

UCH-FC  
DOC-BIOMCN  
C828  
C.1



**PARTICIPACIÓN DE LAS DIFERENTES ISOFORMAS DE LA PROTEÍNA CIITA  
EN LA REGULACIÓN DE LAS MOLÉCULAS DEL COMPLEJO PRINCIPAL DE  
HISTOCOMPATIBILIDAD DE CLASE II**

Tesis

Entregada a la Universidad de Chile

En cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al grado de

Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular, Celular y Neurociencias

Facultad de Ciencias

**CLAUDIO CORTÉS MIRANDA**

Septiembre, 2004

Director de Tesis: **Dra. MARÍA ROSA BONO MERINO**

**FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE**

**INFORME DE APROBACIÓN  
TESIS DE DOCTORADO**

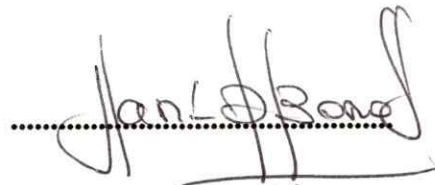
Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato.

**CLAUDIO CORTÉS MIRANDA**

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 22 de Septiembre de 2004.

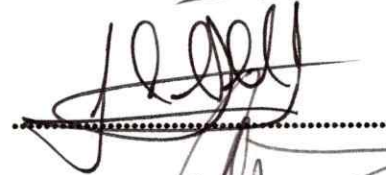
Director de Tesis:

**Dra. MARÍA ROSA BONO MERINO**



Comisión de Evaluación de la Tesis

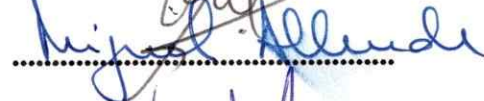
**Dr. ARIEL ORELLANA**



**Dr. ALFREDO DE IOANNES**



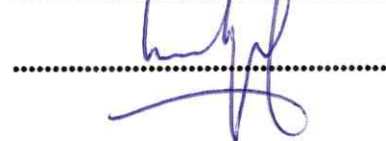
**Dr. MIGUEL ALLENDE**



**Dr. RICARDO MACCIONI**



**Dr. ULISES VERGARA**



Lo bueno que soy se lo debo a los que siempre  
me han apoyado y lo malo, a mi falta de  
capacidad en entender los consejos de quienes  
me aman

*A Dios,  
a mis padres,  
a mi familia  
a mis amigos,  
y en especial a mi amada  
esposa Viviana y a mis  
hermosas hijas  
Bianca y Natalia*

## AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer profundamente al Dr. Arturo Ferreira que me apoyó e incentivó para realizar el Doctorado en esta hermosa Facultad. Agradecer también a los integrantes de la comisión de doctorado del año 1995, en especial a la Dra. Mitzy Canessa, que me dieron la posibilidad y apoyo para ingresar al programa de Doctorado.

A los Drs. María Rosa Bono y Mario Roseblatt, quienes con su paciencia y excelente formación académica han forjado en mí el interés de superarme y seguir adelante en la vida de la investigación. Gracias por aceptarme en vuestro laboratorio y darme la oportunidad de pertenecer al mejor grupo de trabajo que he conocido.

A mis amigos Leonardo Vargas, Rodrigo Mora y a Pablo Vargas por ofrecerme su amistad incondicional y apoyarme en los momentos difíciles de mi vida profesional y sentimental. También deseo agradecer a mis compañeros y amigos de trabajo, Lilian Reyes, Daniela Sauma, Carolina Burgos, Fedora Godoy, Paula Escobar, Paula Michea, Jennifer Alfaro, Raúl Elgueta, Eva Mella, Karina Pino, Valeska Simon, Fernando Sepúlveda y Rodrigo Naves por su apoyo desinteresado en todo momento.

Un agradecimiento muy especial a mi familia, en particular a la Lela, el Lelo, mis cuñados Pancho y Lorena y a mis hermosos sobrinos Panchito y Javier quienes me han dado el cariño que fue fundamental para la realización de este trabajo.

Todo lo bueno que soy se lo debo principalmente a mi mamá, Teresa Miranda Contreras, quien me dio vida y lo sigue haciendo con cada segundo de su existencia. Este trabajo esta dedicado especialmente a ti mamita. Gracias Sergio, que aunque no estás en este universo fuiste un verdadero Padre para mí: Gracias Papá por darme la orientación y consejos necesarios para seguir en el ámbito profesional, regalos que sólo tú me diste a pesar del poco tiempo que pude estar a tu lado. Gracias Miriam y hermanitos (Jorge, David y Mirita) por estar a mi lado, quizás no físicamente, pero si espiritualmente en todo momento.

Gracias Viviana mi amor, por ser el apoyo fundamental para seguir en este camino de descubrimiento y fascinación. En los momentos en que más necesitaba ayuda, allí estabas, mi amiga y pareja, para dármela sin pedir nada a cambio, aún cuando no siempre fue correspondido. Gracias también amor por darme lo más hermoso de mi vida, mis hijas Bianca y Natalia, fuentes de inspiración y esperanza de que todo lo que existe y viene en el futuro será siempre maravilloso si ustedes están presentes.

Finalmente, agradezco a las instituciones CONICYT, FONDECYT (proyecto 2000-062) y a Fundación Andes por el apoyo financiero que permitió la realización de este trabajo.

## ABREVIATURAS

ACF:	Adyuvante completo de Freund
AcMo:	Anticuerpos Monoclonales
ARE:	<i>Activating Response Element</i>
BLS:	<i>Bare Lymphocytes Syndrome</i>
CIITA:	<i>Class-II transactivator</i>
CARD:	<i>Caspase Recruiting Domain</i>
CBP	<i>CREB Binding protein</i>
CLIP	<i>Class II associated invariant chain peptide</i>
DMEM:	<i>Dulbecco's modified eagle media</i>
EDTA:	<i>Ethylen Diamin Tetra Acetate</i>
ELISA:	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
FITC:	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i>
GAS	<i>Gamma Interferon Activated Sequences</i>
GAPDH:	<i>Glyseraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase</i>
GTP:	<i>Guanosin 5'-Triphosphate</i>
ICAM:	<i>Intercellular Cell Adhesion Molecule -1</i>
IFN- $\gamma$ :	Interferón gamma
IPTG:	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside
IRF:	<i>Interferon Regulatory Factor</i>
ISRE:	<i>Interferon-Stimulated Response Element</i>
JAK	<i>Janus Kinase</i>
LRR	<i>Leucine Rich Repeat</i>
MHC-II:	<i>Major histocompatibility complex class II</i>
M-MLV-RT:	<i>Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase</i>
ARNm:	Ácido ribonucleico mensajero
NIH:	<i>National Institute of Health</i>
pb:	Pares de bases
PBS:	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR:	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PE:	<i>Phycoerythrin</i>
RE:	Retículo endoplásmico

RFX            *Regulatory Factor X*  
RT:            *Reverse Transcriptase*  
FCS:           *Fetal calf serum*  
STAT          *Signal transducers and activators of transcription*  
Th1/Th2:      *Linfocitos T helper 1 ó 2*  
TCR:          *T Cell Receptor*  
TGF- $\beta$ :        *Transforming Growth Factor-  $\beta$*   
USF:           *Upstream Stimulating Factor*  
VCAM-1:      *Vascular Cell Adhesion Molecule-1*



# ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	I
ABREVIATURAS	III
ÍNDICE	V
ÍNDICE DE TABLAS	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
RESUMEN	IX
SUMMARY	XII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 El complejo principal de histocompatibilidad	1
1.2 Regulación de la expresión de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase II	4
1.3 El transactivador de clase II (CIITA)	8
1.3.1 Caracterización	8
1.3.2 Dominios de la proteína CIITA	11
1.3.3 Regulación del gen <i>CIITA</i>	14
1.4 Propuesta de trabajo	21
2. HIPÓTESIS DE TRABAJO	23
3. OBJETIVO GENERAL	23
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
5. MATERIALES Y MÉTODOS	24
5.1 Clonamiento, producción y purificación de las proteínas de fusión histidina-CIITA	24
5.2 Animales e inmunización	28
5.3 ELISA	29
5.4 Generación de anticuerpos monoclonales	30
5.5 Cultivos celulares	30
5.6 Transfección de células con <i>CIITA</i> de origen humano	31
5.7 Extractos de proteínas	33
5.8 Inmunoblot e inmunoprecipitación	34
5.9 Citometría de flujo	35
5.10 Preparación de RNA total	36

5.11	RT-PCR	37
5.12	PCR	38
5.13	Arrays	38
5.14	Análisis de los datos de arrays	40
5.15	Marcación de proteínas con Metionina S <sup>35</sup>	40
5.16	Mutagénesis sitio dirigida	40
6.	<b>RESULTADOS</b>	42
6.1	<b>Estudiar la expresión de la proteína CIITA en diferentes líneas celulares y demostrar la existencia de diferentes formas de la proteína de CIITA</b>	42
6.1.1	Generación y caracterización de anticuerpos monoclonales y policlonales anti-CIITA	42
6.1.2	Expresión de la proteína CIITA en células que presentan expresión endógena o inducible de las moléculas MHC-II clase II	55
6.1.3	Caracterización de la proteína CIITA en la línea celular BLS-2	57
6.1.4	Determinación de la existencia de diferentes isoformas de la proteína CIITA	64
6.2	<b>Determinar si las diferentes isoformas de la proteína CIITA regulan diferencialmente la expresión de los isotipos de MHC-II y la expresión de otros genes</b>	68
6.2.1	Regulación de la expresión de los isotipos de moléculas MHC-II por las diferentes isoformas de la proteína de CIITA	68
6.2.2	Participación de las isoformas de CIITA en la expresión de moléculas de adhesión celular	71
6.2.3	Participación de CIITA en la expresión de genes	73
6.3	<b>Estudiar la homodimerización de CIITA y determinar el efecto en la formación de dímeros de una mutación puntual en CIITA que se encontraría en un potencial sitio de homodimerización</b>	79
7.	<b>DISCUSION</b>	82
7.1	<b>Generación de anticuerpos monoclonales contra CIITA; células dendríticas y su uso en la generación de anticuerpos monoclonales</b>	82
7.2	<b>La expresión de diferentes isoformas de la proteína CIITA</b>	86
7.3	<b>Dimerización de CIITA y función transactivadora</b>	91
7.4	<b>Regulación de la expresión de MHC-II: un mecanismo de retroalimentación negativo</b>	93
7.5	<b>Las células tumorales y su relación con la expresión de CIITA</b>	98

7.6	Expresión de genes dependientes de la expresión de CIITA	100
8.	RESUMEN DE RESULTADOS	102
9.	CONCLUSIONES	104
10.	ANEXO	106
11.	REFERENCIAS	107

### ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1:	Grupos de complementación BLS	7
Tabla 2:	Inducción de genes en células humanas transfectadas establemente con CIITA	76
Tabla 3:	Inducción de genes en células murinas transfectadas establemente con CIITA	78

### ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1:	Esquema de la localización de los genes MHC	3
Figura 2:	Representación esquemática de los promotores de las diferentes moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase II	5
Figura 3:	Modelo que muestra las múltiples interacciones de CIITA con los diferentes factores de transcripción	9
Figura 4:	Esquema que muestra los dominios aminoacídicos más importantes de la proteína de CIITA	11
Figura 5:	Esquema de la región promotora de CIITA	16
Figura 6:	Modelo de regulación de la expresión de moléculas MHC-II	20
Figura 7:	Mutación sitio dirigida para generar las formas corta y larga de CIITA	41
Figura 8:	Estrategia experimental para la generación de anticuerpos contra CIITA	43
Figura 9:	Producción de proteínas de fusión de CIITA asociadas a histidina	46
Figura 10:	Inmunoblot de extractos celulares con los sueros de conejos inmunizados con las proteínas de fusión CIITA <sup>474-795</sup> y CIITA <sup>977-1.130</sup>	47
Figura 11:	Inmunoprecipitación de CIITA de células transfectadas con Flag-CIITA	48
Figura 12:	Inmunoprecipitación de CIITA: comparación de anticuerpos comerciales con los anticuerpos generados en nuestro laboratorio	49

Figura 13:	Expresión de <i>CIITA</i> y MHC-II en células transfectadas establemente con <i>CIITA</i>	53
Figura 14:	Inmunoprecipitación de <i>CIITA</i> con los anticuerpos monoclonales y policlonales anti- <i>CIITA</i> .	54
Figura 15:	Inmunoprecipitación de <i>CIITA</i> en células que expresan la proteína en forma constitutiva e inducible	56
Figura 16:	La expresión de la proteína <i>CIITA</i> mutante en células BLS-2 se reduce cuando se transfecta <i>CIITA</i> salvaje	60
Figura 17:	Inhibición transcripcional de la expresión de <i>CIITA</i> endógeno en células BLS-2 transfectadas con <i>CIITA</i> salvaje	61
Figura 18:	La inducción de <i>CIITA</i> endógeno derivado del promotor IV no es afectada por la transfección de <i>CIITA</i> salvaje	62
Figura 19:	Inmunoprecipitación de <i>CIITA</i> de la línea celular HeLa transfectada establemente con las distintas isoformas de <i>CIITA</i>	65
Figura 20:	Inmunoprecipitación de <i>CIITA</i> de la línea celular 42/95 transfectada establemente con las distintas isoformas de <i>CIITA</i>	66
Figura 21:	Inmunoprecipitación de <i>CIITA</i> transfectada transientemente en células Cos7: <i>CIITA</i> que contiene ambos sitios de inicio de la traducción genera sólo una isoforma de la proteína	67
Figura 22:	Expresión de DR y DQ en células HeLa transfectada con F- <i>CIITA</i> y B- <i>CIITA</i>	69
Figura 23:	Expresión de DP, DQ y DR en la línea celular de melanoma humano 42/95 transfectada con F- <i>CIITA</i> y B- <i>CIITA</i>	70
Figura 24:	Expresión de moléculas de adhesión en la línea celular de melanoma humano 42/95 transfectada con F- <i>CIITA</i> y B- <i>CIITA</i>	72
Figura 25:	RT-PCR de células HeLa transfectadas con <i>CIITA</i>	77
Figura 26:	Dimerización de <i>CIITA</i> salvaje y <i>CIITA</i> SAK	81
Figura 27:	Modelo de retroalimentación negativa en la regulación de la expresión de <i>CIITA</i>	96
Figura 28:	Secuencias consensos de las cajas X1, X2 e Y presentes en los promotores de los genes <i>MHC-II</i> y <i>CIITA</i>	97

## ANEXO

Anexo 1:	Partidores para PCR	106
----------	---------------------	-----

## RESUMEN

Las moléculas de histocompatibilidad de clase-II (MHC-II) juegan un papel esencial en la respuesta inmune al participar en la presentación de antígenos adquiridos desde el medio extracelular a los linfocitos T CD4+. Las moléculas MHC-II se expresan en forma constitutiva sólo en las células que participan en la presentación de antígenos. Existen diferentes isotipos de moléculas las MHC-II en humanos, llamados DR, DP y DQ, mientras que en ratón existen sólo 2 isotipos de moléculas MHC-II denominados I-A e I-E, todos ellos capaces de presentar antígenos. Los diferentes isotipos de moléculas MHC-II se expresan normalmente en forma coordinada, sin embargo existen antecedentes en células tumorales que muestran una descoordinación en la expresión de los isotipos de moléculas MHC-II. La presencia en el genoma humano de varios isotipos para MHC-II representa una ventaja evolutiva ya que aumenta las probabilidades de presentación de antígeno en una determinada célula.

La expresión de las moléculas MHC-II está regulada transcripcionalmente por un factor denominado Class II TransActivator (CIITA), el cual se une indirectamente al promotor de los genes *MHC-II*. Este transactivador es el factor maestro en la transcripción de las moléculas MHC-II puesto que precede la transcripción de *MHC-II*, esta presente sólo en células que expresan constitutivamente MHC-II y ratones *knock out* para *CIITA* no expresan moléculas MHC-II.

La transcripción de *CIITA* es bastante compleja y está regulada por 4 promotores en humano (I, II, III y IV) y 3 promotores en ratón (I, III y IV). Los diferentes promotores son utilizados en forma preferencial por las células de los

diferentes tejidos. Al comienzo de esta tesis existía gran cantidad de datos relacionados con el gen de *CIITA*, sin embargo se desconocía casi completamente lo relacionado a la proteína CIITA.

El objetivo general de este trabajo fue estudiar la proteína CIITA, en particular la existencia de diferentes isoformas de CIITA y su importancia en la regulación de la expresión de las moléculas MHC-II. Para ello, fue necesario implementar una nueva estrategia para generar anticuerpos monoclonales y policlonales contra CIITA. Estos anticuerpos fueron en estudio de la proteína CIITA en líneas celulares que expresan moléculas MHC-II en forma constitutiva o inducible y en líneas celulares que presentan mutaciones conocidas en el gen *CIITA*. Nuestros resultados demuestran por primera vez la existencia de diferentes isoformas de la proteína CIITA y una expresión diferencial en distintos tipos celulares.

Antecedentes bibliográficos indicaban que la expresión de los tres isotipos de MHC-II (DR, DP y DQ) en células tumorales de melanoma estaba regulado específicamente por CIITA derivado del promotor III (1.130 aa), en cambio la expresión de DR y DP, pero no DQ, por la expresión de CIITA derivado del promotor IV (1.126 aa). En este trabajo determinamos que ambas isoformas de CIITA no difieren en el patrón de inducción de los isotipos MHC-II (DP, DQ y DR), dilucidando así un antecedente controversial presente en la literatura. Adicionalmente determinamos mediante microarrays que las dos isoformas de CIITA transfectadas en células de melanoma inducen en niveles similares principalmente la expresión de todos los isotipos MHC-II y de genes asociados a la biosíntesis de las moléculas MHC-II como son HLA-DM y HLA-DO. Estos experimentos demostraron que CIITA estaría implicado en la inducción de genes

aparentemente no asociados a *MHC-II* como *APO*, *MMP16*, *Acta2*, *MARCKS* e *IL-6*.

Por otra parte en esta tesis planteamos que las diferentes isoformas de CIITA podrían regular la expresión de las moléculas *MHC-II* a través de la formación de dímeros, ya que se había demostrado que formas mutadas de CIITA actuaban como dominantes negativos. En este trabajo, demostramos directamente mediante experimentos de co-inmunoprecipitación que CIITA es capaz de formar homo y heterodímeros y que una mutación puntual en un sitio potencialmente importante en la formación de dímeros de CIITA, aminoácido 469, no afecta la capacidad de formación de dímeros.

Por último, presentamos evidencias que indican que CIITA derivado del promotor III regula su propia expresión a nivel transcripcional a través de un mecanismo de retroalimentación negativa. Este mecanismo de retroalimentación negativa no ocurre con CIITA derivado del promotor IV. Actualmente se desconocen completamente los mecanismos que regulan la expresión de CIITA.

El conjunto de los datos expuestos en esta tesis contribuyen a dilucidar algunos puntos controversiales de la literatura y demuestran que las isoformas de la proteína CIITA no estarían implicadas en la expresión diferencial de isotipos de moléculas *MHC-II*, sino más bien participarían directamente en la regulación de las moléculas *MHC-II* probablemente a través de la formación de dímeros.

## SUMMARY

Class-II Major Histocompatibility Complex molecules (MHC-II) play an essential role in the immune response, by participating in antigen presentation of particles acquired from the extracellular environment to CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. The expression of *MHC-II* is restricted to antigen presenting cells (APC) and these cells express constitutively 3 isotypes of MHC-II in humans (DR, DP and DQ) and 2 in mice (I-A and I-E). The expression of the isotypes of MHC-II is normally coordinated. However, in some tumoral cells, these isotypes are expressed in a non-coordinated manner. The expression of several MHC-II genes in the human genome represents an evolutive advantage and an increase in the probability of antigen presentation.

The expression of MHC-II is transcriptionally regulated by a factor named Class II TransActivator (CIITA), which binds indirectly to *MHC-II* promoters. CIITA is considered the master regulator of MHC-II expression, because it is expressed in all cells that express MHC-II, preceding the transcription of *MHC-II*, and *CIITA* knock-out mice do not express MHC-II.

*CIITA* transcription is complex and is regulated by 4 promoters in humans (I, II, III and IV) and by 3 promoters in mice (I, III and IV) which are used in a tissue-specific manner. At the beginning of this thesis there was abundant information regarding the *CIITA* gene, but little was known about the expression of the *CIITA* protein due to the lack of antibodies capable of recognizing *CIITA*.

The goal of this thesis was to study the expression of the *CIITA* protein, specifically the existence of different *CIITA* isoforms and how these isoforms may regulate the expression of *MHC-II*. For this purpose, it was necessary to implement



a novel strategy in the development of monoclonal and polyclonal antibodies against CIITA. Antibodies were used to study the expression of CIITA in different cell lines that express MHC-II constitutively or in cells in which MHC-II is induced, as well as cells that present a point mutation in the CIITA gene. Our results demonstrate, for the first time, the existence of different isoforms of the CIITA protein that are differentially expressed in different cell types.

Previous findings have indicated that the expression of MHC-II isotypes (DR, DP and DQ) in melanoma cells lines were specifically regulated by CIITA derived from promoter III (1.130 aa), while DR and DP, but not DQ, were regulated by CIITA derived from promoter IV (1.126 aa). In this thesis we demonstrate that both isoforms of CIITA do not differ in their ability to induce the expression of the MHC-II isotypes (DP, DQ and DR), clarifying controversial data present in the literature. Additionally, we determined by microarrays that these isoforms of CIITA, transfected in melanoma cells, induce similar levels of expression of MHC-II isotypes and genes associated with the biosynthesis of MHC-II, such as HLA-DM and DO. Moreover, these studies show that CIITA is involved in the induction of genes apparently not associated to MHC-II expression such as *APO*, *MMP16*, *Acta2*, *MARCKS* and *IL-6*.

On the other hand, we proposed that different isoforms of CIITA may regulate the expression of MHC-II through the formation of dimers, since it has been shown that some mutant forms of *CIITA* behave as negative dominants, down regulating MHC-II expression. In this thesis we demonstrate, by co-immunoprecipitation experiments, that CIITA is capable of forming homodimers and heterodimers. Also, we show that a point mutation at position 469, located in a

potentially important site for homodimerization, did not affect the capacity of dimer formation.

Finally, we present evidence indicating that CIITA, derived from promoter III, regulates its own expression at the transcriptional level through a negative feedback mechanism. This mechanism does not occur in CIITA derived from promoter IV. At present, available information on the mechanisms involved in the regulation of CIITA expression is scarce.

The data presented in this thesis clarifies some controversial antecedents from the literature, and demonstrates that the different isoforms of CIITA are not implicated in the differential expression of the MHC-II isotypes. We suggest as an alternative that the different isoforms of CIITA participate directly in the regulation of MHC-II probably through the formation of dimers.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 El complejo principal de histocompatibilidad

El complejo principal de histocompatibilidad (*Major Histocompatibility Complex; MHC*), localizado en el brazo corto del cromosoma 6 en humanos, contiene alrededor de 4 millones de pares de bases (pb) y está compuesto de varios genes que codifican las moléculas MHC. Las moléculas MHC presentan un alto grado de polimorfismo y participan en la presentación de antígenos a linfocitos T y se dividen en dos categorías: MHC de clase I y de clase II. Las moléculas MHC en humanos o HLA (*Human Leukocyte Antigen*) unen, en una estructura en forma de bolsillo, pequeños péptidos derivados de proteínas endógenas o exógenas los cuales son presentados a los linfocitos T.

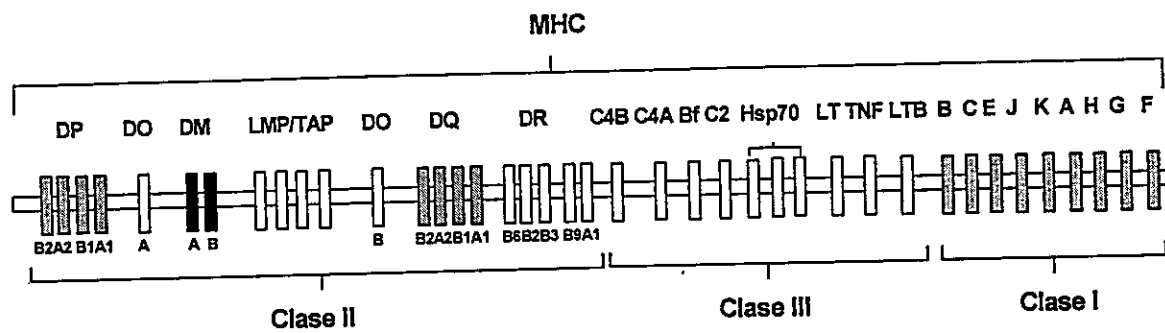
Las moléculas MHC de clase I (MHC-I) están formadas por una cadena pesada o alfa codificada por un gen localizado en la región *MHC* y una cadena liviana, la  $\beta$ 2-microglobulina ( $\beta$ 2-m), codificada por un gen que se ubica fuera del *MHC*. Las moléculas MHC-I unen péptidos de entre 8-10 aminoácidos provenientes de proteínas propias o de patógenos intracelulares y son presentados a linfocitos T citotóxicos CD8+, quienes actúan eliminando a la célula infectada. Las moléculas MHC-I se expresan en todas las células nucleadas en humano. Estas moléculas pueden ser inducidas con interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), citoquina que es producida principalmente por linfocitos T y células *Natural killer* (NK) (Samuel, 2001).

El objetivo de esta tesis está centrado en la expresión de las moléculas MHC de clase II (MHC-II), por lo tanto, a continuación nos referiremos principalmente a estas moléculas. Las moléculas MHC-II son glicoproteínas con

regiones de transmembranas constituidas por una cadena alfa y una beta, ambas codificadas por genes que se encuentran en la región *MHC*. El heterodímero alfa/beta une normalmente péptidos exógenos de entre 12 a 20 aminoácidos. La unión del péptido estabiliza la estructura del complejo, por lo tanto, puede decirse que el péptido es parte de la estructura de las moléculas *MHC-II*. Las moléculas *MHC-II* se expresan principalmente en células presentadoras de antígenos profesionales (CPA) tales como macrófagos, linfocitos B, células dendríticas y células epiteliales tímicas. En humanos existen tres isotipos de moléculas *MHC-II*: HLA DR, HLA DQ y HLA DP que son co-expresadas en forma coordinada y codominante en la superficie de las células. Cada isotipo de molécula *MHC-II* está compuesto de distintos pares de cadenas alfa y beta, cuyos genes se ubican formando un *cluster* en la región *MHC* (Figura 1) (Trowsdale, 1993). Las moléculas *MHC-II* tienen como función la presentación de péptidos a los linfocitos T de ayuda CD4+, los cuales a su vez participan en la respuesta inmune activando otras células, como macrófagos (inmunidad mediada por células) o linfocitos B (inmunidad humoral).

La interacción *MHC-II*-péptido con el receptor de los linfocitos T CD4+, es un evento importante en el desarrollo, activación y regulación del sistema inmune adaptativo (Reith y col., 2001; Palucka y col., 2002). Primero, el reconocimiento del complejo *MHC-II*-péptido expresado en las células epiteliales del timo es fundamental en el proceso de selección positiva y negativa para el desarrollo del repertorio de linfocitos T vírgenes CD4+. Segundo, la interacción del receptor de linfocitos T (TCR) vírgenes con el complejo *MHC-II*-péptido de las células dendríticas permite la activación y proliferación de los linfocitos T. Finalmente, la

sobrevida de los linfocitos T CD4+ en la periferia es influenciada por la interacción con células que expresan moléculas MHC-II.



**Figura 1: Esquema de la localización de los genes MHC.** El complejo principal de histocompatibilidad se localiza en el brazo corto del cromosoma 6 en humano y se denomina HLA. En el esquema se muestra la localización de los genes que codifican para las moléculas MHC-I, MHC-II y MHC-III. En la región de clase II se encuentran también los genes para los transportadores de péptidos, TAP1 y TAP2, además de los genes de las enzimas LMP2 y LMP7 que forman parte del proteasoma inmune. En la región de clase III se encuentran los factores que participan en sistema del complemento C4, Bf y C2, además de TNF- $\alpha$ , LT y LT- $\beta$ , citoquinas que participan en procesos inflamatorios.

La expresión constitutiva de las moléculas MHC-II está restringida a macrófagos, linfocitos B, células dendríticas y células epiteliales tímicas y es dependiente del estado de desarrollo celular (Benoist y col., 1990; Glimcher y col., 1992; Ting y col., 1993; Mach y col., 1996; Boss, 1997). Es así como la maduración de las células dendríticas es acompañada por un aumento en la expresión de las moléculas MHC-II (Landmann y col., 2001), semejante a lo que

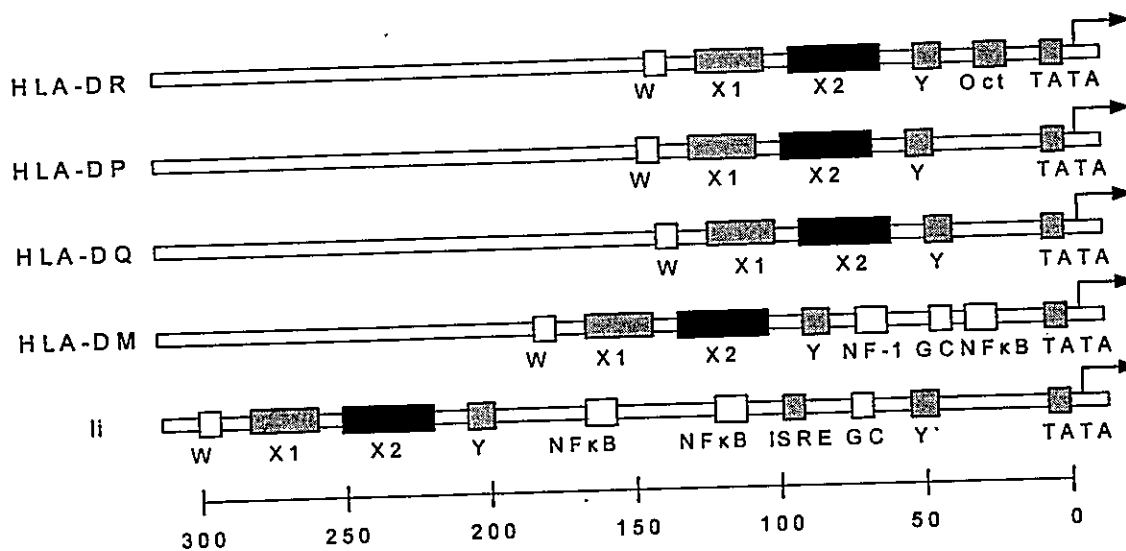
ocurre en la activación de los macrófagos por IFN- $\gamma$  (Chang y col., 1996). En cambio, cuando los linfocitos B se diferencian a plasmocitos dejan de expresar MHC-II (Reith y col., 2001).

Por otra parte, la expresión de las moléculas MHC-II puede ser inducida en la mayoría de las células por la acción de IFN- $\gamma$ , la citoquina más potente en la inducción de estas moléculas. La expresión de MHC-II inducida por IFN- $\gamma$  puede ser modulada por TGF- $\beta$ , IFN- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-1, PPAR- $\gamma$ , inhibidores de la reductasa HMG-CoA e incluso por la infección de una variedad de patógenos (Dong y col., 2001; Kwak y col., 2001; Reith y col., 2001; Kwak y col., 2002).

## **1.2 Regulación de la expresión de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase II**

La expresión constitutiva o inducida de MHC-II es controlada principalmente a nivel transcripcional por una región promotora situada en los primeros 150 pb río arriba del inicio de la transcripción (Mach y col., 1996; Boss, 1997). Esta región regulatoria está constituida por 4 sitios o cajas (W, X1, X2 e Y) que son reguladas por diferentes factores de transcripción. La orientación, orden y espaciamiento relativo de estas cajas se encuentran muy conservados entre los diferentes genes de *MHC-II* (Figura 2), al igual que en aquellos genes relacionados a *MHC-II* como son la cadena invariante, *HLA-DM* y *HLA-DO*, los cuales codifican para moléculas implicadas en el tráfico y expresión de MHC-II en la superficie (Busch y col., 1996; Cresswell, 1996; Ting y col., 1997; Westerheide y col., 1997; Tai y col., 1999; Alfonso y col., 2000; Taxman y col., 2000; Nagarajan y col., 2002b). También estas regiones están presentes en los promotores de las moléculas MHC-I y de la  $\beta$ 2-microglobulina, moléculas importantes en la respuesta inmune mediada por

células (Riegert y col., 1996; Gobin y col., 1997; Martin y col., 1997; Gobin y col., 1998; van den Elsen y col., 1999).



