anticuerpos del suero inmune de conejo reaccionan con determinantes característicos de la especie murina, sin embargo, parecen existir también anticuerpos contra determinantes propios al linaje T. Para confirmar se tendrían que haber utilizado líneas murinas de origen cercano a las células T, como por ejemplo linfocitos B. El uso de la línea L929, que tiene un origen muy distinto a LR4 (fibroblastos contra células T), en los ensayos de IFI permitió estimar el reconocimiento del suero contra la especie murina en general.

TABLA No. 5
REACTIVIDAD DEL SUERO INMUNE DE CONEJO ANTI-LR4
CONTRA LINEAS CELULARES DE DISTINTAS ESTIRPES

Línea celular	SN	SI
LR4	1.2	94.0
Yac-1	6.7	99.1
L929	18.7	48.3
K562	8.3	16.62

Los valores indican porcentaje de positividad respecto a un control de células incubadas en presencia de anticuerpo anti conejo marcado (FITC). Dilución de los sueros 1:500.

DETECCION DE ANTIGENOS MEDIANTE MARCAJE METABOLICO

Durante el proceso de transformación maligna muchas características de las células normales se modifican; entre ellas, el metabolismo celular (Mendelson, 1995). El rápido crecimiento celular implica una alta actividad metabólica, y por observaciones del laboratorio se sabe que las líneas celulares L5178Y, EL4.4 y LR4 presentan una tasa de duplicación muy acelerada, tanto *in vivo* como *in vitro*. En cultivo la línea tumoral LR4 es capaz de duplicar su número en 24 horas sin ningún factor de estimulación adicional en el medio de cultivo. *In vivo*, en la cavidad peritoneal de los ratones, la línea celular LR4 prolifera tan rápidamente que el tumor es evidente de 6 a 7 días postinoculación, siendo que la mayor parte del contenido está formado por células en suspensión.

Aprovechando la alta actividad metabólica de las líneas celulares, se llevaron a cabo cultivos en presencia del aminoácido metionina marcado con el isótopo [^{35}S]. Se depletaron las pozas de metionina endógena cultivando las células en medio libre de metionina y cisteína (ver materiales y métodos). Con un pulso de 3 horas en medio con metionina marcada con el isótopo [^{35}S], se logró obtener un patrón de incorporación a las proteínas de síntesis activa muy similar para las 3 líneas marcadas (Fig. 11).

La marca se incorporó a proteínas con pesos moleculares entre los 20 y hasta más de 200 kd. Una serie de proteínas de entre 25 y 100 kd presentan una alta intensidad de marca incorporada debida a su rápida síntesis durante el pulso.

A partir de estos extractos "preaclarados" (ver materiales y métodos) se realizaron ensayos de inmunoprecipitación (ipp), utilizando el antisuero de conejo y el suero preinmune como control de precipitación inespecífica. Inicialmente se realizaron inmunoprecipitaciones de extractos de LR4 únicamente; la figura 12(a) muestra un experimento representativo del patrón de bandas reconocidas por los sueros normal e inmune. Las movilidades relativas (Rf) de las 3 bandas principales son 0.31, 0.39 y 0.61, que corresponden a 95, 86 y 42-43 kd, respectivamente.

Estos resultados se reprodujeron en diferentes ocasiones, sin embargo, al sobreexponer la placa de autorradiografía por largos periodos (no mostrado), parece ser precipitado el antígeno de 95 kd también con el suero normal.

Un fenómeno que se observó en diferentes experimentos fue que la movilidad de la proteína(s) reconocida(s) en carril del suero normal y que parece corresponder a la de 42-43 kd en el carril del antisuero, es ligeramente menor. La diferencia de movilidad entre ambas bandas podría

Extracto celular Total (NP40)

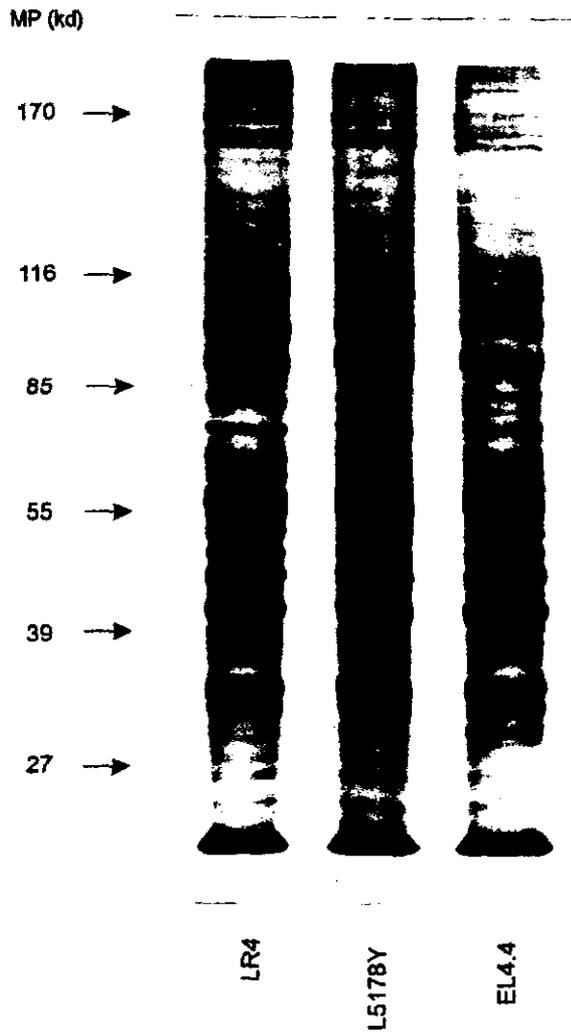


FIGURA 11. Marcaje metabólico de líneas celulares de origen T. Los cultivos celulares de LR4, L5178Y y EL4.4 fueron depletados de sus pozas intracelulares de metionina por incubación en medio libre de metionina y cisteína durante 15 minutos. A cada cultivo se dio un pulso de 3 horas con 50 μ Ci de metionina [35 S] por cada 10^7 células. Los extractos totales se obtuvieron al incubar las células en solución de lisis (NP40). Las proteínas marcadas fueron visualizadas por fluorografía en geles (SDS-PAGE) al 7.5%. MP = marcador de peso.

deberse a: a) que se trata de proteínas diferentes con movilidades muy parecidas; b) que es un sólo antígeno no específico; c) que la banda precipitada por el suero inmune está formada por dos antígenos, de los cuales el de mayor peso molecular es inespecífico y es precipitado por el suero normal; d) que es la misma proteína que por tener alguna modificación postraducciona permite ser mejor reconocida por el suero inmune. Un caso sería el nivel de glicosilación. Existen reportes de que las proteínas hipoglicosiladas expresadas en cáncer pueden comportarse como antígenos fuertes, ya que la parte proteica expuesta de manera anormal genera inmunidad (Jerome, 1991). Este hecho explicaría que la banda se vea intensamente en el carril inmune debido a que una mayor cantidad está siendo reconocida y precipitada. Por otro lado, la menor movilidad de la banda reconocida por el suero normal podría deberse a que el antígeno se encuentra en su forma glicosilada y por lo tanto tendría un peso molecular ligeramente mayor.

Para comprobar esto último, los lisados de LR4 se incubaron en presencia de la enzima endoglicosidasa H capaz de digerir residuos de carbohidratos N-unidos entre residuos de N-acetilglucosamina. Para los experimentos de digestión se partió de una pequeña cantidad de extracto total, conformado por una compleja mezcla de proteínas. La placa de ipp de los extractos digeridos no muestra diferencias entre los controles sin enzima y los problema. Tampoco hubo diferencia entre los sueros normal e inmune (no mostrado). Una posible explicación sería que se logró escalar el experimento para trabajar con una mezcla de proteínas, por lo que la enzima pudo haber sido ocupada para digerir una serie de proteínas irrelevantes. Podría ocurrir también que la diferencia de movilidades se deba no a la presencia de residuos N-unidos sino O-unidos que no son reconocidos por la enzima utilizada, o alguna otra modificación postraducciona.

IMMUNOPRECIPITACION DE EXTRACTOS TOTALES DE LINEAS DE ORIGEN T

Al precipitar los extractos de las líneas LR4, L5178Y y EL4.4, se obtuvo el patrón de precipitación mostrado en la figura 12(b). Las bandas de 95 y de 42-43 kd detectadas en LR4 se observan también, aunque con menor intensidad. Esta diferencia de intensidades de las bandas de 95 y 42-43 kd en L5178Y y EL4.4 podría deberse a una menor incorporación secundaria a una síntesis mas baja, ya que para todos los experimentos se partió de la misma cantidad de proteínas o un número igual de cpm. Las bandas que se observan tenuemente en el carril de suero inmune se reconocieron por el suero preinmune al sobreexponer la placa, por lo que no se consideraron como específicas.

La intensidad de la banda de 86 kd de LR4 fue menor en estos experimentos pudiendo ser consecuencia de un alto recambio (ver adelante). Esta proteína(s) no parece(n) ser precipitada(s) a partir de los extractos de L5178Y ni de EL4.4.

Inmunoprecipitación a partir de extractos celulares de Líneas de Origen T

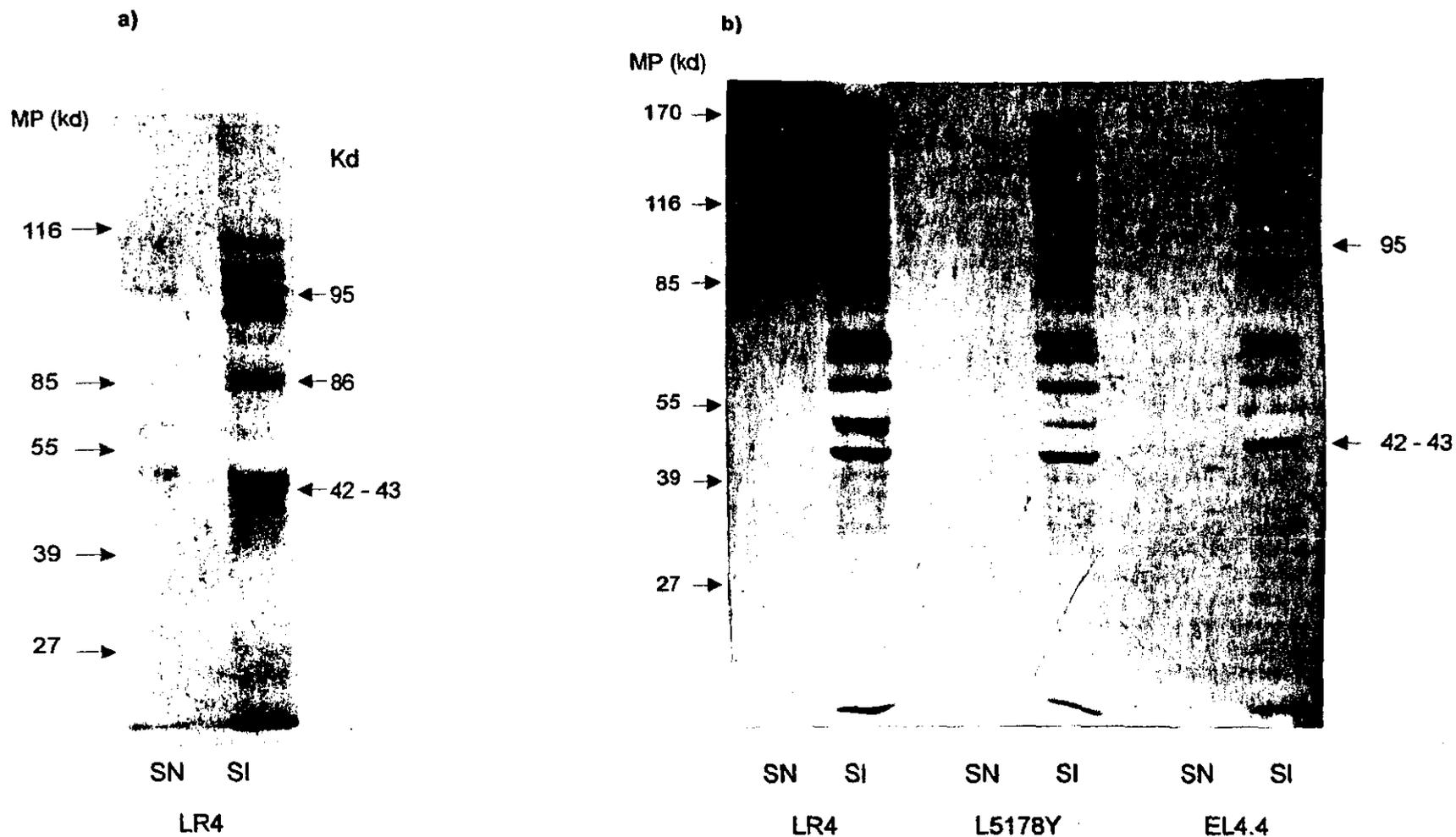


FIGURA 12. Inmunoprecipitación de extractos totales de líneas celulares de origen T. A partir de 200 μ l de extracto "preaclarado" de LR4 (a) (ver materiales y métodos), se realizó una inmunoprecipitación con suero inmune de conejo (SI) o con suero normal (SN); el panel (b) presenta una inmunoprecipitación a partir de extractos de las líneas LR4, L5178Y y de EL4.4 en las mismas condiciones que en (a). MP = marcador de peso.

