

UCH - FC
Biotecnología
V 207
C-1



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS

Utilización de células dendríticas para la obtención de anticuerpos monoclonales contra proteínas poco inmunogénicas.

Memoria de Título

Entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al Título de

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR

POR

PABLO ANTONIO VARGAS CONTRERAS

Noviembre, 2003

Santiago – Chile



DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARÍA ROSA BONO



UTILIZACIÓN DE CÉLULAS DENTRÍICAS PARA LA OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA PROTEÍNAS POCO INMUNOGÉNICAS.

Memoria de Título entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

PABLO ANTONIO VARGAS CONTRERAS

Directora de Memoria de Título
Dra. María Rosa Bono

Handwritten signature of Dra. María Rosa Bono in blue ink.

Comisión de Evaluación de la Memoria de Título

Dr. Marco Tulio Nuñez González

Presidente Comisión

Handwritten signature of Dr. Marco Tulio Nuñez González in blue ink.

Dr. Arturo Ferreira Vigouroux

Handwritten signature of Dr. Arturo Ferreira Vigouroux in blue ink.

Santiago de Chile, Diciembre 2003

*“Las palabras decidieron el curso
de las acciones, tal como suele
ocurrir en esta vida”.*

J. Cortázar.

AGRADECIMIENTOS

“Sin duda alguna debo agradecer a mucha gente muchas cosas que han sido importantes para mi en el transcurso de mi carrera. Primero a mi familia, en especial mis padres (que pena que no este mi abueli) por apoyarme siempre, en todo aspecto. Muchas veces he pensado que les costo mas a ellos que a mi terminar la carrera. Quiero agradecer también a mis profesores, especialmente aquellos involucrados directamente en lo que es esta tesis, Maria Rosa y Mario, que me brindaron además de apoyo académico apoyo personal. Tal vez no se note, pero lo agradezco profundamente. Junto a ellos debo mencionar a toda le gente que forma parte de la “familia de inmunología”, que han hecho de mi paso por el lab una experiencia tan amena que aún paso metido ahí todo el día... Gracias Leo, Cortés, Lily, Paula, Saumin, Michea, Pino, Feña, Carola, Eva, Rene.

Para mi además se cierra un capítulo importante este día, han sido mas de 6 años en que he compartido con mucha gente, donde tengo la suerte de tener muchos amigos. Gracias “peque” por hacerme reír y por crearme un mundo aparte, al gil del Nilo y a la Diana por recibirme siempre, gracias a las... niñas, por ser como son. Gracias a los vagos de OPA, especialmente al Ale, Esparza, Raúl, Chuki, Omar y Chili, por ser mis amigos y por compartir infinidad de discusiones filosóficas después de cada “carrete”.

Gracias a todos por hacer de mi paso por la facultad la mejor experiencia de mi vida.”

ÍNDICE GENERAL

Página

AGRADECIMIENTOS.....	III
ÍNDICE GENERAL	IV
ÍNDICE DE TABLAS.....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
ABREVIATURAS.....	VII
ABREVIATURAS.....	VII
RESUMEN	IX
ABSTRACT	XI
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS	8
2.1 PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE FUSIÓN.....	8
2.2 TRANSFECCIONES.....	9
2.3 AISLAMIENTO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS DESDE BAZOS DE RATONES BALB/c.....	9
2.4 CITOMETRÍA DE FLUJO	11
2.5 ACOPLAMIENTO DE PÉPTIDO DE CIITA A BSA Y BLUE CARRIER®.....	11
2.6 INMUNIZACIONES.....	12
2.6.1 Inmunización Convencional	12
2.6.2 Inmunización con CDs.....	12
2.6.3 Inmunización Genética.....	13
2.7 FUSIONES.....	14
2.8.1 ELISA.....	16
2.8.2 Inmunoblot.....	17
2.9 SUBCLONAMIENTO DE LOS HIBRIDOMAS.....	18
2.10 INMUNOPRECIPITACIONES	19
3. RESULTADOS	20
3.1 PREPARACIÓN DE PROTEÍNAS DE FUSIÓN.....	20
3.2 AISLAMIENTO DE CDs DESDE EL BAZO DE RATONES BALB/c.....	20
3.3 COMPARACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL ANTI-CIITA EN RATONES INMUNIZADOS POR DIFERENTES MÉTODOS.....	24
3.3.1 Comparación de los sueros de ratones inmunizados con células dendríticas con aquellos producidos por inmunización tradicional.....	24
3.3.2 Comparación de los sueros de ratones inmunizados con células dendríticas con aquellos producidos por inmunización genética.....	26
3.3.3 Comparación de los sueros de ratones inmunizados con CDs cargadas con un péptido de CIITA o el péptido acoplado a una proteína portadora.....	28
3.4 CARACTERIZACIÓN POR WESTERN BLOT DE LOS SUEROS DE RATONES INMUNIZADOS CON CÉLULAS DENDRÍTICAS.....	30
3.5 LA INMUNIZACIÓN CON CÉLULAS DENDRÍTICAS PULSADAS CON CIITA INDUCE LA PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS CONTRA LA PROTEÍNA DE ISOTIPOS IGG1, IGG2A E IGG2B.....	31
3.6 PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA CIITA.....	35

3.7 CARACTERIZACIÓN DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-CIITA.....	35
3.8 UTILIZACIÓN DE LOS DISTINTOS ANTICUERPOS MONOCLONALES PARA VISUALIZAR LAS DIFERENTES FORMAS DE LA PROTEÍNA CIITA.....	36
4. DISCUSIÓN.....	40
5. CONCLUSIONES.....	47
6. REFERENCIAS	48

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
TABLA 1. PLASMIDIOS UTILIZADOS PARA LA INMUNIZACIÓN GENÉTICA.	15
TABLA 2. ISOTIPO DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-CIITA GENERADOS.	37

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1. ESQUEMA DE LAS ISOFORMAS TEÓRICAS DE CIITA Y FRAGMENTOS RECOMBINANTES UTILIZADOS.	22
FIGURA 2. CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS AISLADAS DE BAZO DE RATONES BALB/C.	23
FIGURA 3. COMPARACIÓN POR ELISA DE SUEROS DE RATONES INMUNIZADOS CON CDS O POR LOS MÉTODOS TRADICIONALES.	25
FIGURA 4. COMPARACIÓN POR ELISA DE SUEROS DE RATONES INMUNIZADOS CON CDS Y CON LOS PLASMIDIOS.	27
FIGURA 5. COMPARACIÓN POR ELISA DE SUEROS DE RATONES INMUNIZADOS CON UN PÉPTIDO DE CIITA ACOPLADO A UNA PROTEÍNA PORTADORA O CARGADO EN CDS.	29
FIGURA 6. INDUCCIÓN DE MHC-II EN CÉLULAS HELA 7A TRANSFECTADAS CON EL GEN DE CIITA.	32
FIGURA 7. COMPARACIÓN POR INMUNOBLOT DE SUEROS DE RATONES INMUNIZADOS CON O SIN CDS.	33
FIGURA 8. DETERMINACIÓN DE LOS ISOTIPOS DE ANTICUERPOS INDUCIDOS POR LA INMUNIZACIÓN CON CÉLULAS DENDRÍTICAS.	34
FIGURA 9. INMUNOPRECIPITACIÓN DE CIITA CON LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES GENERADOS MEDIANTE INMUNIZACIÓN CON CDS.	38
FIGURA 10. DETECCIÓN DE LAS DIFERENTES ISOFORMAS DE LA PROTEÍNA CIITA ENDÓGENA CON UN ANTICUERPO MONOCLONAL GENERADO MEDIANTE INMUNIZACIÓN CON CDS.	39

ABREVIATURAS

aa:	Residuo de aminoácido
AcMo:	Anticuerpos Monoclonales
ELISA:	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
BLS:	<i>Bare Lymphocyte Syndrome</i>
CDs:	Células Dendríticas
FCS:	<i>Fetal calf serum</i>
IPTG:	Isopropil- β -D(-)-tiogalactopiranosido
HBSS:	Solución de Hanks
BSA:	Albúmina sérica bovina
cDNA:	Ácido desoxirribonucleico complementario
CIITA M:	Región media de la proteína CIITA
CIITA CT:	Región carboxilo terminal de la proteína CIITA
DMEM:	<i>Dulbecco's modified Eagle's media</i>
IMDM:	<i>Iscove's modified Dulbecco's medium</i>
DNA:	Ácido desoxirribonucleico
DTT:	Ditiotreitol
EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético
FITC:	Isotiocianato de fluoresceína
Hepes:	Ácido (N-[2-hidroxietil] piperazina-N'-[2-etanosulfónico])
LB:	Linfocito B
LT:	Linfocito T
MNC:	Células mononucleares
GM-CSF:	Factor estimulador de colonias granulocíticas y monocíticas

TMB:	Tetra metil benzidina
EGTA:	<i>ethylene glycol-bis tetraacetic acid</i>
PMSF:	<i>Phenylmethylsulfonyl Fluoride</i>
rpm:	Revoluciones por minuto
KLH:	<i>Keyhole limpet hemocyanin</i>
MHC-II:	Complejo principal de histocompatibilidad de clase II
pb:	Pares de bases
PBS:	Tampón fosfato salino
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
PE:	Ficoeritrina
RNA:	Ácido ribonucleico
TBE:	Tampón tris-borato-EDTA
UK:	Unidades Kunitz
UM:	Unidades Mandl

RESUMEN

Las células dendríticas (DC) son consideradas centrales en la respuesta inmune ya que son las únicas capaces de activar células T vírgenes e iniciar una respuesta inmune primaria. Las células presentadoras de antígeno (APC) más eficientes del sistema inmune son las DC, las cuales se especializan en capturar y procesar antígenos para luego presentarlos, en los órganos linfoides secundarios, a los linfocitos T (LT). Un grupo de estos LT (LT CD4) tiene un rol fundamental en la respuesta inmune humoral ya que su interacción con los linfocitos B (LB) desencadena la producción de anticuerpos.

Estas características de las DC han hecho que sean usadas para generar inmunidad específica contra melanomas, infecciones virales y como co-adyuvantes *in vivo* para producir activación específica de linfocitos T y B.

En esta tesis se utilizaron CDs para aumentar la respuesta inmune mediada por células B contra una proteína poco inmunogénica. Para esto se eligió una proteína en estudio en el laboratorio y que es de gran relevancia en el contexto del sistema inmune, CIITA, el transactivador del complejo principal de histocompatibilidad de clase II (MHC II), proteína contra la cual ha sido extremadamente difícil producir anticuerpos.

Los resultados obtenidos muestran que al comparar distintos protocolos de inmunización, sólo las CDs cargadas *in vitro* con la proteína recombinante son capaces de producir un alto título de anticuerpos contra CIITA. Además, aunque al realizar fusiones para generar anticuerpos monoclonales siempre se obtuvieron hibridomas, independiente del sistema utilizado para inmunizar los ratones, sólo la inmunización con CDs generó hibridomas productores de anticuerpos que reconocen la proteína CIITA.

En base a estos datos se plantea la utilización de DC como adyuvante para una inmunización eficaz en la producción de anticuerpos monoclonales contra antígenos poco inmunogénicos.

ABSTRACT

Dendritic cells (DCs) are central in the immune response since they are the only cells able to activate naive T cells and to elicit a primary immune response. As the most potent antigen presenting cells (APC) in the immune system, DCs specialize in the capture and processing of antigens that will be presented to T lymphocytes (LT) as immunogenic peptides in secondary lymphoid organs. A group of these activated LT (LT CD4) have a fundamental role in the humoral immune response through their interaction with B lymphocytes (LB) to unchain the production of antibodies.

For their function in the immune system, DCs have been used to generate specific immunity against melanomas and viral infections and as adjuvants for the specific activation T and B lymphocytes *in vivo*.

This thesis shows that through the use of DCs one can increase the immune response mediated by B cells against a poor immunogenic protein. With this purpose, we chose a protein presently in study in the laboratory that is highly relevant in the context of the immune system, CIITA, the transactivator of the main histocompatibility complex of class II (MHC II).

The results show that among the different immunization protocols used, only the use of DCs loaded with the immunogen *in vitro* are able to produce a high title of antibodies against CIITA. Also, although all fusions generated hybridomas irrespectively of the immunization protocol, only the immunization with DCs generated hybridomas producing antibodies capable of recognizing the CIITA protein.

Based on these data we propose the use of DCs as a method for effective immunization for the production of monoclonal antibodies against poor immunogenic antigens.

1. INTRODUCCIÓN

Los anticuerpos monoclonales (AcMos) constituyen una de las herramientas más versátiles y útiles para el desarrollo de la investigación biomédica básica, siendo además actualmente esenciales en el área de diagnóstico y tratamiento de distintas patologías, las que van desde enfermedades infecciosas hasta cáncer. Es por esto que desde su descubrimiento (Köhler y Milstein, 1975) se han desarrollado distintas estrategias destinadas a hacer más eficiente el proceso de producción de anticuerpos monoclonales.