**Figura 2: Representación esquemática de los promotores de las diferentes moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase II.** En la figura se muestran los sitios W, X1, X2 e Y presentes en los promotores *MHC-II*, además de los sitios de unión para otros factores; Oct, sitio de unión para octámeros; NF-1, sitio de unión para CTF/NF-1; GC, sitio de unión para Sp1; NFkB, sitio de unión para los miembros de la familia NFkB/Rel; ISRE, elemento de respuesta a interferón; Y', un sitio semejante al sitio de unión Y. El dibujo está realizado a escala desde el sitio de inicio de la transcripción.

La mayor parte de lo que se conoce actualmente respecto de la regulación de los genes MHC-II, es el resultado de estudios realizados en líneas celulares obtenidas de pacientes con una enfermedad de muy escasa incidencia, llamada Síndrome de los Linfocitos Desnudos (*Bare Lymphocyte Syndrome* o BLS) (Griscelli y col., 1989). Esta enfermedad es una inmunodeficiencia congénita primaria severa, mortal a muy temprana edad, de difícil diagnóstico y que sólo

puede ser curada mediante trasplante de médula ósea. Este Síndrome se caracteriza por la ausencia de expresión de MHC-II en todas las células del individuo, incluso frente a la acción de IFN- $\gamma$ . Se ha demostrado que el defecto en las células de estos pacientes es a nivel de la regulación de *MHC-II*, específicamente en factores de transcripción que actúan en *trans* ya que los genes *MHC-II* están presentes y no contienen alteraciones a nivel del ADN.

Líneas celulares linfoblastoides obtenidas de pacientes con BLS han permitido determinar el defecto génico responsable de la ausencia de moléculas MHC-II. La primera aproximación experimental al problema consistió en preparar heterocariontes entre las diferentes mutantes BLS y realizar experimentos de complementación genética lo cual llevó a definir 4 grupos de complementación (A a D) (Mach y col., 1996) y determinar su defecto genético (Tabla 1). Es así como el defecto genético del grupo D es una alteración en el factor de transcripción RFXAP (Durand y col., 1997), mientras que las mutaciones de los grupos B y C la constituyen los factores de transcripción RFX-5 (Steimle y col., 1995) y RFX-B (p41) (Nagarajan y col., 1999), respectivamente. Estos tres factores transcripcionales forman el complejo RFX que se une a las cajas W y X1 que se encuentra en el promotor de las moléculas MHC-II. El grupo A de complementación tiene como defecto genético mutaciones en un factor que no se une al ADN, pero que permite la activación del complejo transcripcional que promueve la expresión de MHC-II. Este transactivador de la transcripción se denomina CIITA (*Class II Transactivator*) y es el factor maestro de la regulación de MHC-II (Steimle y col., 1993; Sims y col., 1997). El complejo RFX y CIITA, en conjunto con los factores CREB (X2BP) y NF-Y que se unen a las cajas X2 e Y respectivamente, forman el complejo de proteínas responsables de la expresión



de las moléculas MHC-II (Reith y col., 1994; Louis-Pence y col., 1997; Zhu y col., 2000; Zhu y col., 2001).

Se ha observado que el ARNm de *CIITA* se expresa de manera constitutiva en los mismos tejidos en que las moléculas MHC-II se expresan en forma constitutiva. Por otro lado, *CIITA* es inducible por IFN- $\gamma$  y su expresión precede a la de las moléculas del MHC-II (Boss, 1997). Además, ratones *knock out* (KO) para *CIITA* no expresan moléculas MHC-II en la mayoría de los tejidos, es decir, tienen un fenotipo BLS (Chang y col., 1996). El conjunto de estos resultados muestra que *CIITA* tiene un papel fundamental en la transcripción de las moléculas MHC-II y es en este factor que está centrado este trabajo de investigación.

Grupo de complementación	Líneas celulares derivadas de pacientes	Líneas celulares generadas <i>in vitro</i>	Defecto molecular	Cromosoma Humano
A	BLS-2, BCH 1,2	RJ2.2.5	<i>CIITA</i>	16
B	BLS-1, Ra	-	RFX-B	19
C	SJO, Ro	G1B (IFN- $\gamma$ )	RFX-5	1
D	DA, ABI	6.1.6	RFX-AP	13

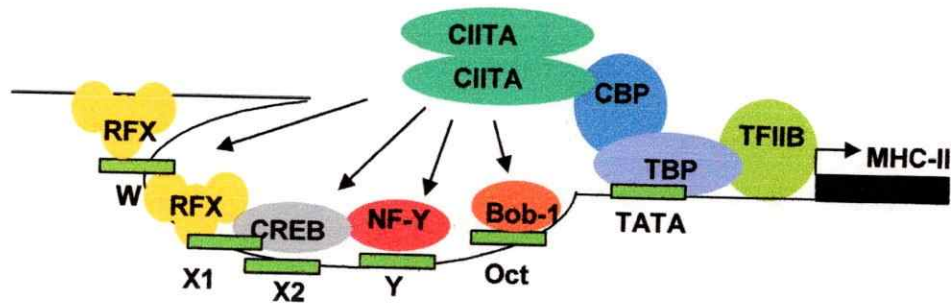
**Tabla 1: Grupos de complementación BLS.** Los grupos A a D están representados por líneas celulares derivadas de pacientes BLS y líneas celulares obtenidas mediante tratamiento con compuestos mutagénicos. Se muestra el gen defectuoso para cada uno de los grupos de complementación y su localización cromosomal.

### 1.3 El transactivador de clase II (*CIITA*)

#### 1.3.1 Caracterización

*CIITA* es un co-activador y es considerado el regulador maestro de la expresión de MHC-II. El gen de *CIITA* humano está localizado en el cromosoma 16 y genera un cDNA de 4.5 Kb, que codifica para una proteína de 1.130 aminoácidos. Aunque el tamaño del gen completo de *CIITA* humano no ha sido determinado, la contraparte murina abarca 42 kb del ADN genómico y consta de 19 exones (Reith y col., 2001).

Ensayos de doble híbrido y far *Western blot* mostraron que *CIITA* interacciona con RFX-5 y que ambos son necesarios para la expresión de MHC-II (Schöll y col., 1997). Además, *CIITA* interactúa con la proteína CBP (CREB binding protein), la cual recluta la maquinaria transcripcional a través de TFIIB, y facilita la remodelación de la cromatina permitiendo el ingreso de factores nucleares al promotor de *MHC-II* (Figura 3) (Kretsovali y col., 1998; Fontes y col., 1999; Beresford y col., 2001; Raval y col., 2001). Por otro lado, los factores CBP y PCAF (factor asociado a CBP/p300) participan en la acetilación de la lisina 144 de *CIITA*, hecho que facilita la translocación al núcleo de *CIITA* y un aumento en la actividad transactivadora de este (Spilianakis y col., 2000). Sin embargo, Harton y cols., (2001) muestran que la actividad acetil transferasa intrínseca de *CIITA* y no la de CBP es la responsable de la actividad transactivadora de *CIITA* en la expresión de MHC-II.



**Figura 3: Modelo que muestra las múltiples interacciones de *CIITA* con los diferentes factores de transcripción.** La proteína *CIITA* sirve como andamio e integrador de la transcripción de *MHC-II* al interactuar con *CREB*, *RFX-5*, *RFX-AP*, *NFYB*, *NFYC*, *CBP* y *TFIIB*.

*CIITA* actúa remodelando la cromatina en los diferentes tipos celulares. Es así como las células tratadas con *IFN-γ* que carecen de *CIITA* tienen una estructura de cromatina cerrada en el sitio del promotor de *MHC-II*. Sin embargo, cuando *CIITA* es introducido, los promotores de *HLA-DR*, *HLA-DM* y cadena invariante se vuelven accesibles y pueden ser ocupados por diferentes factores de transcripción (Rigaud y col., 1996; Ting y col., 1997; Wright y col., 1998). Específicamente, en un estudio reciente se demostró que la unión de *CIITA* al complejo de proteínas que se unen en el promotor de *MHC-II* resulta en una acetilación y deacetilación de las histonas H3 y H4 en el promotor de *HLA-DR*, proceso que depende del tipo de promotor *MHC-II* que está siendo activado (Beresford y col., 2001). Es así como, la acetilación de las histonas H3-H4 y el reclutamiento de la maquinaria transcripcional (*TFIIB*, *RNA pol II* y *TBP*) para el promotor de *HLA DR* es dependiente de *CIITA*, mientras que los promotores de los genes *DM* y cadena invariante son menos dependientes de *CIITA*

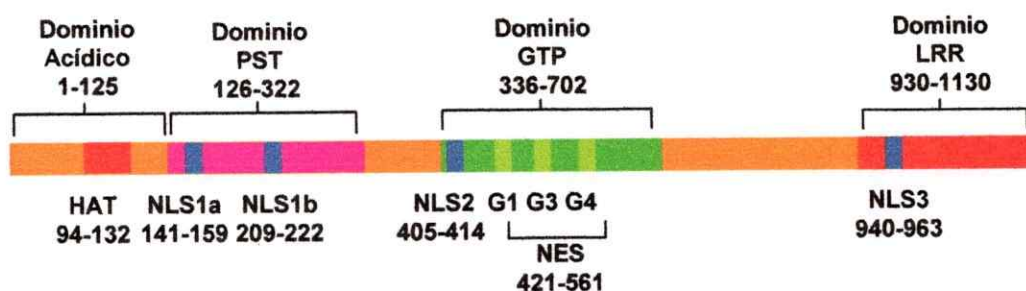
probablemente debido a que contienen dominios adicionales de unión para otros factores transcripcionales comparado a HLA-DR (Figura 2) (Masternak y col., 2002).

Por otra parte, *CIITA* regula la expresión de otros genes además de los genes *MHC-II*. La regulación de *MHC-I* por *CIITA* ha sido atribuida a una actividad sinérgica entre *CIITA* y *RelA*, este último, un factor de transcripción que se une al sitio ENH-A del promotor de los genes *MHC-I* (Girdlestone, 2000). *CIITA* regula además la expresión del ligando de Fas (FasL) ya que ratones *KO* para *CIITA* sobreexpresan FasL en los linfocitos T y B, y esta sobreexpresión disminuye cuando se re-expresa *CIITA* (Gourley y col., 2001; Gourley y col., 2002). También existen evidencias que *CIITA* regula la producción de IL-4, aunque estos resultados son controversiales. Por un lado, Gourley y cols. (2002) observaron un aumento en la secreción de IL-4 en linfocitos T CD4+ provenientes de ratones *KO* para *CIITA*, indicando que *CIITA* podría dirigir el fenotipo de los linfocitos T hacia linfocitos Th1. En cambio, Otten y col., (2003) muestran que no hay diferencias en la expresión del gen *CIITA* en las células T tipo Th1-Th2 y que la activación de linfocitos T CD4+ provenientes de ratones transgénicos para *CIITA* tienen un fuerte fenotipo Th2 productor de IL-4.

Los estudios mencionados y la numerosa literatura existente acerca de *CIITA* muestran que *CIITA* es esencial para la expresión de los genes *MHC-II* y de otros genes importantes en el desarrollo de la respuesta inmune.

### 1.3.2 Dominios de la proteína CIITA

CIITA ha sido caracterizado principalmente a nivel de la estructura del gen ya que se conoce la secuencia completa de su cDNA (Steimle y col., 1993). A partir de la secuencia deducida de la proteína se ha determinado que CIITA no tiene dominios de interacción directa con el ADN, pero presenta un dominio aminoterminal de transactivación, un dominio medio de localización nuclear que une GTP y una región carboxiterminal que participa en la interacción proteína-proteína (Figura 4).



**Figura 4: Esquema que muestra los dominios aminoacídicos más importantes de la proteína CIITA.** En la figura se muestra la región con actividad acetil transferasa (HAT), sitios importantes en la translocación nuclear (NLS), un sitio rico en prolina, serina y treonina (PST), un sitio de unión a GTP (G1, G3 y G4), un sitio de translocación citoplasmática (NES) y una región rica en leucinas (LRR) de CIITA.

La región aminoterminal posee un dominio rico en aminoácidos ácidos (30-160aa), que es importante en el proceso de activación del promotor de *MHC-II* (Zhou y col., 1995) y de interacción con el complejo RFX-5 (Riley y col., 1995; Chin y col., 1997b). Adyacente a esta región se encuentra una región rica en prolina,

serina y treonina (PST) (126-322 aa) que se divide en tres dominios: un dominio rico en prolina (163-195aa), otro en serina (209-237aa) y otro en treonina (260-322aa). La delección de la región PST conduce a la pérdida de la actividad transactivadora de CIITA. Además, en la región aminoterminal, entre los aminoácidos 94 y 132, fue localizada la actividad acetil transferasa de CIITA (Raval y col., 2001). Por otro lado, varios trabajos muestran que mutaciones y delecciones particulares en su región aminoterminal generan un CIITA capaz de actuar como dominante negativo, es decir, capaz de disminuir la expresión de MHC-II en células que tienen expresión constitutiva (Chin y col., 1997a; Chin y col., 1997b; Zhou y col., 1997). Recientemente, se determinó que las regiones aminoacídicas 1-114 y 408-550 son importantes en la interacción con el transportador nuclear CMR1, que participa en la exportación de proteínas hacia el citoplasma (Kretsovali y col., 2001). Finalmente, en la región aminoterminal se encuentran dos regiones importantes en la importación nuclear (NLS) de CIITA, una región entre los aminoácidos 141-159 (NLS1a) y la otra entre los aminoácidos 209-222 (NLS1b) (Figura 4) (Spilianakis y col., 2000; Raval y col., 2003).

El dominio medio de CIITA contiene las secuencias de unión a GTP que se encuentran entre los aminoácidos 421-561. Los aminoácidos 421-433 (G1) contienen la región que une el grupo fosfato, los aminoácidos 461-561 (G3) la que une el  $Mg^{++}$  y los aminoácidos 558-561 (G4) la que une guanina (Chin y col., 1997b). Las mutaciones del sitio de unión a GTP *in vitro* revelaron que CIITA carente de esta región se mantiene en el citoplasma, debido a un aumento en la afinidad por el transportador citoplasmático CMR1, comparado con CIITA normal. Por lo tanto, este dominio es importante en la importación y exportación nuclear de CIITA (Harton y col., 1999; Kretsovali y col., 2001; Raval y col., 2003). La región

aminoacídica 408-550 es importante en la interacción con CMR1 y en la capacidad de interacción intramolecular con secuencias ubicadas en la región aminoterminal (1-408) y carboxiterminal de CIITA (700-970) (Kretsovali y col., 2001; Linhoff y col., 2001). Por otro lado, la región media de CIITA que incluye la región que une GTP, también participaría en la formación de homodímeros de CIITA que sería importante en la asociación con factores que se encuentran en el promotor de *MHC-II* y en el transporte de CIITA al núcleo (Sisk y col., 2001). Finalmente, la secuencia aminoacídica 405-414 forma parte de la señal de translocación nuclear (NLS2) (Cressman y col., 2001).

En la región carboxiterminal de CIITA se encuentran varias regiones ricas en leucinas (LRR) (Hake y col., 2000; Harton y col., 2002a; Harton y col., 2002b; Towey y col., 2002). Mutaciones sitio dirigidas de las regiones LRR altera la actividad transactivadora de CIITA, pero no afecta la capacidad de unión de CIITA con los factores RFX y NF-Y (Hake y col., 2000; Linhoff y col., 2001). La delección de la región aminoacídica 940-963 (NLS3), encontrada en una línea celular proveniente de un paciente BLS denominada BLS-2, impide que CIITA transloque al núcleo, de lo que se puede inferir que la proteína CIITA debería acumularse en el citoplasma siendo incapaz de inducir la expresión de las moléculas *MHC-II* (Cressman y col., 1999; Cressman y col., 2001; Towey y col., 2002). Por otro lado, una mutación en el aminoácido 469 L->P de CIITA, encontrada en una línea celular derivada de un paciente BLS denominado SAK (CIITA SAK), puede translocar al núcleo pero con menor eficiencia que CIITA salvaje (Wiszniewski y col., 2001). Finalmente, se ha determinado que CIITA se encuentra fosforilado en la región carboxiterminal, lo cual podría tener relevancia en la localización citoplasmática y nuclear (Harton y col., 2001).

### 1.3.3 Regulación del gen *CIITA*

La transcripción de *CIITA* es regulada por 4 promotores en humano (Promotores - I, II, III y IV) y 3 promotores en ratón (Promotores - I, III y IV). Los promotores son utilizados en forma preferencial por diferentes tejidos y tienen una alta homología en su secuencia entre la especie humana y murina (Lennon y col., 1997; Muhlethaler-Mottet y col., 1997).

El promotor I es utilizado por las células dendríticas y macrófagos, el promotor III por células B y el promotor IV en células tratadas con IFN- $\gamma$ . El promotor II no ha sido identificado en ningún tejido en particular. La utilización de alguno de los 4 promotores de *CIITA* genera ARNm que contienen un primer exón exclusivo para cada promotor y un segundo exón común para todas las formas del ARNm de *CIITA* (Figura 5). Los sitios de unión para los diferentes factores transcripcionales han sido identificados en cada una de los diferentes promotores de *CIITA*, y estos se encuentran dentro de una región de 13 kb del genoma humano y murino (Muhlethaler-Mottet y col., 1997).

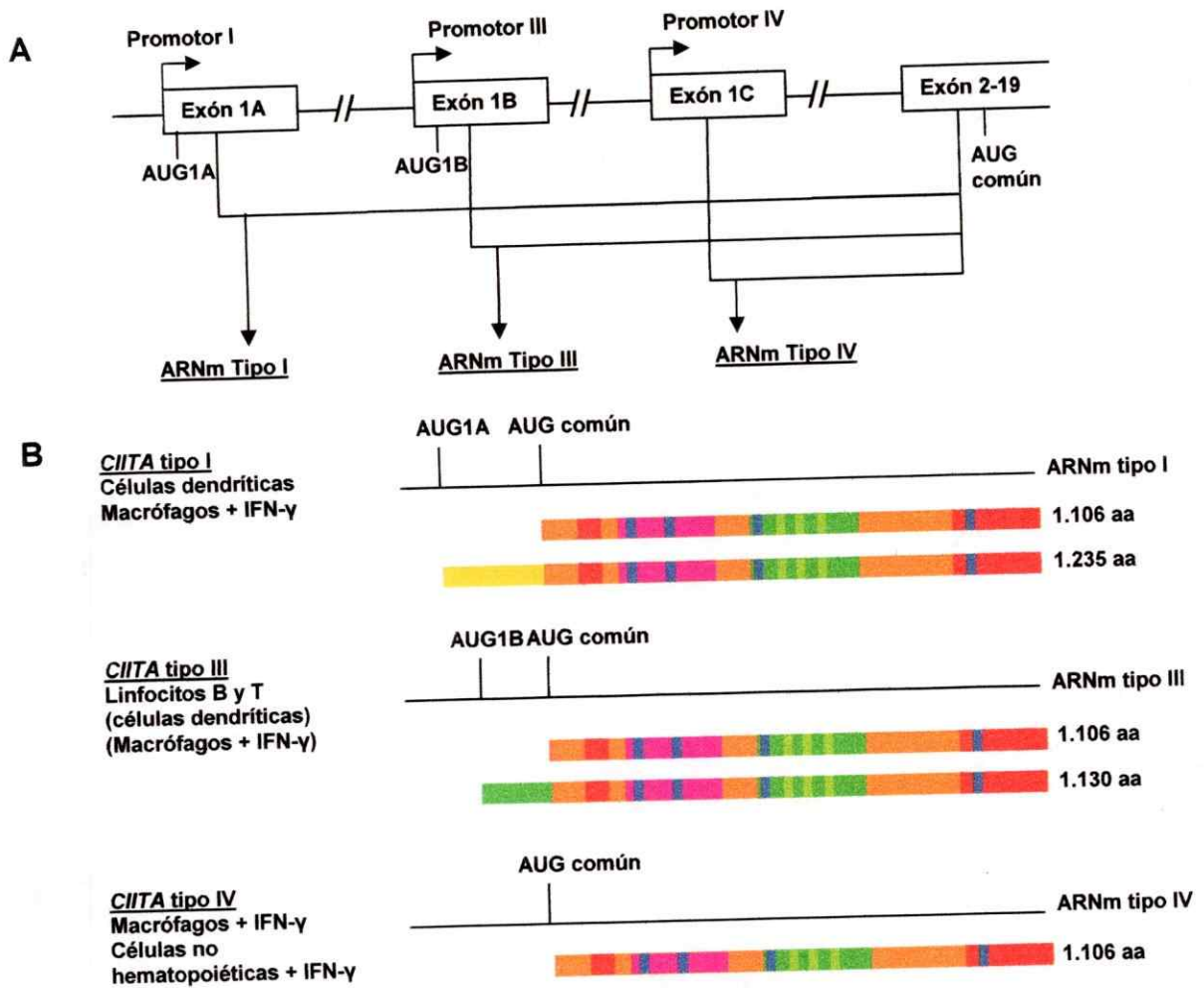
Las células dendríticas inmaduras expresan una alta cantidad de MHC-II en la superficie, lo cual se debe a una alta actividad transactivadora de *CIITA* derivado de promotor I (Nickerson y col., 2001). El exón 1 utilizado por las células dendríticas codifica para una región aminoterminal adicional de 129 aminoácidos con un total de 1.235 aa, con respecto al generado a partir del promotor IV que generaría un *CIITA* de 1.106aa (Figura 5). La región codificante del exón I de promotor I tiene homología a un dominio de reclutamiento de caspasas (CARD). Se determinó que una mutación puntual del dominio CARD de *CIITA* reduce la capacidad transactivadora de este a niveles semejantes a los obtenidos por el



CIITA derivado de promotor III (Nickerson y col., 2001). Aunque los dominios CARDS interactúan con caspasas y están involucrados en la regulación de la apoptosis, al parecer el dominio CARD de CIITA no poseería esta misma función.

La expresión de *CIITA* a partir del promotor III es principalmente constitutiva, aunque puede ser inducida por IFN- $\gamma$  e inhibida por TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor- $\beta$* ) (Piskurich y col., 1998). Ratones *KO* para TGF- $\beta$  desarrollan una enfermedad autoinmune como resultado de la sobre expresión de los genes de *MHC-II* (Shull y col., 1992; Geiser y col., 1993). Un estudio a nivel de ADN señala que la región aledaña al promotor III ubicada en los nucleótidos -545 a -113 (relativos al sitio de inicio de la transcripción) es importante para la expresión constitutiva de *CIITA* desde el promotor III (Ghosh y col., 1999).

La ocupación del promotor III se ha estudiado recientemente a través de ensayos de *footprinting*. Estos ensayos demostraron que los sitios denominados elementos respondedores a la activación (ARE) fueron protegidos fuertemente y que son esenciales para la expresión constitutiva de *CIITA* a partir del promotor III (Holling y col., 2002; van der Stoep y col., 2002b; van der Elsen y col., 2004). Por otra parte, los sitios denominados A, B y C muestran una protección débil y estos aumentan levemente la actividad del promotor III (Leegwater y col., 1985; Holling y col., 2002; Muhlethaler-Mottet y col., 1997; Ghosh y col., 1999; Holling y col., 2002).



**Figura 5: A: Esquema de la región promotora de *CIITA*.** El gen de *CIITA* tiene tres promotores independientes que generan tres diferentes ARNm de *CIITA* (tipo I, III y IV). Los tres tipos de *CIITA* se forman por corte y empalme alternativo del exón 1 con el exón 2. Los ARNm de *CIITA* de tipo I y III contienen dos sitios de inicio de la traducción, el primero ubicado en su respectivo exón 1 y el otro en el exón 2, que es común para todos los tipos de ARNm de *CIITA*. En cambio, el ARNm de *CIITA* tipo IV tiene un sólo sitio de inicio de la traducción que está ubicado en el exón 2. **B:** Esquema de las posibles isoformas de la proteína de *CIITA*. Los diferentes tipos celulares expresan principalmente un tipo de ARNm que puede dar origen a diferentes isoformas de *CIITA* según el sitio de inicio de la traducción utilizado. Los datos que están entre paréntesis indican una baja expresión del tipo de ARNm o variaciones entre las diferentes condiciones o reportes indicados en la literatura.

La expresión de *CIITA* a partir del promotor IV ocurre por efecto del IFN- $\gamma$  (Figura 6). Esta citoquina induce la activación de tirosinas quinasas de la familia de las Janus Quinasas (JAK 1, JAK 2), las cuales fosforilan el factor de transcripción STAT-1 $\alpha$  (*Signal Transducer and Activator of Transcription-1 $\alpha$* ) que se encuentran en forma latente en el citoplasma de las células y que es en consecuencia translocado al núcleo (Boss, 1997). STAT-1 $\alpha$  se une al sitio GAS (*Gamma Activating Sequence*) sólo en presencia de otro factor transcripcional llamado USF-1 (*Upstream Stimulating Factor-1*) que se une a la caja o sitio E, ambos sitios ubicados en el promotor IV (Muhlethaler-Mottet y col., 1998). La expresión de *CIITA* a partir del promotor IV requiere también la participación de los factores transcripcionales IRF-1 e IRF2 que se unen al sitio IRF (Xi y col., 1999; Xi y col., 2001).

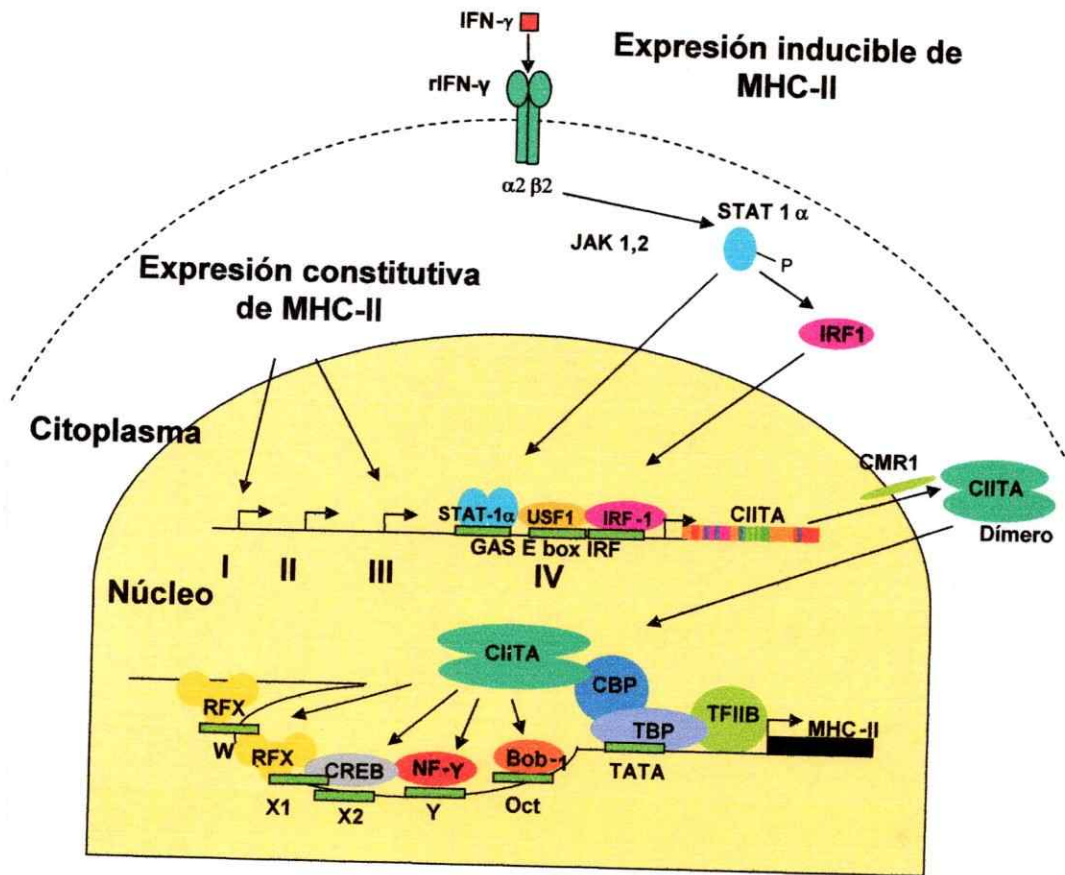
Recientemente se ha reportado el silenciamiento de algunos promotores de *CIITA*. Se ha demostrado que las células tumorales en estadio temprano y los trofoblastos fetales carecen de la expresión constitutiva e inducible por IFN- $\gamma$  de *CIITA* y de MHC-II, probablemente debido a la hipermetilación del promotor IV de *CIITA* (van der Stoep y col., 2002a). Por otro lado, en la diferenciación de linfocitos B a células plasmáticas se produce el silenciamiento de *CIITA* debido a la activación del represor transcripcional BLIMP-1 (*B Lymphocyte-Induced Maturation Protein 1*) que se une al promotor III de *CIITA*. De esta manera BLIMP-1 reprime la expresión de los genes *MHC-II* así como de *Ii* y *HLA-DM* (Piskurich y col., 2000). El equivalente humano PRDI-BF1 (*Positive Regulatory Domain 1 Binding Factor 1*), ha sido implicado en la pérdida de la expresión de *CIITA* en células plasmáticas (Ghosh y col., 2001).

Se ha observado que los macrófagos expresan inicialmente CIITA a partir del promotor IV, luego de cual la expresión de CIITA se produce a partir del promotor I (Waldburger y col., 2001). En el proceso de maduración de las células dendríticas se silencia la expresión de CIITA producida a partir del promotor I, lo que contrasta con el aumento de la expresión de MHC-II (Landmann y col., 2001; Villadangos y col., 2001). Finalmente, se ha demostrado que el factor SOCS-1 (*Suppressor Of Cytokine Signalling protein-1*) inhibe la expresión y unión de STAT-1 $\alpha$  e IRF-1 a sus respectivos elementos de unión, afectando la expresión inducible de CIITA a partir del promotor IV (O'Keefe y col., 2001).

Por otra parte se ha demostrado un aumento anormal en la expresión de CIITA y de moléculas de MHC-II en células de melanoma lo cual ha sido asociado a un pronóstico negativo y a la progresión de la enfermedad (Barnhill y col., 1993; Ostmeier y col., 1999). Estudios recientes han demostrado que la expresión constitutiva y aberrante de MHC-II en melanomas es el resultado de la expresión constitutiva de CIITA, a partir de los promotores III y IV (Deffrennes y col., 2001; Goodwin y col., 2001a). Los melanomas se pueden diferenciar según su expresión de MHC-II: melanomas que expresan en forma constitutiva los tres isotipos de moléculas MHC-II (DP, DQ y DR), y aquellos que expresan principalmente dos isotipos (DR y DP) cuando son tratadas con IFN- $\gamma$  (Deffrennes y col., 2001). La expresión constitutiva de los tres isotipos se asocia con una mayor malignidad de estos tumores con respecto a los que no lo expresan, específicamente se ha observado que la expresión de DQ se correlaciona con un mal pronóstico en los tumores de melanoma (Lee, y col 1994; Bateman y cols., 1998). Por otro lado, se ha postulado que CIITA derivado del promotor III es el responsable de la expresión de los tres isotipos de moléculas MHC-II en tumores derivados de melanoma, en

cambio CIITA derivado del promotor IV sería responsable de la expresión de DP y DR. Uno de los objetivos de esta tesis se centra en estudiar la participación de las isoformas de CIITA en la expresión de MHC-II, en particular de la expresión de DQ.

Finalmente, la expresión constitutiva de CIITA derivada del promotor IV se debería a un aumento inusual en la actividad IRF-2, debido a que IRF-1 no se expresa en las células de melanoma (Goodwin y col., 2001b). En un estudio diferente realizado en cerebro y cordón espinal de ratones con encefalitis experimental autoinmune (EAE), se observó una sobre-expresión de moléculas de MHC-II debido a un aumento en la expresión de CIITA derivado de los promotores I y IV (Suter y col., 2000).



**Figura 6: Modelo de regulación de la expresión de moléculas MHC-II.** La expresión de CIITA a partir del promotor I o III es responsable de la expresión constitutiva de las moléculas MHC-II. En cambio, la expresión inducible por IFN- $\gamma$  de *MHC-II* es mediada por CIITA producido a través del promotor IV. Se desconoce como se regula la expresión de *MHC-II* a través de CIITA producido a partir del promotor II. Se muestran los sitios de unión para los factores STAT-1, USF e IRF. La proteína de CIITA se transporta hacia el citoplasma a través de CMR1.