CINETICA DE SINTESIS

Tomando en cuenta la alta actividad metabólica de LR4, se pensó que se podrían detectar diferencias en la síntesis de proteínas antigénicas con pulsos radiactivos de duración variable. Se realizaron experimentos de cinética de síntesis de las proteínas a lo largo de diferentes intervalos y su detección por inmunoprecipitación.

En una fase inicial las células se cultivaron *in vitro* durante 24 hrs. Posteriormente se dieron pulsos de 15, 30, 60, 90 y 180 minutos con metionina- ^{35}S . La figura 13(a) muestra la intensidad de las bandas de proteínas que incorporaron el aminoácido radiactivo. A los 15 minutos las proteínas que se encuentran sintetizándose más activamente presentan altos pesos moleculares. La intensidad de las bandas marcadas aumenta al aumentar el tiempo del pulso, siendo máxima a las 3 horas.

Se realizó la precipitación de los extractos obtenidos a diferentes tiempos con los sueros inmune y normal. La figura 13(b) muestra los resultados de estos experimentos. Para cada carril de suero inmune hubo uno correspondiente de suero normal; sin embargo, únicamente se muestra el de 180 minutos que es el de mayor intensidad y que facilita la comparación (el patrón de bandas es similar en los casos no mostrados, únicamente es distinto en la intensidad de las mismas).

Se puede sugerir que los antígenos de 95 y 42-43 kd se sintetizan activamente debido que pueden ser observados con 15 minutos de pulso. Ambos aumentan su intensidad a medida aumenta el tiempo de marcaje.

El antígeno de 86 kd se observa también desde los 15 minutos de pulso, siendo aún más evidente que los otros 2. Se observa que este antígeno se ha sintetizado más a medida que se aumenta el tiempo de pulso, y llega a ser máximo a los 90 minutos. Su intensidad disminuye a los 180 minutos (3 hrs), y aparece como una banda de tamaño ligeramente menor. Esto podría sugerir que esta proteína está siendo sintetizada a gran velocidad, ya que puede ser visualizada con un pulso de tan sólo 15 minutos, o que en el suero inmune existe un gran número de anticuerpos contra ella. En anteriores experimentos de ipp de extractos de LR4 marcados por 3 horas el aspecto de este antígeno es muy similar al observado en este experimento de cinética de síntesis, aumenta su concentración y disminuye con 3 horas de cultivo. Una probable explicación sería que este antígeno sufre de un alto recambio, sin embargo, al haber trabajado con cultivos celulares asincrónicos no permite determinar con exactitud el recambio real de esta(s) proteína(s). Otra posible explicación sería que para ser sintetizado este antígeno requiere de algún factor (cisteína por ejemplo) que, después de 3 horas, se agota en el medio de cultivo, por lo que deja de sintetizarse.

Cinética de Síntesis: Marcaje Metabólico e Inmunoprecipitación de Extracto Total de LR4

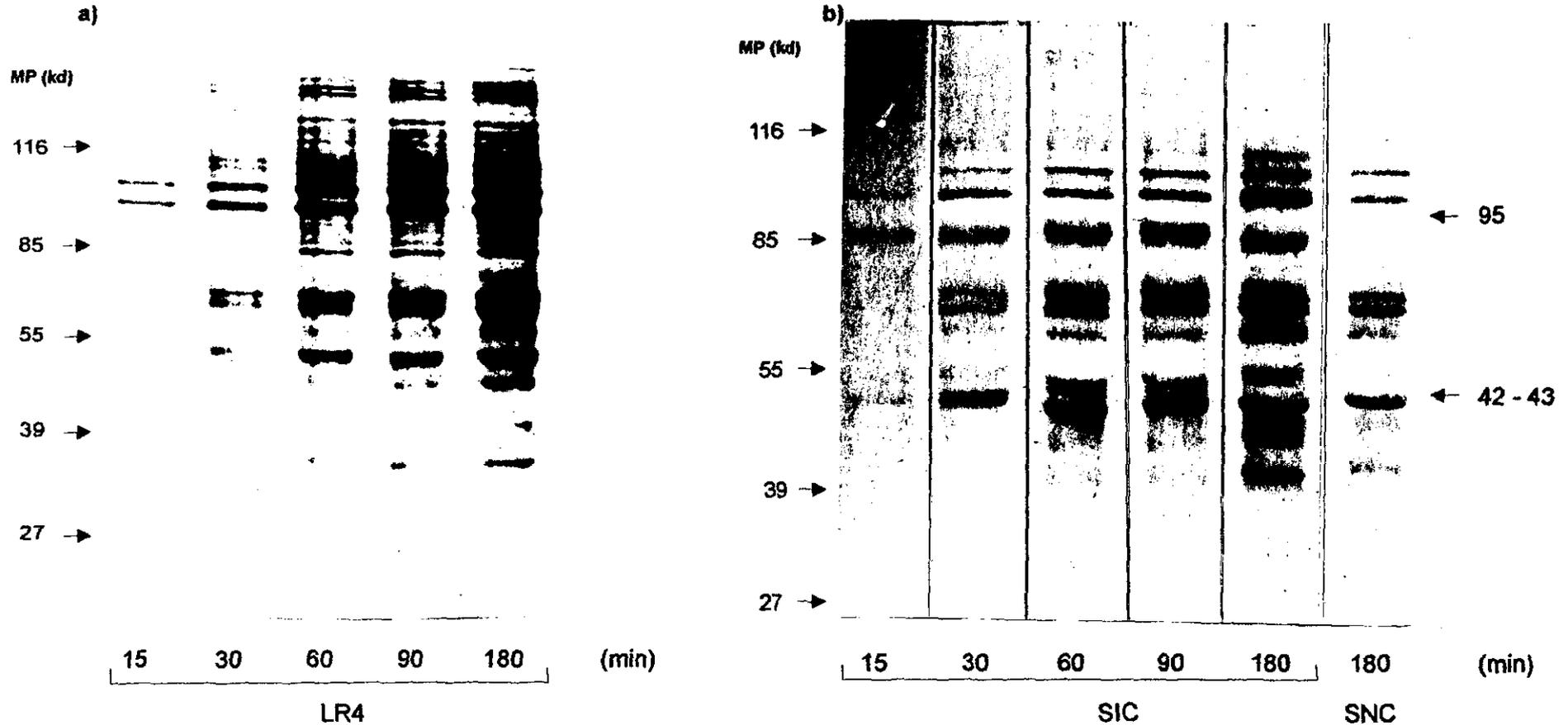


FIGURA 13. Cinética de síntesis. Fueron marcados metabólicamente 5 diferentes cultivos de células LR4 a distintos tiempos de pulso del aminoácido radiactivo metionina [^{35}S]: 15, 30, 60, 90 y 180 minutos. Se obtuvieron los extractos totales incubando las células en solución de lisis (NP40). (a) La fluorografía muestra el nivel de incorporación del aminoácido a las proteínas de síntesis activa. (b) Inmunoprecipitación a partir de los extractos marcados a diferentes tiempos de pulso radiactivo. La precipitación se realizó con suero inmune de conejo (SI) y suero normal (SN); para cada carril de SI se llevó a cabo uno de SN aunque sólo se muestra el correspondiente a 180 minutos para la comparación. MP = marcador de peso.

PRECIPITACION CON SUERO ADSORBIDO

Una de las formas de detectar antígenos específicos de un tipo celular es eliminando los anticuerpos inespecíficos presentes en el suero inmune. Para el caso del suero de conejo anti LR4 se detectó reactividad contra líneas de origen T preferentemente. Se pensó que al adsorber los sueros normal e inmune con células L5178Y y EL4.4 podrían ser visualizados los antígenos expresados únicamente por LR4.

Para lograr este propósito se llevó a cabo el siguiente esquema de adsorción de los sueros:

- a) se incubaron 100 μ l de los sueros (en dilución 1:100 en PBS) con 1×10^6 células de L5178Y toda la noche a 4°C
- b) después de recuperar los sueros por centrifugación se incubaron nuevamente con 1×10^6 células de L5178Y 1 hora a 37°C, 4 veces
- c) nuevamente se recuperaron los sueros y se incubaron en presencia de 1×10^6 células de EL4.4 toda la noche a 4°C
- d) los sobrenadantes se incubaron con 1×10^6 células de EL4.4 1 hora a 37°C, 4 veces más.

La precipitación utilizando el suero adsorbido revela una banda con un Rf de 0.39 (figura 14), que corresponde a 85 kd aproximadamente presente únicamente en el inmunoprecipitado de extracto de LR4 con suero inmune. Este resultado concuerda con los datos de precipitación con los sueros sin adsorber. En la figura 12(b), en el carril de suero normal se pueden observar bandas de muy poca intensidad que fueron eliminadas con la adsorción (fig. 14). En el caso de la precipitación con suero inmune prácticamente se logró eliminar la reactividad contra L5178Y y EL4.4, manteniéndose únicamente para el antígeno de 85 kd en LR4. La movilidad relativa de esta banda y su peso molecular son muy similares a los detectados para el antígeno de 86 kd observado en precipitaciones con suero sin adsorber a partir de extractos totales, por lo que puede sugerirse que se trata de la misma proteína(s).

Debido a que para todos los experimentos de precipitación de este tipo se partió de extractos totales marcados no es posible conocer la localización celular de los antígenos detectados, por lo que podrían encontrarse tanto intracelularmente como a nivel de la membrana plasmática.