La producción de anticuerpos monoclonales es un proceso estandarizado que se divide en al menos 3 etapas importantes: la inmunización, la fusión y la selección. La inmunización consiste en inyectar los ratones con el antígeno de interés. En esta etapa es importante la naturaleza y dosis del antígeno, el estado físico en que éste se encuentra, el número de inmunizaciones y también la vía de inoculación (intraperitoneal, subcutánea o intravenosa). Una vez que se ha inducido en los ratones una respuesta inmune humoral importante contra el antígeno de interés, se procede a la segunda etapa que corresponde a la fusión. Ésta consiste en generar híbridos entre linfocitos de bazo del ratón inmune con células de mieloma murino, adquiriendo estos híbridos características de ambas líneas parentales. De las células del bazo (linfocitos B) adquieren la capacidad de producir anticuerpos (el mismo anticuerpo que produce la célula B original), mientras que de la célula de mieloma obtienen la capacidad de dividirse indefinidamente (inmortalidad). Estos híbridos se llaman hibridomas. El método de fusión celular se ha estandarizado y depende en gran parte de la habilidad del experimentador para llevar a cabo el proceso. En esta etapa es importante la capacidad del suero fetal para soportar el crecimiento clonal de los híbridos. Por lo

tanto es muy importante la preselección del suero para inducir la producción de anticuerpos. Después de obtenidos los hibridomas se procede a la selección. Este proceso consiste en identificar los híbridos que producen los anticuerpos que reconocen el antígeno de interés mediante algún tipo de inmuno-ensayo (ELISA, inmunofluorescencia, inmunoblot, etc.). El método mas adecuado de selección debe ser rápido y específico y debe considerar el uso posterior que se les dará a los anticuerpos. Esta es una etapa laboriosa pero absolutamente controlable. Una vez seleccionados los hibridomas de interés es necesario clonar estos híbridos para asegurarse la selección de un clon único. Los anticuerpos son obtenidos de los medios de cultivo de los hibridomas o bien expandiendo el hibridoma *in vivo* para generar líquido ascítico. Esta última parte del proceso generalmente no presenta inconvenientes, aunque la estabilidad de los hibridomas no es posible de controlar.

El éxito en la producción de los AcMos depende en gran parte del protocolo de inmunización de los animales. Es así como proteínas poco inmunogénicas, o bien muy conservadas en la evolución, pueden provocar una baja respuesta inmune humoral en el animal. Entre las estrategias que existen destinadas a generar respuesta inmune contra este tipo de antígeno se cuenta la utilización, como inmunógenos, de fragmentos peptídicos de la proteína mezclado con algún adyuvante que potencie la respuesta inmune o en su defecto el uso de péptidos pequeños, propios del antígeno de interés, acoplados a proteínas altamente inmunogénicas (por ejemplo KLH o BSA).

Numerosas han sido las estrategias desarrolladas para solucionar el problema de la poca inmunogenicidad de algunos antígenos, sin embargo existen casos en que persisten los problemas para generar los anticuerpos monoclonales. Un caso concreto ocurre con la proteína CIITA, el transactivador de las moléculas del complejo principal

de histocompatibilidad de clase II (MHC-II), contra la cual el proceso de desarrollo de AcMos ha resultado muy difícil.

Uno de los problemas centrales de la inmunología es entender los mecanismos que regulan la expresión de las moléculas de MHC-II, las cuales están encargadas de presentar los antígenos a los LT de ayuda. CIITA es un factor esencial para la expresión de las moléculas MHC-II que actúa a nivel transcripcional. Originalmente CIITA fue identificado hace ya una década (Steimle y col., 1993) en experimentos de complementación con líneas celulares provenientes de pacientes que presentaban el síndrome de linfocito desnudo o BLS ("Bare Lymphocyte Síndrome"). En esta enfermedad, los pacientes manifiestan deficiencias inmunológicas severas debido a la carencia en la expresión de MHC-II tanto constitutiva como inducible. En líneas celulares provenientes de un grupo de pacientes BLS se descubrió que la introducción de CIITA induce la expresión de los genes del MHC-II (Bradley y col., 1997; Chang y col., 1994; Chin y col., 1994; Steimle y col., 1994). Actualmente CIITA es considerado el gen maestro de la expresión de las moléculas MHC-II. El gen que codifica para CIITA ha sido completamente secuenciado y se conoce su regulación a nivel transcripcional. La proteína CIITA es codificada por un gen con características muy particulares ya que posee varios sitios diferentes de iniciación de la transcripción con características funcionales distintas. Existen tres promotores, utilizados por diferentes tipos celulares, que promoverían la expresión de 3 isoformas de CIITA de distinto tamaño. Las células dendríticas usan principalmente el promotor I, lo que generaría una proteína de 1235 aa, los linfocitos B utilizan el promotor III, generando una proteína de 1130 aa, en cambio las células inducidas por IFN- γ inducirían una isoforma de 1106 aa, derivada del promotor IV, que es común para todas las isoformas de CIITA (Lennon y col., 1997; Muhlethaler-Mottet y col., 1997; Barbieri y col., 2002).

CIITA ha sido bien caracterizado a nivel genético, pero a nivel de la proteína los avances han sido menores debido principalmente a la dificultad de producir anticuerpos contra esta proteína.

La generación de AcMos anti-CIITA es de gran importancia debido a que éstos permitirían realizar estudios, por ejemplo, de localización subcelular de la proteína, análisis de expresión celular en células normales y mutantes para la expresión de CIITA así como estudios de modificación postraduccional de la misma, entre otros.

Nuestro laboratorio ha hecho numerosos intentos para producir anticuerpos monoclonales contra CIITA. Las dificultades para generar dichos anticuerpos radican, en nuestra experiencia, principalmente debido a la baja inmunogenicidad de CIITA, lo que probablemente se debe a que es una proteína intracelular muy conservada entre especies, teniéndose entre humanos y ratones un 75% de homología y un 67% de identidad. Además CIITA es un factor de transcripción que está presente en muy bajas cantidades en las células, lo que hace difícil el diseño de un método de selección de los anticuerpos. En este trabajo empleamos un método alternativo para mejorar el protocolo de inmunización, y de esta manera logramos generar anticuerpos monoclonales contra CIITA. La novedad del método consiste en utilizar células dendríticas (CDs) aisladas y cargadas *in vitro* con CIITA, las cuales se reinfunden en los animales estimulando de esta forma más eficientemente el sistema inmune del ratón.

Las CDs, iniciadoras y moduladoras de la respuesta inmune, son las únicas capaces de estimular a los linfocitos T vírgenes en una respuesta primaria (Thery y Amigorena, 2001). Ellas constituyen un grupo heterogéneo de células que se encuentran en los órganos linfoides secundarios y en la periferia, en distintos estadios de diferenciación y maduración. Estas células ejercen un rol central en el sistema inmune regulando la

actividad de los linfocitos B y T, encargados de la respuesta humoral y celular respectivamente. Las CDs tienen dos propiedades fundamentales que son procesar y presentar antígenos, dependiendo ambas de su estado de madurez. Las CDs inmaduras se ubican preferentemente en la periferia donde captan y procesan antígenos eficientemente, pero son malas presentadoras de antígeno debido a la baja expresión de las moléculas MHC. En cambio las CDs maduras, que se ubican en los órganos linfoides secundarios, son excelentes células presentadoras, pero captan y procesan antígenos deficientemente (Banchereau y col., 2000).

El desarrollo de la respuesta inmune primaria ocurre en los órganos linfoides secundarios, donde los linfocitos T son estimulados mediante la presentación del antígeno por las células encargadas de la presentación antigénica, muy probablemente CDs. Las CDs activan a los 2 tipos principales de células T: los linfocitos T CD8+ y T CD4+. La activación de los primeros se produce por la presentación a los linfocitos de péptidos derivados de antígenos intracelulares en las moléculas de MHC de clase I, lo cual lleva al desarrollo de una actividad citotóxica por parte de los linfocitos T CD8+ sobre células blanco, lo que forma parte de la llamada respuesta inmune celular. Por otra parte, la activación de las células T CD4+ se produce principalmente por la presentación de péptidos derivados de antígenos extracelulares en las moléculas MHC de clase II. Los linfocitos se diferencian y secretan patrones particulares de citoquinas, dependiendo en gran parte del antígeno que inició la respuesta, provocando, entre otras cosas, la activación de los linfocitos B y la producción de anticuerpos.

Por otra parte, las CDs han sido ampliamente utilizadas para estimular inmunidad contra enfermedades que van desde infecciones virales hasta cáncer. Se ha señalado también que las CDs se podrían comportar como un adyuvante fisiológico en el desarrollo de una respuesta inmune humoral (Sornasse y col., 1992). En este trabajo

se demostró que la inmunización con CDs purificadas, pulsadas con antígenos solubles, es más eficiente que la inyección del antígeno en presencia de adyuvantes. Existen evidencias de que la expansión de las CDs *in vivo* en ratones, mediante tratamiento con Flt3-L, puede aumentar la respuesta humoral contra determinados antígenos en comparación con métodos que incluyen coadyuvantes tóxicos (Pulendran y col., 1998), aunque esto no evita los problemas limitantes de la respuesta inmune *in vivo*, como son la tolerancia o la baja respuesta inmune contra ciertas proteínas, limitándose a ser un adyuvante natural no tóxico. Por lo demás, otros trabajos señalan que esta expansión de CDs podría ser también inductora de tolerancia en la respuesta humoral (Viney y col., 1998).

Sobre la base de estos antecedentes postulamos que para el caso de proteínas poco inmunogénicas, como es CIITA, la inmunización con células dendríticas cargadas *ex vivo* con la proteína induciría una mejor respuesta inmune humoral contra ésta. Este protocolo de inmunización podría ser usado para producir anticuerpos monoclonales.

HIPÓTESIS

Células dendríticas purificadas cargadas con una proteína soluble pueden ser usadas para inmunizar ratones con una proteína poco inmunogénica mejorando la eficiencia de la inmunización y la generación de hibridomas específicos.

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un método de inmunización para la obtención de anticuerpos monoclonales contra proteínas poco inmunogénicas como el transactivador CIITA humano.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Comparar los sueros de ratones inmunizados con células dendríticas pulsadas con fragmentos de la proteína CIITA humana recombinante, con los sueros de ratones inmunizados por métodos tradicionales.
- II. Producir hibridomas contra CIITA.
- III. Analizar la reactividad de anticuerpos monoclonales anti-CIITA mediante varios ensayos inmunológicos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Producción y purificación de proteínas de fusión.

Dos fragmentos del cDNA de *CIITA* humano se subclonaron en el vector de expresión bacteriano pRSETC (Invitrogen, Life technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.). La región media que codifica para los aminoácidos 465-795 (*CIITA* M) fue clonada directamente cortando desde un vector preexistente que contenía el cDNA de *CIITA* (Steimle y col., 1993) con la enzima *Pst* I y pegando en el sitio *Pst* I del vector pRSETC. La orientación del inserto fue verificada usando PCR. El fragmento carboxilo terminal correspondiente a los aminoácidos 977-1130 (*CIITA* CT) se clonó amplificando una región del cDNA de *CIITA* usando los partidores 5'GGGAAAGCTTGTGCAGACTC 3' sentido y 5'TTGCAGTGAATTCAGATCGCACCACT 3' antisentido, este último conteniendo un sitio de restricción para la enzima *Eco* RI. El fragmento amplificado se digirió con las enzimas de restricción *Bam* HI y *Eco* RI y se clonó en los correspondientes sitios de corte del vector de expresión. Ambos vectores clonados se introdujeron en la cepa *E. coli* BL21(DE3) pLysS. La expresión de los fragmentos de las proteínas de fusión se indujo con 1 mM isopropil-β-D(-)-tiogalactopiranosido (IPTG) por 2-3 horas a 37°C. Después de centrifugar a 3.000g × 15 minutos a 4°C las células obtenidas se resuspendieron en buffer guanidinio (clorhidrato de guanidinio 6 M, Na₂PO₄ 20 mM, NaCl 500mM) pH 7.8 equilibrado a 37°C y se sonicaron con 3 pulsos de 30 segundos a máxima intensidad (Sonicator® Ultrasonic Processor, Misonix, Farmingdale, NY, EE.UU.). Las proteínas de fusión de la fase soluble se purificaron con el Xpress™ System Protein Purification kit (Invitrogen, Life technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.) como indica el fabricante. La concentración de proteínas se midió mediante la reacción

de Bradford (Bio-Rad, Hércules, EE.UU.) y se observó la pureza de las mismas en geles de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturalantes.