#### 1.4 Propuesta de trabajo

Los antecedentes expuestos muestran que la mayor parte de los estudios relacionados con CIITA se han realizado a nivel del ADN o ARNm desconociéndose casi completamente que ocurre a nivel de la proteína. Esto se debe principalmente a la inexistencia de anticuerpos dirigidos contra CIITA y a la baja expresión de esta proteína. Es así como las células dendríticas, las cuales usan el promotor I, potencialmente podrían generar proteínas de CIITA de 1.235 y 1.130 aminoácidos, los linfocitos B, generarían una proteína de 1.130 y otra de 1.106 aa, en cambio las células tratadas con IFN- $\gamma$ , generarían una isoforma de 1.106, que es común para todas las isoformas de CIITA (Figura 5) (Riley y col., 1995; Lennon y col., 1997; Muhlethaler-Mottet y col., 1997). Se ha demostrado que la expresión de los diferentes ARNm de CIITA es tejido específico, tienen distintos sitios de inicios de la traducción, sin embargo, se desconoce si los productos proteicos derivados de estos ARNm son traducidos a proteína. Uno de los objetivos centrales de esta tesis es demostrar la existencia de las diferentes isoformas de la proteína CIITA. En particular, determinar si los ARNm derivados de los promotores III y IV son capaces de generar una o varias isoformas de la proteína CIITA. Los resultados obtenidos en células de melanoma sugieren que las isoformas de CIITA podrían estar regulando la expresión de los diferentes isotipos de MHC-II (DP, DQ y DR), en particular la expresión de DQ, molécula asociada a la malignidad de tumores de melanoma. Adicionalmente y relacionado con este último punto, estudiamos si estas isoformas son capaces de inducir la

expresión de genes no asociados a la expresión de *MHC-II*, pero que pudieran dar luz acerca de una nueva función de este coactivador.

Al comienzo de esta tesis existían antecedentes aportados por la literatura que indicaban que deleciones en la región aminoterminal de CIITA genera dominantes negativos para la expresión de *MHC-II*, es decir, capaces de reducir la expresión de *MHC-II*. Al respecto, nos planteamos dos alternativas que permitirían explicar el mecanismo de acción de los dominantes negativos. Primero, los dominantes negativos competirían con CIITA salvaje por la unión a los factores transcripcionales RFX, NF-Y y CREB ubicados en el promotor de *MHC-II* impidiendo la activación de éste. En segundo lugar, los dominantes negativos formarían dímeros afuncionales con CIITA salvaje impidiendo la acción de este último en la activación de los genes *MHC-II*. Nuestros estudios estuvieron dirigidos a investigar la existencia de dímeros de CIITA ya que por una parte explicaría el mecanismo de acción de los dominantes negativos, pero más importante estos resultados podrían indicar un papel funcional de las diferentes isoformas de CIITA en la regulación de las moléculas *MHC-II*.



## **2. HIPÓTESIS DE TRABAJO**

Existen diferentes isoformas de la proteína CIITA que se expresan en forma tejido-específica, las cuales regulan diferencialmente la expresión de las moléculas MHC-II (DR, DP y DQ).

## **3. OBJETIVO GENERAL**

El objetivo general de este trabajo es el estudio del papel que cumplen las diferentes isoformas CIITA en la regulación de la expresión de las moléculas MHC-II.

## **4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1) Estudiar la expresión de la proteína CIITA en diferentes líneas celulares y demostrar la existencia de diferentes formas de la proteína de CIITA.
- 2) Determinar si las diferentes isoformas de la proteína CIITA regulan diferencialmente la expresión de los isotipos de MHC-II y la expresión de otros genes.
- 3) Estudiar la homodimerización de CIITA y determinar el efecto en la formación de dímeros de una mutación puntual en CIITA que se encontraría en un potencial sitio de homodimerización.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Clonamiento, producción y purificación de las proteínas de fusión histidina-CIITA

**Clonamiento de los fragmentos de CIITA:** Se clonaron los siguientes fragmentos de CIITA: CIITA<sup>977-1.130</sup>, CIITA<sup>465-795</sup> y CIITA<sup>329-932</sup> en el vector de expresión bacteriano pRSET-C (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, EEUU) y CIITA<sup>1-1.130</sup> en el vector pET-28b (Stratagene, La Jolla, CA EEUU). Ambos vectores contienen una secuencia de polihistidina en su extremo aminoterminal que facilita la purificación de proteínas de fusión. Las regiones que codifican para los fragmentos aminoacídicos CIITA<sup>465-795</sup> y CIITA<sup>329-932</sup> fueron clonadas en el sitio Pst I y HindIII del vector pRSETC, respectivamente. El fragmento correspondiente a los aminoacídicos 977-1.130 fue amplificado con el partidador sentido *CIITA-2S* y el partidador antisentido *CIITA-3AS* (EcoRI) (Anexo 1), luego de lo cual se purificó el producto de PCR con un Kit comercial (*PCR purification system*), se digirió con las enzimas de restricción BamHI y EcoRI y finalmente se clonó en los sitios de corte correspondientes en el vector de expresión pRSET-C. Los partidores *CIITA-4S* (XhoI) y *CIITA-3AS* (EcoRI) (Anexo 1) fueron utilizados para clonar CIITA<sup>1-1.130</sup> en el vector pET-28b en los sitios de cortes respectivos.

*CIITA* fue también clonado utilizando el producto de PCR obtenido con la pareja de partidores *CIITA-3S*(EcoRI) y *CIITA-4AS* (XhoI) (Anexo 1) en los vectores de expresión en mamíferos pcDNA3.1 HisB (Invitrogen), pTag 2a y Tag3a (Stratagene). *CIITA* clonado en el vector pCMV2-pFlag (Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, EEUU) fue obtenido a partir de la digestión con las enzimas EcoRI y XbaI del plasmidio pcDNA3.1 HisB-*CIITA*.

Todos los plasmidios que contenían las diferentes regiones de *CIITA* fueron utilizados para transformar bacterias TOP10F' para expandir el ADN plasmidial. Los fragmentos de *CIITA* clonados en los plasmidios pRSET-C y pET-28b fueron además utilizados para transformar bacterias BL21DE3pLys para expresar y purificar las proteínas de fusión histidina-*CIITA*.

**Digestión enzimática:** Se realizó mezclando 2 µl de *buffer* de restricción 10X, 10 U de la enzima de restricción correspondiente y 200-1.000 ng de ADN en un volumen total de 20 µl. Se incubó por 90 min a 37 °C y se verificó la eficiencia de digestión enzimática en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. Para purificar y aislar a partir de soluciones o geles de agarosa los fragmentos digeridos con las enzimas de restricción, se utilizaron los Kits *PCR purification system* y *gel purification system* de Concert, respectivamente, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se determinó la eficiencia de purificación y la concentración de las muestras mediante geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio.

**Reacción de ligación:** Se realizó mezclando 100 ng de cada vector con 1 µl de *buffer* de ligación 10X, 1 U de T4 ADN ligasa (Promega, Madison, WI, EEUU) a una razón molar inserto: vector de 3:1 en un volumen total de 10 µl. Se incluyó un control negativo sin inserto en la reacción de ligación. La mezcla se incubó en un termociclador a 8 °C por 14-16 horas. Posteriormente se realizó la transformación de las células competentes tal como se describe más abajo.

**Generación de bacterias competentes:** Las cepas bacterianas BL21DE3pLys y TOP10F' fueron crecidas en placas LB-agar con cloramfenicol (35 µg/mL) y tetraciclina (10 µg/mL) respectivamente. Una colonia de cada tipo de bacteria se creció a 37 °C con agitación constante (> 200 ciclos/min) en 200 mL de medio SOB suplementado con el antibiótico correspondiente en un matraz de 1 litro. Se

crecieron las bacterias hasta que se alcanzó una  $DO_{600}$  de 0,5 y luego se centrifugaron a  $2.665 \times g$  por 10 min a  $4^{\circ}C$ . Las bacterias se resuspendieron en 10 mL de  $CaCl_2$  50 mM frío y se incubaron en hielo por 30 min. Enseguida, las bacterias se volvieron a centrifugar por 5 min y se resuspendieron en 4 mL de  $CaCl_2$  50 mM frío y se mantuvieron en hielo hasta su uso.

**Transformación de bacterias competentes:** Se mezclaron en tubos Falcon (2059) 100 ng de plasmidio o 10  $\mu$ l del producto de ligación con 100  $\mu$ l de la suspensión de bacterias competentes por 30 min sobre hielo. Enseguida, se incubaron las bacterias por 45-50 segundos a  $42^{\circ}C$  en un baño termostático y se enfriaron por 2 min sobre hielo. Se agregó 1 mL de medio SOC (SOB más 200  $\mu$ l de solución Glucosa 20% disuelta en agua) y se incubó por otros 45 min a  $37^{\circ}C$  con fuerte agitación. A continuación, las bacterias se centrifugaron a  $10.000 \times g$  por 10 seg, se dejaron en un volumen de 150  $\mu$ l y se sembraron en placas LB-agar que contenían ampicilina (50  $\mu$ g/mL) para los plasmidios pRESTC, pET-28b, pCMV2-Flag y kanamicina (10  $\mu$ g/mL) para los plasmidios pIRES, pcDNA 3.1 HisB y pTAG 2a y 3a.

Las placas LB-agar se incubaron a  $37^{\circ}C$  por 24 horas y se tomaron cuatro colonias bacterianas al azar para ser sometidas a un PCR-colonia para determinar la presencia del inserto y la orientación correcta de este en el vector. Las colonias bacterianas que contenían *CITA* en la orientación correcta fueron crecidas y los ADN plasmidiales purificados con el Kit Concert<sup>MR</sup> según instrucciones del fabricante (Invitrogen, MA., EEUU) y enviadas a secuenciar al Servicio de Estudios Avanzados de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Las bacterias que contenían el inserto de interés fueron almacenadas en Glicerol 50% v/v a  $-80^{\circ}C$ .

**Ensayo de expresión de proteínas de fusión:** Una colonia de las bacterias transformadas con cada una de las diferentes regiones de *CIITA* se creció en un tubo Falcon 2059 con 5 mL de medio LB y su respectivo antibiótico de selección hasta alcanzar un  $DO_{600}$  entre 0,4-0,6. Posteriormente se indujo la expresión de las proteínas de fusión por 2 horas a 37°C con 1 mM isopropil- $\beta$ -D(-)-tiogalactopiranosido (IPTG) y se centrifugó a 3.000 x g por 15 min a 4°C. Se utilizaron como controles negativos bacterias transformadas con el vector sin inserto y bacterias no transformadas, en ausencia o presencia de IPTG, respectivamente. Como control positivo de expresión se utilizó bacterias transformadas con el plasmidio pRSETC-Lac-Z. Se verificó la inducción y el tamaño molecular de las proteínas de fusión mediante geles de SDS-PAGE teñidos con Azul de Coomasie.

**Purificación de proteínas recombinantes:** Una colonia de las bacterias transformadas con *CIITA*<sup>977-1.130</sup> o *CIITA*<sup>465-795</sup> se creció en 200 mL de medio LB hasta alcanzar una  $DO_{660}$  entre 0,4-0,6. Posteriormente se indujo la expresión de las proteínas de fusión con 1 mM de IPTG por 2 horas a 37°C y se centrifugó a 3.000 x g por 15 min a 4°C. El pellet fue resuspendido en 10 mL de *buffer* de lisis de Guanidinio (Guanidinio 6 M,  $Na_2PO_3$  20 mM, NaCl 0,5 M, pH 7.8) y se incubó por 10 min a 37°C bajo agitación constante. Posteriormente, se sonicó 3 veces por 10-20 seg cada vez a máxima intensidad (Sonicator® Ultrasonic Processor, Misonix, Farmingdale, NY, EEUU), se centrifugó como antes y se recuperó el sobrenadante. Las proteínas de fusión histidina-*CIITA*<sup>977-1.130</sup> e histidina-*CIITA*<sup>465-795</sup> fueron purificadas mediante columnas de afinidad acopladas a níquel según instrucciones del fabricante (Xpress™ System Protein Purification kit, Invitrogen, Life Technologies, CA, EEUU.). La concentración de proteínas se determinó por la

reacción de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, EEUU.) y la pureza de las mismas en geles de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturalantes.

## 5.2 Animales e inmunización

**Inmunización Convencional:** En todos los protocolos de inmunización se utilizaron ratones Balb/c y conejos de 8-12 semanas de edad que se inmunizaron con las proteínas recombinantes CIITA<sup>977-1.130</sup> y CIITA<sup>465-795</sup>. Los ratones se inmunizaron con 50 µg de cada proteína recombinante diluida en 100 µl de PBS más 100 µl de adyuvante de Freund completo (ACF; Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, EE.UU). Se inmunizaron cada 7 días por un total de 4 veces intraperitonealmente. Los conejos se inmunizaron con 150 µg de cada proteína recombinante y subcutáneamente. Los sueros fueron obtenidos previos a la inmunización (suero pre-inmune o P.I.) y una semana después de cada inmunización (suero inmune o S.I.). Estos sueros fueron analizados por ELISA y *Western blot* para determinar su especificidad.

**Inmunización con células dendríticas:** Dos millones de células dendríticas purificadas de bazo de ratones Balb/c se pulsaron por un período de 3 h a 37°C con una concentración final de 2.5 mM de proteína CIITA<sup>977-1.130</sup> o CIITA<sup>465-795</sup> o bien una mezcla de las dos. Posteriormente las células se lavaron 2 veces con *buffer* fosfato salino (PBS) y el pellet de células se resuspendió en 200 µL de PBS estéril para luego ser inyectado en forma intravenosa. Al mismo tiempo se inyectó intraperitonealmente una emulsión preparada con 50 µg de CIITA<sup>977-1.130</sup> o CIITA<sup>465-795</sup> o bien 100 µg de la mezcla de proteínas recombinantes. Como control se inyectó un grupo de ratones 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.

### 5.3 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 µL de una solución con 6 µg de proteína recombinante (CIITA<sup>977-1.130</sup> o CIITA<sup>465-795</sup>) diluida en 10 mL de *coating buffer* (NaHCO<sub>3</sub> 0,33 M, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,66 M, pH 9.5). La placa se incubó con el antígeno toda la noche a 4°C. Al día siguiente, los sitios libres de la placa se bloquearon por 1 h a temperatura ambiente con una solución de PBST (Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, EE.UU.). Enseguida, se agregó a cada pocillo 50 µL de sobrenadante de cultivo de los hibridomas y se incubaron por 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavó la placa 3 veces con PBST, se agregó a cada pozo 100 µL de anticuerpo de cabra anti-Ig de ratón conjugado con peroxidasa (BD PharMingen, San Diego, CA, EE.UU.) diluido 1:1.000 y se incubó a temperatura ambiente por 1 h. Enseguida se lavó 3 veces con PBST y 2 veces con agua destilada. La placa fue entonces incubada con 100 µL de sustrato reactivo proveniente del *kit TMB Substrate Reagent Set* (BD PharMingen, San Diego, CA, EE.UU.). La reacción se detuvo después de transcurridos 20 min agregando 50 µL de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1 M y se determinó la reacción colorimétrica 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<sup>977-1.130</sup> o CIITA<sup>465-795</sup>, pero no ambas proteínas. De esta manera, los anticuerpos seleccionados reconocen específicamente CIITA y no el fragmento de histidina o aminoácidos adicionales que se encuentran en los vectores de expresión.

#### **5.4 Generación de anticuerpos monoclonales**

La fusión se realizó con las células de bazo aisladas de los ratones inmunizados y el mieloma murino NSO/2 según lo descrito por Köhler y Milstein (1975, 1976). Brevemente, las células de bazo ( $2 \times 10^8$ ) se fusionaron con células del mieloma murino NSO/2 en proporción 5:1 con PEG 50% en RPMI (PEG 4000, Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, EE.UU.). Los hibridomas, híbridos de células B con las células NSO/2, se seleccionaron en medio RPMI + FCS 10% e hipoxantina, aminopterina y timidina (HAT) (Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, EE.UU.). Luego los hibridomas se cultivaron en medio RPMI + FCS 10% e Hipoxantina timidina por dos semanas para enseguida mantenerlos en RPMI + FCS 10%. La selección de los hibridomas productores de anticuerpos monoclonales contra CIITA se realizó en 2 etapas. En una primera selección se utilizó la técnica de ELISA, según se describe en el punto 5.3. Enseguida los hibridomas seleccionados se ensayaron por *Western blot* para determinar la capacidad de los anticuerpos para reconocer la proteína CIITA expresada en forma transiente en células Cos7 según se describe en 2.8.

#### **5.5 Cultivos celulares**

**Líneas celulares murinas:** RAG (PC) (adenocarcinoma), L(tk-) (fibrosarcoma) fueron cultivadas en DMEM, FCS 10% (Gibco BRL, Grand Island, N.Y. EEUU),



CO<sub>2</sub> 10% a 37°C; la línea Raw264.7 (monocito-macrófago) fue cultivada en RPMI 1640 (Gibco BRL, Grand Island, N.Y. EEUU), FCS 10%, CO<sub>2</sub> 5% a 37°C. Las líneas celulares RAG y L(tk-) son incapaces de expresar MHC-II y la proteína CIITA cuando son tratadas con IFN- $\gamma$  (Naves y col., 2002).

**Líneas celulares humanas:** Las líneas celulares 42/95 (melanoma que expresa solo DR y DP cuando es tratada con IFN- $\gamma$ ), BLS-2 (línea B linfoblastoide mutante para la expresión de MHC-II debido a una deleción carboxiterminal en los aminoácidos 955-959 de CIITA), RAJI (línea B linfoblastoide que expresa MHC-II y CIITA en forma constitutiva), RJ.2.2.5 (línea B linfoblastoide derivada por mutagénesis de las células RAJI, que presentan una gran deleción del gen *CIITA*), BLS-1 (línea B linfoblastoide que pertenece al grupo de complementación B de BLS), 6.1.6 (línea B linfoblastoide que pertenecen al grupo de complementación D de BLS) y Cos7 (células derivadas de simio) fueron cultivadas en RPMI 1640, FCS 10%, CO<sub>2</sub> 5% a 37°C; las líneas celulares HeLa (carcinoma epitelial), ECV304 (epitelial) y HT144 (melanoma que expresa MHC-II constitutivamente y CIITA derivado del promotor III) fueron cultivadas en DMEM, FCS 10%, CO<sub>2</sub> 10% a 37°C. Todos los medios de cultivos fueron suplementados con penicilina 100 U /mL, estreptomina 100  $\mu$ g/mL y glutamina 2 mM.

## 5.6 Transfección de células con *CIITA* de origen humano

**Transfección transiente:** Las células Cos7 fueron transfectadas con el gen completo de *CIITA* humano clonado en el vector pCMV2-pFlag de expresión en mamíferos. Se utilizó el vector sin inserto como control negativo. Para la electroporación, dos millones de células fueron incubadas por 10 min a temperatura ambiente en 400  $\mu$ l de RPMI FCS 10% más 30  $\mu$ g de plasmidio en un

volumen de 50  $\mu$ l de PBS. Las condiciones de electroporación fueron 400 V, 960  $\mu$ F y 200 Ohm (Pulse Controller Plus; Bio-Rad Hercules, Laboratorios, Inc, CA, EEUU). Enseguida, se dejaron las células en reposo por 10 min en la cubeta de electroporación y se sembraron en una placa de cultivo P100 a 37°C, CO2 5% por 48 horas. Finalmente, se procedió a la extracción de proteínas totales según lo indicado en 5.7.

**Transfección estable:** Las diferentes líneas celulares fueron transfectadas con *CIITA* humano clonado en diferentes vectores de expresión en mamíferos los cuales contienen un gen de resistencia a neomicina (G418), que se usó para seleccionar los transfectantes. Se utilizaron los vectores sin inserto como control negativo. Las células fueron transfectadas según lo descrito anteriormente en transfección transiente, pero esta vez las células se sembraron en dos placas de cultivo P100 en medios suplementados con G418 (1mg/mL) por 2-3 semanas. Una vez que se obtuvieron colonias celulares resistentes a G418, las células se mantuvieron en cultivo con 300  $\mu$ g/mL de G418. Posteriormente, se analizó la presencia de MHC-II en la superficie de las células mediante citometría de flujo, en cuyo caso la expresión de MHC-II fue alrededor de un 5-10%. A continuación, se enriquecieron las células MHC-II+ mediante selección positiva con partículas magnéticas acopladas con anticuerpos (Clausen y cols., 1998). Brevemente, 5-10x10<sup>6</sup> células fueron lavadas 2 veces con 5 mL de verseno + FCS 5% (Buffer Macs) a 4°C, luego incubadas por 30 min a 4°C con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-MHC-II humano o murino, según corresponda a la línea celular, diluido en medio IF (RPMI FCS 2%). Posteriormente, se eliminó el exceso de anticuerpos con un lavado en 10 mL de *buffer* MACS y se incubó por 10 min a 4°C con agitación rotatoria con 20  $\mu$ l de microesferas magnéticas acopladas con un

anticuerpo anti-inmunoglobulina de ratón (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) diluido en 500  $\mu$ l de *buffer* Macs. Posteriormente las células fueron lavadas con 10 mL de *buffer* Macs, resuspendidas en 1 mL de *buffer* Macs y mantenidas en hielo hasta ser pasadas a través de una columna de selección positiva, utilizada según las instrucciones del fabricante. Este procedimiento permitió obtener un 95% de células MHC-II+ determinado por citometría de flujo. Luego de 48 a 72h de cultivo, las células fueron clonadas mediante dilución límite y se escogieron aquellos clones que fueron 100% MHC-II+ para realizar los experimentos descritos en esta tesis.

### **5.7 Extractos de proteínas**

Las células fueron lisadas mediante incubación con agitación constante por 30 min a 4°C en 350  $\mu$ l de *buffer* de lisis completo (Hepes 10mM pH 7.9, NaCl 400mM, MgCl<sub>2</sub> 1.5mM, EGTA 0,1mM, Glicerol 5%, DTT 1mM, PMSF 0,4 mM y NP40 0,5%) más inhibidores de proteasas libres de EDTA (1/4 de pastilla por cada 5 mL de *buffer* de lisis, Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, EEUU) y 15  $\mu$ l de leupetina (1 $\mu$ g/mL). Enseguida el extracto celular se centrifugó a 11.000 x g por 30 min a 4°C, se rescató el sobrenadante y se determinó la concentración de proteínas mediante una reacción colorimétrica (kit DC Protein Assay, Bio-Rad Hercules, CA, EEUU). Las muestras fueron utilizadas para realizar ensayos de inmunoprecipitación, inmunoblot y geles de dos dimensiones.

Para realizar los ensayos de co-inmunoprecipitación se lisaron las células con un *buffer* de baja fuerza iónica compuesto de Tritón 1%, Tris 25 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM e inhibidores de proteasas tal como se describió anteriormente.

## 5.8 Inmunoblot e inmunoprecipitación

**Inmunoblot:** Los extractos celulares fueron desnaturalizados en *buffer* de muestra 3X (Tris HCl 156 mM, pH 6.8, SDS 6.25%, 2-Mercaptoetanol 12.5%, Glicerol 25% y azul de bromofenol 0,05%) y se hirvieron por 5 min a 100°C para luego ser cargados en un gel de acrilamida al 6% para visualizar CIITA, ó 10% para detectar las proteínas de fusión. La electroforesis se realizó a 30 mA constante en *buffer* de corrida (Tris 25 mM, Glicina 0,2 M, SDS 0,1%). La transferencia de las proteínas desde el gel de poli-acrilamida a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad Hercules, EEUU.), se realizó por 2 horas a 100 Volts constante en *buffer* de transferencia (Metanol 20%, Tris 25 mM Glicina 0,2 M). Enseguida, para bloquear los sitios libres de la membrana, esta se incubó durante la noche a 4°C con PBS-Tween 0,1% (PBST) y leche descremada 5%. Posteriormente, se incubó por 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo monoclonal 7G8 (1:1.000) o anti-histidina (1:5.000) diluido en PBST y leche descremada 0,2%. Se lavó la membrana 3 veces por 10 min con PBST, se incubó por 1 h a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario anti-inmunoglobulina de ratón (1:10.000) acoplado a peroxidasa (Amersham, EEUU) diluido en PBST y leche descremada 0,2%. Las membranas se lavaron como mencionado más arriba y se determinó la presencia de las proteínas mediante una reacción de quimio-luminiscencia (kit ECL-Plus, Amersham, EEUU), siguiendo las instrucciones del fabricante.

**Inmunoprecipitación:** Para eliminar el marcaje inespecífico el extracto proteico (volumen  $\cong$  350  $\mu$ l) fue incubado por 2 horas a 4°C con 3  $\mu$ L de suero normal de conejo y 40  $\mu$ L de sefarosa-proteína G 50% diluido en PBS (Amersham, EEUU). Enseguida, se centrifugó a 5.000 x g por 2 min y se rescató el sobrenadante en un

tubo nuevo. A continuación, se incubó toda la noche a 4°C con 4 µL del anticuerpo de interés (suero inmune de conejo contra CIITA<sup>474-795</sup> y CIITA<sup>977-1.130</sup> o 2.5 µg del suero inmune contra el péptido<sup>726</sup>GEIKDKELPQYLALTR<sup>741</sup>). Al día siguiente, se incubó por 30 min a 4°C con 25 µl de Proteína G 50% bajo agitación constante en un *roller*. Luego, se lavó 4 veces con el *buffer* de lisis completo sin glicerol e inhibidores y una vez con PBS frío. Finalmente, al complejo de proteínas capturadas por la sefarosa-proteína G se adicionó 10 µl de *buffer* de muestra 3X, se hirvió a 100°C por 5 min se centrifugó a 5.000 x g por 2 min y el sobrenadante se cargó en geles de acrilamida al 6%. Para los ensayos de co-inmunoprecipitación los lavados se realizaron con el mismo *buffer* con el cual se realizó la co-inmunoprecipitación. La inmunoprecipitación de MHC-II desde extractos proteicos marcados con biotina se realizó tal como se describe arriba, excepto por el uso de un suero normal de ratón y del anticuerpo anti-HLA-DR (2µg) (Beckton, Dickinson EEUU) para realizar el *pre-clearence* y la inmunoprecipitación, respectivamente.

## 5.9 Citometría de flujo

La expresión de MHC-II humana y murina en las células transfectadas con *CIITA* fue detectada con los anticuerpos anti-DR-PE (Beckton & Dickinson, San Diego, CA, EEUU) e IA/IE-FITC, respectivamente.  $4 \times 10^5$  células fueron incubadas por 30 min a 4°C en la oscuridad con los anticuerpos mencionados anteriormente a la dilución apropiada en 100 µl de medio DMEM FCS 2%. Luego, las células se lavaron con PBS FCS 2%, se centrifugaron a 400 x g por 4 min y se resuspendieron en PBS FCS 2% a una concentración de  $10^6$  células por mL y se agregó yoduro de propidio (PI) a una concentración de 1 mg/mL/ $10^6$  células para

eliminar las células muertas en la adquisición de los datos. La fluorescencia se determinó utilizando un citómetro de flujo (FACScan Becton & Dickinson) y los resultados fueron analizados con el programa CELLQuest. El análisis se restringió a las células vivas utilizando una región para FCS/SSC y PI negativas.

### **5.10 Preparación de RNA total**

El ARNm total fue purificado con el reactivo TRIzol según instrucciones del fabricante (GIBCO BRL, Life Technologies, Bethesda, MD, EEUU.). Brevemente, las células crecidas en suspensión ( $5 \times 10^6$  células) y células adherentes crecidas en placas P100 fueron lisadas con 2 o 5 mL de TRIzol, respectivamente. Se colocó el lisado en un tubo Falcon 2095, se resuspendió suavemente hasta obtener una solución homogénea y se incubó por 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se dividieron las muestras en 1 mL en tubos *ependorf* y se agregó a cada tubo 350  $\mu$ l de cloroformo (Merck, Darmstadt, Alemania). Se mezcló la solución TRIzol-cloroformo por inversión suave durante 20 segundos, se dejó reposar por 1 minuto y se centrifugó a  $11.000 \times g$  por 15 min a  $4^\circ\text{C}$ . Se recuperó la fase superior (500  $\mu$ l) y se precipitó el ARNm con 500  $\mu$ l de isopropanol durante 18-24 horas a  $-20^\circ\text{C}$ . Al día siguiente, se centrifugó la muestra a  $11.500 \times g$  por 10 min a  $4^\circ\text{C}$  y el pellet se lavó con 500  $\mu$ l de etanol 75% (Merck, Darmstadt, Alemania) diluido en agua-DMPC (Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, EEUU). Enseguida, se juntaron las muestras en un solo tubo y se lavaron nuevamente con etanol 75%. Posteriormente, se dejó secar el pellet de ARNm por 5-10 min y se resuspendió el pellet en 50  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O-DMPC. La calidad del ARNm aislado se evaluó en un gel de agarosa al 0,8% (W&Z, Winkler Ltda., Santiago, Chile) teñido con bromuro de etidio (0,3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (W&Z, Winkler Ltda) y se cuantificó su

concentración (D.O<sub>260</sub>) en un espectrofotómetro 6405 UV/Vis (Jenway Limited, Dunmow, Inglaterra).

### 5.11 RT-PCR

La reacción de transcripción inversa se realizó mezclando 2 µg de RNA con 1 µg de oligonucleótido poli-dT en un volumen final de 12 µl. La mezcla se incubó durante 10 min a 70°C para desnaturar el RNA, luego de lo cual se enfrió en hielo y se agregaron 8 µl de una mezcla de dNTP (1,25 mM) (GIBCO BRL, Life Technologies, Bethesda, MD, EEUÚ.), *buffer* de reacción para transcriptasa reversa, inhibidor de RNasa- RNasin<sup>®</sup> (40 U) y transcriptasa inversa M-MLV-RT (200 U) (Promega, Madison, WI, EEUU), completando un volumen de 20 µl. La reacción se llevó a cabo en un termociclador (PTC-150 MiniCycler, MJ Research INC, Watertown, MA, EEUU) durante 1 h a 42°C después de lo cual se incubó por 10 min a 65°C para inactivar la enzima. Se realizaron controles sin RT para excluir la contaminación por ADN. Posteriormente, se realizaron reacciones de PCR independientes para cada gen en estudio. Se usó β-actina como gen de expresión constitutiva para el control de carga de las muestras.

### 5.12 PCR

Las reacciones se realizaron en un volumen total de 25 µl, incluyendo 1 µl de cDNA, Mg<sub>2</sub>Cl 1,5 mM, dNTP (200 uM c/u), partidores sentido y antisentido (0,25 µM c/u), tampón de reacción para PCR y ADN polimerasa (1,25 U) (reactivos de GIBCO BRL, Life Technologies, Bethesda, MD, EEUU). Las mezclas de reacción se sometieron a diferentes programas de amplificación en un termociclador (ver Anexo 1 para más detalles) y finalmente las bandas amplificadas se resolvieron en geles de agarosa al 1,5%, teñidas con bromuro de

etidio y visualizadas en un transiluminador de luz ultravioleta. Cada gel fue finalmente fotografiado utilizando una cámara digital Kodak (DC 120 Digital Camera, GIBCO BRL, Life Technologies) y la cuantificación de las bandas fue realizada con el programa NIH image.