En la tabla No. 6 se resumen los datos obtenidos de los experimentos de inmunoprecipitación de extractos marcados metabólicamente:

Immunoprecipitación con suero inmune adsorbido

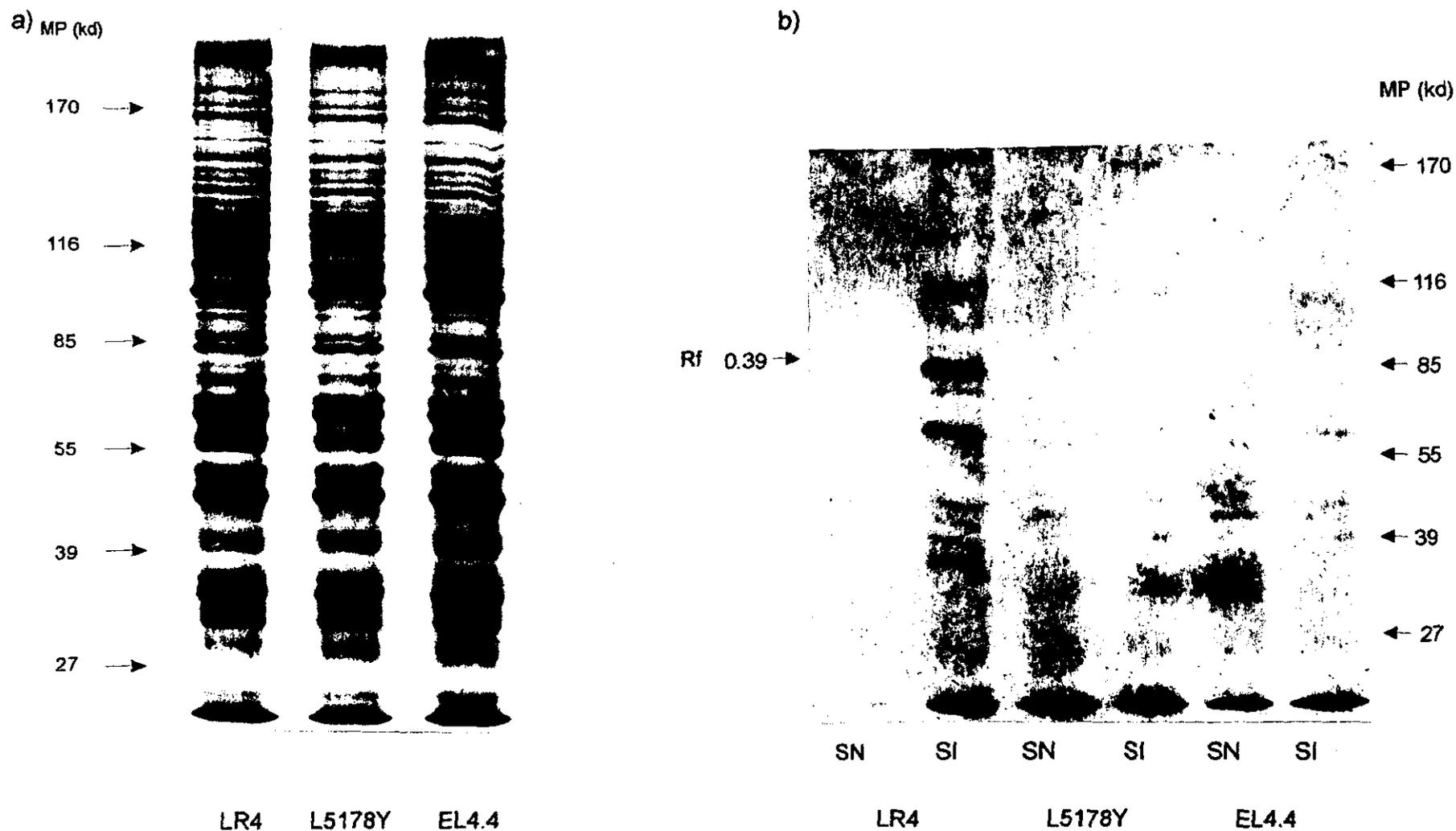


FIGURA 14. **Immunoprecipitación de líneas de origen T con suero adsorbido.** Se llevó a cabo la absorción de los anticuerpos contra antígenos compartidos entre las líneas celulares L5178Y y EL4.4, por incubación con las células completas (ver texto). El suero obtenido fue utilizado para el ensayo de inmunoprecipitación (panel b) a partir de los extractos totales, marcados durante 90 minutos (panel a). Para llevar a cabo la inmunoprecipitación se tomaron 200 cpm en los extractos de cada línea celular. MP = marcador de peso.

TABLA No. 6
ANTIGENOS DETECTADOS MEDIANTE MARCAJE METABOLICO

Línea Celular	95 kd	86 kd	42-43 kd
LR4	+	+	++
L5178Y	+	-	+
EL4.4	+	-	+

ANTIGENOS MEMBRANALES

MARCAJE DE PROTEINAS DE MEMBRANA SOBRE CELULAS COMPLETAS VIVAS

La línea celular LR4 carece de moléculas clase I y II del CPH, por lo que la inmunidad celular que pudiera mediar el reconociendo de antígenos intracelulares se encuentra bloqueada. Debido a que los anticuerpos reconocen a los antígenos al nivel de la membrana plasmática, nuestra hipótesis plantea que la localización celular de los antígenos relevantes de LR4 es la superficie celular. Tomando esto en cuenta, se decidió trabajar con las fracciones membranales para la identificación de antígenos a este nivel.

Como primer enfoque para la detección de antígenos de la membrana se llevó a cabo el marcaje de la superficie de las líneas LR4, L5178Y y de EL4.4 con yodo radiactivo (Na^{125}I) (ver materiales y métodos). En estos ensayos se marcaron la células vivas, y el análisis bioquímico se hizo a partir de extractos totales.

En la figura 15 se observa que el suero inmune de conejo es capaz de reconocer tanto en extractos de LR4 como de EL4.4 una proteína con una movilidad relativa que varió en los distintos experimentos entre 0.43 y 0.46, que corresponde aproximadamente a 80-84 kd. Además, se detectó una proteína de alto peso molecular ($R_f = 0.20$ y 150 kd) en el carril de suero inmune en el extracto de EL4.4. Sin embargo, esta banda, como se explicará mas adelante, no parece ser un antígeno membranaral debido a que en precipitaciones de fracciones membranales no es reconocida, por lo que se piensa que durante el proceso de marcaje pudiera haber sucedido alguna incorporación del yodo obteniéndose marca en algunos componentes intracelulares, como ésta. En estos ensayos el suero normal no precipitó ninguna proteína marcada reforzando la especificidad de las bandas detectadas por el suero inmune.

La diferencia de intensidad de la banda de 80-84 kd que pudiera corresponder al mismo antígeno en LR4 y EL4.4, podría reflejar una mayor expresión por parte de EL4.4. No se ha determinado si estos hallazgos son la causa de las diferencias detectadas entre LR4 y EL4.4 a diluciones altas (1:1000) en los experimentos de IFI. Ninguna de las bandas detectadas en las líneas celulares LR4 o EL4.4 fue identificada en L5178Y. Una posible explicación podría ser que L5178Y no expresara las moléculas presentes en las líneas EL4.4 y LR4.

Inmunoprecipitación de extractos totales de líneas de origen T, marcadas con Na [¹²⁵I]

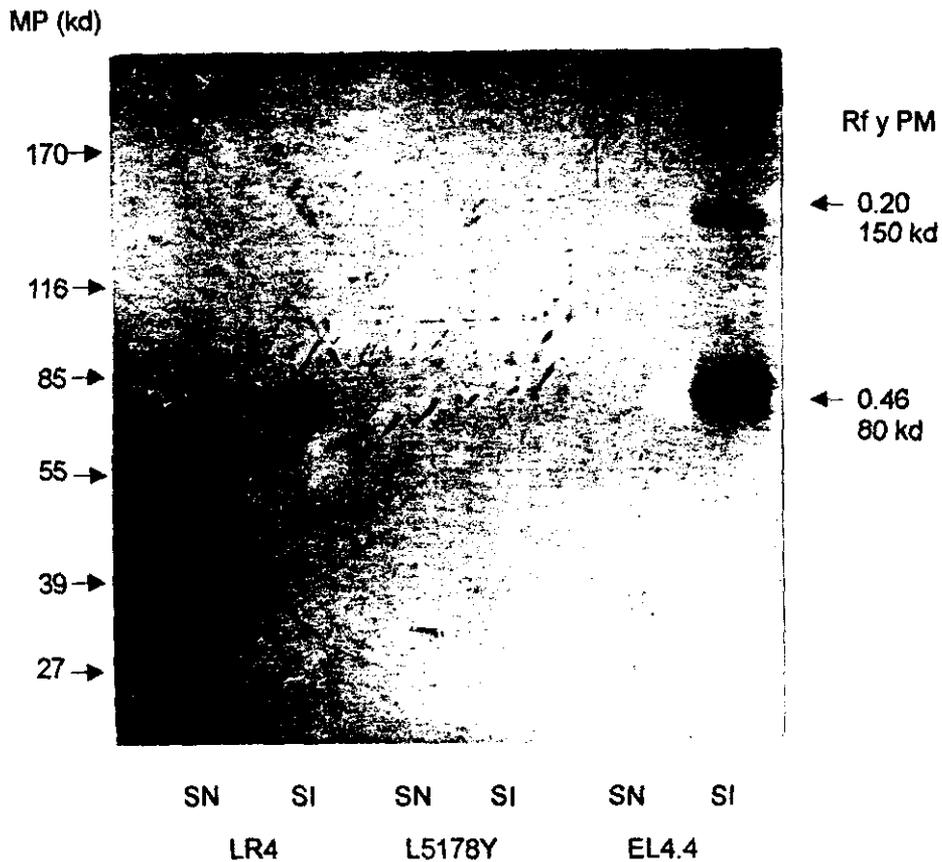


FIGURA 15. Inmunoprecipitación de extractos totales de líneas de origen T. Las membranas celulares de las líneas LR4, L5178Y y EL4.4 fueron marcadas isotópicamente con Na [¹²⁵I] mediante la reacción de lactoperoxidasa. Los extractos totales se obtuvieron por incubación en solución de lisis (NP40). A partir de éstos se realizó la inmunoprecipitación con los sueros normal (SN) e inmune (SI) de conejo. MP = marcador de peso.

MARCAJE DE PROTEINAS AISLADAS DE LA MEMBRANA PLASMATICA

Para los experimentos de marcaje de las proteínas de membrana sobre las células completas deben considerarse diferentes aspectos para realizar una adecuada manipulación que permita obtener la mayor marca de los componentes de la superficie sin permitir que sean adicionados radicales radiactivos a las proteínas intracelulares. Se debe tener cuidado en evitar que las células comiencen a morir y de esta forma se pierda la impermeabilidad membranar y se marquen antígenos intracelulares. Además, la manipulación puede llegar a producir señales de estrés a las células que responden internalizando antígenos, afectando el marcaje de moléculas relevantes.

Para evitar estos inconvenientes se decidió trabajar con las proteínas membranales al aislar estas fracciones en primer lugar. La purificación de las membranas celulares se realizó por choque osmótico de las células y separación de los componentes del citoplasma por centrifugación (ver materiales y métodos).

Como control de obtención de proteínas membranales, se cuantificó la actividad de la 5'-nucleotidasa (Shin, 1975; Chatterjee, 1976; Thom, 1977). Los valores registrados en preparaciones membranales de las líneas LR4, L5178Y y EL4.4 fueron 9, 7 y 12 veces mayores a las que se encontraron en el citoplasma (figura 16). Para el caso de las células del timo de ratones C57BL/6J también se obtuvo una relación de actividad membrana/citoplasma del orden de 7, sin embargo, la actividad de estos compartimientos en estas células fue menor respecto a la de las líneas celulares. Una causa probable para este fenómeno es que las membranas se obtuvieron inmediatamente después de extirpar el timo, situación en la que las células no se encuentran activadas.

La figura 17(a) muestra la autorradiografía del patrón de incorporación del yodo a las proteínas membranales de LR4. La figura 17(b) muestra que después de inmunoprecipitar, solamente la banda de 84 kd se reconoció por el suero inmune de conejo. Esta banda tiene una movilidad electroforética similar a la detectada en los experimentos mostrados en la figura 15, por lo que suponemos que se trata del mismo antígeno.

