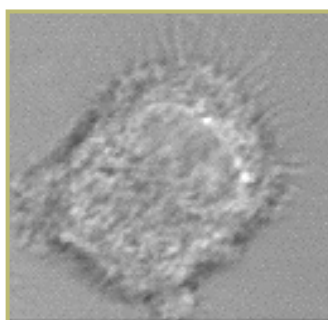


UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS y NATURALES
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOQUÍMICAS

**ESTUDIO DEL ROL DE LA TETRASPANINA CD63 EN CÉLULAS
DENDRÍTICAS HUMANAS Y SU PARTICIPACIÓN EN LA
INTERNALIZACIÓN DE ANTÍGENOS**

Tesis presentada para optar al título de Doctor
de la Universidad de Buenos Aires en el área
Ciencias Químicas, orientación Bioquímica y Biología Molecular

Bioq. Adriana R. Mantegazza



Director de tesis: **Dr. José Mordoh**

Lugar de trabajo: Fundación Instituto Leloir

~2005~

ESTUDIO DEL ROL DE LA TETRASPANINA CD63 EN CÉLULAS DENDRÍTICAS HUMANAS Y SU PARTICIPACIÓN EN LA INTERNALIZACIÓN DE ANFÍGENOS

RESUMEN

Trabajos previos de nuestro laboratorio han permitido desarrollar un anticuerpo monoclonal (AMC) murino denominado **FC-5.01**, usando como inmunógeno la línea celular de carcinoma mamario humano indiferenciado IIB-BR-G. Se identificó el antígeno reconocido por FC-5.01 como la **Tetraspanina CD63/lamp 3**.

La tetraspanina **CD63** está presente en la superficie y en endosomas y lisosomas de células de melanoma, células dendríticas (CDs) y macrófagos; también se encuentra en vesículas secretorias, como los cuerpos de Weibel-Palade de células endoteliales, gránulos citolíticos de células T citotóxicas, gránulos α de plaquetas y gránulos de basófilos, neutrófilos y eosinófilos, localizándose en la membrana plasmática luego de la activación de dichas células.

Observamos que el **AMC FC-5.01** reconoce **CDs** humanas obtenidas a partir del cultivo de monocitos de sangre periférica en presencia de interleuquina-4 (IL-4) y factor estimulador de colonias granulocito-monocito (GM-CSF). Demostramos mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal que el complejo de superficie **FC-5.01-CD63** se internaliza en CDs, siguiendo el trayecto endosomal-lisosomal, y alcanza los compartimentos enriquecidos en moléculas MHC de clase II (**MIICs**), donde tiene lugar el procesamiento y cargado de los péptidos a ser presentados en el contexto de las moléculas clase II.

Detectamos que las tetraspaninas **CD9**, **CD81**, **CD82** y **CD151** también se expresan en CDs. **CD9** y **CD81** se localizan predominantemente en la superficie

celular, mientras que CD63 y CD82 también se expresan intracelularmente. La incubación con AMCs anti-CD9, CD63, CD81 y CD82 causa un aumento de la migración celular inducida por los quimioattractantes MIP-1 α y MIP-5, entre un 50% y un 70%. La incubación con todos los AMCs simultáneamente produce un aumento de casi un 100% en la quimiotaxis celular. Mediante inmunofluorescencia e inmunoprecipitación, demostramos la asociación entre tetraspaninas y ciertas integrinas.

Proponemos que **CD63** está involucrado en la captura selectiva de antígenos (Ags) por las CDs. Observamos que la fagocitosis de *S. cerevisiae*, pero no la endocitosis de FITC-dextrán ni la captura de partículas de látex, produce una disminución en la expresión de superficie de CD63. Visualizamos mediante microscopía que CD63 acompaña la fagocitosis de *S. cerevisiae* y se localiza en organelas intracelulares conteniendo las levaduras fagocitadas. Mediante inmunoprecipitación detectamos la asociación entre CD63 y el receptor de β -glucanos dectin-1, el cual participa en la captura de levaduras por las CDs. CD63 no parece estar asociado con el receptor de manosa (MR) ni el DC-SIGN, responsable de la entrada de varios patógenos a las CDs, como el virus del dengue.

A partir del hibridoma productor del **AMC FC-5.01** construimos una molécula recombinante “**single-chain Fv**” (**scFv**), mediante el ensamblado de las porciones variables de la cadena pesada (V_H) y la cadena liviana (V_L) del AMC por medio de un péptido espaciador. La molécula recombinante scFv-5.01 mantiene la especificidad en el reconocimiento de CD63. El complejo de superficie scFv-5.01-CD63 se internaliza y alcanza los compartimentos MIIC en CDs, al igual que el anticuerpo parental. Partiendo de dicha construcción, generamos una proteína de fusión portando el péptido de melanoma MART-1 (**scFv-5.01-MART-1**), la cual también mantiene la reactividad del anticuerpo parental contra CD63 y alcanza los compartimentos MIIC al internalizarse en CDs.

Por último, conjugamos químicamente el **AMC FC-5.01** con una proteína altamente inmunogénica como el **toxoides tetánico (TT)**. Comprobamos que el conjugado **FC-5.01-TT** retiene la especificidad del anticuerpo parental por CD63, se internaliza en CDs, alcanza los compartimentos MIIC, es presentado por dichas células y genera una respuesta específica de linfocitos autólogos de dadores vacunados contra el tétanos.

Por lo todo lo expuesto, consideramos que el **AMC FC-5.01** o sus fragmentos derivados podrían ser utilizados como vehículo de péptidos o proteínas antigénicas de interés hacia las CDs, las cuales presentarían dichos Ags y generarían una respuesta inmune específica. Nuestros resultados aportaron también nueva evidencia acerca del posible rol de CD63 y otras tetraspaninas en CDs.

Palabras clave: células dendríticas - tetraspanina CD63 - anticuerpo monoclonal FC-5.01 - tráfico intracelular - fagocitosis - quimiotaxis - molécula recombinante single-chain Fv-

Los resultados presentados en esta Tesis fueron parcialmente publicados en:

-“CD63 tetraspanin slows down cell migration and translocates to the endosomal-lysosomal-MIICs route after extracellular stimuli in human immature dendritic cells”. **Mantegazza A. R.**, Barrio M. M., Moutel S., Bover L., Weck M., Brossart P., Teillaud J-L y Mordoh J. Blood 104(4): 1183-1190, 2004.

La información contenida en esta Tesis deberá ser tratada en forma

CONFIDENCIAL.

STUDY OF THE ROLE PLAYED BY TETRASPANIN CD63 IN HUMAN DENDRITIC CELLS AND ITS PARTICIPATION IN THE INTERNALIZATION OF ANTIGENS

ABSTRACT

Our laboratory has previously produced a monoclonal antibody (Mab) named **FC-5.01**, immunizing mice with a human breast cancer cell line (IIB-BR-G) derived from a highly undifferentiated breast tumor. FC-5.01 recognizes **Tetraspanin CD63**.

Tetraspanin CD63 is expressed on the surface and in endosomes and lysosomes of melanoma cells, **dendritic cells (DCs)** and macrophages; it is also found in secretory vesicles, such as Weibel-Palade bodies from endothelial cells, cytolytic granules from cytotoxic T cells, α granules from platelets and granules from basophils, neutrophils and eosinophils, translocating to the plasma membrane after cellular activation.

We have observed that **Mab FC-5.01** recognizes human DCs obtained from the culture of peripheral blood monocytes in the presence of interleukine-4 (IL-4) and granulocyte-monocyte colony stimulating factor (GM-CSF). We have demonstrated, by immunofluorescence and confocal microscopy, that the surface complex **FC-5.01-CD63** internalizes in CDs, follows the endosomal-lysosomal route and reaches the compartments enriched in MHC class II molecules (MIICs), where antigen processing and peptide loading takes place for class II presentation to occur.

We have detected that tetraspanins **CD9**, **CD81**, **CD82** and **CD151** are also expressed in DCs. CD9 and CD81 are localized preferentially at the DCs cell surface, while CD63 and CD82 are also expressed intracellularly. The incubation with Mabs directed to CD9, CD63, CD81 and CD82 increase cellular migration driven by chemoattractants MIP-1 α y MIP-5 between 50% and 70%.

When Mabs against all the tetraspanins studied are added together, migration increases almost 100%. By immunofluorescence and immunoprecipitation we have demonstrated the association between tetraspanins and certain integrins.

We propose that **CD63** is involved in the selective capture of antigens (Ags) by DCs. We have observed that *S. cerevisiae* phagocytosis, but neither FITC-dextran endocytosis nor latex beads capture, causes the decrease on CD63 surface expression. We have visualized by microscopy that CD63 accompanies *S. cerevisiae* phagocytosis and localizes in intracellular organelles containing phagocytosed yeasts. We have detected, by immunoprecipitation, the association between CD63 and the β -glycan receptor dectin-1, which is involved in the capture of yeasts by DCs. CD63 does not seem to be associated neither with mannose receptor (MR) nor with DC-SIGN, which takes part in the entry of several pathogens in DCs, such as dengue virus.

We have constructed a recombinant molecule “**single-chain Fv**” (scFv), making use of FC-5.01 hybridoma, joining the variable portions of FC-5.01 heavy (V_H) and light (V_L) chains by a flexible peptide linker. The recombinant molecule **scFv-5.01** recognizes CD63 on the surface of DCs. The complex **scFv-5.01-CD63** internalizes and reaches MIIC compartments, like the parental antibody. We have further generated a fusion protein carrying the melanoma peptide MART-1 (**scFv-5.01-MART-1**), which also keeps the reactivity of the whole antibody towards CD63 and reaches MIICs after internalization.

Finally, we have chemically conjugated Mab FC-5.01 with a highly immunogenic protein, such as tetanus toxoid (TT). We have verified that **FC-5.01-TT** recognizes CD63, internalizes, reaches MIICs and is presented by DCs, generating a specific response from autologous lymphocytes responsive to TT.

Therefore, we think that **Mab FC-5.01** or its derived fragments could be used as vehicle for antigenic peptides or proteins of interest in DCs, which would present these antigens and could generate a specific immune response. Our results have also provided new evidence about the possible role of CD63 and other tetraspanins in DCs.

Key words: dendritic cells - tetraspanin CD63 - monoclonal antibody FC-5.01 - intracellular traffic - phagocytosis - chemotaxis - recombinant molecule scFv -

The results shown on this Thesis have been partially published in:

-“CD63 tetraspanin slows down cell migration and translocates to the endosomal-lysosomal-MIICs route after extracellular stimuli in human immature dendritic cells”. **Mantegazza A. R.**, Barrio M. M., Moutel S., Bover L., Weck M., Brossart P., Teillaud J-L y Mordoh J. *Blood* 104(4): 1183-1190, 2004.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	4
ABREVIATURAS	14
OBJETIVOS	16
INTRODUCCIÓN	18
1. Superfamilia de las Tetraspaninas	18
1.1. Generalidades	18
1.2. Tetraspaninas en infecciones virales	23
1.3. Tetraspaninas y motilidad celular	24
1.3.1. Integrinas	24
1.3.2. Asociación Tetraspaninas-Integrinas	26
1.3.3. Tetraspaninas y metástasis	29
1.4. Tetraspaninas y presentación antigénica	30
1.5. Tetraspaninas CD9, CD63, CD81, CD82 y CD151	31
1.5.1. CD9	31
1.5.2. CD63/Lamp-3/ME491	32
1.5.3. CD81/TAPA-1	33
1.5.4. CD82/KAI1	35
1.5.5. CD151/PETA3	35
2. Células Dendríticas	37
2.1 Características generales	37
2.2 Funciones específicas	39
2.2.1 Captura de antígenos	39

2.2.1.1 Familia de lectinas tipo C en células dendríticas.....	41
2.2.1.2 Infecciones virales	44
2.2.1.2.1 Virus del dengue.....	44
2.2.2 Adhesión y migración	45
2.2.2.1 Selectinas e integrinas	46
2.2.2.1.1 Expresión en células dendríticas	47
2.2.2.2 Quemoquinas y sus receptores	48
2.2.2.2.1. Expresión diferencial en CDs inmaduras y maduras	49
2.2.3. Procesamiento y presentación antigénica	51
2.2.3.1. Rol de los endosomas, lisosomas y compartimentos MIIC	51
2.2.3.2 Diferencias entre células dendríticas inmaduras y maduras	54
2.3 Células dendríticas en inmunoterapia del cáncer	56
3. Anticuerpos monoclonales	59
3.1 Estructura y función de los anticuerpos	59
3.2 Producción de anticuerpos monoclonales	61
3.3 Aplicación de los anticuerpos monoclonales	61
3.3.1. Anticuerpo monoclonal FC-5.01	61
3.3.2 Los anticuerpos monoclonales como agentes anti-tumorales	62
4. Fragmentos derivados de anticuerpos monoclonales	64
4.1 Fragmentos recombinantes “single-chain Fv”	66
4.1.1 Estructura y producción	66
4.1.2 Aplicaciones terapéuticas	66

MATERIALES Y MÉTODOS	69
1. Anticuerpos	69
2. Células	71
2.1 Obtención de células dendríticas y linfocitos	71
2.2 Cultivo de líneas celulares	73
2.3 Preparación de extractos de células dendríticas	73
2.4 Preparación de extractos tumorales	74
2.5 Preparación de extractos de plaquetas	74
3. Obtención de fragmentos y conjugados del AMC FC-5.01	75
3.1 Preparación de fragmentos Fab-5.01	75
3.1.1 Detección y reactividad del Fab-5.01	75
3.2 Construcción de la molécula recombinante scFv-5.01-<i>c-myc</i>-his6	76
3.2.1 Plásmidos y cepas bacterianas	76
3.2.2 Clonado y secuenciación de las regiones variables del FC-5.01	77
3.2.3. Clonado y secuenciación de la molécula scFv-5.01- <i>c-myc</i> -his6	79
3.2.4. Producción y purificación de la molécula scFv-5.01- <i>c-myc</i> -his6	81
3.2.4.1 Detección y reactividad de la molécula scFv-5.01- <i>c-myc</i> -his6	83
3.3 Construcción de la proteína de fusión scFv-5.01-MART-1- <i>c-myc</i>-his6	83
3.3.1 Producción y purificación de la proteína de fusión	85
3.3.1.1 Detección y reactividad de la proteína de fusión	85
3.4 Preparación del conjugado FC-5.01-TT	85
3.4.1 Detección y reactividad del conjugado FC-5.01-TT	86

4. Ensayos celulares	88
4.1 Inmunofluorescencia: Microscopía confocal y Citometría de flujo ...	88
4.1.1 Expresión de moléculas marcadoras, tetraspaninas e integrinas en células dendríticas. Expresión de superficie e intracelular	88
4.1.2 Internalización de complejos anticuerpo-tetraspanina	89
4.1.3 Reactividad de FC-5.01, FC-5.01-TT, Fab y scFv	90
4.1.4 Co-localización con marcadores de compartimentos intracelulares ...	90
4.2 Inmunoprecipación	91
4.3 Quimiotaxis	92
4.4 Fagocitosis/endocitosis	93
4.4.1 Fagocitosis de levaduras	93
4.4.2 Endocitosis de FITC-dextrán	93
4.4.3 Fagocitosis de partículas de látex	94
4.4.4 Infección con el virus del dengue	94
4.4.4.1 Infección de células dendríticas	94
4.4.4.2 Infección de células BHK con sobrenadantes de células dendríticas infectadas. Observación de placas de lisis	94
4.5 Proliferación de linfocitos respondedores al toxoide tetánico	95
RESULTADOS	96
1. Obtención de células dendríticas humanas	96
1.1 Expresión de marcadores de superficie de células dendríticas	96
2. Tetraspaninas en células dendríticas	98
2.1 Expresión de CD63 y otras tetraspaninas en células dendríticas	98
2.2 Internalización de tetraspaninas con AMCs específicos en células dendríticas	100
2.2.1 Destino intracelular de los complejos de superficie FC-5.01-CD63	

en células dendríticas	102
2.2.2 Preparación de fragmentos Fab-5.01	103
2.2.2.1 Translocación de los complejos de superficie Fab-5.01-CD63 a endosomas, lisosomas y MIICs en células dendríticas	104
2.2.3 Expresión de superficie de las tetraspaninas luego de la incubación con AMCs anti-CD63 y anti-CD82	104
3. Asociación Tetraspaninas-Integrinas en células dendríticas	106
3.1 Efecto de los anticuerpos anti-tetraspaninas en la migración de células dendríticas inmaduras	106
3.2 Expresión de integrinas en células dendríticas	108
3.2.1 Expresión de integrinas luego de la incubación con AMCs anti-CD63 y anti-CD82	109
3.3 Asociación de CD63 con las integrinas CD11b/CD18	110
4. Participación de CD63 en la captura de antígenos extraños por las células dendríticas inmaduras	112
4.1 Fagocitosis de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>. Participación del receptor de β-glucanos (dectin-1)	112
4.1.1 Asociación de CD63 con dectin-1	113
4.2 Endocitosis de FITC-dextrán	116
4.2.1 CD63 no estaría asociado al receptor de manosa	116
4.3 Fagocitosis de partículas de látex	118
4.4 Infección con el virus del dengue	118
5. Construcción de la molécula recombinante scFv-5.01-c-myc-his₆	121

5.1 Clonado y secuenciación de las regiones variables del AMC-FC-5.01 .	121
5.2 Clonado y secuenciación de la molécula recombinante	
scFv-5.01- <i>c-myc</i> - his ₆	124
5.3 Producción y purificación de la molécula recombinante scFv-5.01-	
<i>c-myc</i> -his ₆	126
5.4 Reactividad de la molécula recombinante scFv-5.01- <i>c-myc</i> -his ₆	126
5.5 Internalización del complejo scFv-5.01-<i>c-myc</i>-his₆-CD63	130
5.5.1 Destino intracelular del complejo scFv-CD63	130
6. Construcción de la proteína de fusión scFv-5.01-MART-1	132
6.1 Clonado de la proteína de fusión scFv-5.01-MART-1	132
6.2 Producción y purificación de la proteína de fusión	133
6.3 Reactividad de la proteína de fusión	133
6.4 Translocación del complejo scFv-5.01-Mart-1-CD63 a los	
compartimentos MIIC	133
7. Obtención y caracterización de las propiedades funcionales del	
conjugado FC-5.01-toxoide tetánico	136
7.1 Obtención y purificación del conjugado FC-5.01-toxoide tetánico	136
7.2 Reactividad del conjugado FC-5.01-TT	137
7.3 Internalización del complejo FC-5.01-TT-CD63	138
7.4 Funcionalidad del conjugado FC-5.01-TT. Proliferación de	
linfocitos respondedores al toxoide tetánico	
.....	139

DISCUSIÓN	141
CONCLUSIONES	152
BIBLIOGRAFÍA	154
AGRADECIMIENTOS	169

ABREVIATURAS

- Ac:** anticuerpo
- ADNc:** ácido desoxirribonucleico complementario
- Ag:** antígeno
- AMC:** anticuerpo monoclonal
- ARN:** ácido ribonucleico
- CCR:** receptor de quemoquina
- CDs:** células dendríticas
- CDR:** regiones determinantes de la complementariedad
- CPA:** células presentadoras de antígenos
- ELISA:** ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas
- ER:** retículo endoplásmico
- ETa:** endosoma tardío
- ETe:** endosoma temprano
- FACS:** citometría de flujo
- FAK:** quinasa de adhesión focal
- FITC:** isotiocianato de fluoresceína
- FITC-Dx:** FITC-dextrán
- GAM:** anticuerpo de cabra anti-ratón (goat anti-mouse)
- GAR:** anticuerpo de cabra anti-conejo (goat anti-rabbit)
- GM-CSF:** factor estimulador de colonias granulocito-monocito
- GR:** glóbulo rojo
- ICAM:** molécula de adhesión intercelular
- IL-4:** interleuquina-4
- Kb:** kilobase
- MIIC:** compartimento enriquecido en moléculas MHCII
- MART:** antígeno de melanoma reconocido por linfocitos T
- MEC:** matriz extracelular
- MHCII:** complejo mayor de histocompatibilidad de clase II
- MIP:** proteína inflamatoria de macrófagos

MPM: marcador de PM

MR: receptor de manosa

pb: pares de bases

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PE: ficoeritrina

PHA: fitohemaglutinina

PI-4K: fosfatidil inositol-4 quinasa

PKC: proteín-quinasa C

PM: peso molecular

PMN: leucocitos polimorfonucleares

RAG: anticuerpo de conejo anti-cabra (rabbit anti-goat)

RAM: anticuerpo de conejo anti-ratón (rabbit anti-mouse)

Rc: receptor

rpm: revoluciones por minuto

scFv: "single-chain" Fv

SDS: dodecil sulfato de sodio

SDS-PAGE: electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS

TRITC: isotiocianato de metil-rodamina

VCAM: molécula de adhesión vascular

VHC: virus de la hepatitis C

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

OBJETIVOS

Trabajos previos de nuestro laboratorio han permitido producir y caracterizar un anticuerpo monoclonal (**AMC FC-5.01**) reactivo con la **tetraspanina CD63**¹, una proteína de superficie de amplia distribución tisular.

A partir de la observación de la reactividad de dicho anticuerpo con **células dendríticas humanas**, y habiendo detectado que el complejo de superficie AMC FC-5.01-CD63 es rápidamente internalizado hacia vesículas intracelulares en una línea celular de cáncer de mama, nos planteamos como **Objetivos Generales**:

- 1) Utilizar el **AMC FC-5.01** como herramienta para el estudio del rol de la **tetraspanina CD63** en células dendríticas humanas.
 - a. Analizar la expresión de **CD63** y su posible participación en procesos celulares como la migración, endocitosis/fagocitosis y presentación antigénica.
 - b. Realizar un estudio comparativo con otros miembros de la familia de las **tetraspaninas (CD9, CD81, CD82, CD151)**.

- 2) Analizar el trayecto intracelular del complejo **FC-5.01-CD63** en células dendríticas humanas, con el propósito de evaluar el posible uso del anticuerpo o fragmentos derivados del mismo como vehículo de péptidos antigénicos hacia dichas células.
 - a. Analizar la co-localización del complejo con moléculas MHC de clase II, en compartimentos de presentación antigénica (**MIICs**)

- b. Producir una molécula recombinante “**single-chain Fv**”, cuya versatilidad permita la posterior construcción de proteínas de fusión portando péptidos de interés antigénico.
- c. Ensayar otras estrategias de “vehiculización”, como la conjugación química de una proteína al anticuerpo entero.
- d. Comenzar a evaluar si los péptidos o proteínas “dirigidos” por el **AMC FC-5.01** son presentados por las células dendríticas más eficientemente que los mismos péptidos o proteínas aislados.

INTRODUCCIÓN

3. Superfamilia de las Tetraspaninas

1.1. Generalidades

Las **tetraspaninas**^{2,3,4} constituyen una superfamilia de proteínas de membrana, compuesta en mamíferos, hasta la fecha, por treinta y dos miembros, veinte de los cuales se expresan en leucocitos (**Tabla 1**). Presentan una amplia distribución tisular y deben su nombre a la presencia en su estructura de cuatro dominios transmembrana (**Figura 1A**). Dichos dominios, altamente hidrofóbicos, se encuentran conservados dentro de la familia y no muestran homología de secuencia significativa con otras proteínas de similar topología transmembrana³. Dentro de estos dominios se encuentran varios residuos de aminoácidos polares, muy conservados, los cuales serían de importancia para el correcto plegamiento de estas proteínas⁵ y estarían también involucrados en la formación de heterodímeros entre distintas moléculas de tetraspaninas⁶. Esta familia de proteínas presenta a su vez dos dominios extracelulares (un loop pequeño-EC1- y otro grande-EC2-) y extremos -COOH y -NH₂ terminales cortos e intracitoplasmáticos. A diferencia de los dominios transmembrana, los extracelulares e intracelulares son en general variables dentro de la familia, aunque se distinguen algunos residuos conservados. Una de las características variables es la N-glicosilación, la cual se observa para algunos de sus miembros en el loop grande (**CD63**, **CD82**, **CD151**), en el pequeño (**CD9**) o puede también estar ausente (**CD81**, **NET-2**) y el grado de glicosilación puede a su vez variar dependiendo del tipo y el estadio de maduración celular^{7,8,9}, lo cual determina diferencias en su peso molecular (de 30 a 80 kDa), siendo el core proteico de aproximadamente 25 kDa.

Aparentemente, la glicosilación sería importante para el mantenimiento de ciertos complejos tetraspaninas-integrinas⁷. Presentan también miristoilación y palmitoilación variables en residuos de Cys adyacentes a la membrana o transmembrana, las cuales contribuyen a la estabilidad de las interacciones de distintas tetraspaninas entre sí^{10,11,12} y con ciertas integrinas^{13,14}. Algunos de los miembros de la familia (como **CD63**, **CD82** y **CD151**, pero no **CD9** y **CD81**) presentan una secuencia de localización lisosomal (YXX ϕ) en el extremo -COOH terminal, lo cual se asocia con su capacidad de ciclar entre el compartimento lisosomal y la membrana plasmática^{12,15}. Pero la característica distintiva de esta familia es la presencia de residuos conservados de Cys en los motivos CCG, PXSC y EXC dentro del loop grande, que se encuentran formando parte de puentes disulfuro esenciales para el correcto plegamiento de este dominio¹⁶ y también para el mantenimiento de ciertos complejos con integrinas y otras proteínas. Hasta el momento sólo se conoce la estructura cristalográfica del dominio EC2 de **CD81** humana¹⁶ y los resultados de métodos predictivos parecen indicar que las restantes tetraspaninas presentan dominios EC2 con características comparables¹⁷ (**Figura 1B**), pero no se dispone de información estructural acerca de los dominios transmembrana ni de los extremos intracitoplasmáticos.

Algunas tetraspaninas se encuentran distribuidas en prácticamente todos los tipos celulares (**CD9**, **CD81**), mientras que otras muestran un patrón de expresión más restringido (**CD53** en el linaje linfocitoide-mieloide, **CD37** en linfocitos B, uroplaquina en el epitelio de la vejiga y **RDS** en la retina)^{18,19}. Se caracterizan por formar parte de complejos multimoleculares en la superficie celular, dando lugar a la llamada "red de tetraspaninas"²⁰⁻²³. Dichos complejos están compuestos por diferentes moléculas de tetraspaninas asociadas a receptores, integrinas, proteoglicanos, lípidos, factores de crecimiento y proteínas involucradas en la transducción de señales y la presentación antigénica, entre otras funciones^{4,12,18,23} (**Tabla 2**). Algunas de estas interacciones son comunes a muchas de ellas, mientras que otras están restringidas a una

determinada tetraspanina (como es el caso del complejo **CD81-CD19-CD21** en linfocitos B y del complejo **CD9-CD36** en plaquetas)¹⁸. Se postula que las “unidades fundamentales” dentro de la “red de tetraspaninas” son los homodímeros tetraspanina-tetraspanina, a partir de los cuales se ensamblarían las restantes moléculas. En la formación de dichos homodímeros participarían ciertas secuencias dentro del loop grande, así como regiones proximales a la membrana y transmembrana, formando una “interface de dimerización”^{24,25}. Se han detectado tres niveles de interacción dentro de la “red de tetraspaninas”^{4,21,22}: el primero de ellos corresponde a las interacciones directas, las cuales persisten luego de la extracción con detergentes fuertes como Tritón X-100 y digitonina (interacciones con ciertas integrinas, por ej.), por lo cual serían independientes de lípidos y se forman tempranamente durante la biosíntesis (en el retículo endoplásmico); el segundo nivel corresponde al ensamblado entre complejos primarios a través de interacciones tetraspaninas-tetraspaninas, ocurren tardíamente durante la biosíntesis (en el Golgi o post-Golgi), se encuentran en un ambiente de colesterol, son disociados por Tritón X-100 pero son estables en detergentes relativamente hidrofóbicos como Brij96 y Brij97; el tercero corresponde a interacciones más lábiles e indirectas sólo detectadas en presencia de detergentes débiles como CHAPS. Esta capacidad de asociarse con otras moléculas, determina que las tetraspaninas estén involucradas en una gran variedad de procesos biológicos, dependiendo del tipo celular y de la naturaleza de las moléculas asociadas a ellas. Al respecto, se ha demostrado su participación en el desarrollo, activación, proliferación, diferenciación, adhesión, motilidad e invasión celular²⁶⁻²⁹, en la fusión de membranas, la fertilización del óvulo y en los sistemas nervioso e inmune^{23,30-32}. El modelo más aceptado de acción de las tetraspaninas postula que éstas actuarían como “organizadoras” de complejos multimoleculares en la membrana celular: a) asociándose a diferentes proteínas de superficie (y transmitiendo a la vez señales laterales) mediante sus dominios extracelulares (principalmente mediante EC2), y b) reclutando proteínas involucradas en la

transducción de señales intracelulares mediante sus dominios transmembrana e intracitoplasmáticos, conformando microdominios de membrana^{4,18,21} donde se regulan diferentes procesos celulares como la activación, la motilidad y la presentación antigénica^{18,33,34}. Por lo tanto, las tetraspaninas actuarían como “puente” entre la maquinaria receptora y transductora de señales celular. Como evidencia de ello, puede citarse que el reconocimiento de las tetraspaninas **CD9**, **CD53**, **CD81** y **CD82** por anticuerpos específicos conduce a la fosforilación de proteínas en tirosina, a la movilización del Ca^{2+} y al aumento en los niveles intracelulares de diacilglicerol y fosfoinositoles^{4,18}. Por otra parte, se postula también que estas proteínas podrían actuar no sólo como conectores sino también como barreras, “secuestrando” distintos componentes e impidiendo de este modo una señalización inadecuada⁴. Al respecto, se acepta que la compartimentalización de varios tipos de receptores de superficie en microdominios de membrana especializados es de suma importancia para el control de la señalización³⁵. En el caso particular de las tetraspaninas, se las ha encontrado presentes tanto en aquellos dominios ricos en esfingolípidos y colesterol denominados “rafts”³⁶, como en dominios que no corresponden a raft^{33,37-39}, pudiendo aparentemente trasladarse de uno a otro tipo de dominio, controlando de este modo el reclutamiento de ciertas proteínas en cada uno de ellos. Estas funciones serían facilitadas por los ácidos grasos unidos covalentemente a las tetraspaninas¹⁰. Por otra parte, se está aceptando que las tetraspaninas forman un tipo particular de microdominio de membrana (“microdominio enriquecido en tetraspaninas”), con características similares a los “rafts”, pero donde, a diferencia de estos últimos, prevalecen las interacciones “proteína-proteína”^{22,23}. Asimismo, se postula que las tetraspaninas no sólo se comportarían como “proteínas de andamiaje”, favoreciendo el acercamiento de las moléculas efectoras, sino que desempeñarían un rol más activo en los procesos en los que se encuentran involucradas, participando activamente en la modulación de las vías de señalización^{4,18,33}. En relación a esto último, se están comenzando a dilucidar

las funciones específicas de las tetraspaninas, mediante estudios que involucran la expresión ectópica de estas moléculas en líneas celulares y mediante el análisis de los defectos biológicos causados por la deficiencia de las mismas, tanto en ratones *knock-out* para los genes que las codifican como en individuos con patologías genéticas asociadas⁴⁰. Se ha demostrado de este modo la importancia de las tetraspaninas en ciertos casos de retardo mental asociado al cromosoma X (TM4SF2)⁴¹, defectos visuales y ceguera (RDS y ROM1)^{42,43}, en la infección con *Plasmodium* (CD81)⁴⁴, y varios tipos de virus, en patologías asociadas con la disfunción plaquetaria (CD63)⁴⁵ y en la progresión tumoral⁴⁰. Asimismo, se postula que las tetraspaninas podrían actuar como receptores de proteínas solubles o de proteínas de membrana en células opuestas. Al respecto, hasta la fecha sólo se han encontrado ligandos naturales para las tetraspaninas CD9 y CD81^{30,46,47}. Sin embargo, en líneas generales, los defectos causados por la ausencia de una tetraspanina son menores a los esperados teniendo en cuenta su participación en tan amplio espectro de funciones celulares. Esto se debe a que se ha observado que las tetraspaninas desempeñan funciones tanto específicas⁴⁸ como redundantes, pudiendo una de ellas sustituir funcionalmente a otra⁴⁹.

Esta familia fue por primera vez descrita como tal en los años 90, cuando se detectó homología entre moléculas recientemente clonadas con otras que habían sido descritas una década atrás utilizando anticuerpos monoclonales. Su reciente descubrimiento contrasta con su antigüedad evolutiva, ya que las tetraspaninas se expresan tanto en mamíferos como en invertebrados como *Drosophila*, *Schistosoma*, *Caenorhabditis elegans* y algunas especies de hongos, lo cual, sumado a la conservación de la estructura génica entre los miembros de la familia y a la localización de los genes en diferentes cromosomas (principalmente los cromosomas 11 y 12 en humanos), sugiere que estas moléculas se habrían originado a partir de un ancestro común, por duplicación^{40,50,51}.

1.2 Tetraspaninas en infecciones virales

Se ha detectado la participación de varias tetraspaninas en procesos de infección viral. En los casos estudiados, se observó que la incubación con anticuerpos anti-tetraspaninas inhibía la infección y/o la producción de partículas virales. Con respecto a **CD63**, existen evidencias recientes que sugieren un rol activo para esta tetraspanina en la infección de macrófagos con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Al respecto, se propone que esta tetraspanina actuaría como co-receptor del virus, junto al receptor de quemoquinas CCR5⁵². Por otra parte, se observó la participación de **CD9** en la infección con el virus de la inmunodeficiencia felina (VIF)⁵³. En el caso de **CD82**, se detectó un aumento de su concentración en linfocitos T luego de la infección con el retrovirus humano causante de leucemia de células T de tipo 1 (VTLH-1)⁵⁴. Dicho aumento en la concentración estaría relacionado con un efecto inhibitorio de la tetraspanina sobre la transmisión del virus, la cual depende fundamentalmente de contactos célula-célula. De este modo, **CD82** desempeñaría un rol dual en la infección: en primer lugar facilitaría la entrada del virus mediante la interacción con glicoproteínas de envoltura del virus, pero por otra parte reduciría su transmisión⁵⁵. **CD81** también se encuentra involucrado en la infección por VTLH-1, lo cual está relacionado con la asociación entre **CD81** y **CD82** en linfocitos T⁵⁴. Por otra parte, se detectó que **CD81** actúa como receptor para el virus de la hepatitis C (VHC)⁵⁶.

1.3 Tetraspaninas y motilidad celular

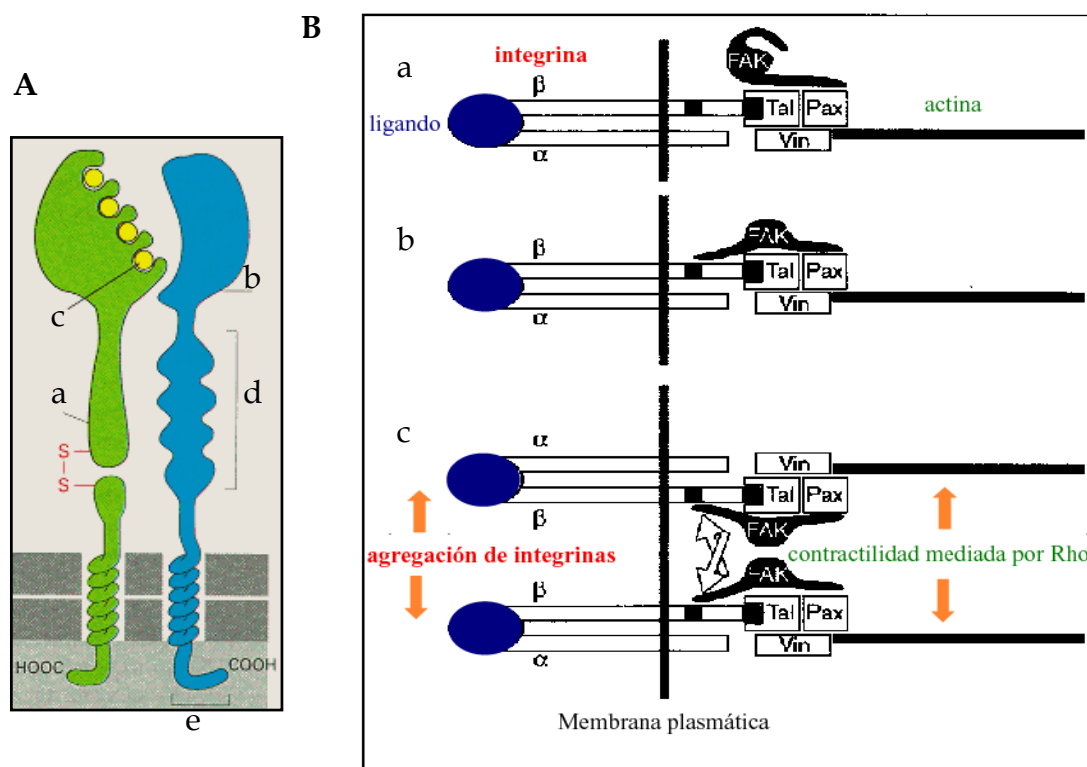
1.3.1 Integrinas

Estas moléculas constituyen un amplio grupo de heterodímeros $\alpha\beta$ de superficie celular (**Figura 2A**). Las subunidades consisten en glicoproteínas transmembrana que se encuentran asociadas no covalentemente a nivel de sus dominios extracelulares. La subunidad β presenta residuos de Cys involucrados en la formación de cuatro puentes disulfuro, mientras que en la subunidad α se encuentran sitios de unión a cationes bivalentes como Ca^{2+} . Desempeñan un rol crucial en la adhesión, migración, diferenciación y proliferación celular, gracias a sus interacciones con la matriz extracelular (MEC) y con proteínas de superficie de otras células y a su participación en la transducción de señales que conducen a rearrreglos en el citoesqueleto y a la proliferación y diferenciación celular⁵⁷⁻⁵⁹. Son proteínas mediadoras, por lo tanto, del contacto célula-célula y célula-matriz.

La motilidad celular constituye un proceso complejo, el cual es influido por la naturaleza de la MEC, la presencia de factores de crecimiento, proteasas y otros componentes, y por el patrón de expresión y estado de activación de los receptores de la superficie celular⁶⁰. Luego de la unión con el ligando de matriz (fibronectina, vitronectina, colágeno, etc.), las **subunidades β_1** y las que forman complejos con α_v tienen la capacidad de promover el ensamblado de complejos de proteínas (talina, paxilina, vinculina) en la zona de contacto con la MEC denominados “adhesiones focales” (**Figura 2B**) y de activar a la quinasa de adhesión focal (FAK), la cual desencadena una cascada de señales intracelulares que conducen a la reorganización del citoesqueleto y a la estimulación de la transcripción de genes involucrados en la proliferación celular. A su vez, la agregación de las integrinas conduce a la activación de la vía de las MAP quinasas y a la consiguiente progresión en el ciclo celular. En este sentido, las

vías de señalización de integrinas y de factores de crecimiento se encuentran interconectadas en varios niveles⁵⁹.

FIGURA 2. Integrinas: Estructura y modelo de activación



A. Estructura de una integrina. **a.** cadena α ; **b.** cadena β ; **c.** catión bivalente; **d.** dominios ricos en Cys; **e.** unión al citoesqueleto.

B. Modelo de activación de integrinas. **a.** La unión del ligando a la integrina promueve la interacción de la subunidad β con la talina (Tal), y, a través de ella, con vinculina (Vin) y paxilina (Pax). Vinculina y paxilina interactúan con el citoesqueleto de actina. La quinasa de adhesión focal (FAK) es reclutada al complejo naciente e interactúa con paxilina y talina. **b.** FAK sufre un cambio conformacional que le permite interactuar con un segmento de la cadena β de la integrina. **c.** La agregación de las integrinas, promovida por la unión de sus ligandos, permite la oligomerización de FAK, la cual se activa por trans-autofosforilación, y esto conduce a la transducción de señales que permiten finalmente la contractilidad celular mediada por la quinasa Rho.

Modificado de *Curr. Op. Cell Biol.* 9:691-700, 1997.

Con respecto a las **integrinas β_2** , éstas son específicas de leucocitos y entre ellas se destacan las integrinas $\alpha_1\beta_2$ /CD11aCD18/LFA-1 y $\alpha_M\beta_2$ /CD11bCD18/Mac-1. Estas integrinas reconocen proteínas de membrana de la superfamilia de las inmunoglobulinas (ICAM-1, ICAM-2, VCAM) y median de este modo la adhesión célula-célula.

1.3.2 Asociación Tetraspaninas-Integrinas

Por medio de microscopía electrónica e inmunoprecipitación, se demostró la colocalización de varias integrinas con tetraspaninas en distintos tipos celulares^{4,12} (**Tabla 2**). En algunos casos, la asociación entre tetraspaninas y ciertas integrinas ($\alpha_3\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$) se detecta en todos los tipos celulares donde las proteínas están co-expresadas, mientras que en el caso de otras integrinas ($\alpha_2\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_6\beta_4$), los complejos sólo se observan en determinados tipos celulares. Los complejos tetraspaninas-integrinas se detectan en la mayoría de los casos en presencia de detergentes suaves (interacción de nivel 3), pero existen algunos complejos directos (detectados en presencia de detergentes fuertes, interacciones de nivel 1), como **CD151**- $\alpha_3\beta_1$, **CD151**- $\alpha_6\beta_1$ y **CD81**- $\alpha_4\beta_1$ ^{61,62}. Por otra parte, se comprobó que la región que comprende las Cys dentro del loop extracelular grande de **CD151** es necesaria y suficiente para mantener el complejo con $\alpha_3\beta_1$, pero no es indispensable para mantener las interacciones con otras tetraspaninas¹², y la porción de integrina involucrada en el complejo es la porción extracelular de α_3 ⁶³. Es también destacable que la asociación de **CD82** con $\alpha_3\beta_1$ y $\alpha_5\beta_1$ depende del estado de glicosilación tanto de la tetraspanina como de la integrina⁷. Dado que el grado de glicosilación de **CD82** varía en distintos tipos celulares, esto podría representar un mecanismo de control tejido-específico que regularía el ensamblado de dichos complejos¹².

Se han detectado complejos tetraspaninas-integrinas tanto en dominios rafts como no-rafts³³.

Las evidencias actuales parecen indicar que la contribución de las tetraspaninas a la adhesión firme a la MEC dependiente de integrinas es prácticamente nula. Los datos con los que se cuenta incluyen la falta de resultados positivos sobre la influencia de las tetraspaninas en la afinidad de las integrinas por sus ligandos de matriz o sobre la agregación de las integrinas o su unión a proteínas del citoesqueleto, los cuales constituyen eventos clave en la interacción célula-MEC. Además, los complejos con tetraspaninas están ausentes de las adhesiones focales (no co-localizan con vinculina y paxilina), estructuras imprescindibles para la adhesión firme a la matriz⁵⁹. Contrariamente, existen numerosos trabajos que describen la participación de las tetraspaninas en las interacciones célula-célula^{26,64}.

Por otra parte, se encuentra ampliamente documentada la injerencia de las tetraspaninas en la motilidad celular. Al respecto, se detectó la asociación de las integrinas $\alpha_3\beta_1$ con las tetraspaninas **CD9**, **CD63**, **CD81** y **CD82** en complejos de adhesión abundantes en la periferia de las extensiones celulares (lamelipodios y filopodios) de células de melanoma, miosarcoma, carcinoma de mama y endoteliales^{65,66}, y en algunos tipos celulares actúan regulando la formación de dichas extensiones⁶⁷. Los complejos de adhesión median las interacciones dinámicas célula-MEC consistentes en ciclos de adhesión-despegado esenciales para la migración celular y anteriores a la adhesión firme sobre un sustrato. Como se mencionó anteriormente, las tetraspaninas se encuentran ausentes de las adhesiones focales, pero sí se encuentran co-localizando con talina y con FAK. Tanto talina como FAK son reclutadas en los complejos de adhesión con anterioridad a vinculina y paxilina, por lo que se supone que las tetraspaninas están presentes en dichos complejos sólo en su etapa inicial, disociándose de ellos cuando vinculina y paxilina se unen a ellos. Por todo lo expuesto, se propone que los complejos con tetraspaninas no regularían la adhesión firme a la matriz en las células estáticas, sino que

participarían en la organización del citoesqueleto en la periferia celular durante la extensión de los lamelipodios y filopodios, afectando de este modo la migración celular.

A su vez, existen evidencias que indican que las tetraspaninas actúan modulando la señalización intracelular de las integrinas. Al examinar la influencia de las tetraspaninas sobre la fosforilación de FAK (un punto clave en la vía de señalización de las integrinas), se observó que la agregación de las tetraspaninas en la superficie celular potenciaba la fosforilación de FAK inducida por la adhesión de las células a una matriz; en cambio, en células despegadas de dicha matriz se potenciaba su defosforilación⁶⁵. Estos efectos moduladores sobre la señalización de las integrinas estarían involucrando a las enzimas asociadas a los complejos integrinas-tetraspaninas, como las tirosín-fosfatasas y la fosfatidilinositol 4-kinasa (PI-4K) tipo II⁶⁸. Dado que los fosfoinosítidos son potentes efectores de la polimerización de la actina, la asociación entre $\alpha_3\beta_1$, las tetraspaninas **CD63** y **CD81** y la PI-4K, desempeñaría un rol importante en la reorganización del citoesqueleto necesaria para la migración celular. Por otra parte, la asociación de las tetraspaninas con las integrinas parece ser fundamental para el reclutamiento de PI-4K^{65,66}. También se detectó la asociación de las tetraspaninas **CD9**, **CD81**, **CD82** y **CD151** con miembros de la familia de PKC (PKC α y PKC β II) y al igual que en el caso de la PI-4K, las tetraspaninas son responsables de su reclutamiento en los complejos con integrinas ($\alpha_3\beta_1$ y $\alpha_6\beta_1$). La fosforilación de la subunidad α_3 dependiente de PKC es justamente crítica para la migración celular y para la señalización desencadenada luego de la adhesión^{69,70}.

Con respecto a la asociación de las tetraspaninas con las integrinas β_2 , cabe destacar la asociación de **CD63** con las integrinas $\alpha_M\beta_2$ /CD11bCD18 en la superficie de los neutrófilos. Además, se ha detectado la presencia en dichos complejos de las Tyr-quinásas Lyn y Hck, miembros de la familia Src y de otras

Ser/Thr quinasas, las cuales desempeñan un rol importante en la activación de las β_2 integrinas en dicho tipo celular³⁸.

1.3.3. Tetraspaninas y metástasis

La transformación maligna de una célula está asociada a cambios en la adhesión celular y la motilidad. Como ya se ha mencionado, entre las moléculas involucradas en estos procesos sobresalen las integrinas, las cuales han sido ampliamente involucradas en el desarrollo tumoral, invasión y metástasis^{71,72}. Por otra parte, la asociación de estas moléculas con las tetraspaninas, supone para estas últimas el desempeño de un rol importante en estos procesos⁷³. Las tetraspaninas ejercerían un efecto sobre las integrinas, llevando a alteraciones en las propiedades adhesivas y migratorias de las células, lo cual podría modificar su potencial metastásico.

En particular, las tetraspaninas **CD9**, **CD63** y **CD82** han sido descritas como “supresores tumorales”, ya que su expresión se ha visto disminuida en células tumorales en comparación con las células normales^{60,73}. La tetraspanina **CD63** se expresa en alto grado durante los estadios tempranos de melanoma, pero su expresión disminuye en estadios avanzados⁷⁴. Del mismo modo, la expresión de **CD82** disminuye durante la progresión tumoral de cáncer de próstata, pulmón, páncreas y colon⁷⁵⁻⁷⁸. Por otra parte, la transfección de **CD9** o **CD63** en células de melanoma produce una reducción del potencial metastásico de dichas células^{79,80}. También se ha observado una correlación inversa entre la expresión de **CD9** en tumores primarios y la aparición de metástasis en melanoma y cáncer de colon, pulmón y mama⁸¹⁻⁸³. Por estas razones, el nivel de expresión de estas proteínas puede correlacionarse con el estadio de la progresión tumoral y puede ser utilizado como factor de pronóstico.

1.4 Tetraspaninas y presentación antigénica

Existen evidencias que sugieren la participación de las tetraspaninas en el procesamiento y la presentación antigénica en el contexto de las moléculas MHC de clase II (MHCII). Dichas moléculas se cargan con péptidos derivados de antígenos internalizados y degradados, en los compartimentos **MIIC** (compartimentos endocíticos tardíos, multivesiculares, ricos en moléculas MHCII), en células presentadoras de antígenos (CPA) como linfocitos B, **células dendríticas** y macrófagos. Se encontró que las tetraspaninas **CD63** y **CD82** están enriquecidas en las membranas internas de los **MIICs** en linfocitos B, donde se asocian con moléculas MHCII, (HLA-DR, -DM y -DO)⁸⁴⁻⁸⁶. Una vez cargadas con péptidos, las moléculas MHCII son transportadas a la superficie celular, donde también se las encuentra asociadas a tetraspaninas⁸⁷. Recientemente, se ha sugerido que los complejos tetraspaninas-MHCII forman microdominios distintos de los “rafts”, portan un repertorio selecto de péptidos y están enriquecidos en la molécula co-estimuladora CD86 y la molécula “editora” de péptidos HLA-DM. Estos microdominios actuarían agrupando las moléculas MHCII y facilitando de este modo la interacción de MHCII con el receptor TCR de los linfocitos T. En efecto, se ha observado que **CD81** se redistribuye al sitio de la interacción MHC-TCR (“sinapsis inmunológica”) tanto en linfocitos B como en linfocitos T^{88,89}.

Los compartimentos **MIIC** pueden alternativamente fusionarse con la membrana plasmática, liberándose las vesículas intracelulares en forma de exosomas⁹⁰. Dichos exosomas expresan moléculas MHCII cargadas con péptidos y moléculas co-estimuladoras, se encuentran también enriquecidos en tetraspaninas (**CD63**, **CD81** y **CD82**) y son capaces de estimular células T *in vitro*^{85,91,92}.