Para la amplificación de productos de *CIITA* a partir de bacterias (PCR-colonia) se utilizó una muestra de cada colonia o 1  $\mu$ l de cada colonia crecida previamente en medio LB por 1-2 horas. El PCR-colonia se realizó usando el partidor T7-S ubicado en el sector aminoterminal del vector y los partidores *CIITA-5AS*, *CIITA-2AS*, *CIITA-6AS* y *CIITA-6AS* (Anexo 1), para comprobar la orientación correcta de *CIITA*<sup>1-1.130</sup>, *CIITA*<sup>977-1.130</sup>, *CIITA*<sup>465-795</sup> y *CIITA*<sup>329-932</sup>, respectivamente. Las colonias bacterianas que contenían el inserto en la orientación correcta fueron crecidas, los ADN plasmidiales purificados con el Kit Concert<sup>MR</sup> según instrucciones del fabricante (Invitrogen, MA., EEUU) y posteriormente enviadas a secuenciar al Servicio de Estudios Avanzados de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

### 5.13 Arrays

**cDNA Arrays, sondas, hibridación y escáner:** El ARNm total fue aislado con TRIzol (Life Technologies, Inc.) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARNm aislado fue usado para generar hebras simples marcadas con sondas fluorescentes Cy3 o Cy5 por transcripción reversa. Los cDNA fueron usados para hibridar portaobjetos de *arrays*. Para sintetizar los cDNA hebras simples se incubaron 30  $\mu$ g de ARNm total y 2  $\mu$ l de oligo dT (2  $\mu$ g/ $\mu$ l) en un volumen total de 19  $\mu$ l por 10 min a 70 °C. Luego se enfriaron las muestras en hielo por 3 min y se agregaron 20  $\mu$ l por muestra de una solución previamente preparada que contenía



4  $\mu$ l de dUTP-Cy3 o dUTP-Cy5 (Amersham, EEUU), 4  $\mu$ l de DTT 0,1M, 2  $\mu$ l de dNTP 1,25mM/bajo en timina 0,25mM, 1  $\mu$ l de Rnasin, 8  $\mu$ l de *buffer* 5X y 1  $\mu$ l de la enzima transcriptasa reversa SuperScript II (Life Technologies, Inc., MA, EEUU). La mezcla se incubó por 30 min a 42°C y luego se agregó 1  $\mu$ l extra de la enzima transcriptasa reversa y se incubó por otros 30 min. Enseguida, se adicionó 5  $\mu$ l de EDTA 500 mM, 10  $\mu$ l de NaOH 1 M mezclando vigorosamente entre cada solución y se centrifugaron a 12.000 x g por 1 min. Se incubó la muestra a 65°C por 20 min para hidrolizar el RNA, se dejó enfriar por 10 min a temperatura ambiente y se agregaron 25  $\mu$ l de Tris/HCl 1 M pH 7.5 para neutralizar la reacción. Posteriormente, las sondas marcadas con Cy3 y Cy5 fueron combinadas y purificadas usando columnas Microcon según instrucciones del fabricante (Millipore, Bedford, MA). Las sondas se lavaron 4 veces en la columna con 500  $\mu$ l de *buffer* TE y en el último lavado se dejó un volumen igual a 22  $\mu$ l, ajustado con *buffer* TE. Enseguida, se colocaron estos 22  $\mu$ l en un tubo *ependorf* nuevo y se adicionaron 2  $\mu$ l (20  $\mu$ g) de ADN COT-1 humano o murino según corresponda, 1  $\mu$ l (8-10  $\mu$ g) de poly(A) (ambos de Amersham, EEUU), 6.2  $\mu$ l de SSC 20X y 1  $\mu$ l de SDS 10% en un volumen final de 33.2  $\mu$ l. Enseguida, se desnaturó la sonda a 100°C por 2 min en un termocalefactor, se centrifugó a 12.000 x g por 4 min y las sondas marcadas fueron incubadas sobre un portaobjeto que contenía los *arrays* procedentes de la *National Cancer Institute* (NCI), los cuales fueron puestos en cámaras de hibridación e incubados toda la noche por 10-16 hrs. a 65°C. Al día siguiente, los portaobjetos fueron lavados con SSC 1X por 1 min, SSC 0,2X por 1 min, SSC 0,05X por 30 segundos y centrifugadas a 400 x g por 5 min. Las imágenes de fluorescencia fueron capturadas por un escáner Genepix 4000 (Axon Instruments, Inc., Foster City, CA) el cual permite balancear y analizar las señales.

Los *arrays* 15K NIA y UNiGem fueron usados para cDNA murino y humano, respectivamente.

#### **5.14 Análisis de los datos de *arrays***

Los datos de las imágenes e intensidad de las señales fueron almacenados en el banco de datos del *Center for Information Technology* de NIH. La razón de intensidad Cy3: Cy5 de cada gen fue calculada y normalizada con respecto a la intensidad de la señal total de la correspondiente longitud de ondas en cada hibridación. En los datos obtenidos para cada análisis, las razones de intensidad total estaban dentro de un rango de 0,7 a 1.25. Bajo estas condiciones se definió razones mayores de 2 y menores de -2 como indicadores significativos de aumento o disminución en la expresión de los genes, respectivamente.

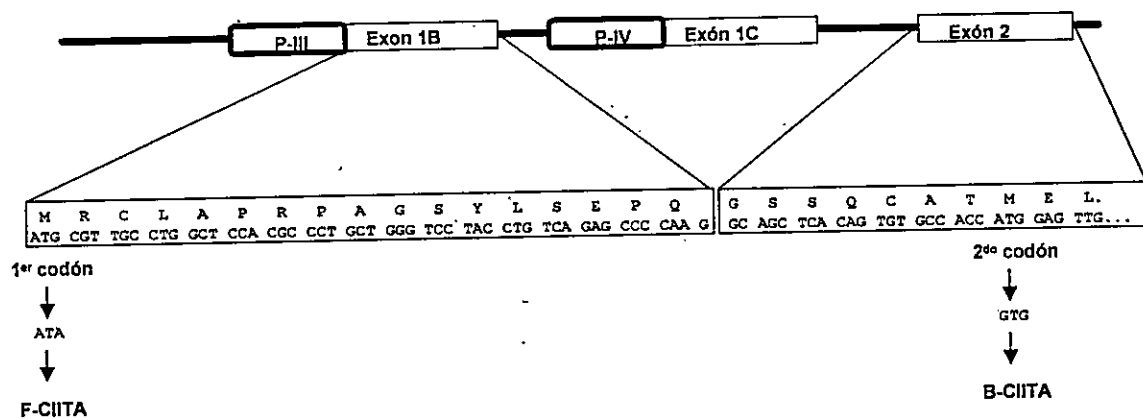
#### **5.15 Marcación de proteínas con Metionina S<sup>35</sup>.**

Las células Cos7 transfectadas transientemente con el vector pFLAG o pFLAG CIITA fueron cultivadas en placas P-6 (500.000 células/pocillo) por 44 horas en medio RPMI 1640, FCS 10%, CO<sub>2</sub> 5% a 37°C y luego lavadas dos veces e incubadas en medio sin metionina y cisteína (Sigma RPMI 7513) por 30 minutos. Enseguida, se cambió el medio y se incubó nuevamente en RPMI 7513 más Metionina y Cisteína S<sup>35</sup> (250 uCi/pocillo) por 4 horas. Posteriormente se lavaron las células con PBS y se procedió a la extracción de proteínas tal como se describe en el punto 5.7.

#### **5.16 Mutagénesis sitio dirigida**

La forma larga de *CIITA* producida por linfocitos B (B-*CIITA*) y la corta producida por fibroblastos (F-*CIITA*) fueron generadas a partir de *CIITA* clonado

en el vector pIRES/neo (Clontech, EEUU) mediante mutagénesis sitio dirigida utilizando el kit *Quickchange<sup>TM</sup> site-directed mutagenesis* (Stratagene, EEUU), según las instrucciones del fabricante. La mutación de *CIITA* en el nucleótido 118 (ATG->ATA) fue generada usando los partidores ATG1 (Anexo 1), de manera que el segundo codón de inicio ubicado en el nucleótido 187 fue utilizado para codificar F-*CIITA*, cuyo tamaño es igual al generado por el promotor IV. B-*CIITA* se generó utilizando los partidores ATG2 (Anexo 1), que permitieron mutar el nucleótido 187 (ATG->GTG), de manera que la traducción de B-*CIITA* comience a partir del codón de inicio ubicado en la posición 116 (Figura 7). La mutación se verificó por ensayos de restricción enzimática y secuenciación. La mutación de aminoácido 469 L->P (SAK) fue realizada en el vector pCMV2-Flag-*CIITA* con los partidores SAK (Anexo 1).



**Figura 7: Mutación sitio dirigida para generar las formas corta y larga de *CIITA*.** La mutación del primer codón de inicio de la traducción (ATG por ATA) permite que la traducción de *CIITA* ocurra a partir del segundo codón de inicio de la traducción y se genere un *CIITA* de tamaño idéntico al derivado del promotor IV (F-*CIITA*). La mutación del segundo codón (ATG por GTG) permite que la traducción ocurra a partir del primer codón, lo cual genera un *CIITA* semejante al *CIITA* derivado del promotor III (B-*CIITA*).

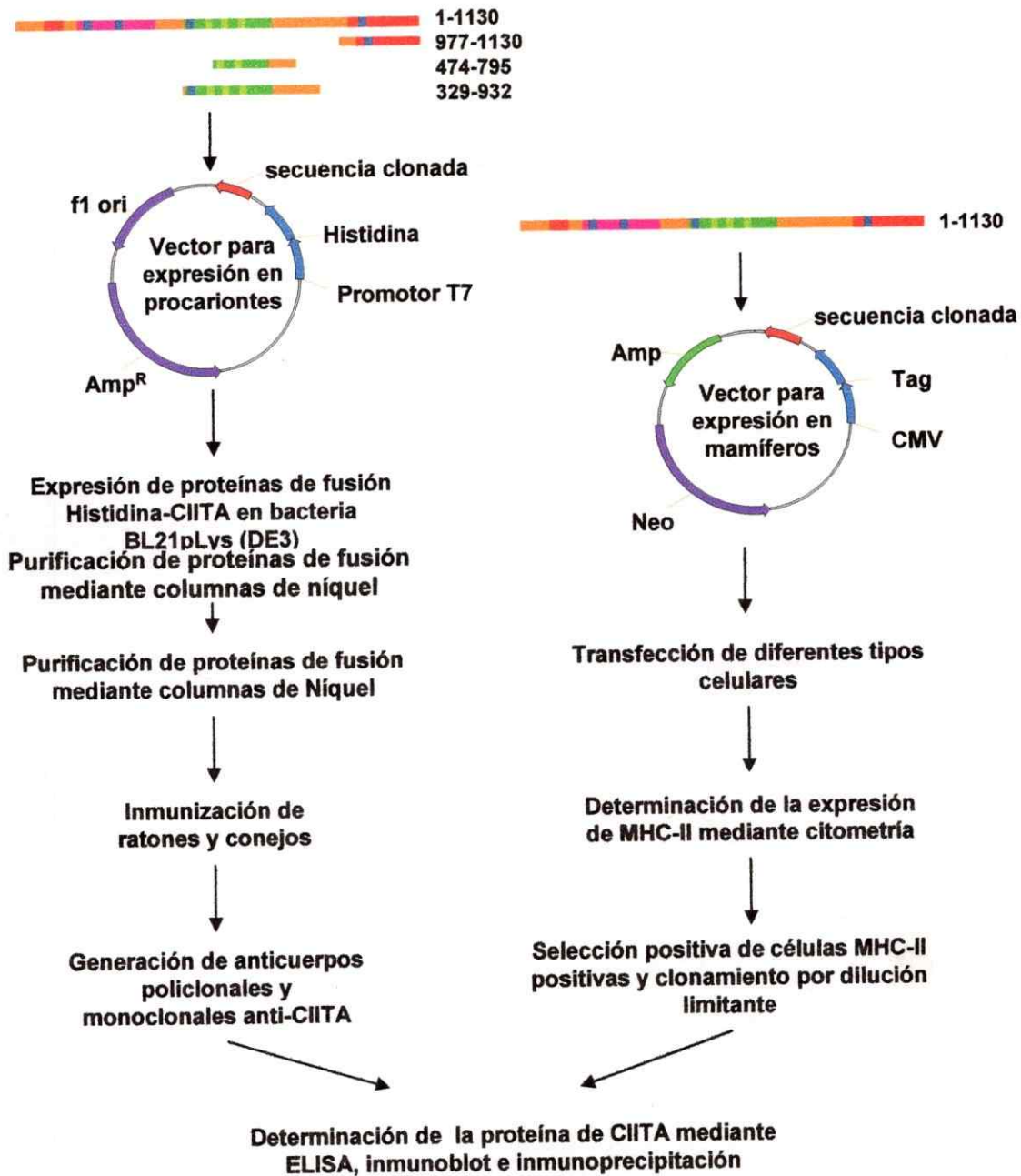
## 6. RESULTADOS

Para estudiar la proteína CIITA se diseñó una estrategia experimental que permitiese la generación de anticuerpos contra la proteína. Esta consistió en preparar en primer lugar proteínas de fusión de diferentes regiones de la proteína utilizando vectores de expresión procariontes, las cuales se usaron como inmunógenos. Enseguida se clonó la proteína completa de CIITA en vectores de expresión en mamíferos para seleccionar mediante transfección de CIITA en la línea celular Cos7, los sueros e hibridomas productores de anticuerpos específicos contra CIITA. En la Figura 8 se muestra un esquema de la estrategia experimental para la obtención de anticuerpos policlonales y monoclonales contra CIITA.

### 6.1 Estudiar la expresión de la proteína CIITA en diferentes líneas celulares y demostrar la existencia de diferentes formas de la proteína de CIITA

#### 6.1.1 Generación y caracterización de anticuerpos monoclonales y policlonales anti-CIITA

Se generaron cuatro proteínas de fusión histidina-CIITA: CIITA<sup>1-1.130</sup>, CIITA<sup>977-1.130</sup>, CIITA<sup>474-795</sup> y CIITA<sup>329-932</sup>. Estas fueron clonadas en los vectores pREST-C y pET-28b que contienen en su región aminoterminal una secuencia de polihistidinas que permite la purificación a través de una columna de níquel. El tamaño de las proteínas de fusión fue determinado en geles de poliacrilamida teñidos con azul de coomasie (Figura 9A) y mediante *Western blot* (Figura 9B)

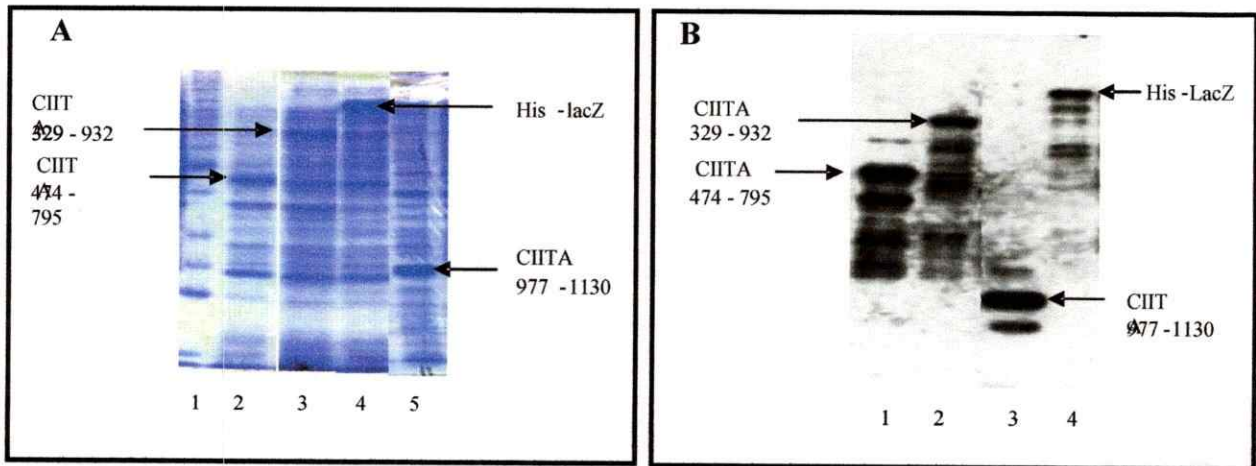


**Figura 8: Estrategia experimental para la generación de anticuerpos contra CIITA.** Fragmentos de *CIITA* fueron amplificados con diferentes parejas de partidores y clonados en vectores de expresión para procariontes. Las proteínas de fusión fueron utilizadas para inmunizar ratones Balb/c y conejos. Los sueros de estos animales y los anticuerpos monoclonales fueron caracterizados por ELISA, inmunoblot e inmunoprecipitación. La especificidad de los anticuerpos anti-CIITA fue corroborada mediante ensayos de inmunoprecipitación e inmunoblot a partir de extractos proteicos derivados de células de mamíferos transfectadas con *CIITA*.

usando el anticuerpo anti-histidina. El tamaño de las proteínas recombinantes inducidas con IPTG fue el esperado y su secuenciación a nivel de ADN fue la esperada (resultado no mostrado). Las bandas de menor peso molecular que se observan en el *Western blot*, corresponden a productos de degradación de las proteínas de fusión. Las proteínas de fusión fueron purificadas con columnas de níquel y utilizadas posteriormente para inmunizar ratones y conejos para generar anticuerpos anti-CIITA. Cabe mencionar que inicialmente la región carboxiterminal CIITA<sup>977-1.130</sup> (16 Kda) fue clonado en un vector que contiene una secuencia de GST (Glutation S transferasa) en cuyo caso se generaron anticuerpos dirigidos principalmente contra la proteína GST debido probablemente a que esta proteína es altamente inmunogénica y además por su gran tamaño molecular (29 Kda) con respecto a la proteína clonada de CIITA, que redujo considerablemente la probabilidad de generar anticuerpos contra CIITA (resultados no mostrados). Estos resultados nos obligaron a utilizar vectores que contienen secuencias de menor peso molecular y que nos permitiesen una fácil purificación, es por ello que utilizamos un vector (pRSET) codifica un péptido de 3 Kda y contiene una secuencia de polihistidina que permite su purificación con columnas de nickel.

Las proteínas de fusión histidina-CIITA<sup>977-1.130</sup> e histidina-CIITA<sup>474-795</sup> fueron utilizadas para inmunizar ratones Balb/c y conejos debido a que estas son conservadas entre las diferentes isoformas de CIITA que se generan de los diferentes ARNm (Figura 5). En las Figuras 10 y 11 se muestra que los sueros inmunes de conejos y ratones son capaces de reconocer CIITA. Se generaron dos sueros inmunes de conejo anti-CIITA y se muestra el resultado de uno de ellos. Ambos sueros inmunes fueron capaces de inmunoprecipitar CIITA

transfectado transientemente en células Cos7 y fueron muy superiores que los anticuerpos policlonales anti-CIITA comercializados por Santa Cruz (Figura 12). Esto era esperado puesto que los anticuerpos comerciales fueron generados contra péptidos, lo que reduce el número de epitopos reconocidos por linfocitos B, en cambio nuestros anticuerpos fueron generados contra casi dos tercios de la proteína. De allí que los sueros policlonales anti-CIITA generados en nuestro laboratorio fueron utilizados posteriormente para realizar la mayoría de los ensayos de inmunoprecipitación descritos en esta tesis.



**Figura 9: Producción de proteínas de fusión de CIITA asociadas a histidina.**

Las diferentes regiones de CIITA (CIITA<sup>1-1.130</sup>, CIITA<sup>977-1.130</sup>, CIITA<sup>474-795</sup> y CIITA<sup>329-932</sup>) fueron clonadas en diferentes vectores de expresión procariontes, que contienen en su región aminoterminal una secuencia de polihistidina y transformadas en bacterias *E.coli* BL21pLys para su expresión *in vivo*. La inducción de las proteínas de fusión histidina-CIITA se realizó incubando las bacterias con IPTG por 2 hrs. **A:** Expresión de las proteínas de fusión histidina-CIITA. Extractos totales de bacterias se corrieron en condiciones desnaturalantes en un gel SDS-PAGE al 12 % y se tiñeron con azul de coomasie. Carril 1: Estándar de peso molecular. Carril 2: CIITA<sup>474-795</sup>. Carril 3: CIITA<sup>329-932</sup>. Carril 4: Control histidina-LacZ. Carril 5: CIITA<sup>977-1.130</sup>. **B:** Detección mediante *Western blot* de las proteínas de fusión histidina CIITA con anticuerpos anti-histidina. Extractos totales de bacterias se corrieron en condiciones desnaturalantes en un gel SDS-PAGE al 12 % y se transfirieron a nitrocelulosa. El anticuerpo anti-histidina (1:10.000) fue utilizado para detectar las proteínas recombinantes de CIITA asociada a histidina. Carril 1: CIITA<sup>474-795</sup>. Carril 2: CIITA<sup>329-932</sup>. Carril 3: CIITA<sup>977-1.130</sup>. Carril 4: Control histidina-LacZ.



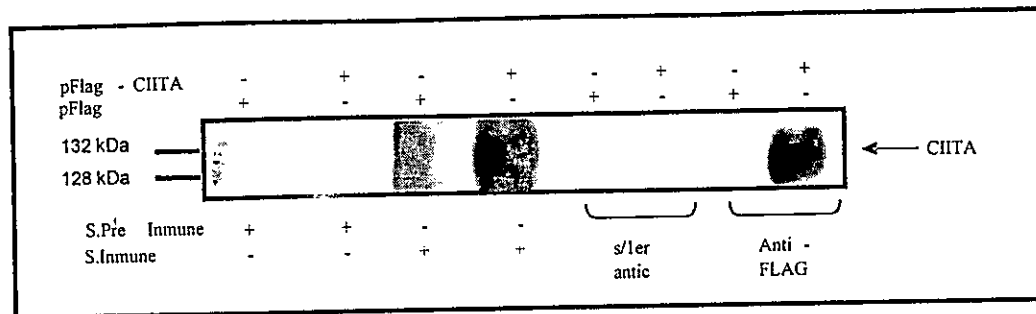
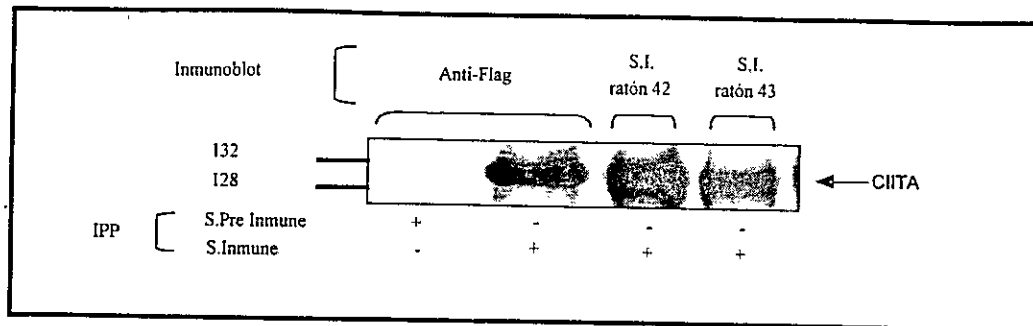
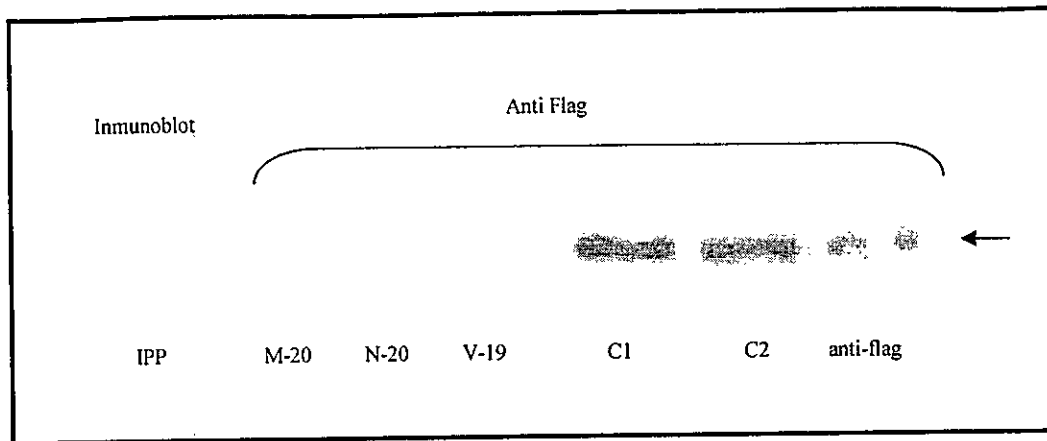


Figura 10: Inmunoblot de extractos celulares con los sueros de conejos inmunizados con las proteínas de fusión CIITA<sup>474-795</sup> y CIITA<sup>977-1.130</sup>. Células Cos7 transfectadas transientemente con pFlag o pFlag-CIITA según se indica en la figura fueron utilizados para determinar la especificidad de los anticuerpos policlonales de conejos anti-CIITA (20 µg de proteína por carril). La flecha indica la banda correspondiente a Flag-CIITA. Como control negativo se hizo el experimento sin primer anticuerpo y como control positivo se utilizó el anticuerpo anti-Flag (1:8.000).



**Figura 11: Inmunoprecipitación de CIITA de células transfectadas con Flag-CIITA.** El suero del conejo inmunizado con una mezcla de proteínas de fusión CIITA<sup>474-795</sup> y CIITA<sup>977-1.130</sup> fue utilizado para inmunoprecipitar CIITA a partir de extractos proteicos provenientes de células Cos7 transfectadas transientemente con el vector pFlag-CIITA (150 µg de extracto proteico por inmunoprecipitación). Se incluye en la figura como control negativo del ensayo de inmunoprecipitación, el suero pre-inmune del mismo conejo utilizado para generar anticuerpos anti-CIITA. La presencia de Flag-CIITA fue detectada mediante inmunoblot utilizando los sueros inmunes (1:500) de los ratones inmunizados con las proteínas de fusión CIITA<sup>474-795</sup> y CIITA<sup>977-1.130</sup> o el anticuerpo anti-Flag (1:8.000). La flecha indica la banda correspondiente a CIITA.



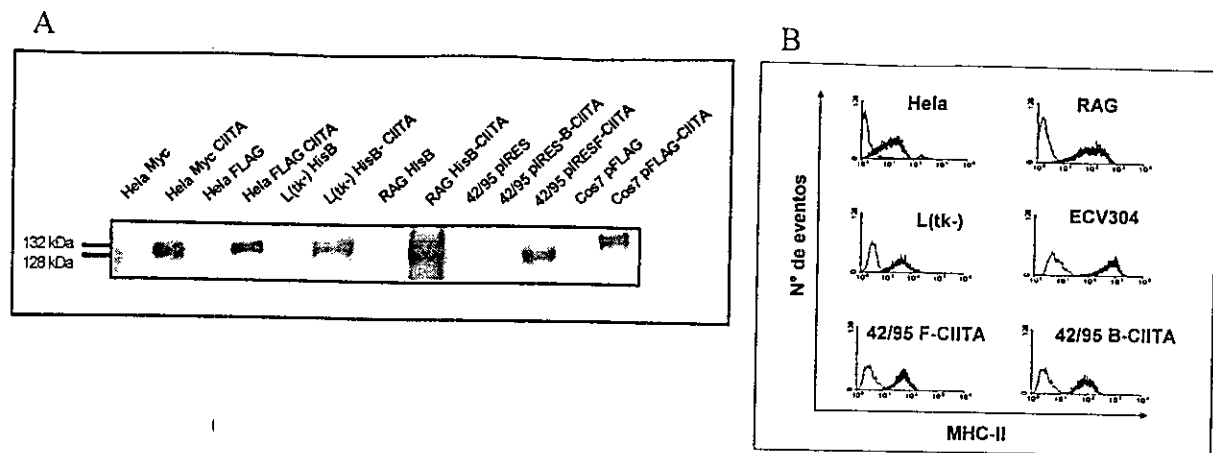
**Figura 12: Inmunoprecipitación de CIITA: comparación de anticuerpos comerciales con los anticuerpos generados en nuestro laboratorio.** Anticuerpos comerciales anti CIITA (2  $\mu$ g de anticuerpo por inmunoprecipitación; Santa Cruz M-20, N-20, V-19) fueron comparados en un ensayo de inmunoprecipitación con los sueros de conejos anti CIITA (C1 y C2) generados en nuestro laboratorio. CIITA fue inmunoprecipitado a partir de extractos proteicos (150  $\mu$ g) de células Cos7 transfectadas transientemente con el vector pFlag-CIITA. La presencia de Flag-CIITA fue detectada mediante inmunoblot utilizando el anticuerpo anti-Flag (1:8.000). Como control del ensayo se inmunoprecipitó CIITA con el anticuerpo monoclonal anti Flag (2  $\mu$ g). La flecha indica la banda correspondiente a CIITA.

A pesar que los ratones fueron capaces de generar anticuerpos policlonales anti-CIITA con el método tradicional de inmunización, que consistió en inmunizar los ratones con las proteínas emulsionadas en adyuvante completo de Freund (ACF), no se pudieron obtener hibridomas productores de anticuerpos monoclonales anti-CIITA en 4 fusiones diferentes. Puesto que en el laboratorio contábamos con gran experiencia en el aislamiento de células dendríticas de ratón, diseñamos un novedoso método de inmunización con células dendríticas, ya que estas células son las únicas capaces de activar linfocitos T vírgenes. La activación de estos últimos debería teóricamente aumentar la frecuencia de clones productores de anticuerpos contra la proteína de CIITA y en consecuencia, facilitar la generación de anticuerpos monoclonales y policlonales contra CIITA. Por lo tanto, se inmunizaron ratones Balb/c vía intravenosa con células dendríticas pulsadas con las diferentes proteínas de fusión histidina-CIITA y al mismo tiempo se inyectaron en forma intraperitoneal con la misma proteína de fusión emulsionada en ACF tal como se realiza en una inmunización convencional. Puesto que la inmunización con células dendríticas se realizaba por primera vez con el objetivo de producir anticuerpos monoclonales, los resultados de las inmunizaciones se compararon paso a paso con el protocolo convencional de inmunización. Esta parte del trabajo se hizo en colaboración con Pablo Vargas, tesista de pregrado de Ingeniería en Biotecnología (Pablo Vargas y cols, patente pendiente, manuscrito terminado). La inmunización de ratones con células dendríticas permitió obtener títulos séricos anti-CIITA más altos que la inmunización tradicional lo que finalmente nos permitió obtener hibridomas capaces de producir anticuerpos monoclonales anti-CIITA.

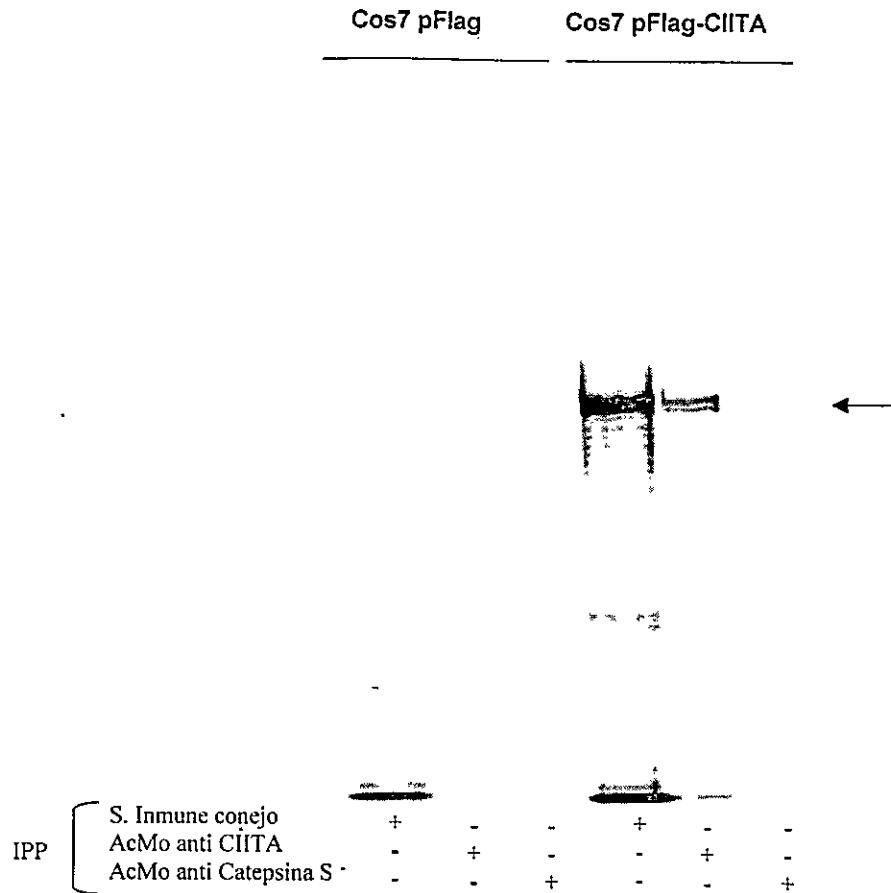
La implementación de un método de selección de los hibridomas productores de anticuerpos contra CIITA fue una etapa importante en esta tesis. Si bien la primera etapa de selección de los hibridomas se realizó a través de ELISA, usando las proteínas de fusión mencionadas anteriormente, la especificidad de estos anticuerpos exigió la elaboración de un sistema de selección mediante western blot. La naturaleza de CIITA permitía predecir que la expresión de la proteína CIITA endógena debía ser baja en líneas celulares, por lo tanto decidimos transfectar células Cos7 en forma transiente con un constructo Flag-CIITA de modo de sobreexpresar CIITA en Cos7. Estas células son utilizadas corrientemente en este tipo de experimentos ya que poseen una eficiencia de transfección muy alta.

Finalmente, la inmunización con células dendríticas y la implementación de un sistema de selección de anticuerpos específicos contra CIITA, resultó ser el procedimiento con el cual se lograron generar excelentes anticuerpos policlonales y monoclonales contra CIITA. Se generaron 8 anticuerpos monoclonales (isotipos IgG), 3 dirigidos contra la región CIITA<sup>977-1.130</sup> y 5 contra CIITA<sup>474-795</sup>. En la Figura 13A se muestra el resultado obtenido con uno de estos anticuerpos monoclonales el cual fue capaz de reconocer CIITA humano transfectado en células de origen humano (HeLa, ECV304 y 42/95) y murino (RAG y L(tk-)), cuya proteína tiene el tamaño molecular esperado y mantiene su actividad biológica ya que permite la expresión constitutiva de MHC-II en las células transfectadas (Figura 13B). Posteriormente, evaluamos la especificidad y capacidad de inmunoprecipitar CIITA de un *pool* de anticuerpos monoclonales y la comparamos con el suero generado en conejo. Para ello, células Cos7 transfectadas transientemente con CIITA y marcadas con Metionina y Cisteína S<sup>35</sup>, fueron utilizadas para generar los

extractos proteicos. Se observó que los anticuerpos monoclonales reconocen específicamente CIITA y que la capacidad de inmunoprecipitar esta proteína, fue inferior al suero de conejo (Figura 14). Este resultado es normal ya que los anticuerpos policlonales reconocen múltiples epitopos de una proteína, mientras que los anticuerpos monoclonales detectan epitopos únicos de la proteína. Es por ello que para la mayoría de los ensayos de inmunoprecipitación se utilizaron los sueros inmunes generados en conejo, y para revelar los Western blot los monoclonales los cuales solo reconocen CIITA.