En un ensayo equivalente, en el que se incluyeron las líneas L5178Y, EL4.4 y timocitos de ratones C57BL/6J (figura 18(a)) se obtuvo un patrón de incorporación similar en todos los casos. A partir de estas preparaciones se inmunoprecipitó con los sueros normal e inmune. El suero inmune permitió identificar una banda de igual movilidad electroforética (0.44) en los carriles de LR4 y EL4.4 (figura 18(b)). Este experimento confirma lo observado al precipitar los extractos celulares totales (fig.

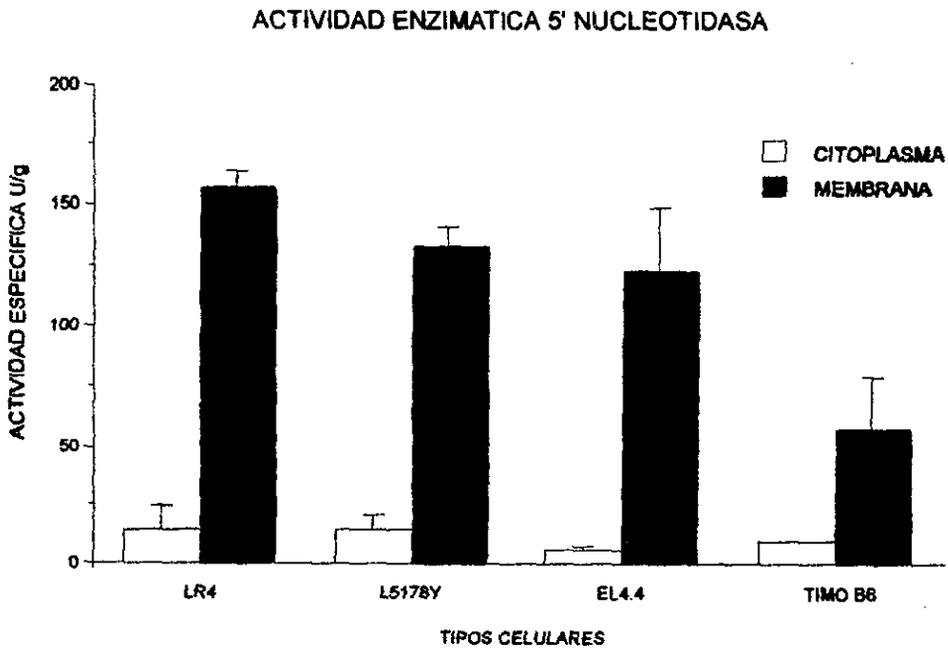


FIGURA 16. Actividad enzimática 5'-nucleotidasa. Se obtuvieron las membranas de las células LR4, L5178Y, EL4.4 y timocitos de ratones C57BL/6J como se explica en materiales y métodos. A las fracciones de membranas y citoplasma les fue cuantificada la actividad de la enzima 5'-nucleotidasa como control. La gráfica representa el promedio de 2 experimentos por duplicado.

Marcaje e inmunoprecipitación de proteínas aisladas de membranas celulares de LR4
 marcadas con Na [¹²⁵I]

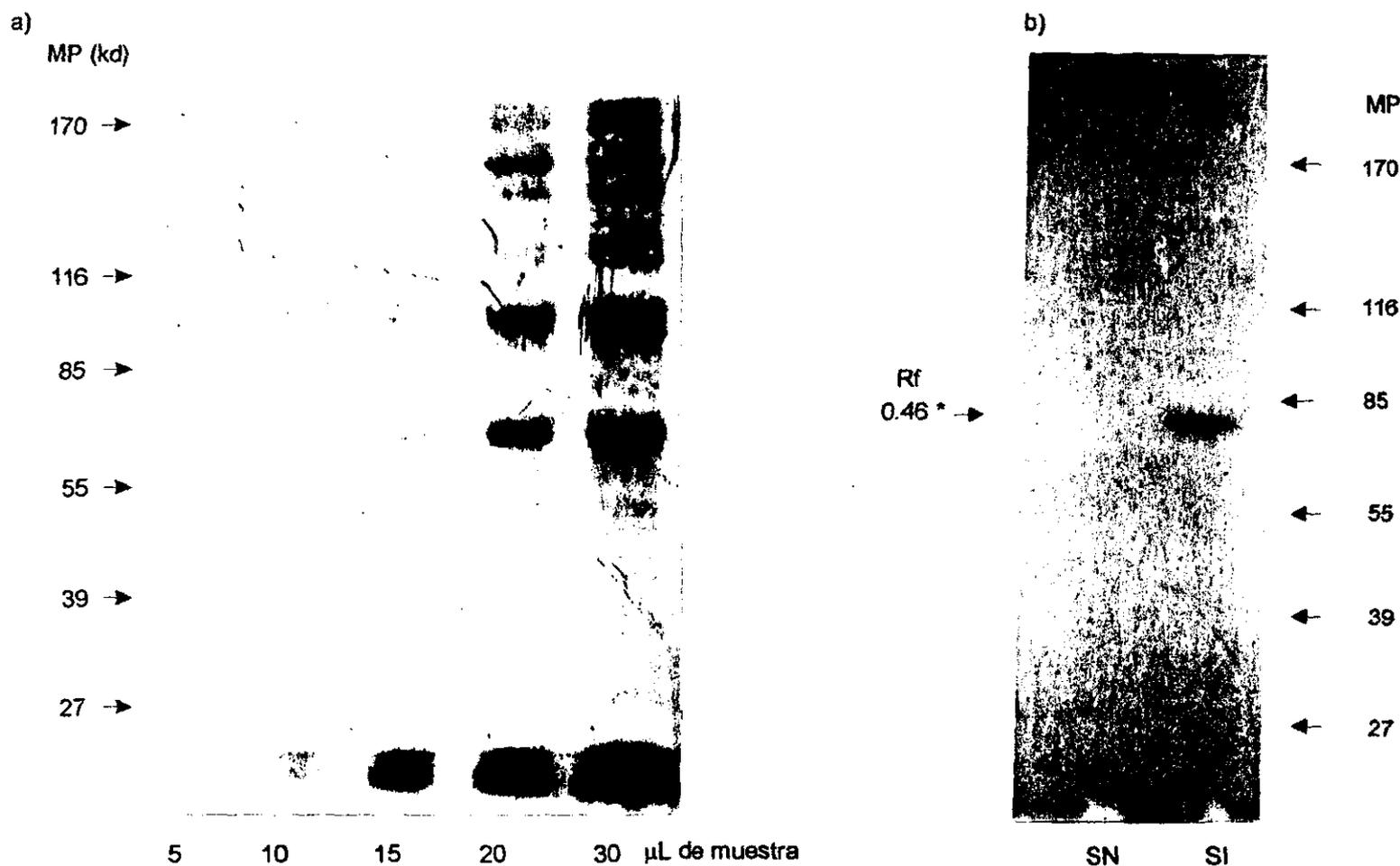


FIGURA 17. Marcaje e inmunoprecipitación de proteínas aisladas de membrana de LR4. (a) De las fracciones colectadas y concentradas de membranas de LR4 se tomaron diferentes volúmenes de muestra para la electroforesis (SDS-PAGE 7.5%). El patrón de incorporación muestra una serie de bandas de pesos moleculares por arriba de los 50 kd. (b) Con los sueros normal e inmune se llevó a cabo una inmunoprecipitación a partir de las preparaciones de proteínas aisladas de la membrana de LR4, utilizando los sueros normal (SN) e inmune (SI) de conejo. La marca (*) en 0.46 indica el Rf correspondiente a la banda señalada. MP = marcador de peso.

Marcaje e Inmunoprecipitación de proteínas aisladas de membranas celulares de diferentes líneas de origen T marcadas con [¹²⁵I]

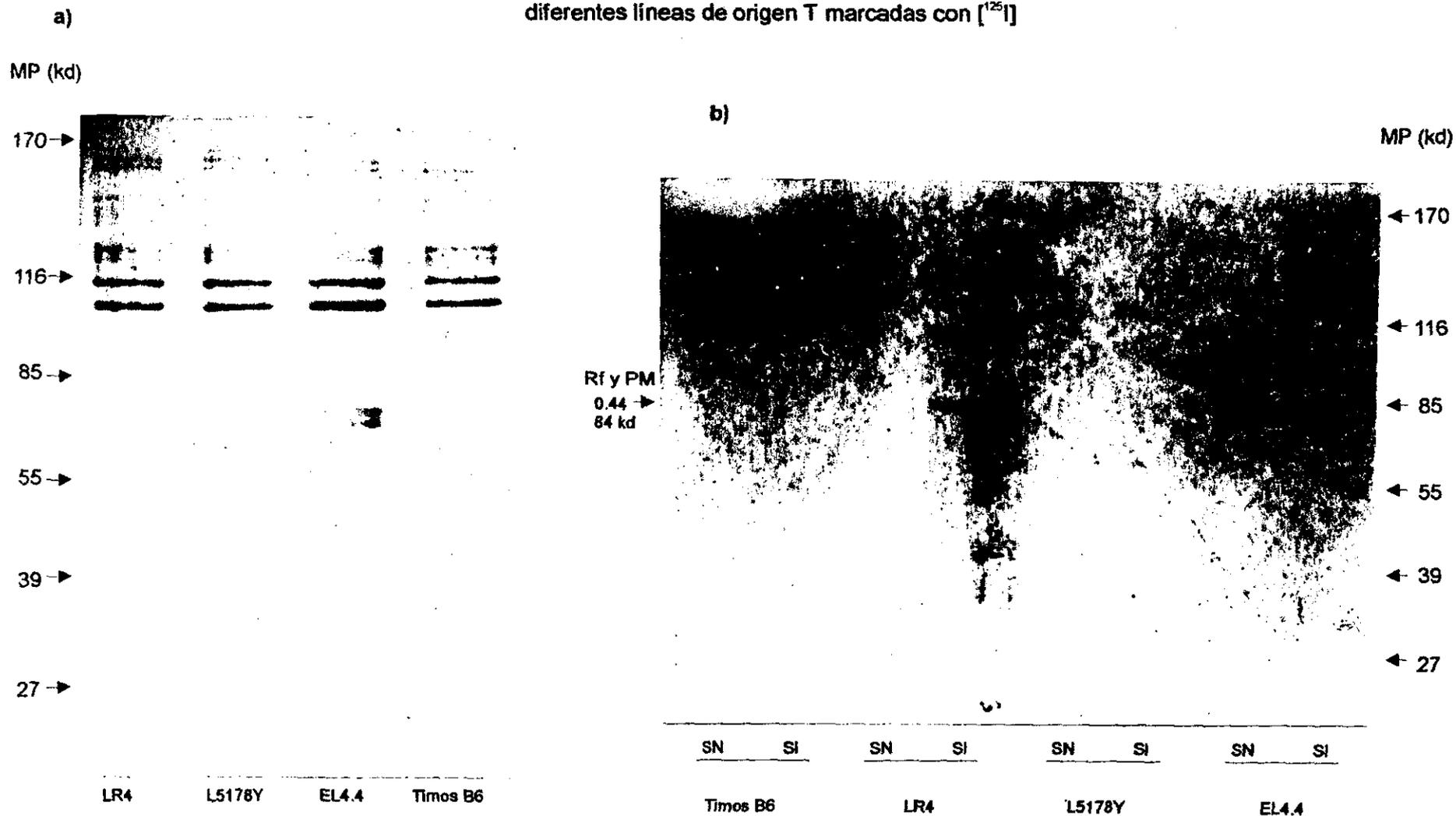


FIGURA 18. Marcaje e inmunoprecipitación de proteínas aisladas de membranas de líneas de origen T y timocitos de ratones C57BL/6J. Se ajustó la concentración de proteínas a 1 mg/ml y se marcó con 100 μ Ci/ml con Na[¹²⁵I]. El yodo no incorporado se eliminó por cromatografía (ver materiales y métodos). Las fracciones de proteínas concentradas se separaron en geles (SDS-PAGE 7.5%). (a) Se muestra el patrón de incorporación a las diferentes líneas celulares (LR4, L5178Y y EL4.4) y a las células normales del timo de ratones B6. (b) Se realizó la inmunoprecipitación con suero normal (SN) e inmune (SI) para cada tipo celular partiendo de 200 cpm de cada muestra. MP = marcador de peso.