Las tetraspaninas podrían también participar en la endocitosis y el tráfico intracelular de las moléculas MHCII y/o de otras moléculas de superficie,

gracias a la señal de localización lisosomal que portan algunas de ellas. En efecto, se observó que la tetraspanina **CD82** es capaz de internalizarse desde la superficie de células B hacia los MIICs⁸⁴. Por otra parte, sería significativa la asociación de las tetraspaninas con la PI4-K tipo II, ya que algunas clases de esta enzima son importantes para el transporte de vesículas desde el Golgi y para la reorganización del citoesqueleto⁹³.

1.5 Tetraspaninas CD9, CD63, CD81, CD82 y CD151

1.5.1 CD9

La principal evidencia de una función no redundante asociada a esta tetraspanina proviene de ratones *knock-out* para su gen codificante^{30,94,95}. En ellos se observó que las hembras mutantes homocigotas CD9 *-/-* resultaban infértiles debido a una falla en la fusión de membranas entre las gametas. Los ratones normales presentan una elevada expresión de esta tetraspanina en los ovocitos y el efecto observado fue en un principio atribuido a la asociación de CD9 con la integrina $\alpha_6\beta_1$. Pero más tarde se observó que en ratones deficientes en dicha integrina la fertilización es normal, lo cual sugiere un mecanismo no asociado a integrinas para la acción de CD9 en este contexto⁹⁶. Este descubrimiento constituyó la primera evidencia clara del rol de una tetraspanina en la funcionalidad celular, en este caso en la fusión óvulo-espermatozoide. El ligando de CD9 resultó ser, en ratones, la glicoproteína específica del embarazo 17 (PSG17), que constituye el primer ligando hallado para una tetraspanina⁹⁷. Asimismo, se observó que la infertilidad de dichos ratones puede ser revertida por la introducción de CD9 humano, lo cual sugiere la contribución de esta molécula en la fertilización humana⁹⁴. Se observó que, al igual que **CD81**, CD9 se encuentra también involucrada en la fusión de miocitos y monocitos^{98,99}.

Por otra parte, se asocia con la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ en plaquetas, induce la estimulación de fosfolipasa A2 y fosfolipasa C y conduce a la activación y agregación plaquetaria, al igual que **CD63** y **CD151**^{100,101}.

Participa en la unión de la toxina diftérica¹⁰² y de factores mitogénicos¹⁰³ y en la activación de linfocitos T¹⁹, lo cual podría relacionarse con su asociación directa con las proteínas EWI, pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas¹⁰⁴.

Es considerada una proteína supresora tumoral, al igual que **CD63** y **CD82**, en ciertos tipos tumorales⁶⁰.

Se ha demostrado recientemente que la disminución en la expresión de superficie de **CD9** y **CD151** en células endoteliales provoca la reducción en la expresión de las moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1 (descriptas en 2.2.2.1), lo cual señala la participación de las tetraspaninas en la expresión de otras moléculas de superficie¹⁰⁵.

El gen que la codifica se localiza, en humanos, en el cromosoma 12¹⁰⁶.

1.5.2 CD63/Lamp-3/ME491

Fue la primer tetraspanina en ser caracterizada a nivel de su estructura primaria, en 1988¹⁰⁷. Se encuentra presente en los lisosomas de diversas células, como células de melanoma^{80,108}, **células dendríticas**¹⁰⁹ y macrófagos¹⁰⁸, por lo que también se la conoce como la proteína de membrana asociada a lisosomas-3 (lamp-3)¹¹⁰. Se localiza asimismo en vesículas secretorias, como los gránulos de basófilos¹¹¹, neutrófilos³⁸ y eosinófilos¹¹², gránulos α de plaquetas¹¹³, gránulos secretorios de linfocitos T citotóxicos¹¹⁴ y cuerpos de Weibel-Palade de células endoteliales¹¹⁵, redistribuyéndose en la membrana plasmática luego de la activación de dichas células¹¹⁶⁻¹¹⁸. Al igual que **CD82**, contiene una secuencia de localización lisosomal en el extremo -COOH terminal, lo cual le permite ciclar entre la membrana plasmática y los lisosomas¹¹⁷. Por otra parte, se observó que **CD63** también participa en la internalización y/o degradación en lisosomas de

otras proteínas de membrana, como fosfatasa y metaloproteinasas de matriz^{119,120}.

Al igual que **CD9** y **CD151**, constituye un antígeno activador de plaquetas, conocido también con el nombre de granulofisina⁴⁵. En neutrófilos, fue hallada formando complejos con la integrina $\alpha_M\beta_2$ y está involucrada en la activación de dichas células y en su adhesión al endotelio³.

Se la considera una proteína supresora tumoral^{121,122} al igual que **CD9** y **CD82**, y fue descrita inicialmente como el antígeno asociado a melanoma ME491¹⁰⁷. En varias líneas tumorales se la encontró asociada a las integrinas $\alpha_3\beta_1$ y $\alpha_6\beta_1$ ¹²³.

Su deficiencia se asocia en humanos con el síndrome de Hermansky-Pudlak, un desorden autosómico recesivo caracterizado por defectos en los lisosomas, melanosomas y gránulos densos de plaquetas, el cual provoca albinismo y hemorragias entre otros síntomas^{45,124}. Por otra parte, se postula que actúa como co-receptor en la infección de macrófagos por VIH⁵².

Al igual que **CD82**, desempeñaría un rol importante en la presentación antigénica, dada su presencia en compartimentos MIIC y exosomas de linfocitos B⁸⁴⁻⁸⁶. A su vez, se observó la inducción de la expresión de CD63 en la superficie de los linfocitos T activados, participando en la transducción de señales que permiten sostener y amplificar la activación de estas células. Esta actividad co-estimuladora de CD63 sería posible gracias a su asociación con PI3K¹²⁵.

El gen que la codifica se localiza, en humanos, en el cromosoma 12¹²⁶.

1.5.3. CD81/TAPA-1

La participación de esta tetraspanina es particularmente destacable en el sistema inmune. Uno de los complejos característicos en los que se encuentra presente es el constituido por las moléculas CD19, CD21 y Leu-13, en la superficie de los linfocitos B¹²⁷, el cual resulta de fundamental importancia para la activación de dichas células. CD81 contribuye a la reorganización de la

membrana y la estabilización de los complejos de señalización en respuesta a la estimulación de los linfocitos B. Asimismo, la presencia de CD81 es crucial para el mantenimiento de niveles normales de CD19, ya que en ratones *knock-out* para CD81 se observó que la expresión de CD19 en células B era prácticamente nula^{128,129}. El efecto de CD81 ocurre a nivel post-traduccional y se observó que la expresión del dominio EC2 es suficiente para la expresión normal de CD19²³. Este ejemplo constituye un argumento adicional a favor de la participación de las tetraspaninas en la expresión de superficie de otras moléculas, lo cual también fue observado para **CD9** y **CD151** en otro contexto. En este caso particular, CD81 se comporta como chaperona durante el transporte de CD19 y actúa también estabilizando a dicha molécula en la membrana celular.

Se asocia a su vez con CD4, CD8 y **CD82** en linfocitos T, localizándose en el sitio de la “sinapsis inmunológica”⁸⁹ luego de la activación de los linfocitos. Por otra parte, se observó que la expresión en membrana de CD81 es esencial para el desarrollo de una respuesta inmune de tipo T helper 2 luego de la interacción linfocito T-linfocito B¹³⁰.

Con respecto a su participación en la patogenia de enfermedades humanas, esta tetraspanina está involucrada en la infección por *Plasmodium falciparum*, causante de malaria, y VHC^{44,56}. Al respecto, se observó que CD81 es necesario para la unión del VHC, pero no suficiente para que se produzca la infección, siendo requeridos otros receptores aún no descriptos¹³¹.

Al igual que **CD9**, se asocia en forma directa con proteínas EWI, las cuales influirían en el efecto de **CD81** sobre la activación de los linfocitos¹³². También, como **CD9**, participa en la fusión de miocitos y monocitos^{98,99}. Asimismo, se observó que la incorporación de **CD81** en ratones infértiles CD9-/-, revierte el defecto en la fertilización, lo cual constituye un claro ejemplo de la capacidad de una tetraspanina de reemplazar funcionalmente a otra⁴⁹. Por otra parte, se observó que ciertas cepas de ratones *knock-out* para CD81 presentan también defectos en la fusión óvulo-espermatozoide¹³³.

El gen que la codifica, se localiza, en humanos, en el cromosoma 11¹³⁴.

1.5.4. CD82/KAI1

Se destaca por su asociación con **CD81**, CD4, CD8 y otros co-receptores en la superficie de los linfocitos T^{54,135}, redistribuyéndose hacia la “sinapsis inmunológica” luego de la activación²⁷. Se la considera una proteína supresora tumoral, al igual que **CD9** y **CD63**⁸.

Del mismo modo que **CD63**, desempeñaría un rol importante en la presentación antigénica⁸⁴⁻⁸⁶.

El gen que la codifica, se localiza, en humanos, en el cromosoma 11¹³⁶.

1.5.5 CD151/PETA3

Esta tetraspanina está involucrada en la activación y agregación plaquetaria, al igual que **CD9** y **CD63**. Se la conoce también como el antígeno 3 asociado a plaquetas y células endoteliales, PETA3⁶⁴. Se destaca por su asociación estable con aproximadamente el 100% de las integrinas $\alpha_3\beta_1$ en varias líneas celulares⁶³. En forma concordante, la formación de este complejo resulta de fundamental importancia en el crecimiento neuronal³¹. La asociación con la integrina $\alpha_6\beta_1$ se relaciona con la capacidad de **CD151** de regular la morfología celular en varios tipos celulares¹³⁷. También se la encontró asociada a la integrina $\alpha_6\beta_4$ en hemidesmosomas¹³⁸, en la superficie basolateral de queratinocitos, donde no fueron halladas las tetraspaninas **CD9** y **CD81**, lo cual estaría sugiriendo un rol específico para CD151 en este contexto.

Como en el caso de **CD9**, se observó que la disminución en su expresión de superficie en células endoteliales, afecta la expresión de las moléculas de adhesión ICAM-1 e ICAM-2¹⁰⁵.

Constituye la primer tetraspanina en ser detectada en eritrocitos¹³⁹. Se observó que pacientes que presentan una forma truncada de esta proteína presentan nefritis y una forma leve de talasemia. Se demostró que CD151 es

esencial para el ensamblado correcto de la membrana basal en el riñón y podría desempeñar un rol en la eritropoyesis¹³⁹.

El gen que la codifica, se localiza, en humanos, en el cromosoma 11¹⁴⁰.

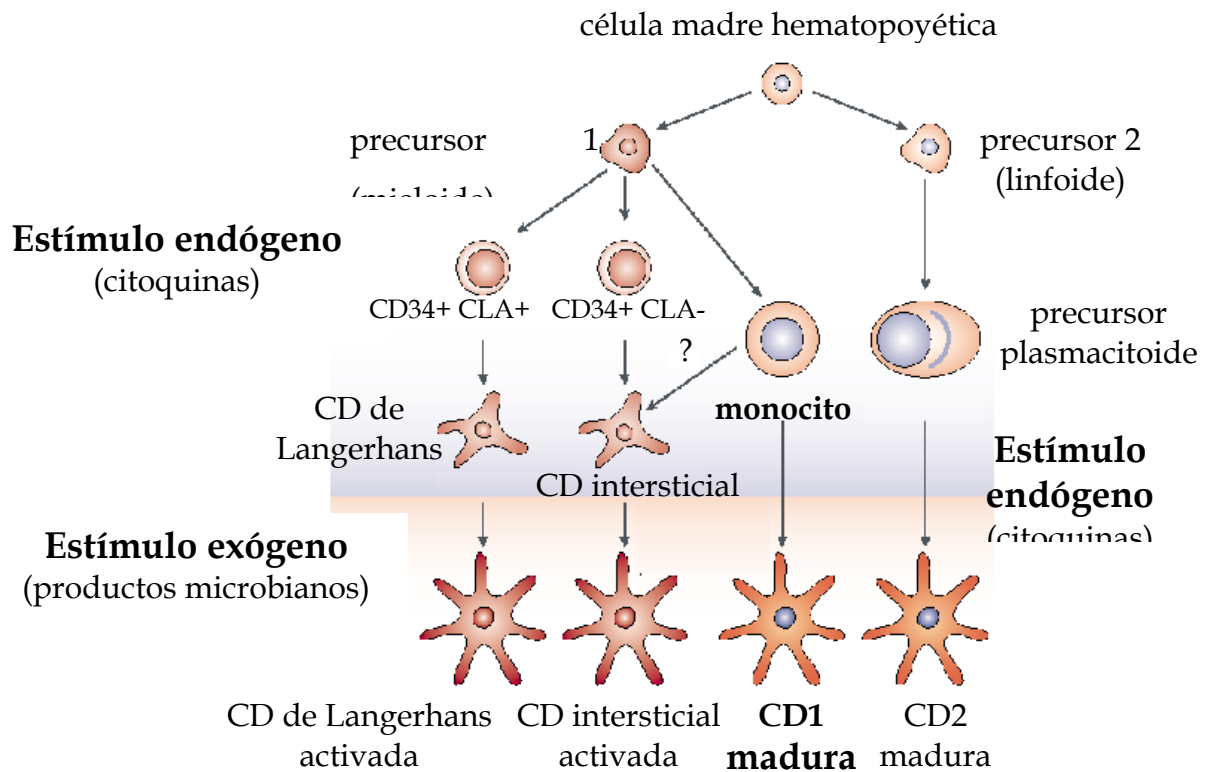
2. Células Dendríticas

2.1 Características generales

Las **células dendríticas (CDs)**^{141,142,143} constituyen las principales CPA del organismo, ya que desempeñan un rol fundamental en la iniciación y regulación de la respuesta inmune celular (mediada por linfocitos T) y humoral (mediada por linfocitos B)¹⁴⁴. Representan aproximadamente el 0,5% de la población sanguínea circulante de leucocitos y del 1 al 2% de la población celular de los tejidos periféricos, encontrándose fundamentalmente en los sitios de contacto con el ambiente (piel y mucosas). Deben su nombre al gran número de protrusiones o dendritas que caracterizan su morfología¹⁴⁵.

Pueden originarse a partir de más de un tipo de precursor: un precursor mieloide (generador del linaje monocito-macrófago) que da lugar a una progenie CD11c+ y un precursor linfoide que da lugar a CDs plasmacitoides (CD123+)^{143,146,147} (**Figura 3**). A su vez, diferentes tipos funcionales de CDs pueden generarse a partir de un mismo precursor. Los monocitos de sangre periférica pueden diferenciarse a CDs en presencia de citoquinas como el factor estimulador de colonias granulocito-monocito (GM-CSF) e interleuquina-4 (IL-4)¹⁴⁸, un proceso que puede ser acelerado por la migración de los monocitos a través del endotelio vascular (transmigración endotelial)^{149,150}. Por otra parte, existen precursores hematopoyéticos CD34+ circulantes en sangre periférica que dan lugar a las células de Langerhans (CDs localizadas en la epidermis). Estos diferentes subtipos de CDs expresan marcadores diferentes que les otorgan propiedades distintivas. Sin embargo, parece existir consenso en que el rol inmunomodulador de la respuesta inmune desempeñado por las CDs depende fundamentalmente del estado de activación/maduración de las mismas, independientemente de su origen o subtipo¹⁵¹.

FIGURA 3. Linajes de células dendríticas humanas



CLA: antígeno linfocitario cutáneo. Modificado de *Nat. Rev. Immunol.* 2: 151-161, 2002

Existen en por lo menos dos estados de maduración, caracterizados por la expresión de distintos marcadores^{152,153} (**Figura 4A**): como CDs inmaduras presentan una elevada actividad endocítica y fagocítica, desempeñando el rol de “centinelas” del sistema inmune, “patrullando” los tejidos periféricos y capturando antígenos (Ags). Durante el proceso de maduración (inducido por citoquinas pro-inflamatorias, productos bacterianos como LPS, motivos de ADN o lípidos, colectivamente conocidos como “señales de peligro”¹⁵⁴, pierden gradualmente su capacidad de capturar Ags y modifican su perfil migratorio, trasladándose a los ganglios linfáticos y órganos linfoides secundarios, donde presentan los Ags incorporados en la periferia a los linfocitos T. Las CDs maduras presentan alta capacidad presentadora de Ags y estimuladora de

linfocitos T vírgenes presentes en los órganos linfoides secundarios. La progresión de CDs inmaduras a CDs maduras requiere de la activación del factor de transcripción NF- κ B^{155,156} y conlleva el aumento de la expresión en membrana de moléculas MHC de clase I y II (las cuales portan los Ags a ser presentados) y de moléculas co-estimuladoras de la presentación como CD40, CD80 y CD86. La maduración de las CDs puede inducirse in vitro exponiendo las células inmaduras a un estímulo inflamatorio como IL-1, TNF- α , CD40L o LPS¹⁵⁷.

2.2 Funciones específicas

2.2.1 Captura de antígenos

Las CDs, en su estado inmaduro, presentan una elevada capacidad de capturar Ags a través de diversos mecanismos: *macropinocitosis*, *endocitosis mediada por receptor* y *fagocitosis*¹⁵⁸. Durante el proceso de maduración, las CDs disminuyen su capacidad endocítica y fagocítica, limitando de este modo el espectro de Ags a presentar a aquellos capturados en el sitio donde recibieron la “señal de peligro” y por lo tanto el estímulo para madurar. Esta disminución de la internalización de Ags incluye tanto la reducción de la expresión de superficie de varios tipos de receptores como la inactivación de GTPasas involucradas en los mecanismos de endocitosis de fase fluida y fagocitosis¹⁵⁹.

La *macropinocitosis* o endocitosis de fase fluida, comprende la internalización de antígenos solubles, requiere de la reorganización del citoesqueleto y permite a las CDs la captura en forma rápida e inespecífica de grandes cantidades de fluidos circundantes.

La *endocitosis mediada por receptor*, en cambio, requiere, como su nombre lo indica, de la participación de receptores específicos y se inicia mediante una señal generada por la cola citoplasmática del receptor, la cual es reconocida por proteínas adaptadoras que reclutan clatrina, formándose de este

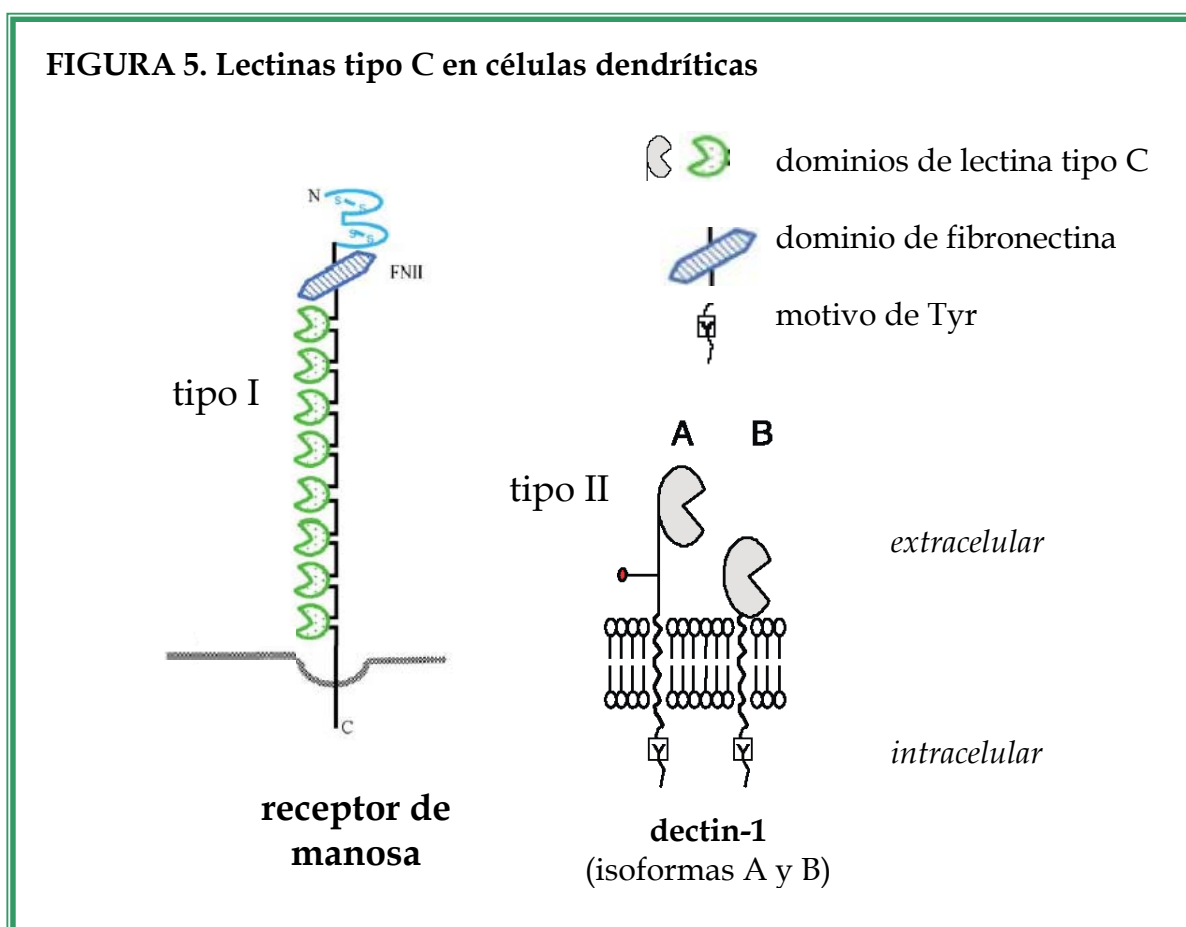
modo vesículas endocíticas recubiertas de clatrina. Entre los receptores expresados por las CDs inmaduras se encuentran receptores a la porción Fc de las inmunoglobulinas (FcγRII, FcαR), receptores de complemento (CR3, CR4), receptores de proteínas de shock térmico (hsp), receptores de cuerpos apoptóticos (CD36), receptores de componentes de bacterias (receptores tipo toll, TLR) y receptores de la familia de lectinas de tipo C (Ca²⁺ dependientes). La unión de ligandos a algunos de estos receptores de CDs activa el proceso de maduración de estas células, como es el caso de los receptores TLR (los cuales unen LPS de bacterias Gram negativas (TLR-4) y peptidoglicanos de bacterias Gram positivas (TLR-2), entre otros componentes de microorganismos), de los receptores de Fc de las inmunoglobulinas (los cuales permiten la captura de Acs y complejos inmunes) y de receptores de cuerpos apoptóticos y hsp.

La *fagocitosis* permite a las CDs la internalización de antígenos particulados y requiere de receptores específicos (en general los mismos requeridos por la endocitosis mediada por receptor), desencadenándose una cascada de señales necesaria para la polimerización de la actina, lo cual permite la efectiva invaginación de la membrana, que rodea a la partícula a ser capturada. La fagocitosis comprende tanto la internalización de patógenos como bacterias, virus, levaduras y parásitos, como la de cuerpos apoptóticos y cuerpos necróticos.

Se ha demostrado que diferentes subtipos de CDs expresan paneles diferentes de receptores de endocitosis/fagocitosis¹⁶⁰. Por otra parte, la unión de ligandos a los distintos receptores puede conducir al desarrollo preferente de una respuesta de linfocitos T helpers 1 (lo cual favorece la respuesta inmune celular) o de linfocitos T helpers 2 (lo cual favorece la respuesta inmune humoral).

2.2.1.1 Familia de lectinas tipo C en células dendríticas

Las lectinas de tipo C unen ligandos en forma Ca^{2+} dependiente y presentan uno (lectinas tipo II) o varios (lectinas tipo I) dominios de reconocimiento de carbohidratos, los cuales pueden conferir especificidades diferentes a los distintos receptores (**Figura 5**). Estas lectinas, como se explicó anteriormente, se expresan preferentemente en CDs inmaduras, coincidente con la elevada actividad endocítica/fagocítica de estas células. Entre las lectinas de tipo I se encuentran el **receptor de manosa (MR)** y el gp200MR6 (Dec-205 en ratones). Entre las de tipo II se encuentran la langerina (específico para células de Langerhans), el receptor de ICAM-3 no integrina específico de CDs (**DC-SIGN**) y **dectin-1**.



Son capaces de interactuar con motivos conservados compartidos por varios tipos de microorganismos y de internalizar a los mismos para su procesamiento y presentación antigénica. La mayoría de estas lectinas transporta los antígenos internalizados a lisosomas y MIICs, mientras que otras, como el **MR**, reciclan rápidamente a través de endosomas tempranos, asegurando de este modo la captura de grandes cantidades de antígenos^{159,160}.

El **MR** y la langerina reconocen especialmente carbohidratos de manosa, pero con especificidades diferentes, de acuerdo con la ramificación de las estructuras de manosa. El **MR** reconoce residuos de manosa, fucosa y N-acetilglucosamina terminales, polisacáridos como el dextrán y una gran variedad de antígenos de patógenos como levaduras^{161,162}.

DC-SIGN, por otra parte, reconoce preferentemente carbohidratos que contengan fucosa, aunque también es capaz de reconocer manosa. Al internalizarse luego de la unión de sus ligandos, alcanza, a diferencia del **MR**, endosomas tardíos y lisosomas y esto resulta en una eficiente presentación antigénica a los linfocitos T¹⁶³. Este receptor, a su vez está involucrado en la entrada de varios tipos de virus en las CDs y constituye el principal receptor de *Mycobacterium tuberculosis* en estas células¹⁶⁰. Asimismo, desempeña un papel fundamental en el proceso de “rolling” de las CDs sobre el endotelio vascular (descrito en 2.2.2.1) y también media la interacción CD-linfocito T a través de su interacción con ICAM-3¹⁶¹.

El gp200MR6¹⁶⁴ se expresa principalmente en CDs maduras y, al igual que **DC-SIGN**, alcanza los compartimentos MIIC al internalizarse junto con sus ligandos, lo cual asegura una eficiente presentación antigénica¹⁶⁵. Por otra parte, no ha sido aún descrito el espectro de carbohidratos que es capaz de reconocer¹⁶².

Dectin-1 es un receptor recientemente descubierto que reconoce β -1,3- y β -1,6- glucanos (como laminarina y zimosán), así como *S. cerevisiae* y *C. albicans* intactas. El ARN mensajero presenta 2 variantes de splicing, dando lugar a 8 isoformas, siendo las isoformas A y B (mayoritarias) las únicas funcionales para

la unión a β -glucanos¹⁶⁶⁻¹⁶⁸. Por otra parte, este receptor es capaz de unirse a linfocitos T (por medio de un sitio diferente al de reconocimiento de β -glucanos) y participaría en la transmisión de señales co-estimuladoras a dichas células¹⁶⁹. En efecto, se ha demostrado *in vitro* que dectin-1 es capaz de inducir la proliferación de linfocitos T helpers y citotóxicos y la producción de interferón γ ¹⁷⁰.

Al igual que DC-SIGN, **dectin-1** presenta un motivo de activación de Tyr en su cola citoplasmática (“motivo de activación de los inmuno-receptores”, el cual se fosforila luego de la activación del receptor, lo cual se postula que daría lugar a una cascada de señalización aún no descrita. Se ha observado que este tipo de receptores no actúa de forma independiente de otros receptores endocíticos/fagocíticos, sino que se ha detectado una “comunicación” entre los receptores Toll y los receptores de la familia de las lectinas tipo C con motivos de activación de Tyr. Tanto dectin-1 como TLR-2 se unen a la pared celular de las levaduras, pero reconociendo componentes diferentes, y la activación de ambos receptores da lugar a señales cooperativas que influyen sobre la respuesta inflamatoria: la señalización de dectin-1 potencia la producción de TNF- α e IL-12 inducida por TLR-2, promoviendo una respuesta inmune de tipo T helper 1; asimismo, la unión del LPS a TLRs desencadena la producción de radicales libres mediada por la señalización de dectin-1. Es decir que el reconocimiento de componentes de microorganismos por ambos tipos de receptores da lugar a cascadas de señalización que se potencian mutuamente y “cooperan” en la generación de una respuesta inmune efectiva contra los patógenos en cuestión^{169,171}. La expresión de varios tipos de receptores endocíticos/fagocíticos por las CDs permitiría la captura de un amplio espectro de antígenos, y, de acuerdo con la vía de señalización activada, se favorecería el desarrollo de respuestas inmunes de tipo T helper 1 ó T helper 2. Sin embargo, ciertos patógenos son capaces de interferir en la “cooperación” de señales, llevando incluso a la inmunosupresión¹⁶⁰.

2.2.1.2 Infecciones virales

Las CDs en su estado inmaduro constituyen, en líneas generales, las puertas de entrada para varios tipos de virus en el organismo. En muchos casos (como el del VIH), no sólo son capaces de capturar el virus sino que son responsables de su transmisión a otros tipos celulares¹⁶⁰. Esto es debido a la elevada capacidad endocítica y fagocítica de estas células, mediada por varios tipos de receptores ya descritos. Uno de los principales receptores involucrados en la captura de virus es el **DC-SIGN**, el cual permite la entrada de virus como el Ebola, el citomegalovirus, el VIH, el VHC y el virus del dengue¹⁶⁰. Se postula que la elevada eficiencia de reconocimiento de motivos moleculares asociados a patógenos por parte de este receptor, se debe a su localización en los microdominios de membrana conocidos como “rafts”, lo cual permitiría la “concentración” en determinadas zonas de la membrana celular de varias moléculas de dicho receptor¹⁷².

Como se comentó en 1.2, algunos miembros de la familia de las **tetraspaninas** participan en la entrada de virus (como VHC) a varios tipos celulares. Asimismo, se ha detectado la presencia de dichas proteínas en microdominios “rafts”. Sin embargo, hasta el momento no se ha descrito ninguna asociación entre **DC-SIGN** y algún miembro de la familia de las **tetraspaninas**.

2.2.1.2.1 Virus del dengue

El virus del dengue es un virus envuelto de RNA simple cadena, perteneciente a la familia de los arbovirus¹⁷³. Está compuesto por cuatro serotipos antigénicamente diferentes (1, 2, 3 y 4), todos ellos causantes de enfermedad en humanos. Las infecciones son en general leves, pero las complicaciones pueden provocar fiebre hemorrágica y síndrome de shock.

La infección es transmitida por un vector, el mosquito del género *Aedes*, el cual deposita el virus dentro de la piel de un individuo en el momento de la picadura. Este virus es capaz de infectar CDs inmaduras residentes en los tejidos periféricos, siendo su vía de entrada el receptor **DC-SIGN**. La infección es productiva en este tipo celular, dando lugar a viriones infectivos que se liberan al medio (sin causar lisis de las CDs) y transmiten la infección a células susceptibles¹⁷⁴.

2.2.2 Adhesión y migración

Las CDs se caracterizan por presentar una elevada capacidad migratoria. Su patrón de migración varía de acuerdo con el estadio de maduración en el que se encuentren. Este patrón está determinado, fundamentalmente, por el perfil de moléculas de adhesión (como las selectinas e integrinas) y de receptores de quemoquinas (citoquinas quimiotácticas), que expresan en dichos estadios^{175,176} (**Figura 4B y 4C**). A su vez, la expresión de dicho perfil de receptores se ve influida por las señales recibidas por las CDs durante su “recorrida” por los tejidos periféricos^{177,178}. De este modo, la migración de las CDs resulta un proceso orquestado por una compleja interacción entre quemoquinas y sus receptores, moléculas de adhesión, metaloproteasas de matriz extracelular y mediadores lipídicos¹⁷⁹.

Para poder desempeñar su rol fundamental en la “inmunovigilancia” de los tejidos periféricos, las CDs (o sus precursores) que viajan por el torrente sanguíneo deben en primer lugar establecer contactos con las células endoteliales de la vasculatura, que les permitan extravasarse. Estos contactos son mediados por las moléculas de adhesión, las cuales actúan de modo secuencial y en forma concertada con mediadores regulatorios como las quemoquinas, dirigiendo el recorrido de las CDs de la sangre a los tejidos periféricos y de allí a los ganglios linfáticos y órganos linfoides secundarios.

2.2.2.1 Selectinas e integrinas

Los primeros contactos con el endotelio, de naturaleza lábil, son mediados por la selectinas, y dan lugar al llamado fenómeno de “rolling” de los leucocitos sobre el endotelio vascular (**Figura 6**). Las *selectinas* son lectinas presentes únicamente en los sistemas leucocitario y vascular, capaces de unirse a carbohidratos fucosilados (fundamentalmente sialil-Lewis X). Constituyen la familia más pequeña de moléculas de adhesión, compuesta por sólo tres miembros: E-selectina (expresada por las células endoteliales), P-selectina (expresada por plaquetas y células endoteliales) y L-selectina (expresada por la mayoría de los leucocitos). Las tres participan en la adhesión de los leucocitos al endotelio vascular, pero sólo la L-selectina es de fundamental importancia para la interacción de los linfocitos con el endotelio linfático, requisito para su entrada en los órganos linfoides secundarios^{180,181}.

Ante un estímulo inflamatorio (IL-1, TNF- α , productos bacterianos o virales), las células endoteliales y las células del estroma (queratinocitos, fibroblastos) comienzan a expresar quemoquinas, las cuales quedan retenidas (y son de este modo presentadas) en los proteoglicanos de la matriz extracelular y de la superficie de las células endoteliales. Estas quemoquinas, al interactuar con sus receptores leucocitarios, causan la activación de las integrinas, las cuales se unen a miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas, presentes en la superficie del endotelio^{181,182}.

Como se describió anteriormente, las integrinas son heterodímeros mediadores de contactos tanto célula-MEC como célula-célula, y su activación da lugar a una serie de señales intracelulares que conducen a rearrreglos en el citoesqueleto. Esto permite una unión más firme con el endotelio y facilita de este modo la extravasación leucocitaria. Las principales integrinas involucradas en este proceso son: CD11aCD18/ $\alpha_L\beta_2$ /LFA-1, **CD11bCD18/ $\alpha_M\beta_2$ /Mac-1**, $\alpha_4\beta_1$ /VLA-4 y $\alpha_4\beta_7$ (presentes en los leucocitos), las cuales se unen a ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1 y PECAM-1 (moléculas de adhesión pertenecientes a la

superfamilia de las inmunoglobulinas) y MAdCAM-1 (mucina que presenta dominios tipo-inmunoglobulina), cuya expresión es inducida en el endotelio por estímulos inflamatorios^{180,183,184}. Es de destacar que tanto ICAM-1 como VCAM-1 se encuentran incluidas dentro de microdominios de membrana enriquecidos en **tetraspaninas** (descritos en 1.1). Según se ha observado recientemente, las **tetraspaninas** actúan regulando la expresión y la función de estas moléculas de adhesión en la superficie del endotelio, favoreciendo la migración transendotelial de los leucocitos¹⁰⁵.

2.2.2.1.1 Expresión en células dendríticas

Las CD45 carecen de L-selectina, pero expresan en cambio ligandos de las selectinas E y P del endotelio, como el ligando-1 de la glicoproteína P-selectina (PSGL-1), el antígeno cutáneo asociado a linfocitos (CLA) y glicoproteínas portadoras de sialil-Lewis X¹⁸⁵⁻¹⁸⁷. Pero de acuerdo con evidencias crecientes, el principal receptor involucrado en el “rolling” de las CD45 (y sus precursores) sobre el endotelio sería la lectina DC-SIGN, la cual interactúa con la molécula ICAM-2 (expresada tanto por el endotelio vascular como por el linfático)^{160,188,189}. Es decir que DC-SIGN participaría tanto en la migración de CD45 o sus precursores a los tejidos periféricos como en la migración de las CD45 a los órganos linfoides secundarios.

Expresan también altos niveles de β_1 ($\alpha_4\beta_1$ y $\alpha_5\beta_1$), β_2 ($\alpha_L\beta_2$ y $\alpha_M\beta_2$) y β_7 integrinas (**Figura 4B**). En ensayos *in vitro* se ha demostrado que la adhesión endotelial de CD45 derivadas de monocitos es mediada por β_2 integrinas ($\alpha_L\beta_2$ y $\alpha_M\beta_2$) y su interacción con ICAM-1 e ICAM-2, y por $\alpha_4\beta_1$ y $\alpha_4\beta_7$ y su interacción con VCAM-1. A su vez, $\alpha_5\beta_1$ interactúa con fibronectina de la MEC^{147,178,190}.

Por otra parte, se ha observado que en la trasmigración endotelial es de fundamental importancia PECAM-1, molécula de adhesión expresada tanto por el endotelio como por las CD45^{147,178}.

Con respecto a la expresión diferencial de moléculas de adhesión en CDs inmaduras y maduras, no se cuenta con demasiadas evidencias, excepto para el caso de la integrina α_4 , la cual se encuentra sobreexpresada en CDs maduras y podría ser por lo tanto considerada como marcador de maduración de estas células¹⁷⁶. También se ha detectado una disminución en la expresión de CLA, sialil-Lewis X y PECAM-1 en CDs maduras con respecto a las inmaduras¹⁹¹. Estos hallazgos aún no son totalmente comprendidos en cuanto a su relevancia *in vivo*.

2.2.2.2 Quemoquinas y sus receptores

Las quemoquinas^{192,193} son citoquinas quimiotácticas (inductoras de migración) de aproximadamente 8 a 12 kDa de PM, las cuales se agrupan en cuatro clases, teniendo en cuenta las primeras una o dos Cys de las tres o cuatro Cys conservadas en la posición -NH₂ terminal y el número de aminoácidos entre ellas: C, CC, CXC y CX₃C. Se han descrito hasta el momento en humanos alrededor de cuarenta quemoquinas, las cuales se caracterizan por su “promiscuidad” en la unión a los distintos receptores.

Son sintetizadas por varios tipos celulares, como células endoteliales, células del estroma y CDs.

Los receptores de quemoquinas pertenecen a la familia de receptores con siete dominios transmembrana acoplados a proteína G (Gi y Gq), y se postula actualmente que los dímeros $\beta\gamma$, más que la subunidad α , serían esenciales para la iniciación de la respuesta quimiotáctica. Se conocen hasta el momento alrededor de veinte receptores de quemoquinas¹⁹⁴.

Las quemoquinas participan en múltiples eventos (además de la adhesión, extravasación y migración leucocitaria), como la hematopoyesis, la infección por VIH, en enfermedades inflamatorias, en la angiogénesis y en la modulación de la respuesta inmune^{192,195,196}.

En cuanto a la adhesión y extravasación leucocitaria, son varias las quemoquinas que participan en la promoción de una unión más firme al endotelio. Citando algunos ejemplos, la quemoquina MCP-1 (secretada por las células endoteliales) favorece la transmigración endotelial de los monocitos a los tejidos periféricos (los cuales pueden diferenciarse a CDs). MCP-1, junto con las quemoquinas RANTES y MIP-1 α inducen la activación de las integrinas $\alpha_4\beta_1$ y $\alpha_5\beta_1$, promoviendo la migración leucocitaria a los tejidos. Por otra parte, SLC y MIP-3 β (secretadas en vasos linfáticos y órganos linfoides secundarios), desencadenan la interacción de $\alpha_L\beta_2$ y $\alpha_4\beta_7$ con ICAM-1 y MAdCAM-1, respectivamente, promoviendo la adhesión leucocitaria a las vénulas endoteliales altas (HEV) de los ganglios linfáticos y órganos linfoides secundarios. A su vez, otras quemoquinas como SDF-1 α (expresada en varios tejidos), median adhesiones firmes tanto a las células del endotelio vascular periférico como a las de las HEV, y ejerce su acción quimiotáctica sobre linfocitos B y T, y monocitos¹⁸⁰. Es decir que la secreción concertada de perfiles diferentes de quemoquinas por los distintos tejidos, asegura la activación de un amplio espectro de moléculas de adhesión, (tanto en los leucocitos como en las células endoteliales), promueve la unión firme de los leucocitos a los distintos endotelios y guía de este modo (y mediante la generación de un gradiente quimiotáctico) la entrada de estas células a sus sitios de acción.

2.2.2.2.1. Expresión diferencial en células dendríticas inmaduras y maduras

Las CDs en estado inmaduro responden, entre otras, a las quemoquinas MIP-1 α , MIP-5 y RANTES (secretadas por las células endoteliales y su entorno), las cuales se unen a los receptores CCR1 y CCR5, y les permite a las CDs extravasar a los tejidos periféricos, donde desempeñan su función de “centinelas”, capturando antígenos propios y extraños (**Figura 7**). La quemoquina MIP-3 α , por otra parte, es producida por los queratinocitos de la epidermis y recluta específicamente células de Langerhans en el epitelio,

uniéndose al receptor CCR6. A su vez, las CD_s inmaduras secretan **MIP-1 α** , MIP-1 β , RANTES e IL-8, ejerciendo una acción autócrina y sobre otros leucocitos.

La presencia de citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 y TNF- α , o de productos bacterianos, entre otras “señales de peligro” recibidas por las CD_s en la periferia, disparan el “programa de maduración” en dichas células, el cual también afecta la expresión de receptores de quemoquinas. De este modo, las CD_s disminuyen la expresión de CCR1 y CCR5 (y CCR6 en el caso de las células de Langerhans) y aumentan la expresión de CCR7, el cual responde a las quemoquinas SLC y MIP-3 β . Estas quemoquinas son expresadas tanto por el endotelio linfático como por las células del estroma de las áreas ricas en linfocitos T de los ganglios linfáticos y órganos linfoides secundarios (bazo, placas de Peyer). Esto causa que las CD_s en vías de maduración migren por los vasos linfáticos hacia los órganos linfoides secundarios, guiadas por un gradiente de quemoquinas, en pos de un encuentro con los linfocitos T vírgenes, a los cuales presentarán los antígenos capturados en la periferia. Estos linfocitos también alcanzan estas áreas en respuesta a un gradiente de quemoquinas y es de destacar que las mismas CD_s secretan quemoquinas atractantes de linfocitos T (como MIP-3 β , DC-CK1 y MDC). Por otra parte, las CD_s foliculares (residentes permanentes de los folículos linfoides) secretan la quemoquina BCA-1, a la cual responden los linfocitos B, siendo éstos en consecuencia atraídos a las áreas ricas en células B de los órganos linfoides secundarios^{195,197,198}. De este modo, las CD_s promueven el encuentro en los órganos linfoides secundarios de las células involucradas en la generación de la respuesta inmune específica, y allí las CD_s presentarán a los linfocitos T los antígenos capturados en la periferia.

2.2.3. Procesamiento y presentación antigénica

Las CDs, en su estado maduro, presentan una elevada capacidad de procesar los antígenos capturados durante su estado inmaduro, cargarlos en moléculas MHC de clase II y presentarlos en su superficie a los linfocitos T CD4+ (helpers). Por otra parte, presentan antígenos endógenos (propios y provenientes de la expresión de proteínas virales, por ej.), en el contexto de las moléculas MHC de clase I, a los linfocitos T CD8+ (citotóxicos). Pero una característica propia de las CDs es su capacidad de presentar también antígenos exógenos en el contexto MHC de clase I, lo cual constituye el fenómeno denominado “presentación cruzada”¹⁹⁹⁻²⁰¹.

2.2.3.1. Rol de los endosomas, lisosomas y compartimentos MIIC

Las moléculas MHC de clase II son sintetizadas en el retículo endoplásmico (ER) como glicoproteínas transmembrana que consisten en heterodímeros de cadenas α y β . En el ER, dichos heterodímeros se asocian con otra glicoproteína de membrana denominada cadena invariante (Ii), formándose complejos nonaméricos que constan de tres cadenas α , tres β y tres Ii. La cadena Ii interactúa con las moléculas MHC II en el surco destinado a la unión de los péptidos a ser presentados, de modo que este surco queda inaccesible a los péptidos presentes en el ER. Luego, los complejos son transportados hacia el Golgi, donde se completa la glicosilación de las tres cadenas y posteriormente al trans-Golgi (TGN) y a compartimentos endocíticos, gracias a una señal de transporte presente en la cadena Ii. En dichos compartimentos, las moléculas de clase II se encuentran con péptidos derivados por proteólisis de Ags internalizados, los cuales reemplazarán a Ii²⁰².

El sistema endocítico celular consiste en un intrincado arreglo de vesículas, vacuolas y túbulos interconectados entre sí, con la membrana plasmática y con el TGN (**Figura 8**). Las primeras estructuras encargadas de

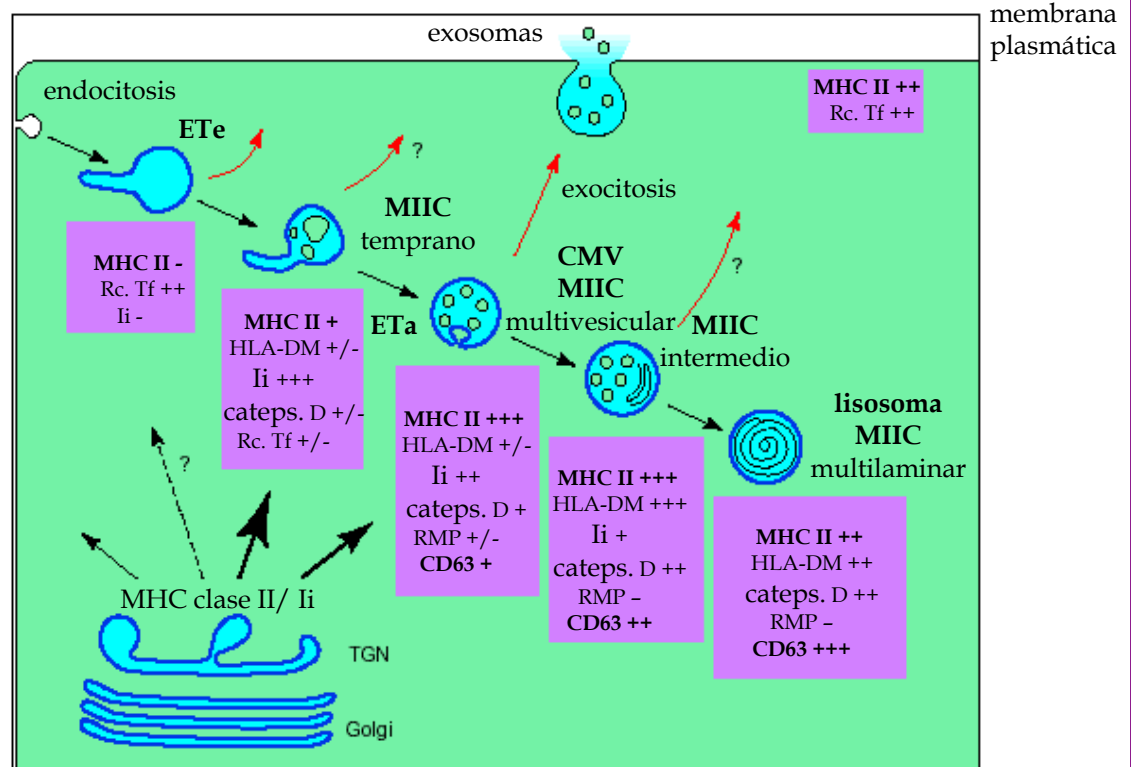
recibir el material endocitado son los endosomas tempranos (ETe). Estos compartimentos presentan una relativamente baja actividad proteolítica, pueden extenderse hasta el TGN y se conectan con los endosomas encargados de la distribución de proteínas hacia la membrana plasmática o el TGN y también con endosomas de “reciclado” de receptores como el receptor de transferrina, hacia la membrana plasmática. Aquellas proteínas que no reciclan, son a continuación transportadas a endosomas tardíos (ETa) y lisosomas. Los ETa derivan de los ETe y a su vez van madurando gradualmente a lisosomas, y reciben también el nombre de “cuerpos multivesiculares” (CMV) o “endosomas multivesiculares”. Estos compartimentos adquieren proteínas de membrana asociadas a lisosomas (lamps, como **CD63**) y constituyen sitios de elevada actividad degradativa.

Se ha demostrado por microscopía electrónica, que la mayoría de las moléculas MHC de clase II intracelular se localizan, en CPA, en estructuras que presentan numerosas vesículas y membranas internas, típicas de los ETa y lisosomas. Estas estructuras se han denominado **MIICs** (compartimentos enriquecidos en moléculas MHCII). Estos compartimentos están también enriquecidos en enzimas como catepsinas, y, como se describió anteriormente, en las **tetraspaninas CD63** y **CD82** en linfocitos B, pero al comienzo de este trabajo de Tesis no se disponía de datos sobre la presencia de **tetraspaninas** en los **MIICs** de CDs. Los complejos MHC II-Ii provenientes del camino biosintético son transportados a ETa y fundamentalmente a **MIICs**. Al alcanzar estos compartimentos, la cadena Ii es degradada, quedando sólo un péptido de la misma (péptido CLIP) asociado al surco de las cadenas MHCII, hasta ser removido e intercambiado por los péptidos antigénicos, procesos que son facilitados por la molécula símil-MHC denominada HLA-DM (“editora” de péptidos). Otras moléculas que contribuyen al cargado de los péptidos son las moléculas HLA-DR y HLA-DO (símil-MHC) y **tetraspaninas** como **CD63**, **CD81** y **CD82** en linfocitos B⁸⁶. Recientemente, se pudo detectar que las moléculas MHCII unidas a Ii o a CLIP se encuentran en dominios “rafts”,

mientras que las moléculas “editoras” se localizan en los microdominios enriquecidos en **tetraspaninas**. El “encuentro” entre ambos dominios necesario para el cargado de las moléculas MHCII sería facilitado por la capacidad de las **tetraspaninas** de movilizarse (y dirigir a las proteínas asociadas) hacia los “rafts” gracias a la presencia de residuos palmitoilados en su estructura (descritos en 1.1)²⁰³. Asimismo, la naturaleza de los péptidos unidos a las moléculas MHCII determinarían la afinidad del complejo por distintos dominios de membrana²⁰³. Esto último explicaría la localización de moléculas MHCII cargadas con determinados epitopes antigénicos en dominios enriquecidos en **tetraspaninas**⁸⁸.