2.2 Transfecciones

El gen completo de *CIITA* fue subclonado desde un vector preexistente en el laboratorio que contenía el cDNA de *CIITA* (Steimle y col., 1993) el cual se cortó con las enzimas de restricción *Eco RI* y *Xba I* e insertó en el vector de expresión en mamíferos pFLAG (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.). Posteriormente, células Cos7 se transfectaron con el vector de expresión que codifica para *CIITA* (Cos Flag-*CIITA*) o con el vector vacío (Cos Flag), por medio de electroporación (450 mV, 960 μ F), con un Pulse Controller Plus (Bio-Rad, Hércules, EE.UU.) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

2.3 Aislamiento de células dendríticas desde bazos de ratones BALB/c.

Las células dendríticas fueron aisladas desde bazos de ratones BALB/c siguiendo un protocolo previamente descrito (Ruedl y col., 1996; Iwasaki y Kelsall, 1999). Para obtener una expansión de CDs ratones BALB/c de entre 8-16 semanas se inyectaron subcutáneamente en el lomo con 1×10^7 células de la línea celular de melanoma murino B16 transfectadas con el gen de la citoquina Flt3-L (proporcionadas por el Dr. Hidde Ploegh, Harvard Medical School, Boston, EE.UU.) (Shi y col., 1999). Dos semanas mas tarde, cuando el tamaño del tumor era de ± 2 cm, se aislaron los bazos y las células se disgregaron e incubaron durante 45 minutos a 37°C con agitación suave en presencia de 1200 UM/ml Colagenasa-D (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania) + 400 UK/ml DNAsa-I (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania) en 5 ml de volumen final

de IMDM + 10% FBS (GIBCO BRL, Life Technologies, Bethesda, MD, EE.UU.), suplementado con 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina. Posteriormente el tejido se pasó a través de una malla metálica (90µm) (Thomas Scientific, EE.UU.), y las células obtenidas se centrifugaron a 200 x g por 10 minutos a temperatura ambiente. La suspensión celular se enriqueció en células dendríticas utilizando un gradiente de iodixanol. Para esto las células se resuspendieron en 3 ml de 17% iodixanol (Optiprep® Sigma, St Louis, EE.UU.) en HBSS sin Ca⁺⁺/Mg⁺⁺ (d=1,100 g/ml), sobre estas se agregaron 5 ml de 12% iodixanol preparado en una solución de NaCl 0,88% p/v + 1 mM EDTA + 10 mM Eles + 0.5% BSA, pH 7,2-7,4 (d=1,068 g/ml), y finalmente se agregaron 2 ml de HBSS sin Ca⁺⁺/Mg⁺⁺. La gradiente se centrifugó a 600 x g por 15 min (20 °C, con aceleración y desaceleración lenta) y posteriormente se recuperó la interfase de baja densidad (12% Optiprep-HBSS). Finalizado esto, las células fueron lavadas 2 veces con verseno + 5% FCS (Buffer Macs) a 4°C, y luego incubadas con microesferas anti-CD11c (clon N418) (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) (50 µL/10⁸ MNC en 500 µL de buffer Macs) por 10 min a 4°C con agitación rotatoria (Clausen, Waldburgery col. 1998). Posteriormente, las células se lavaron una vez más con buffer Macs y se resuspendieron a una concentración de 10⁸ MNC por 1 ml de buffer Macs y aisladas usando un magneto (VarioMACS®) y columnas de selección positiva de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania). Finalmente, se recuperó la fracción positiva, la que contenía las CD con una pureza no inferior al 95% medida como el porcentaje de células CD11c+ por citometría de flujo.

2.4 Citometría de Flujo

La pureza y estado de madurez de las CDs fue verificada por citometría de flujo. Para esto las CDs recién aisladas se incubaron con distintas combinaciones de anticuerpos conjugados directamente a fluorocromos diluidos en DMEM + 2% FBS durante 30 min a 4°C en la oscuridad. Todos los anticuerpos se usaron a las diluciones apropiadas, las que fueron determinadas previamente por citometría de flujo. Después de la incubación con los anticuerpos las células se lavaron con PBS + 2% FCS y se resuspendieron en esta misma solución para posterior análisis en un citómetro de flujo FACScan (Becton & Dickinson, San Diego, CA, EE.UU.) utilizando el programa CELLQUEST (Becton & Dickinson, San Diego, CA, EE.UU.). En todos los experimentos se utilizaron los controles de isotipo correspondientes. Los análisis fueron hechos restringiendo los resultados sólo a las células vivas.

2.5 Acoplamiento de péptido de CIITA a BSA y Blue Carrier®.

Se mezclaron 1mg de péptido (726 GEIKDKELPQYLALTR 741) con 1mg de proteína carrier (BSA o Blue Carrier®) disuelta en agua destilada, enseguida se agregaron 400µL de buffer citrato de sodio (0.05M, pH 6,5), 8 µL de glutaraldehído (concentración final 0.1% p/v) y agua hasta completar 2 ml. La mezcla se incubó por 1 hora a temperatura ambiente en la oscuridad. Después de la incubación se dializó la mezcla contra PBS por 1 hora a 4°C, proceso que se repitió 4 veces. Para calcular la eficiencia de acoplamiento entre la proteína y el péptido se midió la concentración final de proteína. Dado que se mezcló 1 mg de péptido con 1 mg de proteína portadora en un total de 2 ml de buffer, si el acoplamiento fue exitoso y todo el péptido se unió a la proteína, se espera una concentración final de 1 mg/ml. Los resultados indican que la



concentración final luego del acoplamiento fue cercana a 1mg/ml determinada mediante la reacción de Bradford (Bio-Rad, Hercules, EE.UU.), lo que indica que la eficiencia de la reacción de unión del péptido con la proteína portadora fue cercana al 100% (datos no mostrados).

2.6 Inmunizaciones

2.6.1 Inmunización Convencional.

Esta inmunización consistió en inyectar intraperitonealmente una emulsión preparada con 50 µg de CIITA M, CIITA CT o 100 µg de la mezcla de proteínas recombinantes en un volumen total de 100µL de PBS emulsionado con 100µL de adyuvante completo de Freund (Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, EE.UU.). Una semana más tarde la misma mezcla de proteína emulsionada fue administrada como refuerzo a todos los ratones, proceso que fue repetido una segunda vez. Luego de las inmunizaciones de refuerzo los ratones se sangraron y sus sueros se analizaron por ELISA para determinar la reactividad contra la proteína.

2.6.2 Inmunización con CDs.

Dos millones de CDs purificadas de bazo de ratones BALB/c se pulsaron por un período de 3 hr a 37°C con una concentración final de 2.5 mM de proteína CIITA M, CIITA CT o una mezcla equimolar de ambas (concentración final de 5 mM). Las CDs tratadas de esta manera se dice que fueron pulsadas o cargadas con la proteína ya que las CDs tienen la capacidad de endocitar proteínas extracelulares. Posteriormente las células se lavaron 2 veces con buffer fosfato salino (PBS) y las células se resuspendieron en 200µL de PBS estéril para luego ser inyectado en forma

intravenosa. En todos los protocolos de inmunización se utilizaron ratones BALB/c de entre 6 y 8 semanas de edad. Para la inmunización con CDs se inyectaron las CDs cargadas con el antígeno por vía intravenosa. Al mismo tiempo se inyectó intraperitonealmente una emulsión preparada con 50 µg de CIITA M, CIITA CT o 100 µg de la mezcla en partes iguales de proteínas recombinantes en un volumen total de 100 µL de PBS emulsionado con 100 µL de adyuvante completo de Freund (Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, EE.UU.). Como control un grupo de ratones se inyectó sólo intraperitonealmente con la proteína emulsionada. Una semana más tarde la misma mezcla de proteína emulsionada fue administrada como refuerzo a todos los ratones, proceso que fue repetido una segunda vez. Los ratones que fueron escogidos para preparar anticuerpos monoclonales recibieron una dosis suplementaria de 25 µg de la proteína de fusión, la cual fue administrada en forma intravenosa 3 días antes de realizar la fusión.

2.6.3 Inmunización Genética.

En el caso de las inmunizaciones genéticas el protocolo consistió en administrar intramuscularmente 50 µg de un plasmidio de expresión para células eucariontes que codifica para la proteína CIITA humana completa. Para ello el DNA plasmidial se diluyó en 100 µl de PBS, administrándose 50 µl de la solución en cada pata trasera del ratón. Además de la inyección de este plasmidio se administraron, al mismo tiempo y en la misma mezcla en que se inyectó el plasmidio codificante de CIITA, 50 µg de un plasmidio que codifica para GM-CSF. Se utilizaron en total 3 plasmidios distintos (pIRES-CIITA, pCMV Tag2a-CIITA, pcDNA 3.1 His-B-CIITA), todos conteniendo el gen completo de CIITA. Cada 7 días se administraron inyecciones de refuerzo con las mismas cantidades de plasmidios con que se inmunizó inicialmente. Al cabo de 2 de

estas inmunizaciones de refuerzo los ratones se sangraron y sus sueros se analizaron por ELISA para ver la especificidad contra la proteína. La lista de los plasmidios utilizados se resume en la tabla 1.

2.7 Fusiones

Tres días después de la última inyección de refuerzo se aislaron las células del bazo de los ratones inmunizados. Para ello las células de bazo se disgregaron por medio de una malla metálica tras lo cual se realizó la lisis de los glóbulos rojos presentes incubando 5 min en presencia de tampón de lisis de globulos rojos (NH_4Cl 0,15 M, KHCO_3 10 mM, Na_2EDTA 0,1 mM, pH 7,2 – 7,4) y centrifugando 300 x g por 5 min a temperatura ambiente. Una vez realizada esta lisis se recuperaron alrededor de 2×10^8 células, las cuales se mezclaron con células del mieloma murino NSO/2 en proporción 5:1. La mezcla de células se lavó una vez con 10 ml de RPMI a 1.200 rpm por 7 min. Se eliminó el sobrenadante y las células se centrifugaron por 2 min a 1.200 rpm para retirar cualquier resto de medio y no diluir el PEG (PEG 4000, Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, EE.UU.). Se soltaron las células resultantes golpeando el tubo suavemente en repetidas oportunidades y luego se agregó gota a gota, en un período de tiempo de 1 min y en agitación, 0.5 ml de una solución de polietilen glicol 50% preparado en medio RPMI sin suero previamente entibiado a 37 °C. Se agitó por 90 seg a 37 °C tras lo cual se agregó 1 ml de medio RPMI, agitando por 30 seg, a temperatura ambiente. Luego 3 ml de RPMI, agitando por 30 seg, a temperatura ambiente y finalmente 16 ml de RPMI, agitando por 60 seg, a temperatura ambiente. Se dejó reposar 5 min y se completó a un volumen final de 40 ml con RPMI sin suero. La suspensión se centrifugó 7 min a 1.200 rpm y se resuspendieron las células suavemente en 10 ml de

Plasmidio	Inserto	Tamaño (kb)	Dosis intramuscular
pIRES	CIITA	6.1	50 µg
pCMV Tag 2A	CIITA	4.3	50 µg
pcDNA 3.1 His B	CIITA	5.5	50 µg
pcDNA 3.1	GM-CSF	5.5	50 µg

Tabla 1.

Plasmidios utilizados para la inmunización genética.

Los plasmidios utilizados para la expresión estable de CIITA y GM-CSF se muestran en la tabla. El gen de CIITA utilizado en estos constructos fue clonado a partir de un vector preexistente (Steimle y col., 1993) y corresponde a la isoforma proveniente del promotor 3. El factor GM-CSF se administró como adyuvante de la respuesta inmune (Donación del Dr. Rosario Billetta, ICBM).

medio selectivo que contenía RPMI + 10% FBS e hipoxantina, aminopterin y timidina (HAT) (Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, EE.UU.). En seguida se completó a 250 ml de medio selectivo y la suspensión de células se distribuyó en 12 placas de 96 pozos de fondo plano (FALCON, Becton & Dickinson, San Diego, CA, EE.UU.).

2.8 Selección de hibridomas.

La selección se realizó en 2 etapas. En una primera selección se utilizó la técnica de ELISA, según se describe mas adelante. Enseguida los hibridomas seleccionados se ensayaron por inmunoblot para determinar la capacidad de los anticuerpos para reconocer la proteína CIITA expresada en forma transiente en células cos7.