**Figura 13: A: Inmunoprecipitación de CIITA transfectedo establemente en diferentes tipos celulares.** El suero del conejo inmunizado con una mezcla de las proteínas de fusión CIITA<sup>474-795</sup> y CIITA<sup>977-1.130</sup> fue utilizado para inmunoprecipitar CIITA a partir de 4 mg de extractos proteicos provenientes de líneas celulares de origen humano (HeLa y 42/95), simio (Cos7) y murino (RAG y L(tk-) transfectedas establemente con los vectores que se indican en la figura. La presencia de CIITA se detectó mediante inmunoblot utilizando el anticuerpo monoclonal anti-CIITA 7G8. En el caso de las células Cos7, estas se transfectedaron transientemente y se utilizaron 150 µg de extracto proteico por inmunoprecipitación. **B: Expresión de MHC-II en células transfectedadas establemente con CIITA analizadas mediante citometría de flujo.** Las células mencionadas en los recuadros fueron transfectedadas con pMyc-CIITA humano (HeLa), HisB-CIITA (RAG y L(tk-)), pTAG2(Flag)-CIITA (ECV304), pIRES-B CIITA o F-CIITA (42/95). Las células transfectedadas con CIITA fueron capaces de expresar MHC-II en la superficie celular (líneas gruesas), en cambio las células transfectedadas sólo con el vector no expresan MHC-II (líneas delgadas). La expresión de MHC-II de líneas celulares humanas (HeLa, ECV304 y 42/95) y murinas (RAG y L(tk-)) fue determinada con el anticuerpo monoclonal anti-HLA-DR PE (1:100) y anti-I-A/I-E FITC (1:100), respectivamente.

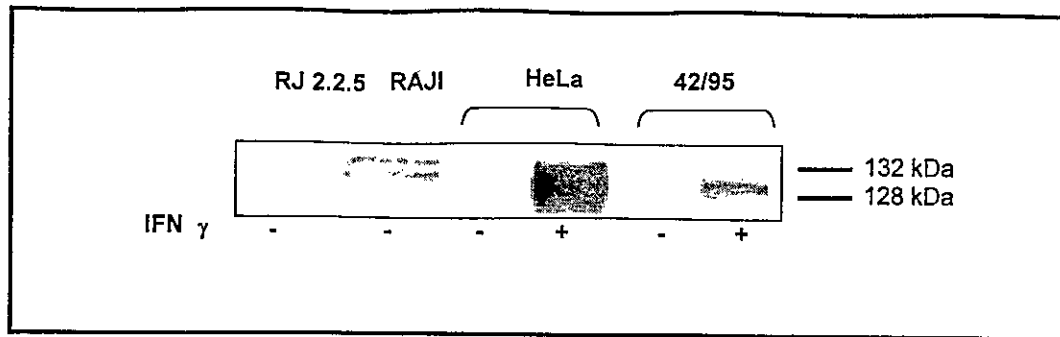


**Figura 14: Inmunoprecipitación de CIITA con los anticuerpos monoclonales y policlonales anti CIITA.** Se inmunoprecipitó CIITA desde extractos proteicos de células Cos7 transientemente transfectadas con el vector pFLAG-CIITA. Enseguida, 44 horas postransfección, se incubaron las células con Metionina y Cisterna S<sup>35</sup> por 4 horas (250 uCi). Se utilizaron como controles negativos células transfectadas con el vector vacío y un anticuerpo monoclonal anti catepsina S. La inmunoprecipitación de CIITA se realizó con el suero del conejo 2 inmunizado con una mezcla de las proteínas de fusión CIITA<sup>474-795</sup> y CIITA<sup>977-1.130</sup> y una mezcla de diferentes anticuerpos monoclonales anti CIITA (1B52, 7G8 y 7D3). Se utilizaron 2x10<sup>6</sup> cpm por inmunoprecipitación. La flecha indica la banda correspondiente a CIITA.



### 6.1.2 Expresión de la proteína CIITA en células que presentan expresión endógena o inducible de moléculas MHC clase II.

Una vez generados los anticuerpos monoclonales mediante el uso de células dendríticas, estos fueron utilizados para estudiar si efectivamente células que tienen expresión constitutiva de MHC-II producen una proteína CIITA diferente de la producida por una célula sensible a IFN- $\gamma$  en la cual las moléculas MHC-II son producidas por efecto de esta citoquina. Para esto se inmunoprecipitó CIITA a partir de la línea celular B linfoblástide llamada RAJI y en dos líneas celulares inducibles por IFN- $\gamma$  (HeLa y el melanoma 42/95). Como control negativo se utilizó una línea celular B mutante que no expresa MHC-II debido a una deleción en el gen de *CIITA* (RJ2.2.5). La Figura 15 muestra el resultado de la inmunoprecipitación realizada con un suero de conejo anti-CIITA sobre 4 mg de extractos celulares en las células derivadas de linfocitos y 1 mg en aquellas tratadas con IFN- $\gamma$ . Se observa que la línea celular RAJI produce una proteína CIITA de mayor tamaño molecular (aprox. 130 Kda) que las células que expresan CIITA por efecto del IFN- $\gamma$  (aprox. 128 Kda). Esto coincide perfectamente con lo descrito en la literatura que indica que linfocitos B expresan principalmente un tipo de ARNm derivado del promotor III (Figura 5), mientras que IFN- $\gamma$  genera una proteína CIITA de menor tamaño derivada del promotor IV. Estos resultados demuestran además que los anticuerpos producidos son capaces de reconocer tanto la proteína producida a partir del promotor III como IV. Por otro lado se observa que las líneas derivadas de linfocitos expresan menos CIITA que las células tratadas IFN- $\gamma$ .



**Figura 15: Inmunoprecipitación de CIITA en células que expresan CIITA en forma constitutiva e inducible.** El suero del conejo inmunizado con una mezcla de las proteínas de fusión CIITA<sup>474-795</sup> y CIITA<sup>977-1.130</sup> fue utilizado para inmunoprecipitar CIITA a partir de 4 mg de extractos proteicos provenientes de diferentes líneas celulares. Se usaron líneas celulares que expresan constitutivamente CIITA (RAJI), deficientes en CIITA y MHC-II (RJ2.2.5) y líneas celulares que inducen la expresión de MHC-II y CIITA (HeLa y 42/95) después de incubarlo con IFN- $\gamma$  (250U/mL) por 16 hrs. La presencia de CIITA se detectó mediante inmunoblot con el anticuerpo monoclonal anti-CIITA 7G8.

### 6.1.3 Caracterización de la proteína CIITA en la línea celular BLS-2.

Las células BLS-2 no expresan moléculas MHC-II y pertenecen al grupo de complementación BLS de tipo A, es decir, presenta defectos a nivel de CIITA. Se ha demostrado que el defecto de esta línea celular se debe a una deleción carboxiterminal del gen *CIITA*, lo cual impide que CIITA entre al núcleo y active la transcripción de las moléculas MHC-II (Cressman y col., 1999). En la Figura 16 se muestra que las células BLS-2 expresan la proteína CIITA y que esta es de menor tamaño molecular que CIITA salvaje expresado por las células RAJI en acuerdo con lo informado a nivel génico (Figura 16). Una observación interesante que se desprende de estos resultados es la sobreexpresión de la proteína CIITA mutada, la que representa alrededor de 5 veces más que la expresada por las células RAJI. Este punto fue investigado con más detalles ya que sugieren que CIITA podría regular directamente su expresión a nivel de la proteína, mediante un mecanismo de retroalimentación negativo que en las células BLS-2 no podría ser activado debido a que CIITA no puede translocarse al núcleo. Sin embargo, existe otra posible explicación para estos resultados es que CIITA se autorregule indirectamente a través de la expresión de MHC-II en la superficie. Por último es posible que tanto la proteína como el ARNm de *CIITA* proveniente de BLS-2 posean una vida media más larga o niveles de expresión más altos comparados con las células RAJI.

Con el fin de evaluar estas posibilidades, comparamos en primer lugar la expresión de CIITA de las células BLS-2 con las líneas celulares B linfoblastoides BLS-1 y 6.1.6 que no expresan MHC-II pero que tienen el gen *CIITA* normal y con la línea celular RAJI que si expresa MHC-II. Si la expresión de CIITA es regulada

por la expresión de MHC-II en la superficie, esperaríamos en las células mutantes para MHC-II (BLS-1 y 6.1.6) una sobreexpresión de CIITA. Sin embargo, la expresión de CIITA en estas líneas celulares fue reducida, incluso menor que las células RAJI que expresa MHC-II en su superficie, lo que sugiere que la acumulación de CIITA no depende de la expresión de MHC-II en la superficie (Figura 16).

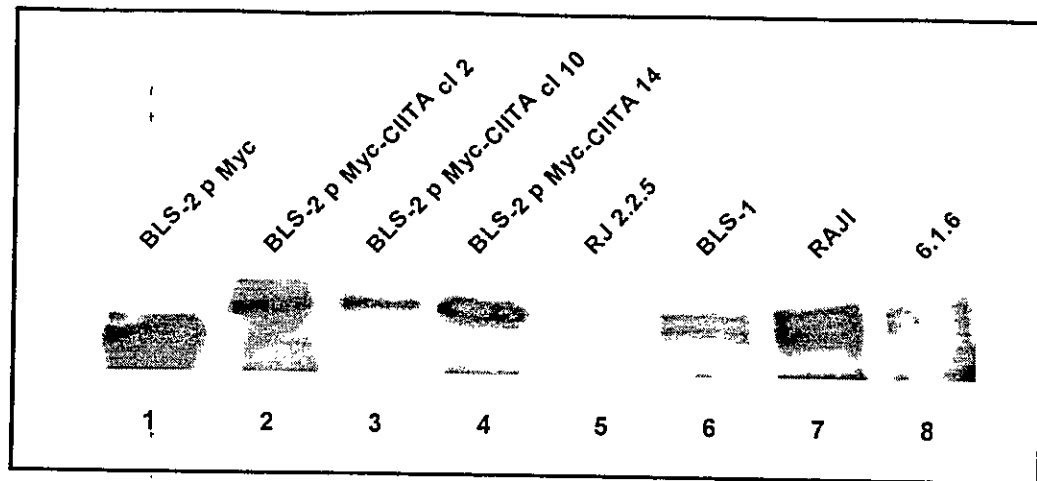
Por otra parte, si la regulación de la expresión de CIITA en las células BLS-2 depende de que CIITA entre al núcleo, entonces la transfección de *CIITA* salvaje debiera reducir la expresión endógena de CIITA mutado proveniente de BLS-2. Puesto que la proteína CIITA de BLS-2 presenta una delección de 24 aminoácidos, es posible distinguirla de CIITA salvaje en experimentos de inmunoprecipitación. En la Figura 16 se muestra que las células BLS-2 transfectadas con *CIITA* salvaje reducen la expresión endógena de la proteína CIITA mutada de BLS-2 hecho que ocurriría a nivel transcripcional ya que se observó una inhibición en la expresión del ARNm del *CIITA* de BLS-2 (Figura 17). Esto sugiere fuertemente que CIITA se regula a través de un mecanismo de retroalimentación negativo a nivel transcripcional.

Por otro lado observamos que las células BLS-2 y BLS-1 amplifican una mayor cantidad de ARNm de *CIITA* comparado a las células RAJI, sin embargo, a nivel de la proteína sólo las células BLS-2 y no las BLS-1 expresan una mayor cantidad de CIITA, sugiriendo la existencia de mecanismos adicionales que regulan el proceso de traducción o estabilidad de la proteína CIITA en estas líneas celulares.

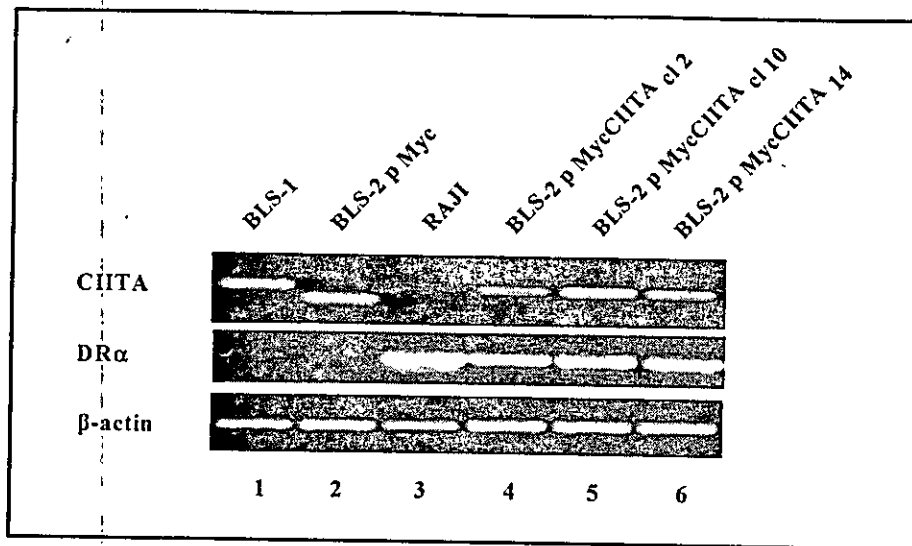
Ya que CIITA expresado por las células BLS-2 se produce a partir del promotor III, nos preguntamos si este mecanismo de autorregulación afecta la

expresión de CIITA producida a partir del promotor IV. Para investigar este punto se transfectaron en forma estable las células HeLa 7A con el plasmidio pMyc-CIITA y se determinó la expresión de la proteína CIITA producida después de tratamiento con IFN- $\gamma$ . En la Figura 18 se muestra que CIITA establemente transfectado no es capaz de reprimir la expresión de CIITA endógeno derivado del promotor IV.

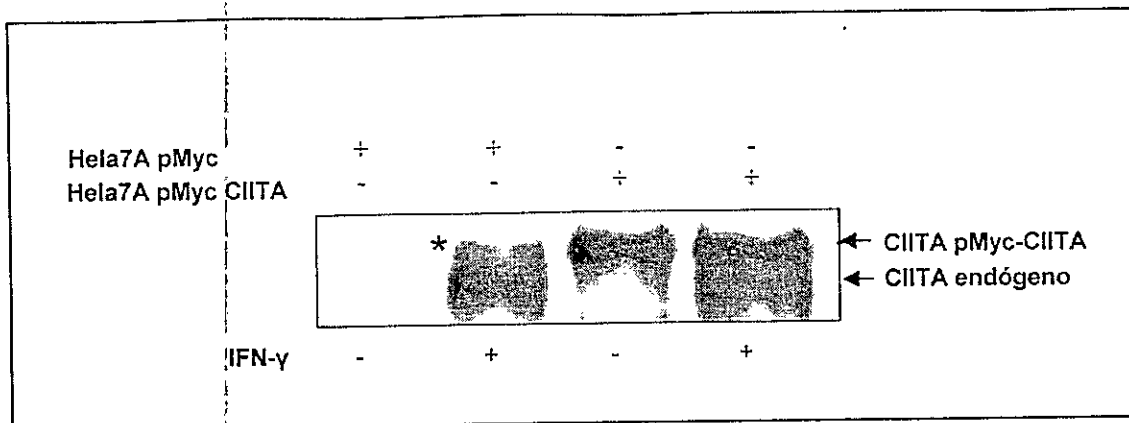
En resumen, estos resultados apuntan a la existencia de un mecanismo de autorregulación de CIITA a nivel transcripcional, específico del promotor III e independiente de la expresión de MHC-II.



**Figura 16:** La expresión de la proteína CIITA mutante en células BLS-2 se reduce cuando se transfecta CIITA salvaje. La línea celular BLS-2 fue transfectada con pMyc-CIITA (salvaje) o con el vector sin inserto y se determinó la expresión de CIITA endógeno mediante ensayos de inmunoprecipitación. Se utilizaron además líneas celulares que expresan constitutivamente CIITA y que no expresan MHC-II (BLS-2, BLS-1 y 6.1.6), células deficientes de CIITA y que no expresan MHC-II (RJ2.2.5) y células que expresan ambas moléculas (RAJI). La inmunoprecipitación de CIITA fue realizada con el anticuerpo policlonal de conejo anti-CIITA (4  $\mu$ l) y el inmunoblot con el anticuerpo monoclonal 7G8 (1:1.000). Para el ensayo de inmunoprecipitación se utilizaron 4 mg de extracto proteico, excepto para BLS-2 que se usó 1 mg. Las diferencias de tamaño molecular se deben a que el CIITA BLS-2 tiene una delección de 24 aminoácidos con respecto al CIITA salvaje que se expresa en las células BLS-1, 6.1.6 y RAJI, y de 45 aminoácidos con respecto a las células que expresan pMyc-CIITA.



**Figura 17:** Inhibición transcripcional de la expresión de *CIITA* endógeno en células BLS-2 transfectadas con *CIITA* salvaje. Las células BLS-2 fueron transfectadas con pMyc o pMyc-*CIITA* (salvaje) y se determinó la expresión de *CIITA* y *HLA-DRα* mediante ensayos RT-PCR según se describe en Materiales y Métodos. La diferencia de tamaño del amplificado de *CIITA* en células BLS-2 pMyc se debe a una deleción de 72 pb con respecto al *CIITA* salvaje. No hubo amplificado en controles sin RT (datos no mostrados). Se incluye como control positivo de la expresión de *HLA-DRα* y *CIITA* las células RAJI. Las células BLS-1 expresan *CIITA* constitutivamente y una expresión residual de HLA-DR.



**Figura 18:** La inducción de CIITA endógeno derivado del promotor IV no es afectada por la transfección de CIITA salvaje. Las células HeLa fueron transfectadas con pMyc o pMyc-CIITA (salvaje) y se determinó la expresión de CIITA endógeno derivado del promotor IV mediante ensayos de inmunoprecipitación. Las células fueron tratadas con IFN- $\gamma$  (250U/mL) para inducir la expresión del CIITA endógeno. La inmunoprecipitación fue realizada con el anticuerpo policlonal de conejo anti-CIITA (4  $\mu$ l) y el inmunoblot con el anticuerpo monoclonal 7G8 (1:1.000). Para el ensayo de inmunoprecipitación se utilizaron 2 mg de extracto proteico. Las diferencias de tamaño molecular se deben a que pMyc-CIITA tiene 45 aminoácidos más que el CIITA derivado del promotor IV. El asterisco (\*) muestra una isoforma del CIITA de mayor tamaño molecular inducida por el tratamiento con IFN- $\gamma$ .



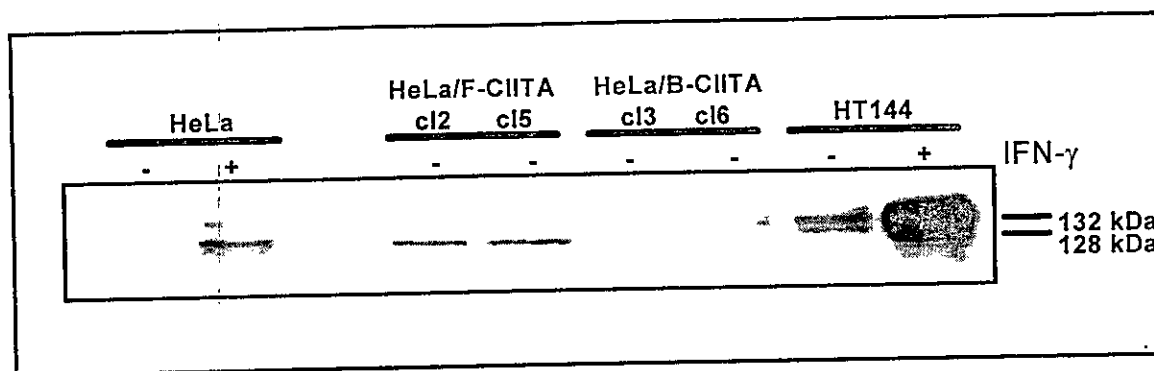
#### 6.1.4 Determinación de la existencia de diferentes isoformas de la proteína CIITA.

Antecedentes de la literatura sugieren que el ARNm para *CIITA* producido en diferentes tipos celulares podría generar diferentes isoformas de la proteína CIITA (Lennon y col., 1997; Muhlethaler-Mottet y col., 1997). En los resultados anteriores (Figuras 15, 16 y 19) demostramos que efectivamente existen diferentes isoformas de CIITA y que estas varían en tamaño molecular dependiendo del tipo celular que las expresa. Sin embargo, esto no demuestra directamente que un ARNm tipo III o IV, sea capaz de generar una o varias isoformas de CIITA *in vivo*. Con el objetivo de demostrar fehacientemente la existencia *in vivo* de diferentes isoformas de CIITA, generamos mediante mutación sitio dirigido constructos que permiten obtener CIITA proveniente de los promotores III y IV. Estos constructos fueron transfectados en forma transiente en una línea celular que no expresa CIITA (HeLa) y comparamos en experimentos de inmunoprecipitación el tamaño molecular de CIITA de los transfectantes con CIITA endógeno de diferentes líneas celulares. En la Figura 7 se muestra el esquema utilizado para la generación *in vitro* de una isoforma larga de CIITA de 1.130 aa. (B-CIITA) y una corta de 1.106 aa (F-CIITA). Se utilizó el *CIITA* clonado en el vector pIRES/neo para generar las diferentes isoformas de *CIITA* obteniéndose 4 clones de cada construcción que contenían la mutación deseada (resultado no mostrado). Las transfecciones con estos constructos se hicieron transientemente de modo de descartar cualquier mutación que pudiera afectar la capacidad transactivadora de *CIITA*. La funcionalidad de los constructos se determinó analizando por citometría de flujo la expresión de MHC-II tal como se aprecia en la Figura 22.

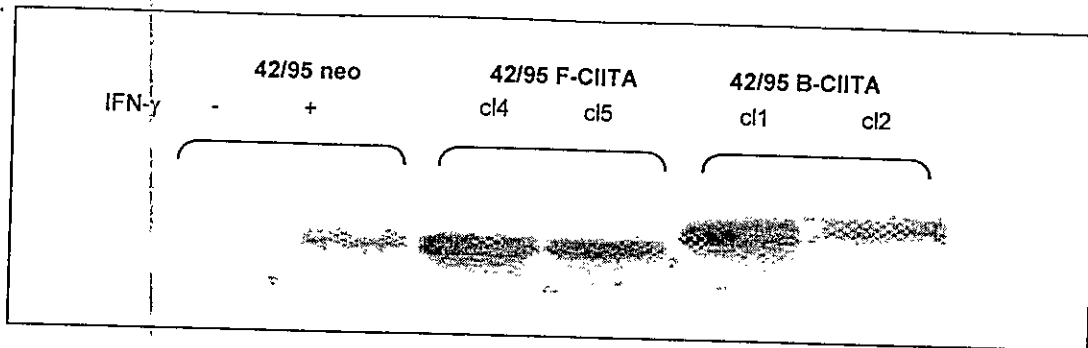
Posteriormente, comparamos el tamaño molecular de CIITA endógeno con las isoformas B-CIITA y F-CIITA transfectadas establemente en líneas celulares que expresan principalmente un tipo de ARNm; un tipo celular que expresa CIITA derivado del promotor IV cuando son tratadas con IFN- $\gamma$  como las células HeLa y otra que expresa un ARNm derivado del promotor III como son las células HT144 (Deffrennes y Cols, 2001). La Figura 19 muestra que el tamaño de F-CIITA es semejante al CIITA endógeno inducido por IFN- $\gamma$  en células HeLa, mientras que B-CIITA es del tamaño predicho para CIITA derivado del promotor III generado en las células HT144. Un resultado similar se obtuvo en las células de melanoma 42/95 transfectadas con ambas isoformas de CIITA, en la que se observa que esta línea celular tratada con IFN- $\gamma$  genera principalmente F-CIITA (Figura 20). Por otra parte, cuando se transfectaron células Cos7 con CIITA proveniente del promotor III, que contiene los sitios de inicios de la traducción para las formas larga y corta de CIITA, se observó sólo la presencia de la forma larga de CIITA (B-CIITA) (Figura 21), que indica que el ARNm derivado del promotor III traduce una sola isoforma de CIITA. Esta es la primera demostración que confirma la existencia de dos isoformas de CIITA, que provienen del uso alternativo de los diferentes sitios de inicios de la traducción, lo que se tradujo en una reciente publicación (Barbieri y col., 2002).

Las bandas de menor tamaño molecular encontradas en las células tratadas con IFN- $\gamma$  corresponderían principalmente a CIITA derivado de un procesamiento alternativo y no a un proceso de degradación de CIITA puesto que no se observan estas proteínas en los mismos tipo celulares transfectadas establemente con las formas F y B (Figura 19). La banda de mayor peso

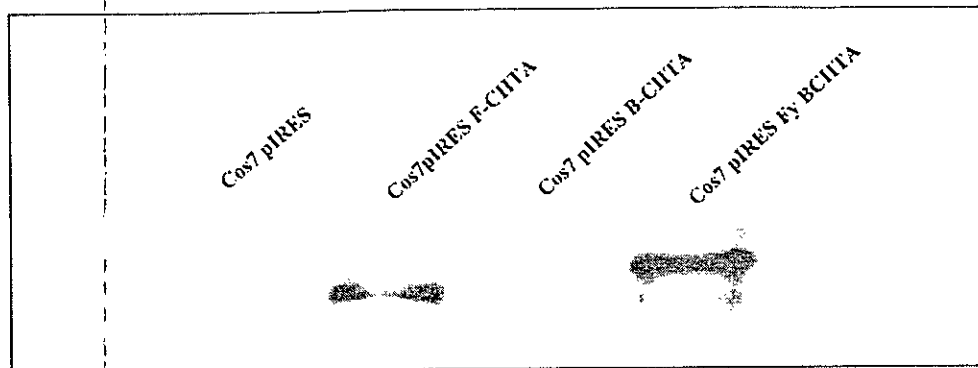
molecular observada en las células HeLa tratadas con IFN- $\gamma$  correspondería a CIITA derivado del promotor I.



**Figura 19: Inmunoprecipitación de CIITA de la línea celular HeLa transfectada establemente con las distintas isoformas de CIITA.** Las células fueron transfectadas con el vector vacío o con las distintas formas de CIITA (F y B-CIITA). Enseguida, se realizó la inmunoprecipitación con el suero policlonal contra el péptido CIITA ( $^{726}$ GEIKDKELPQYLALTR $^{741}$ ) y el inmunoblot se reveló con un anticuerpo monoclonal anti-CIITA (R&D Systems). Las células tratadas con IFN- $\gamma$  (250U/mL) se indican en la figura. El tamaño molecular de la forma F-CIITA es similar al CIITA inducida con IFN- $\gamma$  proveniente del promotor IV en células HeLa. En cambio la forma B-CIITA es del mismo tamaño que CIITA derivado del promotor III en células HT144.



**Figura 20:** Inmunoprecipitación de CIITA de la línea celular 42/95 transfectada establemente con las distintas isoformas de CIITA. Las células fueron transfectadas con el vector vacío o con las distintas formas de CIITA (F y B-CIITA). Enseguida, se realizó la inmunoprecipitación con el suero policlonal contra el péptido CIITA (726GEIKDKELPQYLALTR741) y el inmunoblot se reveló con un anticuerpo monoclonal anti-CIITA (R&D Systems). Las células tratadas con IFN- $\gamma$  (250U/mL) se indican en la figura. El tamaño molecular de la forma F-CIITA es similar al CIITA inducido por IFN- $\gamma$  generado del promotor IV.



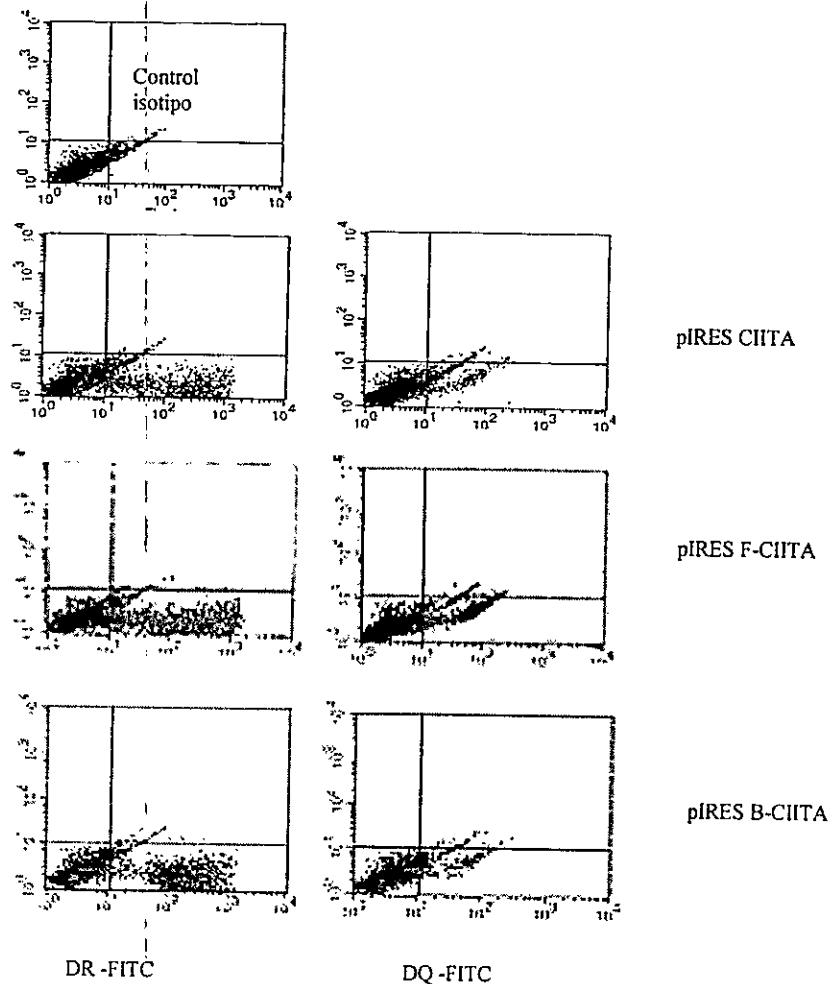
**Figura 21: Inmunoprecipitación de CIITA transfectada transientemente en células Cos7: CIITA que contiene ambos sitios de inicio de la traducción genera sólo una isoforma de la proteína. El suero del conejo inmunizado con una mezcla de las proteínas de fusión CIITA<sup>474-795</sup> y CIITA<sup>977-1.130</sup> fue utilizado para inmunoprecipitar CIITA a partir 150 µg de extractos proteicos provenientes de células Cos7 transfectadas transientemente con los vectores que se indican en la figura. La presencia de CIITA se detectó mediante inmunoblot utilizando el anticuerpo monoclonal anti-CIITA 7G8 48 hrs. posterior a la transfección. El vector pIRES CIITA contiene ambos sitios de inicio de la traducción.**

**6.2 Determinar si las diferentes isoformas de la proteína CIITA regulan diferencialmente la expresión de los isotipos de MHC-II y la expresión de otros genes.**

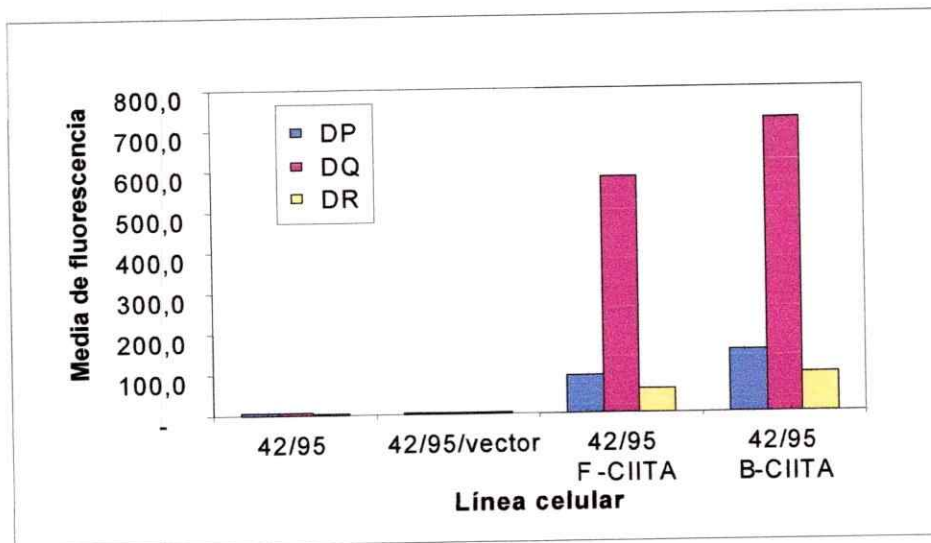
**6.2.1 Regulación de la expresión de los isotipos de moléculas MHC-II por las diferentes isoformas de la proteína de CIITA.**

Existen evidencias que postulan que la forma larga de CIITA es responsable de la inducción de los tres isotipos de moléculas MHC-II (DP, DQ y DR), en cambio la forma corta de CIITA induciría solo los isotipos DP y DR. La expresión inducible por IFN- $\gamma$  de DQ se produciría a través de un sitio respondedor a IFN- $\gamma$  situado en el promotor III de *CIITA* (Deffrennes y col., 2001). Para evaluar la participación de las diferentes isoformas de CIITA en la expresión de los isotipos DR, DP y DQ, se transformaron células HeLa y Melanoma 42/95 con F-*CIITA* y B-*CIITA* y se determinó mediante citometría de flujo la expresión de los diferentes isotipos de moléculas MHC-II. La Figura 22 muestra los resultados obtenidos en las células HeLa que fueron transfectadas transientemente con F-*CIITA* y B-*CIITA* en la que observamos la expresión de los isotipos DR y DQ de las moléculas MHC-II, resultado que no concuerda con las hipótesis que se manejan actualmente en la literatura. Para probar que este resultado es más general realizamos este mismo tipo de experimento en una línea celular de melanoma llamada 42/95 en la cual se ha demostrado que el tratamiento con IFN- $\gamma$  induce la expresión de DR y DP, pero no de DQ. Como se muestra en la Figura 23, al igual que en las células HeLa, tanto F-*CIITA* como B-*CIITA* inducen la expresión de DQ y también de los isotipos DP y DQ. Estos resultados demuestran

por primera vez que la expresión de DQ es independiente de la isoforma de CIITA que se transcriba, es decir, que sea producida a partir del promotor III o IV, dilucidando así un punto controversial en la literatura.