Los complejos MHCII-péptidos alcanzan la superficie celular mediante la fusión de los **MIICs** con la membrana plasmática. A su vez, por exocitosis, se liberan al medio extracelular vesículas provenientes de estos compartimentos, las cuales reciben el nombre de exosomas⁹⁴. Por otra parte, se postula que los compartimentos **CIIVs** participarían en el transporte de los complejos MHCII-péptidos a la membrana plasmática mediante un sistema tubular²⁰⁴ (**Figura 9**).

**FIGURA 8. Rutas de transporte de las moléculas MHCII
Marcadores de compartimentos endocíticos**



La fracción mayoritaria de las moléculas de clase II sintetizadas *de novo*, viajan desde el TGN a los MIICs tempranos y desde allí siguen el camino endocítico o son transportadas a la membrana plasmática, desde donde son endocitadas y conducidas a los ETe. El procesamiento antigénico, la degradación de Ii y el cargado de los péptidos comienza en los MIICs tempranos y se acentúa en los subsiguientes. La fusión de los MIICs multivesiculares con la membrana plasmática permite la deposición en la superficie de las moléculas de clase II, así como la exocitosis de las vesículas internas (exosomas). ETe: endosoma temprano; ET_a: endosoma tardío; Ii: cadena invariante; Rc. Tr: receptor de transferrina; RMP: receptor de manosa-6-fosfato; cateps. D: catepsina D; CMV: cuerpos multivesiculares.

Modificado de *Immunol. Today* 19:282-287, 1998

2.2.3.2. Diferencias entre células dendríticas inmaduras y maduras

Durante la inducción de la maduración de las CD, se produce un aumento en la expresión de superficie de las moléculas MHC de clase I y II, como consecuencia de un aumento tanto en la síntesis como en la vida media de estas moléculas. La actividad endocítica/fagocítica celular se reduce

notablemente, con lo cual se reduce también el transporte de los complejos MHC-péptidos a los lisosomas, surgiendo de este modo la estabilización de dichos complejos en la superficie de las CDs. La maduración también conduce al aumento en la expresión de moléculas co-estimuladoras, importantes para la interacción CPA-linfocito T, como CD40, CD80 y CD86^{159,205} (**Figura 4A**).

A su vez, durante la maduración, se produce un aumento en la actividad de la maquinaria de procesamiento antigénico (por ej., la ubiquitinación y la actividad proteolítica de enzimas involucradas en la degradación antigénica y de la cadena invariante Ii)^{204,206,207} (**Figura 9**). Se ha observado que la maduración induce la activación de bombas de protones, intensificándose la acidificación de los lisosomas y facilitándose de este modo la formación de los complejos MHCII-péptidos. En las CDs inmaduras humanas, en cambio, los complejos MHC-péptidos de la superficie celular son rápidamente internalizados, con lo cual la presentación antigénica es de muy corto plazo²⁰⁸. De esta forma, el sistema inmune se asegura de que fundamentalmente se presenten a los linfocitos T aquellos antígenos capturados donde se generó la “señal de peligro”, es decir, donde hubo un foco inflamatorio inducido por la entrada de algún patógeno, como una de las posibles causas. Como consecuencia, se evita la presentación de antígenos propios, que son continuamente endocitados por las CDs, los cuales normalmente conducen a la anergia de los clones de linfocitos T reactivos contra ellas^{209,210}, pero que en algunos casos podrían causar autoinmunidad.

La presencia de citoquinas anti-inflamatorias (como IL-10) pueden interferir con la regulación del procesamiento y la presentación antigénica. Por lo tanto, el microambiente de citoquinas que se genera en el sitio donde las CDs reciben la “señal de peligro” es un factor crucial en la determinación de la orientación de la respuesta inmune que se induce. A su vez, el panel de citoquinas secretadas por las CDs se relaciona con la polarización de la respuesta inmune hacia una respuesta celular o humoral. Como ejemplo, la producción de IL-12 por las CDs induce una respuesta de tipo T helper-1. Por

otra parte, la dosis antigénica, la afinidad del antígeno por el MHC y el TCR y la duración del contacto APC-linfocito T son factores que también pueden influir en el tipo de respuesta inmune inducida^{151,159}.

2.3 Células dendríticas en inmunoterapia del cáncer

El cáncer es una enfermedad de origen genético, que resulta de la acumulación de mutaciones en células normales, las cuales llevan a la adquisición de un fenotipo “maligno”, caracterizado por la proliferación descontrolada de las células (independiente de factores de crecimiento), la pérdida de la inhibición del crecimiento por contacto, la evasión de la muerte celular por apoptosis, la insensibilidad a factores inhibidores del crecimiento, la habilidad de invadir tejidos adyacentes y colonizar órganos distantes y la capacidad de promover el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis)^{211,212}. Por otra parte, los tumores liberan factores inmunosupresores que modulan la respuesta del sistema inmune promoviendo el “escape” tumoral. Las CD8, las cuales desempeñan un rol fundamental en el reclutamiento y activación de linfocitos T, son también afectadas en su función por dichos factores. Al respecto, las CD8 presentes en tejidos tumorales se encuentran mayoritariamente en estado inmaduro, inactivas e incapaces de migrar a los órganos linfoides secundarios²¹³. Por otra parte, la presencia de CD8 maduras en el sitio tumoral se ha asociado a un pronóstico favorable en varios tumores humanos²¹⁴.

Por tales motivos, la utilización de CD8 cultivadas *in vitro* a partir de precursores (fundamentalmente monocitos de sangre periférica²¹⁵) surgió en 1996 como una alternativa posible para el tratamiento del cáncer²¹⁶, ya que las CD8, al ser obtenidas fuera del microambiente inmunosupresor del paciente serían capaces de estimular la respuesta anti-tumoral de los linfocitos. A partir de ese momento, se han diseñado varias estrategias para la utilización de CD8 en inmunoterapia del cáncer, las cuales están siendo actualmente evaluadas en

más de sesenta ensayos clínicos^{217,218}. La elevada capacidad endocítica de estas células puede ser aprovechada para el cargado *in vitro* con Ags de interés, como proteínas o péptidos asociados a tumor^{219,220}, lisados tumorales^{221,222} y células tumorales apoptóticas^{223,224}. De esta forma, las CDs pueden presentar *in vivo* los Ags capturados *in vitro*, a los linfocitos T CD4+ y/o CD8+ (dependiendo del contexto del MHC en el que se presenten los péptidos), promoviendo una respuesta anti-tumoral. En efecto, en varios pacientes se han observado respuestas específicas de linfocitos T citotóxicos contra Ags presentados por las CDs^{217,225}. Asimismo, las CDs pueden ser transfectadas con ADN o ARN²²⁶ o infectadas con vectores virales portando genes de interés²²⁷.

Por otra parte, la **endocitosis mediada por receptor** también puede ser explotada con el fin de dirigir Ags a receptores de superficie. Al respecto, se han realizado ensayos pre-clínicos de este tipo dirigiendo Ags al receptor DEC-205, CD11b/CD18, TLR-2, Fcγ, DC-SIGN, MR y receptores de quemoquinas²²⁷⁻²³⁴. Con este fin de “dirigir” Ags a receptores celulares, los **anticuerpos monoclonales** están demostrando ser una herramienta eficaz para introducir dichos Ags en las vías de presentación antigénica de clase I y/o II, según el receptor elegido como vía de entrada^{228, 233-235}.

Hasta el momento, la vacunación con CDs ha producido resultados satisfactorios²³⁶, demostrando ser factible y segura, causando mínimos efectos colaterales, y la evidencia obtenida claramente indica que la maduración de las CDs es un requisito indispensable para la inducción de una respuesta inmune efectiva. Sin embargo, son aún necesarios: la estandarización de variables como el modo de obtención de las CDs; el subtipo y estado de maduración de las mismas al momento de la administración; la vía, dosis e intervalos de administración; el modo de cargado de Ags, y estudios a largo plazo que confirmen su eficacia^{179,217,237}. Al respecto, una de las principales limitaciones de la inmunoterapia parece ser el escaso número de CDs que alcanzan los ganglios linfáticos al ser inyectadas en la periferia. Por esta razón, se están ensayando estrategias que incluyen el pre-tratamiento del sitio de inyección con citoquinas

inflamatorias como TNF- α o ligandos de los TLR y la transfección de CDs con quemoquinas como CCR-7, citoquinas inflamatorias e inmunoestimuladoras o anticuerpos anti CD40, de modo de inducir un microambiente que mejore la migración de las CDs^{179,225,238-240}. Por otra parte, se está también evaluando la eficacia de vías de administración alternativas, como intra-nodular e intra-tumoral^{222,241}.

3. Anticuerpos monoclonales

3.1 Estructura y función de los anticuerpos

En 1897, Paul Ehrlich propuso por primera vez que las células del sistema inmune presentan receptores para sustancias extrañas y que son capaces de liberarlos cuando entran en contacto con ellas, comparando esta interacción con el sistema “llave-cerradura” y vaticinando que dichos receptores se comportarían como “balas mágicas”²⁴². Estos receptores constituyen los hoy llamados anticuerpos (Acs) y las sustancias reconocidas por ellos, antígenos (Ags).

Los Acs o inmunoglobulinas (Igs)²⁴³ constituyen una familia de glicoproteínas estructuralmente relacionadas, las cuales median la respuesta inmune específica humoral. Están compuestas por dos cadenas livianas idénticas (de aproximadamente 25 kDa) y dos cadenas pesadas idénticas (de aproximadamente 55 kDa) (**Figura 10**). Ambos tipos de cadenas contienen unidades homólogas que se pliegan de forma independiente en una estructura globular común denominada “dominio de inmunoglobulina”, la cual caracteriza a las proteínas pertenecientes a la “superfamilia de las inmunoglobulinas”. Cada cadena pesada consta de un dominio variable (V_H) y tres dominios constantes (C_{H1} , C_{H2} y C_{H3}), y cada cadena liviana presenta un dominio variable (V_L) y uno constante (C_L). Las regiones variables (porción F_v del Ac) son las que presentan mayor diversidad de secuencia, a diferencia de las constantes (porción F_c) que están más conservadas. A su vez, dentro de las regiones variables de las cadenas pesadas y livianas se encuentran tres tramos de secuencias de extraordinaria diversidad denominadas regiones hipervariables o regiones determinantes de la complementariedad. Estas regiones constituyen el paratope o superficie de unión del Ac a determinadas regiones del Ag llamadas determinantes antigénicos o epitopes.

En cada individuo existen hasta 10^9 moléculas de anticuerpo diferentes, cada una de ellas portando una secuencia de aminoácidos única en los sitios de combinación con el Ag. Esta extraordinaria diversidad de estructuras permite al organismo el reconocimiento de una enorme variedad de epitopes diferentes. La interacción Ac-Ag, aunque no es covalente, se caracteriza por ser altamente específica y por presentar una elevada fuerza de unión (constante de disociación $K_d = 10^{-6}$ - 10^{-10} M).

Se dividen en cinco clases: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, las cuales pueden a su vez dividirse en subclases (según pequeñas diferencias en las cadenas pesadas) como IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 en el hombre, e IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 en el ratón. Por otra parte, las cadenas livianas pueden pertenecer al isotipo κ o λ .

Así como las regiones variables de los Acs son responsables de la especificidad y diversidad de la respuesta inmune, las regiones constantes participan en funciones efectoras, como la activación del complemento, la citotoxicidad celular dependiente de Acs y las reacciones de hipersensibilidad, y favorecen la fagocitosis mediante la opsonización del Ag²⁴³, corroborando el concepto de “balas mágicas” acuñado por Paul Ehrlich.

Los anticuerpos son producidos por los linfocitos B en una forma asociada a la membrana (receptor) y en una forma secretada. Las células B que expresan Igs de membrana son capaces de reconocer al Ag y de diferenciarse a células secretoras de Acs (plasmocitos). Cada clon estimulado de linfocitos B produce anticuerpos idénticos entre sí, específicos para un determinado epitope, de modo que en el torrente sanguíneo es posible encontrar anticuerpos diferentes, cada uno de ellos derivado de un clon de linfocitos B (anticuerpos policlonales).

3.2 Producción de anticuerpos monoclonales

En 1975, César Milstein y Georges Kohler describieron un método para immortalizar células secretoras de Acs a partir de un animal inmunizado, seleccionando luego anticuerpos específicos para un único determinante antigénico. El método se basa en la fusión entre una célula B normal productora de Acs y una célula de mieloma (tumor derivado de un linfocito B) y en la selección de las células fusionadas que producen Acs de una determinada especificidad. Estas líneas celulares immortalizadas, productoras de Acs específicos para un único determinante antigénico, se denominan hibridomas, y los Acs producidos, "anticuerpos monoclonales" (AMCs)^{244,245}.

3.3 Aplicación de los anticuerpos monoclonales

Los AMCs son ampliamente utilizados, principalmente con fines diagnósticos y de investigación. Resultan de suma utilidad para la identificación de marcadores fenotípicos característicos de un determinado tipo celular y para la identificación de Ags aún desconocidos, para el análisis funcional de la superficie celular y de las moléculas secretadas (mediante la estimulación, inhibición o neutralización de las funciones celulares luego de la unión Ac-Ag), para el diagnóstico de enfermedades infecciosas, autoinmunes y tumorales (mediante la detección de Ags o Acs específicos presentes en la circulación sanguínea o en los tejidos) y para el tratamiento de ciertos tumores.

3.3.1. Anticuerpo monoclonal FC-5.01

En nuestro laboratorio se desarrolló un AMC murino denominado **FC-5.01** (IgG2a, κ)¹, usando como inmunógeno la línea celular de carcinoma mamario humano indiferenciado IIB-BR-G²⁴⁶. El AMC FC-5.01 reconoce a la **tetraspanina CD63**.

Mediante inmunohistoquímica, se observó que **FC-5.01** reconoce varios carcinomas humanos y 100% de los melanomas malignos. Se ha demostrado que el complejo de superficie FC-5.01-CD63 es capaz de internalizarse en células IIB-BRG, cuando éstas son incubadas a 37°C²⁴⁷. Por otra parte, FC-5.01 marcado con ^{99m}Tc o ¹²⁵I puede radioinmunodetectar tumores humanos (IIB-BR-G) creciendo en ratones atómicos²⁴⁸.

El AMC **FC-5.01** fue patentado y es comercializado por el laboratorio Zymed (San Francisco, California) con fines de investigación y de diagnóstico *in-vitro*.

3.3.2 Los anticuerpos monoclonales como agentes anti-tumorales

El tratamiento actual del cáncer consiste, cuando es posible, en la cirugía para remover el tumor, combinada con radio o quimioterapia. Estas últimas afectan a células en rápida división, lo cual incluye a las células cancerosas, pero también a células normales, siendo esto último responsable de los severos efectos adversos de estas terapias. Por este motivo, se intentan desarrollar formas de tratamiento que sean específicas para las células tumorales, sin afectar al tejido normal. En este sentido, los AMCs surgieron hace casi treinta años como una alternativa promisoriosa.

En la actualidad se utilizan AMCs en sistemas comerciales de radioinmunodetección de tumores (como Oncoscint[®] para cáncer de colon y Proscint[®] para cáncer de próstata). Asimismo, se ha aprobado el uso de algunos AMCs con fines terapéuticos (como ejemplos: Rituxan[®] para el tratamiento de leucemias y linfomas CD20+ y Herceptin[®] para el tratamiento principalmente de cáncer de mama, pero también de algunos tumores de páncreas y pulmón). Por otra parte, se encuentra en curso una gran cantidad de ensayos clínicos que involucran el uso de AMCs. Sin embargo, el número de ellos aprobados para uso terapéutico es, hasta la fecha, limitado^{249,250}.

Una de las desventajas iniciales en el uso de AMCs con fines terapéuticos fue la observación de que los pacientes desarrollaban una respuesta inmune anti-ratón (origen de la mayoría de los AMCs), lo cual bloqueaba el potencial efecto de los Acs, y la formación de los complejos inmunes podía provocar daño renal. Por esta razón, la mayoría de los Acs utilizados actualmente con fines terapéuticos son anticuerpos “quiméricos” (contienen la región variable de origen murino y la constante humana, como es el caso de Rituxan[®]) o anticuerpos “humanizados” (sólo las regiones hipervariables son de origen murino, como Herceptin[®]). Actualmente es también posible la producción de AMCs totalmente humanos en forma sintética o a partir de ratones transgénicos²⁵¹, los cuales están siendo evaluados en ensayos clínicos²⁵².

Pero la actual limitación para el uso terapéutico de los AMCs reside, fundamentalmente, en las características físicas de los AMCs:

- 1) el tamaño de la molécula de AMC limita su capacidad de difundir de la vasculatura hacia el tumor.
- 2) las interacciones del AMC con receptores a Fc presentes en el tejido normal pueden alterar su distribución y provocar efectos secundarios no deseados²⁵³.

Esta limitación explica por qué son eficientemente tratados con AMCs fundamentalmente los tumores líquidos (como leucemias y linfomas) y que se hayan aprobado para uso terapéutico contra tumores sólidos sólo dos AMCs: Herceptin[®] y PanoRex[®] (este último utilizado en Alemania para el tratamiento de cáncer de colon; no fue aprobado por la FDA de Estados Unidos por tratarse de un AMC murino).

Por tal motivo, se están diseñando actualmente fragmentos derivados de AMCs, de menor tamaño que ellos, que carecen de la porción Fc, como una forma de mejorar la penetración tumoral y limitar los efectos no deseados^{249,250,254}.

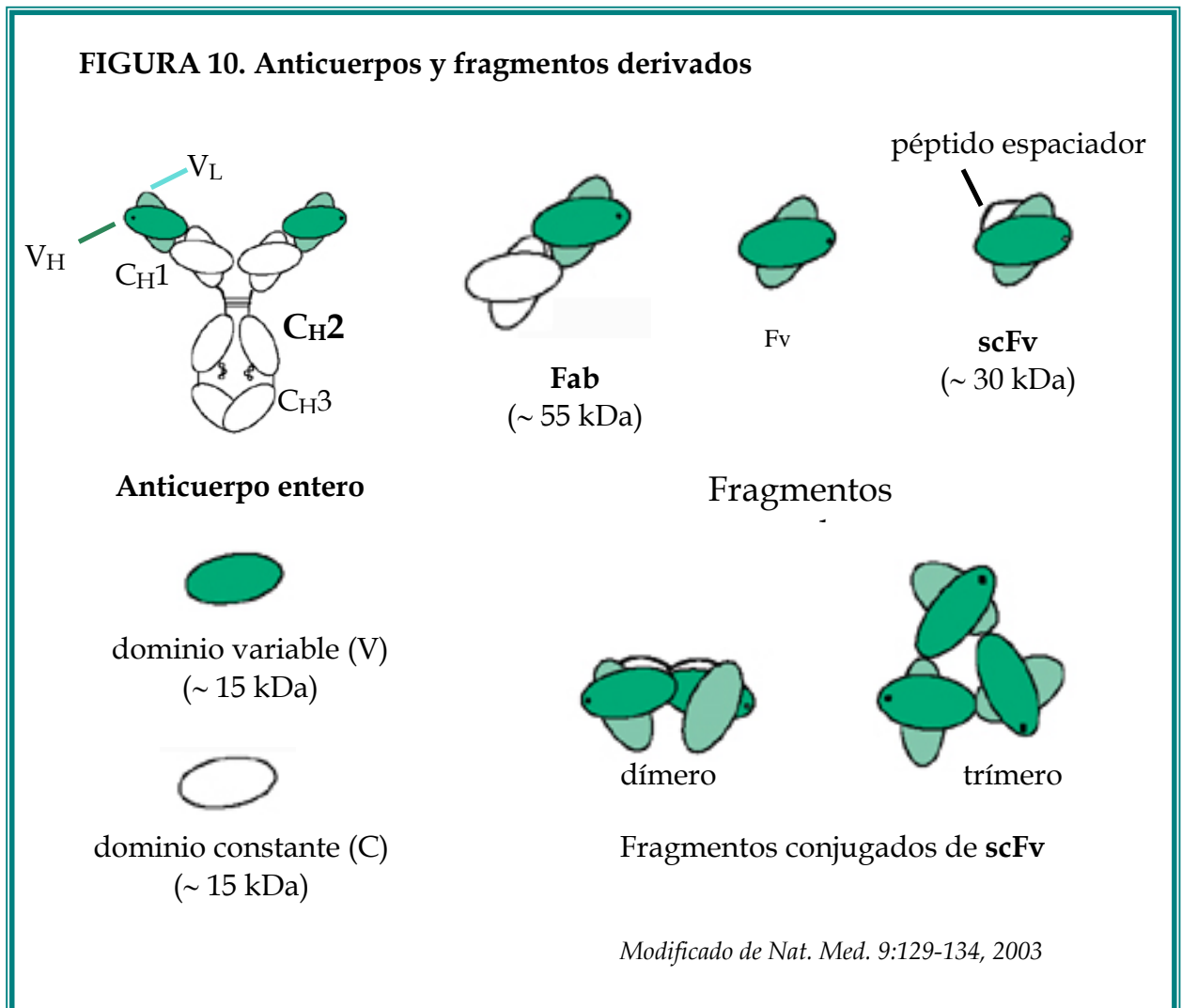
4. Fragmentos derivados de anticuerpos monoclonales

Estos fragmentos pueden obtenerse mediante proteólisis de los Acs intactos o en forma recombinante (**Figura 10**). En el primer caso, los fragmentos más pequeños que han podido obtenerse son los fragmentos Fab monovalentes, compuestos por el dominio variable de las cadenas pesada y liviana (V_H y V_L) y un dominio constante de ambas cadenas (C_{H1} y C_L). Por otra parte, mediante la tecnología de ADN recombinante se han podido obtener fragmentos monovalentes más pequeños, conteniendo sólo la porción variable del Ac (fragmentos “**single-chain Fv**” (scFv)).

En comparación con los anticuerpos intactos, estos fragmentos muestran mejores propiedades farmacocinéticas para la penetración tumoral sin perder su capacidad de reconocimiento antigénico. Sin embargo, por sus características monovalentes presentan una baja tasa de retención en los tejidos, lo cual hace necesario su administración constante. Por esta razón, se han diseñado conjugados diméricos, triméricos y tetraméricos de estos fragmentos, de modo de aumentar su afinidad y de este modo su retención en el sitio de interés. (Hudson). Por otra parte, estos fragmentos presentan limitaciones en su producción a gran escala. Este problema puede ser superado mediante estrategias de terapia génica, las cuales permiten la expresión intracelular de estos fragmentos (“intrabodies”) en forma constante (compensando su rápida eliminación), y con patrones de glicosilación singeneicos, lo cual los haría menos inmunogénicos y mejor tolerados²⁵⁵.

Estos fragmentos pueden acoplarse a moléculas capaces de ejercer alguna función sobre la célula luego de su unión (como drogas citotóxicas, toxinas, péptidos, enzimas), dando lugar a Acs “bifuncionales”. En el caso de la terapia anti-tumoral, estos anticuerpos bifuncionales permiten localizar Acs asociados a tumor y luego ejercer un efecto citotóxico sobre la célula tumoral, reviviendo el concepto de “balas mágicas” surgido más de un siglo atrás^{250,256}.

Por otra parte, estos fragmentos o los Acs enteros pueden dirigir péptidos o proteínas a CPAs como las CDs, que serán degradados y presentados por ellas en el contexto de clase I ó II, estimulando de esta forma la reacción del sistema inmune contra Ags de interés, como pueden ser antígenos tumorales (descrito en 2.3)²²⁸. Dentro de esta línea de inmunoterapia, una estrategia innovadora es la utilización de los denominados “troybodies”, anticuerpos cuya porción variable reconoce moléculas presentes en APCs y cuyos dominios constantes “esconden” (a la manera de un caballo de Troya) secuencias que codifican para epitopes reconocidos por las células T, los cuales serán presentados por las APCs una vez procesados dichos anticuerpos²⁵⁷.



4.1 Fragmentos recombinantes “single-chain Fv”

4.1.1 Estructura y producción

Las fragmentos recombinantes “**single-chain Fv**” (**scFv**), son fragmentos monovalentes que resultan del clonado de la porción variable de la cadena pesada (V_H) y la porción variable de la cadena liviana (V_L) de una inmunoglobulina, ensambladas mediante un péptido espaciador de naturaleza flexible. Presentan un peso molecular de aproximadamente 25 kDa. Pueden ser generadas clonando en vectores de expresión secuencias de ADN de hibridomas murinos²⁵⁸⁻²⁶⁰, o a partir de bibliotecas de fagos (“display en fagos”)^{261,262}, o, recientemente, de bibliotecas de levaduras²⁶³, de bibliotecas de retrovirus²⁶⁴ y en plantas transgénicas²⁶⁵. En el caso de la tecnología de “display en fagos”, un gran repertorio de secuencias de ADN que codifican para los fragmentos de Acs (biblioteca) son fusionadas con genes que codifican para proteínas del core de bacteriófagos, de modo que estos virus se replican en cultivos de bacterias y los fragmentos de Ac son presentados en la superficie del fago. A continuación, se realiza un proceso de selección de varias rondas, basado en la unión de dichos fragmentos a las moléculas de interés. A su vez, es posible generar mutaciones en los fragmentos seleccionados de modo de mejorar la afinidad de los mismos, de modo que el proceso incluye varios ciclos de mutación, exhibición, selección y amplificación de los productos seleccionados^{256,258,266}.

4.1.2 Aplicaciones terapéuticas

Los fragmentos scFv poseen diversas ventajas sobre los anticuerpos enteros para ser utilizados terapéuticamente como agentes anti-tumorales²⁶⁷⁻²⁶⁹, entre ellas se pueden mencionar: a) su pequeño tamaño les permite penetrar un tumor más rápidamente, b) al no presentar la porción Fc del anticuerpo

monoclonal de origen, generalmente murino, son menos inmunogénicos; por otra parte, actualmente es posible generar scFvs humanos²⁷⁰, c) una vez clonados pueden ser manipulados con bastante facilidad y versatilidad para construir moléculas quiméricas conteniendo enzimas^{271,272}, toxinas²⁷³⁻²⁷⁵, citoquinas²⁷⁶⁻²⁷⁹ o péptidos^{280,281}, o bien anticuerpos bivalentes y/o biespecíficos²⁸²⁻²⁸⁵; dichas construcciones están siendo actualmente evaluadas en líneas celulares y modelos animales para ser utilizadas con fines terapéuticos. Los fragmentos scFv pueden ser también clonados en vectores de expresión intracelular, con el fin de neutralizar proteínas virales, factores de transcripción, moléculas oncogénicas (tales como p21ras) o enzimas (como la colagenasa tipo IV) en el interior de las células^{266,286-289}, como vehículos de moléculas inmunomoduladoras^{290,291}, o formando quimeras con receptores de superficie celular de modo de modular la interacción con otros tipos celulares, incluyendo la regulación de la respuesta inmune^{227,292,293}.

Las moléculas scFv constituyen una alternativa promisorio frente a los tratamientos convencionales como la quimio- o radioterapia, ya que éstos están limitados por sus efectos tóxicos sobre tejidos normales a determinadas dosis. Como ejemplo se puede citar el uso de citoquinas asociadas a scFvs, el cual combina la especificidad del anticuerpo por las células tumorales con la liberación local de la citoquina, constituyendo una interesante posibilidad para disminuir los severos efectos colaterales asociados a la administración de las mismas en altas dosis. Las moléculas scFv aparecen también como herramientas ideales para el diagnóstico clínico por imágenes o la radioinmunoterapia, debido a su rápida penetración tumoral y a la alta relación tumor:tejidos normales obtenida a tiempos cortos, después de su administración²⁹⁴. Al ser eliminados rápidamente de la circulación, es posible marcarlos con isótopos de corta vida media, como el ^{99m}Tc. Se han elaborado varios scFvs como agentes para el diagnóstico por imágenes²⁹⁵⁻²⁹⁸, algunos de ellos están siendo actualmente evaluados en ensayos clínicos de fase I²⁹⁹⁻³⁰¹. Asimismo, se está

estudiando en modelos animales la eficacia de scFvs radiomarcados en radioterapia de tumores³⁰²⁻³⁰⁴.

La mayoría de estos fragmentos aún está siendo evaluada en ensayos pre-clínicos, pero los resultados hasta el momento obtenidos permiten inferir que las “balas mágicas”, finalmente, están dando en el blanco³⁰⁵.

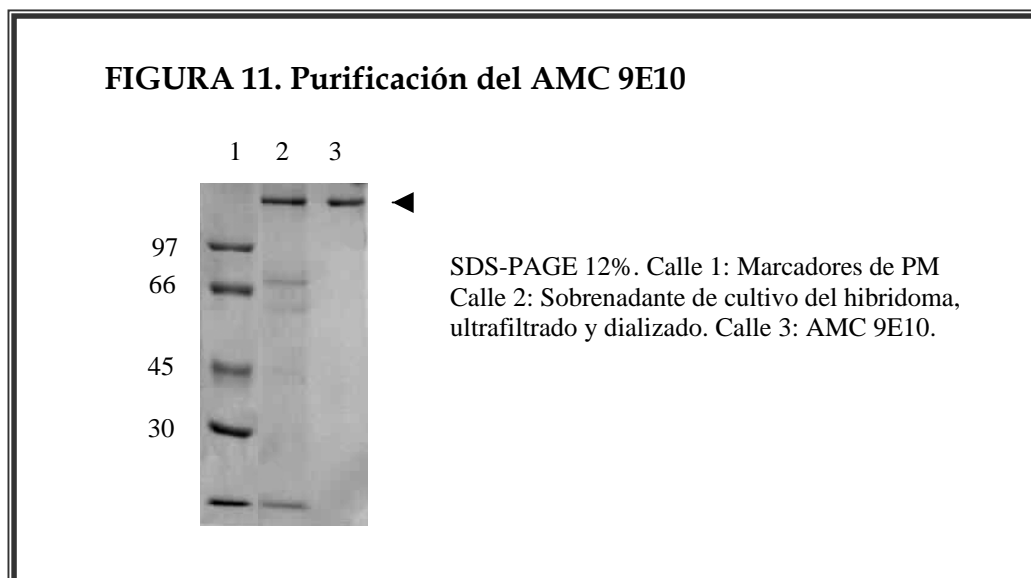
MATERIALES y MÉTODOS

1. Anticuerpos

Fueron utilizados los siguientes Acs: AMC de ratón anti-CD63 (FC-5.01, Zymed, South San Francisco, California), anticuerpo policlonal de conejo anti-antígeno de endosomas tempranos-1 (EEA-1) humano (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA, donación del Dr. J. Salamero, Institute Curie, Paris, France), anticuerpo policlonal de cabra anti-proteína de lisosomas asociada a membrana-2 (LAMP-2) humana (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), HLA-DR, -DP y -DQ (IgG2a/ κ) y anti-CD86 (IgG1/ κ) humanos conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC), AMCs de ratón anti-CD9 (IgG1/ κ), anti-CD29 (IgG1/ κ), anti-CD40 (IgG1/ κ), anti-CD80 (IgM/(IgG1/ κ), anti-CD81 (IgG1/(IgG1/ κ), anti-CD82 (IgG1/(IgG1/ κ), anti-CD151 (IgG1/ κ), anti-MHCI (A, B, C, IgG1/ κ) y anti-MHCII (IgG2a/ κ) humanos (Pharmingen, NJ, USA), anticuerpo policlonal de conejo anti-dectin-1 humano (donación del Dr. P. Brossart, Universidad de Tübingen, Tübingen, Alemania), AMCs de ratón anti CD11b y anti-CD18 humanos (donación del Dr. V. Horejsi, Academia de Ciencias de la República Checa, República Checa), AMCs de ratón anti- α_5 humana (Chemicon International, CA, USA), anti- β_3 humana (Cymbus Biotechnology, UK), IgG2a de ratón, κ (control de isotipo del FC-5.01 y del Ac. anti-MHCII), IgG1 de ratón, κ (control de isotipo de los anticuerpos anti-MHCI, anti-CD9, anti-CD29, anti-CD40, anti-CD81, anti-CD82 y anti CD151), IgM de ratón, κ (control de isotipo del Ac anti-CD80) e IgG1 de ratón, κ , marcado con FITC (control de isotipo del Ac anti-CD86) (Sigma, Saint Louis, MO, USA), suero humano anti-toxoide tetánico (donación de la Dra. V. López, Fundación Instituto Leloir, Buenos Aires, Argentina), anticuerpo policlonal de conejo anti-

inmunoglobulinas de ratón conjugado con Cy3 (RAM-Cy3), anticuerpo policlonal de cabra anti-inmunoglobulinas de conejo conjugado con cy3 (GAR-cy3), anticuerpo policlonal de cabra anti-inmunoglobulinas de ratón conjugado con cy5 (GAM-cy5), anticuerpo policlonal de conejo anti-inmunoglobulinas de cabra conjugado con cy5 (RAG-cy5), anticuerpo policlonal de cabra anti-inmunoglobulinas de ratón conjugado con ficoeritrina (GAM-PE) y anticuerpo policlonal de conejo anti-inmunoglobulinas humanas conjugado con FITC (RAH-FITC) (Dako, CA, USA), anticuerpo policlonal de cabra anti-inmunoglobulinas de conejo conjugado con peroxidasa (HRP-GAR), anticuerpo policlonal de cabra anti-inmunoglobulinas de ratón conjugado con fosfatasa alcalina (GAM-PA) y anticuerpo policlonal de ratón anti-inmunoglobulinas humanas conjugado con peroxidasa de rábano picante (MAH-HRP) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA), anticuerpo policlonal de cabra anti-inmunoglobulinas de ratón conjugado con FITC (GAM-FITC), anticuerpo policlonal de cabra anti-inmunoglobulinas de ratón conjugado con isotiocianato de tetrametil rodamina (TRITC) (GAM-TRITC) y anticuerpo monoclonal de ratón anti-poli-histidina (Sigma).

El AMC 9E10 (IgG1, κ , anti-*c-myc*) fue purificado a partir del sobrenadante de cultivo del hibridoma productor por medio de una resina de Proteína G-Sepharosa (Pharmacia, NJ, USA), previa ultrafiltración y diálisis del sobrenadante. Su pureza se controló por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE, 12%)³⁰⁶. La cuantificación se realizó por el método de Lowry³⁰⁷. Se obtuvo un elevado rendimiento de 9E10 (20 mg de anticuerpo puro/250 ml de sobrenadante de cultivo de hibridoma) con alta pureza (>95%) (**Figura 11**).



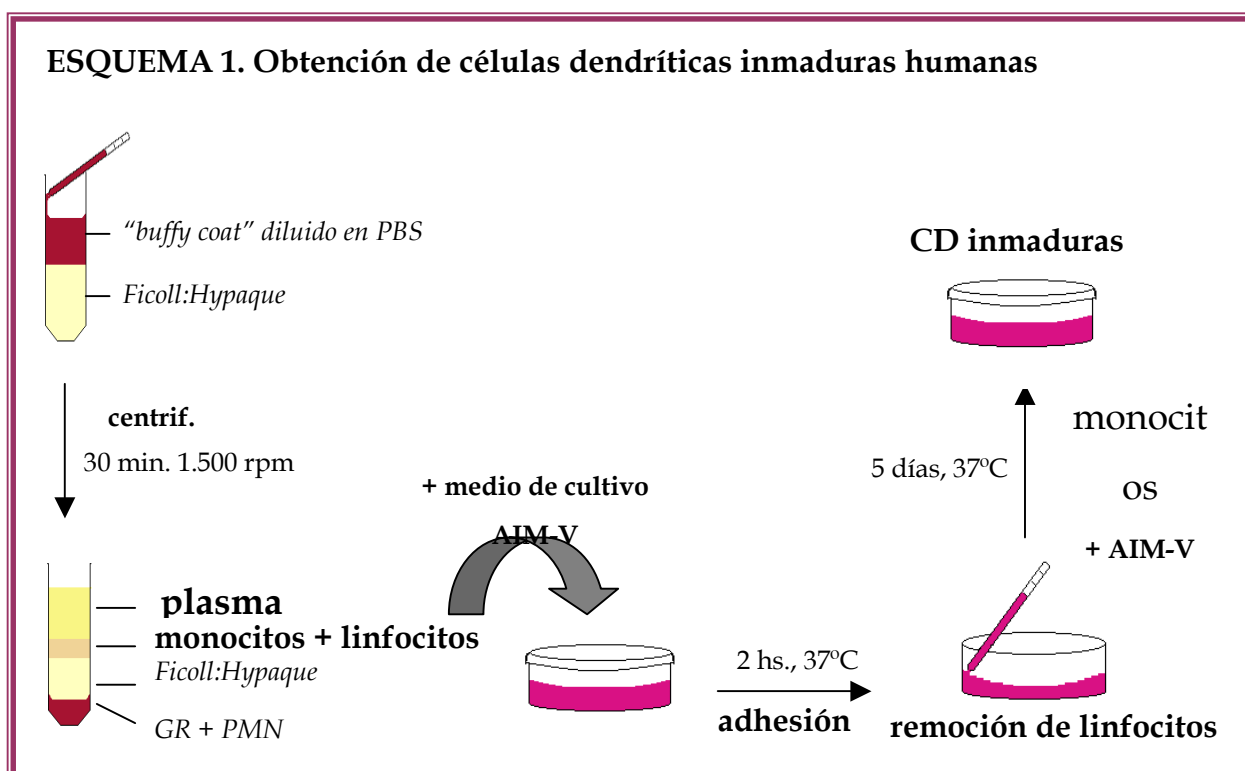
2. Células

2.1 Obtención de células dendríticas y linfocitos

Las CDs se obtuvieron a partir de monocitos de sangre periférica del siguiente modo: Se aislaron los leucocitos de sangre periférica de dadores sanos mediante "buffy coats" (provistos por el Servicio de Hemoterapia del Hospital Naval "Pedro Mallo") y se sembraron en una dilución $\frac{1}{2}$ en buffer fosfato salino (PBS, 7 mM KH_2PO_4 , 14 mM Na_2HPO_4 , 25 mM NaCl, pH 7,4) en un gradiente de densidad de Ficoll 9% (Sigma)-Hypaque 33,3% (Triyosom, 50% amidotriozato sódico, Laboratorio Justesa Imagen, Argentina) en proporción 12:5 (Ficoll:Hypaque) (**Esquema 1**). Luego de centrifugar dichos gradientes durante 30 min. a 1.500 rpm, se aisló la capa correspondiente a las células mononucleares (linfocitos y monocitos), la cual se lavó con PBS. Las células se resuspendieron en medio sin suero AIM-V (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), se plaquearon en placas de cultivo celular y se dejaron adherir a las mismas durante 2 hs. a 37°C. Cumplido dicho lapso de tiempo, las células no adherentes (linfocitos) fueron separadas y las adherentes (monocitos) fueron

cultivadas de 5 a 7 días en medio AIM-V fresco suplementado con 800 U/ml de factor estimulante de colonias granulocito-monocito (GM-CSF) (LEUCOMAX, Molgramostim, Schering-Plough, Ireland) y 50 ng/ml de interleuquina-4 (IL-4) humana recombinante (Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA). Para algunos experimentos, luego de 5 días de cultivo (células dendríticas inmaduras) se agregó al medio 1 µg/ml de lipopolisacárido (LPS) de *Pseudomonas Aeruginosa* (Sigma, St. Louis, Missouri) durante 48 hs., de modo de obtener CDs maduras.

Para la separación de monocitos y linfocitos, en algunos casos se utilizó una columna de separación magnética (MACS, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania). Las células mononucleares aisladas fueron incubadas con partículas imantadas marcadas con anticuerpos anti-CD14 (marcador de monocitos) (Miltenyi) durante 15 min. a 4°C, en una relación de 100 µl de partículas/10⁸ células en 500 µl de buffer PBS con 0,5% de albúmina humana y 2 mM EDTA. Luego, las células se sembraron en la columna magnética equilibrada en dicho buffer, y se recolectaron 2 fracciones: la no adherente a la columna (linfocitos) y la adherente (monocitos), la cual se despegó mediante presión con un émbolo. Los monocitos fueron cultivados como se indica en el párrafo anterior.



2.2 Cultivo de líneas celulares

Las células **IIB-MEL-J**, (línea de melanoma humano CD63+ desarrollada en nuestro laboratorio³⁰⁸), fueron cultivadas en medio Dulbecco modificado por Eagle (DMEM)-F12 (Sigma) suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10%, 20 nM selenito de Na, 2 mM glutamina, 100 μ M ácido ascórbico, 0,3 mg/ml galactosa, 0,15 mg/ml transferrina, 5 ng/ml EGF, 5 μ g/ml insulina y 3,7 g/l HCO_3Na , a 37°C con atmósfera húmeda y 5% CO_2 .

Las células **BHK** (línea de células de riñón de hamster bebé, donadas por la Dra. A. Gamarnik, Fundación Instituto Leloir), fueron cultivadas en medio esencial mínimo (MEM, Sigma) suplementado con FBS al 10% y 2 mM glutamina.

Las células del **hibridoma** productor de **AMC 9E10**, se cultivaron inicialmente en medio hibridoma (medio DMEM suplementado con 3,5 g/l glucosa, 1 mM piruvato de Na, 2 mM glutamina y 3,7 g/l HCO_3Na), con 10% de FBS, y luego se fue disminuyendo paulatinamente el porcentaje de suero (período de adaptación) hasta mantener el cultivo en medio hibridoma libre de suero, (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), el cual facilita la posterior purificación del anticuerpo.

2.3 Preparación de extractos de células dendríticas

Las CDs inmaduras fueron lisadas en buffer de inmunoprecipitación (1% [3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato] (CHAPS) en PBS, 2 mM MgCl_2 , 2 mM fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF), 10 μ g/ml de aprotinina, 10 μ g/ml de leupeptina) durante 1 h. a 4°C y centrifugadas a 14.000 rpm durante 10 min. La concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry.

2.4 Preparación de extractos tumorales

Los **extractos tumorales** se obtuvieron a partir de tumores humanos (1-2g) obtenidos de intervenciones quirúrgicas y conservados a -70°C. Luego de pulverizarlos bajo N₂ líquido, la fracción de membranas se separó por ultracentrifugación a 40.000 rpm durante 1h. a 4°C y se realizó la extracción con detergentes (1% NP-40) e inhibidores de proteasas. La concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry.

2.5 Preparación de extractos de plaquetas

Las **plaquetas** se aislaron a partir de sangre periférica, recogida sobre una solución 135 mM de citrato de sodio (1/10 del volumen total de sangre). Se centrifugaron durante 15 minutos a 800 rpm y se separó el plasma rico en plaquetas, el cual fue centrifugado a 2.500 rpm durante 15 minutos y se obtuvo un pellet libre de eritrocitos. Luego de lavar dicho pellet con 5 mM EDTA en PBS, se incubaron las células durante 1h. a 4°C en buffer de lisis (10 mM Tris-HCl pH 7,8, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 2 mM PMSF) y se obtuvo el extracto de plaquetas por centrifugación (15 min. a 4°C, 14.000 rpm). La concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry.

3. Obtención de fragmentos y conjugados del AMC FC-5.01

3.1 Preparación de fragmentos Fab-5.01

Se realizó una digestión con papaína del FC-5.01 (1 mg de papaína/100 mg de Ac) en 0,15 M NaCl, 1 mM EDTA y 25 mM β -mercaptoetanol en PBS pH 7,4, a 37°C durante distintos tiempos (30 min., 1h., 2hs., 4hs., 6hs., 8hs. y 22hs.) de modo de elegir el tiempo óptimo de digestión. La reacción se detuvo alquilando los grupos SH con el agregado de iodoacetamida (concentración final 30 mM, 15 min. a 37°C). La extensión de la digestión se monitoreó mediante un SDS-PAGE 12%.

El digerido se dializó O.N. contra PBS pH 7,6 y se purificó de los fragmentos Fc mediante una resina de proteína A-Sepharosa (Sigma): Se realizó la unión "en batch", en PBS pH 7,6, durante 30 min. a temp. ambiente, se empaquetó la resina en una columna y los fragmentos Fab se colectaron en el "run-through" (los fragmentos Fc quedaron unidos a la proteína A-Sepharosa y se eluyeron con una solución de gly 100 mM pH 3).

3.1.1 Detección y reactividad del Fab-5.01

La pureza del Fab se controló por SDS-PAGE, 12%. La cuantificación se realizó por el método de Lowry.

La reactividad de los fragmentos Fab-5.01 se verificó mediante inmunofluorescencia sobre CDs en suspensión, según se explica en el punto 4.1.3.

3.2 Construcción de la molécula recombinante scFv-5.01-*c-myc*-his₆

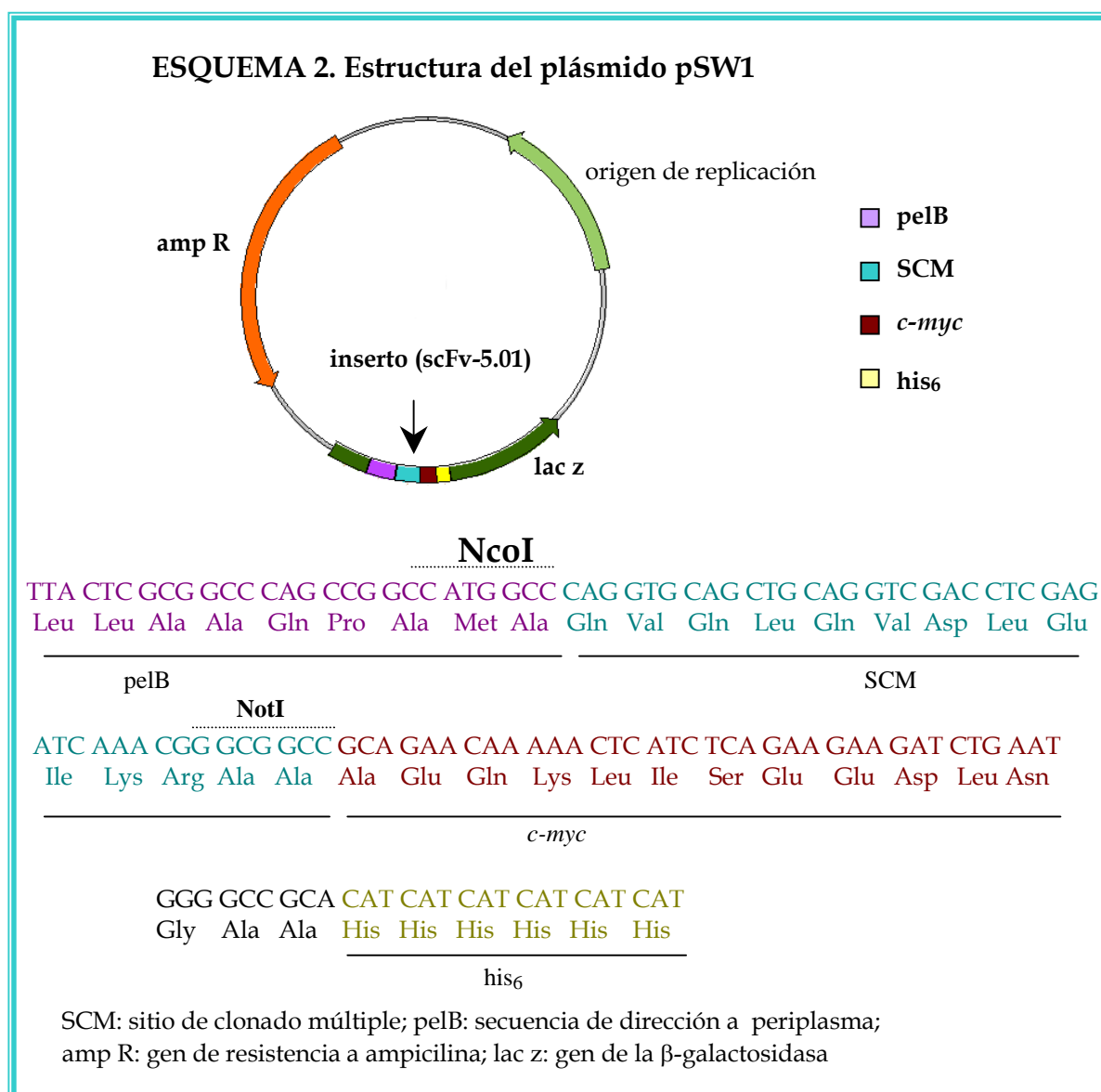
Para la construcción de la molécula scFv-5.01 nuestro laboratorio estableció un convenio de colaboración con el Dr. Jean-Luc Teillaud (Centre de Recherches Biomédicales des Cordeliers, París, Francia). En primer lugar, se debieron clonar las porciones variables de la cadena pesada y liviana (Fv) del FC-5.01, a partir del ADN complementario (ADNc) correspondiente al ARN total del hibridoma productor del FC-5.01.

3.2.1. Plásmidos y cepas bacterianas

Para llevar a cabo el clonado de las regiones variables del AMC FC-5.01 se utilizó el plásmido pGEM-T (pGEM-T Easy vector System I, Promega, WI, USA). Dicho plásmido posee un gen de resistencia a ampicilina (para su selección) y la incorporación de los insertos interrumpe el gen codificante de la β -galactosidasa (*lac z*, cuyo promotor es inducible por IPTG), por lo que las bacterias transformadas no son capaces de metabolizar al X-gal (sustrato de la enzima) dando lugar a colonias blancas.

El clonado y expresión del scFv-5.01 se llevó a cabo en el plásmido pSW1³¹² (derivado del plásmido pUC 119, **Esquema 2**), el cual contiene un gen de resistencia a la ampicilina (para su selección) el gen *lac z* junto a su promotor, un sitio de clonado múltiple (“polylinker”) ubicado río abajo del promotor *lac* y a continuación de los primeros codones del gen *lac z*, la secuencia pelB (para dirigir el inserto expresado hacia el espacio periplásmico de las bacterias), los sitios Nco-I y Not-I para el clonado del scFv-5.01 y las secuencias marcadoras (tags) *c-myc* e His₆ en el extremo 3’ del inserto, lo cual permite el reconocimiento del scFv (scFv-5.01-*c-myc*-his₆) con el AMC 9E10 (anti *c-myc*) y el anticuerpo anti-his en los ensayos *in vitro* y su purificación mediante una columna de afinidad por metales. La incorporación del inserto interrumpe

el gen *lac z*, por lo que las bacterias transformadas dan lugar a colonias blancas. Para la expresión del scFv-5.01 se transformaron bacterias *E. coli* cepa TG1.



