



PRODUCCIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE HUMANA HSC70 Y SU APLICACIÓN EN EL DESARROLLO DE UN SISTEMA DE DETECCIÓN POR ELISA

Johana Espejo; Angela Sosa; Ana Karina Carrascal; Catherine Cifuentes;
Alfonso Barreto

Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana.
Carrera 7ª No 43-82. Bogotá.

alfonso.barreto@javeriana.edu.co

RESUMEN

Debido a que el papel desempeñado por las Proteínas de Choque Térmico (HSPs) en los procesos de inducción de inmunidad antitumoral, luego de su liberación por células tumorales, y su interacción con células dendríticas, son hasta el momento poco entendidos; es necesario generar herramientas útiles para el estudio de los aspectos relacionados con dichos procesos. Por consiguiente, en este trabajo, se propuso producir y purificar la proteína recombinante humana Hsc70 (rh-Hsc70) a partir de la cepa de *E. coli* BL21DE3pLysS pET28a(+)/Hsc70, con el fin de poder utilizarla en el estudio de su función biológica sobre un modelo *in vitro* de células dendríticas. De igual forma, se estableció un sistema por ELISA de detección y cuantificación de la Hsc70 cuando se encuentra en forma soluble.

Estrés, HSP, Inmunidad, Recombinante, Tumor

ABSTRACT

In order to understand how the Heat Shock Proteins (HSPs) are involved in antitumoral immunity activation process, through their release from tumoral cells and their interaction with dendritic cells (DC), it is necessary to develop the proper tools for research on those processes. Therefore, our main aim was to produce and purify the recombinant human protein Hsc70 (rh-Hsc70) obtained from *E. coli* BL21DE3pLysS pET28a(+)/Hsc70 strain and in that way, it can be used at in-vitro studies of its biological functions over DC. On the other hand, an ELISA system was established for detecting and quantifying the Hsc70 in soluble form.

HSP, Immunity, Recombinant, Stress, Tumor

INTRODUCCIÓN

Las proteínas de choque térmico (HSPs) son moléculas ubicuas que están presentes a lo largo de toda la escala evolutiva (Jolly y Morimoto, 2000). Estas proteínas a través de interacciones con porciones peptídicas llevan a cabo funciones vitales para la célula (Fourie *et al*, 1994). Bajo condiciones de estrés algunas de estas proteínas protegen a la célula de los efectos deletéreos

ocasionados por incremento en temperatura, condiciones anóxicas, presencia de metales pesados entre otras (Schlesinger, 1990). La inmunogenicidad en algunos modelos tumorales se ha relacionado con la expresión y localización en la membrana celular de HSPs como la Hsp70 (proteína inducible por estrés) o la Hsc70 (proteína expresada de forma constitutiva) en células tumorales (Kishi, *et al* 2001; Multhoff, *et al* 1995a; 1995b; 1997;

Tamura, *et al* 1993). Algunos trabajos han mostrado también, que la interacción de HSPs solubles con células dendríticas favorece la entrega de péptidos antigénicos derivados de tumor (Noessner *et al*, 2002; Todryk *et al*, 1999; Singh-Jausja *et al*, 2000), así como procesos de señalización que conducen a la maduración de estas células presentadoras de antígeno (Asea *et al*, 2002; Kuppner *et al*, 2001; Somersan *et al*, 2001; Todryk *et al*, 1999). Estas dos funciones mediadas por las proteínas HSPs solubles favorecen una apropiada inducción de linfocitos T efectores específicos de tumor (Todryk *et al*, 1999).

Recientemente, se ha descrito que algunos estímulos como el calor o la presencia de IFN- γ disminuyen la expresión en la membrana celular de la proteína Hsc70 en la línea tumoral K562 favoreciendo su liberación al entorno celular (Barreto *et al*, 2003). Por consiguiente, el estudio de la liberación de esta Hsp en otros modelos tumorales o bajo la acción de otros estímulos, así como la asociación de la presencia de esta proteína en suero de pacientes con ciertos tipos de cáncer, requiere de un sistema de detección eficiente de la forma soluble de la proteína. Por otro lado, Kuppner *et al* (2001) han demostrado que el uso de las proteínas recombinantes Hsp70 y Hsc70 son funcionales en el estudio de los procesos relacionados con la maduración de células dendríticas por parte de las HSPs. Así, para avanzar en el entendimiento de dichos procesos, en este trabajo, se obtuvo la proteína recombinante humana Hsc70 purificada y se estableció un sistema de detección de la proteína en forma soluble por medio de la técnica de ELISA.