**Figura 22: Expresión de DR y DQ en células HeLa transfectada con F-CIITA y B-CIITA.** Análisis de la expresión de DQ y DR mediante citometría de flujo en la línea celular HeLa transfectada transientemente con las diferentes isoformas de CIITA. La detección de DR y DQ se realizó 48 hrs. posterior a la transfección de los distintos vectores. En la figura se incluye pIRES CIITA como control positivo desde el cual se originaron las formas B y F-CIITA, que tiene ambos sitios de inicio de la traducción, y como control negativo un control de isotipo.

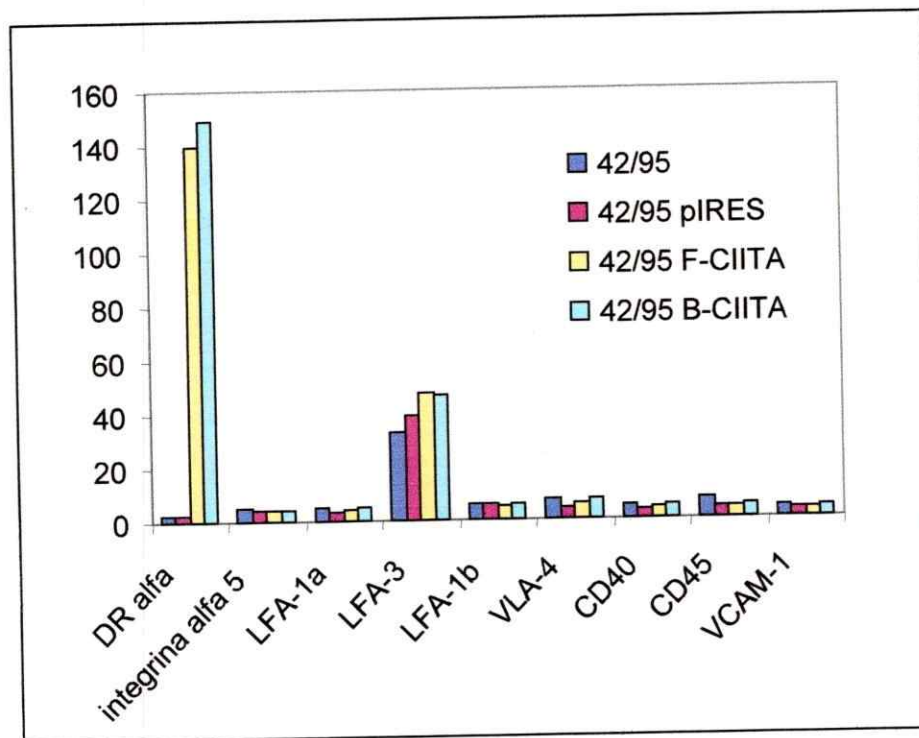


**Figura 23: Expresión de DP, DQ y DR en la línea celular de melanoma humano 42/95 transfectada con F-CIITA y B-CIITA.** Análisis de la expresión de DP, DQ y DR mediante citometría de flujo en la línea celular 42/95 transfectada establemente con las diferentes isoformas de *CIITA*. En la figura se muestra la media de fluorescencia para cada uno de los isotipos MHC-II.



### 6.2.2 Participación de las isoformas de CIITA en la expresión de moléculas de adhesión celular

En la literatura existen antecedentes que sugieren que la expresión de MHC-II en células tumorales de melanoma les confiere un fenotipo más agresivo ya que producen metástasis con mayor frecuencia, y esto se correlaciona fuertemente con la expresión de DQ en la superficie celular (Alcaide-Loridan y col., 1999). Esto nos llevó a postular que las diferentes isoformas de CIITA podían influir no sólo en los isotipos de moléculas MHC-II que expresan las células tumorales, sino también en la dotación de moléculas de adhesión que expresan estas células. En este estudio, demostramos mediante citometría de flujo que células de melanoma transfectadas con las formas corta y larga de *CIITA* no cambian la expresión de las moléculas de adhesión LFA-1, VCAM-1, CD40, CD45 e integrina  $\alpha 5$  (Figura 24). Otras moléculas interesantes, relacionadas últimamente con el fenómeno de *homing* celular son las quimioquinas y sus receptores, las cuales deberían ser examinadas en este contexto cuando se encuentren disponibles anticuerpos contra estas proteínas.



**Figura 24: Expresión de moléculas de adhesión en la línea celular de melanoma humano 42/95 transfectada con F-CIITA y B-CIITA.** Análisis de la expresión LFA-1, LFA-3, VCAM-1, CD40, CD45 e integrina  $\alpha$ 5 mediante citometría de flujo en la línea celular 42/95 transfectada establemente con las diferentes isoformas de CIITA. En la figura se muestra la media de fluorescencia para cada uno de las proteínas analizadas.

### 6.2.3 Participación de CIITA en la expresión de genes.

Aunque todo indica que la función esencial de CIITA es inducir la expresión de genes *MHC-II*, existen bastantes antecedentes en la literatura que demuestran que CIITA puede actuar como un represor para genes como Fas Ligando e *IL-4* (Sisk y col., 2000; Gourley y col., 2001). Por otro lado, como la expresión de las diferentes isoformas de CIITA es tejido específica y que estas se asocian a una mayor malignidad de tumores derivados de melanoma (CIITA derivadas de los promotores III y IV) (Deffrennes y col., 2001), es probable que estas diferentes isoformas participen en la regulación de otros genes que indirectamente se relacionan con la expresión de moléculas MHC-II como también de genes que confieran un fenotipo de mayor agresividad a las células tumorales de melanoma. El patrón de expresión de genes fue analizado mediante *microarrays* de clones de células de melanoma 42/95 transfectadas establemente con las diferentes isoformas de *CIITA* obtenidos por dilución límite los cuales expresan CIITA y MHC-II (Figuras 13 A y B). Los resultados se compararon a células HeLa transfectadas con la construcción pMyc-CIITA en la cual la expresión de CIITA se produce a partir del promotor III. Los *arrays* contenían 10.000 genes humanos, entre los cuales se encuentran la familia de genes de *MHC-II*, moléculas de adhesión, citoquinas y moléculas relacionadas con apoptosis entre otros.

Los resultados de los ensayos de *microarrays* a partir de ARNm de células humana 42/95 transfectadas con las formas B-CIITA y F-CIITA muestran que en general se inducen los mismos genes y a una tasa similar (Tabla 2). Se consideró señal significativa todas aquellas que en promedio tuvieran una razón de

intensidad de fluorescencia de la muestra versus control transfectada con el vector vacío de alrededor de 2. Se escogió este valor ya que es similar al valor encontrado para el gen *HLA-DO* para el cual se ha demostrado recientemente que *CIITA* induce su expresión (Nagarajan y col., 2002a). Los resultados de *microarrays* confirman la expresión de los genes DR, DP y DQ obtenidos en los ensayos de citometría de flujo (Figura 23). La inducción de muchos genes como *SAT*, *MMP16*, *ANXA1*, entre otros, son tipo celular específico, ya que se inducen en las células 42/95 transfectadas con cualquiera de las 2 isoformas de *CIITA*, no así en las células HeLa transfectadas con pMyc *CIITA* (Tabla 2).

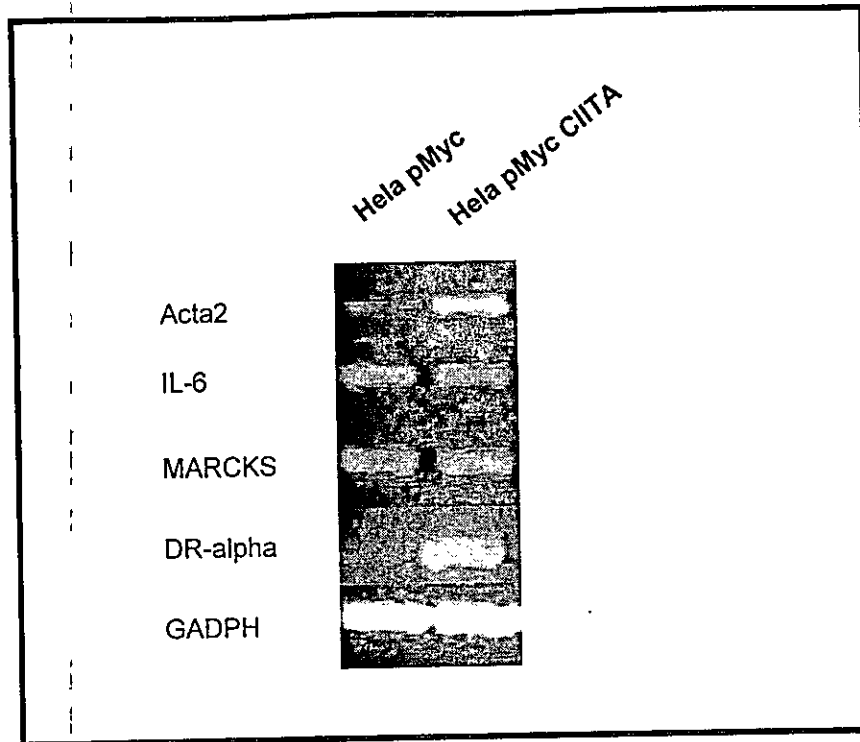
Por otro lado, se observó la expresión de nuevos genes tanto en las líneas celulares HeLa, transfectadas con pMyc-*CIITA* la cual genera B-*CIITA*, como las 42/95 transfectadas con B-*CIITA* y F-*CIITA* (Tabla 2). Entre estos genes se encuentran: *IL-6*, *Acta2*, citocromo P450 y *MARCKS*. Nos pareció importante analizar en más detalles la inducción de estos genes, en particular *IL-6*, que participa en el proceso de presentación antigénica por moléculas MHC-II (Lennon-Dumenil y col., 2002), *MARCKS*, que participa en procesos relacionados con fagocitosis, tráfico de membranas e interacción con actina y *Acta2* que participa en procesos generales de movimiento e integridad celular (Arbuzova y col., 2002). Se confirmó la expresión constitutiva de *IL-6*, *MARCKS* y *Acta2* por RT-PCR en las líneas celulares transfectadas o no con *CIITA* (resultado no mostrado), sin embargo solo en el caso de las células HeLa pMyc-*CIITA* observamos una sobreexpresión de *Acta2* en contraste con los resultados de los *microarrays* (Figura 25).

Por otra parte ya que CIITA es capaz de inducir la expresión de moléculas MHC-II murinas, realizamos este mismo tipo de ensayo con *arrays* que contenían más de 15.000 genes murinos en las líneas celulares murinas (L(tk-) y RAG) establemente transfectadas con *CIITA* humano. En este caso sólo se observaron la inducción de *MHC-II* y de *DM* (Tabla 3). Cabe notar los bajos índices de inducción obtenidos, lo que probablemente indica que los contenidos de estos *arrays* eran insuficientes.

La conclusión más importante de este conjunto de experimentos es que CIITA esta involucrado principalmente en la inducción de genes relacionados con las moléculas MHC-II y que las isoformas de CIITA derivadas de los promotores III y IV no difieren en el patrón de genes que ellas inducen. Es probable que para el caso de genes cuya inducción es débil, MARCKS e IL-6 por ejemplo, se requiera de técnicas más sensibles como *Real Time* PCR, como ha sido señalado recientemente (Nagarajan y col., 2002a).

Genes inducidos	Melanoma 42/95	Melanoma 42/95	HeLa pMyc CIITA
	F-CIITA	B-CIITA	
HLA -DRA	18 (14-22)	17 (16-19)	16 (9-20)
HLA -DQB1	18 (14-24)	16 (11-22)	17 (5-26)
HLA -DRB1	15 (12-17)	16 (14-18)	10 (4-31)
HLA -DQA1	14 (10-16)	13 (11-15)	12 (10-14)
HLA -DRB5	10 (9-11)	15 (13-18)	18 (15-25)
HLA -DQB1	10 (7-12)	15 (14-17)	17 (5-26)
HLA -DPA1	7,5 (7-8)	10 (6-15)	15 (5-31)
ACTA2	14 (7-20)	10 (9-11)	8,6 (4-11)
HLA -DMA	8	7	9 (5-13)
Similar a citocromo P450	4,5 (4-5)	7 (6-8)	8 (3-12)
HLA -C	3	4 (3-5)	-
MMP16	2,5 (2-3)	2,6	-
MARCKS	3	3	4 (3-5)
ANXA1	2,4	2,5	-
Unknown	2,5 (2-3)	2,	-
HLA -A	3 (2-4)	3	-
SAT	2,3	2,2	-
OSTF1	2	2	-
APOE	2	1,8 (1,6-2)	-
IL6	2,1	2,1	4 (2-7)
HLA -DOA	1,9	1,9	2,8

**Tabla 2: Inducción de genes en células humanas transfectadas establemente con CIITA.** Ensayos de *microarrays* fueron realizados para determinar los genes inducidos por las formas corta y larga de CIITA en la línea celular de melanoma 42/95. Se incluyen también los genes que se inducen en células HeLa establemente transfectadas con pMyc-CIITA. Los números en la tabla representan un promedio de dos experimentos de la razón de intensidades de fluorescencia de las células transfectadas con CIITA y las células transfectadas con el vector vacío. Una razón mayor a dos indica inducción o sobreexpresión con respecto su control no transfectado. Se utilizó como referencia la inducción de HLA-DO, debido que este es inducido por CIITA (Nagarajan y col., 2002a).



**Figura 25: RT-PCR de células HeLa transfectadas con CIITA.** El ARNm de las células HeLa transfectadas con pMyc CIITA y con el vector sin inserto fueron analizados por RT-PCR según se describe en Materiales y Métodos para los genes que se muestran en la figura. Se incluyó como control de carga el producto de reacción de PCR con el gen de expresión constitutiva GADPH.

Nombre	Promedio
Genes inducidos	
RAG-CIITA	
H2-Eb1	4,4
H2-DMa	3,0
Genes inducidos	
Ltk-CIITA	
H2-DMa	3,87
H2-Ek	6,29

**Tabla 3: Inducción de genes en células murinas transfectadas establemente con *CIITA*.** Células RAG y L(tk-) transfectadas establemente con Histidina *CIITA*, comparadas con su control transfectado con el vector vacío fueron analizadas por microarrays. Los números en la tabla representan la razón de intensidad de fluorescencia de las células transfectadas con *CIITA* con las células transfectadas con el vector vacío de un promedio de dos experimentos.

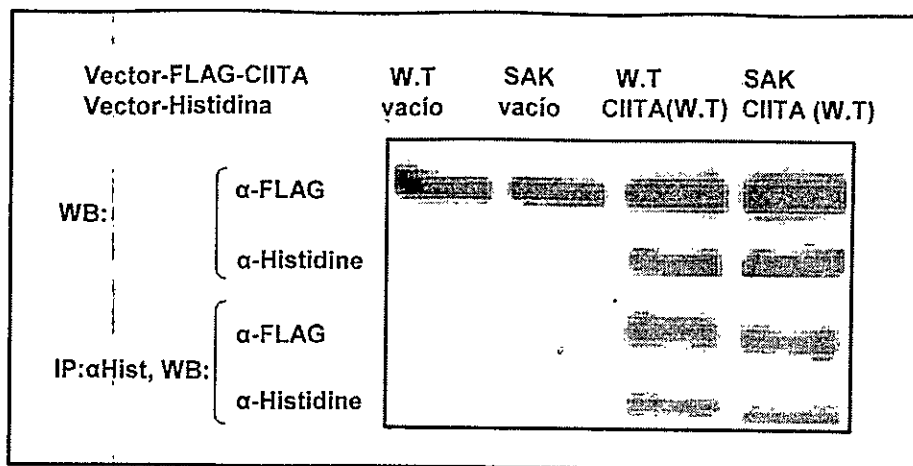


### **6.3 Estudiar la homodimerización de CIITA y determinar el efecto en la formación de dímeros de una mutación puntual en CIITA que se encontraría en un potencial sitio de homodimerización.**

Al comienzo de esta tesis existían antecedentes que sugerían que la funcionalidad de CIITA dependía de una posible formación de dímeros, ya que transfecciones de *CIITA* deficiente en un segmento de la región aminoterminal, reducían la expresión de MHC-II en diferentes tipos celulares (Bontron y col., 1997; Chin y col., 1997a). Estas mutantes de CIITA se denominaron dominantes negativos y su mecanismo de acción era aún desconocido. Planteamos entonces una alternativa según la cual la molécula de CIITA mutante formaría dímeros con la forma salvaje inhibiendo así la acción transactivadora a nivel del promotor de MHC-II. Con el fin de probar esta hipótesis realizamos ensayos de co-inmunoprecipitación con constructos de *CIITA* clonado en dos vectores de expresión diferentes asociados a histidina y a Flag. Los plasmidios histidina-*CIITA* y Flag-*CIITA* fueron co-transfectados en células Cos7, se inmunoprecipitó la proteína histidina-*CIITA* con anticuerpos anti-histidina y se realizó el inmunoblot con el anticuerpo anti-Flag. En la Figura 29 se muestra que CIITA es efectivamente capaz de formar dímeros y sería esta la forma como CIITA dominante negativo reduce la expresión de MHC-II.

Por otra parte, nos pareció interesante estudiar el efecto sobre la formación de dímeros de CIITA de una mutación del aminoácido 469 L->P que se encuentra en un paciente BLS denominado SAK que expresa CIITA sólo a nivel citoplasmático (CIITA SAK). Sin embargo, cuando CIITA SAK es transfectado en otros tipos celulares es capaz de inducir débilmente la expresión de MHC-II

(Wiszniewski y col., 2001). Por lo tanto, el defecto en la translocación nuclear de CIITA SAK podría tener relación con la incapacidad de formar dímeros de CIITA sobretodo considerando que la mutación se encuentra en un potencial sitio de homodimerización (Sisk y col., 2001). Con el objetivo de determinar si esta mutación es importante en el proceso de dimerización se generó mediante mutación sitio dirigida un constructo con *CIITA SAK* en un vector asociado a Flag. Se obtuvieron 8 clones de los cuales dos ellos fueron secuenciados y se determinó que contenían la mutación deseada (resultados no mostrados). Enseguida se realizó un ensayo de co-inmunoprecipitación de la forma mutante con la construcción de CIITA salvaje asociado a histidina. En la Figura 29 se muestra que la mutación L469P no afecta la formación de heterodímeros de CIITA, sugiriendo otro mecanismo responsable de la acumulación de esta proteína mutante en el citoplasma. Estos resultados fueron posteriormente confirmandos por otros investigadores (Sisk y col., 2001).



**Figura 26: Dimerización de CIITA salvaje y CIITA SAK.** Células Cos7 fueron co-transfectadas con los plasmidios según se indicada en la figura. La inmunoprecipitación fue realizada con el anticuerpo anti-histidina (2 µg) y el inmunoblót con el anticuerpo anti-Flag o anti-histidina (1:10.000) según se indica en la figura. Para los ensayos de inmunoblót e inmunoprecipitación se utilizaron 60 µg y 1 mg de extractos proteicos, respectivamente.

## 7. DISCUSION

Las moléculas MHC-II se expresan en la superficie de las células presentadoras de antígenos (células dendríticas, linfocitos B y macrófagos) y son esenciales en la respuesta inmune celular y humoral de todos los vertebrados. Estas moléculas presentan péptidos antigénicos a los linfocitos T de ayuda CD4+, los cuales participan en la respuesta inmune contra patógenos al activar a macrófagos (inmunidad mediada por células) y a linfocitos B (inmunidad humoral). La expresión de MHC-II en la mayoría de los tipos celulares está regulada transcripcionalmente por el factor denominado CIITA. El gen de *CIITA* presenta características bien particulares, como son la existencia de 4 regiones promotoras diferentes, que generan ARNm de tamaños diferentes los que se relacionan con la expresión constitutiva o inducible de las moléculas MHC-II en diferentes tipos celulares. Sin embargo, a pesar del conocimiento que se tiene de la estructura del gen de *CIITA*, al comenzar esta tesis se desconocía si los transcritos de este gen generaban proteínas de *CIITA* de diferentes tamaños, ni cual podría ser la importancia biológica de estos. En este sentido, planteamos como objetivo central estudiar la proteína *CIITA*, en particular la existencia de posibles isoformas, y su participación en la regulación de las moléculas de MHC-II.

### 7.1 Generación de anticuerpos monoclonales contra *CIITA*; células dendríticas y su uso en la generación de anticuerpos monoclonales.

Tal como se mencionó, este trabajo se focalizó en el estudio de la proteína *CIITA*, para lo cual fue necesario en primer lugar producir una herramienta

indispensable para estudiar una proteína como es la generación de anticuerpos. Las dificultades encontradas en laboratorios de todo el mundo para la producción de anticuerpos anti-CIITA se deben probablemente a propiedades intrínsecas de esta proteína relacionadas con la inmunogenicidad, inducción de tolerancia o bajo nivel de expresión. Por lo tanto, uno de los objetivos fundamentales para la realización de esta tesis fue en primer lugar desarrollar una estrategia que nos permitiera la obtención de anticuerpos tanto policlonales como monoclonales contra CIITA.

La primera estrategia para generar anticuerpos monoclonales contra CIITA fue producir proteínas recombinantes de diferentes regiones de la proteína, de manera de aumentar las probabilidades de encontrar alguna región de la proteína con propiedades inmunogénicas. Se escogió producir proteínas asociadas a una cola de polihistidina, de manera de poder visualizar y purificar CIITA gracias a la utilización de anticuerpos comerciales anti-histidina y columnas de afinidad de níquel, respectivamente. Por otra parte, *CIITA* fue clonado en diferentes vectores eucariontes para producir CIITA asociado a otros marcadores, distintos de la cola de polihistidina, y poder de esta manera discriminar entre los anticuerpos dirigidos contra CIITA o contra el motivo de histidina, los cuales en nuestra experiencia fueron muy frecuentes. Sorpresivamente, cuando estas proteínas de fusión se utilizaron como inmunógenos, todas ellas fueron capaces de generar una respuesta inmune contra CIITA tanto en ratones como en conejos, determinado ya sea por ELISA (Vargas P y cols., manuscrito terminado) o por inmunoblot de extractos de células Cos7 transfectadas con *CIITA* asociada a Flag (Figuras 10 y 11). La funcionalidad de los diferentes constructos de *CIITA* fue confirmada indirectamente mediante su transfección en líneas celulares que no expresan

MHC-II en forma constitutiva, en las cuales demostramos por citometría de flujo que los constructos permitían la expresión de MHC-II (Figura 13). Es interesante señalar que todas las proteínas de fusión generaron sueros policlonales con títulos razonablemente buenos en experimentos de *Western blot*, sin embargo en varias fusiones independientes no se obtuvieron hibridomas productores de anticuerpos monoclonales anti-CIITA usando el método clásico de inmunización, es decir, repetidas inyecciones intraperitoneales de la proteína emulsionada en adyuvante de Freund. Esto a pesar que el número de hibridomas producidos estuvo en el rango normal (200-300 clones por fusión), considerando el protocolo experimental en uso en nuestro laboratorio. Estos resultados parecen mostrar en primer lugar que contrariamente a lo postulado, CIITA no es poco inmunogénica y que la dificultad en obtener hibridomas anti-CIITA se debería a que el número de linfocitos B activados por los métodos tradicionales es insuficiente como para lograr estadísticamente híbridos productores de anticuerpos contra CIITA.

Una estrategia original para resolver este último punto fue aprovechar la característica de las células dendríticas de ser las únicas células presentadoras de antígeno que tienen todo el arsenal de moléculas accesorias para la activación de linfocitos T vírgenes de ayuda, los cuales son necesarios para la maduración de linfocitos B a células productoras de anticuerpos o plasmocitos (Banchereau y col., 1998). En consecuencia desarrollamos un nuevo método de inmunización que utiliza células dendríticas pulsadas *in vitro* con las diferentes proteínas de fusión CIITA, las cuales son inyectadas en forma intravenosa a ratones isogénicos. En vista de las dificultades encontradas anteriormente para la producción de anticuerpos monoclonales anti-CIITA, se reforzó el protocolo de inmunización inyectando a los ratones, al mismo tiempo que las células dendríticas, la proteína

emulsionada en adyuvante completo de Freund (ACF). Los ratones así inmunizados mostraron títulos séricos específicos contra CIITA, detectables inmediatamente después de la segunda inmunización, con títulos notablemente más altos que los obtenidos en aquellos ratones inmunizados sólo por el método tradicional. Este mismo resultado fue observado en ratones inmunizados con células dendríticas pulsadas con péptidos acoplados a un potente adyuvante como es KLH (*key Limpet hemocyanin*) comparado a la inmunización tradicional (Vargas P y cols, patente pendiente, manuscrito terminado).

La capacidad de las células dendríticas de potenciar una alta respuesta inmune humoral contra diferentes inmunógenos se debe por una parte a una eficiente presentación antigénica a los LT CD4+ de ayuda, lo que a su vez permite una eficiente activación de linfocitos B (Banchereau y col., 1998; Palucka y col., 2002). Por otra parte se ha demostrado que las células dendríticas son capaces de activar directamente a los linfocitos B (Dubois y col., 1997; Dubois y col., 1998). Por lo tanto, estos antecedentes sugieren que la alta respuesta inmune humoral en ratones inmunizados con células dendríticas, aumenta la probabilidad de obtener hibridomas productores de anticuerpos específicos.

La generación de anticuerpos monoclonales requirió necesariamente implementar un sistema de selección de anticuerpos específicos contra CIITA que sea lo más cercano a lo que ocurre *in vivo*. Esto se logró expresando CIITA en células Cos7, las cuales sobreexpresan grandes cantidades de CIITA, comparadas con células que expresan CIITA en forma endógena, y la expresión en células de mamífero confiere además a la proteína CIITA las posibles modificaciones postraduccionales, como por ejemplo fosforilación, modificaciones que no se logran en un sistema de expresión procarionte.

El uso de células dendríticas en conjunto con un sistema de selección de los hibridomas productores de anticuerpos permitió la generación de 8 anticuerpos monoclonales contra CIITA, los cuales reconocen CIITA transfectado transientemente en células Cos7 (Figura 13) y CIITA endógeno de diferentes tipos celulares (Figura 15 y 16). Estos anticuerpos monoclonales, contra diferentes regiones de la proteína CIITA, no fueron capaces de inmunoprecipitar CIITA tan eficientemente como un suero inmune generado en conejo (Figura 14). Por esta razón los estudios de CIITA endógeno en diferentes líneas celulares se realizaron usando en forma secuencial los sueros policlonales para la inmunoprecipitación y los anticuerpos monoclonales para la visualización en *Western blot*.

Se realizaron varios intentos para inmunoprecipitar CIITA de origen murino en diferentes tipos celulares, sin embargo, los anticuerpos producidos reconocen aparentemente solo la proteína de origen humano (resultados no mostrados).

Finalmente, es importante señalar que los anticuerpos generados en nuestro laboratorio están dirigidos contra los últimos dos tercios de la proteína CIITA por lo que reconocerían todas las isoformas generadas a partir de los diferentes promotores e inicio de la traducción previamente descritos por Muhlethaler-Mottet y cols (1997). Por estas razones estos anticuerpos representan herramientas muy valiosas para futuros estudios.

## **7.2 La expresión de diferentes isoformas de la proteína CIITA.**

Las diferencias en tamaño molecular de las distintas formas de CIITA observados en la Figura 19, sugiere la existencia de diferentes isoformas de la



proteína CIITA. Varias hipótesis se han planteado con el objetivo de explicar estos resultados: uso alternativo de los diferentes promotores de *CIITA* en los diferentes tipos celulares (Figura 5) (Lennon y col., 1997; Muhlethaler-Mottet y col., 1997), procesamiento alternativo (Riley y col., 1995) o modificaciones post-traduccionales (Li y col., 2001).

Los resultados de esta tesis muestran, en conjunto con los antecedentes aportados en la literatura, que cada tipo celular expresa principalmente un tipo de ARNm mensajero para *CIITA* (Muhlethaler-Mottet y col., 1997) y que este es capaz de generar una de las isoformas de la proteína de *CIITA* (Figuras 19). Por ejemplo, las células HeLa tratadas con IFN- $\gamma$  inducen principalmente la expresión de un ARNm derivado del promotor IV, que a su vez genera la principal isoforma detectada a nivel proteico por ensayos de inmunoprecipitación (Figura 19). En cambio, la línea celular HT144, cuya inusual característica es expresar *CIITA* a partir del promotor III cuando estas células son tratadas con IFN- $\gamma$  (Deffrennes, V y col 2001), expresa principalmente una proteína *CIITA* que es de mayor tamaño molecular que *CIITA* derivado del promotor IV (Figura 19). Estos resultados fueron confirmados cuando se observó que las células transfectadas con las formas F y B-*CIITA* generaron productos proteicos de un tamaño molecular idéntico al *CIITA* expresado *in vivo* por las células HeLa y HT144, respectivamente (Figura 19). Por otro lado, las células Cos7 transfectadas con el *CIITA* derivado del promotor III, que tiene los sitios de inicio de la traducción intactos para generar las formas B y F-*CIITA*, sólo expresaron la isoforma B-*CIITA* (Figura 21). Por lo tanto, nuestros resultados indican que un tipo de ARNm genera principalmente una proteína *CIITA* de un sólo tamaño molecular y que esta isoforma es la que se expresa principalmente en un determinado tipo de célula.

Las bandas de menor tamaño molecular encontradas en las células tratadas con IFN- $\gamma$  o en las células que expresan constitutivamente CIITA (Figura 19), no corresponderían a productos de degradación, ya que estas isoformas no se observan en los mismos tipo celulares transfectadas establemente con las formas F y B. Probablemente, las formas de menor tamaño de CIITA son originadas por procesamiento alternativo, en cuyo caso la mayoría de éstas son afuncionales, es decir, no son capaces de inducir la expresión de MHC-II (Riley y col., 1995). Por otra parte, la banda de mayor peso molecular que se expresa en las células HeLa tratadas con IFN- $\gamma$ , correspondería al CIITA derivado del promotor I, puesto que su peso molecular es mayor que la isoforma derivada del promotor III o B-CIITA (Figura 19). Esto concuerda con lo descrito por Waldburger y cols 2001, que observaron la inducción del ARNm derivado del promotor I en macrófagos tratados con IFN- $\gamma$ .