3.2.2 Clonado y secuenciación de las regiones variables del FC-5.01

Se llevó a cabo mediante la técnica de RT-PCR. Para la preparación del ARN total, se partió de 50×10^6 células del hibridoma productor del FC-5.01 congeladas a -70°C y se realizó la extracción con Trizol (total RNA isolation reagent, Gibco-BRL, Rockville, MD, USA). El ARN obtenido se cuantificó a

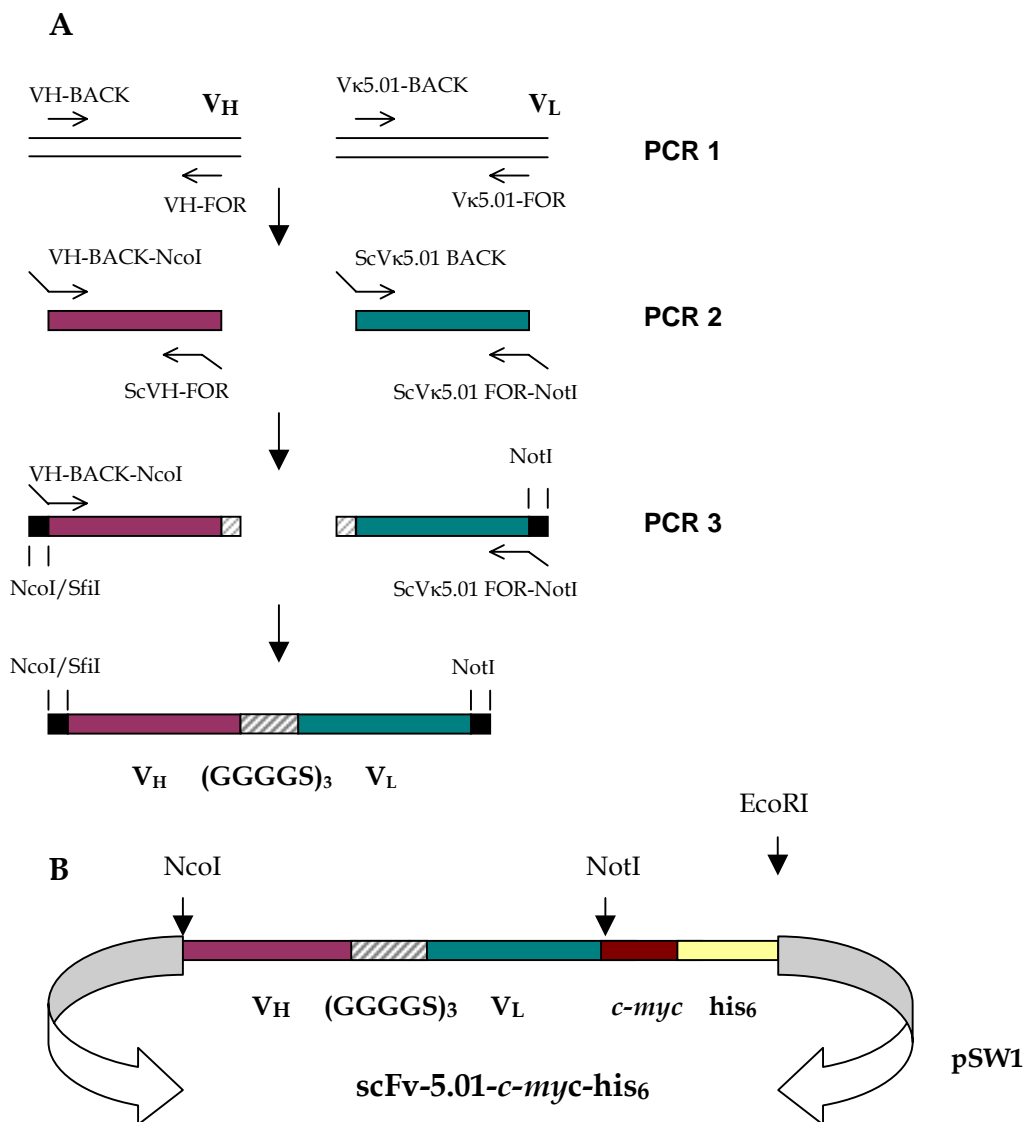
partir de la medición de la Absorbancia a 260/280 y se verificó su integridad mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TAE 0,5X (20 mM Tris-Acetato, 0,5 mM EDTA). A partir de dicho ARN se preparó el ADNc utilizando los oligonucleótidos CH γ y C κ 2, los cuales se unen a regiones constantes conservadas de las inmunoglobulinas, en el límite con la porción variable, en ambas cadenas¹. Luego, mediante PCR, se amplificaron las secuencias codificantes de las regiones variables de ambas cadenas del AMC FC-5.01 (V $_H$ y V $_L$), utilizando oligonucleótidos diseñados para flanquear ambas porciones variables, en secuencias conservadas¹: Para la cadena pesada, se utilizaron los oligonucleótidos VHB (5' AGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGG 3') y CH γ (5' GGCCAGTGGATAGAC 3'), y para la cadena liviana, los oligonucleótidos V κ B-2 (5' GATATTGTGATGACCCAGTCTCCA 3') y C κ 2 (5' TGGATACA GTTGGTGCAGC 3'). Los productos de amplificación obtenidos se analizaron en un gel de agarosa al 1% en TAE 0,5X, utilizando marcadores de peso molecular de ADN para establecer la longitud de los productos obtenidos. Los fragmentos amplificados para cada cadena de AMC FC-5.01 se ligaron a plásmidos pGEM-T usando T4 ADN ligasa (Promega). Con dichos plásmidos conteniendo los insertos, se transformaron bacterias competentes JM109 por electroporación (200 Mohms, 2.5 kv, Gene Pulser, BioRad, CA, USA) y se plaquearon en Luria Bertani-ágar (LB-ágar) conteniendo 100 μ g/ml ampicilina, 0,5 mM IPTG (inductor) y 80 μ g/ml X-gal. Al cabo de 24 hs., se aislaron colonias blancas de las placas correspondientes a cada cadena del AMC FC-5.01, se cultivaron en medio líquido LB conteniendo ampicilina y se purificaron los plásmidos correspondientes (minipreps). Dichos plásmidos fueron digeridos con la enzima de restricción EcoRI (Promega), de modo de verificar que contuvieran los insertos. A continuación, dichos insertos fueron secuenciados en un secuenciador AlfExpress (Pharmacia, Uppsala, Suecia; Fundación Instituto Leloir) utilizando los primers adecuados para el vector pGEM-T (Promega). Las secuencias obtenidas se analizaron en la Base de Datos de

Secuencias de Proteínas de Interés Inmunológico Kabat^{309,310} a fin de determinar regiones de alta homología con otras secuencias de regiones variables de inmunoglobulinas e identificar los sitios de combinación al antígeno (CDRs) y las regiones conservadas entre ellos (frameworks).

3.2.3 Clonado y secuenciación de la molécula recombinante scFv-5.01-*c-myc*-his₆

Para la construcción de dicha molécula, se partió del ADNc correspondiente al ARN total del hibridoma productor del AMC FC-5.01, según se explicó en el punto anterior. Se clonaron y ensamblaron las porciones variables de la cadena pesada y liviana (Fv) del AMC FC-5.01, separadas por una secuencia espaciadora (GGGGS)₃ hacia 3' de V_H y 5' de V_L, en el plásmido de expresión bacteriana pSW1, por medio de una PCR en tres pasos (**Esquema 3A**), según las condiciones descritas por O. Cochet³¹¹. En la primer PCR, se amplificaron V_H y V_L, utilizando primers diseñados específicamente para FC-5.01 en el caso de la cadena liviana κ y una mezcla de primers consenso para la cadena pesada^{312,313}. Los productos purificados de esta PCR fueron sometidos a una segunda PCR de modo de añadir sitios de restricción en los extremos 5' de V_H y 3' de V_L y secuencias complementarias codificantes del péptido espaciador (GGGGS)₃ en los extremos 3' de V_H y 5' de V_L. En una tercer PCR se ensamblaron V_H y V_L a través del péptido espaciador. Los productos obtenidos fueron digeridos por las enzimas de restricción Nco-I y Not-I y ligados en el plásmido de expresión bacteriana pSW1 (**Esquema 3B**).

ESQUEMA 3. Construcción de la molécula recombinante scFv-5.01-*c-myc*-his₆



- A. Clonado del scFv-5.01 por medio de una PCR en 3 pasos. Oligonucleótidos utilizados:
 VH-BACK: 5' AGTSMARCTGCAGSAGTCWGG 3'. VH-FOR: 5' TGAGGAGACGGTGACCGTGGTCC
 CTGGCCCC 3'. V_k5.01 BACK: 5' AACATTATGATGACACA GTCGCCATCA 3'.
 V_k5.01 FOR: 5' TTTTATTTCAGCCTGGTCCC 3'. VH-BACK-NcoI: 5' ATGGCCCAGGTSMARC TGCAGSAGTC 3'.
 ScVH-FOR: 5' AGAGCCACCTCCGCTGAACCGCTCCACCTGAGGAGACGGTGACCG 3'.
 ScV_k5.01 BACK: 5' GGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGAACATTATGATG 3'.
 V_k5.01 FOR-NotI: 5' GATATGAGATACTGGCGCCGCTTTTATTTCAGCCT 3'.
 S=C o G; M=A o C; R=A o G; W=A o T.
- B. Inserción del fragmento clonado en el plásmido de expresión bacteriana pSW1, conteniendo las secuencias marcadoras *c-myc* e his₆.

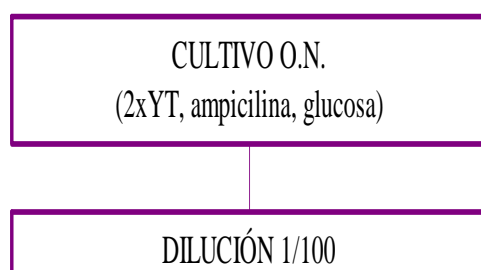
TG1 por electroporación. Los clones obtenidos se analizaron por PCR,

utilizando oligonucleótidos que hibridizan con los extremos 5' y 3' del inserto clonado y posteriormente se secuenciaron para corroborar el ensamblado correcto del scFv-5.01-*c-myc*-his₆.

3.2.4 Producción y purificación de la molécula scFv-5.01-*c-myc*-his₆

A partir de un cultivo O.N. de *E. coli* cepa TG1 (transformadas por electroporación con el plásmido pSW1 portando la construcción anteriormente descrita), se realizó una dilución 1/100 en medio 2xYT (16 g/l triptona, 10 g/l extracto de levaduras, 5 g/l NaCl, 100 µg/ml ampicilina, 0,1% glucosa) y se cultivó a 37°C hasta alcanzar una OD_{600 nm} = 0,7. Luego se agregó el inductor IPTG (concentración final 1 mM) y se prolongó el cultivo por un período de 4 hs. a 30°C. Las bacterias se centrifugaron (30 min. a 4°C, 4.000 rpm), el pellet se resuspendió en buffer de esferoplastos (200 mM Tris-HCl pH 8, 0,5 mM EDTA pH 8, 0,5 M sacarosa) y se incubó en hielo durante 30 min. con agitación. La fracción periplásmica se recolectó por centrifugación (15 min. a 4°C, 13.000 rpm), se dializó contra buffer de lavado (50 mM NaH₂P₀₄/Na₂HP₀₄, 300 mM NaCl, pH 7) y se procedió a su purificación por cromatografía de afinidad por metales: Se equilibró la resina de cobalto (TALON™, Clontech, Palo Alto, CA, USA) en el buffer de lavado y se realizó la unión en batch (2 hs. a 4°C). Luego de una serie de lavados con el mismo buffer se procedió a la elución en columna (Econo-Pac™, Bio-Rad) con buffer imidazol (50 mM NaH₂P₀₄/Na₂HP₀₄, 300 mM NaCl, 150 mM imidazol, pH 7) (**Esquema 4**). El principio de separación se basa en la formación de un complejo de coordinación entre el Co²⁺ y los grupos imidazol de los residuos de His del scFv.

ESQUEMA 4. Producción, purificación y detección del scFv-5.01-*c-myc*-his₆



3.2.4.1 Detección y reactividad de la molécula scFv-5.01-*c-myc*-his₆

La pureza de las fracciones conteniendo el fragmento scFv-5.01-*c-myc*-his₆, (fracciones periplásmicas y eluidos de la columna de afinidad) se analizó mediante geles de poliacrilamida (SDS-PAGE 15%) teñidos con Coomassie blue o AgNO₄. Dichas fracciones fueron también transferidas a membranas de nitrocelulosa (Sigma). El sc-Fv5.01-*c-myc*-his₆ fue detectado con el anticuerpo monoclonal 9E10 (5 ug/ml) y con el anticuerpo anti-his. Para el revelado se utilizó el anticuerpo GAM-PA.

La reactividad del scFv se evaluó mediante Western blot sobre extractos tumorales, de plaquetas y de CDs (CD63+) y por medio de inmunofluorescencia sobre células IIB-MelJ y CDs en suspensión, según se explica en el punto 4.1.3.

3.3 Construcción de la proteína de fusión scFv-5.01-MART-1- *c-myc*-his₆

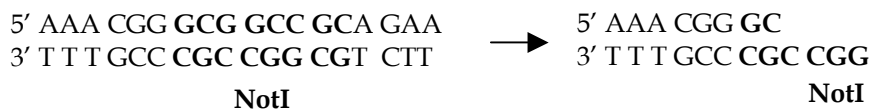
Para su construcción se partió del plásmido pSW1 conteniendo la secuencia de la molécula scFv-5.01-*c-myc*-his₆ según se describió en 3.2.3., y se lo digirió con la enzima NotI, de modo de clonar en ese sitio la secuencia de un péptido de interés, en este caso MART-1 (AAGIGILTV)³¹⁴ (**Esquema 5A**).

Se obtuvo en primer lugar el ADNc de MART por RT-PCR a partir del ARN total de células IIB-MEL-J. Con una segunda PCR se amplificó la porción de ADNc codificante para el nonapéptido y 4 aminoácidos flanqueantes a ambos lados, para permitir el clivaje correcto del péptido al procesarse en las CDs. Además se introdujeron sitios NotI para facilitar el clonado del fragmento, sin perder el marco de lectura (**Esquema 5B**). Finalmente se ligó dicho fragmento en el plásmido pSW1 conteniendo la secuencia de la molécula scFv-5.01-*c-myc*-his₆ (**Esquema 5C**).

ESQUEMA 5. Construcción de la proteína de fusión scFv-5.01-MART-1

A

1. Digestión del plásmido pSW1 con NotI



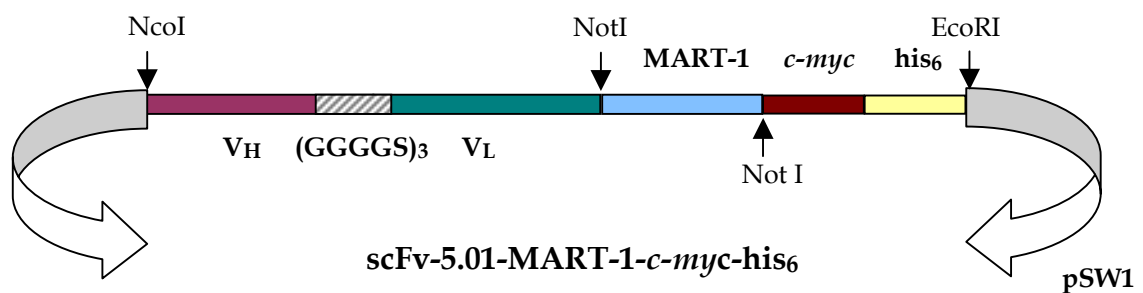
B

Amplificación de la secuencia del péptido MART-1 a partir del ADNc de MART



C

Ligación en el plásmido pSW1-scFv



A. Digestión del plásmido pSW1 con la enzima NotI. En negrita se indica el sitio de corte para dicha enzima.

B. Amplificación de MART-1. En azul se señala la secuencia del nonapéptido MART-1; en rojo, el sitio de corte de la enzima NotI, y en negro las secuencias flanqueantes que facilitan la digestión por NotI y el posterior clivaje proteolítico del péptido. En líneas de trazo grueso se indican los oligonucleótidos utilizados para la amplificación: MART-1 For-Not: 5' TATTGCGGCCGCGACTC CCAGGATCACTGT 3'. MART-1 Back-Not: 5' CGGGCCGGCCGCAACGGCTGAAGAG 3'.

C. Ligación de MART-1 en el vector pSW1 conteniendo el scFv-5.01-c-myc-his₆

3.3.1 Producción y purificación de la proteína de fusión scFv-5.01-MART-1

La proteína de fusión se obtuvo y purificó a partir de un cultivo O.N. de *E. coli* cepa TG1, del mismo modo que se describió para la molécula scFv-5.01-*c-myc-his₆* (punto 3.2.4).

3.3.1.1 Detección y reactividad de la proteína de fusión scFv-5.01-MART-1

La pureza de las fracciones conteniendo la proteína de fusión (fracciones periplásmicas y eluidos de la columna de afinidad) se analizó y detectó según se indicó para la molécula scFv-5.01-*c-myc-his₆* (punto 3.2.4.1).

La reactividad de la proteína de fusión se verificó mediante inmunofluorescencia sobre CDs en suspensión, según se explica en el punto 4.1.3.

3.4 Preparación del conjugado FC-5.01-TT

Se incubaron por separado 10 mg de FC-5.01 y de toxoide tetánico (TT, obsequio de Laboratorios Biol, Buenos Aires, Argentina) con el reactivo heterobifuncional N-succinimidil 3-(2-piridilditio) propionato (SPDP, Sigma), en PBS-1 mM EDTA pH 7,5, durante 1 hora a temperatura ambiente, con agitación, de modo de incorporar grupos SH en ambas proteínas. El reactivo sin conjugar se separó del conjugado mediante cromatografía de exclusión molecular (Sephadex G-25, Sigma). Luego, el conjugado FC-5.01-SPDP se redujo con 12 mg de ditioneitol (DTT) en buffer acetato (100 mM acetato de Na⁺, 100 mM NaCl, pH 4,5), durante 45 min. a temp. ambiente, con agitación, y al cabo de ese tiempo, el DTT sin conjugar se eliminó como se describió para el SPDP. Finalmente, el conjugado TT-SPDP se incubó con el conjugado FC-5.01-SPDP reducido, O.N. a 4°C, con agitación. El conjugado FC-5.01-TT se separó del TT y FC-5.01 sin conjugar, mediante cromatografía de exclusión molecular (Sephacryl S-200, Pharmacia) y posterior incubación con proteína G-Sepharosa

(Sigma) de modo de separar los conjugados TT-TT. El principio de separación mediante proteína G es similar al de proteína A y se basa en la unión a dichas proteínas de las porciones Fc de los Acs. (Esquema 6).

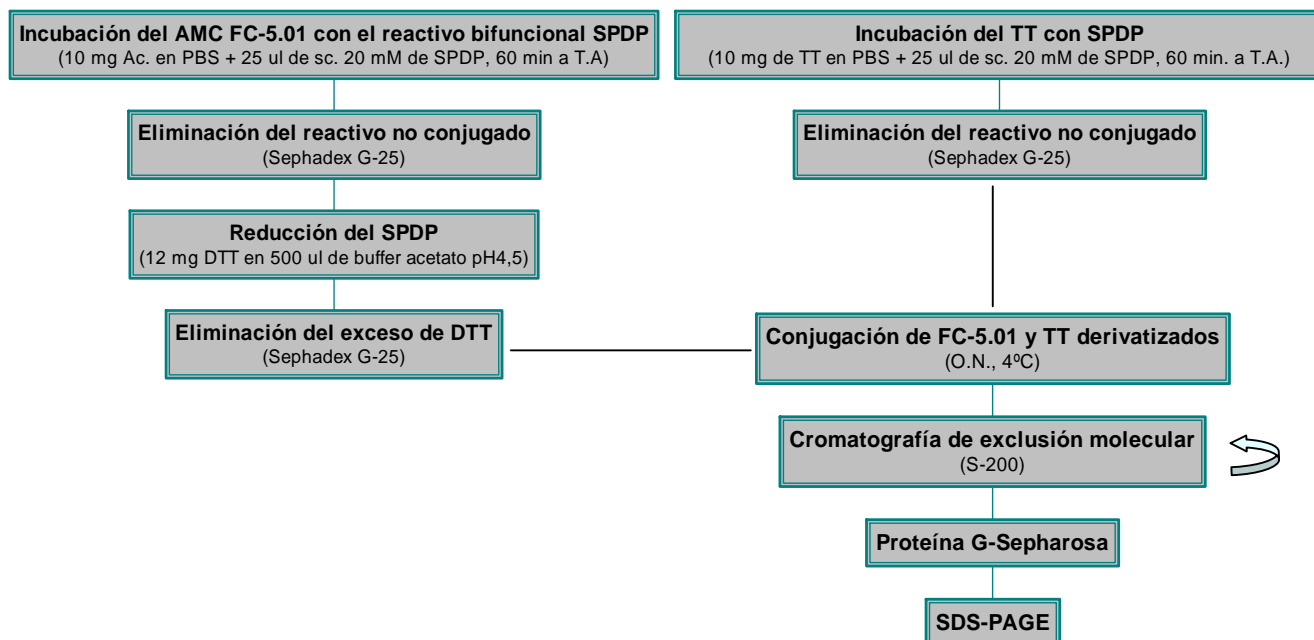
3.4.1 Detección y reactividad del conjugado FC-5.01-TT

Los productos obtenidos fueron analizados por medio de SDS-PAGE 4%, y posterior Western blot revelado con anticuerpos anti-ratón para detectar el FC-5.01 (GAM-PA, sustratos enzimáticos: BCIP (5-Br-4-Cl-3-indolil-fosfato)/NBT (nitroblue tetrazolium), Promega, WI, USA) y con suero humano de un dador vacunado contra tétanos seguido de anticuerpos anti-humano de modo de detectar el TT (RAH-HRP, sustratos enzimáticos: 4-Cl-1-naftol y H₂O₂).

La reactividad del conjugado FC-5.01-TT se analizó mediante Western blot sobre extractos de CDs (CD63+) e inmunofluorescencia sobre CDs en suspensión, según se detalla en 4.1.3.

La capacidad de las CDs de capturar el conjugado y presentar los péptidos derivados del TT a linfocitos respondedores, se evaluó mediante un ensayo de proliferación de linfocitos midiendo la incorporación de ³H-timidina, según se explica en 4.5.

ESQUEMA 6. Obtención y purificación del conjugado FC-



4. Ensayos celulares

4.1 Inmunofluorescencia: Microscopía Confocal y Citometría de flujo

4.1.1 Expresión de moléculas marcadoras, tetraspaninas e integrinas en células dendríticas. Expresión de superficie e intracelular

Se analizó sobre CDs inmaduras y maduras en suspensión o inmovilizadas. Las células en suspensión fueron despegadas de las placas de cultivo y lavadas con PBS, luego de 5 días (CDs inmaduras) ó 7 días (CDs maduras) de cultivo. Luego de bloquear con suero de cabra al 10% (30 min.), se incubó con los anticuerpos anti-tetraspaninas, anti-integrinas o anti-marcadores de CDs (CD40, CD80, CD83, CD86, MHCI, MHCII) y con los correspondientes controles de isotipo, durante 1 hora y luego se reveló incubando con el anticuerpo GAM-PE (para citometría de flujo -FACS, Ortho Cytoron Absolute, Johnson-Johnson company, Hospital de Clínicas, Buenos Aires, o FACS Vantage SE, Becton Dickinson, Fundación Instituto Leloir-) o GAM-cy3 (para microscopía confocal) durante 1 hora. Para analizar la expresión de superficie, las incubaciones se realizaron siempre a 4°C (en esta condición de temperatura se minimiza la internalización de los AMCs en caso de que se produjera, observándose la fluorescencia sólo en la superficie celular).

Para observar la inmunofluorescencia en sitios intracelulares, las células fueron fijadas y permeabilizadas con paraformaldehído al 3%, saponina 0,1% y las incubaciones posteriores se realizaron en presencia de saponina 0,1%.

Las células fueron fijadas con paraformaldehído al 3% y analizadas por FACS o montadas en Mowiol (Calbiochem, La Jolla, CA) y observadas en un microscopio confocal Zeiss.

En el caso de las células inmovilizadas, éstas fueron crecidas sobre cubreobjetos, los cuales fueron pre-tratados con poli-L-lisina al 0,1%³¹⁵ para

permitir la adhesión de las CDs, y luego de realizada la inmunofluorescencia fueron observadas en el microscopio confocal.

4.1.2 Internalización de complejos anticuerpo-tetraspanina

Los experimentos de internalización en CDs fueron realizados en células inmobilizadas o en suspensión. Las células fueron lavadas con PBS conteniendo Ca^{2+} y Mg^{2+} (0,1 g/l), bloqueadas con suero de cabra al 10% en PBS/ Ca^{2+} / Mg^{2+} e incubadas con los anticuerpos anti-tetraspaninas correspondientes 1 hora a 4°C y luego a 37°C durante distintos tiempos en el lapso de 2 horas, previa eliminación del exceso de anticuerpo; se fijaron las células con paraformaldehído al 3% en PBS, durante 10 min. a temperatura ambiente y se permeabilizaron con saponina al 0,1% en PBS durante 15 min. a temperatura ambiente. Luego de la permeabilización, se reveló incubando con GAM-cy3 en saponina al 0,1% en PBS, durante 1 hora a temp. ambiente. Los preparados fueron montados en Mowiol y observados en el microscopio confocal Zeiss.

Para analizar la expresión de superficie de las tetraspaninas e integrinas luego de la internalización de CD63 y CD82, se llevó a cabo el siguiente ensayo: Las CDs, en suspensión, fueron incubadas durante 1 hora a 4°C con AMC FC-5.01 o AMC anti-CD82 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$). A continuación, el medio fue removido y la incubación se continuó a 37°C en PBS $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ a 37°C durante 30 min. de modo de permitir la internalización de los complejos Ac-tetraspanina. Las células fueron luego tratadas con un buffer ácido (ácido acético 0,2M-NaCl 0,5M pH 3) durante 20 min., de modo de eliminar los posibles Acs unidos a la membrana. Posteriormente, fueron incubadas con los correspondientes anticuerpos anti-tetraspaninas o anti-integrinas a 4°C , seguidos de la incubación con anticuerpos secundarios (GAM-PE), y analizadas por FACS.

4.1.3 Reactividad de FC-5.01, FC-5.01-TT, Fab y scFv

Se analizó sobre células IIB-MEL-J o CDs inmovilizadas o en suspensión. En este último caso, las células IIB-MEL-J en crecimiento exponencial se despegaron de las placas de cultivo con una solución conteniendo 15 mM citrato de sodio, 135 mM KCl y se lavaron con PBS, y las CDs fueron despegadas y lavadas con PBS, luego de 5 ó 7 días de cultivo. Luego de bloquear con suero de cabra o de conejo al 10% (30 min.), se incubó con las fracciones a ensayar (FC-5.01, FC-5.01-TT, Fab y scFv) durante 1 hora y luego se reveló incubando con GAM-TRITC (para microscopía) o GAM-FITC (para FACS), durante 1 hora, previa incubación con el AMC 9E10 (anti *c-myc*) en el caso del revelado del scFv. Las incubaciones se realizaron siempre a 4°C (marcación de superficie). Para observar la inmunofluorescencia intracelular, las células fueron fijadas y permeabilizadas con paraformaldehído al 3%, saponina 0,1% y las incubaciones posteriores se realizaron en presencia de saponina 0,1%. Todas las diluciones se realizaron en PBS. Los preparados, montados en Mowiol, se observaron en un microscopio confocal Zeiss y fueron también analizados por FACS.

4.1.4 Co-localización con marcadores de compartimentos intracelulares

La internalización se llevó a cabo según se indica en el punto 4.1.2. Para visualizar la colocación de FC-5.01, FC-501-TT, Fab o scFv con marcadores intracelulares de endosomas tempranos, lisosomas y MIICs, se realizó una inmunofluorescencia indirecta doble. Las células fueron incubadas secuencialmente con: Acs anti-ratón marcados con cy3 ó cy5 (para revelar al FC-5.01, su conjugado o sus fragmentos), Acs primarios anti-EEA1, LAMP-2 o MHCII y los anticuerpos secundarios correspondientes marcados con cy3 ó cy5, según se indica en Resultados. Se realizaron controles de marcación inespecífica

con inmunoglobulinas control de isotipo y controles de reacción cruzada entre los distintos anticuerpos utilizados. Los preparados fueron montados en Mowiol y observados en el microscopio confocal Zeiss.

4.2 Inmunoprecipitación

Se llevó cabo a partir de extractos de CDs clarificados mediante incubación con proteína G Sepharosa 4B (Amersham Pharmacia) durante 1 hora a 4°C y posterior centrifugación a 5.000 rpm durante 5 min., repitiéndose este procedimiento 3 veces.

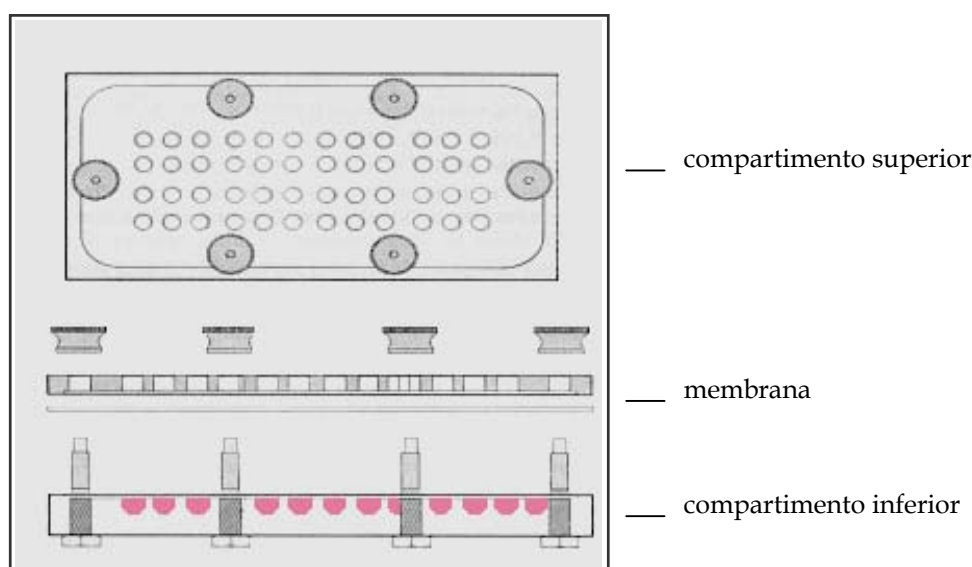
Los lisados celulares fueron incubados con AMC FC-5.01 ó AMC anti-CD11b, O.N. a 4°C. Los complejos inmunes fueron recolectados en proteína G Sepharosa 4B luego de una segunda incubación O.N. a 4°C. Luego de centrifugar a 5.000 rpm durante 5 min., el sobrenadante fue desechado, la resina se lavó 3 veces con el buffer de inmunoprecipitación descrito en el punto 2.3 y los complejos inmunes fueron eluidos de la resina con buffer de siembra Laemmli y resueltos en un gel 10% de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes no reductoras. Las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa y visualizadas con el anticuerpo anti-dectin-1 seguido de HRP-GAR usando un kit de detección de quimioluminiscencia (Western Blotting Luminol Reagent for enhanced chemiluminescence, Santa Cruz Biotechnology, Sta. Cruz, CA, USA) o con los anticuerpos FC-5.01 o CD18, seguidos de AP-GAM usando BCIP/NBT.

Se llevaron a cabo inmunoprecipitaciones control usando inmunoglobulinas control de isotipo IgG2a.

4.3 Quimiotaxis

Se realizó en una cámara de quimiotaxis de 48 wells (NeuroProbe, Gaithersburg, MD), en cuyo compartimento inferior se colocaron las citoquinas diluidas en RPMI-0,1% BSA (MIP-1 α y MIP-5³¹⁶, PeptoTech) o sólo RPMI-BSA como control (**Esquema 7**). Las CDs se pre-incubaron con los AMCs correspondientes durante 30 min. a 37°C y luego se sembraron en el compartimento superior de la cámara (7,5x10⁴ CDs/well). Entre ambos compartimentos se colocó una membrana de policarbonato (Nucleopore Co., Pleasanton, CA) con poros de 5 μ m, que las CDs debieron atravesar en respuesta al quimioattractante. Luego de una incubación de 90 min. a 37°C, se eliminaron las células de la cara superior y las células ubicadas en la cara inferior de la membrana se tiñieron con Giemsa y se contaron al microscopio óptico. Se analizaron 5 campos representativos por well (aumento de 40X) y 3 wells por condición. Los resultados se expresaron como el promedio de los triplicados \pm SD. El análisis estadístico se realizó utilizando el test t de Student.

ESQUEMA 7. Cámara de quimiotaxis



4.4 Fagocitosis/endocitosis

4.4.1 Fagocitosis de levaduras

S. cerevisiae autoclavadas fueron agregadas a cultivos de CDs de 5 días (CDs inmaduras) en una proporción 30:1 (levaduras:CDs). Las CDs fueron en algunos casos previamente incubadas con manano, laminarina o ambos poliósidos (0,6 mg/ml, 15 min., Sigma). Luego de 4 hs. de incubación a 37°C, se recolectaron las células y se incubaron con un anticuerpo anti-HLA-II marcado con FITC, con FC-5.01 o con los restantes anticuerpos anti-tetraspaninas (2° Ac: GAM-PE).

El porcentaje de fagocitosis se obtuvo contando las CDs teñidas con May Grunwald-Giemsa con más de 5 levaduras en su citoplasma.

En otro ensayo, se analizó si CD63 acompañaba a las levaduras fagocitadas. En este caso, las CDs fueron incubadas con FC-5.01 durante 1 hora a 4°C, previo al agregado de las levaduras. Luego de las 4 hs. de incubación, las células fueron lavadas y permeabilizadas con PBS/saponina, y el complejo FC-5.01-CD63 se detectó mediante inmunofluorescencia con anticuerpos GAM-cy3 (según se indica en 4.1.1) y posterior microscopía confocal.

4.4.2 Endocitosis de FITC-dextrán

Se incubaron CDs inmaduras con FITC-dextrán (FITC-Dx) (1mg/ml, Sigma) durante 30 min. a 37°C; en algunos casos se pre-incubaron las células con manano (0,6 mg/ml), durante 15 min. A continuación las células fueron recolectadas, lavadas e incubadas con FC-5.01 o los anticuerpos anti-tetraspaninas correspondientes (2° Ac: GAM-PE).

4.4.3 Fagocitosis de partículas de látex

Se incubaron CDs inmaduras con partículas de látex marcadas con FITC (latex beads, Sigma) en una proporción de 5×10^7 partículas/ 10^6 células. Las células fueron en algunos casos previamente incubadas con manano, laminarina o ambos poliósidos (0,6 mg/ml, durante 15 min.). Luego de 4 hs. de incubación a 37°C, las CDs fueron recolectadas, lavadas e incubadas con los anticuerpos primarios correspondientes, seguidos de anticuerpos secundarios marcados con PE.

4.4.4 Infección con el virus del dengue

4.4.4.1 Infección de células dendríticas

CDs inmaduras en suspensión fueron incubadas con AMC anti-tetraspaninas durante 30 min. a 37°C, lavadas e infectadas con partículas virales a una multiplicidad de infección (MOI) de 10^{-2} a 1 (10^{-2} -1 partículas/CD) durante 2 hs. a 37°C (agitando cada 30 min.). Luego de ese lapso de tiempo, las células fueron lavadas repetidas veces (para eliminar las partículas virales remanentes en suspensión) e incubadas durante 5 días en medio AIM-V suplementado con GM-CSF e IL-4. Se realizaron controles con CDs sin pre-incubar con AMC, infectadas y sin infectar.

Cada día se tomó una alícuota de sobrenadante de cultivo de CDs de cada condición y se congeló a -70°C.

4.4.4.2 Infección de células BHK con sobrenadantes de células dendríticas infectadas. Observación de placas de lisis.

Se despegaron las células BHK de placas de cultivo de 100 mm de diámetro (p100) mediante tripsinización (solución 0,25% tripsina, 1 mM EDTA

en PBS), se plaquearon en placas de cultivo de 24 pocillos y se cultivaron hasta alcanzar una confluencia de aproximadamente el 80%. Luego se incubaron durante 1 hora (agitando cada 15 min.) con los sobrenadantes de CDs infectadas (recolectados según se explica en el punto anterior), en diluciones variables en PBS. A continuación, se agregó a cada pocillo 1 ml de la mezcla de una solución de metil-celulosa al 1,6% y medio MEM 2X (en proporción 1:1) y se incubó a 37°C, sin mover, durante 7 días.

Al cabo de ese tiempo, las células se fijaron con formaldehído al 10% durante 2 hs. a 37°C, se descartó el contenido de los pocillos y se reveló con una solución de cristal violeta al 1% en etanol al 20%. Se contó el número de placas de lisis observadas en cada pocillo.

4.5 Proliferación de linfocitos respondedores al toxoide tetánico

A partir de un dador sano vacunado recientemente contra el tétanos, se obtuvieron CDs y linfocitos, según se explicó en el punto 2.1. Se incubaron las CDs inmaduras con concentraciones de 10^{-5} a 100 $\mu\text{g/ml}$ de FC-5.01-TT, FC-5.01 o TT durante tiempos variables (de 2 a 24 hs). A continuación, se agregó 1 $\mu\text{g/ml}$ de LPS (para inducir la maduración de las CDs) y se incubó a 37°C durante 24hs. Seguidamente, se fijaron las CDs con paraformaldehído al 1% durante 30 min. a 4°C, se co-cultivaron con los linfocitos del mismo dador (15.000 CDs y 400.000 linfocitos/pocillo en placas de 96 pocillos de fondo redondeado, en 200 μl de medio AIM-V) durante 72 hs. y se agregó 1 μCi de ^3H -timidina/pocillo 18 hs. antes de la finalización de la incubación. Las células se cosecharon y se evaluó la proliferación de los linfocitos respondedores midiendo la incorporación de ^3H -timidina en un contador de centelleo. Los ensayos fueron realizados por triplicado. Los resultados se expresan como el promedio de las cpm +/- SD de los triplicados. Se realizaron controles de proliferación de los linfocitos frente a CDs no cargadas, y de linfocitos y CDs cultivados por separado.

RESULTADOS

1. Obtención de células dendríticas humanas

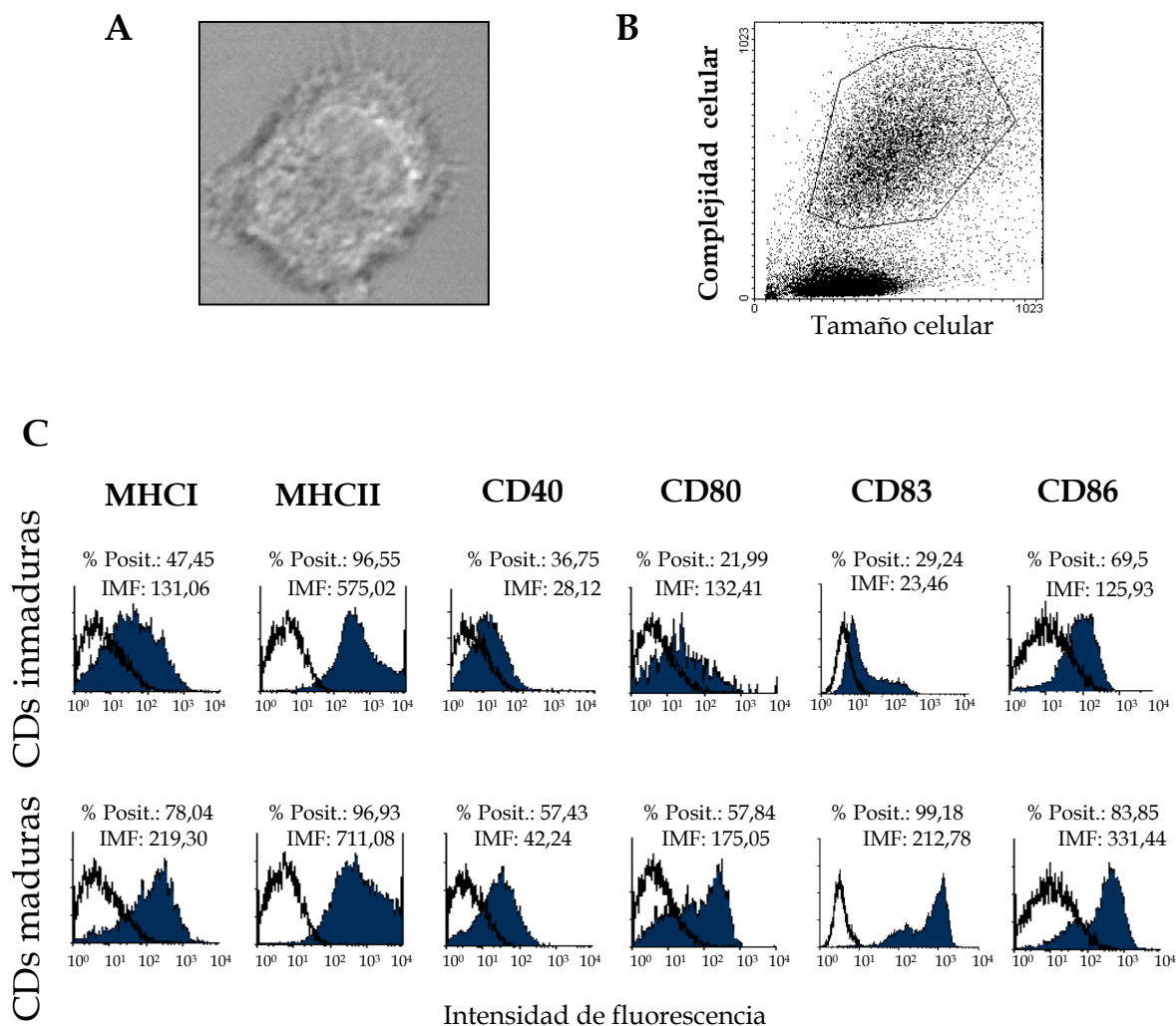
Las CDs fueron obtenidas a partir de monocitos de sangre periférica de dadores sanos, según se describe en Materiales y Métodos. Los monocitos son inicialmente adherentes a las placas de cultivo, pero al diferenciarse a CDs van perdiendo dicha característica y luego de cinco días de cultivo en presencia de las citoquinas IL-4 y GM-CSF se obtienen CDs que crecen en suspensión o semi-adheridas. Dichas células se caracterizan morfológicamente por presentar protrusiones o dendritas en la membrana plasmática (**Figura 12A**).

1.1 Expresión de marcadores de superficie de células dendríticas

En primer lugar, las CDs inmaduras y maduras con LPS fueron caracterizadas mediante el análisis por citometría de flujo (FACS) de la expresión de moléculas marcadoras de superficie (MHCI, MHCII, CD40, CD80, CD83, CD86), de modo de validar nuestro sistema (**Figura 12B y C**).

Se observó un marcado incremento en la expresión de las moléculas involucradas en la presentación antigénica MHCI y MHCII y de las moléculas co-estimuladoras de la presentación CD40, CD80, CD83 y CD86 en las CDs maduras, como se esperaba, de acuerdo con lo descripto para estas células.

FIGURA 12. Expresión de marcadores de superficie de células



A. Observación al microscopio de una CD inmadura, en contraste de fase. Aumento: 60X.

B. Selección de la región correspondiente a las CDs (polígono) por citometría de flujo. Las células fuera de la región corresponden a los linfocitos y debris celular.

C. Análisis de la expresión de superficie de moléculas marcadoras de CDs, por FACS. En los histogramas coloreados se muestra la expresión de superficie de las moléculas indicadas y en los blancos, la marcación con inmunoglobulinas control de isotipo. % Posit. : porcentaje de positividad; IMF: intensidad media de fluorescencia.

2. Tetraspaninas en células dendríticas

2.1 Expresión de CD63 y otras tetraspaninas en células dendríticas

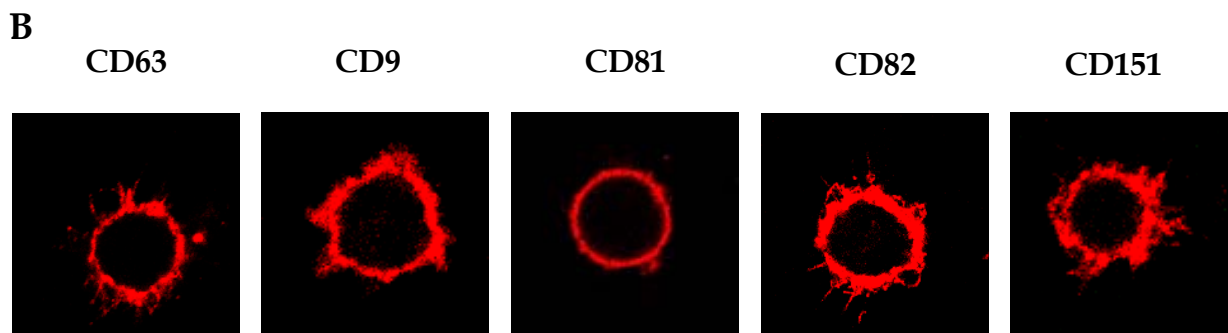
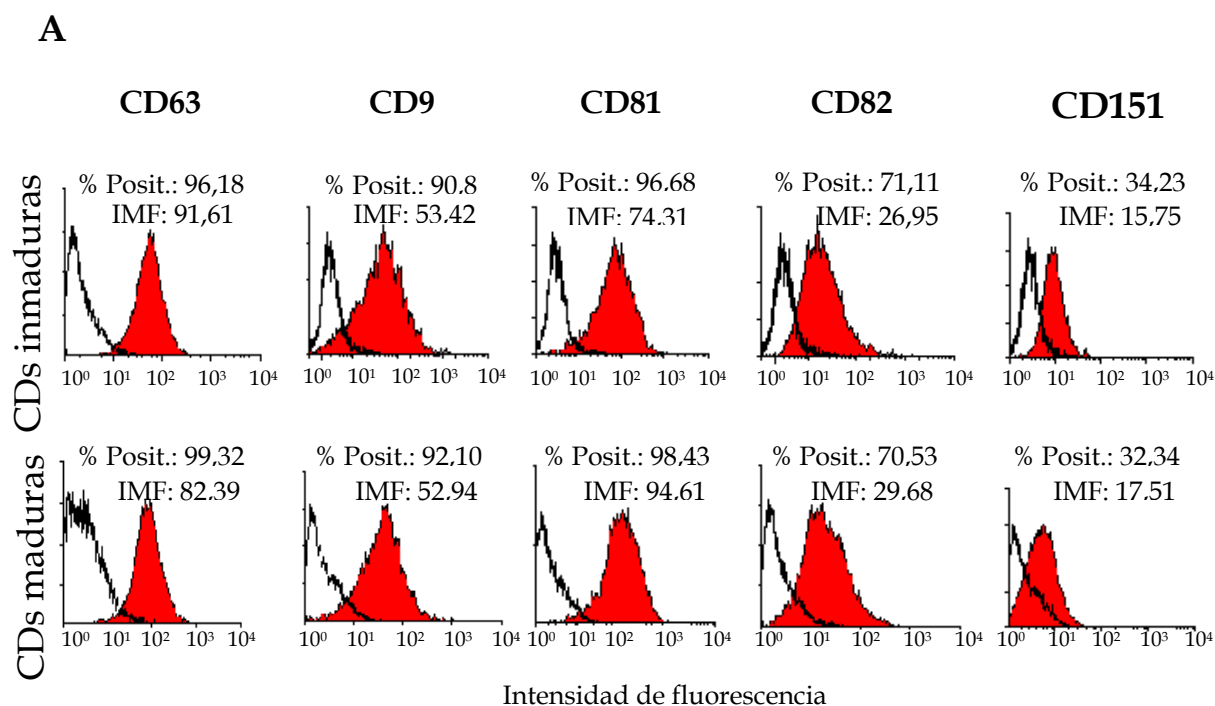
La expresión de las tetraspaninas **CD63**, **CD9**, **CD81**, **CD82** y **CD151** fue analizada en CDs inmaduras y maduras, tanto mediante FACS como microscopía confocal (**Figura 13** y **Figura 14**).

En las CDs inmaduras, la expresión de superficie de **CD9**, **CD63** y **CD81** es similar, mientras que la de **CD82** es menor y la de **CD151** es poco detectable. En el caso de las CDs maduras, no se observaron diferencias en la expresión con respecto a las CDs inmaduras (**Figura 13A**). La expresión de **CD63** en la membrana es en general uniforme (**Figura 13B** y **Figura 15**), aunque en algunas células aparece polarizada (**Figura 16**, panel superior izquierdo).

Con respecto a la expresión intracelular de las tetraspaninas, el análisis de células permeabilizadas demuestra que **CD63**, **CD82** y **CD81** (en menor grado), se expresan también en compartimentos citoplasmáticos, mientras que **CD9** y **CD151** se expresan exclusivamente en la superficie celular (**Figura 14**). En el análisis por FACS, se observa un corrimiento hacia mayores intensidades de fluorescencia en los histogramas correspondientes a **CD63**, **CD81** y **CD82** en CDs permeabilizadas (expresión total), con respecto a los histogramas de células incubadas a 4°C (expresión de superficie), siendo más notable en el caso de **CD63**. En cambio, los histogramas correspondientes a **CD9** y **CD151** son prácticamente superponibles en ambas condiciones (**Figura 14A**).

Por otra parte, la expresión de las tetraspaninas estudiadas en monocitos fue poco detectable (no mostrado).