15), donde se había determinado la carencia de reactividad con las membranas de L5178Y, y se identificó un antígeno de movilidad semejante en LR4 y EL4.4. Las células normales del timo de ratones C57BL/6J no presentaron reactividad bajo estas condiciones experimentales.

El hecho de no haber detectado ningún antígeno en células del timo de ratones C57BL/6J es importante porque: a) pudiera ser que el antígeno identificado en LR4 fuera un antígeno tumoral que por lo tanto, no se expresa en células normales, aunque no se pudo llevar a cabo el análisis a partir de células del timo de ratones susceptibles (BALB/c); b) el que EL4.4 lo exprese pudiera deberse a que durante la transformación maligna se permitió la expresión de este gen; c) si el antígeno de EL4.4 es el mismo que en LR4 entonces no podría ser el responsable del rechazo por parte de los ratones C57BL/6J de LR4; y d) si lo anterior es cierto, entonces podría tratarse de un antígeno diferente o bien de una forma alélica que los ratones C57BL/6J no reconocen en EL4.4 y si en LR4.

La tabla no. 7 resume los datos obtenidos al analizar los componentes de las membranas de diferentes tipos celulares:

TABLA NO. 7
ANTIGENOS DETECTADOS MEDIANTE MARCAJE CON ¹²⁵I
DE CELULAS COMPLETAS O PROTEÍNAS DE MEMBRANAS AISLADAS

Tipo celular	150 kd	80-84 kd
LR4	-	+
L5178Y	-	-
EL4.4	+	+
Timocitos C57BL/6J	-	-

ANÁLISIS DE PROTEÍNAS NO MARCADAS

Una técnica empleada en este trabajo para el análisis de antígenos no marcados radiactivamente fue la de electrotransferencia, que permite detectar moléculas cuya naturaleza no sea necesariamente proteica, a diferencia del marcaje con metionina o yodo radiactivos.

Las condiciones experimentales óptimas para este tipo de ensayos fueron: 30 µg de proteínas por carril; dilución de los sueros de 1:500 - 1:10,000 en las que hubo reconocimiento específico respecto al control. Las diluciones empleadas en los experimentos mostrados fueron 1:1000 y 1:2000.

A partir de extractos totales de LR4 se logró el reconocimiento de una banda antigénica de aproximadamente 142 kd y una de menor intensidad de 116 kd (figura 19).

En el caso de extractos obtenidos de L5178Y y de EL4.4 la banda de 142 kd fue poco intensa, lo que sugiere que se encuentra en menor concentración en las líneas L5178Y y en EL4.4 o es un antígeno que está sobreexpresado en LR4. La banda de 116 kd no se detectó en L5178Y ni EL4.4.

Se quiso saber si los antígenos reconocidos en los extractos de las líneas celulares se encontraban también presentes en las células normales de ratones susceptibles y resistentes al tumor. Para lo cual se realizó un experimento equivalente a partir de células del timo de ratones BALB/b y C57BL/6J. La figura 20 muestra los antígenos identificados por los sueros normal, inmune e inmune adsorbido en los timocitos. En los carriles correspondientes al suero inmune y al suero inmune adsorbido para las células de ambas cepas de ratones se observan tres bandas antigénicas de 154, 135 y 111 kd, de las cuales únicamente la de 135 kd parece ser específica debido a que las otras 2 presentan reacción también en presencia del suero normal. El hecho de no haber detectado diferencias entre el suero inmune y el suero inmune adsorbido podría deberse a que las células de L5178Y y EL4.4 carecen del antígeno de 135 kd o que lo expresan en bajas cantidades por lo que la adsorción pudo haber sido insuficiente.

En ninguno de los casos de los timocitos analizados se logró la identificación de antígenos de pesos similares a los detectados en LR4 por lo que podría pensarse que la expresión de las proteínas identificadas en la línea celular es consecuencia de la transformación maligna.

Western blot de líneas celulares
de origen T

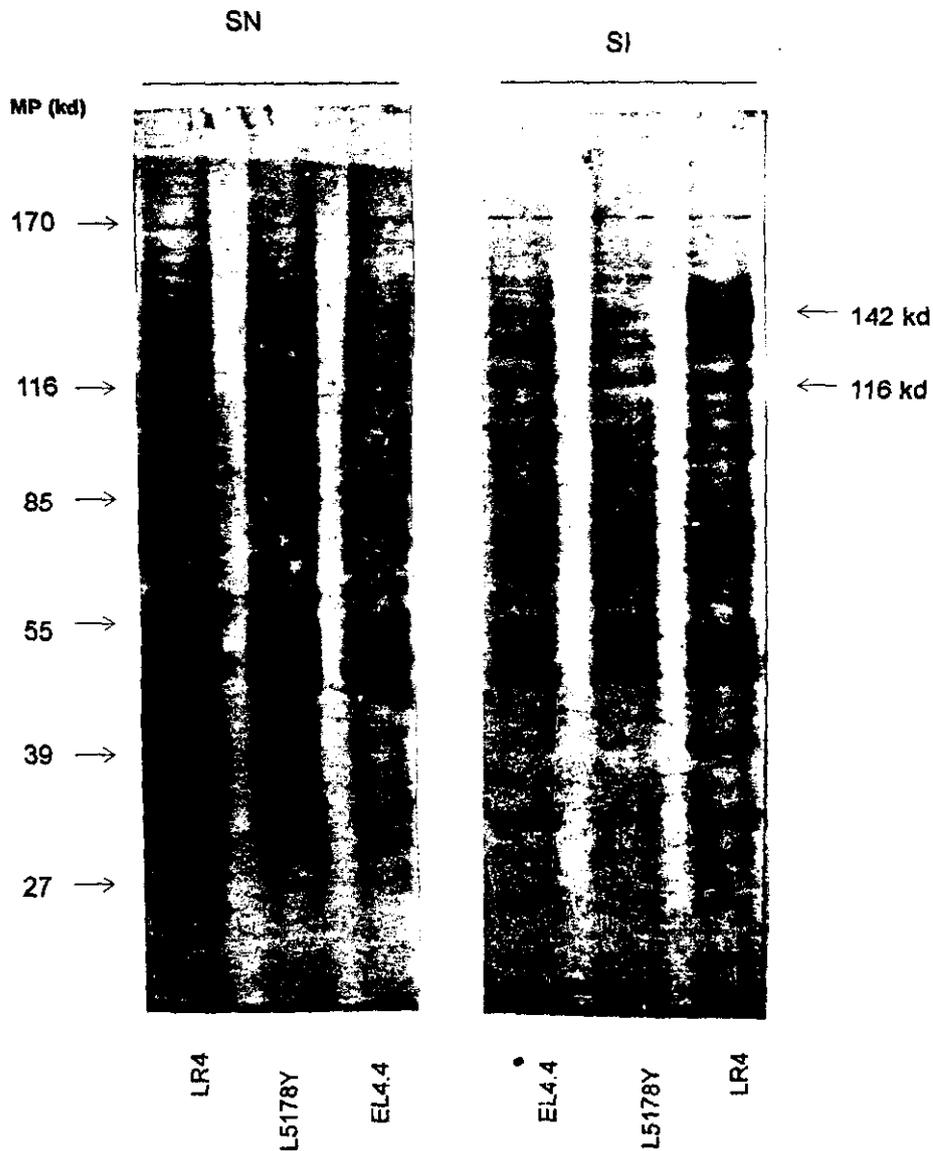


FIGURA 19. Inmuno blot de líneas celulares de origen T. A partir de cultivos in vitro de 24 h se realizó la lisis por incubación en solución de NP40 de las líneas LR4, L5178Y y EL4.4. Se colocaron 30 μ g de proteínas en gel para electroforesis (SDS-PAGE 7.5%) y electrotransferencia a membranas de nitrocelulosa. Se incubó en presencia de los sueros normal (SN) e inmune (SI) en dilución 1:1000 y se reveló por oxidación de DAB en presencia de HRP y H_2O_2 . MP = marcador de peso.

Western blot de células del timo
de ratones BALB/b Y C57BL/6J

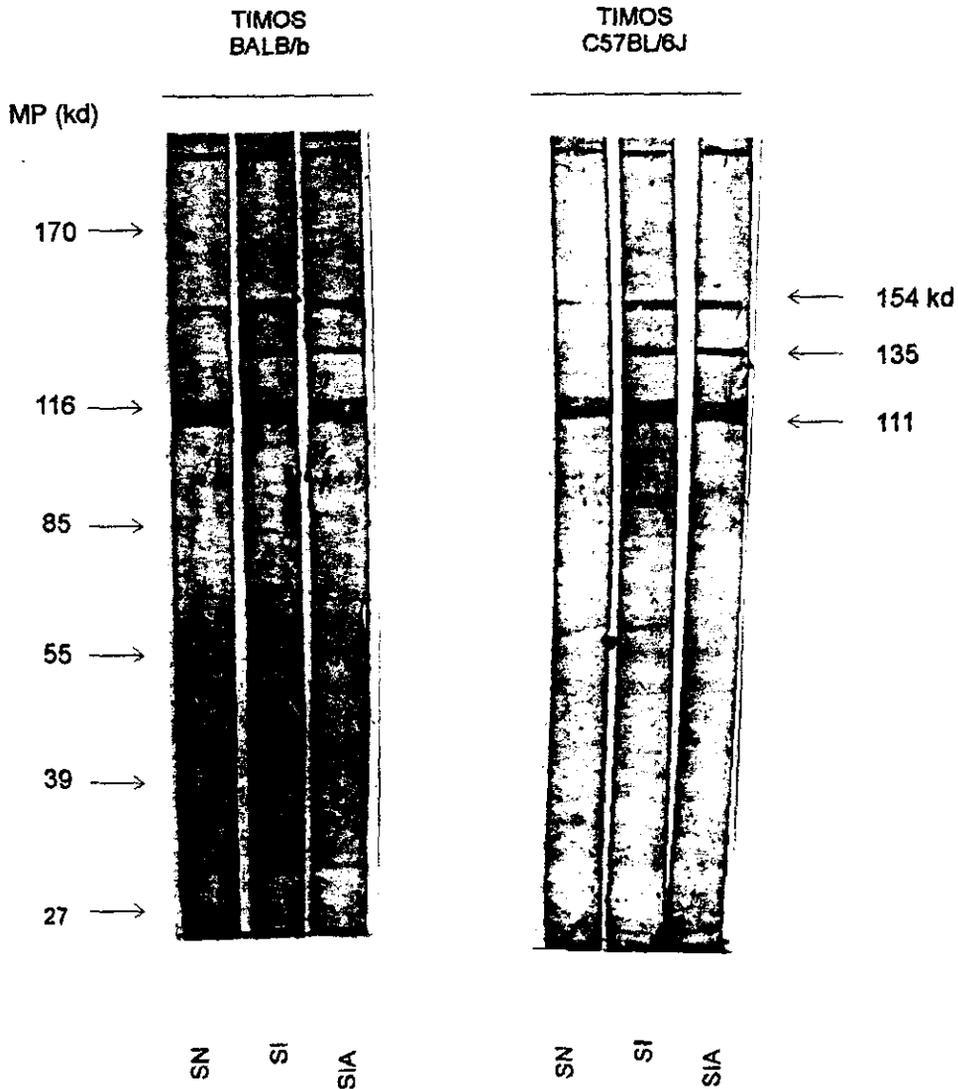


FIGURA 20. Inmuno blot de células del timo de ratones BALB/b y C57BL/6J. Se extirparon los timos de ratones BALB/b y C57BL/6J, y las células obtenidas por disgregación mecánica se incubaron en solución de lisis (NP40). Se colocaron 30 µg de proteínas en gel para electroforesis (SDS-PAGE 7.5%) y electrotransferencia a membranas de nitrocelulosa. Las membranas fueron incubadas con los sueros normal (SN), inmune (SI) e inmune adsorbido (SIA) a dilución 1:500. MP = marcador de peso.