2.8.1 ELISA

Para la realización de los ensayos de ELISA, cada pozo de una placa immuno-plate maxisorp F96 (Nunc, Naperville, IL, EE.UU.) se cubrió con 100 μ L de una solución de 6 μ g de proteína recombinante (CIITA M o CT) diluida en 10 ml de *coating buffer* (NaHCO_3 0.33 M, Na_2CO_3 0.66 M, pH 9.5). El antígeno se incubó toda la noche a 4°C. Al día siguiente el antígeno no unido a la placa fue retirado y los sitios libres de la placa se bloquearon por 1 hora a temperatura ambiente con una solución de PBS + 0.1% Tween 20 (Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, EE.UU.) que denominamos en adelante PBST. Luego del bloqueo se agregó a cada pocillo 50 μ L de sobrenadante de cultivo de los hibridomas y se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se lavó la placa 3 veces con PBST y se agregó a cada pozo 100 μ L de anticuerpo de cabra anti-Ig de ratón conjugado con peroxidasa (BD PharMingen, San Diego, CA, EE.UU.), diluido 1:1.000. Se incubó a temperatura ambiente por 1 y se lavó 3 veces con PBST y 2 veces con agua destilada. La placa fue

entonces incubada con 100 μ L de sustrato reactivo proveniente del kit TMB Substrate Reagent Set (BD PharMingen, San Diego, CA, EE.UU.) que reacciona con la peroxidasa dando una solución coloreada. La reacción se detuvo después de transcurridos 20 minutos agregando 50 μ L de H_3PO_4 1 M. La coloración del ensayo de ELISA fue cuantificada midiendo la absorbancia a 450 nm en un espectrofotómetro Emax Precision Microplate Reader (Molecular Devices, Sunnyvale, California, EE.UU.). La selección de los hibridomas de interés se hizo escogiendo aquellos en los cuales el sobrenadante reconocía CIITA M o CIITA CT pero no ambas proteínas. De este modo nos aseguramos que los anticuerpos no estaban reconociendo el fragmento histidina mas otros aminoácidos adicionales que forman parte del sistema de expresión.

2.8.2 Inmunoblot

Para realizar los ensayos de inmunoblot se lisaron las células Cos7 transfectadas en forma transiente con CIITA o con el plasmidio sin inserto en un buffer de lisis completo (10 mM hepes pH 7.9, 400 mM NaCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.1 mM EGTA, 5% glicerol y 0.5% NP40). El extracto total de proteínas obtenidas se centrifugó a 12.000 rpm por 30 min a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se cuantificó usando el kit DC Protein Assay (Bio-Rad Hercules, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente 20 μ g de los extractos celulares diluidos en buffer de muestra 5X caliente (Tris HCl pH 6.8 0.156 M, SDS 6.25%, 2-Beta MercaptoEtanol 12.5%, Glicerol 25% y azul de bromofenol 0.05%) se hirvieron por 5 minutos a 100°C para luego ser cargados en un gel de acrilamida al 6%. Luego de la electroforesis las proteínas del gel se transfirieron desde el gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad Hercules, EEUU.), se realizó por 2 horas a 100 V constantes en buffer de transferencia (Metanol

20%, Tris 25 mM Glicina 0.2 M). Posteriormente se bloquearon los sitios libres con PBST + 5% leche descremada por 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C. Una vez bloqueada la membrana se cortó en tiras, y cada una se incubó por 1 hora a temperatura ambiente con los sobrenadantes de los hibridomas sin diluir o un anticuerpo anti-Flag diluido 1:8.000, el que fue utilizado como control positivo del experimento. Luego de lavar las tiras 3 veces por 10 minutos con PBST, se incubó con un anticuerpo policlonal de oveja acoplado con peroxidasa (Amersham Biosciences AB, Little Chalfont Buckinghamshire, UK) a una dilución 1:10.000 en PBST + 5% leche descremada. La membrana se lavó para eliminar el anticuerpo libre y posteriormente fue revelada en la oscuridad con un kit ECL Plus (Amersham Biosciences AB, Little Chalfont Buckinghamshire, UK) siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.9 Subclonamiento de los Hibridomas.

Con el objeto de asegurarnos de que los anticuerpos obtenidos provienen de una sola colonia, y también para seleccionar clones estables, los hibridomas seleccionados se subclonaron. Para esto cada hibridoma escogido se creció hasta obtener al menos 0.1×10^5 células. Se contaron las células al menos en 5 diluciones independientes de modo de obtener un recuento preciso y posteriormente se diluyeron a una concentración final de 100 células por 20 ml de medio RPMI + 10% FCS y se distribuyeron 200 μ L por pozo en una placa de cultivo de 96 pozos con fondo plano. Al cabo de 2 semanas los sobrenadantes de las colonias únicas (determinado por inspección en el microscopio) se ensayaron por ELISA y los hibridomas positivos ensayados por *western blot* de modo de confirmar la especificidad hacia CIITA.

2.10 Inmunoprecipitaciones

Los extractos proteicos para los experimentos de inmunoprecipitación se prepararon de la misma manera a la descrita en 2.8.2. Para detectar CIITA endógeno se utilizaron 5 mg de proteína de extracto por cada experimento. Para detectar la proteína en células Cos7 transfectadas transientemente sólo 150 µg de extracto fueron necesarios. En todos estos experimentos al extracto proteico se le agregó un cóctel de inhibidores de proteasas consistente en (DTT 1 mM, PMSF 0.4 mM, Aprotinina 3 µg/ml, Leupeptina 3 µg/ml, Pepstatina 0.5 µg/ml) y para eliminar proteínas que se unen en forma inespecífica a la proteína G los extractos proteicos se incubaron por 1 hora a 4°C con 5 µL de suero normal de conejo más de 25 µL de proteína G 50% en PBS (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Suecia). Una vez transcurrido este tiempo se centrifugó el extracto celular a 8.000 RPM por 5 minutos y se recuperó el sobrenadante, el cual se incubó con 5 µL del anticuerpo de interés (suero o líquido ascítico) toda la noche a 4°C. Al día siguiente se agregaron 20 µL de proteína G 50% preparada en PBS y se incubó por 30 min a 4°C con agitación. Transcurrido el tiempo se lavó 4 veces con buffer de lisis completo, pero sin glicerol, centrifugando cada vez a 8.000 rpm por 8 min. Se realizó un lavado final con PBS, se descartó la fracción soluble y el inmunoprecipitado se hirvió con buffer de muestra 5X por 5 min a 100°C. Después de hervir las muestras, estas fueron centrifugadas a 8.000 rpm por 5 min para luego recuperar el sobrenadante y cargarlo en geles de acrilamida al 6%. Las proteínas se transfirieron a nitrocelulosa y el *western blot* se desarrolló siguiendo el protocolo descrito en la sección 2.8.2.

3. RESULTADOS

3.1 Preparación de proteínas de fusión.

Para realizar las inmunizaciones se prepararon dos proteínas de fusión pertenecientes a la región media (CIITA M) y carboxilo terminal (CIITA CT) de la proteína CIITA las cuales fueron clonadas en el vector pHisB. Se usaron 2 fragmentos de la proteína CIITA de modo de generar anticuerpos contra distintas regiones de la misma pero además esto nos permitió disponer de un método específico de selección de los hibridomas. En la figura 1 se muestra un esquema de la ubicación de los fragmentos recombinantes producidos en el contexto de la proteína CIITA completa.

3.2 Aislamiento de CDs desde el bazo de ratones BALB/c.

Para la inmunización de ratones con CDs, éstas se aislaron a partir de bazos de ratones BALB/c. Como la cantidad de CDs presentes normalmente en los distintos tejidos es muy baja, éstas fueron expandidas *in vivo* utilizando un factor de crecimiento de CDs, Flt3-ligando (FL), el que induce una proliferación masiva de las DC maduras. El posterior aislamiento se llevó a cabo mediante selección positiva con MACS anti-CD11c (ver Materiales y Métodos).

La figura 2 muestra un análisis por citometría de flujo de la pureza y el estado de madurez de las CDs aisladas de bazo de ratones BALB/c. La pureza es cercana al 95%, medida como porcentaje de células CD11c⁺ y es representativa de todos los aislamientos realizados. La figura muestra que la expresión de MHC-II en las CDs aisladas es heterogénea, lo que implica que las CDs se encuentran en distintos estados de madurez. Cabe notar que la escala de fluorescencia es logarítmica y que

por lo tanto se encuentran células con media de fluorescencia entre 100 y 1000 unidades arbitrarias para la expresión de MHC-II.

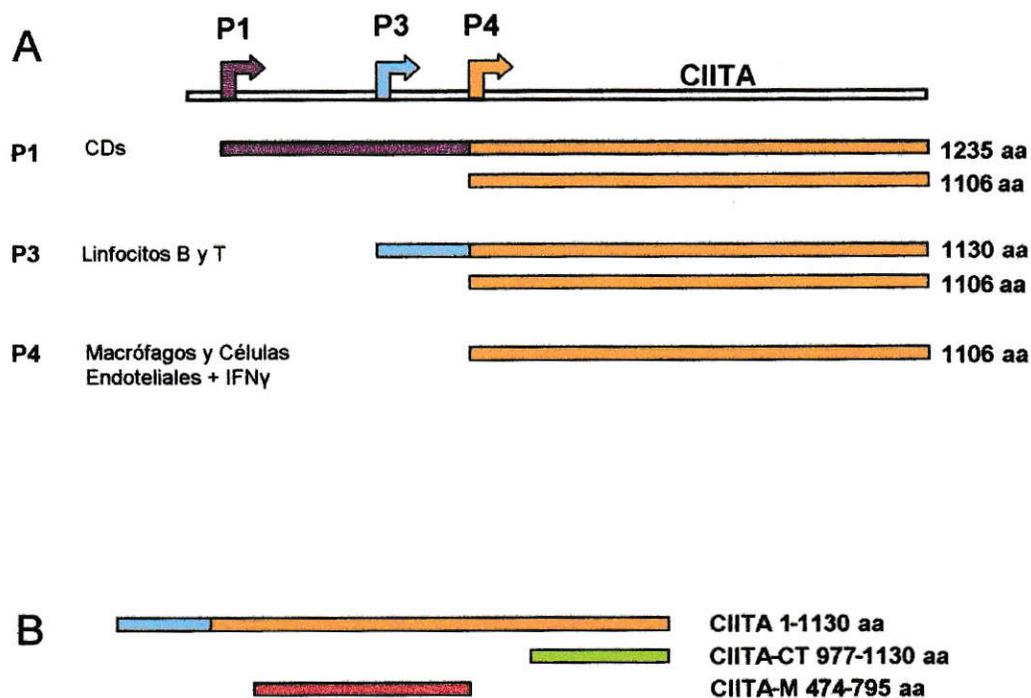


Figura 1.
Esquema de las isoformas teóricas de CIITA y fragmentos recombinantes utilizados.

En la figura A se muestran las isoformas teóricas de CIITA generadas a partir de los tres promotores de la proteína. La forma principal generada a partir del promotor 1 (P1) tiene un largo de 1235 aa y se expresa en CDs, la generada a partir del promotor 2 (P2) es de 1130 aa y se expresa en linfocitos T y B, y la generada a partir del promotor 4 (P4) tiene un largo de 1106 aa y se expresa en varios tipos celulares después de tratarlos con IFN γ . En B se muestran los fragmentos recombinantes utilizados para la generación de los anticuerpos monoclonales anti-CIITA. La región media de la proteína CIITA, con un largo de 321 aa y la región carboxilo terminal de CIITA, con un largo de 153 aa.

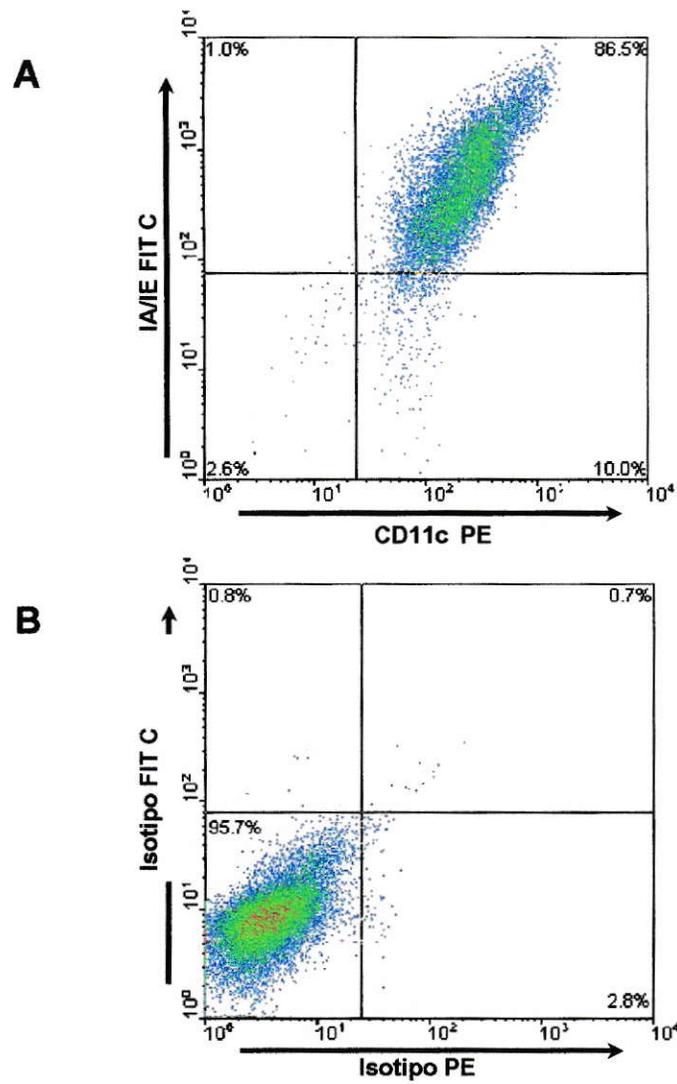


Figura 2.