La existencia de las diferentes isoformas de CIITA tiene varias implicancias fisiológicas en la regulación de la expresión de las moléculas MHC-II. Comparativamente, los niveles de expresión de moléculas MHC-II en la membrana plasmática de las células B es mayor que en células tratadas con IFN- $\gamma$ . Sin embargo, la expresión de la proteína CIITA en células B es menor que en células tratadas con IFN- $\gamma$  (Barbieri y cols, 2002). Esto sugiere que B-CIITA puede tener características fisicoquímicas que lo hacen ser más estable, o bien tener una mayor vida media en el complejo transcripcional que la forma corta o inducible de CIITA (F-CIITA). Por otro lado, las diferentes isoformas de CIITA encontradas en un tipo celular pueden formar dímeros o heterodímeros de CIITA entre las diferentes isoformas y de esta manera tener diferentes mecanismos para regular la expresión de MHC-II. Recientemente, se determinó que CIITA proveniente del

promotor I tiene mayor actividad transactivadora que CIITA tipo III (B-CIITA), y esto ha sido asociado a la presencia de sitios CARD que podrían facilitar la interacción con otras proteínas (Nickerson y col., 2001; Harton y col., 2002a). Cabe destacar que CIITA producido a partir del promotor I está presente principalmente en células dendríticas en las cuales el nivel de expresión de las moléculas MHC-II les confiere funciones diferentes. Células dendríticas inmaduras tienen bajo nivel de expresión de MHC-II y son células con gran capacidad para procesar antígenos, mientras que la maduración está acompañada por un alto nivel de expresión de MHC-II, pérdida de la función procesadora y adquisición de un fenotipo de célula presentadora de antígeno (Landmann y col., 2001; Villadangos y col., 2001). Por lo tanto, la presencia de una o más isoformas en un determinado tipo celular permitiría, a través de la formación de diferentes heterodímeros, mecanismos de regulación de la expresión de MHC-II.

Por otra parte, en algunos casos observamos formas más pequeñas de CIITA, las cuales no provenían de productos de degradación, expresadas constitutivamente o inducidas por IFN- $\gamma$ , que pensamos podrían corresponder a isoformas de la proteína que se comportarían como dominantes negativos, formando heterodímeros afuncionales con la forma completa de CIITA (Bontron y col., 1997; Chin y col., 1997a). Si este fuera el caso, la regulación de MHC-II sería el resultado del balance de las formas de CIITA que actúan activando la expresión de *MHC-II* con las formas que actúan como dominantes negativos. En consecuencia, como existe mayor cantidad de la forma completa de CIITA en las líneas celulares estudiadas, el balance sería positivo para la expresión de MHC-II. En cambio, un aumento de las isoformas que actúan como dominantes negativos con respecto a la forma completa de CIITA regularía negativamente la expresión

de MHC-II, proceso que podría estar ocurriendo en la diferenciación de linfocitos B a células plasmáticas, en cuyo caso se reprime la expresión de MHC-II cuando ocurre la diferenciación celular.

Por otro lado posibles modificaciones post-traduccionales tales como fosforilaciones podrían explicar en parte las diferentes isoformas de CIITA encontradas en las distintas líneas celulares. Este punto fue analizado en el curso de esta tesis y no detectamos fosforilación de CIITA en treonina y tirosinas (resultado no mostrado), aunque paralelamente otros autores observaron que CIITA se fosforila en serina (Li y col., 2001). Recientemente se ha demostrado que la fosforilación de CIITA en la región C-terminal disminuye la actividad transactivadora de CIITA, en cambio la fosforilación de la región amino terminal aumenta la capacidad de formar dímeros como también la capacidad de inducir *MHC-II* (Tosi y col., 2002). Estos autores observaron además que CIITA se expresa mayoritariamente como una forma no fosforilada en células U937, en cambio en células Cos7 se expresa principalmente la forma fosforilada. Ya que nuestros resultados demuestran que todas las líneas celulares transfectadas con *CIITA* expresan un sólo tamaño molecular de CIITA, esto sugiere que ambas formas de CIITA se expresarían al mismo tiempo, probablemente una de ellas se expresaría en muy bajas concentraciones con respecto a la otra o bien, ambas formas poseen la misma movilidad electroforética, razón por la cual observamos una sola proteína en geles desnaturalantes.

### 7.3 Dimerización de CIITA y función transactivadora.

La presencia de regiones ricas en LRR las cuales permiten una interacción proteína-proteína y la existencia de mutantes de CIITA generados *in vitro* que se comportan como dominantes negativos, reprimiendo la expresión de *MHC-II*, son antecedentes que sugieren que CIITA podría formar dímeros. En este trabajo demostramos directamente que CIITA es capaz de formar dímeros. Para esto se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación a partir de extractos proteicos de células Cos7 co-transfectadas transientemente con un vector que contiene el gen de CIITA asociada a una cola de polihistinas y otro vector con el gen de CIITA asociado a Flag (Figura 26). Nuestros resultados concuerdan con antecedentes recientemente reportados en la literatura que muestran la dimerización de CIITA, y que adicionalmente demuestran la importancia de esta dimerización en el proceso de translocación nuclear como para la actividad transactivadora de CIITA (Sisk y col., 2001; Tosi y col., 2002; Raval y col., 2003). El proceso de translocación nuclear comenzaría cuando GTP se une a CIITA permitiendo la formación de un dímero de CIITA. La formación de este dímero escondería las señales de exportación nuclear NES y se expondrían las señales de importación nuclear NLS. La formación del dímero, en conjunto con la acetilación de CIITA mediada por PCAF, facilitaría la translocación nuclear y el poder transactivador de CIITA para permitir la expresión de los genes de *MHC-II* (Spilianakis y col., 2000; Raval y col., 2003). Posteriormente, el dímero de CIITA se une al promotor de *MHC-II* activando la expresión de estos genes, luego de lo cual monomeriza exponiendo las señales de exportación nuclear NES permitiendo entonces que CIITA se una al transportador CMR1 y sea exportada al citoplasma (Raval y col.,

2003). Un mecanismo similar de regulación de transporte nuclear ocurre cuando I $\kappa$ B y Ca<sup>++</sup> esconden los sitios NLS de los factores transcripcionales NF- $\kappa$ B y NF-AT respectivamente, impidiendo la translocación al núcleo (Beg y col., 1992; Zhu y col., 1999). Finalmente, otro sistema que presenta este mecanismo es la conversión de tetrámeros de p53 a monómeros o dímeros lo cual deja expuesto sitios NES que permiten la salida de este factor al citoplasma (Stommel y col., 1999).

Recientemente, Wiszniewski y col., (2001) informaron de la existencia de un paciente BLS llamado SAK que presenta una mutación puntual en el aminoácido 469 L->P de CIITA que a diferencia de otros pacientes con el síndrome BLS, es un adulto sano. Específicamente se determinó que la proteína CIITA SAK se acumula en el citoplasma, semejante a lo que ocurre con CIITA derivado de la línea celular BLS-2, pero presenta una actividad transactivadora de moléculas MHC-II reducida, a diferencia de CIITA BLS-2 que no es capaz de inducir la expresión de *MHC-II* (Cressman y col., 1999; Wiszniewski y col., 2001). Como esta mutación se encuentra en la región cercana a la unión de GTP, región importante en la homodimerización (Sisk y col., 2001), postulamos que CIITA SAK tendría un impedimento en la formación de dímeros. En este contexto nuestros resultados indican que la mutación puntual 469 L->P no afecta la formación de dímeros CIITA SAK con la contraparte salvaje (Figura 23), contrario a lo observado por Sisk y col (2001) que muestran que las mutaciones de los aminoácidos 469 y 470 por alanina afectan la formación de dímeros. Si el fenómeno de dimerización de CIITA SAK no se ve alterado y tomando en cuenta que la mutación está localizada en la región cercana al sitio de unión de GTP, es probable entonces que la acumulación de CIITA SAK en el citoplasma se deba a

un aumento en la tasa de translocación hacia el citoplasma debido a un incremento en la afinidad por el transportador CMR1, fenómeno semejante a lo que ocurre cuando CIITA no tiene la región de unión a GTP (421-561aa) (Raval y col., 2003). Nuestros resultados permitirían explicar el único paciente que sobrevive en edad adulto a esta enfermedad ya que la mutación no afectaría la capacidad transactivadora de CIITA. En un contexto más fisiológico sería importante evaluar el efecto de esta mutación en la formación de dímeros entre CIITA mutantes, para tener una completa información de este fenómeno de dimerización.

#### **7.4 Regulación de la expresión de MHC-II: un mecanismo de retroalimentación negativo.**

Una observación interesante que se desprende del estudio de la proteína CIITA es la sobreexpresión de ésta en la línea celular BLS-2 comparada a la forma salvaje de CIITA que se expresa en la línea celular RAJI, 6.1.6 y BLS-1 (Figura 16). En relación con el gen *CIITA* de las células BLS-2 se ha demostrado que este presenta una delección en la región de translocación nuclear NLS3 (nucleótidos 2.818 al 2.890), razón por la cual la proteína no es capaz translocar al núcleo e inducir la expresión de MHC-II (Cressman y col., 1999). Sin embargo, el defecto en la translocación nuclear de la proteína CIITA BLS-2 no explica la notable acumulación de la proteína observada en nuestros experimentos (figuras 15 y 16). Una posible explicación de la alta acumulación de la proteína CIITA BLS-2 podría deberse a la falla en un mecanismo de regulación negativa dependiente o no de la expresión de MHC-II. Si la acumulación de la proteína CIITA BLS-2 dependiese de

la expresión de MHC-II, deberíamos observar en líneas celulares mutantes para la expresión de MHC-II pertenecientes a los grupos BLS B y D, que expresan CIITA normalmente, una expresión por sobre lo normal de CIITA. Sin embargo, nuestros resultados indican que los niveles de expresión de la proteína CIITA es independiente de la presencia de las moléculas MHC-II (Figura 16). Enseguida, nos preguntamos si la incorporación de *CIITA* salvaje en las células BLS-2 reduciría la expresión endógena CIITA BLS-2. Para ello transfectamos establemente *CIITA* en las células BLS-2. Como la forma salvaje y mutante de CIITA difieren en tamaño molecular, esto nos permitió determinar la expresión de ambas formas simultáneamente en ensayos de inmunoprecipitación. Sorpresivamente, observamos una reducción de la expresión de la proteína CIITA BLS-2 y de su mensajero (Figuras 16 y 17) en las células transfectadas con *CIITA* salvaje, lo que sugiere que CIITA se autorregularía a través de un mecanismo de retroalimentación negativa a nivel transcripcional.

El mecanismo de autorregulación podría ser a través de la unión indirecta de CIITA a una región regulatoria de su propio promotor aún no caracterizada, o a través de la inducción de un represor que se uniría a la región promotora de *CIITA* (Figura 27). Es posible también que CIITA o el supuesto represor actúen modificando la cromatina de la región promotora impidiendo que los factores transcripcionales puedan unirse y activar la expresión de *CIITA*. Nuestros resultados demuestran que la retroalimentación negativa es específica para *CIITA* derivado del promotor III, debido a que la transfección estable de *CIITA* en células HeLa no reduce la expresión de CIITA inducida por IFN- $\gamma$ , derivada del promotor IV (Figura 18). Como CIITA no se une directamente al ADN sino que a los factores transcripcionales RFX, CREB y NF- $\gamma$  para inducir la expresión de *MHC-II* (Reith y



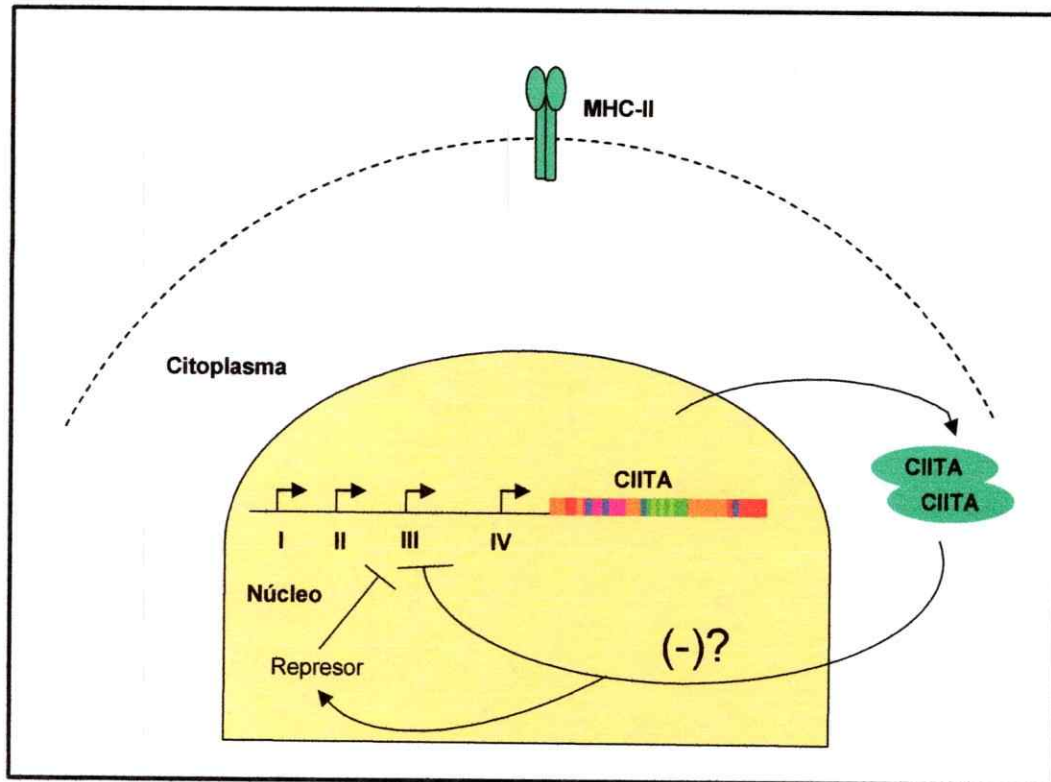
col., 1999; Reith y col., 2001), investigamos la existencia de sitios de unión para estos factores en los promotores III y IV de *CIITA*. En un análisis de los bancos de datos utilizando el programa Match<sup>TM</sup> disponible en Internet (<http://www.gene-regulation.com/pub/programs.html>), se muestra que el promotor III de origen murino y humano además del promotor IV murino contiene sitios de unión para todos los factores transcripcionales mencionados anteriormente, en cambio el promotor IV de origen humano sólo contiene los sitios de unión para RFX y NF-Y. Esto sugiere fuertemente la existencia de un mecanismo de autorregulación promotor III específico conservado entre especies. Por otro lado que este mecanismo no estaría exclusivamente restringido al promotor III, ya que en ratón también se encuentran los sitios de unión para estos factores en el promotor IV no así en humanos (Figura 28).

Recientemente se ha demostrado que la región ARE-2, presente en el promotor III de *CIITA*, une CREB y regula positivamente su expresión (Holling y col., 2002; van der Stoep y col., 2002b; van der Elsen y col., 2004). En base a nuestros resultados pensamos que la región de unión de *CIITA* al promotor III no es ARE-2, sino una secuencia que se encuentra río arriba del promotor III (Figura 31) y que sería esta la región que regula negativamente la expresión de *CIITA*.

En cuanto a la distribución de las cajas de unión para los distintos factores en el promotor III de *CIITA*, la distancia de X2 con Y es similar entre los promotores III de *CIITA* y *MHC-II*. En cambio la distancia entre la caja X1 con X2 difiere entre los promotores de *CIITA* y *MHC-II* por aproximadamente 11 nucleótidos, distancia que no afectaría la interacción entre los factores transcripcionales RFX y CREB puesto que se necesitan 11 nucleótidos para dar una vuelta completa en la hebra y mantener la interacción entre estos factores

transcripcionales. Por lo tanto, esto sugiere que la proteína CIITA actuaría directamente sobre el promotor III regulando negativamente la transcripción de CIITA.

Mecanismos de retroalimentación negativa han sido reportados en diversos temas en la literatura. Un ejemplo de esto es la regulación de Hes1, factor de transcripción que participa en la señalización de Notch, el cual se autorregula a nivel transcripcional ejerciendo un efecto inhibitorio sobre su propio promotor, semejante a lo que ocurriría con *CIITA* (Takebayashi y col., 1994; Hirata y col., 2002).



**Figura 27: Modelo de retroalimentación negativa en la regulación de la expresión de CIITA.** En este modelo se postula que una vez la proteína CIITA sintetizada, esta se transloca al núcleo y se autorregula por un mecanismo directo a través de la acción sobre el promotor III o por la inducción de un agente represor.

Genes	X1	X2	Y	Y'
HLA-DRA	ttcccct agcaac --5--	cgatca --18--	attgg ccaaag	-62
HLA-DRB	tctgacc agcaac --3--	tgatg --19--	attgc ttct <u>ccaac</u>	-69
HLA-DPA	tttacc agcaac --6--	tgtca --17--	atagg tgaatc	-67
HLA-DPB	tctgcct agtgag --3--	tgact --19--	attgg ttcttt	-72
HLA-DQA	ttcaact agtaac --5--	tgtca --17--	aattg gccaaa	-64
HLA-DQB	tctgcct agagac --3--	tgagg --19--	attgg ttcctt	-67
HLA-DMA	tctcccc agtgac --3--	tgatg --20--	attgg ttagt	-58
Ii	cctgccc agaaac --3--	tgatg --13--	<u>ccaat</u> ggatcg	-192
mCIITA PIII	tcatttc agtgac --5--	tgagg --18--	<u>ccaat</u> ttggcc	-173
hCIITA PIII	cagtgcg <u>gttcca</u> -16--	cgatca --17--	<u>ccaac</u> agactt	-225
mCIITA pIV	gtgaaat agagag --16--	tgagg --13--	aaaca cctgcc	-296

**Figura 28: Secuencias consensos de las cajas X1, X2 e Y presentes en los promotores de los genes *MHC-II* y *CIITA*.** La caja X1 une a los factores del complejo RFX, la caja X2 a CREB y la caja Y al factor NF-Y. Las secuencias de las cajas invertidas se encuentran subrayadas. Los números indican la distancia en pares de bases entre las secuencia mostradas. Los números con signo negativo al extremo derecho de la figura indican la posición río arriba desde el inicio de la transcripción. Y' caja de unión para NF-Y detectada por el programa el *Match*<sup>TM</sup>.

Debido al papel fundamental de la expresión de las moléculas MHC-II en la respuesta inmune, la regulación de *MHC-II* y *CIITA* deben estar sujeto a un estricto control a nivel transcripcional en los diferentes tipos celulares. Un mecanismo de autorregulación de *CIITA* afectaría directamente el proceso de presentación antigénica de los linfocitos B, en el cual una expresión exacerbada de *CIITA* traería consigo problemas de autoinmunidad y una disminución en su expresión por debajo de lo normal, problemas de inmunodeficiencias.

La expresión de diferentes isoformas de la proteína *CIITA* observada en las líneas celulares de origen B (Figuras 15, 17 y 19), abre la posibilidad de que estas isoformas regulen diferencialmente la expresión de MHC-II como también la expresión de *CIITA* derivado del promotor III. Nuestros resultados indican que existe un *CIITA* de mayor tamaño molecular, que correspondería al *CIITA* derivado

del promotor I. Si este fuera el caso, este CIITA tiene mayor capacidad de transactivar el promotor de *MHC-II* (Nickerson y col., 2001), y por lo tanto también tendría una mayor capacidad de autorregular la expresión de CIITA proveniente del promotor III. Por otro lado, si tal como mencionado previamente, las isoformas de tamaño molecular más pequeñas se comportan como dominantes negativos, estas isoformas pueden competir con la forma completa de CIITA y regular negativamente la expresión de MHC-II a través de la formación de homodímeros afuncionales, o bien pueden regular negativamente la expresión del promotor III. Por lo tanto, estudios orientados a identificar el sector del promotor III de *CIITA* que sería regulado por un supuesto represor o directamente por CIITA darán luces sobre los mecanismos de regulación de las moléculas MHC-II en los diferentes tipos celulares.

#### **7.5 Las células tumorales y su relación con la expresión de CIITA.**

Existen antecedentes en la literatura que sugieren que la expresión de MHC-II, específicamente el isotipo DQ, como también de FasL en las células tumorales, es un alto indicador de la malignidad del tumor. Esto porque las células tumorales a través de la expresión del MHC-II, sumado a la falta de expresión de las moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86, pueden anergizar los LT CD4+, lo que a su vez impediría una eficiente activación de LT CD8+ citotóxicos para la destrucción del tumor. Por otra parte, la expresión de FasL en las células tumorales podría inducir la apoptosis de células T permitiendo de esta manera que el tumor escape a un control inmunológico (Byrne y col., 2003; Valle y col., 2003).

En este sentido, al comienzo de esta tesis existían antecedentes que sugerían que la proteína CIITA derivada del promotor III permitiría la expresión de

los tres isotipos de moléculas MHC-II, mientras que la isoforma derivada del promotor IV lo haría sólo para la expresión de DP y DR (Deffrennes y col., 2001). Estos antecedentes nos hicieron plantear la hipótesis que las diferentes isoformas de CIITA podrían jugar un rol en la expresión de los diferentes isotipos de moléculas MHC-II. Nuestros resultados muestran que las isoformas B y F-CIITA inducen los tres isotipos de MHC-II (DR, DP y DQ) e inducen los mismos genes (Figuras 22, 23 y Tabla 2). Por lo tanto, los 24 aminoácidos extras localizados en la región N-terminal, provenientes del exón 1 de B-CIITA, no afectan la inducción de los genes *MHC-II* y sería probablemente la cantidad de CIITA y las diferencias intrínsecas a nivel de las secuencias de los promotores de los distintos isotipos las que regularían la expresión de MHC-II (Otten y col., 1998; Masternak y col., 2002). Nuestros resultados muestran además que la inducción de otras moléculas, que han sido relacionadas con la malignidad de tumores, como LFA-1, VCAM-1, CD40 CD45 y LFA-3 (Ishikawa y col., 2000; Ding y col., 2003; Hakkarainen y col., 2003) no están asociadas a la expresión de las diferentes isoformas de CIITA (Figura 24).

Por otra parte, se ha observado en células de melanoma que la expresión de quimioquinas (CXCL1, CXCL8 y CCL5) y receptores de quimioquinas (CCR7, CXCR2 y CXCR1) se correlacionan con la malignidad del tumor (Richmond, 2002). En nuestros ensayos de *arrays* no se encuentran representados los genes para las quimioquinas y sus receptores antes mencionados, excepto por CXCL1 el cual no fue inducido, por lo que sería interesante investigar en el futuro en las células de melanoma 42/95 y las células HeLa derivadas de un carcinoma cérvico-uterino transfectadas con *CIITA* la inducción de los genes restantes. Es posible que CIITA pueda estar relacionada con la expresión de estas quimioquinas y receptores y en

consecuencia con la generación de tumores más agresivos. Finalmente, la expresión anormal de MHC-II y FasL en células tumorales, ambas reguladas por CIITA (Gourley y col., 2001; Reith y col., 2001; Gourley y col., 2002), en conjunto con la expresión de quimioquinas y sus receptores, reguladas o no por CIITA, podrían ser claves en el proceso de metástasis y propagación de tumores.

## 7.6 Expresión de genes dependientes de la expresión de CIITA

Como corolario de nuestro trabajo analizamos la expresión de genes no relacionados a *MHC-II*, inducidos por CIITA, ya que se ha demostrado recientemente que la expresión de genes como *IL-4*,  $\beta$ -2-microglobulina y FasL son también regulados por CIITA (Sisk y col., 2000; Gourley y col., 2001). En otro trabajo realizado en una línea celular B del grupo de complementación A (RJ2.2.5) transfectada con CIITA se observó que *CIITA* induce, además de la expresión de los genes pertenecientes a *MHC-II*, otros genes como tirosil tRNA sintetasa (YARS), *TAP1*, *TGF $\beta$ R-interacting protein 1*, adenilato quinasa 2 y *Hsp70* sugiriendo que *CIITA* puede actuar directa o indirectamente en procesos relacionados con la remodelación de la cromatina (Nagarajan y col., 2002a).

Los ensayos de *microarrays* realizados durante el desarrollo de esta tesis en las células de melanoma 42/95 demostraron la inducción de nuevos genes, entre ellos *IL-6*, *Anxa1*, *APOE*, *MMP16*, *Acta 2*, *MARCKS* y un gen homólogo a citocromo P450. Los genes *IL-6*, *Acta2*, *MARCKS* y citocromo P450 fueron también inducidos en otra línea tumoral derivada de un carcinoma cérvico-uterino (HeLa) establemente transfectada con *CIITA* (Tabla 2).

Posteriormente intentamos confirmar los resultados de los microarrays mediante RT-PCR para los genes *IL-6*, *Acta2*, *MARCKS* y citocromo P450, ya que estos son expresados en ambos tipos celulares y representan genes que podrían participar en procesos relacionados con la respuesta inmune. Así por ejemplo *IL-6* participa en la acidificación del compartimiento rico en MHC-II (MIIC) donde ocurre la unión péptido-antigénico con las moléculas de MHC-II (Lennon-Dumenil y col., 2002), mientras que *MARCKS* participa en procesos relacionados con fagocitosis, tráfico de membranas e interacción con actina. Finalmente *Acta2* participa en procesos generales de movimiento e integridad celular (Arbuzova y col., 2002).

Los estudios de RT-PCR demostraron que los genes *IL-6*, *MARCKS* y *Acta2* se expresan en forma constitutiva en ambos tipos celulares y solo se observó la sobreexpresión de *Acta 2* en las células HeLa transfectada con *CIITA* (Figura 25), lo que contrasta con los resultados obtenidos en los *microarrays*. Es probable que la sobreexpresión de *MARCK* e *IL-6*, que tienen un bajo nivel de inducción según muestran los ensayos de *microarrays* (Tabla 2), necesite el uso de técnicas más sensibles como *Real time PCR* para su detección. La expresión de citocromo P450 no pudo ser confirmada (resultados no mostrados).

En lo que respecta a los genes arriba mencionados, reportados por otros autores, en nuestros arrays no estaban incluidos los genes Hsp70 y tirosil tRNA sintetasa, y no observamos la inducción de *TAP1*, adenilato quinasa 2 y de *TGF $\beta$ R-interacting protein 1* en ninguno de los 2 tipos celulares analizados. Por lo tanto es probable que los genes observados por Nagarajan y cols (2002a) sean tipo celular específico.

Finalmente los estudios de *microarrays* de los genes inducidos por *CIITA* realizados en esta tesis como también los descritos en la literatura muestran que

los mayores índices de inducción son aquellos pertenecientes a las moléculas de la familia MHC-II. El resto de los genes inducidos por *CIITA* tienen índices muy inferiores, incluso algunos se encuentran en el límite de sensibilidad, lo cual dificulta la interpretación de los datos aportados por los ensayos de *microarrays*. La situación se torna más compleja aún si consideramos que los genes con bajo índice de inducción dependen además del tipo celular en estudio.

Por último, a excepción de los genes pertenecientes a *MHC-II*, *MHC-I*,  $\alpha$  y  $\beta$ -2 microglobulina, no se han encontrado secuencias de unión para los factores RFX, CREB y NF-Y en las regiones promotoras de los genes inducidos por *CIITA* mencionados en esta tesis ni en los descritos por otros autores (Nagarajan y cols, 2002a), que pudieran dar cuenta de la participación directa de *CIITA* sobre la regulación de estos genes. Por lo tanto, si efectivamente *CIITA* participa en la regulación de estos otros genes, es probable que se deba más bien a una acción indirecta.

## 8. RESUMEN DE RESULTADOS

1. Se clonó *CIITA* en varios vectores, tanto de expresión procarionte y eucarionte con el objetivo de producir *CIITA* para ser usada como inmunógeno y para expresarla en forma endógena en líneas celulares, respectivamente.
2. Se produjeron anticuerpos policlonales y monoclonales capaces de reconocer *CIITA* endógeno en diferentes tipos celulares. La producción de anticuerpos monoclonales necesitó la implementación de un protocolo de inmunización más eficiente debido a la baja inmunogenicidad de *CIITA*.



3. Demostramos mediante estudios bioquímicos la existencia de al menos dos isoformas principales de la proteína de CIITA. Una proveniente del promotor IV (F-CIITA: forma corta) de peso molecular 128 kDa y otra proveniente del promotor III (B-CIITA: forma larga) de peso molecular 132 KDa. Estos resultados son parte de una publicación reciente en *Int. Immunol.* (2002) 14(8): 839-48.
4. La transfección de *CIITA* salvaje en células BLS-2, reduce la expresión del *CIITA* endógeno de BLS-2 a nivel transcripcional sugiriendo la posibilidad de un mecanismo de retroalimentación negativa a nivel del promotor III de *CIITA* independiente de la expresión de MHC-II.
5. Demostramos mediante citometría de flujo y *microarrays* que las formas F-CIITA y B-CIITA tienen la misma capacidad de inducir la expresión de los isotipos de MHC-II (DP, DQ y DR), dilucidando de esta manera un punto controversial en la literatura.
6. Demostramos directamente que la proteína de CIITA tiene la capacidad de formar dímeros y que la mutación puntual 469 (L->P) en CIITA no afecta esta interacción.
7. Demostramos que CIITA induce principalmente genes que se encuentran en la región génica MHC, entre ellos DR, DP, DQ, DM y DO.
8. Además se observó en los experimentos de *microarrays* que CIITA induce la expresión de los genes *Acta2*, *MARCKS* e *IL-6*, en cuyo caso se pudo confirmar mediante RT-PCR la inducción de *Acta2* en una de las líneas transfectadas con *CIITA*.

## 9. CONCLUSIONES

Los estudios realizados en esta tesis estuvieron dirigidos en primer lugar a comprobar directamente la existencia de diferentes isoformas de la proteína CIITA y a estudiar la participación de estas isoformas en la regulación de las moléculas MHC-II. Comprobamos, mediante la utilización de anticuerpos policlonales y monoclonales producidos en el transcurso de este trabajo, que efectivamente los ARNm generados a partir de los promotores III y IV de CIITA producen una única proteína del tamaño esperado. Los antecedentes encontrados en la literatura nos llevaron a proponer que la función de las diferentes isoformas de CIITA podía estar relacionada con la expresión de diferentes isotipos de moléculas MHC-II. Sin embargo, los resultados obtenidos mediante la expresión directa en experimentos de transfección de las isoformas de CIITA provenientes del promotor III y IV obtenidas por mutación sitio dirigida, además de los resultados de microarrays, no sustentan esta hipótesis.

Alternativamente nos planteamos que la existencia de diferentes isoformas de CIITA podría regular la expresión de las moléculas MHC-II mediante la formación de dímeros. Demostramos directamente mediante experimentos de co-transfección e inmunoprecipitación que CIITA es capaz de formar homo y heterodímeros. Todas las evidencias producidas en este trabajo apuntan a un papel fundamental de esta propiedad de CIITA en la regulación de las moléculas MHC-II y abren nuevas perspectivas de investigación en esta área.

Por último, el análisis de una línea celular que produce CIITA mutada en un sitio de translocación nuclear sugiere que al menos la isoforma de CIITA producida a través del promotor III es capaz de autoregularse. Ya que actualmente se desconocen completamente los mecanismos de regulación de CIITA, estos resultados deberían ser considerados en investigaciones futuras.