Se ha reportado que las células del timo de ratones BALB/b son capaces de inmunizar a ratones C57BL/6J contra un reto de LR4, por lo que se esperaba encontrar al menos una banda en común para los timocitos de BALB/b y LR4. Debido a la ausencia de antígenos en común, podría sugerirse que las proteínas de 142 y 116 kd identificadas en LR4 no son las responsables del rechazo por parte de los ratones resistentes al tumor.

Sin embargo, aún cuando no se puede afirmar que los antígenos reconocidos por el antisuero en LR4 sean relevantes en el rechazo, podría tratarse de antígenos importantes en la fisiología de LR4. Aunque no se descarta que los mismos antígenos puedan ser también expresados en las células normales en condiciones distintas. Esto es posible debido a que las células normales fueron lisadas inmediatamente después de la extirpación de los timos, situación en la cual la mayor parte de las células no se encuentran activadas ni en proliferación.

Un aspecto importante del antígeno de 142 kd identificado en LR4 es que, aún cuando no parece ser un antígeno tumoral, si parece expresarse únicamente en esta línea al compararla con L5178Y y EL4.4, por lo que podría ser considerado como propio de LR4.

ANÁLISIS DE PROTEÍNAS DE LA MEMBRANA CELULAR

Se aislaron las proteínas membranales de las líneas LR4, L5178Y y de EL4.4, de igual forma que se hizo para los ensayos con yodo radiactivo, para ser analizada en experimentos de electrotransferencia. En estos ensayos se incluyeron también las fracciones citoplasmáticas de todas las líneas.

En la figura 21 se observa un ensayo típico obtenido al incubar membranas de nitrocelulosa transferidas con antígenos membranales y del citoplasma de las líneas celulares de origen T. Debido a que las fracciones se enriquecieron con las proteínas de los dos compartimentos celulares, se requirieron cantidades menores de proteína para obtener bandas muy intensas de reconocimiento, aún con diluciones mayores del suero inmune (10 µg de proteínas por carril y dilución del suero 1:2000). Este tipo de ensayos reveló 2 antígenos reconocidos claramente en las membranas de todas las líneas celulares: de 76 y 113 kd. Un antígeno de 121 kd fue reconocido también con gran intensidad en las membranas de LR4 y EL4.4 y débilmente en L5178Y. Fue detectado al mismo tiempo un antígeno de 167 kd en las membranas de L5178Y y de EL4.4 y se encontró ausente en LR4.

Western blot de proteínas membranales de líneas de origen T

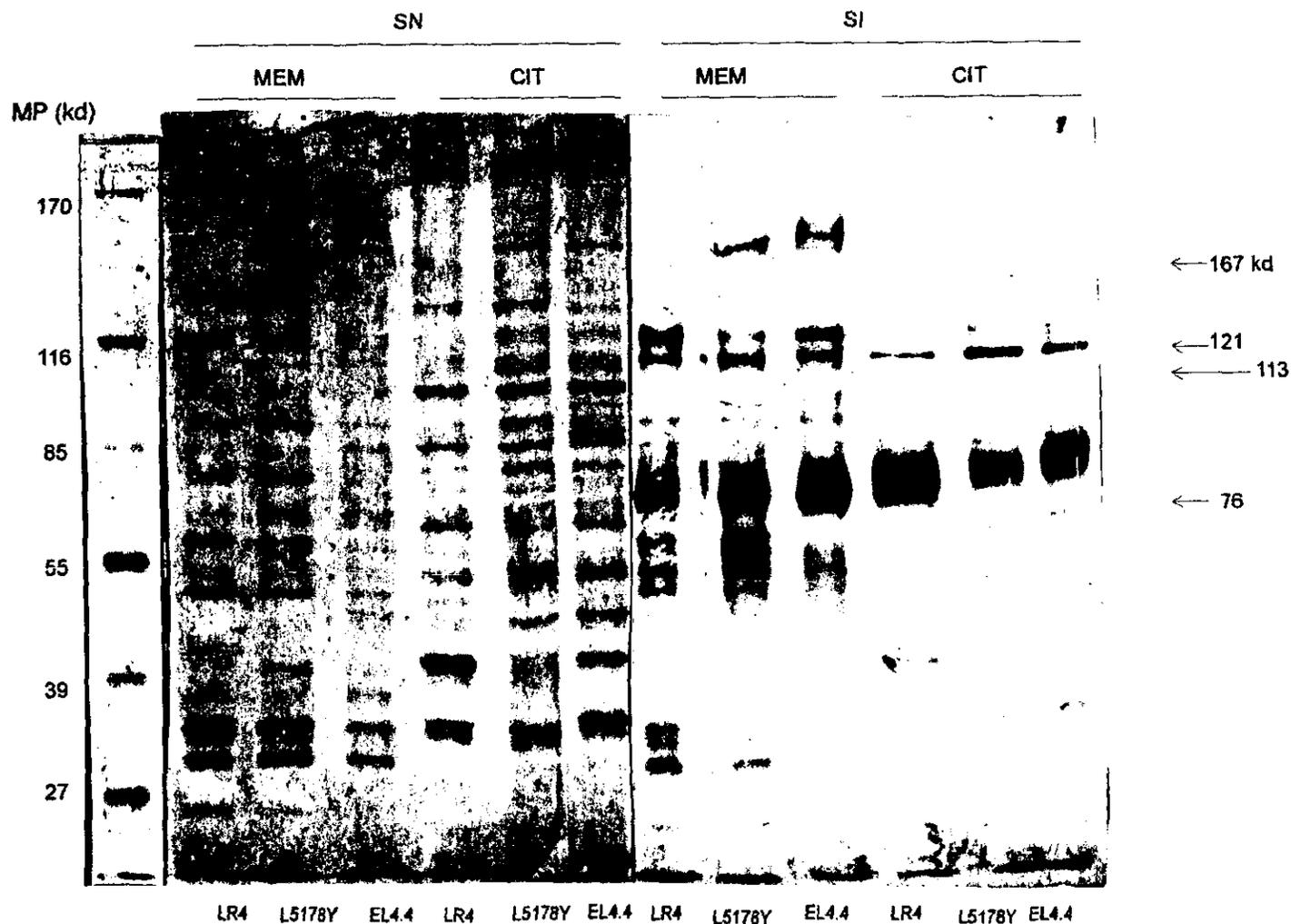


FIGURA 21. Inmuno blot de proteínas de fracciones membranales y citoplásmicas de líneas celulares de origen T. Se obtuvieron las fracciones membranales y citoplásmicas de las líneas LR4, L5178Y y EL4.4 como se explica en materiales y métodos. Se colocaron 10 μ g de proteínas en gel para electroforesis (SDS-PAGE 7.5%) y electrotransferencia a membranas de nitrocelulosa. Se incubó en presencia de los sueros normal (SN) e inmune (SI) a dilución de 1:2000. MP = marcador de peso.

TABLA No. 8
ANTIGENOS DE EXTRACTOS TOTALES DETECTADOS
POR WESTERN BLOT

Tipo Celular	154 kd	142 kd	135 kd	116 kd
LR4	-	++	-	+
L5178Y	-	-	-	-
EL4.4	-	-	-	-
Timocitos BALB/b	+	-	+	-
Timocitos C57BL/6J	+	-	+	-

TABLA No. 9
ANTIGENOS MEMBRANALES DETECTADOS
POR WESTERN BLOT

Línea Celular	167 kd	121 kd	113 kd	76 kd
LR4	-	++	+	+++
L5178Y	+	+	+	+++
EL4.4	+	++	+	+++

La presencia de un mayor número de antígenos reconocidos en las fracciones citoplasmicas y membranales aisladas en comparación con los observados en los extractos totales podría ser consecuencia del enriquecimiento de antígenos en cada fracción.

• CONCLUSION

Mediante el presente trabajo se ha intentado indagar sobre la naturaleza antigénica de la línea celular LR4. El empleo de distintas técnicas permitieron la detección de una serie de antígenos presentes en las líneas LR4, su línea parental L5178Y y la línea H-2b, EL4.4 (tabla 10). Sin embargo, la proteína(s) de 86 kd identificada por el suero inmune de conejo, previamente adsorbido en células de L5178Y y EL4.4, se identificó como específica de la línea LR4. La expresión, aparentemente exclusiva, del antígeno de 86 kd en LR4 abre la posibilidad de que pudiera corresponder a un antígeno tumoral, capaz de ser reconocido por la cepa de ratones C57BL/6J resistentes al tumor.

TABLA No. 10
RESUMEN DE ANTIGENOS DETECTADOS EN
CELULAS DE ORIGEN T

Técnica de detección	Marcaje metabólico			Marcaje con yodo 125					Inmuno blot				
	95 kd	86 kd	42-43 kd	150 kd	80-84 kd	154 kd	142 kd	135 kd	116 kd	167 kd	121 kd	113 kd	76 kd
LR4	+	+	++	-	+	-	++	-	+	-	++	+	+++
L5178Y	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+++
EL4.4	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	++	+	+++
Timocitos BALB/b	ND	ND	ND	ND	ND	+	-	+	-	ND	ND	ND	ND
Timocitos C57BL/6J	ND	ND	ND	-	-	+	-	+	-	ND	ND	ND	ND

ND = no determinado

APENDICE

REACTIVOS Y SOLUCIONES

Amortiguador de fosfatos (PBS): NaCl 150 mM, KCl 2.6 mM, Na₂HPO₄ 8 mM, KH₂PO₄ 1.4 mM, pH 7.2.

Amortiguador de lisis de glóbulos rojos (ACK): NH₄Cl 166 mM, Na₂EDTA 19 mM, KHCO₃ 85 mM

Medio de cultivo RPMI 1640: Medio 10.4%, dextrosa 2.5%, NaHCO₃ 2%, SFB 10%, piruvato de sodio 1 mM, aminoácidos no esenciales 0.1 mM, sulfato de estreptomicina 100 µg/ml, fungizone (anfotericina B 250 µg/ml, desoxicolato de sodio 205 µg/ml), pH 7.2. Se esterilizó por filtración a través de membranas de 0.22 micras.

Medio de cultivo RPMI 1640 libre de metionina y cisteína suplementado: SFB 10%, piruvato de sodio 1 mM, aminoácidos no esenciales 0.1 mM, fungizone (anfotericina B 250 µg/ml, desoxicolato de sodio 205 µg/ml), estreptomicina 100 µg/ml, glutamina 300 mg/l. Se esterilizó por filtración a través de membranas de 0.22 micras.

Amortiguador de lisis: NP40 1%, NaCl 150 mM, trietanolamina 10 mM, yodoacetamida 10 mM, PMSF 1 mM, aprotinina 0.5 µg/ml, pepstatina 1 µg/ml, pH 7.8.