Caracterización de las CDs aisladas de bazo de ratones BALB/c.

Células dendríticas aisladas desde el bazo de ratones BALB/c mediante selección positiva con microesferas magnéticas CD11c⁺ fueron analizadas mediante citometría de flujo. Las células se tiñeron con CD11c para verificar la pureza y con un anticuerpo anti-MHC-II (I-A/I-E FIT C) para determinar el estado de madurez. En A se muestra que la pureza de las CDs recién aisladas (células CD11c⁺) es superior al 95% (86.5% + 10%), valor representativo de todos los aislamientos realizados. Por otra parte se aprecia entre las CDs una distribución heterogénea de las moléculas de clase II (I-A/I-E), lo que advierte sobre la presencia de células en distintos estados de madurez. En B se muestran los controles de isotipo correspondientes a los anticuerpos usados en A. El porcentaje de células se presenta en cada cuadrante.

3.3 Comparación de la respuesta inmune humoral anti-CIITA en ratones inmunizados por diferentes métodos.

Se usaron varios métodos de inmunización para inmunizar los ratones, los que comprenden métodos tradicionales, inmunización genética e inmunización con células dendríticas cargadas *in vitro* con la proteína de fusión de CIITA.

Los sueros se analizaron por ELISA y *western blot*.

3.3.1 Comparación de los sueros de ratones inmunizados con células dendríticas con aquellos producidos por inmunización tradicional.

En la figura 3 se muestran los resultados obtenidos cuando se usó como inmunógeno una mezcla de las proteínas de fusión CIITA-M y CIITA-CT para pulsar las células dendríticas o bien para ser emulsionadas en adyuvante completo de Freund. La única diferencia en los protocolos de inmunización consistió en la inyección intravenosa adicional de CDs pulsadas con la proteína de fusión a uno de los grupos de ratones. En esta figura se muestra que después de 2 inyecciones de refuerzo los sueros de los ratones inmunizados con CDs presentan un título de anticuerpos contra CIITA notablemente mayor que los sueros de los ratones inmunizados solo intraperitonealmente con la proteína.

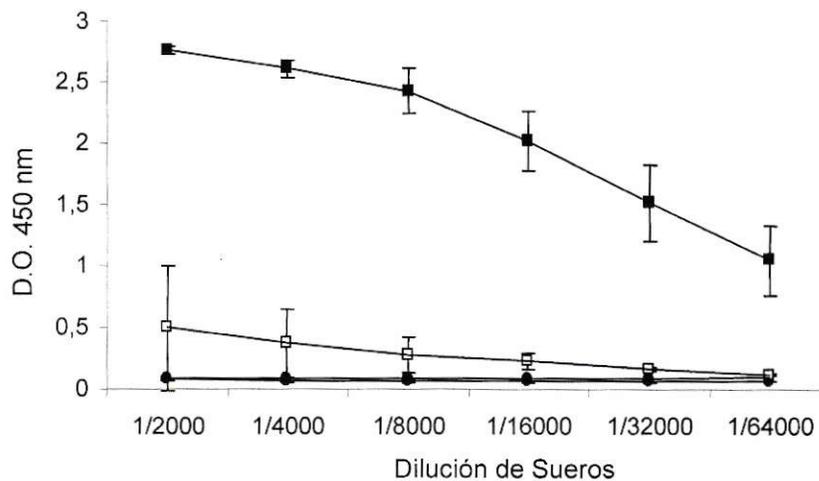


Figura 3.
Comparación por ELISA de sueros de ratones inmunizados con CDs o por los métodos tradicionales.

En la figura se muestran los resultados de ensayos de ELISA de los sueros de ratones inmunizados con el método tradicional versus los inmunizados con las CDs pulsadas con la mezcla de proteínas recombinantes (CIITA M y CT). Después de 2 desafíos intraperitoneales con la mezcla de proteínas recombinantes, los sueros de los ratones inmunizados con las CDs pulsadas (■) reconocen CIITA. Los sueros inmunes de los ratones inmunizados con las proteínas sin CDs (□) presentan una baja respuesta contra la proteína. Como control se muestra que los sueros preinmunes de ambos grupos de ratones (-DC ○, +DC ●) no reconocen CIITA.

3.3.2 Comparación de los sueros de ratones inmunizados con células dendríticas con aquellos producidos por inmunización genética.

Para corroborar la capacidad estimuladora de la respuesta inmune humoral específica contra CIITA se comparó la inmunización con CDs con la inmunización genética. Para ello 3 grupos de ratones se inmunizaron con 3 plasmidios distintos que contenían el gen completo CIITA. El protocolo consistió en inyectar los ratones intramuscularmente cada 7 días con los vectores que contenían el gen de CIITA. Esta inmunización fue acompañada con una inyección, también intramuscular, de un plasmidio codificante para el gen de GM-CSF, el que es utilizado como adyuvante para mejorar la respuesta inmune en este tipo de inmunizaciones. Transcurridos 7 días después del último desafío con los vectores de expresión, los ratones se sangraron y sus sueros se ensayaron por ELISA para luego ser comparados con los sueros de ratones inmunizados con CDs pulsadas con la mezcla de proteínas recombinantes CIITA-M y CIITA-CT. En la figura 4 se muestran estos resultados. Para la inmunización genética se muestra el resultado de solo un vector de expresión (pHIS B 2.1-CIITA), el cual es representativo de los resultados obtenidos con los otros vectores utilizados. En la figura se puede apreciar que sólo la inmunización con CDs es capaz de generar una respuesta inmune importante contra CIITA. Como controles se usaron los respectivos sueros preinmunes.

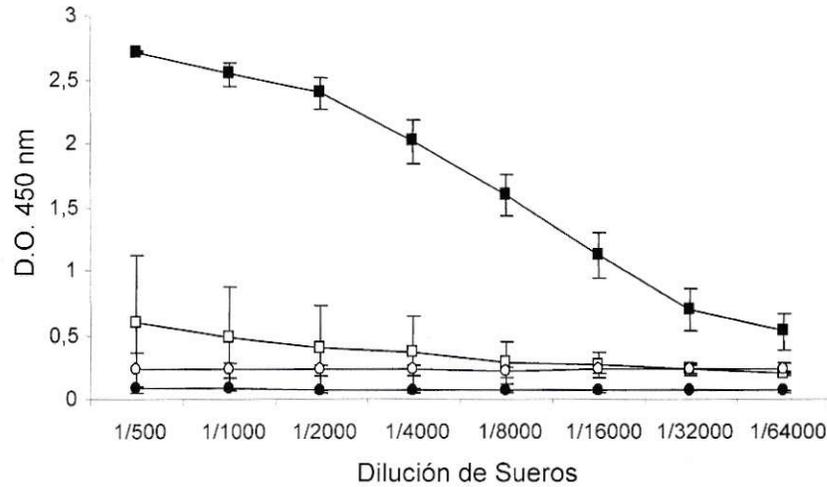


Figura 4.
Comparación por ELISA de sueros de ratones inmunizados con CDs y con los plasmidios.

En la figura se muestra la comparación por ensayos de ELISA de los sueros de ratones inmunizados genéticamente versus los inmunizados con las CDs pulsadas con la mezcla de proteínas recombinantes (CIITA M y CT). Los sueros fueron analizados después de 2 desafíos intraperitoneales con la mezcla de proteínas recombinantes en el caso de la inmunización con CDs, o con dosis intramusculares de los vectores de expresión codificantes para CIITA en el caso de la inmunización genética. Sólo los sueros de los ratones inmunizados con las CDs pulsadas (■) reconocen CIITA. Los sueros de los ratones inmunizados genéticamente (□) presentan una baja respuesta contra la proteína. Como control se usaron los sueros preinmunes de ambos grupos de ratones (+DC ○, genéticamente ●) los cuales no reconocen CIITA. El resultado es representativo de 3 grupos de ratones inmunizados con 3 plasmidios distintos.

3.3.3 Comparación de los sueros de ratones inmunizados con CDs cargadas con un péptido de CIITA o el péptido acoplado a una proteína portadora.

Otros métodos de inmunización utilizados normalmente se basan en la utilización de péptidos pequeños acoplados a proteínas inmunogénicas como BSA o KLH. Para esto se acopló a hemocianina de loco (Blue Carrier®, Pierce, EE.UU.) un péptido de 16 aminoácidos perteneciente a la proteína CIITA (ver Materiales y Métodos), complejo con el cual se inmunizaron ratones BALB/c. Otro grupo de ratones fue inmunizado con CDs pulsadas con el péptido más una inyección intraperitoneal del complejo Blue Carrier®-péptido. Los 2 grupos de ratones recibieron dosis de refuerzo del complejo proteico cada 7 días y luego de 2 inyecciones se sangraron y sus sueros se analizaron por ELISA. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 5 confirmándose que los ratones inmunizados con CDs presentan una mejor respuesta por ensayos de ELISA contra el péptido comparado a los ratones inmunizados con el complejo Blue Carrier®-péptido.

Para asegurarnos que la respuesta es efectivamente contra el péptido de CIITA, en los ensayos de ELISA se utilizó el mismo péptido de CIITA acoplado a otra proteína portadora que fue BSA.

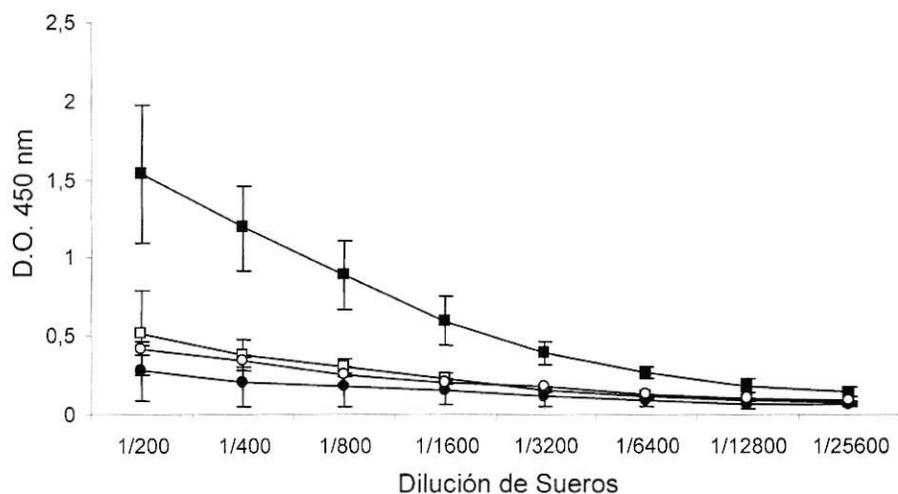


Figura 5.

Comparación por ELISA de sueros de ratones inmunizados con un péptido de CIITA acoplado a una proteína portadora o cargado en CDs.

En la figura se muestran los ensayos de ELISA de los sueros de ratones inmunizados intraperitonealmente con un complejo proteico Blue Carrier®-péptido de CIITA o, además de dicha inmunización, con una dosis de CDs pulsadas con dicho péptido. Después de 2 desafíos intraperitoneales con el complejo Blue Carrier®-péptido sólo los sueros inmunes de los ratones inmunizados con las CDs pulsadas (■) reconocen el péptido de CIITA (acoplado a BSA). Los sueros inmunes de los ratones tratados sólo con inyecciones intraperitoneales (□) no presentan respuesta contra dicho péptido. Como control se usaron los sueros preinmunes de ambos grupos de ratones (-DC ○, +DC ●) los cuales no reconocen el péptido de CIITA.

3.4 Caracterización por *western blot* de los sueros de ratones inmunizados con células dendríticas.

Puesto que CIITA se encuentra en muy baja cantidad en las células que lo expresan ya sea en forma constitutiva o inducible, diseñamos como estrategia para visualizar la proteína, la sobreexpresión de CIITA mediante experimentos de transfección en células Cos7. Para controlar que efectivamente lo que se visualizó por *western blot* correspondía a CIITA se usó una construcción del gen de CIITA humano fusionado a un epitopo Flag, lo que permite visualizar CIITA con un anticuerpo anti-Flag. La construcción Flag-CIITA se transfectó en células Hela 7A para determinar su funcionalidad. En la figura 6 se muestra que las células Hela 7A transfectadas con Flag-CIITA expresan moléculas MHC-II, lo que confirma la funcionalidad de la construcción ya que las células Hela 7A no transfectadas o transfectadas con el vector vacío no expresan MHC-II.