## 10. ANEXO

### Anexo 1: Partidores utilizados para PCR

Nombre	secuencia 5'-3'	T° apareamiento y tiempo	N° Ciclos
B-actina: sentido:	AAA-TCG-TGC-GTG-ACA-TTA-AGG	58°C por 45 seg	17
anti-sentido:	CCG-ATC-CAC-ACG-GAG-TAC -TT		
Acta2: sentido:	AAT-GCA-GAA-GGA-GAT-CAC-G	56°C por 45 seg	25
anti-sentido:	GAA-GGC-ATA-ATT-CCA-CAG-G		
DR: sentido:	CTG-ACT-CCC-AAA-AGA-GCG-CCC	56°C por 45 seg	25
anti-sentido:	TGC-TTG-AGA-AGA-GGC-TCA-TCC		
MARCKS: sentido:	TGG-AGA-ACT-TGT-CTA-CAA-CC	56°C por 45 seg	25
anti-sentido:	GAC-TGG-TAC-AGC-TAA-CAT-GAG		
IL6: sentido:	CAA-ATT-CGG-TAC-ATC-CTC-G	56°C por 45 seg	25
anti-sentido:	TGC-AGG-AAC-TCC-TTA-AAG-C		
SAK sentido:	CTGCAGGATCTGCCCTTCTCCCTGGGCC	56°C por 2 min	12
anti-sentido:	GGGCCAGGGAGAAGGGCAGATCCTGCAG		
ATG1 sentido:	GGGATTCCTACACAATACGTTGCCTGGCTC	12 por 2 min	12
anti-sentido:	GAGCCAGGCAACGTATTGTGTAGGAATCCC		
ATG2 sentido:	CTCACAGTGTGCCACCGTGGAGTTGGGGCC	12 por 2 min	12
anti-sentido:	GGCCCCAACTCCACGGTGGCACACTGTGAG		
CIITA-RJ-S (IS) sentido:	<sup>32</sup> CTG-CCT-GGC-TGG-GAT-TCC-TA <sup>111</sup>	58°C por 45 seg	25
CIITA-RJ-AS (IAS) anti-sentido:	<sup>249</sup> GGA-GAC-TGC-CAG-TCA-CCA-CA <sup>610</sup>	58°C por 45 seg	25
CIITA-2S sentido:	<sup>2309</sup> GGG-AAA-GCT-TGT-GCA-GAC-TC <sup>2927</sup>	58°C por 45 seg	25
CIITA-2AS anti-sentido:	<sup>3359</sup> CAG-CGT-GGT-TAG-TGT-CCT-CA <sup>3540</sup>	58°C por 45 seg	25
CIITA-3S1-(EcoRI) sentido:	<sup>95</sup> CCT-GGC-TGG-AAT-TCC-TAC-ACA-ATG-C <sup>119</sup>	58°C por 240 seg	25
CIITA-3AS1-(EcoRI) anti-sentido:	<sup>3967</sup> TTG-CAG-TGA-ATT-CAG-ATC-GCA-CCA- CT <sup>3943</sup>	58°C por 240 seg	25
CIITA-4S(XhoI) sentido:	TTA-CGC-T <sup>62</sup> CG-AGG-AGG-GGC-TGC-CAG <sup>78</sup>	58°C por 240 seg	25
CIITA-4AS(XhoI) anti-sentido:	<sup>3538</sup> CAT-GGG-ATA-CAG-CCT-CGA-GAA-GAG- C <sup>3612</sup>	58°C por 240 seg	25
CIITA-5AS anti-sentido:	<sup>310</sup> TGT-CTG-TGT-CGG-CGG-GTT-CTG-AG <sup>329</sup>	58°C por 45 seg	25
CIITA HCS (6S) sentido:	<sup>1799</sup> CGC-CCT-ATT-TGA-GCT-GTC <sup>1815</sup>	58°C por 45 seg	25
CIITAHCAS (6AS) anti-sentido:	<sup>2316</sup> GGT-CAA-TGC-TAG-GTA-CTG <sup>2335</sup>	58°C por 45 seg	25
CIITA-7S1 (BLS-2) sentido:	<sup>2845</sup> AGC-AGA-GGA-GAA-GTT-CAC-C <sup>2863</sup>	58°C por 45 seg	25
CIITA 7AS1 anti-sentido:	<sup>3189</sup> TTC-TGG-GAC-AGA-TTG-AGG <sup>3172</sup>	58°C por 45 seg	25
T7-S sentido:	TAA-TAC-GAC-TCA-CTA-TAG-GG	58°C por 45 seg	25

## 11. REFERENCIAS

1. Alcaide-Loridan, C., A.M. Lennon, M.R. Bono, R. Barbouche, K. Dellagi y M. Fellous (1999). Differential expression of MHC class II isotype chains. *Microbes Infect* 1(11): 929-34.
2. Alfonso, C. y L. Karlsson (2000). Nonclassical MHC class II molecules. *Annu Rev Immunol* 18: 113-42.
3. Arbuzova, A., A.A. Schmitz y G. Vergeres (2002). Cross-talk unfolded: MARCKS proteins. *Biochem J* 362(Pt 1): 1-12.
4. Banchereau, J. y R.M. Steinman (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392(6673): 245-52.
5. Barbieri, G., V. Deffrennes, T. Prod'homme, J. Vedrenne, F. Baton, C. Cortes, A. Fischer, M.R. Bono, B. Lisowska-Groszpiere, D. Charron y C. Alcaide-Loridan (2002). Isoforms of the class II transactivator protein. *Int Immunol* 14(8): 839-48.
6. Barnhill, R.L. y M.A. Levy (1993). Regressing thin cutaneous malignant melanomas (< or = 1.0 mm) are associated with angiogenesis. *Am J Pathol* 143(1): 99-104.
7. Bateman, A. C. Turner, S. J. Theaker, J. M. and W. M. Howell. (1998). HLA-DQB1\*0303 and \*0301 alleles influence susceptibility to and prognosis in cutaneous malignant melanoma in the British Caucasian population. *Tissue Antigens* 52(1): 67-73
8. Beg, A.A., S.M. Ruben, R.I. Scheinman, S. Haskill, C.A. Rosen y A.S. Baldwin, Jr. (1992). I kappa B interacts with the nuclear localization sequences of the subunits of NF-kappa B: a mechanism for cytoplasmic retention. *Genes Dev* 6(10): 1899-913.
9. Benoist, C. y D. Mathis (1990). Regulation of major histocompatibility complex class-II genes: X, Y and other letters of the alphabet. *Annu Rev Immunol* 8: 681-715.
10. Beresford, G.W. y J.M. Boss (2001). CIITA coordinates multiple histone acetylation modifications at the HLA- DRA promoter. *Nat Immunol* 2(7): 652-7.
11. Bontron, S., C. Ucla, B. Mach y V. Steimle (1997). Efficient repression of endogenous major histocompatibility complex class II expression through dominant negative CIITA mutants isolated by a functional selection strategy. *Mol Cell Biol* 17(8): 4249-58.
12. Boss, J.M. (1997). Regulation of transcription of MHC class II genes. *Curr Opin Immunol* 9(1): 107-13.

13. Busch, R. y E.D. Mellins (1996). Developing and shedding inhibitions: how MHC class II molecules reach maturity. *Curr Opin Immunol* **8**(1): 51-8.
14. Byrne, S.N. y G.M. Halliday (2003). High levels of Fas ligand and MHC class II in the absence of CD80 or CD86 expression and a decreased CD4(+) T cell Infiltration, enables murine skin tumours to progress. *Cancer Immunol Immunother* **52**(6): 396-402.
15. Chang, C.H., S. Guerder, S.C. Hong, W. van Ewijk y R.A. Flavell (1996). Mice lacking the MHC class II transactivator (*CIITA*) show tissue- specific impairment of MHC class II expression. *Immunity* **4**(2): 167-78.
16. Chin, K.C., G. Li y J.P. Ting (1997a). Activation and transdominant suppression of MHC class II and HLA-DMB promoters by a series of C-terminal class II transactivator deletion mutants. *J Immunol* **159**(6): 2789-94.
17. Chin, K.C., G.G. Li y J.P. Ting (1997b). Importance of acidic, proline/serine/threonine-rich, and GTP-binding regions in the major histocompatibility complex class II transactivator: generation of transdominant-negative mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(6): 2501-6.
18. Cressman, D.E., K.C. Chin, D.J. Taxman y J.P. Ting (1999). A defect in the nuclear translocation of *CIITA* causes a form of type II bare lymphocyte syndrome. *Immunity* **10**(2): 163-71.
19. Cressman, D.E., W.J. O'Connor, S.F. Greer, X.S. Zhu y J.P. Ting (2001). Mechanisms of nuclear import and export that control the subcellular localization of class II transactivator. *J Immunol* **167**(7): 3626-34.
20. Cresswell, P. (1996). Invariant chain structure and MHC class II function. *Cell* **84**(4): 505-7.
21. Deffrennes, V., J. Vedrenne, M.C. Stolzenberg, J. Piskurich, G. Barbieri, J.P. Ting, D. Charron y C. Alcaide-Loridan (2001). Constitutive expression of MHC class II genes in melanoma cell lines results from the transcription of class II transactivator abnormally initiated from its B cell-specific promoter. *J Immunol* **167**(1): 98-106.
22. Ding, Y.B., G.Y. Chen, J.G. Xia, X.W. Zang, H.Y. Yang y L. Yang (2003). Association of VCAM-1 overexpression with oncogenesis, tumor angiogenesis and metastasis of gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* **9**(7): 1409-14.
23. Dong, Y. y E.N. Benveniste (2001). Immune function of astrocytes. *Glia* **36**(2): 180-90.
24. 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.

25. 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.
26. Durand, B., P. Sperisen, P. Emery, E. Barras, M. Zufferey, B. Mach y W. Reith (1997). RFXAP, a novel subunit of the RFX ADN binding complex is mutated in MHC class II deficiency. *Embo J* **16**(5): 1045-55.
27. Fontes, J.D., S. Kanazawa, N. Nekrep y B.M. Peterlin (1999). The class II transactivator *CIITA* is a transcriptional integrator. *Microbes Infect* **1**(11): 863-9.
28. Geiser, A.G., J.J. Letterio, A.B. Kulkarni, S. Karlsson, A.B. Roberts y M.B. Sporn (1993). Transforming growth factor beta 1 (TGF-beta 1) controls expression of major histocompatibility genes in the postnatal mouse: aberrant histocompatibility antigen expression in the pathogenesis of the TGF- beta 1 null mouse phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(21): 9944-8.
29. Ghosh, N., I. Gyory, G. Wright, J. Wood y K.L. Wright (2001). Positive regulatory domain 1 binding factor 1 silences class II transactivator expression in multiple myeloma cells. *J Biol Chem* **276**(18): 15264-8.
30. Ghosh, N., J.F. Piskurich, G. Wright, K. Hassani, J.P. Ting y K.L. Wright (1999). A novel element and a TEF-2-like element activate the major histocompatibility complex class II transactivator in B-lymphocytes. *J Biol Chem* **274**(45): 32342-50.
31. Girdlestone, J. (2000). Synergistic induction of HLA class I expression by RelA and *CIITA*. *Blood* **95**(12): 3804-8.
32. Glimcher, L.H. y C.J. Kara (1992). Sequences and factors: a guide to MHC class-II transcription. *Annu Rev Immunol* **10**: 13-49.
33. Gobin, S.J., A. Peijnenburg, V. Keijsers y P.J. van den Elsen (1997). Site alpha is crucial for two routes of IFN gamma-induced MHC class I transactivation: the ISRE-mediated route and a novel pathway involving *CIITA*. *Immunity* **6**(5): 601-11.
34. Gobin, S.J., A. Peijnenburg, M. van Eggermond, M. van Zutphen, R. van den Berg y P.J. van den Elsen (1998). The RFX complex is crucial for the constitutive and *CIITA*-mediated transactivation of MHC class I and beta2-microglobulin genes. *Immunity* **9**(4): 531-41.
35. Goodwin, B.L., H. Xi, R. Tejiram, D.D. Eason, N. Ghosh, K.L. Wright, U. Nagarajan, J.M. Boss y G. Blanck (2001a). Varying functions of specific major histocompatibility class II transactivator promoter III and IV elements in melanoma cell lines. *Cell Growth Differ* **12**(6): 327-35.

36. Goodwin, B.L., H. Xi, R. Tejiram, D.D. Eason, N. Ghosh, K.L. Wright, U. Nagarajan, J.M. Boss y G. Blanck (2001b). Varying functions of specific major histocompatibility class II transactivator promoter III and IV elements in melanoma cell lines. *Cell Growth Differ* **12**(6): 327-35.
37. Gourley, T.S. y C.H. Chang (2001). Cutting edge: the class II transactivator prevents activation-induced cell death by inhibiting Fas ligand gene expression. *J Immunol* **166**(5): 2917-21.
38. Gourley, T.S., D.R. Patel, K. Nickerson, S.C. Hong y C.H. Chang (2002). Aberrant expression of Fas ligand in mice deficient for the MHC class II transactivator. *J Immunol* **168**(9): 4414-9.
39. Griscelli, C., B. Lisowska-Groszpiette, F. Le Deist, A. Durandy, A. Marcadet, A. Fischer, C. de Preval y B. Mach (1989). Combined immunodeficiency with abnormal expression of MHC class II genes. *Clin Immunol Immunopathol* **50**(1 Pt 2): S140-8.
40. Hake, S.B., K. Masternak, C. Kammerbauer, C. Janzen, W. Reith y V. Steimle (2000). CIITA leucine-rich repeats control nuclear localization, in vivo recruitment to the major histocompatibility complex (MHC) class II enhanceosome, and MHC class II gene transactivation. *Mol Cell Biol* **20**(20): 7716-25.
41. Hakkarainen, T., A. Hemminki, A.V. Pereboev, S.D. Barker, C.K. Asiedu, T.V. Strong, A. Kanerva, J. Wahlfors y D.T. Curiel (2003). CD40 is expressed on ovarian cancer cells and can be utilized for targeting adenoviruses. *Clin Cancer Res* **9**(2): 619-24.
42. Harton, J.A., D.E. Cressman, K.C. Chin, C.J. Der y J.P. Ting (1999). GTP binding by class II transactivator: role in nuclear import. *Science* **285**(5432): 1402-5.
43. Harton, J.A., M.W. Linhoff, J. Zhang y J.P. Ting (2002a). Cutting edge: CATERPILLER: a large family of mammalian genes containing CARD, pyrin, nucleotide-binding, and leucine-rich repeat domains. *J Immunol* **169**(8): 4088-93.
44. Harton, J.A., W. O'Connor, Jr., B.J. Conti, M.W. Linhoff y J.P. Ting (2002b). Leucine-rich repeats of the class II transactivator control its rate of nuclear accumulation. *Hum Immunol* **63**(7): 588-601.
45. Harton, J.A., E. Zika y J.P. Ting (2001). The histone acetyltransferase domains of CREB-binding protein (CBP) and p300/CBP-associated factor are not necessary for cooperativity with the class II transactivator. *J Biol Chem* **276**(42): 38715-20.
46. Hirata, H., S. Yoshiura, T. Ohtsuka, Y. Bessho, T. Harada, K. Yoshikawa y R. Kageyama (2002). Oscillatory expression of the bHLH factor Hes1 regulated by a negative feedback loop. *Science* **298**(5594): 840-3.



47. Holling, T.M., N. van der Stoep, E. Quinten y P.J. van den Elsen (2002). Activated human T cells accomplish MHC class II expression through T cell-specific occupation of class II transactivator promoter III. *J Immunol* **168**(2): 763-70.
48. Ishikawa, H., M.S. Mahmoud, R. Fujii, S. Abroun y M.M. Kawano (2000). Proliferation of immature myeloma cells by interleukin-6 is associated with CD45 expression in human multiple myeloma. *Leuk Lymphoma* **39**(1-2): 51-5.
49. Kohler, G., S.C. Howe y C. Milstein (1976). Fusion between immunoglobulin-secreting and nonsecreting myeloma cell lines. *Eur J Immunol* **6**(4): 292-5.
50. Kohler, G. y C. Milstein (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**(5517): 495-7.
51. Kretsovali, A., T. Agalioti, C. Spilianakis, E. Tzortzakaki, M. Merika y J. Papamatheakis (1998). Involvement of CREB binding protein in expression of major histocompatibility complex class II genes via interaction with the class II transactivator. *Mol Cell Biol* **18**(11): 6777-83.
52. Kretsovali, A., C. Spilianakis, A. Dimakopoulos, T. Makatounakis y J. Papamatheakis (2001). Self-association of class II transactivator correlates with its intracellular localization and transactivation. *J Biol Chem* **276**(34): 32191-7.
53. Kwak, B., F. Mulhaupt, N. Veillard, G. Pelli y F. Mach (2001). The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin inhibits IFN-gamma induced MHC class II expression in human vascular endothelial cells. *Swiss Med Wkly* **131**(3-4): 41-6.
54. Kwak, B.R., S. Myit, F. Mulhaupt, N. Veillard, N. Rufer, E. Roosnek y F. Mach (2002). PPARgamma but not PPARalpha ligands are potent repressors of major histocompatibility complex class II induction in atheroma-associated cells. *Circ Res* **90**(3): 356-62.
55. Landmann, S., A. Muhlethaler-Mottet, L. Bernasconi, T. Suter, J.M. Waldburger, K. Masternak, J.F. Arrighi, C. Hauser, A. Fontana y W. Reith (2001). Maturation of dendritic cells is accompanied by rapid transcriptional silencing of class II transactivator (*CIITA*) expression. *J Exp Med* **194**(4): 379-91.
56. Lee, J. E. Reveille, J. D. Ross, M. I. and C Platsoucas. (1994). DHLA-DQB1\*0301 association with increased cutaneous melanoma risk. *Int J Cancer*. **59**(4): 510-513
57. Leegwater, P.A., W. van Driel y P.C. van der Vliet (1985). Recognition site of nuclear factor I, a sequence-specific ADN-binding protein from HeLa cells that stimulates adenovirus ADN replication. *Embo J* **4**(6): 1515-21.
58. 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.

59. Lennon-Dumenil, A.M., A.H. Bakker, R. Maehr, E. Fiebiger, H.S. Overkleef, M. Roseblatt, H.L. Ploegh y C. Lagaudriere-Gesbert (2002). Analysis of protease activity in live antigen-presenting cells shows regulation of the phagosomal proteolytic contents during dendritic cell activation. *J Exp Med* **196**(4): 529-40.
60. Li, G., J.A. Harton, X. Zhu y J.P. Ting (2001). Downregulation of *CIITA* function by protein kinase a (PKA)-mediated phosphorylation: mechanism of prostaglandin E, cyclic AMP, and PKA inhibition of class II major histocompatibility complex expression in monocytic lines. *Mol Cell Biol* **21**(14): 4626-35.
61. Linhoff, M.W., J.A. Harton, D.E. Cressman, B.K. Martin y J.P. Ting (2001). Two distinct domains within *CIITA* mediate self-association: involvement of the GTP-binding and leucine-rich repeat domains. *Mol Cell Biol* **21**(9): 3001-11.
62. Louis-Pence, P., C.S. Moreno y J.M. Boss (1997). Formation of a regulatory factor X/X2 box-binding protein/nuclear factor-Y multiprotein complex on the conserved regulatory regions of HLA class II genes. *J Immunol* **159**(8): 3899-909.
63. Mach, B., V. Steimle, E. Martinez-Soria y W. Reith (1996). Regulation of MHC class II genes: lessons from a disease. *Annu Rev Immunol* **14**: 301-31.
64. Martin, B.K., K.C. Chin, J.C. Olsen, C.A. Skinner, A. Dey, K. Ozato y J.P. Ting (1997). Induction of MHC class I expression by the MHC class II transactivator *CIITA*. *Immunity* **6**(5): 591-600.
65. Masternak, K. y W. Reith (2002). Promoter-specific functions of *CIITA* and the MHC class II enhanceosome in transcriptional activation. *Embo J* **21**(6): 1379-88.
66. Muhlethaler-Mottet, A., W. Di Bernardino, L.A. Otten y B. Mach (1998). Activation of the MHC class II transactivator *CIITA* by interferon-gamma requires cooperative interaction between Stat1 and USF-1. *Immunity* **8**(2): 157-66.
67. 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.
68. Nagarajan, U.M., A. Bushey y J.M. Boss (2002a). Modulation of gene expression by the MHC class II transactivator. *J Immunol* **169**(9): 5078-88.
69. Nagarajan, U.M., J. Lochamy, X. Chen, G.W. Beresford, R. Nilsen, P.E. Jensen y J.M. Boss (2002b). Class II transactivator is required for maximal expression of HLA-DOB in B cells. *J Immunol* **168**(4): 1780-6.
70. Nagarajan, U.M., P. Louis-Pence, A. DeSandro, R. Nilsen, A. Bushey y J.M. Boss (1999). RFX-B is the gene responsible for the most common cause of the bare lymphocyte syndrome, an MHC class II immunodeficiency. *Immunity* **10**(2): 153-62.

71. Naves, R., A.M. Lennon, G. Barbieri, L. Reyes, G. Puga, L. Salas, V. Deffrennes, M. Roseblatt, M. Fellous, D. Charron, C. Alcaide-Loridan y M.R. Bono (2002). MHC class II-deficient tumor cell lines with a defective expression of the class II transactivator. *Int Immunol* **14**(5): 481-91.
72. Nickerson, K., T.J. Sisk, N. Inohara, C.S. Yee, J. Kennell, M.C. Cho, P.J. Yannie, 2nd, G. Nunez y C.H. Chang (2001). Dendritic cell-specific MHC class II transactivator contains a caspase recruitment domain that confers potent transactivation activity. *J Biol Chem* **276**(22): 19089-93.
73. O'Keefe, G.M., V.T. Nguyen, L.L. Ping Tang y E.N. Benveniste (2001). IFN-gamma regulation of class II transactivator promoter IV in macrophages and microglia: involvement of the suppressors of cytokine signaling-1 protein. *J Immunol* **166**(4): 2260-9.
74. Ostmeier, H., B. Fuchs, F. Otto, R. Mawick, A. Lippold, V. Krieg y L. Suter (1999). Can immunohistochemical markers and mitotic rate improve prognostic precision in patients with primary melanoma? *Cancer* **85**(11): 2391-9.
75. Otten, L.A., V. Steimle, S. Bontron y B. Mach (1998). Quantitative control of MHC class II expression by the transactivator *CIITA*. *Eur J Immunol* **28**(2): 473-8.
76. Palucka, K. y J. Banchereau (2002). How dendritic cells and microbes interact to elicit or subvert protective immune responses. *Curr Opin Immunol* **14**(4): 420-31.
77. Piskurich, J.F., K.I. Lin, Y. Lin, Y. Wang, J.P. Ting y K. Calame (2000). BLIMP-1 mediates extinction of major histocompatibility class II transactivator expression in plasma cells. *Nat Immunol* **1**(6): 526-32.
78. Piskurich, J.F., Y. Wang, M.W. Linhoff, L.C. White y J.P. Ting (1998). Identification of distinct regions of 5' flanking ADN that mediate constitutive, IFN-gamma, *STAT1*, and TGF-beta-regulated expression of the class II transactivator gene. *J Immunol* **160**(1): 233-40.
79. Raval, A., T.K. Howcroft, J.D. Weissman, S. Kirshner, X.S. Zhu, K. Yokoyama, J. Ting y D.S. Singer (2001). Transcriptional coactivator, *CIITA*, is an acetyltransferase that bypasses a promoter requirement for TAF(II)250. *Mol Cell* **7**(1): 105-15.
80. Raval, A., J.D. Weissman, T.K. Howcroft y D.S. Singer (2003). The GTP-Binding Domain of Class II Transactivator Regulates Its Nuclear Export. *J Immunol* **170**(2): 922-30.
81. Reith, W., M. Kober, P. Emery, B. Durand, C.A. Siegrist y B. Mach (1994). Cooperative binding between factors RFX and X2bp to the X and X2 boxes of MHC class II promoters. *J Biol Chem* **269**(31): 20020-5.

82. Reith, W. y B. Mach (2001). The bare lymphocyte syndrome and the regulation of MHC expression. *Annu Rev Immunol* **19**: 331-73.
83. Reith, W., A. Muhlethaler-Mottet, K. Masternak, J. Villard y B. Mach (1999). The molecular basis of MHC class II deficiency and transcriptional control of MHC class II gene expression. *Microbes Infect* **1**(11): 839-46.
84. Richmond, A. (2002). Nf-kappa B, chemokine gene transcription and tumour growth. *Nat Rev Immunol* **2**(9): 664-74.
85. Riegert, P., R. Andersen, N. Bumstead, C. Dohring, M. Dominguez-Steglich, J. Engberg, J. Salomonsen, M. Schmid, J. Schwager, K. Skjodt y J. Kaufman (1996). The chicken beta 2-microglobulin gene is located on a non-major histocompatibility complex microchromosome: a small, G+C-rich gene with X and Y boxes in the promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(3): 1243-8.
86. Rigaud, G., A. De Lerma Barbaro, M. Nicolis, T. Cestari, D. Ramarli, A.P. Riviera y R.S. Accolla (1996). Induction of *CIITA* and modification of in vivo HLA-DR promoter occupancy in normal thymic epithelial cells treated with IFN-gamma: similarities and distinctions with respect to HLA-DR-constitutive B cells. *J Immunol* **156**(11): 4254-8.
87. Riley, J.L., S.D. Westerheide, J.A. Price, J.A. Brown y J.M. Boss (1995). Activation of class II MHC genes requires both the X box region and the class II transactivator (*CIITA*). *Immunity* **2**(5): 533-43.
88. Samuel, C.E. (2001). Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev* **14**(4): 778-809, table of contents.
89. Scholl, T., S.K. Mahanta y J.L. Strominger (1997). Specific complex formation between the type II bare lymphocyte syndrome- associated transactivators *CIITA* and RFX5. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(12): 6330-4.
90. Shull, M.M., I. Ormsby, A.B. Kier, S. Pawlowski, R.J. Diebold, M. Yin, R. Allen, C. Sidman, G. Proetzel, D. Calvin y et al. (1992). Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* **359**(6397): 693-9.
91. Sims, T.N., J.F. Elliott, V. Ramassar, D.W. Denney, Jr. y P.F. Halloran (1997). Mouse class II transactivator: cDNA sequence and amino acid comparison with the human class II transactivator. *Immunogenetics* **45**(3): 220-2.
92. Sisk, T.J., T. Gourley, S. Roys y C.H. Chang (2000). MHC class II transactivator inhibits *IL-4* gene transcription by competing with NF-AT to bind the coactivator CREB binding protein (CBP)/p300. *J Immunol* **165**(5): 2511-7.

93. Sisk, T.J., S. Roys y C.H. Chang (2001). Self-association of *CIITA* and its transactivation potential. *Mol Cell Biol* **21**(15): 4919-28.
94. Spilianakis, C., J. Papamatheakis y A. Kretsovali (2000). Acetylation by PCAF enhances *CIITA* nuclear accumulation and transactivation of major histocompatibility complex class II genes. *Mol Cell Biol* **20**(22): 8489-98.
95. Steimle, V., B. Durand, E. Barras, M. Zufferey, M.R. Hadam, B. Mach y W. Reith (1995). A novel ADN-binding regulatory factor is mutated in primary MHC class II deficiency (bare lymphocyte syndrome). *Genes Dev* **9**(9): 1021-32.
96. 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.
97. Stommel, J.M., N.D. Marchenko, G.S. Jimenez, U.M. Moll, T.J. Hope y G.M. Wahl (1999). A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulation of subcellular localization and p53 activity by NES masking. *Embo J* **18**(6): 1660-72.
98. Suter, T., U. Malipiero, L. Otten, B. Ludewig, A. Muelethaler-Mottet, B. Mach, W. Reith y A. Fontana (2000). Dendritic cells and differential usage of the MHC class II transactivator promoters in the central nervous system in experimental autoimmune encephalitis. *Eur J Immunol* **30**(3): 794-802.
99. Tai, A.K., G. Zhou, K. Chau y S.J. Ono (1999). Cis-element dependence and occupancy of the human invariant chain promoter in *CIITA*-dependent and -independent transcription. *Mol Immunol* **36**(7): 447-60.
100. Takebayashi, K., Y. Sasai, Y. Sakai, T. Watanabe, S. Nakanishi y R. Kageyama (1994). Structure, chromosomal locus, and promoter analysis of the gene encoding the mouse helix-loop-helix factor HES-1. Negative autoregulation through the multiple N box elements. *J. Biol. Chem.* **269**(7): 5150-5156.
101. Taxman, D.J., D.E. Cressman y J.P. Ting (2000). Identification of class II transcriptional activator-induced genes by representational difference analysis: discoordinate regulation of the DN alpha/DO beta heterodimer. *J Immunol* **165**(3): 1410-6.
102. Ting, J.P. y A.S. Baldwin (1993). Regulation of MHC gene expression. *Curr Opin Immunol* **5**(1): 8-16.
103. Ting, J.P., K.L. Wright, K.C. Chin, W.J. Brickey y G. Li (1997). The DMB promoter: delineation, in vivo footprint, trans-activation, and trans-dominant suppression. *J Immunol* **159**(11): 5457-62.

104. Tosi, G., N. Jabrane-Ferrat y B.M. Peterlin (2002). Phosphorylation of *CIITA* directs its oligomerization, accumulation and increased activity on MHCII promoters. *Embo J* 21(20): 5467-76.
105. Towey, M. y A.P. Kelly (2002). Nuclear localisation of *CIITA* is controlled by a carboxy terminal leucine-rich repeat region. *Mol Immunol* 38(8): 627-34.
106. Trowsdale, J. (1993). Genomic structure and function in the MHC. *Trends Genet* 9(4): 117-22.
107. Valle, M.T., C. Porta, A.M. Megiovanni, R. Libener, L. Mele, G. Gaudino, L. Strizzi, R. Guida, S. Toma y L. Mutti (2003). Transforming growth factor-beta released by PPD-presenting malignant mesothelioma cells inhibits interferon-gamma synthesis by an anti-PPD CD4+ T-cell clone. *Int J Mol Med* 11(2): 161-7.
108. van den Elsen, P.J. y S.J. Gobin (1999). The common regulatory pathway of MHC class I and class II transactivation. *Microbes Infect* 1(11): 887-92.
109. van der Stoep, N., P. Biesta, E. Quinten y P.J. van den Elsen (2002a). Lack of IFN-gamma-mediated induction of the class II transactivator (*CIITA*) through promoter methylation is predominantly found in developmental tumor cell lines. *Int J Cancer* 97(4): 501-7.
110. van der Stoep, N., E. Quinten y P.J. van den Elsen (2002b). Transcriptional regulation of the MHC class II trans-activator (*CIITA*) promoter III: identification of a novel regulatory region in the 5'- untranslated region and an important role for cAMP-responsive element binding protein 1 and activating transcription factor-1 in *CIITA*- promoter III transcriptional activation in B lymphocytes. *J Immunol* 169(9): 5061-71.
111. Van der Elsen P., Holling T., Kuipers H y van der Stoep N. (2004). Transcriptional regulation of antigen presentation. *Current Opinion in Immunology*. 16: 67-75
112. Villadangos, J.A., M. Cardoso, R.J. Steptoe, D. van Berkel, J. Pooley, F.R. Carbone y K. Shortman (2001). MHC class II expression is regulated in dendritic cells independently of invariant chain degradation. *Immunity* 14(6): 739-49.
113. Waldburger, J.M., T. Suter, A. Fontana, H. Acha-Orbea y W. Reith (2001). Selective abrogation of major histocompatibility complex class II expression on extrahematopoietic cells in mice lacking promoter IV of the class II transactivator gene. *J Exp Med* 194(4): 393-406.
114. Westerheide, S.D., P. Louis-Pence, D. Ping, X.F. He y J.M. Boss (1997). HLA-DMA and HLA-DMB gene expression functions through the conserved S-X- Y region. *J Immunol* 158(10): 4812-21.

115. Wiszniewski, W., M.C. Fondaneche, F. Le Deist, M. Kanariou, F. Selz, N. Brousse, V. Steimle, G. Barbieri, C. Alcaide-Loridan, D. Charron, A. Fischer y B. Lisowska-Groszpiere (2001). Mutation in the class II trans-activator leading to a mild immunodeficiency. *J Immunol* **167**(3): 1787-94.
116. Wright, K.L., K.C. Chin, M. Linhoff, C. Skinner, J.A. Brown, J.M. Boss, G.R. Stark y J.P. Ting (1998). *CIITA* stimulation of transcription factor binding to major histocompatibility complex class II and associated promoters in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(11): 6267-72.
117. Xi, H., D.D. Eason, D. Ghosh, S. Dovhey, K.L. Wright y G. Blanck (1999). Co-occupancy of the interferon regulatory element of the class II transactivator (*CIITA*) type IV promoter by interferon regulatory factors 1 and 2. *Oncogene* **18**(43): 5889-903.
118. Xi, H., B. Goodwin, A.T. Shepherd y G. Blanck (2001). Impaired class II transactivator expression in mice lacking interferon regulatory factor-2. *Oncogene* **20**(31): 4219-27.
119. Zhou, H. y L.H. Glimcher (1995). Human MHC class II gene transcription directed by the carboxyl terminus of *CIITA*, one of the defective genes in type II MHC combined immune deficiency. *Immunity* **2**(5): 545-53.
120. Zhou, H., H.S. Su, X. Zhang, J. Douhan, 3rd y L.H. Glimcher (1997). *CIITA*-dependent and -independent class II MHC expression revealed by a dominant negative mutant. *J Immunol* **158**(10): 4741-9.
121. Zhu, J. y F. McKeon (1999). NF-AT activation requires suppression of Crm1-dependent export by calcineurin. *Nature* **398**(6724): 256-60.
122. Zhu, X.S., M.W. Linhoff, G. Li, K.C. Chin, S.N. Maity y J.P. Ting (2000). Transcriptional scaffold: *CIITA* interacts with NF-Y, RFX, and CREB to cause stereospecific regulation of the class II major histocompatibility complex promoter. *Mol Cell Biol* **20**(16): 6051-61.
123. Zhu, X.S. y J.P. Ting (2001). A 36-amino-acid region of *CIITA* is an effective inhibitor of CBP: novel mechanism of gamma interferon-mediated suppression of collagen alpha(2)(I) and other promoters. *Mol Cell Biol* **21**(20): 7078-88.