FIGURA 13 . Expresión de superficie de tetraspaninas en células dendríticas

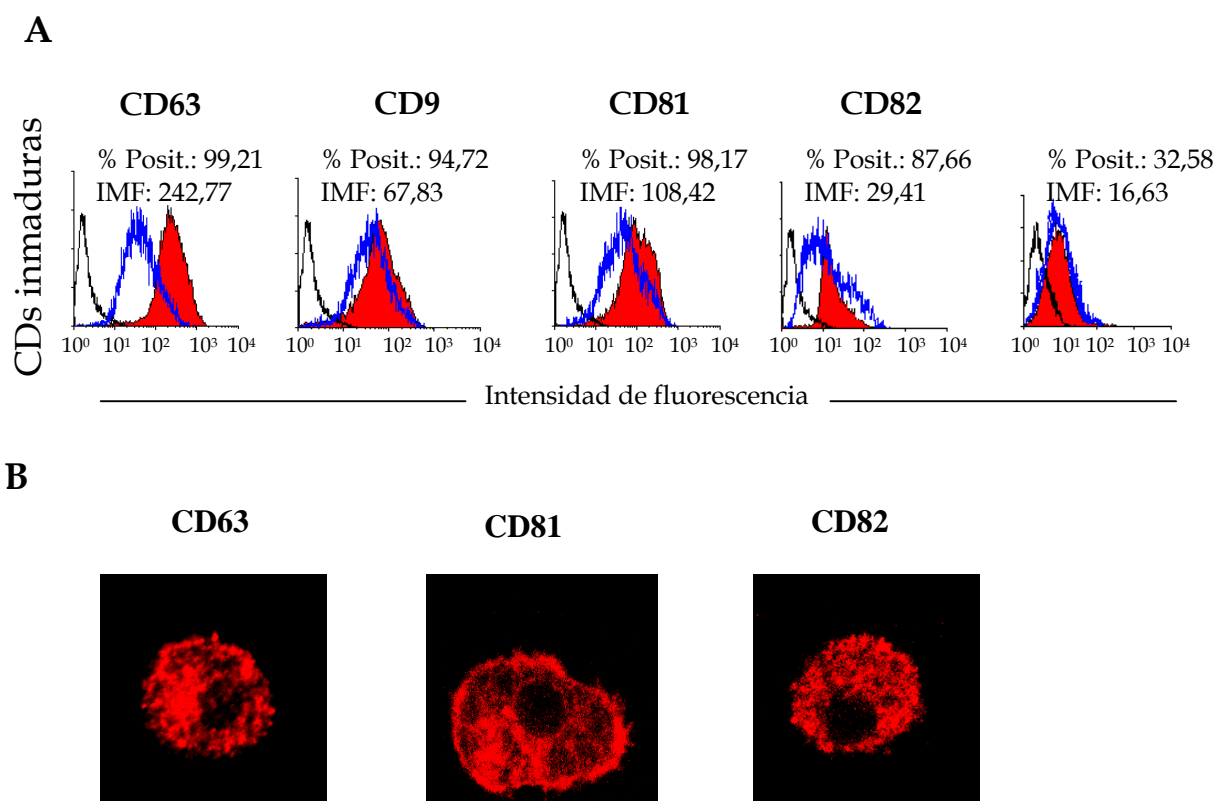


A. Análisis de la expresión de superficie de las tetraspaninas en CDs por FACS. En los histogramas coloreados se muestra la expresión de superficie de las moléculas indicadas y en los blancos, la marcación con inmunoglobulinas control de isotipo.

% Posit.: porcentaje de positividad; IMF: intensidad media de fluorescencia.

B. Análisis de la expresión de superficie de las tetraspaninas en CDs inmaduras por microscopía de fluorescencia. Aumento: 60X

FIGURA 14. Expresión intracelular de tetraspaninas en células dendríticas



A. Análisis de la expresión de tetraspaninas en CDs inmaduras permeabilizadas, por FACS. En los histogramas rojos se muestra la expresión total (de superficie e intracelular) de las moléculas indicadas; en los marcados con líneas azules, la expresión de superficie, y en los marcados con líneas negras, la marcación con inmunoglobulinas control de isotipo. % Posit.: porcentaje de positividad de la expresión total; IMF: intensidad media de fluorescencia.

B. Análisis de la expresión intracelular de tetraspaninas en CDs inmaduras por microscopía de fluorescencia. Aumento: 60X.

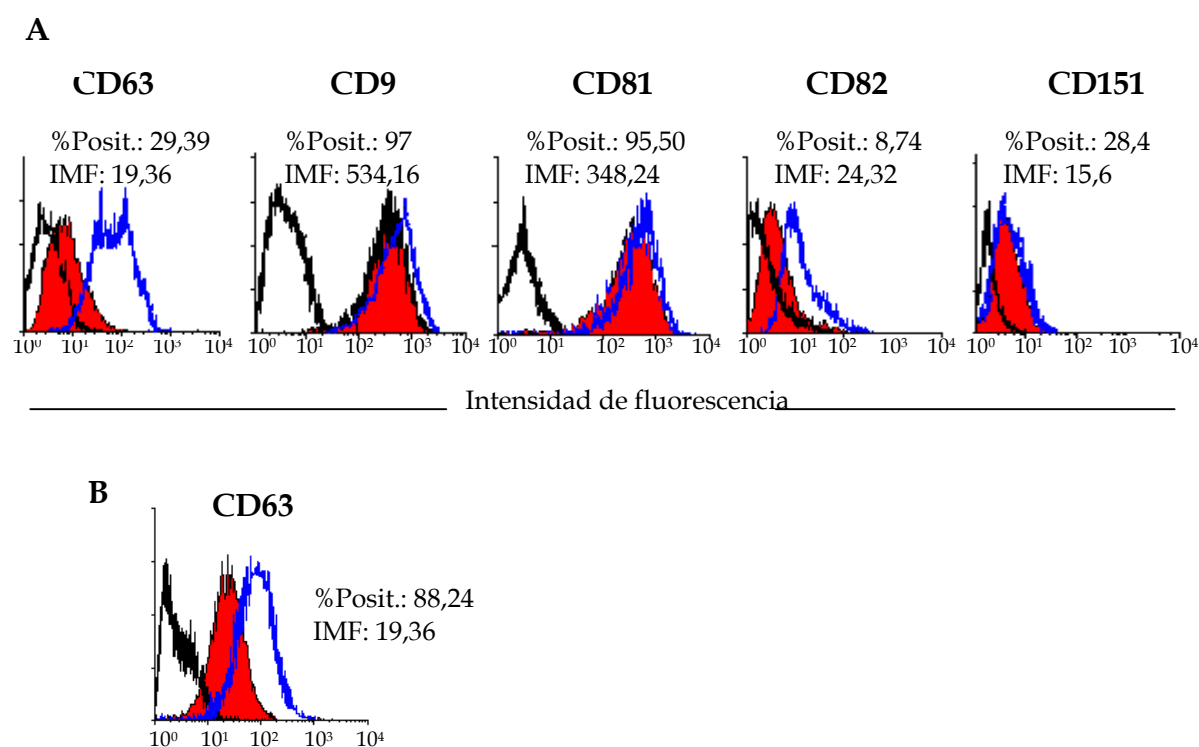
2.2 Internalización de tetraspaninas con AMCs específicos en células dendríticas

Quisimos en primer lugar investigar si el AMC FC-5.01, desarrollado en nuestro laboratorio, era capaz de internalizarse luego de la unión a CD63 en la superficie celular (como se había demostrado previamente en células IIB-BR-

G²⁴⁷, con el fin de estudiar el trayecto intracelular de CD63 en CDs y para la posible utilización del AMC como vehículo de péptidos antigénicos hacia CDs.

Analizamos también, mediante inmunofluorescencia, si la incubación con AMCs anti-tetraspaninas CD9, CD81, CD82 y CD151 inducía la traslocación intracelular de los complejos de superficie AMC-tetraspanina formados. Sólo los complejos FC-5.01-CD63 y AMC-CD82 se internalizaron a compartimentos citoplasmáticos (Figura 15, Figura 16 y Tabla 3).

FIGURA 15. Internalización de tetraspaninas inducida por anticuerpos



- A.** Análisis de la expresión de superficie de las tetraspaninas en CDs inmaduras, luego de la incubación a 37°C con AMCs específicos, por FACS. En los histogramas rojos se observa la expresión de las tetraspaninas luego de dicha incubación, en los marcados con líneas azules se observa la expresión de superficie de las tetraspaninas previa a la incubación con los Acs específicos, y en los marcados con líneas negras, la marcación con inmunoglobulinas control de isotipo. %Posit.: porcentaje de positividad. IMF: intensidad media de fluorescencia.
- B.** Análisis de la expresión de CD63 en CDs maduras, luego de la incubación a 37°C con el AMC FC-5.01, por FACS.

La internalización del complejo FC-5.01-CD63 también se detectó en CDs maduras, aunque en menor proporción que en las CDs inmaduras (**Figura 14B**), lo cual es congruente con la menor actividad endocítica de las CDs maduras en comparación con las inmaduras.

2.2.1 Destino intracelular de los complejos de superficie FC-5.01-CD63 en células dendríticas. Translocación a endosomas, lisosomas y MIICs

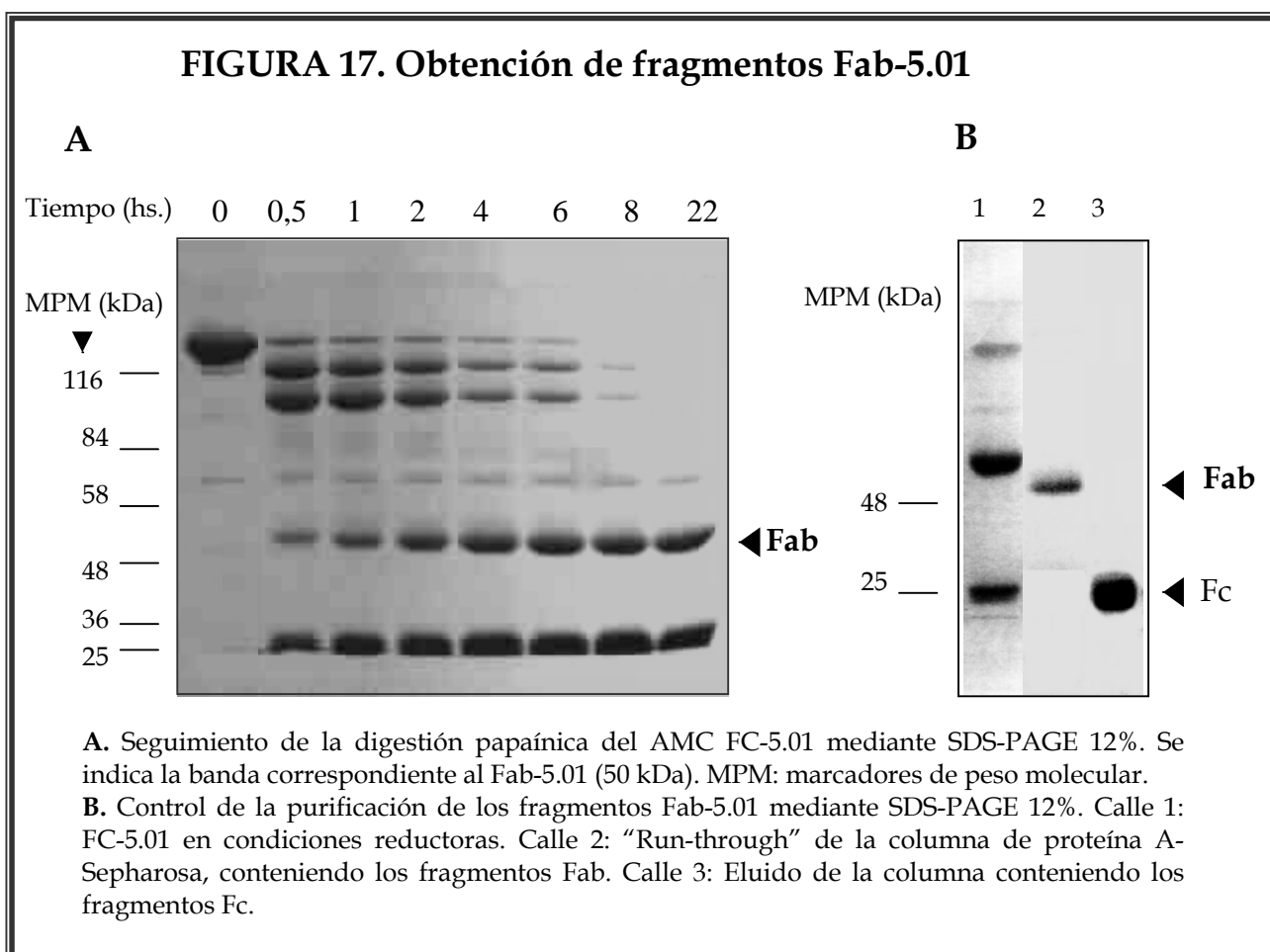
Luego de incubar el AMC FC-5.01 con CDs inmaduras, primero a 4°C y luego a 37°C, el complejo FC-5.01-CD63 fue detectado en varios compartimentos intracelulares, co-localizando con moléculas residentes de endosomas, lisosomas y MIICs (Figura 16). A 4°C, el complejo se detecta exclusivamente en la superficie celular, donde co-localiza con moléculas MHCII (tiempo 0). Al incubar a 37°C, el complejo se internaliza, y se lo detecta luego de 30 min. en endosomas tempranos (co-localización con EEA-1) y en algunas células en lisosomas (co-localización con LAMP-2) y MIICs (colocalización con MHCII). Luego de 60 min. de incubación, el complejo se localiza en los lisosomas de todas las células analizadas y en algunos casos en MIICs. A los 120 min., FC-5.01 abandona claramente los endosomas y se localiza principalmente en lisosomas y MIICs, lo cual indica que a dicho tiempo alcanza claramente los compartimentos donde tiene lugar el procesamiento antigénico y cargado de los péptidos a ser presentados.

Los complejos de superficie AMC-CD82 también co-localizan con moléculas MHCII luego de 60 min. de incubación a 37°C (no mostrado).

2.2.2 Preparación de fragmentos Fab-5.01

Con el fin de descartar la posibilidad de que parte de la internalización del AMC FC-5.01 se debiera a la unión del Ac a receptores a la región Fc presentes en la superficie de las CDs, y con el interés de investigar también si la agregación de CD63 con un Ac bivalente era un requisito para su internalización, decidimos preparar fragmentos Fab a partir del AMC FC-5.01 y repetir con dichos fragmentos el ensayo anterior de internalización.

Los fragmentos Fab (de aproximadamente 50 kDa) fueron obtenidos por digestión papaínica del AMC FC-5.01. Se realizaron digestiones durante distintos tiempos y se eligió 22 hs. como tiempo óptimo (**Figura 17A**). La purificación de los fragmentos se llevó a cabo según se indica en Materiales y Métodos y se controló mediante SDS-PAGE (**Figura 17B**).



2.2.2.1 Translocación de los complejos de superficie Fab-5.01-CD63 a endosomas, lisosomas y MIICs en células dendríticas

Se obtuvieron resultados similares a los descritos anteriormente para el complejo FC-5.01-CD63 (**Figura 18**). A tiempo 0, el complejo Fab-5.01-CD63 co-localiza con moléculas MHCII de la superficie celular. Luego de 30 min. de incubación a 37°C, se localiza en endosomas tempranos. A los 60 min., se concentra en lisosomas y a los 120 min. se lo encuentra principalmente en MIICs.

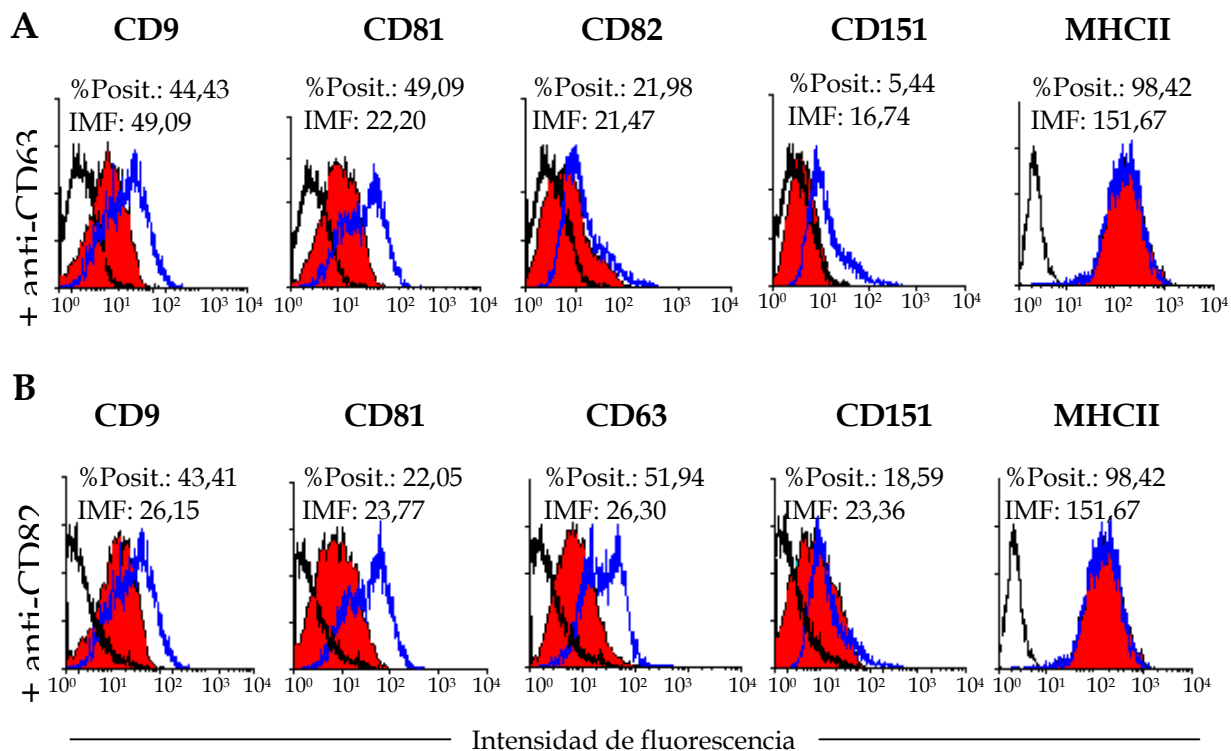
Por lo tanto, se pudo comprobar que la monovalencia de los fragmentos no afecta el reconocimiento antigénico ni la capacidad de internalización del complejo Fab-5.01-CD63. Asimismo, queda descartado que la internalización del complejo FC-5.01-CD63 se produzca por unión de la porción Fc del Ac y no por el reconocimiento del Ag a través del paratope.

2.2.3 *Expresión de superficie de las tetraspaninas luego de la incubación con AMCs anti-CD63 y anti-CD82*

Teniendo en cuenta el modelo de la “red de tetraspaninas” propuesto para otros tipos celulares²⁰, investigamos la posible asociación de las tetraspaninas entre sí mediante el análisis de su expresión de superficie luego de la internalización de CD63 y CD82 inducida por AMCs.

Observamos que la expresión de superficie de las tetraspaninas CD9, CD81, CD82 y CD151 disminuye luego de la incubación con el AMC anti-CD63 (FC-5.01). Del mismo modo, la expresión de superficie de las tetraspaninas CD9, CD63, CD81 y CD151 disminuye luego de la incubación con el AMC anti-CD82, mientras que la expresión de las moléculas HLAII permanece constante en ambos casos (Figura 19).

FIGURA 19. Internalización de tetraspaninas inducida por otras tetraspaninas



- A. En los histogramas rojos se muestra la expresión de superficie de las moléculas indicadas, en CDs inmaduras, luego de la internalización del complejo FC-5.01-CD63. Los histogramas marcados con líneas azules indican la expresión de las tetraspaninas previa a la internalización del complejo FC-5.01-CD63, y los marcados con líneas negras, la marcación con inmunoglobulinas control de isotipo.
- B. En los histogramas rojos se muestra la expresión de superficie de las moléculas indicadas, en CDs inmaduras, luego de la internalización del complejo AMC anti-CD82-CD82. Los histogramas marcados con líneas azules indican la expresión de las tetraspaninas previa a la internalización del complejo AMC-CD82, y los marcados con líneas negras, la marcación con inmunoglobulinas control de isotipo.

%Posit.: porcentaje de positividad correspondiente a la expresión de tetraspaninas post-internalización de los complejos. IMF: intensidad media de fluorescencia.

3. Asociación Tetraspaninas-Integrinas en células dendríticas

3.1 Efecto de los anticuerpos anti-tetraspaninas en la migración de células dendríticas inmaduras

Las tetraspaninas han sido involucradas en varias funciones celulares, entre ellas la migración, lo cual se ha atribuido a su asociación con integrinas en varios tipos celulares¹².

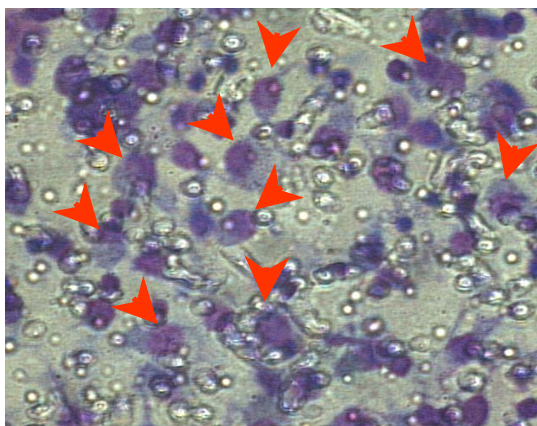
Por tal motivo, decidimos investigar si CD63 y otras tetraspaninas desempeñaban un rol en la migración de CDs inmaduras. Con tal fin, llevamos a cabo ensayos de quimiotaxis, utilizando las quemoquinas MIP-1 α y MIP-5 como quimioattractantes.

En dichos ensayos, observamos que la incubación previa de las CDs con los AMCs anti-CD9, -CD63, -CD81 y -CD82 estimula la migración inducida por las quemoquinas, mientras que la incubación con el AMC anti-CD151 no ejerce un efecto significativo sobre la migración celular. Cuando analizamos el efecto de los AMCs anti-tetraspaninas agregados conjuntamente, la migración aumentó en casi un 100% (**Figura 20**).

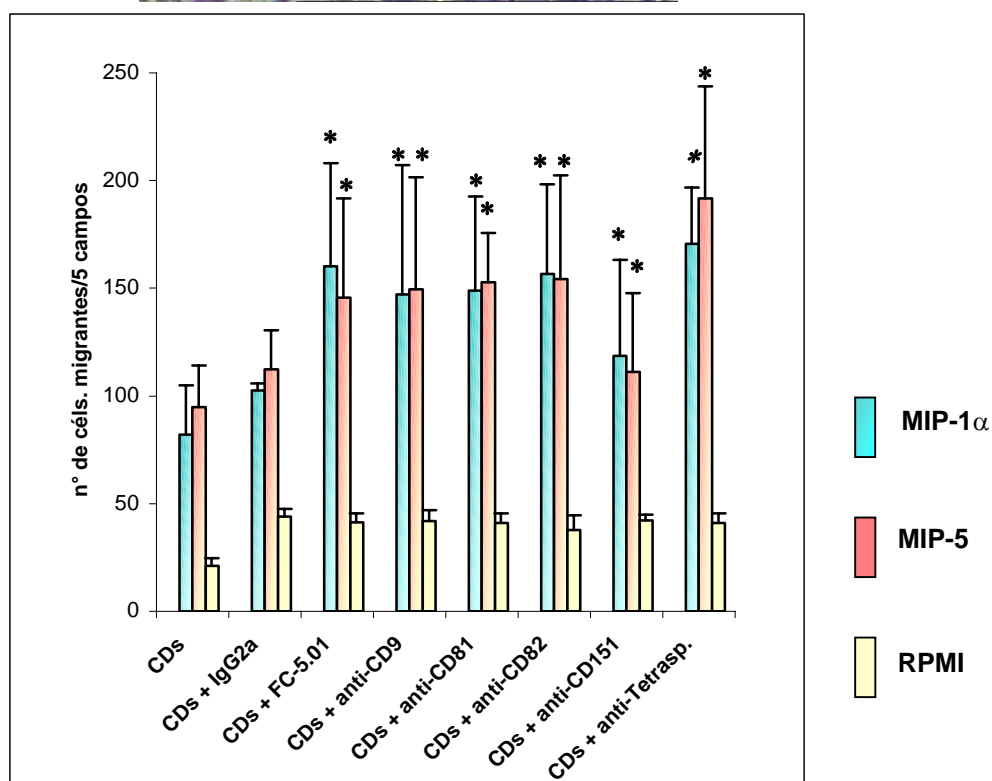
Teniendo en cuenta la asociación entre tetraspaninas e integrinas descrita para otros tipos celulares, el rol desempeñado por las integrinas en la motilidad celular y el aumento observado en la migración de CDs inmaduras luego de la incubación con los AMCs anti-tetraspaninas, decidimos investigar la posible asociación tetraspaninas-integrinas en CDs.

FIGURA 20. Migración de células dendríticas inmaduras

A



B

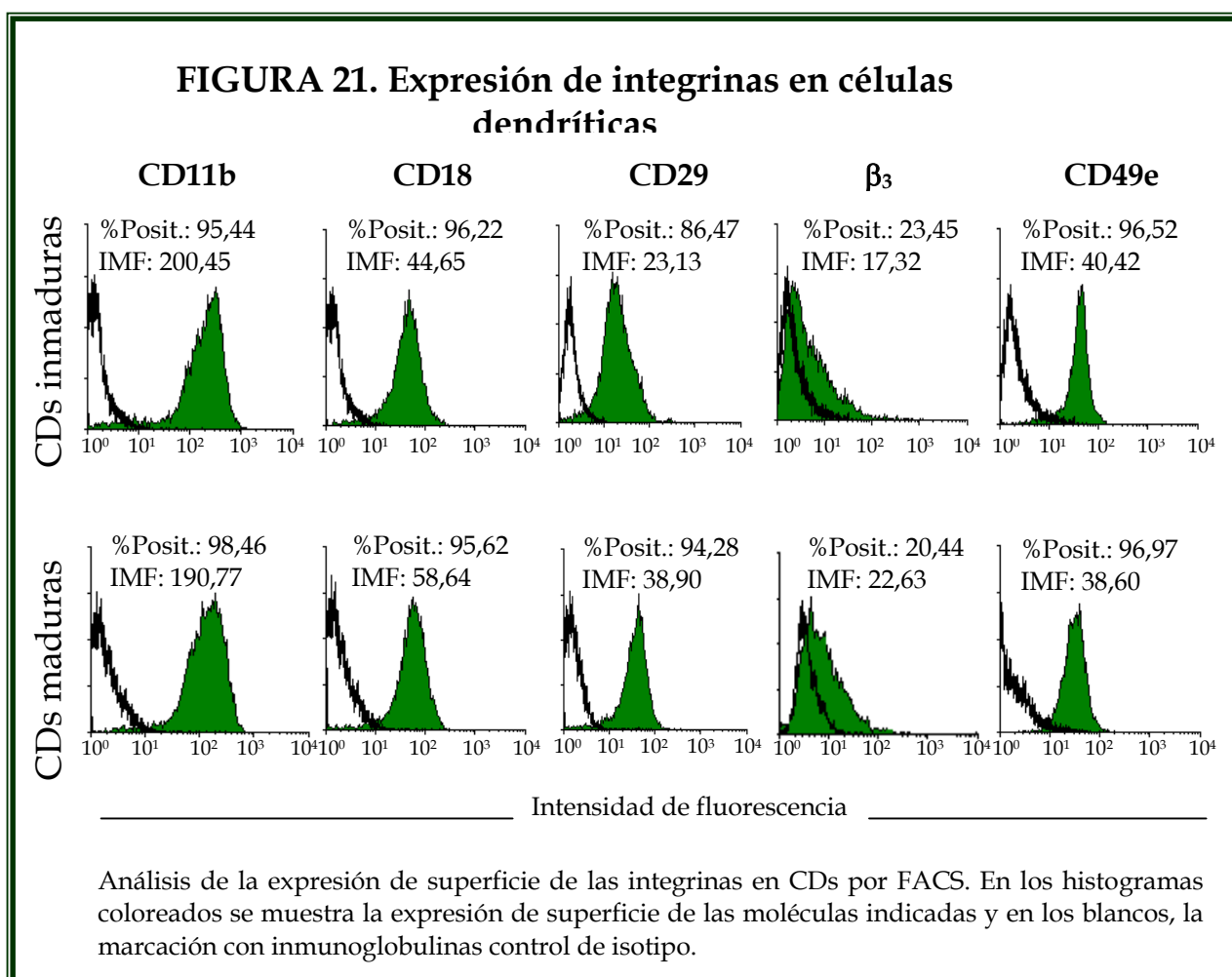


- A. Observación al microscopio de las CDs migratorias teñidas con Giemsa, en la membrana de policarbonato, según se explica en Materiales y Métodos. Aumento: 40X.
- B. Migración de las CDs inmaduras pre-incubadas con los Acs indicados, en respuesta a MIP-1 α y MIP-5. Las barras de error muestran la desviación standard. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las CDs incubadas con los AMCs correspondientes y las CDs incubadas con inmunoglobulinas control de isotipo (IgG2a), según el test t de Student de 2 colas.

3.2 Expresión de integrinas en células dendríticas

En primer lugar analizamos la expresión de las integrinas CD11b (α_M), CD18 (β_2), CD29 (β_1), β_3 y CD49e (α_5) en la superficie de CDs inmaduras y maduras, mediante FACS.

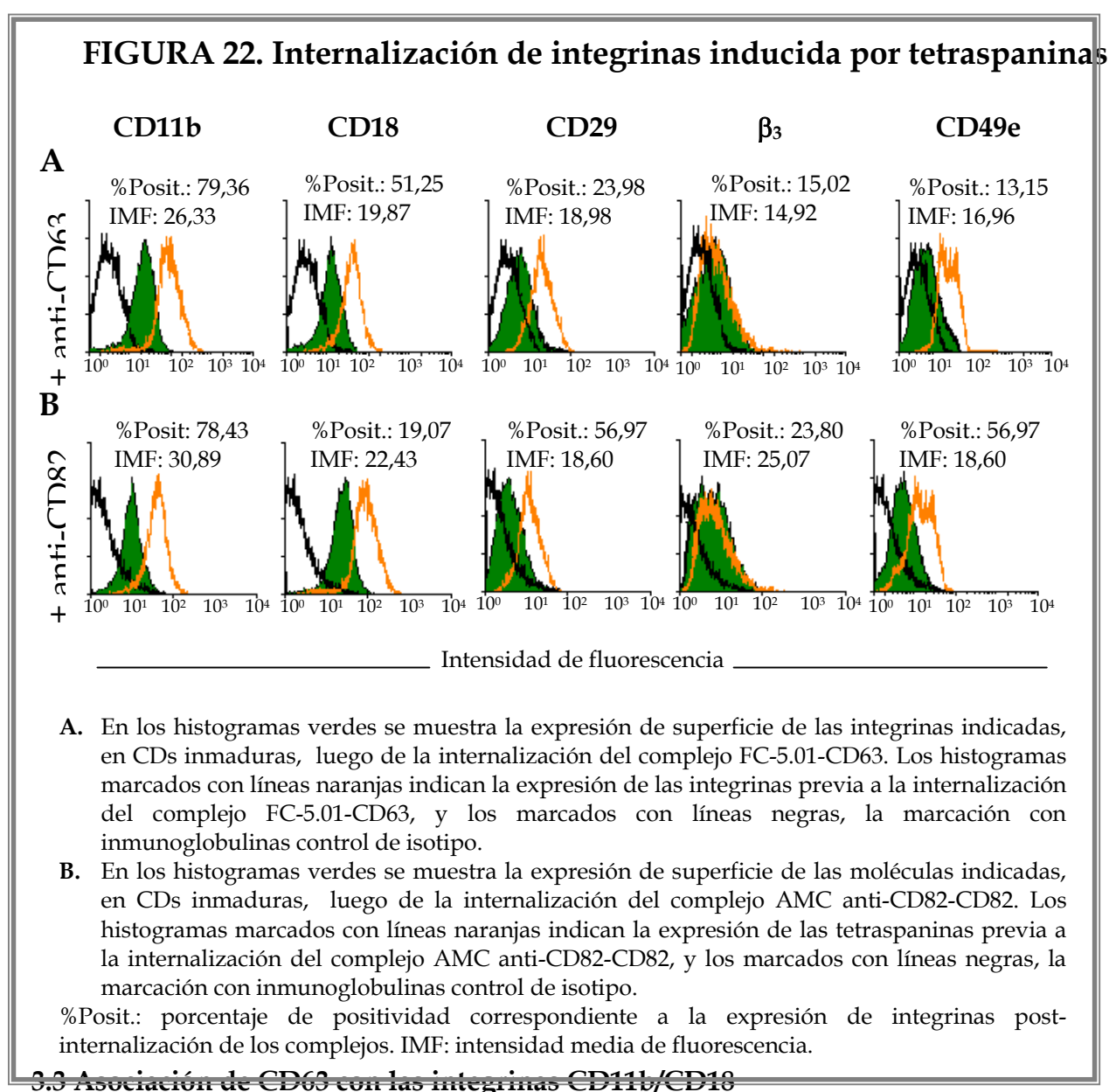
Observamos que las integrinas estudiadas se expresan en CDs, siendo menor la expresión de β_3 . Por otra parte, no detectamos diferencias significativas en la expresión entre CDs inmaduras y maduras (Figura 21).



3.2.1 Expresión de integrinas luego de la incubación con AMCs anti-CD63 y anti-CD82

A continuación analizamos la expresión de superficie de las integrinas CD11b, CD18, CD29, β_3 y CD49e en CDs inmaduras luego de la incubación con los AMCs anti-CD63 y anti-CD82.

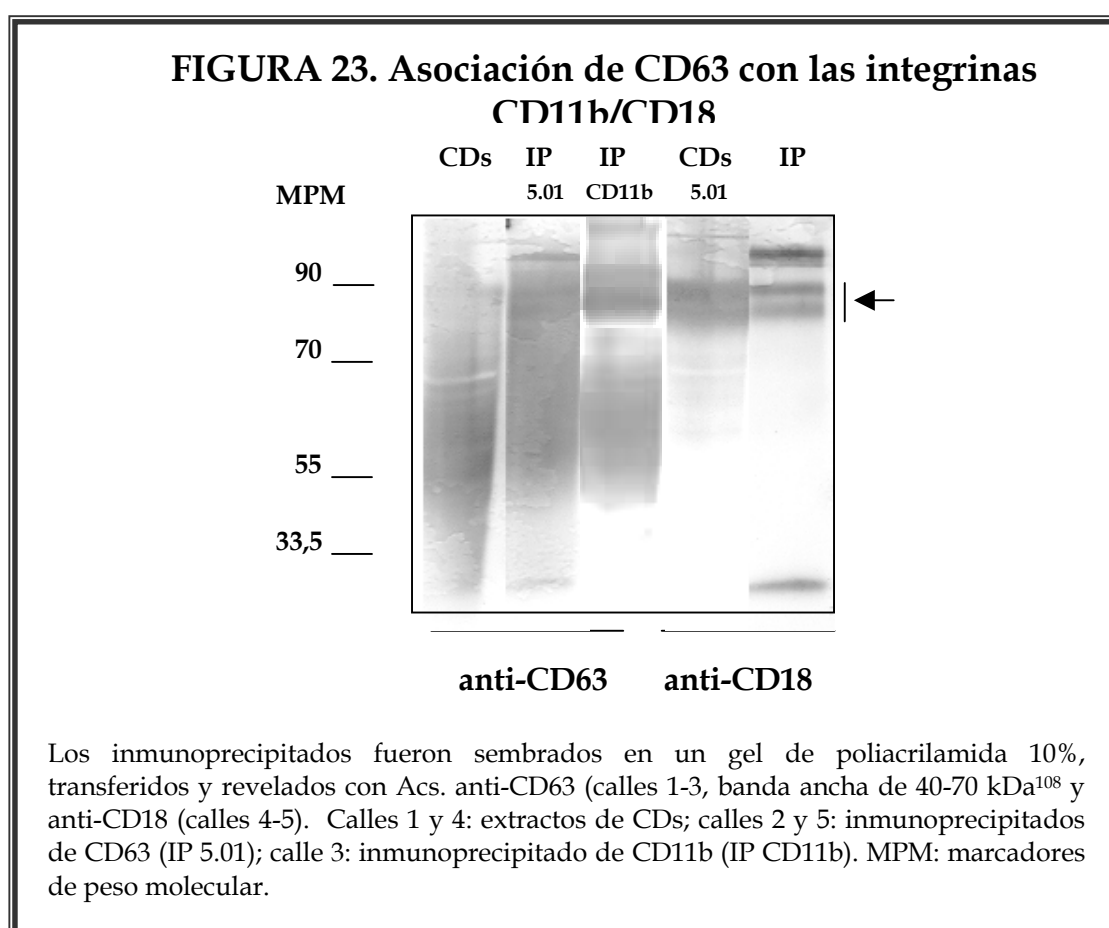
Observamos que la expresión de superficie de las integrinas analizadas, exceptuando β_3 , disminuye luego de la internalización de CD63 y CD82, del mismo modo que describimos anteriormente para las tetraspaninas (Figura 22).



Decidimos verificar, mediante inmunoprecipitación, la asociación de CD63 con las integrinas CD11b/CD18 en CDs inmaduras, la cual fue detectada en neutrófilos¹¹⁸.

Según se describe en Materiales y Métodos, inmunoprecipitamos CD63 utilizando el AMC FC-5.01 en un extracto de CDs inmaduras y revelamos con un Ac anti-CD18. Del mismo modo, inmunoprecipitamos CD11b utilizando un Ac específico y revelamos con el AMC FC-5.01.

De este modo detectamos la asociación de CD63 con las integrinas CD11b/CD18, confirmando los resultados sugeridos por los experimentos de internalización de CD63 descritos en el punto anterior (**Figura 23**).



y

el efecto de los AMCs específicos en la translocación intracelular de las mismas y la migración celular, se resumen en la **Tabla 3**.

TABLA 3. Expresión y características funcionales de las tetraspaninas en células dendríticas inmaduras

Tetraspanina	Expresión		Efecto de la unión de AMCs	
	Superficie	Citoplasma	Translocación	Migración
CD9	++	no	no	↑
CD63	++	sí	sí	↑
CD81	++	+/-	no	↑
CD82	+	sí	sí	↑
CD151	+/-	no	no	=

++: porcentaje de positividad mayor al 90%, con una IMF entre 50 y 90.

+: porcentaje de positividad del 70%, con una IMF intermedia (27).

+/-: porcentaje de positividad del 35%, con una IMF baja (16).

4. Participación de CD63 en la captura de antígenos extraños por las células dendríticas inmaduras

Las CDs inmaduras poseen diversos tipos de receptores para la captura de Ags, dentro de los cuales se encuentran los receptores de β -glucanos, el receptor de manosa (MR) y el DC-SIGN, los cuales les permiten, como se describió en Introducción, fagocitar partículas como bacterias y levaduras y endocitar Ags glicosilados y partículas virales.¹⁶²⁻¹⁶⁶

La demostrada capacidad de CD63 de translocarse a compartimentos intracelulares luego de la unión del FC-5.01 nos permitió suponer que dicha propiedad podría ser también inducida por otro estímulo, como la endocitosis o la fagocitosis de Ags extraños.

Por tal motivo, decidimos analizar el efecto de la captura de Ags extraños por las CDs inmaduras en la expresión de superficie de CD63.

4.1 Fagocitosis de *Saccharomyces cerevisiae*. Participación del receptor de β -glucanos (dectin-1)

En primer lugar estudiamos el efecto de la fagocitosis de *S. cerevisiae* en la expresión de superficie de CD63. Luego de la incubación de CDs inmaduras con levaduras (4 horas a 37°C), observamos que un porcentaje mayor al 85% de las CDs fagocitaban más de 5 levaduras/célula (**Figura 24A**). Con el fin de determinar qué tipo de receptores están involucrados en dicho proceso, las CDs fueron pre-incubadas con α -manano (polisacárido bacteriano que se une con alta afinidad al MR), con laminarina (glucano β -1,3 semejante al glucano de levaduras) o con ambos poliósidos, y luego se llevó a cabo el ensayo de fagocitosis anteriormente descrito. Como se muestra en la **Figura 24A**, la captación de *S. cerevisiae* no fue inhibida significativamente por el α -manano (porcentaje de inhibición del 6,2%). Contrariamente, con el agregado de laminarina al cultivo celular, se observó una notable inhibición de la fagocitosis

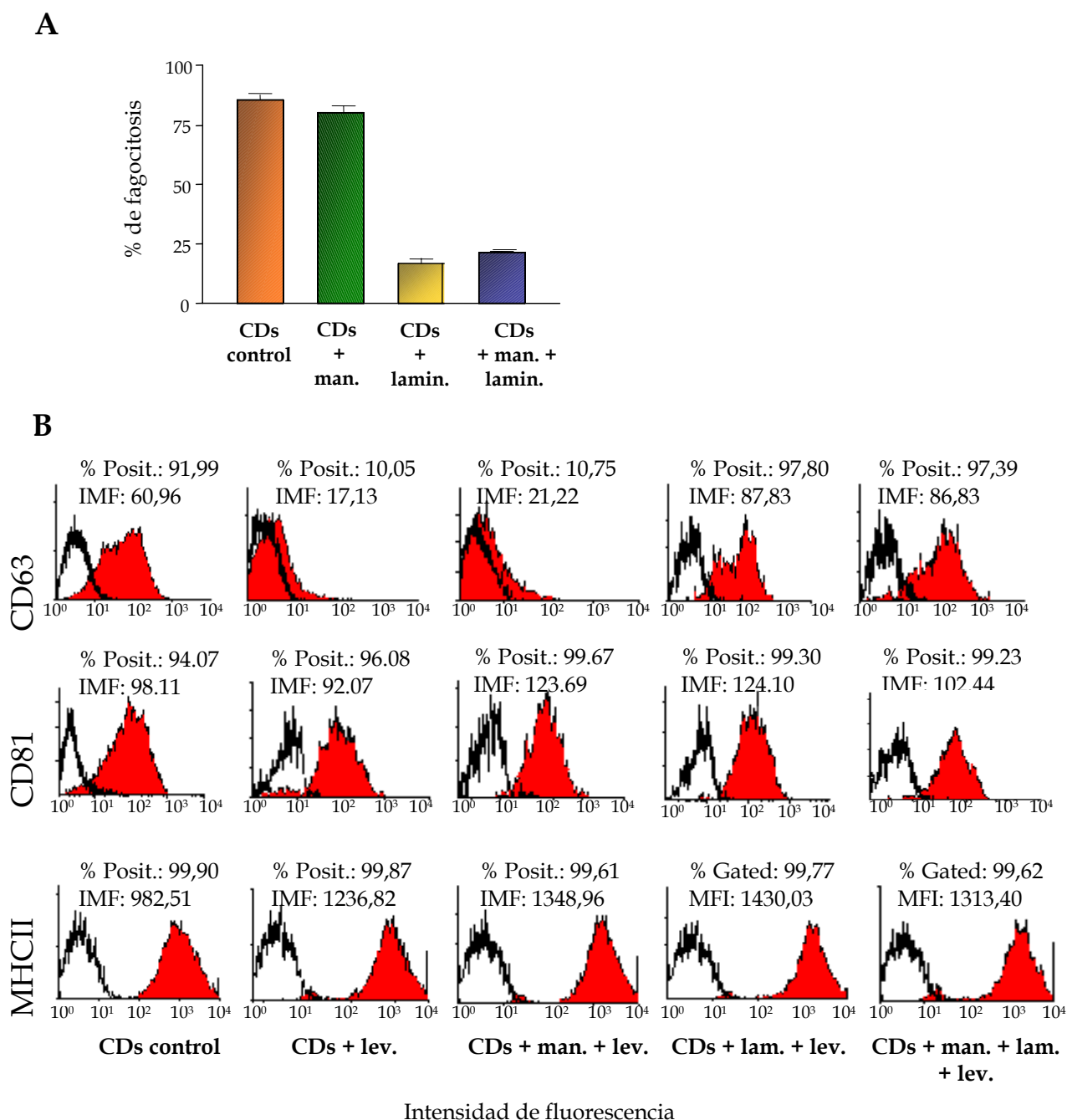
(porcentaje de inhibición del 80,4%), mientras que el agregado de manano y laminarina simultáneamente no modificó significativamente la inhibición observada con laminarina (73%). De los resultados obtenidos se deduce que el receptor de β -glucanos parece ser esencial para la fagocitosis de *S. cerevisiae*, mientras que este proceso involucraría al MR en forma secundaria.

4.1.1 Asociación de CD63 con *dectin-1*

El análisis por FACS de la expresión de superficie de CD63 en CDs luego de la fagocitosis de levaduras, mostró una importante disminución en la expresión de CD63 en comparación con las CDs control (sin incubar con levaduras) (**Figura 24B y C**). Dicha disminución pudo ser revertida con el agregado de laminarina previo a la fagocitosis, pero no con el agregado de manano, lo cual sugiere la participación del receptor de β -glucanos, pero no del MR, en dicho proceso. La disminución en la expresión de moléculas de superficie de las CDs no se trató de un proceso general, ya que no ocurrió con las tetraspaninas CD81 (**Figura 24B**), CD9 y CD82, ni con las moléculas MHCII (**Figura 24B y C**).

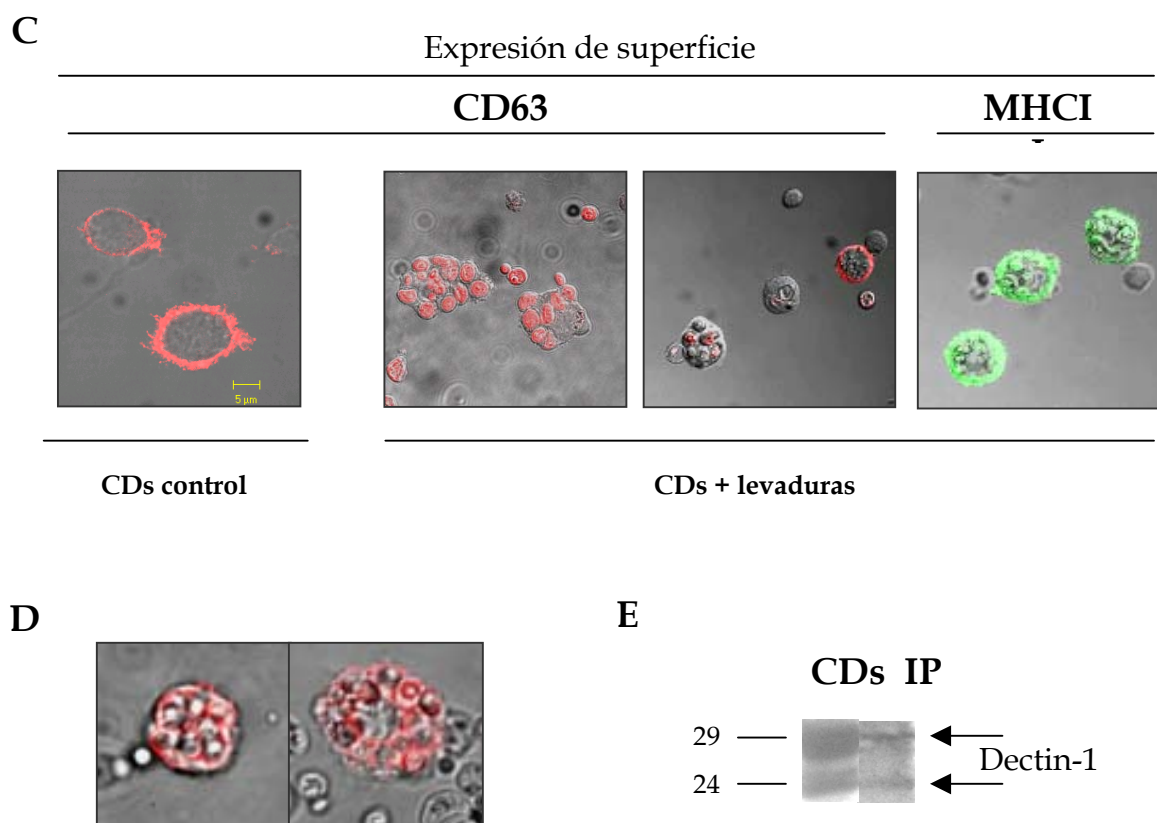
Con el fin de examinar si la disminución en la expresión de superficie de CD63 se debía a que dichas moléculas acompañaban a las levaduras fagocitadas, las CDs fueron pre-incubadas con FC-5.01 a 4°C durante 1 hora (unión a CD63 de superficie). Luego de centrifugar las células y remover el sobrenadante, se agregaron las levaduras y se prosiguió con la incubación a 37°C durante 24 hs. Posteriormente, las CDs fueron lavadas, permeabilizadas y analizadas por inmunofluorescencia y microscopía confocal, como se describe en Materiales y Métodos. Como se muestra en la **Figura 24D**, el complejo FC-5.01-CD63 se detectó rodeando a las levaduras fagocitadas.

Este resultado sugiere que CD63 se transloca desde la superficie hacia organelas intracelulares que contienen las levaduras fagocitadas.

FIGURA 24. Participación de CD63 en la fagocitosis de *S. cerevisiae*

- A. Los ensayos de fagocitosis fueron realizados con CDs inmaduras en presencia o ausencia de α -manano, laminarina o ambos poliósidos. Las diferentes condiciones se evaluaron por triplicado, se contaron como mínimo 200 células por punto y se calcularon los porcentajes de fagocitosis indicados.
- B. Se evaluó mediante FACS la expresión de superficie de CD63, CD81 y MHCII en CDs inmaduras luego de la fagocitosis de levaduras, en presencia o ausencia de los poliósidos indicados y en CDs control (no incubadas con levaduras). IMF: intensidad media de fluorescencia.

FIGURA 24. Participación de CD63 en la fagocitosis de *S. cerevisiae*
-continuación-



C. Se evaluó mediante microscopía de fluorescencia, la expresión de superficie de CD63 (rojo) y MHCII (verde) en CDs inmaduras luego de la fagocitosis de levaduras, y en células control (no incubadas con levaduras). Se observan las CDs conteniendo las levaduras en su interior. Aumento: 60X.