La figura 7 muestra un ensayo de *western blot* de los sueros de ratones inmunizados con CDs pulsadas con CIITA o por el método tradicional, en ambos casos después de 2 inyecciones de refuerzo. Los extractos celulares para realizar este experimento se obtuvieron de células Cos7 transfectadas transientemente con el plasmidio pFlag-CIITA (ver Materiales y Métodos). Como control positivo se utilizó un anticuerpo comercial anti-epitopo Flag. El peso molecular, determinado por comparación a marcadores de peso molecular, corresponde al esperado para la construcción utilizada (~130 KDa). En la misma figura 6 se aprecia que los sueros de ratones inmunizados con CDs reaccionan con una banda del mismo peso molecular que la que reconoce el anticuerpo anti-Flag. Sólo los sueros de los ratones inmunizados con CDs son capaces

de reconocer CIITA, lo que se correlaciona con los datos obtenidos por ensayos de ELISA (figuras 3 y 4).

3.5 La inmunización con células dendríticas pulsadas con CIITA induce la producción de anticuerpos específicos contra la proteína de isotipos IgG1, IgG2a e IgG2b.

Puesto que la inmunización con CDs produce anticuerpos de isotipos bien definidos, se caracterizó el perfil de isotipos de anticuerpos producidos en forma específica contra CIITA por esta inmunización. Para ello los sueros de los ratones inmunizados con CDs se ensayaron utilizando un kit Sigma de determinación isotópica basado en ensayos de ELISA. La figura 8 muestra el patrón isotópico contra CIITA M (figura 8a) y CIITA CT (figura 8b) y en ellos se aprecia un aumento de los isotipos IgG1, IgG2a e IgG2b comparados con los sueros preinmunes de los mismos ratones.

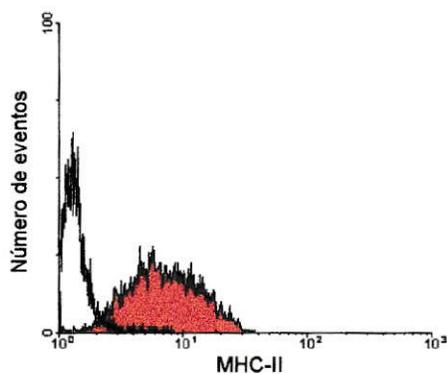


Figura 6.

Inducción de MHC-II en células HeLa 7A transfectadas con el gen de CIITA.

Las células HeLa 7A fueron transfectadas para determinar la funcionalidad del constructo. Las células HeLa 7A transfectadas con el vector codificante para CIITA fueron analizadas mediante citometría de flujo para la expresión de MHC-II utilizando un anticuerpo anti MHC-II. En la figura se muestra que las células transfectadas con CIITA expresan MHC-II (histograma rojo) comparadas a las células transfectadas con el vector vacío, las cuales no expresan MHC-II (histograma blanco).

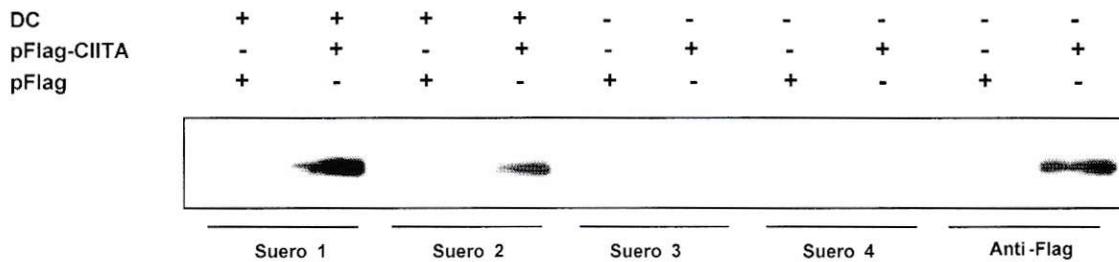


Figura 7.

Comparación por Inmunoblot de sueros de ratones inmunizados con o sin CDs.

En la figura se compara por ensayos de inmunoblot los sueros de ratones inmunizados intraperitonealmente con la mezcla de proteínas recombinantes (CIITA M y CT) con o sin CDs pulzadas con el antígeno. Para la realización de este experimento células Cos7 fueron transfectadas con un plasmidio que tiene clonado el gen de CIITA fusionado a un epítipo Flag o con el plasmidio pFlag sin inserto. Después de 2 desafíos intraperitoneales con la mezcla de proteínas recombinantes sólo los sueros inmunes de los ratones inmunizados con las CDs pulzadas (sueros 1 y 2) reconocen CIITA. Los sueros inmunes de los ratones tratados sólo con inyecciones intraperitoneales del antígeno (sueros 3 y 4) no son capaces de reconocer CIITA al igual que los controles con extractos de células Cos7 transfectadas con el vector vacío (sin CIITA).

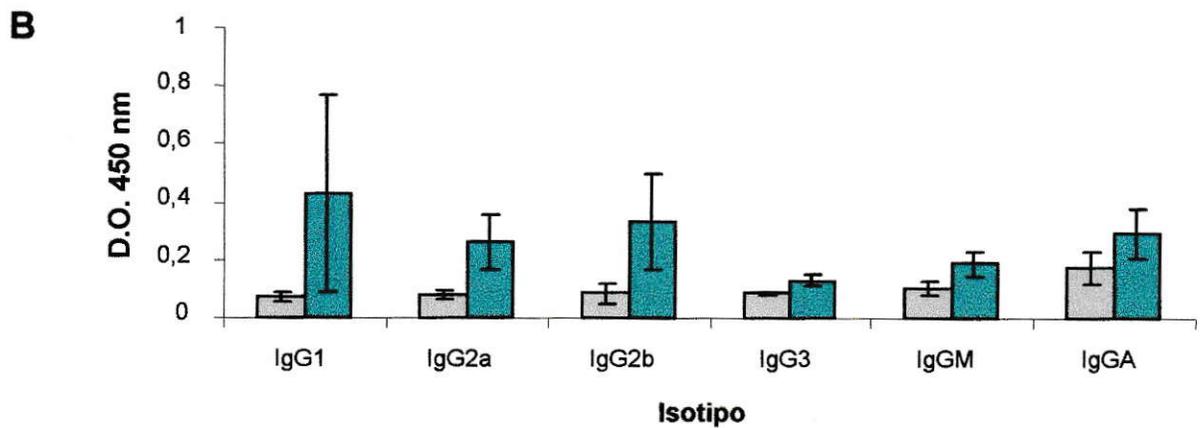
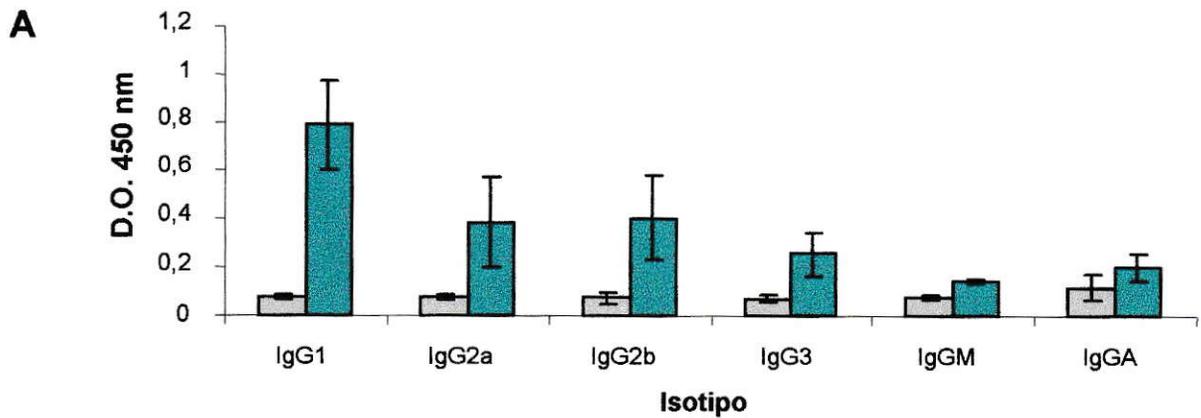


Figura 8.

Determinación de los isotipos de anticuerpos inducidos por la inmunización con células dendríticas.

La figura muestra la determinación, mediante ELISA, de los isotipos de los anticuerpos inducidos por la inmunización con CDs utilizando una mezcla de CIITA M y CT como inmunógeno. En el gráfico A se muestran los isotipos de los anticuerpos que reconocen la proteína CIITA M y en B se muestran los resultados obtenidos contra CIITA CT. Como control se muestran los sueros preinmunes de los ratones los cuales no presentan respuesta específica contra CIITA de ningún isotipo.

3.6 Producción de anticuerpos monoclonales contra CIITA.

Ya que solo los sueros de los ratones inmunizados con CDs presentan reactividad contra CIITA, estos ratones fueron seleccionados para generar anticuerpos monoclonales. Los ratones recibieron una última inyección de refuerzo por vía intravenosa de la proteína recombinante antes de realizar la fusión (ver Materiales y Métodos). La selección de los hibridomas se realizó mediante ELISA en un primer ensayo y enseguida por inmunoblot. Se utilizaron los ratones inmunizados con sólo una de las construcciones (CIITA M o CIITA CT) de manera de poder utilizar estas mismas proteínas recombinantes como controles positivo y negativo de los ensayos. Se consideraron como positivos aquellos hibridomas que reconocieron una sola región de CIITA por ELISA y que posteriormente se seleccionaron sólo aquellos capaces de reconocer la proteína CIITA completa en extractos de células Cos7 transfectadas con Flag-CIITA. Cada hibridoma positivo fue subclonado y los clones obtenidos crecidos e inyectados a ratones BALB/c sensibilizados con pristano para así generar líquido ascítico. De 4 fusiones realizadas se obtuvieron cerca de 1200 hibridomas (300 hibridomas por fusión) de los cuales sólo 3 reconocen CIITA-M y 5 reconocen CIITA-CT.

3.7 Caracterización de los anticuerpos monoclonales anti-CIITA.

Se determinó el isotipo de los anticuerpos monoclonales obtenidos como se describe previamente. Todos los ensayos se realizaron usando los líquidos ascíticos generados a partir de los hibridomas positivos. Los resultados se resumen en la tabla 2. Estos resultados señalan que todos los anticuerpos son de isotipo IgG1 o IgG2a, lo que se

correlaciona con los datos obtenidos de la caracterización isotópica de los anticuerpos contenidos en los sueros de los ratones inmunizados con CDs (figura 8).

Además se analizó la capacidad de los anticuerpos monoclonales generados de inmunoprecipitar CIITA. Para esto se utilizaron extractos de células Cos7 Flag-CIITA que fueron inmunoprecipitados con los distintos líquidos ascíticos obtenidos de los hibridomas correspondientes. Como control positivo se utilizó un suero policlonal de conejo producido en el laboratorio que inmunoprecipita CIITA. La figura 9 muestra que los anticuerpos monoclonales obtenidos son capaces de inmunoprecipitar la proteína CIITA sobreexpresada en esta línea celular.

3.8 Utilización de los distintos anticuerpos monoclonales para visualizar las diferentes formas de la proteína CIITA.

A pesar de que los anticuerpos monoclonales producidos son capaces de inmunoprecipitar el antígeno, su afinidad es baja comparada a sueros policlonales producidos en conejo, razón por la cual los monoclonales se usaron en combinación con estos sueros policlonales para detectar las formas endógenas de CIITA. Para esto primero se inmunoprecipitó CIITA endógeno de varias líneas celulares utilizando el suero policlonal de conejo. Enseguida las proteínas inmunoprecipitadas se separaron en un gel y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa que fue revelada con los distintos monoclonales anti-CIITA. Este último resultado se muestra en la figura 10 y señala que los anticuerpos monoclonales generados en este proyecto son capaces de reconocer las distintas isoformas de la proteína CIITA endógena.

Hibridoma	Inmunógeno	Isotipo
1B5	CIITA-M	IgG2a
7D3	CIITA-M	IgG1
7G8	CIITA-M	IgG1
9D5	CIITA-CT	IgG1
6H7	CIITA-CT	IgG1
3H12	CIITA-CT	IgG1

Tabla 2.

Isotipo de los anticuerpos monoclonales anti-CIITA generados.

En la tabla se muestran los isotipos de los anticuerpos monoclonales generados por la inmunización con células dendríticas determinados por ensayos de ELISA. Los isotipos fueron obtenidos a partir de los líquidos ascíticos generados a partir de los hibridomas correspondientes.

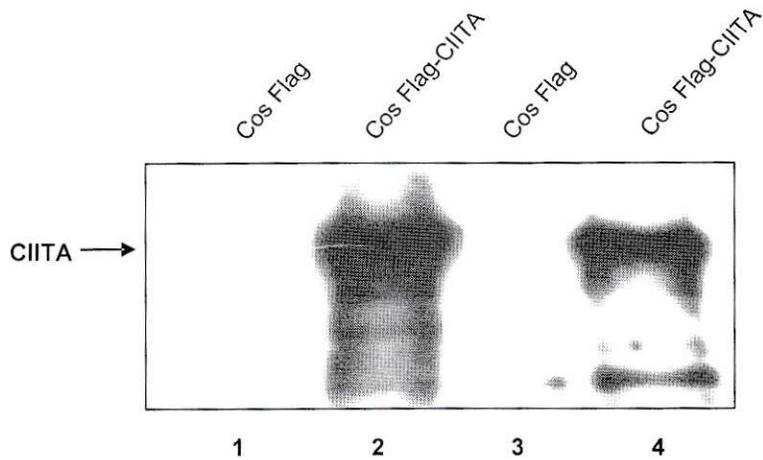


Figura 9.
Inmunoprecipitación de CIITA con los anticuerpos monoclonales generados mediante inmunización con CDs.