Reactivos de la Determinación de Proteínas (Lowry)

Solución de cobre tartrato: CuSO₄ 6.2 mM, tartrato de sodio y potasio 9.5 mM, Na₂CO₃ 0.2 M

Reactivo de fenol 20%

SDS 5%

NaOH 0.8 M

Reactivos para Inmunoprecipitación

Solución Tris-NaCl-azida de sodio (TSA): Tris-Cl 10 mM, NaCl 0.14 M, NaN₃ 0.025%, pH 8.0

Solución de Tris: Tris-Cl 50 mM, pH 6.8

Solución fijadora para geles: Metanol 25%, ácido acético 7%

Solución para impregnar geles (fluorografía): PPO 15% en DMSO

Solución para secar geles: Acido acético 7%, glicerol 10%

Reactivos para Purificación de Membranas Plasmáticas

Solución de cosecha: Acido bórico 50 mM, NaCl 150 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 1 mM, pH 7.8

Solución de extracción: Acido bórico 20 mM, Na₂EDTA 0.2 M, pH 10.2

Solución de boratos: Acido bórico 0.5 M, pH 10.2

Solución salina de fosfatos: NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, CaCl₂ 0.9 mM, MgCl₂ 0.49 mM, KH₂PO₄ 1.47 mM, Na₂HPO₄ 0.84 mM, pH 7.4 a 7.8

Kit para Actividad 5'-ND

Reactivo 5'-ND: AMP 3.2 mM, NADH 0.2 mM, 2-oxoglutarato 3.7 mM, GLDH (bovina) 11000 U/L, ADA (bovina) 400 U/L, en amortiguador de glicerol-2-fosfato

Reactivos para Western-blot

Solución de electrotransferencia: Tris-Cl 25 mM, glicina 144 mM, metanol 20%, pH 8.3

Solución de bloqueo: BSA 3% en PBS

Solución de dilución: BSA 1%, Tween 20 0.2% en PBS

Solución de lavado: Tween 20 0.2% en PBS

Sustrato: DAB 0.5 mg/ml, H₂O₂ 5 µl/10 ml en PBS

• BIBLIOGRAFIA

Alarcón, B., et al. Assembly of the human T cell receptor-CD3 complex takes place in the endoplasmic reticulum and involves intermediary complexes between the CD3- γ • δ • ϵ core and single T cell receptor α or β chains. *J Biol Chem* 1988, 263: 2953-2961

Alarcón, B., et al. The CD3- γ and CD3- δ subunits of the T cell antigen receptor can be expressed within distinct functional TCR/CD3 complexes. *EMBO J* 1991, 10: 903-912

Albelda, S. Integrins and the cell adhesion molecules. *FASEB J* 1990, 4: 2868-2880

Alfaro, G., Lomeli, C., Ocadiz, R. Immunologic and genetic characterization of S180, a cell line of murine origin capable of growing in different inbred strains of mice. *Vet Immunol Immunopath* 1992, 30: 385-398

Algarra, I., et al. Heterogeneity of MHC-class-I antigens in clones of methylcholanthrene-induced tumors. Implications for local growth and metastasis. *Int J Cancer* 1991, 6 (suppl): 73-81

Allison, J., Hurwitz, A., Leach, D. Manipulation of costimulatory signals to enhance antitumor T-cell responses. *Curr Opin Immunol* 1995, 7: 682-686

Amoroso, A., et al. Binding characteristics and antitumor properties of 1A10 bispecific antibody recognizing gp40 and human transferrin receptor. *Cancer Res* 1996, 56: 113-120

Barnd, D., Lan, M., Metzgar, R., Finn, O. Specific, Major Histocompatibility complex-unrestricted recognition of tumor-associated mucins by human cytotoxic T cell. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989, 86: 7159-7163

Böel, P., Wildmann, C., Sensi, M., Brasseur, R., Renaud, J., Coulie, P., Boon, T., Van der Bruggen, P. BAGE: a new gene encoding an antigen recognized on human melanomas by cytolytic T lymphocytes. *Immunity* 1995, 2: 167-175

Brändle, D., Brasseur, F., Weynants, P., Boon, T., Van den Eynde, B. A mutated HLA-A2 molecule recognized by autologous cytotoxic T lymphocytes on a human renal cell carcinoma. *J Exp Med* 1996, 183: 2501-2508

Browning, M., Bodmer, W. MHC antigens and cancer: implications for T-cell surveillance. *Curr Op Immunol* 1992, 4: 613-618

Bruggemann, M., Williams, G., Bindon, C., Clark, M., Walker, M., Jefferis, R., Waldmann, H., Neuberger, M. Comparison of the effector functions of human immunoglobulins using a matched set of chimeric antibodies. *J Exp Med* 1987, 166: 1351-1361

Casey, P. Protein lipidation in cell signaling. *Science* 1995, 268: 221-225

Cebrian, M., Yague, E., Rincon, M., Lopez-Botet, M., De Landazuri, M., Sanchez-Madrid, F. *J Exp Med* 1988, 168: 1621-1637

Chatterjee, S., Kim, U., Bielat, K. Plasma membrane associated enzymes of mammary tumours as the biochemical indicators of metastasizing capacity. Analyses of enriched plasma membrane preparations. *Br J Cancer* 1976, 33: 15-26

Cheever, M., et al. Immunity to oncogenic proteins. *Immunol Revs* 1995, No. 145: 33-59

Chen, L., Mizuno, M., Singhal, M., Hu, S., Galloway, D., Hellström, I., Hellström, K. Induction of cytotoxic T lymphocytes specific for a syngeneic tumor expressing the E6 oncoprotein of human papillomavirus type 16. *J Immunol* 1992, 148: 2617-2621

Cheresh, D., Reisfeld, R., Varki, A. O-acetylation of diasialoganglioside GD₃ by human melanoma cells creates a unique antigenic determinant. *Science* 1984, 225: 844-846

Chimori, Y., Minowada J. Identification and characterization of a colon-cancer-associated antigen expressed on leukemia-lymphoma cell lines. *Int J Cancer* 1991, 47: 428-430

Chuang, Ch., Ng, S. Functional divergence of the MAP kinase pathway ERK1 and ERK2 activate specific transcription factors. *FEBS Letters* 1994, 346: 229-234

Coligan, J., Kruisbeek, A., Margulies, D., Strober, W. *Current Protocols in Immunology*. John Wiley & Sons, Inc., USA 1994

Cromme, F., et al. Differences in MHC and TAP-1 expression in cervical cancer lymph node metastases as compared with the primary tumours. *Br J Cancer* 1994, 69: 1176-1181

Davies, D., Metzger, H. Structural basis of antibody function. *Ann Rev Immunol* 1983, 1: 87-117

De Leo, A., et al. Properties of a Mr 110,000 tumor rejection antigen of chemically induced BALB/c Meth A sarcoma. *Cancer Res* 1993, 53: 1602-1607

Del Rio, R. Estudio de la respuesta inmune humoral en ratones C57BL/6J y en los híbridos (c57BL/6J x BALB/c)F1 frente a una línea tumoral deficiente en moléculas del complejo principal de histocompatibilidad, LR4. Tesis de Maestría. Instituto de Investigaciones Biomédica, UNAM, 1997

Draetta, G. Mammalian G1 cyclins. *Curr Opin Cell Biol* 1994, 6: 842-846

DuBois, G., et al. Biochemical characterization and biologic activities of 82- and 86 kda tumor antigens isolated from a methylcholantrene-induced sarcoma, CII-7. *Int J Cancer* 1986, 37: 925-931

Fantl, W., Johnson, D., Williams, L. Signaling by receptor tyrosine kinases. *Annu Rev Biochem* 1993, 62: 453-481

Fellinger, E., et al. Biochemical and genetic characterization of the HBA71 Ewing's sarcoma cell surface antigen. *Cancer Res* 1991, 51: 336-340

Ferrone, S., et al. Loss of HLA class I antigens by melanoma cell: molecular mechanisms, functional significance and clinical relevance. *Immunol Today* 1995, 16: 487-494

Finn, J. Tumor-rejection antigens recognized by T lymphocytes. *Curr Op Immunol* 1993, 5: 701-708

Garin-Chesa, P., et al. Cell surface glycoprotein of reactive stromal fibroblasts as a potential antibody target in human epithelial cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990, 87: 7235-7239

Girling, A., et al. A core protein epitope of the polymorphic epithelial mucin detected by the monoclonal antibody SM-3 is selectively exposed in a range of primary carcinomas. *Int J Cancer* 1989, 43: 1072-1076

Hakomori, S. Possible functions of tumor-associated carbohydrate antigens. *Curr Opin Immunol* 1991, 3: 646-653

Hamel, P., Gallie, B., Phillips, R. The retinoblastoma protein and cell cycle regulation. *Trends Genet* 1992, 8: 180-185

Harlow, E., Lane, D. *Antibodies. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, USA 1988

Harrison, R., Lunt, G. (editors). *Biological membranes. Their structure and function*. Blackie London, 1980

Hunter, T. Braking the cycle. *Cell* 1993, 75: 839-841

Ihle, J. Signaling through the haematopoietic cytokine receptors. *Annu Rev Immunol* 1995, 13: 369-398

Ikeda, H., Lethé, B., Lehmann, F., VanBaren, N., Baurain, J-F., DeSmet, C., Chambost, H., Vitale, M., Boon, T., Coullie, P. Characterization of an antigen that is recognized on a melanoma showing partial HLA loss by CTL expressing an NK inhibitory receptor. *Immunity* 1997, 6: 199-208

Immune Receptor Supplement; *Immunol Today*, oct 1996

Jerome, K., Bamd, D., Bendt, K., Boyer, C., Taylor-Papadimitriou, J., McKenzie, I., Bast, R., Finn, O. Cytotoxic T-lymphocytes derived from patients with breast adenocarcinoma recognize an epitope present on the protein core of a mucin molecule preferentially expressed by malignant cells. *Cancer Res* 1991, 51: 2908-2916

Kallioniemi, O., Kallioniemi, A., Kurisu, W., Thor, A., Chen, L., Smith, H., Waldman, F., Pinkel, D., Gray, J. ERBB2 amplification in breast cancer analyzed by fluorescence in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992, 89: 5321