D. Observación al microscopio confocal de los complejos FC-5.01-CD63 rodeando las vacuolas de levaduras. Aumento: 100X.

E. Resultado de la inmunoprecipitación de CD63 y el revelado con el Ac anti-dectin-1. Los inmunoprecipitados fueron analizados mediante SDS-PAGE 10%, transferidos a nitrocelulosa y revelados. El Ac detecta una banda doble de aproximadamente 23 y 27 kDa, lo cual corresponde al peso molecular estimado de la forma completa de dectin-1 y su variante de splicing 1b¹⁷⁰ Calle 1: extracto de CDs; calle 2: inmunoprecipitado de CD63 (IP).

Finalmente, quisimos comprobar la posible asociación entre CD63 y el receptor de β -glucanos (dectin-1), sugerida por los experimentos de fagocitosis anteriormente descritos, mediante ensayos de inmunoprecipitación. Como se observa en la **Figura 24E**, dectin-1 co-inmunoprecipitó con CD63, es decir que pudimos confirmar la asociación entre CD63 y dectin-1 en CDs inmaduras.

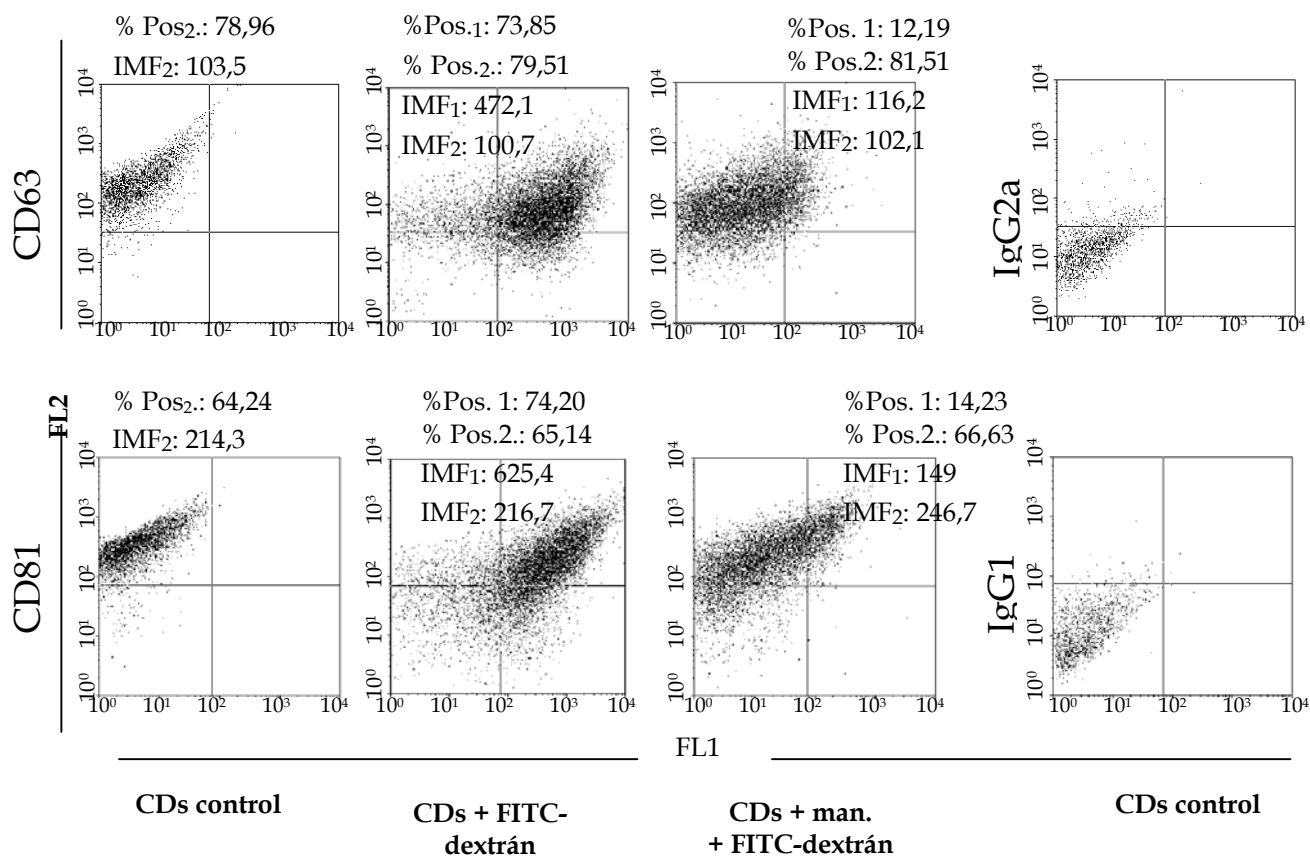
4.2 Endocitosis de FITC-dextrán

Seguidamente, analizamos el efecto de la captación de FITC-dextrán (FITC-Dx) en la expresión de superficie de CD63 y otras tetraspaninas en CDs inmaduras. Como se muestra en la **Figura 25** (abscisas) se observó un 77% de endocitosis de FITC-Dx luego de 30 min. de incubación de las CDs. Como se esperaba, la presencia de α -manano inhibió significativamente la captación de FITC-Dx (reducción del porcentaje de captación del 77% al 12%, lo cual implica una inhibición del 60%), ya que el MMR ha sido identificado como el principal receptor para la endocitosis de dicho azúcar³¹⁷.

4.2.1 CD63 no estaría asociado al receptor de manosa

En contraposición a lo observado luego de la fagocitosis de *S. cerevisiae*, no se detectó una disminución significativa en la expresión de superficie de CD63 ni de CD81 luego de la endocitosis de FITC-Dx (**Figura 25**, ordenadas). El mismo resultado se obtuvo con las demás tetraspaninas estudiadas (no mostrado).

FIGURA 25. CD63 no participa en la endocitosis de FITC-dextrán



Análisis de la expresión de superficie de CD63 y CD81 en CDs, por FACS, luego de la endocitosis de FITC-Dx en presencia o ausencia de los poliósidos indicados, y en CDs control (no incubadas con FITC-Dx). FL1: intensidad de fluorescencia de las partículas ingeridas. FL2: intensidad de fluorescencia de CD63, CD81 o inmunoglobulinas control de isotipo (IgG1 e IgG2a). %Pos.1: porcentaje de positividad correspondiente a los cuadrantes derechos superior e inferior (FITC-Dx endocitado). %Pos.2: porcentaje de positividad correspondiente a los cuadrantes superiores derecho e izquierdo (CD63, MHCII o inmunoglobulinas control de isotipo). IMF1: intensidad de fluorescencia correspondiente a los cuadrantes derechos superior e inferior. IMF2: intensidad de fluorescencia correspondiente a los cuadrantes superiores derecho e izquierdo.

4.3 Fagocitosis de partículas de látex

A diferencia de lo observado en la endocitosis de FITC-Dx, la fagocitosis de partículas de látex marcadas con FITC no fue inhibida con el agregado previo de manano. Tampoco sufrió variación con el agregado de laminarina ni de ambos poliósidos. Por otra parte, la expresión de superficie de CD63 no se modificó luego de la captación de las partículas de látex, al igual que en el caso de la endocitosis de FITC-Dx (**Figura 26**).

Del mismo modo, la expresión de superficie de las tetraspaninas CD81 (**Figura 25**), CD9 y CD82 y de las moléculas MHCI y MHC-II (**Figura 26**) no se modificó luego de la captación de FITC-Dx ni de las partículas de látex.

4.4 Infección con el virus del dengue. Endocitosis de partículas virales

Teniendo en cuenta:

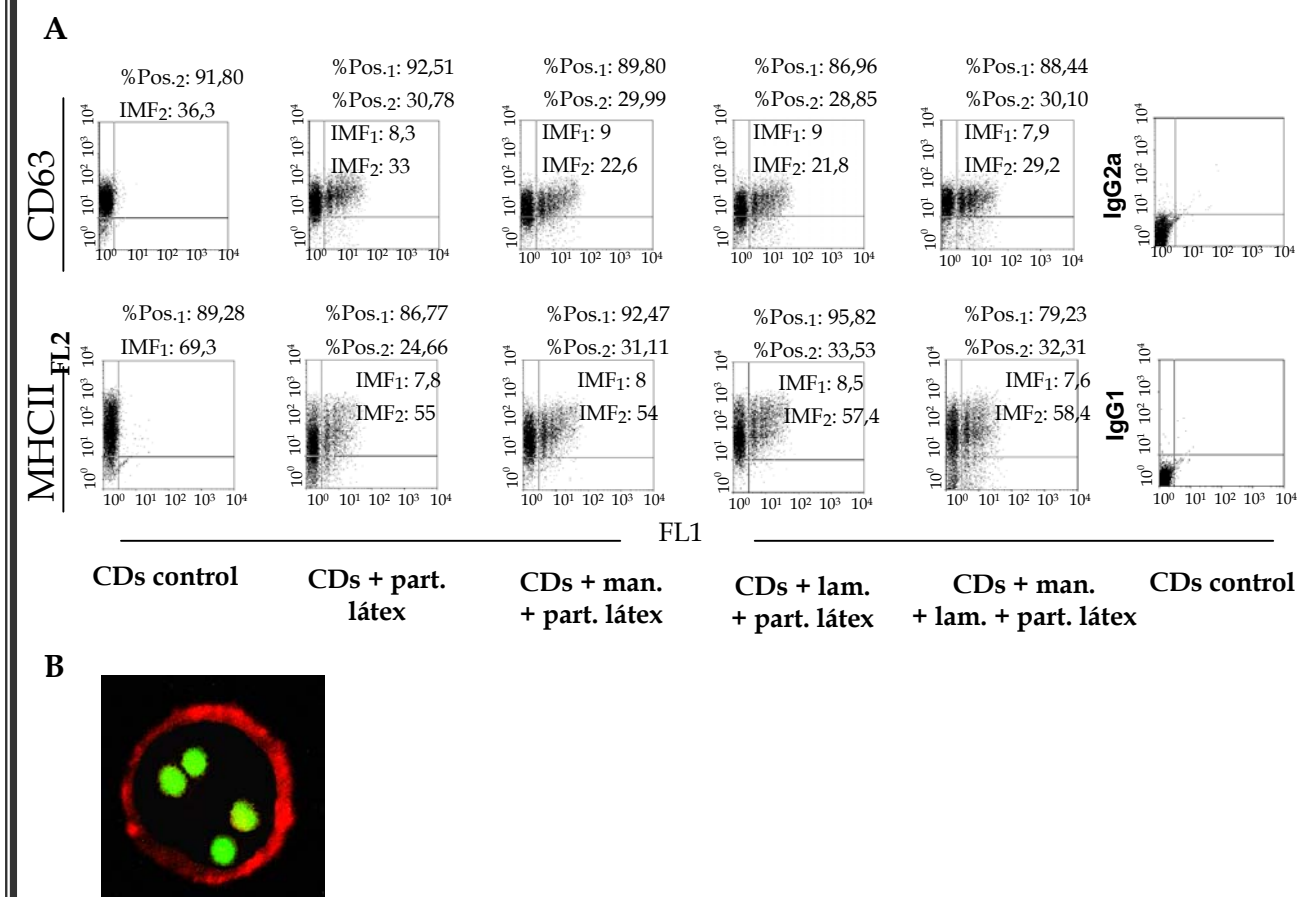
- a. nuestra observación de la participación de CD63 en la fagocitosis de *S. cerevisiae*,
- b. los datos bibliográficos que demuestran el rol de las tetraspaninas en las infecciones virales (Introducción, punto 1.2),
- c. la importancia del receptor DC-SIGN para la entrada de varios tipos de virus en las CDs, como el virus del dengue (Introducción, punto 2.2.1.2), y
- d. la localización de dicho receptor en microdominios “rafts” de la membrana plasmática, donde también pueden detectarse las tetraspaninas (Introducción, puntos 1.1 y 2.2.1.2),

decidimos analizar la posible participación de CD63 y las demás tetraspaninas estudiadas, en la infección con el virus del dengue.

Como se describe en Materiales y Métodos, infectamos con partículas virales CDs inmaduras pre-incubadas o no con AMCs anti-tetraspaninas,

lavamos las CDs y recolectamos los sobrenadantes de los cultivos a distintos tiempos luego de la infección, y añadimos dichos sobrenadantes a cultivos de células BHK, las cuales forman placas de lisis al ser infectadas.

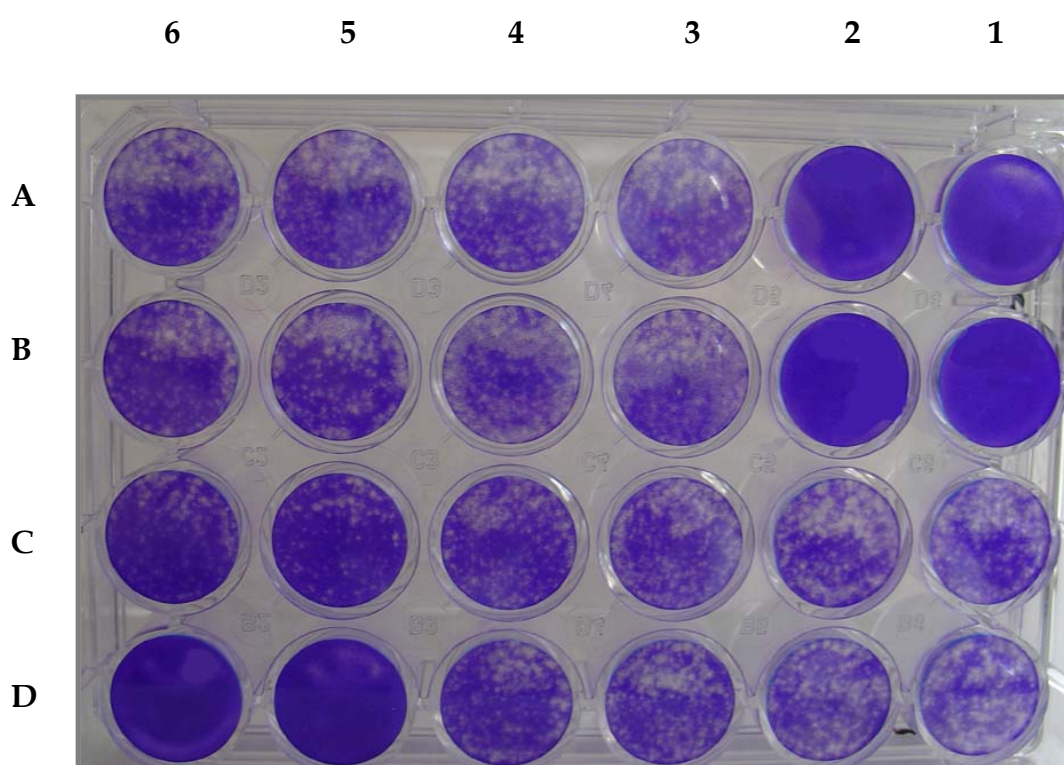
FIGURA 26. CD63 no participa en la fagocitosis de partículas de látex



- A.** Análisis de la expresión de superficie de CD63 y MHCII en CDs, por FACS, luego de la fagocitosis de partículas de látex en presencia o ausencia de los poliósidos indicados, y en CDs control (no incubadas con partículas). FL1: intensidad de fluorescencia de las partículas ingeridas. FL2: intensidad de fluorescencia de CD63, MHCII o inmunoglobulinas control de isotipo (IgG1 e IgG2a). %Pos.1: porcentaje de positividad correspondiente a los cuadrantes derechos superior e inferior (partículas ingeridas). %Pos.2: porcentaje de positividad correspondiente a los cuadrantes superiores derecho e izquierdo (CD63, MHCII o inmunoglobulinas control de isotipo). IMF1: intensidad de fluorescencia correspondiente a los cuadrantes derechos superior e inferior. IMF2: intensidad de fluorescencia correspondiente a los cuadrantes superiores derecho e izquierdo.
- B.** Observación al microscopio de la fagocitosis de látex-FITC por una CD inmadura. En rojo se observa la marcación de superficie del CD63. Aumento: 60X.

Las sobrenadantes de CDs comenzaron a ser infectivos a partir del día 2 luego de la infección. En ninguna de las condiciones descritas en Materiales y Métodos, las cuales incluyen las descritas para la inhibición de la infección mediante un AMC anti-DC-SIGN¹⁷⁴, pudimos detectar una variación en el número de placas de lisis observadas luego de la infección de las células BHK con los sobrenadantes de CDs infectadas (**Figura 27**).

FIGURA 27. CD63 no participa en la infección con el virus del dengue



Infección de células BKH con sobrenadantes de CDs infectadas. Observación de placas de lisis. MOI: 0,1. Sobredadantes (SN) de CDs: ½.

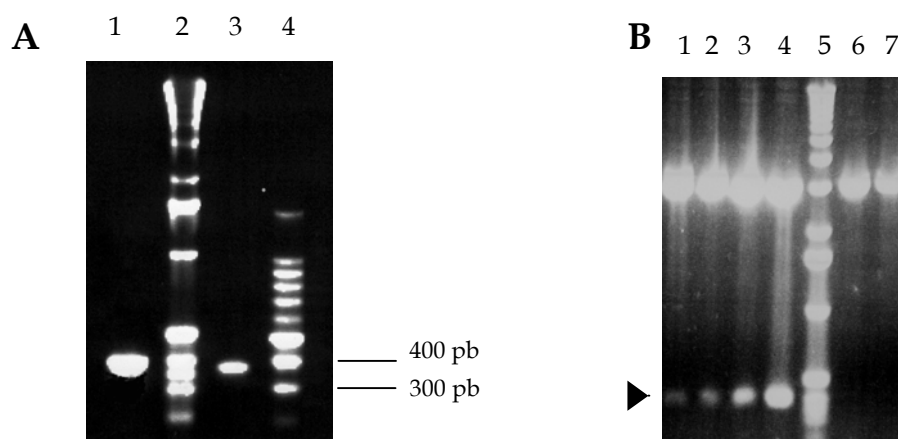
A1-A2, D5-D6: células BHK sin infectar. B1-B2: céls. BHK + SN control (tiempo 0 de infección). C1-C2: céls. BHK + SN de día 2 de infección. D1-D2, A3-A4: céls. BHK + AMC FC-5.01 + SN de día 2. B3-B4, C3-C4: céls. BHK + AMC anti-CD9 + SN de día 2. D3-D4, A5-A6: céls. BHK + AMC anti-CD81 + SN de día 2. B5-B6, C5-C6: céls. BHK + AMC anti-CD82 + SN de día 2.

5. Construcción de la molécula recombinante scFv-5.01-c-myc-his₆

5.1 Clonado y secuenciación de las regiones variables del AMC-FC-5.01

La amplificación, clonado y secuenciación de las regiones variables de las cadenas pesada (V_H) y liviana (V_L) del AMC FC-5.01 se llevó a cabo según se detalla en Materiales y Métodos, a partir del ARN total del hibridoma productor del AMC FC-5.01. El resultado de la amplificación por RT-PCR de dichas regiones, así como su ligación en el plásmido pGEM-T, se muestran en la **Figura 28**. Se obtuvieron productos de amplificación de aproximadamente 390 pb para la cadena pesada y 350 pb para la cadena liviana. En las muestras control (en ausencia de ADNc del hibridoma), no se observó amplificación con ningún par de primers.

FIGURA 28. Amplificación y clonado de las regiones variables del AMC FC-5.01



- A.** Productos de la amplificación de V_H y V_L analizados en un gel de agarosa 1%. Calle 1: Producto de amplificación de V_H . Calle 3: Producto de amplificación de V_L . Calle 2: Marcador de peso molecular de 1Kb (bandas de 220 pb a 2 kb). Calle 4: Marcador de peso molecular de 100 pb (bandas de 300 pb a 1kb).
- B.** Productos de digestión de los plásmidos pGEM-T luego de la ligación de V_H y V_L , analizados en un gel de agarosa 1%. Calles 1-2: Plásmidos conteniendo el inserto V_L . Calles 3-4: Plásmidos conteniendo el inserto V_H . Calles 6-7: Plásmidos sin inserto. Calle 5: Marcador de peso molecular de 1Kb.

A continuación, ambas regiones fueron secuenciadas, utilizando los oligonucleótidos adecuados para el vector pGEM-T. Para V_H se obtuvo una secuencia de 119 aminoácidos, y para V_L , de 105 aminoácidos. A partir de las secuencias de nucleótidos, se obtuvieron los marcos de lectura abiertos y las secuencias aminoacídicas, mediante el programa DNAMAN (Versión 5, Lynnon Biosoft). Posteriormente, dichas secuencias se ingresaron en la Base de Datos Kabat (Kabat, Jonhson) y se identificaron las regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) y las regiones conservadas entre ellas (frameworks) (**Figura 29**).

De acuerdo con la base de datos Kabat, la cadena pesada es un posible miembro de la Familia VII de Inmunoglobulinas, subgrupo IIa o IIb. La cadena liviana *kappa* fue clasificada dentro de la Familia III, subgrupo V.

FIGURA 29. Secuencia de las regiones variables del AMC FC-5.01

A

VHB

1 CAG GTC CAG CTG CAG CAG TCA GGA CCT GAG CTG GTA AAG CCT GGG GGT TCA GTG AAG ATG
 1 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Val Lys Met

61 TCC TGC AAG GCT TCT GGA TAC ACA TTC ACT ACC TAT GTT ATA CAG TGG GTG AAG CAG AAG
 21 Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr Val Ile Gln Trp Val Lys Gln Lys

121 CCT GGG CAG GGC CTT GAG TGG ATT GGA TAT ATT AGT CCT TAC AAT GAT GGT ACT AAG TAC
 41 Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Ser Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr

181 AAT GAC AAG TTC AAA GGC AAG GCC ACA CTG ACT TCA GAC AAA TCC TCC AGC ACA GCC TAC
 61 Asn Asp Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

241 ATG GAG CTC AGC AGC CTG ACC TCT GAG GAC TCT GCG GTC TAT TAC TGT GTG GGT GGT ACC
 81 Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Val Gly Gly Thr

301 TCA TAT TTT TAT GCT ATG GAC TAC TGG GGT CGA GGA ACC TCA GTC ACC GTC TCC TCA GCC
 101 Ser Tyr Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala

361 AAA ACA ACA GCC CCA TCG GTC TAT CCA CTG GCC
 121 Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala

CHy

B

VkB-2

1 CCA TCA TAT CTG GCT GTG TCT GCA GGA GAA AAG GTC ACT ATG AAC TGT AAG TCC AGT CAA
 1 Pro Ser Tyr Leu Ala Val Ser Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Asn Cys Lys Ser Ser Gln

61 AGT GTT TTA TAC AGT TCA AAT CAG AAG AAC TAC TTG GCC TGG TAC CAG CAG AAA CCG GGA
 21 Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly

121 CAG TCT ATC AAG CTG CTG GTC TAC TGG GCA TCC ACT AGG GAA TCT GGT GTC CCT GAT CGC
 41 Gln Ser Ile Lys Leu Leu Val Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg

181 TTT AAA GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTT ACT CTT ACC ATC GAT AGT GTG CAA ACT GAA
 61 Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp Ser Val Gln Thr Glu

241 GAC CTG GCA ATT TAT TAC TGT CAT CAA TAC TTC TCC TCA TAC ACG TTC GGA GGC GGG ACC
 81 Asp Leu Ala Ile Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Phe Ser Ser Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr

301 AGG CTG GAA ATA AAA CGG GCT GAT GGT GCA CCA ACT GTA TCC AAA
 101 Arg Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Gly Ala Pro Thr Val Ser Lys

Ck2

- A. Secuencia de V_H del AMC FC-5.01. En negrita se indican las regiones determinantes de la complementariedad (CDRs). Las letras grises corresponden a la región constante. Con líneas de trazo grueso se indican los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de V_H , cuyas secuencias se describen en Materiales y Métodos.
- B. Secuencia de V_L del AMC FC-5.01. En negrita se indican las regiones determinantes de la complementariedad (CDRs). Las letras grises corresponden a la región constante. Con líneas de trazo grueso se indican los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de V_L , cuyas secuencias se describen en Materiales y Métodos.

5.2 Clonado y secuenciación de la molécula recombinante scFv-5.01-*c-myc*-his₆

La molécula recombinante scFv-5.01-*c-myc*-his₆ fue construida según se detalla en Materiales y Métodos (**Esquema 3**), mediante una PCR en tres pasos y clonada en el plásmido pSW1 (**Figura 30**). A continuación, el plásmido fue digerido con las enzimas NcoI y NotI (los sitios de corte de estas enzimas flanquean el inserto), de modo de comprobar que la ligación con el plásmido haya sido exitosa (**Figura 30C**). Posteriormente, se transformaron bacterias *E. coli* cepa TG1 con el plásmido conteniendo dicha construcción, se extrajo el ADN plasmídico, se analizó por PCR utilizando oligonucleótidos que hibridizan con los extremos 5' y 3' del inserto clonado (**Figura 30D**) y se secuenció para corroborar el ensamblado correcto del scFv-5.01-*c-myc*-his₆, obteniéndose una secuencia de 269 aminoácidos (**Figura 31**).

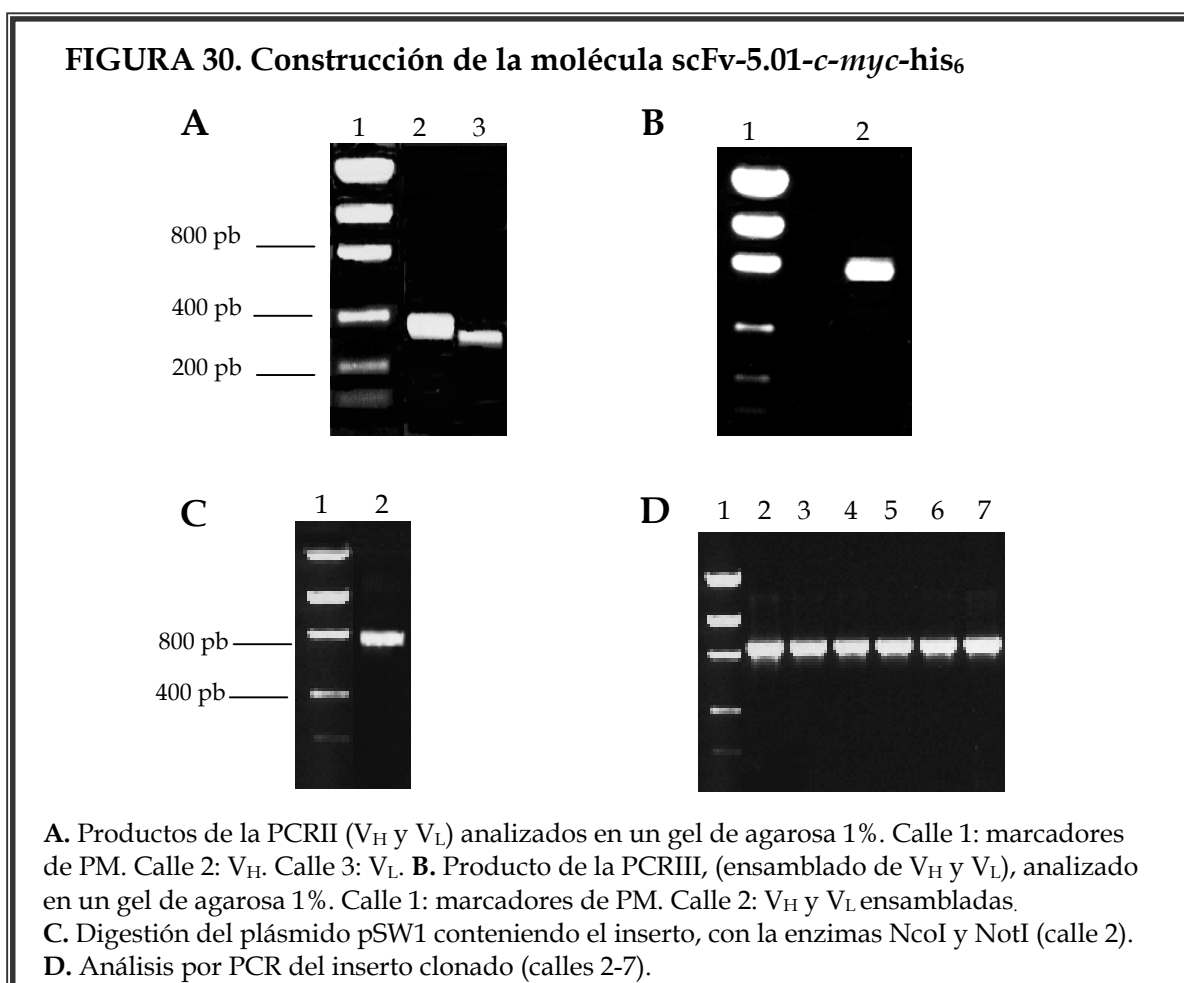


FIGURA 31. Secuencia de la molécula scFv-5.01-*c-myc*-his₆

ScVH-BACK-NcoI

VH-BACK

1 GAG GTT CAG CTG CAA CAG TCT GGA CCT GAG CTG GTA AAG CCT GGG GGT TCA GTG AAG ATG
 1 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Val Lys Met

61 TCC TGC AAG GCT TCT GGA TAC ACA TTC ACT ACC **TAT GTT ATA CAG TGG** GTG AAG CAG AAG
 21 Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr **Thr Tyr Val Ile Gln Trp** Val Lys Gln Lys

121 CCT GGG CAG GGC CTT GAG TGG ATT GGA TAT ATT AGT CCT TAC AAT GAT GGT ACT AAG TAC
 41 Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly **Tyr Ile Ser Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr**

181 AAT GAC AAG TTC AAA GGC AAG GCCACA CTG ACT TCA GAC AAA TCC TCC AGC ACA GCCTAC
 61 **Asn Asp Lys Phe Lys Gly** Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

241 ATG GAG CTC AGC CTG ACC TCT GAG GAC TCT GCG GTC TAT TAC TGT GTG GGT **GGT ACC TCA**
 81 Met Glu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Val Gly **Gly Thr Ser**

VH-FOR

301 TAT TTT TAT GCT ATG GAC TAC TGG GGG GGA GGA ACC TCA GTC ACC GTC TCC TCA **GGT GGA**
 101 **Tyr Phe Tyr Ala Met Asp Tyr** Trp Gly Gly Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser **Gly Gly**

ScVh5.01-BACK

361 GGC GGT TCA GGC GGA GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCG AAC ATT ATG ATG ACA CAG TCG
 121 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asn Ile Met Met Thr Gln Ser

Vk5.01-BACK

421 CCA TCA TAT CTG GCT GTG TCT GCA GGA GAA AAG GTC ACT ATG AAC TGT **AAG TCC AGT CAA**
 141 Pro Ser Tyr Leu Ala Val Ser Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Asn Cys **Lys Ser Ser Gln**

481 AGT GTT TTA TAC AGT TCA AAT CAG AAG AAC TAC TTG GCC TGG TAC CAG CAG AAA CCG GGA
 161 **Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala** Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly

541 CAG TCT ATC AAG CTG CTG GTC TAC TGG GCA TCC ACT AGG GAA TCT GGT GTC CCT GAT CGC
 181 Gln Ser Ile Lys Leu Leu Val Tyr **Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser** Gly Val Pro Asp Arg

601 TTT AAA GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTT ACT CTT ACC ATC AGT AGT GTG CAA ACT GAA
 201 Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Thr Glu

Vk5.01-FOR

661 GAC CTG GCA ATT TAT TAC TGT CAT CAA TAC TTC TCC TCA TAC ACG TTC GGA GGG GGC ACC
 221 Asp Leu Ala Ile Tyr Tyr Cys **His Gln Tyr Phe Ser Ser Tyr Thr** Phe Gly Gly Gly Thr

ScVk5.01-FOR-Not I

721 AAG CTG GAA ATC AAA CGG GCG GCC GCA GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAA GAT CTG AAT
 241 Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn

781 GGG GCC GCA CAT CAT CAT CAT CAT CAT TAG TAG
 261 Gly Ala Ala **His His His His His His** stop stop

Secuencia de la molécula scFv-5.01-*c-myc*-his₆. En negro se señala la secuencia correspondiente a V_H. En azul, la correspondiente V_K. En verde, la secuencia espaciadora entre ambas cadenas. En bordeau, la secuencia *c-myc*, en marrón la secuencia de seis histidinas y en gris los codones stop. En negrita se resaltan los CDRs. En líneas de trazo grueso se indican los oligonucleótidos utilizados para la construcción del scFv. Las secuencias de dichos oligonucleótidos se describen en Materiales y Métodos, Esquema 3.

5.3 Producción y purificación de la molécula recombinante scFv-5.01-*c-myc*-his₆

La expresión de la molécula recombinante fue dirigida al espacio periplásmico de las bacterias transformadas, según se describe en Materiales y Métodos. La fracción periplásmica fue extraída, y, a partir de allí, dicha molécula fue purificada mediante una resina de afinidad por Co²⁺ según se resume en el **Esquema 4**.

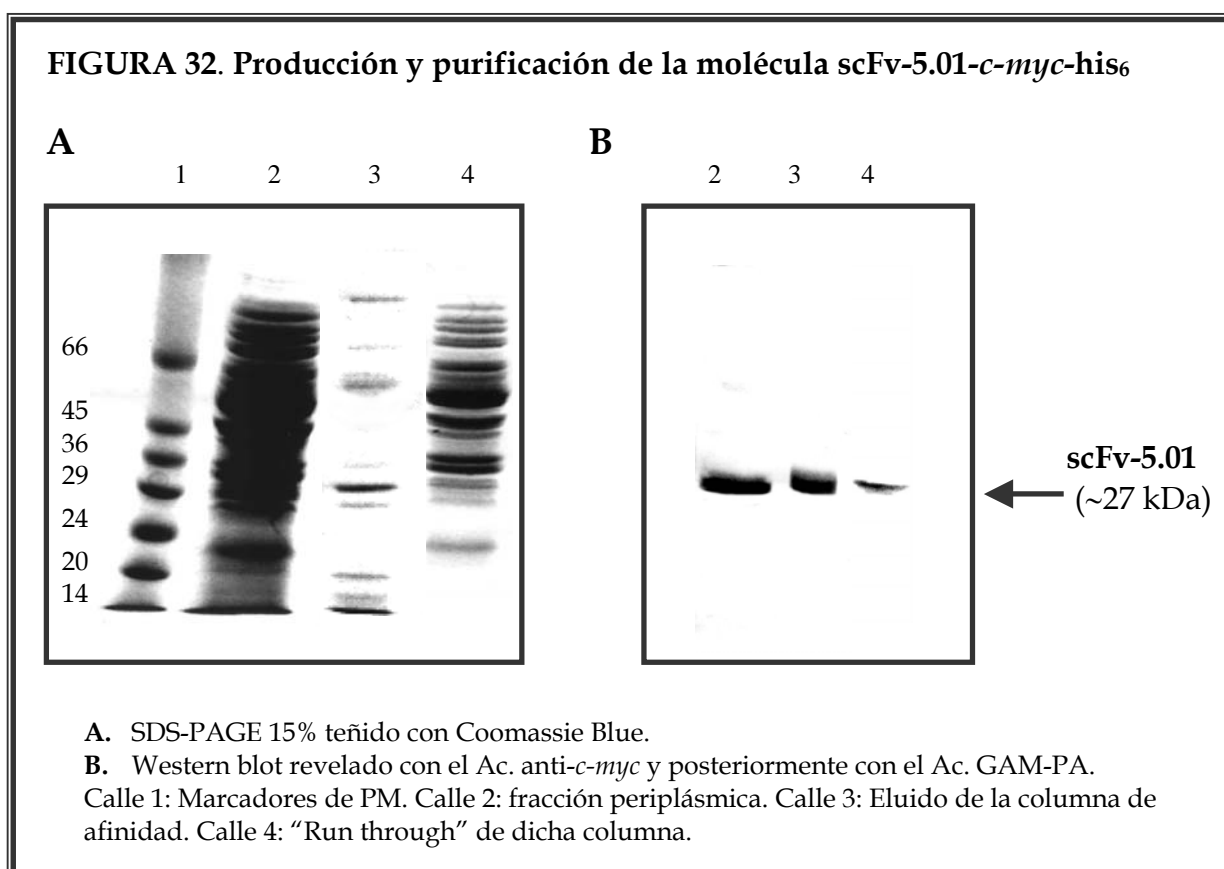
La presencia de dicha molécula en la fracción periplásmica y en los eluidos de la columna de afinidad se verificó inicialmente mediante dot-blot. A continuación se sembró en un gel de poliacrilamida 15% la fracción periplásmica y las fracciones eluidas de la columna que dieron resultado positivo por dot-blot (**Figura 32**). El Western blot muestra la presencia de la molécula scFv (detectada por su tag de *c-myc*) en la fracción periplásmica y en uno de los eluidos de la columna y en menor grado en el “run-through de la columna” (fracción que eluye durante la siembra de la muestra). La concentración del fragmento scFv-5.01 se estimó por densitometría de las bandas del SDS-PAGE mediante el programa de computación Scion Image (Scion Corp., Maryland, USA), calculándose un rendimiento de 130 µg/l de cultivo.

5.4 Reactividad de la molécula recombinante scFv-5.01-*c-myc*-his₆

Evaluamos la reactividad con CD63 de la molécula purificada mediante Western blot frente a extractos de plaquetas, CDs, melanoma y tumores de colon (CD63+) y mediante inmunofluorescencia indirecta sobre células de melanoma IIB-MEL-J y CDs (FACS y microscopía confocal). El scFv fue detectado en primer lugar con el anticuerpo 9E10, el cual reconoce el tag de *c-myc*, seguido de un anticuerpo secundario marcado.

En la **Figura 33A** se observa el resultado del Western blot sobre dichos extractos. Se incubaron las membranas de nitrocelulosa con scFv y FC-5.01

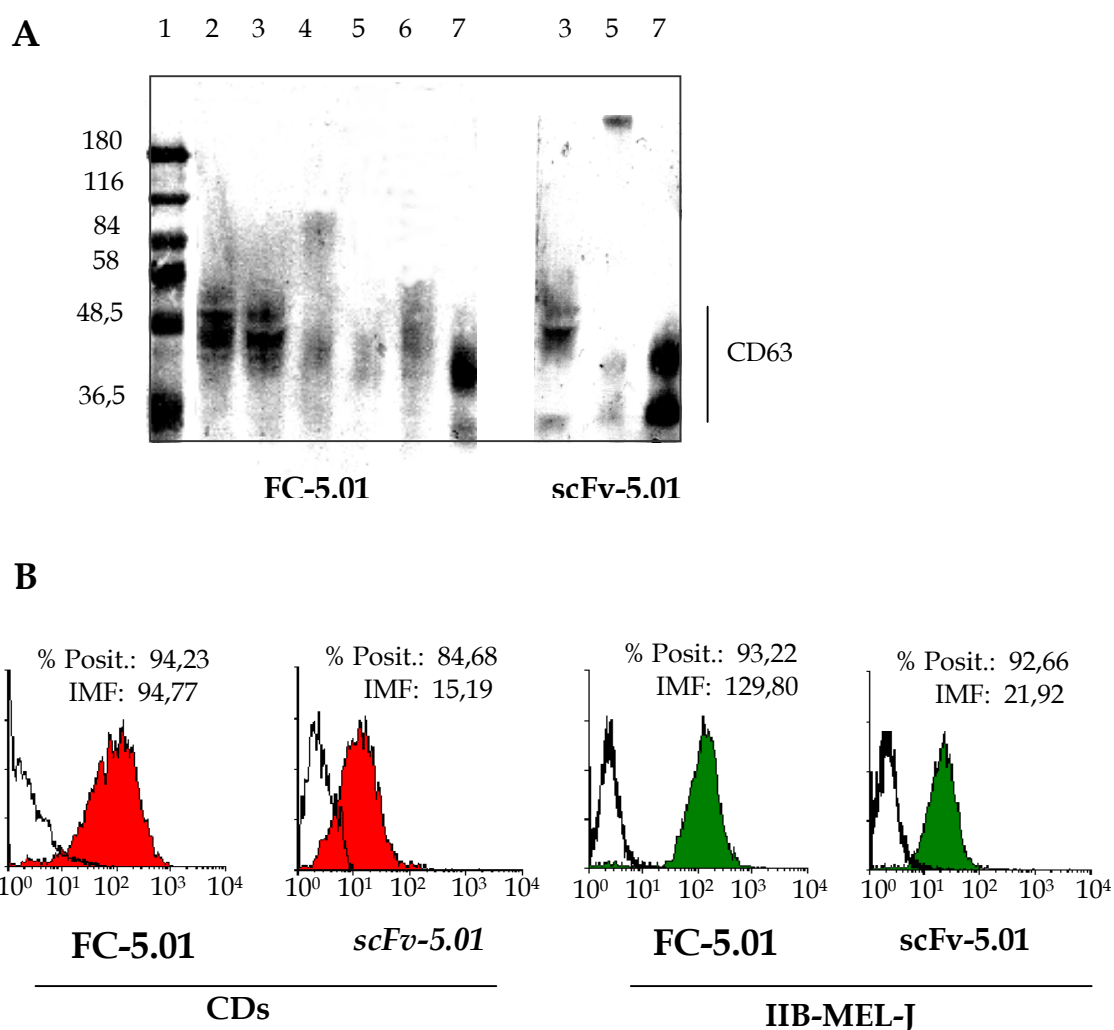
(control positivo). Según puede observarse, la molécula scFv-5.01 reconoce específicamente al Ag CD63 presente en dichos extractos. La heterogeneidad en el peso molecular de las bandas que se observan en el Western blot se debe a que, como se comentó anteriormente, el Ag CD63 es una glicoproteína de membrana de peso molecular variable (30-60 kDa). Dicha heterogeneidad es debida a variaciones en el patrón de glicosilación del antígeno.



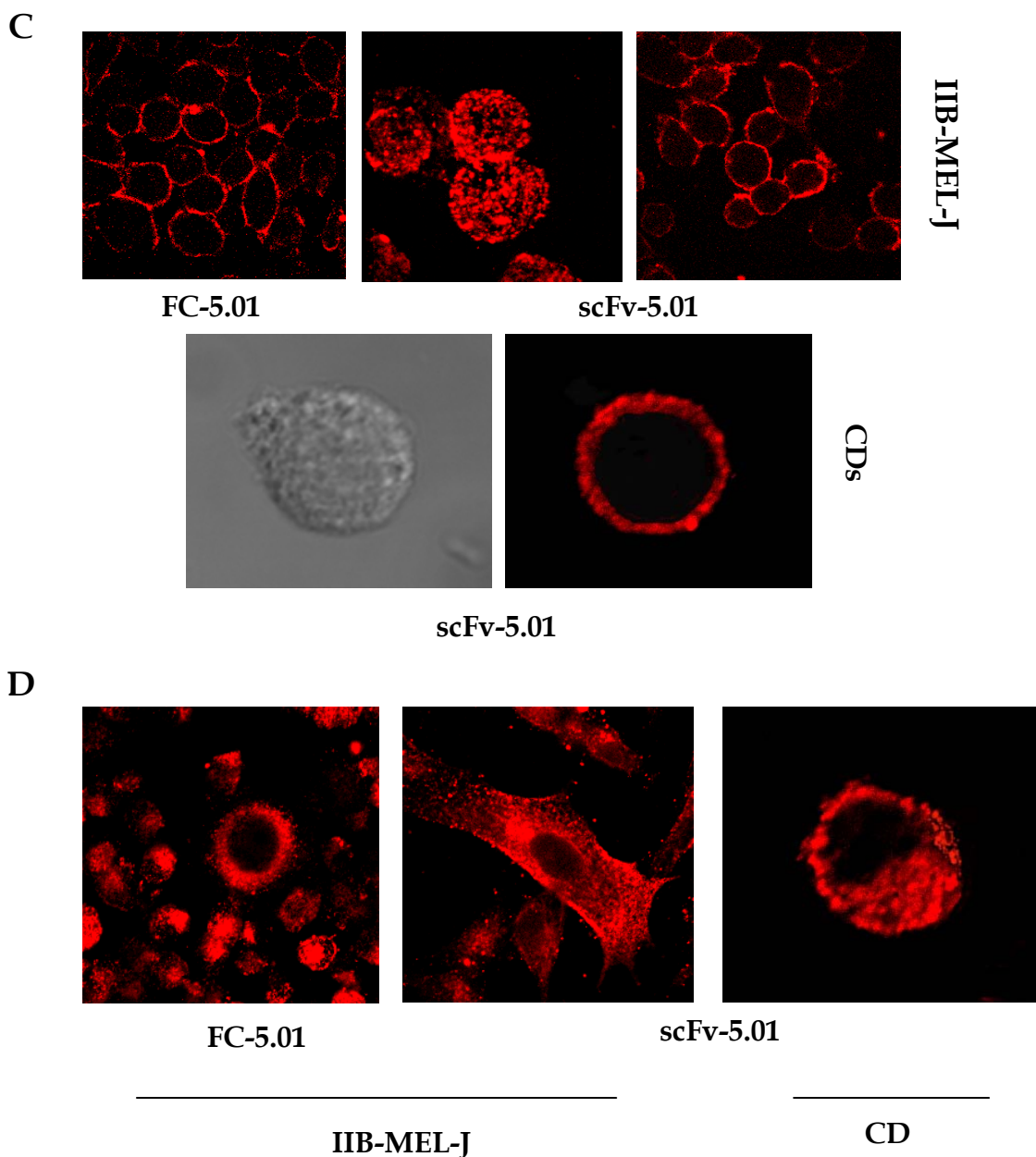
En la **Figura 33B, C y D**, se observa el resultado de la inmunofluorescencia sobre células IIB-MEL-J y CDs. La **Figura 33B** corresponde al análisis por FACS de la reactividad de superficie de la molécula scFv-5.01 comparada con la del FC-5.01. Observamos que la molécula recombinante reconoce al CD63 tanto en CDs como en las células de melanoma, pero en menor grado que el FC-5.01. La **Figura 33C y D** corresponde al análisis de la reactividad de superficie e intracelular evaluada mediante microscopía confocal. Como puede observarse, el scFv reconoce al Ag CD63 tanto en la

membrana plasmática como en el citoplasma de las células. Realizamos los controles correspondientes, incubando las células con PBS y con fracción periplásmica control (obtenida a partir de *E. coli* TG1 no transformadas) y en ningún caso se observó reactividad.

FIGURA 33. Reactividad de la molécula scFv-5.01-c-myc-his₆



- A.** Reactividad de scFv-5.01, comparado con FC-5.01, evaluada mediante Western blot sobre extractos de plaquetas, tumores y CDs. Calle 1: marcadores de PM. Calle 2: CDs maduras. Calle 3: CDs inmaduras. Calles 4 y 5: extractos de melanoma. Calle 6: extracto de tumor de colon. Calle 7: extracto de plaquetas.
- B.** Reactividad de scFv-5.01, en comparación con FC-5.01, sobre CDs (histogramas rojos) y células IIB-MEL-J (histogramas verdes), evaluada mediante citometría de flujo. Los histogramas blancos corresponden a la marcación con inmunoglobulinas control de isotipo. %Posit.: porcentaje de positividad; IMF: intensidad media de fluorescencia.

FIGURA 33. Reactividad de la molécula scFv-5.01-*c-myc*-his₆*-continuación-*

C. Reactividad de scFv-5.01, en comparación con FC-5.01, en la superficie de células IIB-MEL-J y CD8, analizada mediante microscopía confocal. La fotografía superior central corresponde a una imagen tridimensional de células IIB-MEL-J. Aumento: 60X.

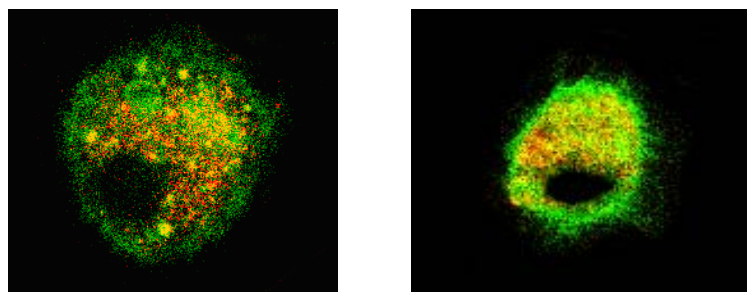
D. Reactividad de scFv-5.01, en comparación con FC-5.01, en células IIB-MEL-J y CD8 permeabilizadas (reactividad intracelular), evaluada mediante microscopía confocal. Aumento: 60X.

5.5 Internalización del complejo scFv-5.01-*c-myc*-his₆-CD63

Una vez comprobada la capacidad del scFv-5.01 de reconocer al Ag CD63 tanto en membrana plasmática como en sitios intracelulares, procedimos a ensayar si el complejo de superficie scFv-CD63 es capaz de internalizarse hacia vesículas intracelulares, como lo hace el anticuerpo parental. Para ello, según se describe en Materiales y Métodos, incubamos CDs con scFv-5.01 durante 1h. a 4°C, para permitir la unión del scFv a CD63, y luego a 37°C, para posibilitar la internalización del complejo de superficie. El scFv fue revelado con el anticuerpo 9E10 seguido de Acs marcados con cy3. La molécula recombinante fue capaz de internalizarse en CDs luego de su unión a superficie (**Figura 34**).

5.5.1 Destino intracelular del complejo scFv-CD63. Translocación a MIICs en células dendríticas

Investigamos el destino intracelular del complejo scFv-CD63 en CDs por medio de inmunofluorescencia indirecta doble. Al igual que lo observado con el AMC FC-5.01 y su fragmento monovalente Fab, la molécula recombinante scFv alcanza los compartimentos MIIC luego de 30 min. de incubación a 37°C, siendo máxima la co-localización con moléculas MHCII a los 120 min (**Figura 34**).

FIGURA 34. Co-localización del complejo scFv-CD63 con moléculas MHCII

Tiempo
(min.)

60

120

Análisis por inmunofluorescencia doble seguida de microscopía confocal, de la co-localización del complejo scFv-CD63 con moléculas MHCII, luego de su internalización a 37°C.