En la figura se muestra que el anticuerpo monoclonal 7G8 (anti-CIITA-M) es capaz de inmunoprecipitar CIITA expresado en células Cos7 transfectadas con el constructo pFlag-CIITA. Para realizar este experimento lisados de células Cos7 transfectadas fueron inmunoprecipitados utilizando un líquido ascítico generado a partir del hibridoma 7G8. Las muestras se sometieron a electroforesis y *electroblotting* y se revelaron utilizando un suero policlonal de conejo anti-CIITA. Carril 1: Extracto de células Cos7-pFlag inmunoprecipitado con suero inmune de conejo anti-CIITA. Carril 2: Extracto de células Cos7-pFlag-CIITA inmunoprecipitado con suero inmune de conejo anti-CIITA. Carril 3: Extracto de células Cos7-pFlag inmunoprecipitado con líquido ascítico anti-CIITA (clon 7G8). Carril 4: Extracto de células Cos7-pFlag-CIITA inmunoprecipitado con líquido ascítico anti-CIITA (clon 7G8). En cada punto del experimento se inmunoprecipitaron 200 µg de proteína.

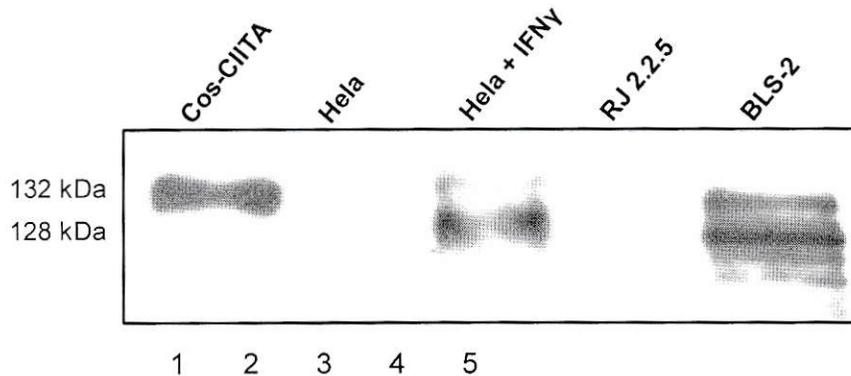


Figura 10.

Detección de las diferentes isoformas de la proteína CIITA endógena con un anticuerpo monoclonal generado mediante inmunización con CDs.

En la figura se muestra que el anticuerpo monoclonal 7G8 (anti-CIITA-M), generado por la inmunización con CDs, reconoce distintas isoformas de la proteína CIITA endógena mediante inmunoblot. Para realizar este experimento se inmunoprecipitó CIITA a partir de distintos extractos celulares con un suero de conejo anti-CIITA y se detectó la presencia de la proteína revelando con el anticuerpo monoclonal 7G8. Carril 1: Control positivo, extracto de células Cos7 transfectadas con el gen completo de CIITA (150 µg). Carril 2: 5 mg de extracto de células Hela, línea fibroblastoide que no expresa CIITA constitutivamente. Carril 3: 5 mg de extracto de células Hela tratadas con IFN-γ (250 U/ml), el cual induce la expresión de CIITA. Carril 4: 5 mg de extracto de células RJ 2.2.5, línea linfoblastoide que tiene una delección cromosomal del gen de CIITA. Carril 5: 5 mg de extracto de células BLS-2, línea linfoblastoide que expresa constitutivamente una forma trunca de la proteína CIITA.

4. DISCUSIÓN

Actualmente *CIITA* es considerado el gen maestro de la expresión de las moléculas MHC-II. Debido a esto en los últimos años se ha generado un creciente interés por el estudio tanto de la regulación de la expresión de *CIITA* como en el modo en la proteína regula la expresión de los genes del MHC-II. A pesar de esto aún no se han desarrollado anticuerpos monoclonales contra *CIITA*. Una de las principales razones de esto es la baja inmunogenicidad de la proteína, ya que la producción de anticuerpos monoclonales depende, en gran medida, de la capacidad de los ratones de producir clones de linfocitos B que respondan al inmunógeno. Los experimentos realizados en este trabajo están orientados a la generación de anticuerpos monoclonales contra *CIITA* mediante la inmunización con CDs, las que ayudarían a estimular la respuesta inmune humoral específica. Para esto se utilizaron CDs aisladas desde el bazo de ratones BALB/c, mediante un protocolo previamente descrito (Iwasaki y Kelsall, 1999) que utiliza la citoquina Flt3-L para expandir las CDs en los diferentes tejidos del ratón. Los datos de la literatura indican que esta citoquina expande las CDs uniformemente, sin alterar la composición o funcionalidad de éstas células en los diferentes órganos linfoides secundarios (Maraskovsky y col., 1996, 2000; Pulendran y col., 1997, 1999, 2000; Maldonado-Lopez y col., 1999). Además, el tratamiento con la citoquina Flt3-L produce principalmente una expansión de las CDs maduras *in vivo* (Maraskovsky y col., 1996), las cuales presentan una baja capacidad para procesar antígenos, pero una alta capacidad para presentarlos a las células T. En cambio, las CDs inmaduras presentan una alta capacidad de procesamiento antigénico y una baja capacidad de presentación.

En los resultados de purificación de CDs obtenidos en este trabajo se aisló una población de CDs con una distribución heterogénea en cuanto a su estado de madurez, lo que se aprecia por la expresión de las moléculas de MHC-II en la superficie (figura 2). La gran mayoría de las células (alrededor de un 86%) presentaban un estado maduro (CD11c+ y MHC-II+) mientras que sólo el 10% de la población presentó un estado más inmaduro (CD11c+ y MHC-II-). Esta población menor de CDs inmaduras podría ser la responsable de la alta respuesta inmune humoral específica contra CIITA, ya que puede procesar eficientemente los fragmentos proteicos del antígeno para luego presentarlos en el contexto de MHC-II a los linfocitos T CD4+. A pesar del bajo porcentaje de CDs inmaduras que se obtienen por este protocolo, la eficiencia que adquieren estas células al madurar, donde una sola DC puede activar entre 100 y 3.000 linfocitos T, puede dar cuenta de la alta respuesta humoral (Klagge y Schneider-Schaulies, 1999).

La respuesta inmune humoral específica de los ratones inmunizados con CDs es notablemente mayor que la respuesta de los ratones inmunizados con el método tradicional (inmunización con proteína recombinante emulsionada en un coadyuvante) o con inmunización genética (figuras 3 y 4). Esto porque la inmunización con CDs asegura la activación de los LT CD4+ de ayuda, lo que a su vez permite una eficiente activación de linfocitos B. Por otro lado, hay evidencias recientes que señalan que las CDs podrían activar directamente a células B, independientemente de LT CD4+, estimulando la producción de anticuerpos (Dubois y col., 1997, 1998). El mismo efecto potenciador de las CDs se observó en la respuesta inmune humoral específica que se obtuvo al comparar la inmunización utilizando CDs pulsadas con un péptido de la proteína CIITA con la inmunización del péptido acoplado a una proteína portadora altamente inmunogénica (Blue Carrier®) (figura 5). Estos datos muestran que este

método puede también ser utilizado para dirigir la respuesta inmune contra péptidos, uno de los sistemas más utilizados en la producción de anticuerpos monoclonales, pero donde no siempre la utilización de proteínas portadora tiene buenos resultados. Además la inmunización con CDs ha permitido generar, en nuestro laboratorio, anticuerpos monoclonales contra otras proteínas de interés biológico como son las catepsinas (datos no mostrados). Estos antecedentes confirman la eficacia y las potencialidades de este método de inmunización, sugiriendo su uso como una estrategia en la obtención de anticuerpos monoclonales contra proteínas poco inmunogénicas.

En relación a la inmunización genética hay que resaltar algunos aspectos relevantes del protocolo. Esta inmunización se llevó a cabo intramuscularmente utilizando 3 plasmidios de expresión eucarionte distintos donde todos contenían el gen que codifica para la proteína CIITA completa y todos aquellos capaces de complementar la expresión de MHC-II en células deficientes de estas moléculas (datos no mostrados). Aparte de la inmunización con estos plasmidios se suministraron dosis, también intramusculares, con un vector de expresión eucarionte codificante para GM-CSF, factor que, según datos de la literatura, aumenta la eficacia en este tipo de inmunizaciones (Stampfli y col., 1998; Wang y col., 2000; Parker y col., 2001). A pesar de esto no se obtuvo ninguna respuesta inmune contra CIITA con ninguno de los 3 vectores utilizados, lo que sumado a los datos de la inmunización tradicional, demuestran la poca inmunogenicidad de la proteína y resaltan aún más los resultados obtenidos en la inmunización con CDs. Para una mayor facilidad en los análisis de los resultados, en esta memoria sólo se muestran los resultados obtenidos con uno de los plasmidios, el más utilizado para desarrollar inmunizaciones genéticas (Figura 4).

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que la inmunización con CDs pulsadas induce un aumento de los isotipos IgG1, IgG2a e IgG2b en la respuesta humoral específica contra CIITA (figuras 8a y 8b). Estos datos se correlacionan con resultados obtenidos en otros experimentos de inmunización con CDs (Sornasse y col., 1992) o inmunización de ratones tratados con la citoquina que expande CDs, Flt3-L (Pulendran y col., 1998), que muestran una inducción específica de los isotipos IgG1 e IgG2a.

Es importante señalar que una de las ventajas que presenta la inmunización con CDs pulsadas *ex vivo* con el antígeno de interés versus otros métodos de inmunización como la genética o la tradicional es la posibilidad de generar una respuesta inmune, incluso si el antígeno es poco inmunogénico. *In vivo* ha sido documentada recientemente la inducción de tolerancia de células T por CDs, así como una ignorancia frente a ciertos antígenos provocada por las CDs, lo que limita la respuesta inmune contra ciertos antígenos. Al incubar *ex vivo* las CDs con el antígeno estas maduran fuera del animal y al parecer en estas condiciones las CDs no presentarían el putativo efecto tolerogénico, provocando una activación de los linfocitos T DC4. Si al mismo tiempo se administra el antígeno soluble, este podría preactivar las células B e inducir al sistema inmune a una respuesta humoral, sobrepasando algunas de las limitaciones naturales. Este último punto sería interesante de investigar, sobre todo que las CDs están siendo utilizadas actualmente en tratamiento de pacientes con melanoma, los cuales son estimulados mediante protocolos que utilizan las CDs cargadas con proteínas del tumor

En nuestro laboratorio hemos demostrado (manuscrito enviado a *Transpl. Proc.*, 2003) que las DC producen muy tempranamente bajas cantidades de IL-2, lo que podría tener un papel tolerogénico o en la polarización de los LT CD4+, lo que en nuestro

protocolo de inmunización podría producirse durante la activación *in vitro*. Este punto también necesita un análisis más profundo ya que la producción de IL-2 por las CDs podría depender del estímulo.

Numerosos intentos realizados en nuestro laboratorio para generar anticuerpos monoclonales con ratones inmunizados por métodos tradicionales culminaron con la obtención de un alto número de hibridomas, pero ninguno de ellos dio resultados positivos contra CIITA. Sólo los ratones inmunizados con CDs pulsadas con diferentes fragmentos de CIITA permitieron hibridomas positivos dirigidos contra la proteína. Los anticuerpos monoclonales fueron caracterizados mediante varios ensayos. Éstos reconocieron por inmunoblot distintas isoformas de la proteína CIITA endógena como se esperaba, ya que las proteínas recombinantes fueron producidas contra la región media o carboxilo terminal de la proteína. Las isoformas de CIITA se detectaron después de inmunoprecipitar las muestras con anticuerpos policlonales anti-CIITA generados en conejo, de manera de enriquecer el extracto celular en CIITA antes de visualizar las proteínas por inmunoblot (figura 10). En células Hela está descrita la expresión de 2 isoformas principales del mRNA de CIITA (larga y corta) después del tratamiento con IFN γ , encontrándose en mayor proporción la isoforma corta (Barbieri y col., 2002). Estos datos son confirmados con los distintos anticuerpos monoclonales producidos en este trabajo (figura 10). De la misma manera se pudo detectar CIITA en células BLS-2, línea celular linfoblastoide humana, que expresa constitutivamente una forma mutada de la proteína de menor tamaño, con una delección de 27aa (figura 10). En los ensayos realizados no se pudo detectar CIITA murino, pero este resultado no indica que los anticuerpos no sean capaces de reconocer la proteína de ratón ya que no se dispone de un control positivo funcional adecuado para el experimento. De todas maneras sería importante verificar si estos anticuerpos monoclonales son capaces de

reconocer la forma murina de CIITA pues permitiría estudiar la expresión de este factor de transcripción en el modelo de ratón, donde además se cuenta con ratones *knock out* para factores con los que interactúa CIITA.