- Kang, X., Kawakami, Y., El-Gamil, M., Wang, R., Sakaguchi, K., Yannelli, J., Appella, E., Rosenberg, S., Robbins, P. Identification of a tyrosinase epitope recognized by HLA-A24-restricted, tumor-infiltrating lymphocytes. *J Immunol* 1995, 155: 1343-1348
- Kawakami, Y., Eliyahu, S., Delgado, C., Robbins, P., Sakaguchi, K., Appella, E., Yannelli, J., Adema, G., Miki, T., Rosenberg, S. Identification of a human melanoma antigen recognized by tumor-infiltrating lymphocytes associated with in vivo tumor rejection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, 91: 6458-6462
- Kawakami, Y., Eliyahu, S., Sakaguchi, K., Robbins, P., Rivoltini, L., Yannelli, J., Appella, E., Rosenberg, S. Identification of the immunodominant peptides of the MART-1 human melanoma antigen recognized by autologous T cells infiltrating into tumor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 3515-3519
- Kawakami, Y., Eliyahu, S., Jennings, C., Sakaguchi, K., Kang, X., Southwood, S., Robbins, P., Sette, A., Appella, E., Rosenberg, S. Recognition of multiple epitopes in the human melanoma antigen gp100 by tumor-infiltrating T lymphocytes associated with in vivo tumor rejection. *J Immunol* 1995, 154: 3961-3968
- Kupfer, A., Singer, S. Cell biology of cytotoxic and helper T cell functions: immunofluorescence microscopic studies of single cells and cell couples. *Ann Rev Immunol* 1989, 7: 309-337
- Léger, O., Dunn, P., Coles, B., Dean, J. Isolation and characterization of a serologically defined tumour membrane antigen from a chemically-induced rat sarcoma, HSN. *Int J Cancer* 1991, 47: 569-575
- Lever, T. Analysis of membrane proteins: current problems and future perspectives. En Gould G. W. (Editor) *Membrane protein expression systems. A users guide*. Portland Press 1994, London UK.
- Levine, A. The tumor suppressor genes. *Annu Rev Biochem* 1993, 62: 623-651
- Lin, L., et al. Construction of phosphorylatable monoclonal antibody to a tumor-associated antigen. *Cancer Res* 1996, 56: 4250-4254
- Lloyd, K., Old, L. Human monoclonal antibodies to glycolipids and other carbohydrate antigens: dissection of the humoral immune response in cancer patients. *Cancer Res* 1989; 49: 3445-3451
- Lu, X., Park, S., Thompson, T., Lane, D. ras-induced hyperplasia occurs with mutation of p53, but activated ras and myc together can induce carcinoma without p53 mutation. *Cell* 1992, 70: 153-161
- Marshall, C. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 1995, 80: 179-185
- Matsumura, T., et al. Characteristics and in vitro homing of long-term T-cells lines and clones derived from tumor-draining lymph nodes. *Cancer Res* 1994, 54: 2744-2750
- Mattes, J. et al. Class I (unique) tumor antigens of human melanoma: partial purification and characterization of the FD antigen and analysis of a mouse polyclonal antiserum. *Cancer Res* 1987, 47: 6614-6619
- McCloskey, M., Poo, M. Contact-induced redistribution of specific membrane components: local accumulation and development of adhesion. *J Cell Biol* 1986, 102: 2185-2196
- Melief, C., Kast, M. Potential immunogenicity of oncogene and tumor suppressor gene products. *Curr Op Immunol* 1993, 5: 709-713
- Mendelson, J., Howley, P., Israel, M., Liotta, L. (editors) *The molecular basis of cancer*. WB Saunders Co., USA, 1995
- Meredith, J., Fazeli, B., Schwartz, M. The extracellular matrix as a cell survival factor. *Mol Biol Cell* 1993, 4: 953-961
- Michalac, M., Quackenbush, E., Letarte, M. *J Biol Chem* 1986, 261: 92-95
- Miyajima, A., Kitamura, T., Harada, N., Yokota, T., Arai, K. Cytokine receptors and signal transduction. *Annu Rev Immunol* 1992, 10: 295-331
- Miyake, K., Underhill, C., Lesley, J., Kinkade, P. *J Exp Med* 1990, 172: 96-75
- Mobley, J. Regulatory mechanisms underlying T cell integrin receptor function. *Seminars Immunol* 1993, 5: 227-236

- Moodie, Sh., Willumsen, B., Weber, M., Wolffman, A. Complexes of Ras \times GTP with Raf-1 and mitogen-activated protein kinase kinase. *Science* 1993, 260: 1658-1661
- Morrison, S. *In vitro* antibodies: strategies for production and application *Annu Rev Immunol* 1992, 10: 239-265
- Nava, G., Ocadiz, R., Ortega, V., Alfaro, G. Damage in $\beta 2m$ genes and DNA methylation of H-2 genes are involved in the loss of expression of class I MHC products on the membrane of LR4, a cell line derivative of the T-cell lymphoma L5178Y. *Eur J Immunogenet* 1992, 19: 141-158
- Nevins, J. Disruption of cell-cycle control by viral oncoproteins. *Biochem Society Transactions* 1993, 21: 935-938
- Norbury, C., Nurse, P. *Animal cell cycles and their control. Annu Rev Biochem* 1992, 61: 441-470
- Oliner, J. Discerning the function of p53 by examining its molecular interactions. *BioEssays* 1993, 15: 703-707
- Olson, M., Ashworth, A., Hall, A. An essential role for Rho, Rac and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1. *Science* 1995, 269: 1270-1272
- Pardoll, D. New strategies for enhancing the immunogenicity of tumors. *Curr Op Immunol* 1993, 5: 719-725
- Paul, W. *Fundamental Immunology. Third Edition. Raven Press, Ltd., New York* 1993
- Press, M., Cordon-Cardo, C., Slamon, D. Expression of HER2/neu protooncogene in normal human adult and fetal tissues. *Oncogene* 1990, 5: 953
- Pines, J. Cyclins and their associated cyclin-dependent kinases in the human cell cycle. *Biochem Society Transactions* 1993, 21: 921-925
- Prendergast, G., Khosravi-Far, R., Solski, P., Kurzawa, H., Lebowitz, P., Der, Ch. Critical role of Rho in cell transformation by oncogenic Ras. *Oncogene* 1995, 10: 2289-2296
- Reisfeld, R. Immunochemical characterization of human tumor antigens. *Seminar Oncology* 1986, 13: 153-164
- Rettig, W. Immunogenetics of cell surface antigens of human cancer. *Curr Op Immunol* 1992, 4: 630-640
- Robbins, P., El-Gamil, M., Li, Y., Kawakami, Y., Loftus, D., Appella, E., Rosenberg, S. A mutated beta-catenin gene encodes a melanoma-specific antigen recognized by tumor infiltrating lymphocytes. *J Exp Med* 1996, 183: 1185-1192
- Rodriguez-Thomas, B. Keystone symposium on complex carbohydrates in biology and medicine: cancer. *Cancer Res* 1995, 55: 450-453
- Rosen, S. Cell surface lectins in the immune system. *Seminars Immunol* 1993, 5: 237-247
- Roth, C. Immune response against tumors. *Adv Immunol* 1994, 57: 281-351
- Schreiber, H., et al. Unique tumor-specific antigens. *Annu Rev Immunol* 1988, 6: 465-483
- Schulz, G., Cheresh, D., Varki, N. Detection of ganglioside GD₂ in tumor tissues and neuroblastoma patients. *Cancer Res* 1984, 44: 5914-5920
- Sheldrick, K., Carr, A. Feedback controls and G2 checkpoints: fission yeast as a model system. *BioEssays* 1993, 15: 775-781
- Shin, C., Ebner, KE., Hudson, BG., Carraway, KL. Membrane glycoprotein differences between normal lactating mammary tissue and the R3230 AC mammary tumor. *Cancer Res* 1975, 35: 1135-1140
- Shirasawa, S., Furuse, M., Yokoyama, N., Sasazuki, T. Altered growth of human colon cancer cell lines disrupted at activated Ki-ras. *Science* 1993, 260: 85-87
- Singer, N., Todd, R., Fox, D. Structures on the cell surface. *Arthritis and Rheumatism* 1994, 37: 1245-1248
- Skipper, J., Stauss, H. Identification of two cytotoxic T lymphocytes-recognized epitopes in the ras protein. *J Exp Med* 1993, 177: 1493-1498

- Srivastava, P. Protein tumor antigens. *Curr Op Immunol* 1991, 3: 654-658
- Srivastava, P., Old, L. Individually distinct transplantation antigens of chemically induced mouse tumors. *Immunol Today* 1988, 9: 78-83
- Stahl, N. The alphas, betas, and kinases of cytokine receptor complexes. *Cell* 1993, 74: 587-590
- Tanaka, K., et al. Role of the major histocompatibility complex class I antigens in tumor growth and metastasis. *Ann Rev Immunol* 1988, 6: 359-380
- Thom, D., Powell, A., Lloyd, C., Rees, D. Rapid Isolation of Plasma membranes in High yield from cultured fibroblasts. *Biochem J* 1977, 168: 187-194
- Tsomidis, T., Eisen, H. T-cell antigens in cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, 91: 3487-3489
- Traversari, C., Van der Bruggen, P., Lescher, I., Lurquin, C., Chomez, P., Van Pel, A., Amar-Costesec, A., Boon, T. A nonapeptide encoded by human gene *MAGE-1* is recognized on HLA-A1 by cytolytic T lymphocytes directed against tumor antigen MZ2-E. *J Exp Med* 1992, 176: 1453-1457
- Udono, H., Srivastava, P. Comparison of tumor-specific immunogenecities of stress-induced proteins gp96, hsp90, and hsp70. *J Immunol* 1994, 152: 5398-5403
- Urban, J. Tumor antigens. *Annu Rev Immunol* 1992, 10: 617-644
- Valius, M., Kazlauskas, A. Phospholipase C-gamma1 and phosphatidylinositol 3 kinase are the downstream mediators of the PDGF receptor's mitogenic signal. *Cell* 1993, 73: 321-334
- Van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Pien, E., Van den Eynde, B., Knuth, A., Boon, T. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 1991, 12: 337-365
- Van der Bruggen, P., Bastin, J., Gajewski, T., Coulie, P., Böel, P., De Smet, C., Traversari, C., Townsend, A., Boon, T. A peptide encoded by human gene *MAGE-3* and presented by HLA-A2 induces cytolytic T lymphocytes that recognize tumor cells expressing *MAGE-3*. *Eur J Immunol* 1994, 24: 3038-3043
- VanDenderen, J., Hermans, A., Meeuwssen, T., Troelstra, C., Zegers, N., Boersma, W., Grosveld, G., VanEwijk, W. Antibody recognition of the tumor-specific *bcr/abl* joining region in chronic myeloid leukemia. *J Exp Med* 1999, 169: 87
- Van den Eynde, B., Lethe, B., VanPel, A., DePiaen, E., Boon, T. The gene coding for a major tumor rejection antigen of tumor P815 is identical to the normal gene of syngeneic DBA/2 mice. *J Exp Med* 1991, 173: 1373-1384
- Van den Eynde, B., Brichard, V. New tumor antigens recognized by T cells. *Curr Opin Immunol* 1995, 7: 674-681
- Verástegui E, Del Rio., Ortega, V., Alfaro, G. Specific recognition and rejection of the H-2 deficient cell line LR4 by C57BL/6J mice. *Eur J Immunogenet* 1977, 24: 93-103
- Vijayasaradhi, S., Houghton, A. Purification of an autoantigenic 75-kDa human melanosomal glycoprotein. *Int J Cancer* 1991, 47: 298-303
- Walton, K. Protein tyrosine phosphatases. *Annu Rev Biochem* 1993, 62: 101-120
- Wang, R., Parkhurst, M., Kawakami, Y., Robbins, P., Rosenberg, S. Utilization of an alternative open reading frame of a normal gene in generating a novel cancer antigen. *J Exp Med* 1996, 183: 1131-1140
- White, M., Nicolette, Ch., Minden, A., Polverino, A., Van Aelst, L., Karin, M., Wigler, M. Multiple Ras functions can contribute to mammalian cell transformation. *Cell* 1995, 80: 533-541
- Williams, A. The immunoglobulin superfamily-domains for cell surface recognition. *Annu Rev Immunol* 1988, 6: 381-405
- Wisoki, L., Sato, V. Panning for lymphocytes: a method for cell selection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978, 75: 2844

Wölfel, T., Haurer, M., Schneider, J., Serrano, M., Wölfel, C., Klehmann-Hieb, E., De Plaen, E., Hankeln, T., Meyer zum Büchenfelde, K., Beach, D. A p16^{INK4a}-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science* 1995, 269: 1281-1284

Wong, A., et al. Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992, 89: 2965-2969

Wright, M. The ins and outs of the transmembrane 4 superfamily. *Immunol Today* 1994, 15: 588-594

Yanuck, M., Carbone, D., Pendleton, C., Tsukui, T., Winters, S., Minna, J., Berzofsky, J. A mutant p53 tumor suppressor protein is a target for peptide induced CD8+ cytotoxic T-cells. *Cancer Res* 1993, 53: 3257

Yoshinari, K., Kimura, H., Arai, K., Sugawara, I., Noda, K., Kihara, M., Misaki, H., Yamaguchi, Y. Generation of human monoclonal antibodies recognizing membranous antigens of the lung adenocarcinoma cell line A549 using an AMeX immunohistostaining method. *Br J Cancer* 1996, 74: 359-367

Zannettino, A., Rayner, J., Ashman, J., Gonda, T., Simmons, P. A powerful new technique for isolating genes coding cell surface antigens using retroviral expression cloning. *J Immunol* 1996, 156: 611-620