En rojo se observa el complejo scFv-CD63, y en verde las moléculas MHCII. La co-localización se visualiza como puntos amarillos.

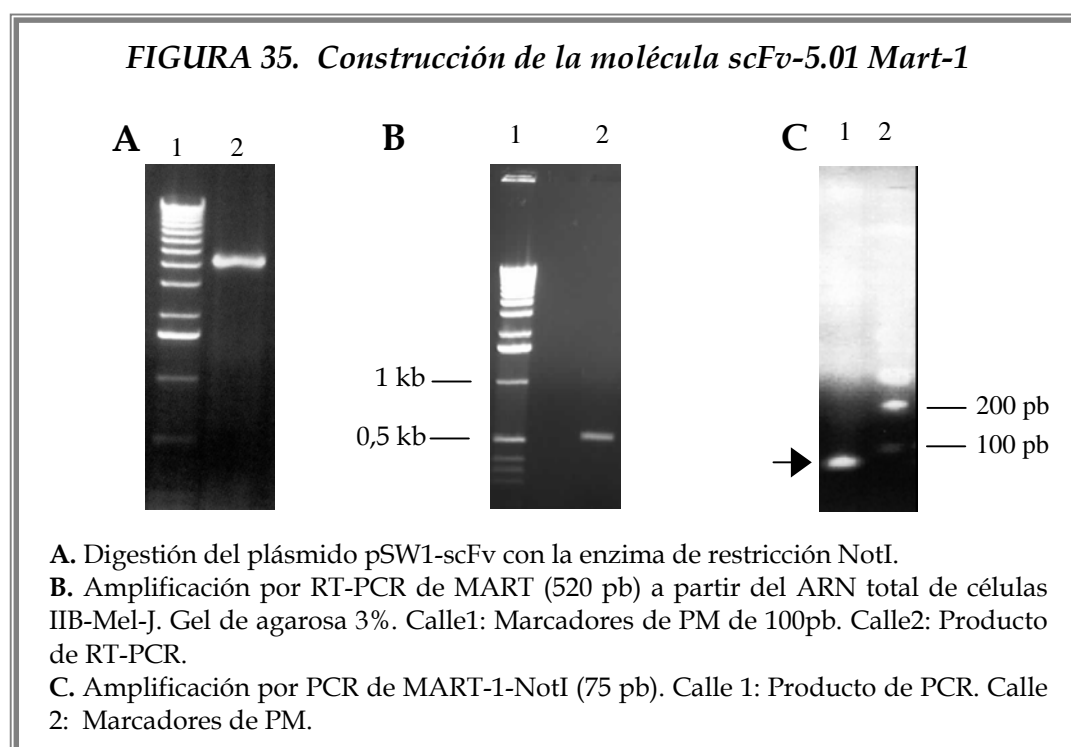
Dada la capacidad de la molécula recombinante scFv de internalizarse en CDs y alcanzar los compartimentos donde tiene lugar el procesamiento de los péptidos a ser presentados en el contexto de las moléculas MHCII, seguimos adelante con la idea de utilizar dicha molécula como vehículo de péptidos antigénicos en las CDs. A continuación, se describe la construcción de una proteína de fusión a partir de la molécula scFv-5.01-*c-myc*-his₆.

6. Construcción de la proteína de fusión scFv-5.01-MART-1

Partiendo de la molécula recombinante scFv-5.01-*c-myc*-his₆, descrita anteriormente, decidimos construir una proteína de fusión portando el péptido de melanoma MART-1. MART (antígeno de melanoma reconocido por los linfocitos T), es una proteína de 118 aminoácidos, con un PM aproximado de 18 kDa. Es expresado por la mayoría de los melanomas y líneas de células de melanoma y es reconocido por los linfocitos T que infiltran el tumor^{318,319}.

6.1 Clonado de la proteína de fusión scFv-5.01-MART-1

El clonado de la molécula recombinante scFv-5.01-MART-1 se llevó a cabo a partir del plásmido pSW1 conteniendo la secuencia del scFv-5.01, según se describe en Materiales y Métodos (**Esquema 5**). Para la preparación del ADNc del péptido MART-1, en primer lugar se amplificó MART a partir del ARN total de células IIB-Mel-J, y luego se procedió a amplificar la porción de ADNc codificante de MART-1, agregando un sitio de corte para la enzima NotI (**Esquema 5B** y **Figura 35**).



6.2 Producción y purificación de la proteína de fusión scFv-5.01-MART-1

La molécula recombinante scFv-5.01-MART-1 se expresó en bacterias *E. coli* cepa TG1 y se purificó a partir de la fracción periplásmica de dichas bacterias, según se explicó anteriormente para la molécula scFv-5.01-*c-myc*-his₆.

Para su detección en Western blot e inmunofluorescencia, se utilizó en primer lugar el anticuerpo monoclonal 9E10, el cual reconoce el tag de *c-myc*. (Figura 36A).

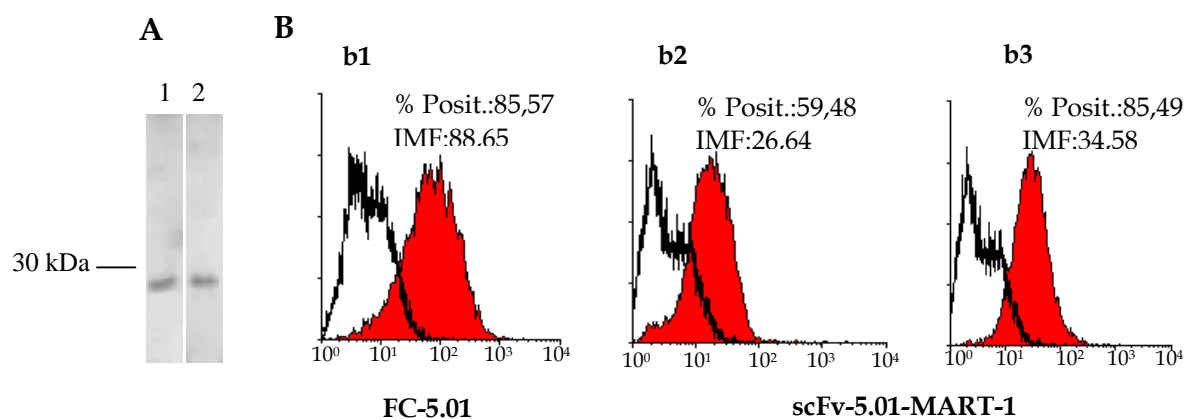
6.3 Reactividad de la proteína de fusión scFv-5.01-MART-1

La reactividad de la molécula scFv-5.01-MART-1 se evaluó sobre CDs en suspensión, mediante inmunofluorescencia indirecta seguida de citometría de flujo (Figura 36B) y microscopía confocal (Figura 37).

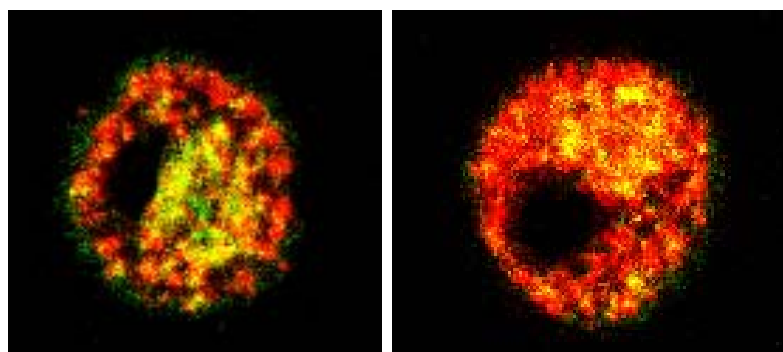
Como se observa en la Figura 36B, la proteína de fusión reconoce al Ag CD63 en la superficie de las CDs, aunque en menor grado que el anticuerpo parental. Por otra parte, dicha proteína es capaz de internalizarse en CDs luego de incubar las células a 37°C (Figura 37).

6.4 Translocación del complejo scFv-5.01-MART-1-CD63 a los compartimentos MIICs.

Del mismo modo que el AMC FC-5.01 y la molécula recombinante scFv, la proteína de fusión scFv-MART-1 es capaz de internalizarse y alcanzar los compartimentos MIIC (Figura 37).

FIGURA 36. Detección y reactividad de la molécula scFv-5.01-MART-1

- A. Detección de scFv-5.01-MART-1 en la fracción periplásmica (calle 1) y eluido de la columna de afinidad (calle 2), mediante Western blot.
- B. Reactividad de scFv-5.01-MART-1, en comparación con FC-5.01, sobre CDs (histogramas rojos), evaluada mediante citometría de flujo. Los histogramas blancos corresponden, en b1, a la marcación del control de isotipo (IgG2a) y en b2-b3, a la de la fracción periplásmica de bacterias no transformadas. Concentración utilizada de los primeros anticuerpos: 20 μ g/ml para b1-b2 y 50 μ g/ml para b3. %Posit.: porcentaje de positividad; IMF: intensidad media de fluorescencia.

FIGURA 37. Internalización del complejo scFv-5.01-MART-1-CD63 en células dendríticas

Tiempo: 60 min.

Co-localización de scFv-5.01-MART-1 con moléculas MHCII, luego de 60 min. de incubación a 37°C, visualizada mediante microscopía confocal. En rojo se observa el scFv-5.01-MART-1 y en verde las moléculas MHCII. La co-localización se visualiza como puntos amarillos.

Paralelamente a la construcción de la proteína de fusión emprendimos una estrategia alternativa con el mismo propósito de utilizar el AMC FC-5.01 o sus fragmentos derivados, como vehículos de péptidos o proteínas antigénicas hacia las CDs. Esta nueva estrategia consistió en la conjugación química del AMC FC-5.01 con una proteína altamente inmunogénica como el toxoide tetánico, la cual se comenta a continuación.

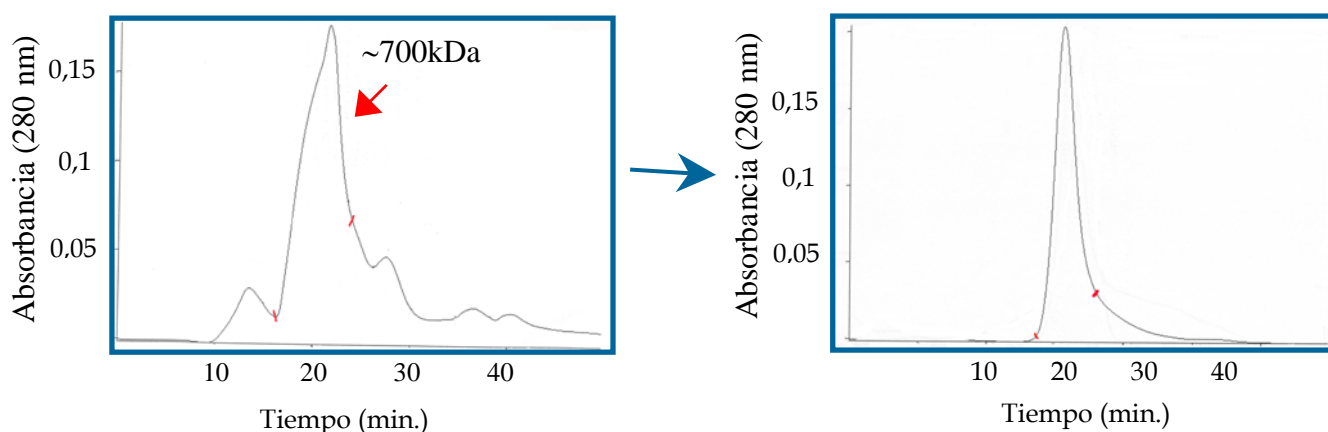
7. Obtención y caracterización de las propiedades funcionales del conjugado FC-5.01-toxoide tetánico

7.1 Obtención y purificación del conjugado FC-5.01-toxoide tetánico

El conjugado FC-5.01-toxoide tetánico (FC-5.01-TT) se obtuvo por conjugación química del AMC FC-5.01 con el toxoide tetánico utilizado para la formulación de la vacuna anti-tetánica, según se describe en Materiales y Métodos (**Esquema 6**). Se purificó mediante cromatografía de exclusión molecular (S-200) seguida de proteína G Sepharosa (**Figura 38**).

La cuantificación de las moléculas de TT/molécula de FC-5.01 se realizó mediante ELISA, obteniéndose como resultado 4 moléculas de TT/molécula de FC-5.01. El PM del conjugado se estimó mediante una curva de calibración realizada con estándares de PM sembrados en la columna S-200.

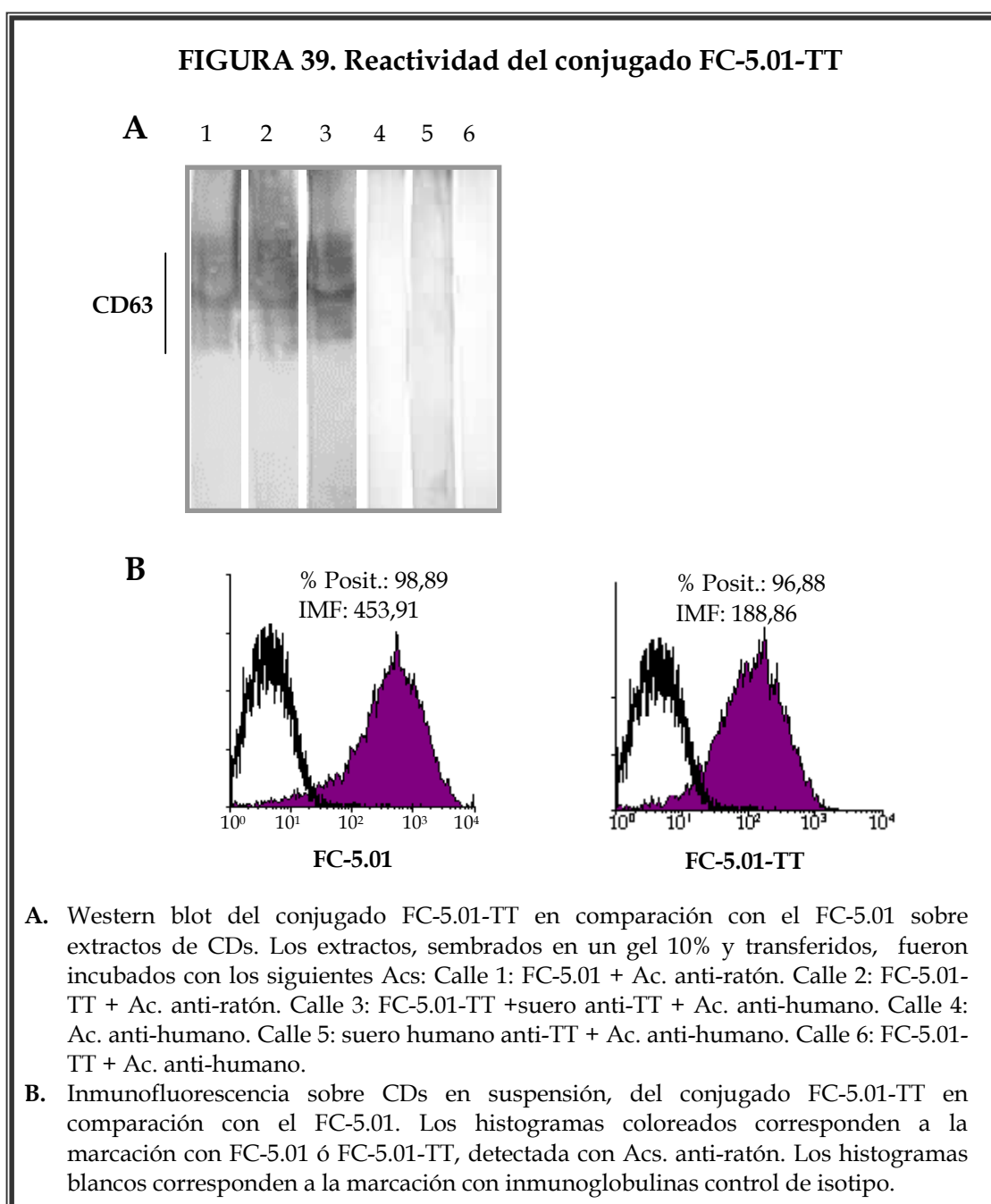
FIGURA 38. Purificación del conjugado FC-5.01-TT



Purificación del conjugado FC-5.01-TT mediante cromatografía de exclusión molecular (S-200).
Flujo: 0,5 ml/min. Buffer de corrida: PBS pH 7,5.

7.2 Reactividad del conjugado FC-5.01-TT

La reactividad del conjugado se evaluó sobre extractos de CDs mediante Western blot y sobre CDs en suspensión mediante inmunofluorescencia indirecta (**Figura 39** y **Figura 40**). El conjugado se detectó con Acs anti-ratón para revelar el FC-5.01 y con un suero anti-TT de un dador vacunado contra el tétanos seguido de Acs anti-humano para revelar el TT.

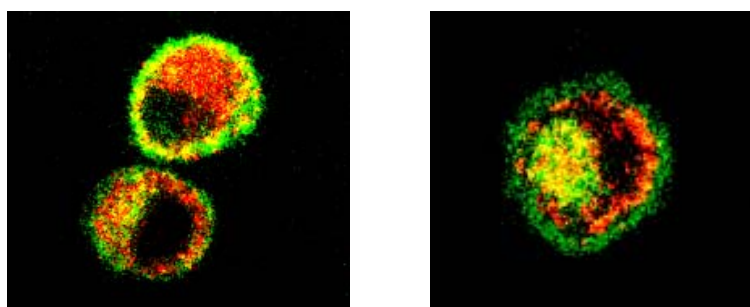


Como se observa en la **Figura 39** y la **Figura 40**, el conjugado retiene la especificidad del anticuerpo parental por el Ag CD63.

7.3 Internalización del complejo FC-5.01-TT-CD63. Translocación a compartimentos MIIC.

El conjugado FC-5.01-TT se internaliza en CDs incubadas a 37°C y alcanza los compartimentos MIIC, al igual que el anticuerpo parental (**Figura 40**).

FIGURA 40. Co-localización del complejo FC-5.01-TT-CD63 con moléculas MHCII



Tiempo (min.) 30

60

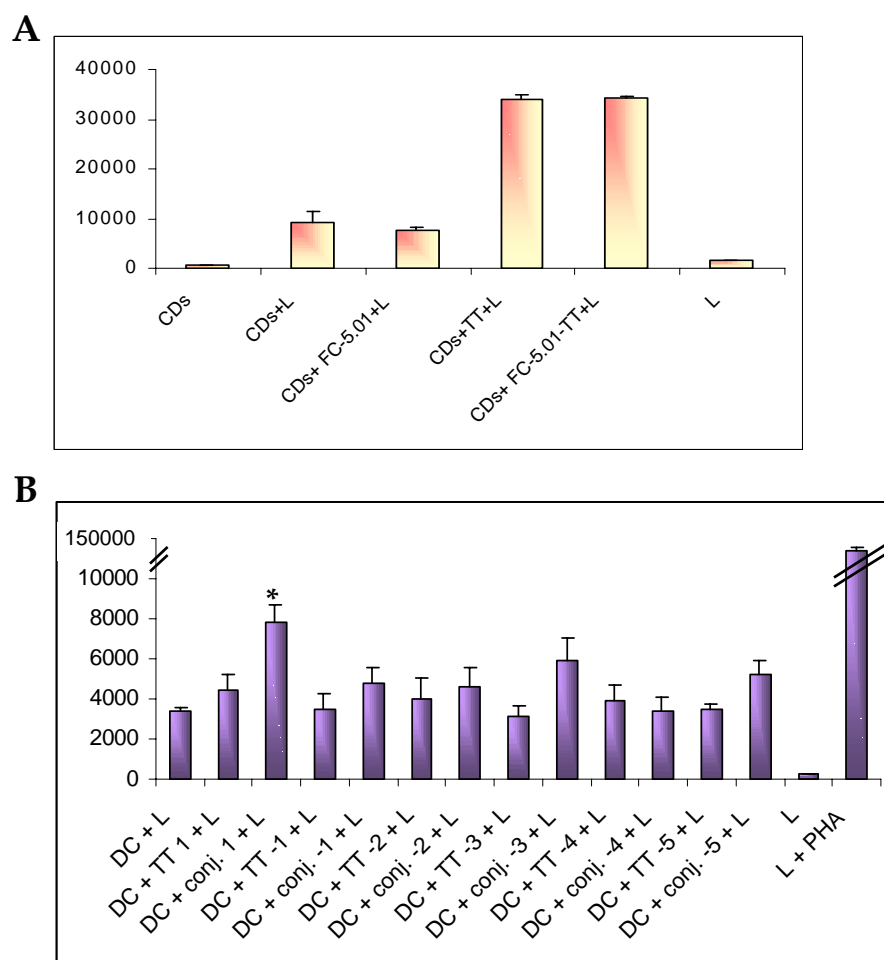
Translocación del complejo FC-5.01-TT-CD63 a los compartimentos MIIC, visualizado mediante microscopía confocal. En rojo se observa el conjugado y en verde las moléculas MHCII. La co-localización se visualiza como puntos amarillos.

7.4 Funcionalidad del conjugado FC-5.01-TT. Proliferación de linfocitos respondedores al toxoide tetánico.

Como se describe en Materiales y Métodos, ensayamos distintas condiciones, variando las cantidades de CDs y linfocitos, las concentraciones de los Ags, los tiempos de incubación CDs-Ags y los tiempos de co-cultivo con los linfocitos.

Según se observa en la **Figura 41**, el conjugado FC-5.01-TT fue presentado por las CDs y generó una respuesta específica de linfocitos autólogos de un dador vacunado contra el tétanos. Por otra parte, el AMC FC-5.01 dio lugar a una respuesta similar a la observada para las CDs sin cargar con Ags. (**Figura 41A**). Utilizando una concentración de Ags de 100 µg/ml y un tiempo de incubación CDs-Ags de 4 hs. previo al agregado de LPS para inducir la maduración de las CDs, no se observaron diferencias entre las respuestas obtenidas frente al TT conjugado y sin conjugar (**Figura 41A**). Contrariamente, reduciendo la dosis de Ags y el tiempo de incubación CDs-Ags, sí se observaron diferencias significativas entre la capacidad inmunogénica del TT conjugado y sin conjugar (a una concentración de 1 µg/ml) (**Figura 41B**).

FIGURA 41. El conjugado FC-5-01-TT es presentado por las células dendríticas e induce la proliferación de linfocitos respondedores



Análisis de la respuesta al conjugado FC-5.01-TT presentado por las CDs, mediante un ensayo de proliferación de linfocitos autólogos respondedores al TT.

A. Tiempo de incubación CDs-Ags: 4 hs. Concentración de los Ags: 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. El resultado es representativo de 5 experimentos.

B. Tiempo de incubación CDs-Ags: 2 hs. Concentración de los Ags: de 1 a 10^{-5} $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Conj.: FC-5.01-TT. PHA: fitohemaglutinina. El resultado es representativo de 5 experimentos.

Número de CDs: 15.000. Número de linfocitos: 400.000. Las barras de error muestran la desviación standard. El asterisco indica una diferencia significativa ($p < 0,05$) entre la respuesta obtenida con las CDs incubadas con el TT conjugado y las CDs incubadas con el TT sin conjugar, según el test t de Student de 2 colas.

DISCUSIÓN

Las Tetraspaninas constituyen una superfamilia de proteínas de membrana de amplia distribución tisular. Su reconocimiento como “familia de proteínas” es bastante reciente³²⁰, pero desde la descripción de su primer miembro (CD63) se ha ido acumulando una copiosa evidencia que las involucra en múltiples funciones celulares²⁻⁴. A pesar de ello, no se ha podido aún definir claramente si estas proteínas actúan solamente como “proteínas de andamiaje”, reclutando moléculas de superficie y transductoras de señales en microdominios de membrana especializados, o si también desempeñan roles específicos, irremplazables por otros miembros de la familia. Hasta el momento, parece evidente que CD9 resulta indispensable para la fusión de gametas en una cepa de ratón⁹⁵; su deficiencia puede ser revertida por la transfección de CD81, pero la expresión natural de CD81 en los ovocitos no resulta suficiente para suplantar la ausencia de CD9. Puede decirse entonces que las funciones de las tetraspaninas son en algunos casos “potencialmente” redundantes. Es también destacable que se requiera de la expresión de CD81 para el mantenimiento de niveles normales de CD19 en la superficie de los linfocitos B¹²⁹. Esto plantea una importante función de ciertas tetraspaninas como “chaperonas” irremplazables. Actualmente están surgiendo nuevos datos que involucran a algunas tetraspaninas (CD9, CD81, CD63), en la infección con virus^{52,55,56}. Hasta el momento se especula que su función sería la de co-receptores, pero no existen aún resultados concluyentes de que su ausencia prevenga las infecciones. Con respecto al rol de las tetraspaninas como inmuno-moduladores, la mayor parte de la evidencia proviene de estudios en linfocitos B y es prácticamente nula la información con la que se cuenta sobre su participación en las principales células presentadoras de antígenos, las células dendríticas (CDs).

Con respecto a la tetraspanina CD63, se ha observado que su deficiencia, en humanos, causa una serie de síntomas asociados con la expresión disminuida de CD63 en gránulos de plaquetas y melanosomas⁴⁵, pero aumentada en la membrana plasmática, lo cual demuestra la importancia del mantenimiento de un “sorting” adecuado para esta tetraspanina. Como se describió en Introducción, CD63 (al igual que CD82), presenta una señal de localización lisosomal en su extremo -COOH terminal. Se ha encontrado que CD63 se expresa mayoritariamente en los lisosomas de varios tipos celulares, translocándose a la membrana plasmática luego de la activación celular. Por otra parte, se ha detectado en células endoteliales y basófilos, que CD63 es capaz de ciclar entre la membrana plasmática y los cuerpos de Weibel-Palade o los gránulos intracelulares, respectivamente^{116,117}. Esta propiedad de CD63 de alternarse entre la membrana plasmática y los compartimentos citoplasmáticos la convierte en un blanco atractivo para la introducción y presentación de antígenos de interés en células presentadoras de antígeno como las CDs. Por tal motivo, utilizamos el AMC FC-5.01, desarrollado en nuestro laboratorio, y reactivo con la tetraspanina CD63, para analizar la expresión de CD63 en CDs y la posibilidad de que el complejo de superficie FC-5.01-CD63 se internalice hacia compartimentos de presentación antigénica (MIICs). También intentamos contribuir al esclarecimiento de las funciones desempeñadas por CD63 y otras tetraspaninas en CDs.

Mediante citometría de flujo y microscopía confocal, demostramos que las tetraspaninas CD9, CD63, CD81, CD82 y CD151 se expresan en CDs inmaduras. CD9 y CD81 se expresan predominantemente en la superficie, mientras que CD63 y CD82 también lo hacen intracelularmente, en lisosomas y/o compartimentos MIIC. La expresión de CD151 fue poco detectable. Con respecto a la expresión de superficie de CD63, la evidencia con la que se contaba era controvertida: Por un lado, en 1998, Woodhead y colaboradores¹⁰⁹ mostraron por citometría de flujo una positividad menor al 50% para CD63, y

posteriormente, durante el desarrollo de esta Tesis, otros autores³²¹, mediante técnicas de fraccionamiento subcelular, sólo encontraron CD63 en compartimentos endosomales-lisosomales/MIICs, pero no en la membrana plasmática, y no detectaron CD82 intracelularmente. Por lo tanto, nuestros resultados confirmaron la expresión de CD63 en CDs inmaduras humanas (% de positividad: 95%; IMF: 10²) y aportaron nuevos datos acerca de la expresión de otras proteínas de la familia. Nuestra evidencia puede compararse con la obtenida en linfocitos B, donde CD63 y CD82 fueron hallados en compartimentos MIIC, y CD9, CD63, CD81 y CD82 fueron también detectados en la superficie celular^{10,85}.

Con respecto a la expresión de las tetraspaninas en CDs maduras, no observamos diferencias en la expresión de superficie, con respecto a las CDs inmaduras. Coincidentemente, otros autores han demostrado que la localización subcelular de CD63 no se altera durante la maduración de las CDs, pero sí se producen cambios en la modificaciones post-traduccionales de la molécula, lo cual podría estar relacionado con los cambios morfológicos que sufren los compartimentos MIIC durante la maduración de las CDs⁹.

Demostramos que luego de la unión del AMC FC-5.01, el complejo de superficie se internaliza, y analizamos el trayecto intracelular del complejo (endosomas → lisosomas → MIICs) en CDs inmaduras. Observamos que esta internalización no requiere del cross-linking de moléculas de CD63, ya que el fragmento Fab-5.01 también fue internalizado. Analizamos también la posibilidad de internalización de otros complejos Ac-tetraspanina. Observamos que sólo el AMC FC-5.01 y el AMC anti-CD82 inducían la translocación intracelular de los complejos.

Teniendo en cuenta el modelo aceptado de la existencia en varios tipos celulares de una “red de tetraspaninas” conectada con integrinas, proteínas de señalización y moléculas involucradas en la presentación antigénica^{21,23}, analizamos la asociación tetraspaninas-tetraspaninas y tetraspaninas-integrinas

en CDs inmaduras. En primer lugar, analizamos la expresión en superficie de varias integrinas en CDs. Observamos que las integrinas CD11b/ α_M , CD18/ β_2 , CD29/ β_1 y CD49e/ α_5 se expresan abundantemente, mientras que la expresión de β_3 es leve, y no detectamos una variación en la expresión entre CDs inmaduras y maduras. Otros autores tampoco han detectado la variación en la expresión de las integrinas CD29 y CD49e entre CDs inmaduras y maduras, pero sí de CD49d/ α_4 ¹⁷⁶. Sabiendo que la incubación con los AMCs anti-CD63 y anti-CD82 inducía la internalización de los complejos con ambas tetraspaninas, analizamos, mediante citometría de flujo, si la internalización de dichos complejos llevaba también a la internalización de otras tetraspaninas e integrinas. Observamos que la incubación con dichos Acs provocaba una disminución en la expresión de superficie de las demás tetraspaninas estudiadas, y de las integrinas CD11b, CD18, CD29 y CD49e, pero no de las moléculas MHCII. Al respecto, se ha postulado que las tetraspaninas forman microdominios especializados, distintos de los "rafts"²². Se ha observado también que las tetraspaninas co-localizan en la superficie celular con moléculas MHCII portando determinados epitopes, los cuales determinarían la localización de las moléculas de clase II en ciertos dominios de membrana⁸⁸. Por lo tanto, es posible postular que CD63 y CD82, al internalizarse, conducen también consigo a las moléculas de clase II reclutadas en los microdominios enriquecidos en tetraspaninas, pero que esta desaparición no es detectada por inmunofluorescencia debido a la presencia en la superficie celular de otras moléculas de clase II portando otros epitopes y presentes en microdominios de membrana diferentes a los de las tetraspaninas. La internalización de CD63 y CD82 puede asociarse con la capacidad de estas tetraspaninas de dirigir el tránsito intracelular de sus moléculas asociadas y su degradación en lisosomas. Justamente CD63 y CD82 portan una secuencia de localización lisosomal, lo cual les permite ciclar de la membrana plasmática a los compartimentos intracelulares y viceversa¹⁵. Se postula que en estos procesos contribuirían también las enzimas asociadas con las tetraspaninas, como PI4-K y PKC. En

efecto, se ha observado que la activación de PKC α en células epiteliales mamarias facilita la internalización de las integrinas β_1 ⁷⁰. Mediante inmunoprecipitación, confirmamos la asociación CD63/CD11b en CDs inmaduras.

Con respecto a la relevancia funcional de la asociación tetraspaninas-integrinas en CDs inmaduras, analizamos la posible participación de las tetraspaninas en la migración celular, proceso en el cual las integrinas desempeñan un rol destacado. Llevamos a cabo ensayos de quimiotaxis utilizando MIP-1 α y MIP-5 como quimioattractantes, los cuales actúan preferentemente sobre CDs inmaduras. Observamos que la incubación con Acs anti-CD9, -CD63, -CD81 y -CD82 aumentó la migración celular entre un 50% y un 70%, y cuando los Acs fueron agregados simultáneamente, la migración aumentó casi un 100%. El mecanismo responsable de este aumento debe ser diferente para las distintas tetraspaninas, ya que observamos previamente que la unión de los Acs induce la internalización de CD63 y CD82, pero no de CD9 y CD81, pero de todas formas el efecto sería debido a la asociación tetraspaninas-integrinas. Se ha postulado que la posible acción de las tetraspaninas sobre el tráfico de las integrinas permitiría el reclutamiento de estas últimas en el "frente" celular y el control de su reciclado durante la migración, lo cual contribuye al mantenimiento de las protrusiones celulares necesarias para el movimiento¹². La internalización de las tetraspaninas puede conducir a la internalización de las integrinas, como se describió previamente, pero cabe también la posibilidad de que la unión de los Acs anti-tetraspaninas cause en las integrinas una modificación conformacional que afecte su funcionalidad. Al respecto, se ha observado que la expresión de un determinado epítopo en CD9 depende de su asociación con $\alpha_6\beta_1$ y es funcionalmente relevante para la migración celular³²². Alternativamente, las tetraspaninas podrían actuar directamente sobre las quinasas que fosforilan las subunidades de las integrinas, como la PKC, la cual se observó formando complejos con tetraspaninas.

La participación de las tetraspaninas en la migración celular ha sido ampliamente documentada en células tumorales⁶⁰. Nuestros resultados concuerdan con lo observado en ciertas líneas tumorales, donde se ha asociado una expresión disminuida de las tetraspaninas con un aumento en la motilidad celular. Al respecto, CD9, CD63 y CD82 son reconocidas como “proteínas supresoras tumorales”. Su expresión en muchos casos se ve disminuida durante la progresión tumoral, por lo que su presencia se asocia con un mejor pronóstico. La asociación con integrinas podría explicar el rol de las tetraspaninas en los procesos malignos, ya que la disminución en la expresión de las tetraspaninas podría alterar la formación de complejos con proteínas involucradas en la transducción de señales, o la misma expresión de superficie de las integrinas (como se observó para las moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1¹⁰⁵) y esto llevaría al aumento de la capacidad metastásica de las células. La incubación con los Acs anti-CD63 y anti-CD82 estaría así mimetizando el efecto de la ausencia de la tetraspanina en la superficie celular.

Dada la propiedad de CD63 de ciclar entre la membrana plasmática y los compartimentos intracelulares, se ha involucrado a esta tetraspanina en la señalización celular “de adentro hacia afuera”. Este proceso se refiere a la expresión en la membrana plasmática de CD63 en células que en estado basal sólo expresan dicha tetraspanina intracelularmente, pero que al ser estimuladas sufren una translocación de CD63 generalmente acompañando la secreción de gránulos. Teniendo en cuenta nuestra observación de la internalización del complejo FC-5.01-CD63 hacia compartimentos endocíticos, postulamos que CD63 participaría también en la señalización celular “de afuera hacia adentro”. Proponemos que CD63 podría actuar asociado a un receptor antigénico o actuando él mismo como receptor de un ligando aún no descrito y postulamos que la translocación de CD63 hacia la ruta endosomal/lisosomal en CDs podría estar ligada a la captura de Ags en estas células. Con el fin de poner a prueba nuestra hipótesis, analizamos la participación de CD63 en la captura de Ags

extraños por las CDs (fagocitosis de *S. cerevisiae* y partículas de látex, endocitosis de FITC-Dx, infección con el virus del dengue). Hemos demostrado que CD63 se internaliza luego de la fagocitosis de *S. cerevisiae*, co-localizando intracelularmente con las levaduras fagocitadas. Esta internalización parece ser dependiente del receptor de β -glucanos, pero no del receptor de manosa (MR), ya que fue inhibida por laminarina (glucano β -1,3 semejante al glucano de levaduras), pero no por α -manano (polisacárido bacteriano que se une con alta afinidad al MR). Del mismo modo, la fagocitosis de levaduras por las CDs no resultó significativamente inhibida por el manano, lo cual confirma resultados anteriores que sugerían la participación del receptor de β -glucanos en la fagocitosis de derivados de pared de *S. cerevisiae* en macrófagos de ratón carentes del receptor MR³¹⁷. Mediante inmunoprecipitación comprobamos la asociación de CD63 con dectin-1, un receptor de β -glucanos recientemente descubierto, que reconoce una variedad de glucanos β -1,3 y β -1,6 así como levaduras intactas¹⁶⁶. Por el contrario, la endocitosis de FITC-dextrán (FITC-Dx) no causó modificación en la expresión de superficie de CD63. A diferencia de lo que ocurre con la fagocitosis de levaduras, el MR es considerado el principal responsable de la captación de FITC-Dx, por lo que no habría interacción entre CD63 y el MR. Por otra parte, el MR recicla preferentemente a través de endosomas tempranos, a diferencia de CD63 y otros receptores endocíticos de las CDs (como Dec-205 y DC-SIGN), que alcanzan los compartimentos MIICs. La expresión de CD63 tampoco se modificó luego de la captura de partículas de látex, lo que estaría indicando una selectividad en la internalización de dicha tetraspanina. Es de destacar también que sólo CD63, y no las restantes tetraspaninas estudiadas, participaría en la captura de Ags extraños. También debe tenerse en cuenta que la incubación con el AMC FC-5.01 no inhibió la fagocitosis de levaduras, lo cual sugiere una cooperación de CD63 con dectin-1 en la internalización de ciertos Ags, pero no una función de receptor, por lo menos en este caso. Por lo tanto, postulamos que CD63 actuaría como chaperona, dirigiendo ciertos Ags a los compartimentos MIIC, donde tiene

lugar el procesamiento y cargado de péptidos en las moléculas MHCII. Se ha observado la asociación de CD63 y CD82 con moléculas HLA-DM (moléculas involucradas en la “edición” de los péptidos a ser presentados) en linfocitos B, y se ha demostrado recientemente que el “encuentro” entre estas moléculas y las moléculas MHCII inicialmente presentes en los MIICs en microdominios de membrana distintos de los microdominios enriquecidos en tetraspaninas, sería posible gracias a la facultad de las tetraspaninas de desplazarse de un tipo de dominio a otro, ayudadas por la presencia de ácidos grasos en residuos adyacentes a la membrana o transmembrana (residuos palmitoilados)²⁰³. Del mismo modo como ocurre con HLA-DM, CD63 podría facilitar el contacto entre ciertos Ags y las moléculas MHCII.

El receptor DC-SIGN¹⁶⁴ surgió también como un posible candidato a “interactuar” con CD63. Fue hallado en dominios “rafts”, y, a diferencia del MR, se internaliza y alcanza los compartimentos MIIC. Al igual que ciertas tetraspaninas, ha sido involucrado en la entrada de varios patógenos en las células, entre ellos el virus del dengue. Sin embargo, nuestros resultados parecen indicar que no existiría ninguna relación entre CD63 o las restantes tetraspaninas estudiadas y el receptor DC-SIGN.

Dadas las evidencias presentadas acerca de la localización estratégica de CD63 en la membrana plasmática y en compartimentos intracelulares de las CDs, su habilidad de formar complejos con receptores fagocíticos y su predisposición a internalizarse y seguir el trayecto endosomas→lisosomas→MIICs, no sólo luego de la unión de un Ac específico sino de Ags extraños como las levaduras, co-localizando con moléculas MHCII, proponemos que CD63 está involucrado en la captura de ciertos Ags y su posterior procesamiento y/o presentación en el contexto de las moléculas MHC de clase II. Por otra parte, la localización en la membrana plasmática de las CDs de las tetraspaninas CD9, CD63, CD81 y CD82 sería de importancia para la modulación de la capacidad migratoria de dichas células.

Nuestros resultados aportan nuevos datos a favor de la participación de las tetraspaninas en funciones específicas como la fagocitosis y el “sorting” de otras proteínas de la familia y de integrinas en CDs. Al mismo tiempo, el rol de las tetraspaninas en la migración celular estaría relacionado con el mantenimiento de complejos con integrinas y moléculas de señalización. De este modo, las tetraspaninas se comportarían no sólo como “proteínas de andamiaje” sino que a la vez desempeñarían roles más activos en las CDs.

El hallazgo de la capacidad de internalización del complejo de superficie FC-5.01-CD63 y su localización posterior en compartimentos MIIC nos alentó a la construcción de una molécula recombinante “single-chain Fv” cuya versatilidad permitiera la posterior construcción de una proteína de fusión portando péptidos de interés antigénico. Hemos citado en Introducción varias ventajas de las moléculas recombinantes frente a los Acs enteros, entre ellas su menor inmunogenicidad y la potencialidad de fusionarles enzimas, citoquinas, toxinas, etc., lo cual permitiría reducir la dosis administrada de dichas sustancias. Recientemente se han diseñado varias moléculas recombinantes dirigidas contra receptores de CDs que son capaces de internalizarse, como el DC-SIGN y el MR^{227,233}.

Construimos y produjimos con éxito la molécula recombinante scFv-5.01, demostramos que retiene la especificidad por la tetraspanina CD63 y que es también susceptible de internalizarse a compartimentos MIIC en CDs. La monovalencia del fragmento causa que la magnitud del reconocimiento del CD63 sea menor en comparación con el Ac entero, bivalente, pero la especificidad del reconocimiento se mantiene. Ensayamos asimismo la reactividad de la molécula sobre células de melanoma y extractos tumorales CD63+, con el fin de evaluar el reconocimiento del Ag en distintos tipos celulares que previamente habían sido utilizados para estudiar la reactividad del anticuerpo entero.

A continuación proseguimos con la construcción de una proteína de fusión, a partir de la molécula anterior, mediante el clonado de la secuencia codificante de un péptido de melanoma (MART-1). La versatilidad de la construcción original permitirá luego cambiar la estrategia y clonar otra secuencia de interés. Esta nueva molécula recombinante retuvo también la especificidad por CD63 y se internalizó en CDs, alcanzando los compartimentos MIIC. Planeamos continuar con la caracterización de esta molécula, evaluando si es efectivamente presentada por las CDs y si es capaz de generar una respuesta específica de linfocitos respondedores a MART-1.

La generación de estas moléculas recombinantes presentó varias dificultades, tanto en la construcción como en la producción. Al respecto, con el sistema utilizado de expresión en *E. coli* obtuvimos un rendimiento muy bajo (aproximadamente 120 µg/l de cultivo de bacterias), lo cual sin dudas requiere ser optimizado. Pensamos ensayar un sistema de expresión en levaduras (*Pichia pastoris*), esperando mejorar el rendimiento.

Paralelamente evaluamos una estrategia alternativa con el mismo propósito de dirigir péptidos o proteínas de interés hacia las CDs. En este caso se trató de la conjugación química de una proteína al AMC FC-5.01 entero. Otros autores han aplicado una estrategia similar en CDs, utilizando un Ac que reconoce al receptor Dec-205²²⁸. Elegimos en primer lugar al toxoide tetánico (TT), una proteína altamente inmunogénica que permitiría evaluar con relativa facilidad la generación de una respuesta específica de linfocitos respondedores, de modo de poner a prueba el sistema. Partiendo de dadores vacunados contra el tétanos, obtuvimos CDs, las incubamos con TT o el conjugado FC-5.01-TT y evaluamos la respuesta de linfocitos autólogos mediante un ensayo de proliferación, midiendo la incorporación de [³H]timidina. Observamos que tanto el TT sin conjugar como el conjugado FC-5.01-TT es presentado por las CDs y genera una respuesta específica de linfocitos. A concentraciones altas de TT o conjugado, se produjo la saturación del sistema y no se observaron diferencias entre la respuesta inducida por el TT conjugado y sin conjugar. Sin

embargo, reduciendo la dosis de los Ags y el tiempo de incubación CDs-Ags, se encontraron condiciones en la que el TT conjugado resultaba ser más inmunogénico que el TT sin conjuguar, siendo la diferencia estadísticamente significativa. Para estos experimentos se eligieron dadores vacunados contra el tétanos dentro de un período no mayor a los cinco años. Pero debido a la variabilidad entre ellos, para cada uno debieron evaluarse las respuestas a diferentes dosis de Ags. Continuaremos con el desarrollo de esta estrategia, analizando posteriormente la conjugación de proteínas de interés antigénico para el melanoma.

Demostramos que tanto el AMC FC-5.01 como las moléculas derivadas scFv-5.01 y scFv-5.01-MART-1 reconocen CD63 en la superficie de CDs, se internalizan y alcanzan los compartimentos MIIC. Por lo tanto, pueden ser potencialmente utilizadas como vehículo de péptidos o proteínas antigénicas en las CDs. Sustenta esta hipótesis la observación de que el conjugado FC-5.01-TT fue presentado por las CDs y generó una respuesta de linfocitos autólogos específica para el TT.

CONCLUSIONES

Hasta el momento es escasa la evidencia con la que se cuenta acerca de la participación de las tetraspaninas en procesos como la migración, fagocitosis y presentación antigénica en células dendríticas (CDs). Los resultados presentados en esta Tesis constituyen un aporte original al esclarecimiento del posible rol de la tetraspanina CD63 y otras tetraspaninas en CDs humanas. Pudimos demostrar:

- Las tetraspaninas CD9, CD63, CD81, CD82 y CD151 se expresan en CDs inmaduras y maduras. CD9 y CD81 se localizan fundamentalmente en la superficie celular, mientras que CD63 y CD82 también se expresan intracelularmente. La expresión de CD151 es leve y sólo fue detectada en la superficie celular.
- CD63 y CD82 se internalizan y alcanzan los compartimentos MIIC.
- Las tetraspaninas CD9, CD63, CD81 y CD82 participan en la migración celular. Este efecto sería debido a la asociación tetraspaninas - integrinas en la membrana celular.
- Las integrinas CD11b/ α_M , CD18/ β_2 , CD29/ β_1 y CD49e/ α_5 se expresan en CDs inmaduras y maduras, no registrándose variaciones en la expresión entre ambos estadios de maduración celular.
- CD63 se asocia con la integrina CD11b/ α_M .
- CD63 se asocia con el receptor de β -glucanos dectin-1 y participa en la fagocitosis de *S. cerevisiae*.
- CD63 no estaría asociada al receptor MR ni al DC-SIGN.

Por otra parte, construimos la molécula recombinante scFv-5.01, derivada del AMC FC-5.01, y, a partir de ella, la proteína de fusión scFv-

5.01-MART-1. Paralelamente, conjugamos el AMC FC-5.01 con el toxoide tetánico. Demostramos lo siguiente:

- Tanto las moléculas recombinantes como el conjugado químico mantienen la reactividad del anticuerpo parental.
- Las complejos de superficie scFv-CD63 y FC-5.01-TT-CD63 se internalizan y alcanzan los compartimentos MIIC.
- El conjugado FC-5.01-TT es presentado por las CDs, y genera una respuesta específica de linfocitos respondedores al TT.

Los resultados hasta el momento obtenidos nos permiten suponer que el AMC FC-5.01 o sus fragmentos derivados pueden ser utilizados como vehículos de péptidos o proteínas antigénicas a las CDs.

Los futuros estudios estarán dirigidos a:

- Confirmar que las moléculas recombinantes resultan efectivas para la presentación de los péptidos que portan.
- Analizar el tipo de respuesta generada.
- Evaluar qué estrategia resulta más conveniente/eficaz para potenciar la inmunogenicidad de los antígenos a ser presentados.

BIBLIOGRAFÍA

1. Barrio M.M. Obtención y caracterización del anticuerpo monoclonal FC-5.01, reactivo con cáncer de mama, melanoma y otros tumores humanos. Tesis de Doctorado, 1998.
2. Wright M.D y Tomlinson M.G. The ins and outs of the transmembrane 4 superfamily. *Immunol. Today* 15:588-594, 1994.
3. Maecker H.T. y col. The tetraspanin superfamily: molecular facilitators. *The FASEB Journal* 11:428-441, 1997.
4. Tarrant J.M. y col. Tetraspanins: molecular organizers of the leukocyte surface. *Trends in Immunology* 24:610-617, 2003.
5. Cannon K.S. y Cresswell P. Quality control of transmembrane domain assembly in the tetraspanin CD82. *EMBO J.* 20:2443-2453, 2001.
6. Stipp C.S. y col. Functional domains in tetraspanin proteins. *Trends Biochem Sci.* 28:106-12, 2003.
7. Ono M y col. Glycosylation effect on membrane domain (GEM) involved in cell adhesion and motility: a preliminary note on functional alpha3, alpha5-CD82 glycosylation complex in Id1D 14 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 279:744-50, 2000.
8. White A. y col. Frequent downregulation of the KAI1(CD82) metastasis suppressor gene in human cancer cell lines. *Oncogene* 16:3143-3149, 1998.
9. Engering A. y col. Differential post-translational modification of CD63 molecules during maturation of human dendritic cells. *Eur. J. Biochem.* 270:2412-2420, 2003.
10. Seehafer J.G. y col. Myristic acid is incorporated into the two acylatable domains of the functional glycoprotein CD9 in ester, but not in amide bonds. *Biochem. Biophys. Acta* 1039:218-226, 1990.
11. Yang X. y col. Palmitoylation of tetraspanin proteins: modulation of CD151 lateral interactions, cellular distribution, and integrin-dependent cell morphology. *Mol. Biol. Cell* 13:767-781, 2002.
12. Berditchevski F. y col. Complexes of tetraspanins with integrins: more than meets the eye. *J Cell Science* 114:4143-51, 2001.
13. Berditchevski F. y col. Expression of the palmitoylation-deficient CD151 weakens the association of $\alpha 3\beta 1$ integrin with the tetraspanin-enriched microdomains and affects integrin-dependent signaling. *J. Biol. Chem.* 277:36991-37000, 2002.
14. Yang W. y col. Palmitoylation supports assembly and function of integrin-tetraspanin complexes. *J. Cell Biol.* 167:1231-1249, 2004.
15. Bonifacino J.S. y Dell'Angelica E.C. Molecular basis for the recognition of tyrosine-based sorting signals. *J. Cell. Biol.* 145:923-926, 1999.
16. Kitadokoro K. y col. CD81 extracellular domain 3D structure: insight into the tetraspanin superfamily structural motifs. *The EMBO J.* 20:12-18, 2001.
17. Seigneuret M. y col. Structure of the tetraspanin main extracellular domain. *J. Biol. Chem.* 276:40055-40064, 2001.
18. Yunta M. y col. Tetraspanin proteins as organizers of membrane microdomains and signalling complexes. *Cell Signal* 15:559-64, 2003.
19. Hemler M.E. Specific tetraspanin functions. *J. Cell Biol.* 155:1103-7, 2001.
20. Rubinstein E. y col. CD9, CD63, CD81 and CD82 are components of a surface tetraspan network connected to HLA-DR and VLA integrins. *Eur. J. Immunol.* 1996, 26:2657-2665.