Adicionalmente analizamos la capacidad de los anticuerpos de inmunoprecipitar CIITA, observándose que estos anticuerpos inmunoprecipitan la proteína pero sólo desde extractos celulares donde CIITA está sobreexpresada (Figura 9). Una posible explicación para esto es que no sería posible detectar la forma endógena de CIITA debido a la baja expresión de la proteína o bien que la afinidad de los anticuerpos monoclonales sea muy baja. Se debe mencionar que en los resultados sólo se muestran los datos de un anticuerpo monoclonal, el 7G8, pero los mismos resultados se obtuvieron para todos los anticuerpos monoclonales analizados. Una manera de resolver el problema de la baja afinidad es usar una mezcla de diferentes anticuerpos, por lo tanto se realizaron inmunoprecipitaciones usando una mezcla de todos los anticuerpos monoclonales obtenidos en este trabajo, pero el resultado fue similar que con los anticuerpos monoclonales en forma independiente. De cualquier manera la comparación de la cantidad de proteína inmunoprecipitada con el suero de conejo y los monoclonales sugiere que estos últimos son de baja afinidad.

Finalmente los isotipos de los anticuerpos monoclonales son IgG1 o IgG2a (ver tabla 2), lo que se correlaciona con los datos obtenidos al caracterizar los sueros de ratones inmunizados con CDs (figura 8a y 8b).

La obtención de los anticuerpos monoclonales anti-CIITA permitirá, entre otros, la realización de estudios de localización de la proteína en células normales como mutantes para la expresión de moléculas de clase II. La importancia de tener una batería de anticuerpos monoclonales dirigidos contra distintos fragmentos de una proteína, en este caso CIITA, pueden permitir el desarrollo de ensayos ELISA de

captura que permitan detectar y cuantificar la presencia de factores transcripcionales, como CIITA, los cuales se encuentran en cantidades solamente detectables con ensayos muy sensibles. Asimismo falta por realizar estudios que permitan identificar los sitios de unión de los monoclonales como también determinar si son o no capaces de bloquear la interacción de CIITA con los factores transcripcionales que transactiva. Finalmente, es importante hacer notar que la combinación de 2 tecnologías como son la inmunización con CDs pulsadas y la inmunización con proteína emulsionada en un coadyuvante proporcionan, según los resultados expuestos en este trabajo, un método estimulador de la respuesta inmune humoral muy eficiente, como lo demuestra la obtención de anticuerpos monoclonales contra proteínas poco inmunogénicas como CIITA o muy conservadas como las catepsinas. En relación al método aquí desarrollado se puede decir que no es un protocolo simple de realizar y tiene un costo bastante alto ya que requiere de la implementación de metodologías como la purificación de células dendríticas por medio de columnas magnéticas, de la citometría de flujo y de la disposición de proteínas recombinantes. Sin embargo, por su efectividad proponemos que este método sea utilizado para la generación de anticuerpos monoclonales contra antígenos poco inmunogénicos o proteínas muy conservadas entre especies.

5. CONCLUSIONES

- Los sueros de los ratones inmunizados con células dendríticas pulsadas con fragmentos de CIITA humano recombinante reconocen CIITA, a diferencia de los sueros de los ratones inmunizados con el método tradicional o inmunización genética.
- Los sueros de los ratones inmunizados con DC pulsadas con un péptido de CIITA generan respuesta inmune anti-péptido, a diferencia de la sola inmunización con complejo Blue Carrier®-péptido.
- La inmunización con DC indujo sueros con los isotipos de anticuerpos IgG1, IgG2a e IgG2b específicos contra la proteína CIITA.
- Se generaron 8 anticuerpos monoclonales anti-CIITA a partir de ratones inmunizados con DC. Intentos anteriores para producir estos anticuerpos, utilizando métodos tradicionales de inmunización, no dieron resultados positivos.
- Los anticuerpos monoclonales obtenidos mediante la inmunización con CDs son de isotipos IgG1 e IgG2a.
- Los anticuerpos monoclonales obtenidos son capaces de inmunoprecipitar CIITA desde extractos celulares que sobreexpresan la proteína pero no así de extractos con niveles endógenos CIITA.
- A pesar de no ser capaces de inmunoprecipitar la proteína CIITA endógena, los anticuerpos monoclonales son capaces de reconocer la forma endógena de la proteína por inmunoblot.

6. REFERENCIAS

1. Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y. J. Liu, B. Pulendran y K. Palucka (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* **18**: 767-811.
2. Barbieri, G., V. Deffrennes, T. Prod'homme, J. Vedrenne, F. Baton, C. Cortes, A. Fischer, M. R. Bono, B. Lisowska-Grosj Pierre, D. Charron y C. Alcaide-Loridan (2002). Isoforms of the class II transactivator protein. *Int Immunol* **14**(8): 839-48.
3. Bradley, M. B., J. M. Fernandez, G. Ungers, T. Diaz-Barrientos, V. Steimle, B. Mach, R. O'Reilly y J. S. Lee (1997). Correction of defective expression in MHC class II deficiency (bare lymphocyte syndrome) cells by retroviral transduction of CIITA. *J Immunol* **159**(3): 1086-95.
4. Clausen, B. E., J. M. Waldburger, F. Schwenk, E. Barras, B. Mach, K. Rajewsky, I. Forster y W. Reith (1998). Residual MHC class II expression on mature dendritic cells and activated B cells in RFX5-deficient mice. *Immunity* **8**(2): 143-55.
5. Chang, C. H., J. D. Fontes, M. Peterlin y R. A. Flavell (1994). Class II transactivator (CIITA) is sufficient for the inducible expression of major histocompatibility complex class II genes. *J Exp Med* **180**(4): 1367-74.
6. Chin, K. C., C. Mao, C. Skinner, J. L. Riley, K. L. Wright, C. S. Moreno, G. R. Stark, J. M. Boss y J. P. Ting (1994). Molecular analysis of G1B and G3A IFN gamma mutants reveals that defects in CIITA or RFX result in defective class II MHC and li gene induction. *Immunity* **1**(8): 687-97.
7. Dubois, B., C. Massacrier, B. Vanbervliet, J. Fayette, F. Briere, J. Banchereau y C. Caux (1998). Critical role of IL-12 in dendritic cell-induced differentiation of naive B lymphocytes. *J Immunol* **161**(5): 2223-31.
8. Dubois, B., B. Vanbervliet, J. Fayette, C. Massacrier, C. Van Kooten, F. Briere, J. Banchereau y C. Caux (1997). Dendritic cells enhance growth and differentiation of CD40-activated B lymphocytes. *J Exp Med* **185**(5): 941-51.
9. Iwasaki, A. y B. L. Kelsall (1999). Freshly isolated Peyer's patch, but not spleen, dendritic cells produce interleukin 10 and induce the differentiation of T helper type 2 cells. *J Exp Med* **190**(2): 229-39.
10. Klagge, I. M. y S. Schneider-Schaulies (1999). Virus interactions with dendritic cells. *J Gen Virol* **80**(Pt 4): 823-33.
11. Kohler, G. y C. Milstein (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**(5517): 495-7.

12. Lennon, A. M., C. Ottone, G. Rigaud, L. L. Deaven, J. Longmire, M. Fellous, R. Bono y C. Alcaide-Loridan (1997). Isolation of a B-cell-specific promoter for the human class II transactivator. *Immunogenetics* **45**(4): 266-73.
13. Maldonado-Lopez, R., T. De Smedt, P. Michel, J. Godfroid, B. Pajak, C. Heirman, K. Thielemans, O. Leo, J. Urbain y M. Moser (1999). CD8alpha+ and CD8alpha- subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo. *J Exp Med* **189**(3): 587-92.
14. Maraskovsky, E., K. Brasel, M. Teepe, E. R. Roux, S. D. Lyman, K. Shortman y H. J. McKenna (1996). Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified. *J Exp Med* **184**(5): 1953-62.
15. Maraskovsky, E., E. Daro, E. Roux, M. Teepe, C. R. Maliszewski, J. Hoek, D. Caron, M. E. Lebsack y H. J. McKenna (2000). In vivo generation of human dendritic cell subsets by Flt3 ligand. *Blood* **96**(3): 878-84.
16. Muhlethaler-Mottet, A., L. A. Otten, V. Steimle y B. Mach (1997). Expression of MHC class II molecules in different cellular and functional compartments is controlled by differential usage of multiple promoters of the transactivator CIITA. *Embo J* **16**(10): 2851-60.
17. Parker, S. E., D. Monteith, H. Horton, R. Hof, P. Hernandez, A. Vilalta, J. Hartikka, P. Hobart, C. E. Bentley, A. Chang, R. Hedstrom, W. O. Rogers, S. Kumar, S. L. Hoffman y J. A. Norman (2001). Safety of a GM-CSF adjuvant-plasmid DNA malaria vaccine. *Gene Ther* **8**(13): 1011-23.
18. Pulendran, B., J. Banchereau, S. Burkeholder, E. Kraus, E. Guinet, C. Chalouni, D. Caron, C. Maliszewski, J. Davoust, J. Fay y K. Palucka (2000). Flt3-ligand and granulocyte colony-stimulating factor mobilize distinct human dendritic cell subsets in vivo. *J Immunol* **165**(1): 566-72.
19. Pulendran, B., J. Lingappa, M. K. Kennedy, J. Smith, M. Teepe, A. Rudensky, C. R. Maliszewski y E. Maraskovsky (1997). Developmental pathways of dendritic cells in vivo: distinct function, phenotype, and localization of dendritic cell subsets in FLT3 ligand- treated mice. *J Immunol* **159**(5): 2222-31.
20. Pulendran, B., J. L. Smith, G. Caspary, K. Brasel, D. Pettit, E. Maraskovsky y C. R. Maliszewski (1999). Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(3): 1036-41.
21. Pulendran, B., J. L. Smith, M. Jenkins, M. Schoenborn, E. Maraskovsky y C. R. Maliszewski (1998). Prevention of peripheral tolerance by a dendritic cell growth factor: flt3 ligand as an adjuvant. *J Exp Med* **188**(11): 2075-82.

22. Ruedl, C., C. Rieser, G. Bock, G. Wick y H. Wolf (1996). Phenotypic and functional characterization of CD11c⁺ dendritic cell population in mouse Peyer's patches. *Eur J Immunol* **26**(8): 1801-6.
23. Shi, G. P., J. A. Villadangos, G. Dranoff, C. Small, L. Gu, K. J. Haley, R. Riese, H. L. Ploegh y H. A. Chapman (1999). Cathepsin S required for normal MHC class II peptide loading and germinal center development. *Immunity* **10**(2): 197-206.
24. Sornasse, T., V. Flamand, G. De Becker, H. Bazin, F. Tielemans, K. Thielemans, J. Urbain, O. Leo y M. Moser (1992). Antigen-pulsed dendritic cells can efficiently induce an antibody response in vivo. *J Exp Med* **175**(1): 15-21.
25. Stampfli, M. R., R. E. Wiley, G. Scott Neigh, B. U. Gajewska, X.-F. Lei, D. P. Snider, Z. Xing y M. Jordana (1998). GM-CSF Transgene Expression in the Airway Allows Aerosolized Ovalbumin to Induce Allergic Sensitization in Mice. *J. Clin. Invest.* **102**(9): 1704-1714.
26. Steimle, V., L. A. Otten, M. Zufferey y B. Mach (1993). Complementation cloning of an MHC class II transactivator mutated in hereditary MHC class II deficiency (or bare lymphocyte syndrome). *Cell* **75**(1): 135-46.
27. Steimle, V., C. A. Siegrist, A. Mottet, B. Lisowska-Grospierre y B. Mach (1994). Regulation of MHC class II expression by interferon-gamma mediated by the transactivator gene CIITA. *Science* **265**(5168): 106-9.
28. They, C. y S. Amigorena (2001). The cell biology of antigen presentation in dendritic cells. *Curr Opin Immunol* **13**(1): 45-51.
29. Viney, J. L., A. M. Mowat, J. M. O'Malley, E. Williamson y N. A. Fanger (1998). Expanding dendritic cells in vivo enhances the induction of oral tolerance. *J Immunol* **160**(12): 5815-25.
30. Wang, J., D. P. Snider, B. R. Hewlett, N. W. Lukacs, J. Gauldie, H. Liang y Z. Xing (2000). Transgenic expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces the differentiation and activation of a novel dendritic cell population in the lung. *Blood* **95**(7): 2337-2345.