21. Charrin S. y col. Multiple levels of interaction within the tetraspanin web. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 304:107-112, 2003.
22. Hemler M.E. Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion and fusion events, and define a novel type of membrane microdomain. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 19:397-422, 2003.
23. Levy S. y Shoham T. The tetraspanin web modulates immune-signalling complexes. *Nature Rev. Immunol.* 5:136-148, 2005.
24. Kitadokoro K. y col. Subunit association and conformational flexibility in the head subdomain of human CD81 large extracellular loop. *Biol. Chem.* 383:1447-1452, 2002.
25. Kovalenko O.V. y col. Evidence for specific tetraspanin homodimers: inhibition of palmitoylation makes cysteine residues available for cross-linking. *Biochem. J.* 377:407-417, 2004.
26. Yáñez-Mó M. y col. Tetraspanins and intercellular interactions. *Microcirculation* 8:153-68, 2001.
27. Dellaguillaumie A. y col. Rho GTPases link cytoskeletal rearrangements and activation processes induced via the tetraspanin CD82 in T lymphocytes. *J. Cell Sci.* 115:433-43, 2002.
28. Mazzocca A. y col. Expression of transmembrane 4 superfamily (TM4SF) proteins and their role in hepatic stellate cell motility and wound healing migration. *J. Hepatology* 37:322-30, 2002.
29. Sauer G. y col. Expression of tetraspanin adaptor proteins below defined threshold values is associated with in vitro invasiveness of mammary carcinoma cells. *Oncol. Rep.* 10:405-10, 2003.
30. Le Naour F. y col. Severely reduced female fertility in CD9-deficient mice. *Science* 287:319-21, 2000.
31. Stipp C.S. y Hemler M.E. Transmembrane-4-superfamily proteins CD151 and CD81 associates with $\alpha_3\beta_1$ integrin, and selectively contribute to $\alpha_3\beta_1$ -dependent neurite outgrowth. *J. Cell Science* 113:1871-1882, 2000.
32. Fradkin L.G. y col. Genomewide analysis of the Drosophila tetraspanins reveals a subset with similar function in the formation of the embryonic synapse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99:13663-8, 2002.
33. Claas C. y col. Evaluation of prototype transmembrane 4 superfamily protein complexes and their relation to lipid rafts. *J. Biol. Chem.* 276:7974-7984, 2001.
34. Heijnen H.F. y col. Concentration of rafts in platelet filopodia correlates with recruitment of c-Src and CD63 to these domains. *J Thromb Haemost.* 1:1161-73, 2003.
35. Xavier R. y Seed B. Membrane compartmentation and the response to antigen. *Curr. Op. Immunol.* 11:265-269, 1999.
36. Simons K. y Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 1:31-39, 2000.
37. Odintsova E. y col. Attenuation of EGF receptor signaling by a metastasis suppressor tetraspanin KAI-1/CD82. *Curr. Biol.* 10:1009-1012, 2000.
38. Skubitz K.M. y col. CD63 associates with tyrosine kinase activity and CD11b/CD18, and transmits an activation signal in neutrophils. *J. Immunol.* 157:3617-3626, 1996.
39. Berditchevski F. y col. Characterization of novel complexes on the cell surface between integrins and proteins with 4 transmembrane domains (TM4 proteins). *Mol. Biol. Cell* 7:193-207, 1996.
40. Boucheix C. y Rubinstein E. Tetraspanins. *Cell Mol. Life Sci.* 58:1189-1205, 2001.
41. Zemni R. y col. A new gene involved in X-linked mental retardation identified by analysis of an X;2 balanced translocation. *Nat. Genet.* 24:167-170, 2000.
42. Kohl S. y col. RDS/peripherin gene mutations are frequent causes of central retinal dystrophies. *J Med Genet.* 34:620-6, 1997.

43. Clarke G. y col. Rom-1 is required for rod photoreceptor viability and the regulation of disk morphogenesis. *Nat Genet.* 25:67-73, 2000.
44. Silvie O. y col. Hepatocyte CD81 is required for *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium yoelii* sporozoite infectivity. *Nat. Med.* 9:93-96, 2003.
45. Nishibori M. y col. The protein CD63 is in platelet dense granules, is deficient in a patient with Hermansky-Pudlack syndrome, and appears identical to granulophysin. *J. Clin. Invest.* 91:1775-1782, 1993.
46. Flint M. y col. Characterization of hepatitis C virus E2 glycoprotein interaction with a putative cellular receptor, CD81. *J. Virology* 73:6235-44, 1999.
47. Kelic S. y col. CD81 regulates neuron-induced astrocyte cell-cycle exit. *Mol. Cell. Neurosci.* 17:551-60, 2001.
48. Ryu F. y col. Domain analysis of the Tetraspanins: Studies of CD9/CD63 chimeric molecules on subcellular localization and upregulation activity for diphtheria toxin binding. *Cell Structure and Function* 25:317-327, 2000.
49. Kayi K. y col. Infertility of CD9-deficient mouse eggs is reversed by mouse CD9, human CD9 or mouse CD81; polyadenylated mRNA injection developed for molecular analysis of sperm-egg fusion. *Developmental Biol.* 247:327-334, 2002.
50. Wright M.D. y col. Gene structure, chromosomal localization, and protein sequences of mouse CD53: evidence that the transmembrane 4 superfamily arose by gene duplication. *Int. Immunol.* 5:209-16, 1993.
51. Andria M. y col. Genomic organization and chromosomal localization of the TAPA-1 gene. *J. of Immunol.* 147:1030-1036, 1991.
52. von Lindern J.J. y col. Potential role for CD63 in CCR5-mediated human immunodeficiency virus type 1 infection of macrophages. *J. Virol.* 77: 3624-33, 2003.
53. Willett B. J. y col. FIV infection of the domestic cat: an animal model for AIDS. *Immunol. Today* 18:182-189, 1997.
54. Imai T. y col. CD33 antigen and M38 antigen recognized by monoclonal antibodies inhibitory to syncytium formation by human T cell leukemia virus type 1 are both members of the transmembrane 4 superfamily and associate with each other and with CD4 or CD8 in T cells. *J. Immunol.* 151:6470-6481, 1993.
55. Pique C. y col. Interaction of CD82 tetraspanin proteins with HTLV-1 envelope glycoproteins inhibits cell-to-cell fusion and virus transmission. *Virology* 276:455-465, 2000.
56. Pileri P.Y. y col. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 282:938-941, 1998.
57. Hynes R.O. Integrins: versatility, modulation and signaling in cell adhesion. *Cell* 69:11-25, 1992.
58. Ruoslahti E. Integrins. *J. Clin. Invest.* 87:1-5, 1991.
59. Giancotti F.G. Integrin signaling: specificity and control of cell survival and cell cycle progression. *Curr. Op. Cell Biol.* 9:691-700, 1997.
60. Boucheix C. y col. Tetraspanins and malignancy. *Expert Rev. Mol. Med.* 2001:1-17, 2001. <http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/01002381a.pdf>
61. Yauch R.L. y col. Direct extracellular contact between integrin $\alpha_3\beta_1$ and TM4SF protein CD151. *J. Biol. Chem.* 275:9230-9238, 2000.
62. Serru V. y col. Selective tetraspan-integrin complexes (CD81/ $\alpha_4\beta_1$, CD151/ $\alpha_3\beta_1$, CD151/ $\alpha_6\beta_1$) under conditions disrupting tetraspan interactions. *Biochem. J.* 340:103-111, 1999.
63. Yauch R.L. y col. Highly stoichiometric, stable, and specific association of integrin $\alpha_3\beta_1$ with CD151 provides a major link to phosphatidylinositol 4-kinase, and might regulate cell migration. *Mol. Biol. Cell* 9:2751-2765, 1998.
64. Fitter S. y col. The transmembrane 4 superfamily (TM4SF) protein CD151 (PETA-3) associates with β_1 and $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrins in haematopoietic cells and modulates cell-cell adhesion. *Biochem. J.* 338:61-70, 1999.

65. Berditchevski F. y Odintsova E. Characterization of integrin-tetraspanin adhesion complexes: role of tetraspanins in integrin signaling. *J. Cell Biol.* 146:477-492, 1999.
66. Sugiura T. y col. Function of $\alpha_3\beta_1$ -tetraspanin protein complexes in tumor cell invasion. Evidence for the role of the complexes in production of matrix metalloproteinase 2 (MMP-2). *J. Cell. Biol.* 146:1375-89, 1999.
67. Baudoux B. y col. The tetraspanin CD9 associates with the integrin $\alpha_4\beta_4$ in cultured human epidermal keratinocytes and is involved in cell motility. *Eur. J. Cell. Biol.* 79:41-51, 2000.
68. Yauch R.L. y Hemler M.E. Specific interactions among transmembrane 4 superfamily (TM4SF) proteins and phosphoinositide 4-kinase. *Biochem. J.* 351:629-637, 2000.
69. Zhang X.A. y col. Transmembrane 4 superfamily proteins associate with activated protein kinase C (PKC) and link PKC to specific β_1 integrins. *J. Biol. Chem.* 276:25005-13, 2001.
70. Ng T. y col. PKC α regulates β_1 integrin-dependent cell motility through association and control of integrin traffic. *EMBO J.* 18:3909-3923, 1999.
71. Keel P. y col. Integrins and GTPases in tumour cell growth, motility and invasion. *Trends Cell. Biol.* 8:101-106, 1998.
72. Boudreau N. y col. Extracellular matrix signaling: integration of form and function in normal and malignant cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10:640-646, 1998.
73. Hemler M.E. y col. Association of TM4SF proteins with integrins: relevance to cancer. *Biochem. Biophys. Acta* 1287:67-71, 1996.
74. Radford K. y col. CD63 associates with the transmembrane 4 superfamily members, CD9 and CD81, and with β_1 integrins in human melanoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 222:13-18, 1996.
75. Dong J.T. y col. KAI1, a metastasis suppressor gene for prostate cancer on human chromosome 11p11.2. *Science* 268:884-886, 1995.
76. Guo X.Z. y col. KAI1, a new metastasis suppressor gene, is reduced in metastatic hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 28:1481-1488, 1998.
77. Adachi M. y col. Correlation of KAI1/CD82 gene expression with good prognosis in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 56:1751-1755, 1996.
78. Lombardi D.P. y col. Loss of KAI1 expression on the progression of colorectal cancer. *Cancer Res.* 59:5724-5731, 1999.
79. Ikeyama S. y col. Suppression of cell motility and metastasis by transfection with human motility-related protein (MRP-1/CD9) DNA. *J. Exp. Med.* 177:1231-1237, 1993.
80. Radford K.J. y col. Regulation of tumor cell motility and migration by CD63 in a human melanoma cell line. *J Immunol.* 158:3353-3358, 1997.
81. Si Z. y Hersey P. Expression of the neuroglandular antigen and analogues in melanoma. CD9 expression appears inversely related to metastatic potential of melanoma. *Int. J. Cancer* 54:37-43, 1993.
82. Miyake M. y col. Motility-related protein-1 (MRP-1/CD9) reduction as a factor of poor prognosis in breast cancer. *Cancer Res.* 56:1244-1249, 1996.
83. Mori M. y col. Motility-related protein-1 (MRP-1/CD9) expression in colon cancer. *Clin. Cancer Res.* 4:1507-1510, 1998.
84. Hammond C. y col. The Tetraspan protein CD82 is a resident of MHC Class II compartments where it associates with HLA-DR, -DM and -DO molecules. *J. Immunol.* 161:3282-3291, 1998.
85. Escola J.M. y col. Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 273:20121-7, 1998.

86. Busch R. y col. Accessory molecules for MHC class II peptide loading. *Curr. Opin. Immunol.* 12(1): 99-106, 2000.
87. Schick M.R. y col. The TAPA-1 molecule is associated on the surface of B cells with HLA-DR molecules. *J. Immunol* 151:4090-4097, 1993.
88. Kropshofer H. y col. Tetraspan microdomains distinct from lipid rafts enrich select peptide-MHC class II complexes. *Nat. Immunol.* 3:61-68, 2002.
89. Mittelbrunn M. y col. Cutting edge: dynamic redistribution of tetraspanin CD81 at the central zone of the immune synapse in both T lymphocytes and APC. *J. Immunol.* 169:6691-6695, 2002.
90. Scharz N.E. y col. From the antigen-presenting cell to the antigen-presenting vesicle: the exosomes. *Curr Opin Mol Ther.* 4:372-81, 2002.
91. Wubbolts R.W. y col. Proteomic and biochemical analysis of human B cell derived exosomes: potential implications for their function and multivesicular body formation. *J. Biol. Chem.* 278: 208-18, 2003.
92. Théry C. y col. Indirect activation of naive CD4+ T cells by dendritic cell-derived exosomes. *Nat Immunol* 3:1156-62, 2002.
93. Simonsen A. y col. The role of phosphoinositides in membrane transport. *Curr. Op. Cell Biol.* 13:485-492, 2001.
94. Kaji K. y col. The gamete fusion process is defective in eggs of CD9-deficient mice. *Nat. Genet.* 24:279-82, 2000.
95. Miyado K. y col. Requirement of CD9 on the egg plasma membrane for fertilization. *Science* 287:321-4, 2000.
96. Miller B.J. y col. Normal fertilization occurs with eggs lacking the integrin $\alpha_6\beta_1$ and is CD9-dependent. *J. Cell Biol.* 149:1289-1296, 2000.
97. Waterhouse R. y col. Murine CD9 is the receptor for pregnancy-specific glycoprotein 17. *J. Exp. Med.* 195:277-28, 2002.
98. Tachibana L. y Hemler M.E. Role of transmembrane-4 superfamily (TM4SF) proteins CD9 and CD81 in muscle cell fusion and myotube maintenance. *J. Cell. Biol.* 156:893-904, 1999.
99. Takeda Y. y col. Tetraspanins CD9 and CD81 function to prevent the fusion of mononuclear phagocytes. *J. Cell. Biol.* 161:945-956, 2003.
100. Slupsky J.R. y col. Evidence that monoclonal antibodies against CD9 antigen induce specific association between CD9 and the platelet glycoprotein IIb-IIIa complex. *J. Biol. Chem.* 264:12289-12293, 1989.
101. Masellis-Smith A. y col. Anti-CD9 monoclonal antibodies induce homotypic adhesion of pre-B cell lines by a novel mechanism. *J. Immunol.* 144:1607-1613, 1990.
102. Cha J.H. y col. Cell surface monkey CD9 antigen is a coreceptor that increases diphtheria toxin sensitivity and diphtheria toxin receptor affinity. *J. Biol. Chem.* 275:6901-6907, 2000.
103. Nakamura K.T. y col. Importance of the major extracellular domain of CD9 and the epidermal growth factor (EGF)-like domain of heparin-binding EGF-like growth factor for up regulation of binding and activity. *J. Biol. Chem.* 275:18284-18290, 2000.
104. Charrin S.F. y col. The major CD9 and CD81 molecular partner. Identification and characterization of the complexes. *J. Biol. Chem.* 276:14329-14337, 2001.
105. Barreiro O. y col. Endothelial tetraspanin microdomains regulate leukocyte firm adhesion during extravasation. *Blood* 105:2852-61, 2005.
106. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM). CD9 antigen.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispmim.cgi?id=143030>
107. Hotta H. y col. Molecular cloning and characterization of an antigen associated with early stages of melanoma tumor progression. *Cancer Res.* 48:2955-2962, 1988.

108. Barrio M.M. y col. A New epitope on human melanoma-associated antigen CD63/ME491 expressed by both primary and metastatic melanoma. *Hybridoma* 17: 355-364, 1998.
109. Woodhead V.E. y col. From sentinel to messenger: an extended phenotypic analysis of the monocyte to dendritic cell transition. *Immunology* 94:552-9, 1998.
110. Metzelaar M.J. y col. CD63 antigen: a novel lysosomal membrane glycoprotein, cloned by a screening procedure for intracellular antigens in eucaryotic cells. *J. Biol. Chem.* 266:3239-3245, 1991.
111. Knol E.F. y col. Monitoring human basophil activation via CD63 monoclonal antibody 435. *J. Allergy Clin. Immunol.* 88:328-338, 1991.
112. Mahmudi-Azer S. y col. Translocation of the tetraspanin CD63 in association with human eosinophil mediator release. *Blood* 99:4039-4047, 2002.
113. Israels S.J. y col. CD63 associates with the alphaIIb beta3 integrin-CD9 complex on the surface of activated platelets. *Thromb Haemost* 85:134-41, 2001.
114. Peters P.J. y col. Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes. *J. Exp. Med.* 173:1099-109, 1991.
115. Vischer U.M. y col. CD63 is a component of Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *Blood* 82:1184-91, 1993.
116. Amano T. y col. Dynamics of intracellular granules with CD63-GFP in rat basophilic leukemia cells. *J Biochem (Tokyo)* 129:739-44, 2001.
117. Kobayashi T. y col. The Tetraspanin CD63/lamp3 Cycles between Endocytic and Secretory Compartments in Human Endothelial Cells. *Mol. Biol. Cell* 11:1829-1843, 2000.
118. Skubitz K.M. y col. CD63 associates with CD11b/CD18 in large detergent-resistant complexes after traslocation to the cell surface in human neutrophils. *FEBS Letters* 469:52-56, 2000.
119. Duffield A. y col. The tetraspanin CD63 enhances the internalization of the H,K-ATPase beta-subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100:15560-5, 2003.
120. Takino T. y col. Tetraspanin CD63 promotes targeting and lysosomal proteolysis of membrane-type 1 matrix metalloproteinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 304:160-166, 2003.
121. Radford K.J. y col. Suppression of human melanoma cell growth and metastasis by the melanoma-associated antigen CD63 (ME491). *Int. J.Cancer* 62:631-635, 1995.
122. Jang H. y col. A decrease in the expression of CD63 tetraspanin protein elevates invasive potential of human melanoma cells. *Exp. and Mol. Med.* 35: 317-323, 2003.
123. Berditchevski F. y col. Specific association of CD63 with the VLA-3 and VLA-6 integrins. *J. Biol. Chem.* 270(30), 17784-17790, 1995.
124. Gahl W.A. y col. Genetic defects and clinical characteristics of patients with a form of oculocutaneous albinism (Hermansky-Pudlack syndrome). *New Eng. J. Med.* 338:1258-1264, 1998.
125. Pfistershammer K. y col. CD63 as an activation-linked T cell costimulatory element. *J. Immunol.* 173:6000-6008, 2004.
126. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM). CD63 antigen.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispmim.cgi?id=155740>.
127. Matsumoto A.K. y col. Functional dissection of the CD21/CD19/TAPA-1/Leu-13 complex of B lymphocytes. *J. Exp. Med.* 178:1407-1417, 1993.
128. Maecker H.T. y Levy S. Normal lymphocyte development but delayed humoral response in CD81-null mice. *J. Exp. Med.* 185:1505-1510, 1997.

129. Shoham T. y col. The tetraspanin CD81 regulates the expression of CD19 during B cell development in a post-endoplasmic reticulum compartment. *J. Immunol.* 171:4062-4072, 2003.
130. Deng J. y col. Critical role of CD81 in cognate T-B cell interactions leading to Th2 responses. *Int. Immunol.* 14:513-523, 2002.
131. McKeating J.A. y col. Diverse hepatitis C virus glycoproteins mediate viral infection in a CD81 dependent manner. *J. Virol.* 78:8496-8505, 2004.
132. Deng J. y col. Allergen-induced airway hyperreactivity is diminished in CD81-deficient mice. *J. Immunol.* 165:5054-5061, 2000.
133. Clark K.L. y col. Pgr1 is a major CD81-associated protein on lymphocytes and distinguishes a new family of cell surface proteins. *J. Immunol.* 167:5115-5121, 2001.
134. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM). CD81 antigen.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=186845>
135. Shibagaki N. y col. Overexpression of CD82 on human T cells enhances LFA-1/ICAM-1-mediated cell-cell adhesion: functional association between CD82 and LFA-1 in T cell activation. *Eur. J. Immunol* 29:4081-91, 1999.
136. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM). CD82 antigen.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=600623>
137. Zhang X.A. y col. Function of the tetraspanin CD151- $\alpha_6\beta_1$ integrin complex during cellular morphogenesis. *Mol. Biol. Cell* 13:1-11, 2002.
138. Sterk L.M. y col. The tetraspan molecule CD151, a novel constituent of hemidesmosomes, associates with the integrin $\alpha_6\beta_4$ and may regulate the spatial organization of hemidesmosomes. *J. Cell Biol.* 149:969-982, 2000.
139. Karamatic C.V. CD151, the first member of the tetraspanin (TM4) superfamily detected on erythrocytes, is essential for the correct assembly of human basement membranes in kidney and skin. *Blood* 104:2217-2223, 2004.
140. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM). CD151 antigen.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=602243>
141. Steinman R.M. y Cohn Z.A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med.* 137:1142-1162, 1973.
142. Steinman R.M. y Cohn Z.A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro. *J. Exp. Med.* 139:380-397, 1974.
143. Steinman R.M. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu. Rev. Immunol.* 9:271-296, 1991.
144. Banchereau J. y Steinman R. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 392:245-252, 1999.
145. van Schooten W.C.A. y col. (1997). Biological properties of dendritic cells: implications to their use in the treatment of cancer. *Mol. Med. Today* 3(6), 254-260.
146. Shortman K. y Yong-Jung L. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat. Rev. Immunol.* 2:151-161, 2002.
147. de la Rosa G. y col. Migration of human blood dendritic cells across endothelial cell monolayers: adhesion molecules and chemokines involved in subset-specific transmigration. *J. Leuk. Biol.* 73:639-649, 2003.
148. Sallusto F. y Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor α . *J. Exp. Med.* 179:1109-1118, 1994.
149. Randolph G. y col. Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking. *Science* 282:480-483, 1998.
150. Randolph G. y col. Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. *Immunity* 11:753-761, 1999.

151. Grabbe S. y col. Dendritic cells: multi-lineal and multi-functional. *Immunol. Today* 21:431-433, 2000.
152. Dietz A.B. y col. Maturation of human monocyte-derived dendritic cells studied by microarray hybridization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 275:731-8, 2000.
153. Le Naour F. y col. Profiling changes in gene expression during differentiation and maturation of monocyte-derived dendritic cells using both oligonucleotide microarrays and proteomics. *J. Biol. Chem.* 276:17920-17931, 2001.
154. Gallucci S. y Matzinger P. Danger signals: SOS to the immune system. *Curr. Op. Immunol.* 13:114-119, 2001.
155. Rescigno M. y col. Dendritic cell survival and maturation are regulated by different signaling pathways. *J. Exp. Med.* 188:2175, 1998.
156. Ardeshna K.M. y col. The PI3 Kinase, p38 SAP kinase, and NF- κ B signal transduction pathways are involved in the survival and maturation of lipopolysaccharide-stimulated human monocyte-derived dendritic cells. *Immunobiology* 96:1039-1046, 2000.
157. Girolomoni G. y col. Dendritic cells hold promise for immunotherapy. *Immunol Today* 18:102-104, 1997.
158. Sallusto F. y col. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: Downregulation by cytokines and bacterial products. *J. Exp. Med.* 182:389-400, 1995.
159. Guermonprez P. y col. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 20:621-67, 2002.
160. van Kooyk Y. y Geijtenbeek T.B. A novel adhesion pathway that regulates dendritic cell trafficking and T cell interactions. *Immunol. Rev.* 186:47-56, 2002.
161. Engering A. y col. The mannose receptor functions as a high capacity and broad specificity antigen receptor in human dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 27:2417-2425, 1997.
162. East L. e Isacke C.M. The mannose receptor family. *Biochim. Biophys. Acta* 1572:364-386, 2002.
163. Engering A. y col. The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells. *J. Immunol.* 168:2118-2126, 2002.
164. Geijtenbeek T.B. y col. Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* 100:575-85, 2000.
165. Mahnke K. y col. The dendritic cell receptor for endocytosis, DEC-205, can recycle and enhance antigen presentation via major histocompatibility complex class II-positive lysosomal compartments. *J Cell Biol* 151:673-683, 2000.
166. Willment J.A. y col. Characterization of the human β -glucan receptor and its alternatively spliced isoforms. *J Biol Chem.* 276:43818-23, 2001.
167. Yokota K. y col. Identification of a human homologue of the dendritic cell-associated C-type lectin-1, dectin-1. *Gene* 272:51-60, 2001.
168. Taylor P.R. y col. The β -glucan receptor, Dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages. *J Immunol.* 169:3876-82, 2002.
169. Brown G.D. y col. Dectin-1 mediates the biological effects of β -glucans. *J. Exp. Med.* 197:119-1124, 2003.
170. Grünebach F. y col. Molecular and functional characterization of human Dectin-1. *Exp. Hematol.* 30:1309-1315, 2002.
171. Gantner B.N. y col. Collaboratory induction of inflammatory responses by dectin-1 and toll-like receptor 2. *J. Exp. Med.* 197:1107-1117, 2003.

172. Cambi A. y col. Microdomains of the C-type lectin DC-SIGN are portals for virus entry into dendritic cells. *J of Cell Biol.* 164:145-155, 2004.
173. Baron S. *Medical Microbiology*. 4th edition. Section 2. University of Texas, 1996.
174. Tassaneeritthep B. y col. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J. Exp. Med.* 197:823-829, 2003.
175. Sozzani S. y col. Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. *J. Immunol.* 161:1083-1086, 1998.
176. Puig-Kröger A. y col. Maturation-dependent expression and function of the CD49d integrin on monocyte-derived human dendritic cells. *J. Immunol.* 165:4338-4345, 2000.
177. Dieu-Nosjean M-C y col. Regulation of dendritic cell trafficking: a process that involves the participation of selective chemokines. *J. Leuk. Biol.* 66:252-262, 1999.
178. D'Amico G. y col. Adhesion, transendothelial migration and reverse transmigration of in vitro cultured dendritic cells. *Blood* 92:207-214, 1998.
179. Adema G.J. y col. Migration of dendritic cell based cancer vaccines : in vivo veritas? *Curr. Op. Immunol.* 17 :170-174, 2005.
180. Ebnet K. y Vestweber D. Molecular mechanisms that control leukocyte extravasation: the selectins and the chemokines. *Histochem. Cell. Biol.* 112:1-23, 1999.
181. Kansas G.S. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood* 88:3259-3287, 1996.
182. Luster A.D. Chemokines-Chemotactic cytokines that mediate inflammation. *New Engl J. Med.* 338:436-445, 1998.
183. Dustin M.L. y Springer A. Role of lymphocyte adhesion receptors in transient interactions and cell locomotion. *Annu. Rev. Immunol.* 9:27-66, 1991.
184. Springer T.A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76:301-314, 1994.
185. Laszik Z. y col. P-selectin glycoprotein ligand-1 is broadly expressed in cells of myeloid, lymphoid and dendritic lineage and in some nonhematopoietic cells. *Bloo* 88:3010-21, 1996.
186. Srinivas U. y col. E-selectin involvement in in vitro adhesion of blood dendritic cells to human umbilical cord endothelial cells. *Scand. J. Immunol.* 38:273-8, 1993.
187. Kieffer J.D. y col. Neutrophils, monocytes and dendritic cells express the same specialized form of PSGL-1 as do skin-homing memory T cells: cutaneous lymphocyte antigen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 285:577-87, 2001.
188. Bleijs D.A. y col. DC-SIGN and LFA-1: a battle for ligand. *Trends Immunol* 22:457-63, 2001.
189. Teunis B.H. y col. DC-SIGN-ICAM-2 interaction mediates dendritic cell trafficking. *Nat. Immunol.* 1:353-357, 2000.
190. Brown K.A. y col. Human blood dendritic cells: binding to vascular endothelium and expression of adhesion molecules. *Clin. Exp. Immunol.* 107:601-607, 1997.
191. Ebner S. y col. Expression on maturation-/migration-related molecules on human dendritic cells from blood and skin. *Immunobiology* 198:568-87, 1998.
192. Rollins B. Chemokines. *Blood* 90:909-928, 1997.
193. Mantovani A. The chemokine system: redundancy for robust outputs. *Immunology Today* 20:254-257, 1999.
194. Jung S. y Littman D.R. Chemokine receptors in lymphoid organ homeostasis. *Curr. Op. Immunol.* 11:319-325, 1999.
195. Hasegawa H. y Fujita S. Chemokines and lymphocytes: the role of chemokines and their receptors in the immune system. *Cell. Mol. Biol.* 47:599-607, 2001.

196. Cravens P.D. y Lipsky P.E. Dendritic cells, chemokine receptors and autoimmune inflammatory diseases. *Immunol. Cell Biol.* 80:497-505, 2002.
197. Caux C. y col. Dendritic cell biology and regulation of dendritic cell trafficking by chemokines. Springer. *Semin. Immunopathol.* 22:345-369, 2000.
198. McColl S.R. Chemokines and dendritic cells : A crucial alliance. *Immunol. Cell Biol.* 80:489-496, 2002.
199. Rodríguez A. y col. Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC class I presentation in dendritic cells. *Nat. Cell Biol.* 1:362-368, 1999.
200. Guermonprez P. y col. ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature* 425:397-402, 2003.
201. Gil-Torregrosa B.C. y col. Control of cross-presentation during dendritic cell maturation. *Eur. J. Immunol.* 34:398-407, 2004.
202. Geuze H.J. The role of endosomes and lysosomes in MHC class II functioning. *Immunol Today* 19:282-7, 1998.
203. Karacsonyi C. y col. Association of amajor histocompatibility complex II with cholesterol- and sphingolipid-rich membranes precedes peptide loading. *J. Biol. Chem.* 279:34818-34826, 2004.
204. Gatti E. y Pierre P. Understanding the cell biology of antigen presentation: the dendritic cell contribution. *Curr. Op. Cell Biology* 15:468-473, 2003.
205. Watts C. y Amigorena S. Antigen traffic pathways in denritic cells. *Traffic* 1:312-317, 2000.
206. Lelouard H. y col. Transient aggregation of ubiquitinated proteins during dendritic cell maturation. *Nature* 417:177-182, 2002.
207. Trombetta E.S. y col. Activation of lysosomal function during dendritic cell maturation. *Science* 299:1400-3, 2003.
208. Turley S.J. y col. Transport of peptide-MHC class II complexes in developing dendritic cells. *Science* 288:522-527, 2000.
209. Steinman R.M. y Nussenzweig M.C. Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peropheral T cell tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99:351-358, 2002.
210. Finkelman F.D. et al. Dendritic cells can present antigen in vivo in a tolerogenic or immunogenic fashion. *J. Immunol.* 157:1406-1414, 1996.
211. Vogelstein B. y Kinzler K.W. The multistep nature of cancer. *Trends Genet.* 9:138-141, 1993.
212. Hanahan D. y Weinberg R.A. The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57-70, 2000.
213. Cerundolo V. y col. Dendritic cells: a journey from laboratory to clinic. *Nat. Immunol.* 5:7-10, 2004.
214. Iwamoto M. y col. Prognostic value of tumor-infiltrating dendritic cells expressing CD83 in human breast carcinoma. *Int. J. Cancer* 104:92-7, 2003.
215. Berger T.G. y col. Large-scale generation of mature monocyte-derived dendritic cells for clinical application in cell factories. *J. Immunol. Methods* 268:131-140, 2002.
216. Hsu F. J. y col. Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat. Med.* 2:52-58, 1996.
217. Figdor C.G. y col. Dendritic cell immunotherapy: mapping the way. *Nat. Med.* 10:475-480, 2004.
218. Ridgway D. The first 1000 dendritic cell vaccines. *Cancer Invest.* 21:873-886, 2003.
219. Brossart P. y col. Induction of cytotoxic T-lymphocyte responses in vivo after vaccination with peptide-pulsed dendritic cells. *Blood* 96:3102-3108, 2000.
220. Tokunaga N. Human monocyte-derived dendritic cells pulsed with wild-type p53 protein efficiently induce CTLs against p53 overexpressing human cancer cells. *Clin. Cancer Res.* 11:1312-1318, 2005.

221. Nestle F.O. y col. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat. Med.* 4:328-332, 1998.
222. Maier T. y col. Vaccination of cutaneous T-cell lymphoma patients using intranodal injection of autologous tumor lysate pulsed dendritic cells. *Blood* 102:2338-2344, 2003.
223. Jenne L. y col. Dendritic cells containing apoptotic melanoma cells prime human CD8+ T cells for efficient tumor cell lysis. *Cancer Res.* 60:4446-4452, 2000.
224. Goldszmid R.S. y col. Dendritic cells charged with apoptotic tumor cells induce long-lived protective CD4+ and CD8+ T cell immunity against B16 melanoma. *J. Immunol.* 171:5940-7, 2003.
225. Nestle F.O. y col. Dendritic-cell-based therapeutic vaccination against cancer. *Curr. Op. Immunol.* 17:163-169, 2005.
226. Nair S.K. y col. Induction of primary carcinoembryonic antigen (CEA)-specific cytotoxic T lymphocytes in vitro using human dendritic cells transfected with RNA. *Nat. Biotechnol.* 16:364-369, 1998.
227. Korokhov N. y col. High Efficiency Transduction of Dendritic Cells by Adenoviral Vectors Targeted To DC-SIGN. *Cancer Biol. Ther.* 4, 2005.
228. Bonifaz L.C. y col. In vivo targeting of antigen to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination. *J. Exp. Med.* 199:815-824, 2004.
229. Guermonprez P. y col. In vivo receptor-mediated delivery of a recombinant invasive bacterial toxoid to CD11c+ CD8 alpha-CD11b high dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 32:3071-81, 2002.
230. Jeannin P. y col. OmpA targets dendritic cells, induces their maturation and delivers antigen into the MHC class I presentation pathway. *Nat. Immunol.* 1:502-509, 2000.
231. Kalergis A.M. y col. Inducing tumor immunity through the selective engagement of activating Fcγ receptors on dendritic cells. *J. Exp. Med.* 195:1653-1659, 2002.
232. Schjetne K.W. y col. A mouse C(kappa)-specific T cell clone indicates that DC-SIGN is an efficient target for antibody-mediated delivery of T cell epitopes for MHC class II presentation. *Int. Immunol.* 14:1423-1430, 2002.
233. Ramakrishna V. y col. Mannose receptor targeting of tumor antigen pmel17 to human dendritic cells directs anti-melanoma T cell responses via multiple HLA molecules. *J. Immunol.* 172:2845-2852, 2004.
234. Schjetne K.W. y col. Antibody-mediated delivery of antigen to chemokine receptors on antigen-presenting cells results in enhanced CD4+ T cell responses. *Eur. J. Immunol.* 33:3101-8, 2003.
235. Mahnke K. y col. Induction of CD4+/CD25+ regulatory T cells by targeting of antigens to immature dendritic cells. *Blood* 101:4862-4869, 2003.
236. Schuler G. y col. The use of dendritic cells in cancer immunotherapy. *Curr. Op. Immunol.* 15 :138-147, 2003.
237. Yi Q. y Kwak L.W. Monocyte-derived dendritic cells : A promising armament for immunotherapy in human malignancies. *Clin. Cancer Res.* 11 :966-967, 2005.
238. Okada N. y col. Augmentation of the migratory ability of DC-based vaccine into regional lymph nodes by efficient CCR7 gene transduction. *Gene Ther.* 12:129-39, 2005.
239. Satoh Y. y col. Local administration of IL-12-transfected dendritic cells induces antitumor immune responses to colon adenocarcinoma in the liver in mice. *J. Exp. Ther. Oncol.* 2:337-49, 2002.
240. de Gruijl T.D. y col. Prolonged maturation and enhanced transduction of dendritic cells migrated from human skin explants after in situ delivery of CD40-targeted adenoviral vectors. *J. Immunol.* 169:5322-5331, 2002.
241. Crittenden M.R. Intratumoral immunotherapy: using the tumour against itself. *Immunol.* 114:11-22. 2005.
242. Schwartz R. Paul Ehrlich's Magic Bullets. *N. Engl. J. Med.* 350 :1079-1080, 2004.
243. Abbas A.K. y col. *Inmunología celular y molecular.* 2da. edición. Cap. III:38-71. Editorial Interamericana, 1995.

244. Kohler G. y Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256:495-497, 1975.
245. Milstein C. With the benefit of hindsight. *Immunol. Today* 21:359-364, 2000.
246. Bover L. y col. Description of a new human breast cancer cell line, IIB-BR-G, established from a primary undifferentiated tumor. *Breast Cancer Res Treat.* 19:47-56, 1991.
247. Barrio M.M. y col. Monoclonal antibody FC-5.01, directed against CD63 antigen, is internalized into cytoplasmic vesicles in the IIB-BR-G human breast cancer cell line. *Hybridoma* 17:517-525, 1998.
248. Barrio M.M. y col. Tumor imaging with ^{99m}Tc-labeled FC-5.01 monoclonal antibody using a single step labeling method. *J. Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 245:337-341, 2000.
249. Hudson P.J. y Souriau C. Engineered antibodies. *Nat. Med.* 9:129-34, 2003.
250. Sanz L. y col. Antibodies and gene therapy: teaching old "magic bullets" new tricks. *Trends Immunol.* 25:85-91, 2004.
251. He Y. y col. Analysis of the immunogenic properties of a single-chain polypeptide analogue of the HIV-1 gp120-CD4 complex in transgenic mice that produce human immunoglobulins. *Vaccine* 21:4421-9, 2003.
252. U.S. Food and drug administration. Clinical trials. <http://www.fda.gov/oc/gcp/default.htm>
253. Adams G.P y Schier R. Generating improved single-chain Fv molecules for tumor targeting. *J. Immunol. Methods* 231:249-60, 1999.
254. Krauss J. Recombinant antibodies for the diagnosis and treatment of cancer. *Mol. Biotechnol.* 25:1-17, 2003.
255. Noel D. y col. High in vivo production of a model monoclonal antibody on adenoviral gene transfer. *Hum. Gene Ther.* 13:1483-1493, 2002.
256. Cochlovius B. y col. Therapeutic antibodies. *Mol. Drug Discovery* 6:33-38, 2003.
257. Lunde E. y col. Efficient delivery of T cell epitopes to APC by use of MHC class II-specific Tryptophan. *J. Immunol.* 168:2154-62, 2002.
258. Huston J.S. y col. Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:5879-5883, 1988.
259. Gottstein C. y col. Generation and characterization of recombinant vascular targeting agents from hybridoma cell lines. *Biotechniques* 30:190-4, 2001.
260. Mamalaki A. y col. In vitro and in vivo antitumor activity of a mouse CTL hybridoma expressing chimeric receptors bearing the single chain Fv from HER-2/neu-specific antibody and the gamma-chain from Fc(epsilon)RI. *Cancer Immunol. Immunother* 52:513-22, 2003.
261. Heitner T. y col. Selection of cell binding and internalizing epidermal growth factor receptor antibodies from a phage display library. *J Immunol Methods* 248:17-30, 2001.
262. Son J.H. y col. Humanization of agonistic anti-human 4-1BB monoclonal antibody using a phage displayed combinatorial library. *J. Immunol. Methods* 286:187-201, 2004.
263. Weaver-Feldhaus J.M. y col. Yeast mating for combinatorial Fab library generation and surface display. *FEBS Lett.* 564:24-34, 2004.
264. Urban J.H. y col. Selection of functional human antibodies from retroviral display libraries. *Nucleic Acids Res.* 33:e35, 2005.
265. Galeffi P. y col. Expression of single-chain antibodies in transgenic plants. *Vaccine* 23:1823-7, 2005.
266. Zhang M.Y. y col. Improved breadth and potency of an HIV-1 neutralizing human single-chain antibody by random mutagenesis and sequential antigen panning. *J. Mol. Biol.* 335:209-19, 2004.

267. Yokota T. y col. Rapid tumor penetration of a single-chain Fv and comparison with other immunoglobulin forms. *Cancer Res.* 52:3402-3408, 1992.
268. Bonnin E. y col. Generation of functional scFv intrabodies for triggering anti-tumor immunity. *Methods* 34:225-32, 2004.
269. Leath C.A. y col. Single-chain antibodies : A therapeutic modality for cancer gene therapy. *Int. J. Oncol.* 24 :765-71, 2004.
270. Piazza T. y col. Internalization and recycling of ALCAM/CD166 detected by a fully human single-chain recombinant antibody. *J. Cell Science* 118 :1515-1525, 2005.
271. Bhatia J. y col. Catalytic activity of an in vivo tumor targeted anti-CEA scFv::carboxypeptidase G2 fusion protein. *Int J. Cancer* 85:571-7, 2000.
272. Zheng L. y col. Production of a functional catalytic antibody ScFv-NusA fusion protein in bacterial cytoplasm. *J. Biochem. (Tokyo)* 133:577-81, 2003.
273. Onda M. y col. In vitro and in vivo cytotoxic activities of recombinant immunotoxin 8H9(Fv)-PE38 against breast cancer, osteosarcoma, and neuroblastoma. *Cancer Res.* 64:1419-24, 2004.
274. Azemar M. y col. Regression of cutaneous tumor lesions in patients intratumorally injected with a recombinant single-chain antibody-toxin targeted to ErbB2/HER2. *Breast Cancer Res. Treat.* 82:155-64, 2003.
275. Pennel C.A. y Pauza M.E. CD7-specific single chain Fv immunotoxins. Design and expression. *Methods Mol. Biol.* 166:17-29, 2001.
276. Dorai H. y col. Mammalian cell expression of single chain Fv (scFv) antibody proteins and their C-terminal fusions with interleukin-2 and other effector domains. *Biotechnology* 12:890-896, 1994.
277. Cui H. y col. The anti-tumor immune responses induced by a fusion protein of ovarian carcinoma anti-idiotypic antibody 6B11ScFv and muine GM-CSF in BALB/c mice. *Int. J. Gynecol. Cancer* 14:234-41, 2004.
278. Kim E.J. y col. Efficient induction of T helper type 1-mediated immune responses in antigen-primed mice by anti-CD3 single-chain Fv/interleukin-18 fusion DNA. *Immunology* 111:27-34, 2004.
279. Liu Y. y col. Recombinant single-chain antibody fusion construct targeting human melanoma cells and containing tumor necrosis factor. *Int. J. Cancer* 108:549-57, 2004.
280. Stevenson F.K. y col. Vaccine therapy in NHL: future promises and current limitations. *Leuk. Lymphoma* 44 S3:85-90, 2003.
281. Lev A. y col. Tumor-specific Ab-mediated targeting of MHC-peptide complexes induces regression of human tumor xenografts in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101:9051-6, 2004.
282. Holliger P. y col. "Diabodies": small bivalent and bispecific antibody fragments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:444-6448, 1993.
283. Bruenke J. y col. A recombinant bispecific single-chain fv antibody against HLA class II and FcγIII (CD16) triggers effective lysis of lymphoma cells. *Br. J. Haematol.* 125:167-79, 2004.
284. Kikuchi Y. y col. A bivalent single-chain Fv fragment against CD47 induces apoptosis for leukemic cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 315:912-8, 2004.
285. Gao Y. y col. Efficient inhibition of multidrug-resistant human tumors with a recombinant bispecific anti-P-glycoprotein x anti-CD3 diabody. *Leukemia* 18:513-20, 2004.
286. Marasco W.A. y col. Design, intracellular expression and activity of a human anti- human immunodeficiency virus type1 gp120 single-chain antibody. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* 90:7889-7893, 1993.
287. Cochet O. y col. Intracellular expression of an antibody fragment neutralizing p21ras promotes tumor regression. *Cancer Res* 58:1170-6, 1998.

288. Wang W. y col. Antineoplastic effect of intracellular expression of a single-chain antibody against type IV collagenase. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 19:61-8, 2000.
289. Olsen R.J. y col. Minimal structural elements of an inhibitory anti-ATF1/CREB single-chain antibody fragment (scFv41.4). *Hybrid Hybridomics* 22:65-77, 2003.
290. Whittington H.A. y col. Recombinant adenoviral delivery for in vivo expression of scFv antibody fusion proteins. *Gene Ther.* 5:770-7, 1998.
291. Lamikanra A. y col. In vivo evaluation of an EIAV vector for the systemic genetic delivery of therapeutic antibodies. *Gene Ther.* 17, 2005.
292. Griffin M.D. y col. Development and applications of surface-linked single chain antibodies against T-cell antigens. *J. Immunol. Methods* 248:77-90, 2001.
293. Brandao J.G. CD40-targeted adenoviral gene transfer to dendritic cells through the use of a novel bispecific single-chain Fv antibody enhances cytotoxic T cell activation. *Vaccine* 21:2268-72, 2003.
294. DeNardo S.J. Radioimmunodetection and Therapy of Breast Cancer. *Semin. Nucl. Med.* 35:143-151, 2005.
295. Kang N. y col. In vivo targeting of malignant melanoma by ¹²⁵Iodine- and ^{99m}Technetium-labeled single-chain Fv fragments against high molecular weight melanoma-associated antigen. *Clin. Cancer Res.* 6:4921-31, 2000.
296. Sundaresan G. y col. ¹²⁴I-labeled engineered anti-CEA minibodies and diabodies allow high-contrast, antigen-specific small-animal PET imaging of xenografts in athymic mice. *J. Nucl. Med.* 44:1962-9, 2003.
297. Goel A. y col. ^{99m}Tc-labeled divalent and tetravalent CC49 single-chain Fv's: novel imaging agents for rapid in vivo localization of human colon carcinoma. *J. Nucl. Med.* 42:1519-27, 2001.
298. Albrecht H. y col. Production of soluble scFvs with C-terminal-free thiol for site-specific conjugation or stable dimeric scFvs on demand. *Bioconj. Chem.* 15:16-26, 2004.
299. Chester K.A. y col. Recombinant anti-carcinoembryonic antigen antibodies for targeting cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 46 Suppl:58-12, 2000.
300. Mayer A. y col. Radioimmunoguided surgery in colorectal cancer using a genetical engineered anti-CEA single-chain Fv antibody. *Clin. Cancer Res.* 6:1711-9, 2000.
301. Francis R.J. y col. Radiolabelling of glycosylated MFE-23::CPG2 fusion protein (MFECP1) with (^{99m})Tc for quantitation of tumour antibody-enzyme localisation in antibody-directed enzyme pro-drug therapy (ADEPT). *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 31:1090-6, 2004.
302. Goel A. y col. Single-dose versus fractionated radioimmunotherapy of human colon carcinoma xenografts using ¹³¹I-labeled multivalent CC49 single-chain fvs. *Clin. Cancer Res.* 7:175-84, 2001.
303. Pavlinkova G. y col. Radioimmunotherapy of human colon cancer xenografts using a dimeric single-chain Fv antibody construct. *Clin. Cancer Res.* 5:2613-9, 1999.
304. Huhlov A. y Chester K.A. Engineered single chain antibody fragments for radioimmunotherapy. *Q.J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 48:279-88, 2004.
305. Gura T. Magic bullets hit the target. *Nature* 417:584-586, 2002.
306. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-5, 1970.
307. Lowry O.H. y col. Protein measurement with the Folin reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275, 1951.
308. Guerra L. y col. Characterization of IIB-MEL-J: a new and highly heterogeneous human melanoma cell line. *Pigment Cell Res.* 2:504-9, 1989.
309. The Kabat Database of Sequences of Proteins of Immunological Interest. <http://www.kabatdatabase.com>.
310. Johnson G. y col. Kabat Database and its applications: future directions. *Nucleic Acids Research* 2001, 29:205-206.

311. Cochet O. y col. Ingénierie des anticorps. Banques combinatoires. Cap. "Expression intracellulaire de fragments d'anticorps recombinants". Ed. INSERM, 1997.
312. Ward E.S. y col. Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted by *Escherichia coli*. *Nature* 341:544-546, 1989.
313. Orlandi R. y col. Cloning immunoglobulin variable domains for expression by the polimerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:3833-3837, 1989.
314. Hersey P. y col. Phase I/II study of immunotherapy with T-cell peptide epitopes in patients with stage IV melanoma. *Cancer Immunol. Immunother.* 54:208-18, 2005.
315. Saudrais C. y col. Intracellular pathway for the generation of functional MHC class II peptide complexes in immature human dendritic cells. *J Immunol* 160:2597-607, 1998.
316. Sozzani S. y col. Receptor expression and responsiveness of human dendritic cells to a defined set of CC and CXC chemokines. *J. Immunol.* 1997;159:1993-2000.
317. Kato M. y col. cDNA cloning of human DEC-205, a putative antigen-uptake receptor on dendritic cells. *Immunogenetics* 47:442-50, 1998.
318. Kawakami Y. y col. Cloning of the gene coding for a shared human melanoma antigen recognized by autologous T cells infiltrating into tumor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:3515-9, 1994.
319. Hoashi T. y col. Mart-1 is required for the function of melanosomal matrix protein PMEL17/GP100 and the maturation of melanosomes. *J. Biol. Chem.* , 2005.
320. Oren R. y col. TAPA-1, the target of an antiproliferative antibody, defines a new family of transmembrane proteins. *Molec. Cell Biol.* 1990;10:4007-4015.
321. Engering, A. y Pieters J. Association of distinct tetraspanins with MHC class II molecules at different subcellular locations in human immature dendritic cells. *Int. Immunol.* 2001, 13(2): 127-34.
322. Gutiérrez-López M.D. y col. A functionally relevant conformational epitope on the CD9 tetraspanin depends on the association with activated beta1 integrin. *J Biol Chem.* 2003;278:208-18.
323. Giaimis J. y col. (1993). Both mannose and β -glucan receptors are involved in phagocytosis of unopsonized, heat-killed *Saccharomyces cerevisiae* by murine macrophages. *J Leuk. Biol.* 54, 564-571.