MATERIALES Y MÉTODOS

CEPA DE *E.coli* BL21DE3pLysS pET28a(+)/Hsc70

Para la producción de la proteína rh-Hsc70 se utilizó la cepa *E. coli* BL21DE3pLysS

transformada con el plásmido pET28a(+)/Hsc70 resistente a canamicina donada por el Dr. Carlos Guerrero del Laboratorio de Bioquímica de Virus de la Universidad Nacional de Colombia. La cepa se mantuvo de 24-48 horas a 37° C en caldo Luria Bertoni (LB) suplementado con canamicina (Gen Far) a 25mg/ml.

La proteína recombinante producida bajo este sistema, tiene en la región N-terminal aproximadamente 23 amino ácidos adicionales representados en una secuencia His-Tag (6 Histidinas), una región trombina (6 residuos) y una secuencia T7-Tag (11 amino ácidos), y en la región C-terminal tiene una secuencia adicional His-Tag correspondiente a 5 prolinas (Novagen on line).

EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA RH-HSC70

La inducción del plásmido fue realizada según la metodología descrita por Carrascal (2001). La estandarización de la inducción se realizó a diferentes concentraciones de Isopropil Tiogalactosido (IPTG, Gibco BRL), partiendo de 0.5mM hasta 2mM, manteniendo el cultivo en incubación con el inductor durante 4 horas a 37°C. Las bacterias se lisaron en buffer de lisis pH 8.0 (NaH₂PO₄ 100 mM, Tris-HCl 10 mM, Urea 8 M, Tween 20 0.05%, Imidazol 5 mM) por sonicación en un Ultrasonic Homogenizer Branson W450D durante tres ciclos de un minuto cada uno con pulsos de 0.9 segundos y 0.5 segundos de descanso a 40° de amplitud. La solubilidad de la proteína se determinó por electroforesis en geles de poliacrilamida evaluando la liberación de las proteínas al sobrenadante.

La proteína fue purificada utilizando una resina de agarosa Ni-NTA (Qiagen on line) en agitación a 100 rpm sobre hielo durante 2 horas. Enseguida, la resina se lavó tres veces en buffer de lavado pH 6.3 (NaH₂PO₄

100 mM, Tris-Cl 10 mM, Urea 8 M, Tween 20 0.05%, Imidazol 5 mM), y se eluyó con una solución de elución pH 4.5 (NaH_2PO_4 100 mM, Tris-Cl 10 mM, Urea 8 M, Tween 20 0.05%, Imidazol 250 mM). Todas las soluciones fueron suplementadas con PMSF (Sigma Chemical Co) 1 mM como inhibidor de proteasas. La proteína eluida se dializó durante 24 horas en una solución fosfato (NaH_2PO_4 0.2 M, Na_2HPO_4 0.2 M) y posteriormente se cuantificó por un método convencional de Bradford.

SDS-PAGE Y WESTERN-BLOT

La producción y purificación de la proteína rh-Hsc70 se evaluó por electroforesis en un gel SDS-PAGE al 10%. De igual forma, la expresión de la proteína fue determinada por Western-blot sobre papel de nitrocelulosa. Como anticuerpo primario específico se utilizó IgG de cabra anti-Hsc70 (sc-1059 Santa Cruz Biotechnology) a una concentración de 0.4 mg/ml y como anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa se utilizó anti-IgG de cabra (sc-2020, Santa Cruz Biotechnology) a una concentración de 0.8 mg/ml. Las membranas de nitrocelulosa se trataron con una solución de visualización por quimioluminiscencia para peroxidasa (Luminol, SC2048, Santacruz Biotechnology) (Barreto, 2001).

DETECCIÓN DE LA PROTEÍNA HSC70 SOLUBLE MEDIANTE ELISA INDIRECTA

Una placa de Polivinil clorado (PVC, Nunc Maxisorp) fue sensibilizada con la proteína rh-Hsc70 diluida a diferentes concentraciones en PBS pH 7.4. Como controles negativos del antígeno se usaron dos proteínas que no pertenecen a la familia de proteínas de choque térmico pero fueron expresadas y purificadas bajo las mismas condiciones del presente trabajo; la proteína recombinante rP1 obtenida a partir

de *Plasmodium vivax* y la proteína esaf6. Estos antígenos se incubaron por 3 horas a 37°C y posteriormente a 4°C por 16 horas en cámara húmeda; en seguida se bloqueó la placa con una solución de PBS, Tween 0.05%, leche 5% durante 2 horas a temperatura ambiente en cámara húmeda. Como anticuerpo primario se utilizó IgG de cabra anti-Hsc70 (sc-1059 Santa Cruz Biotechnology) en concentraciones de 0.8 ó 0.4 mg/ml diluidos en una solución de PBS, Tween 0.05%, leche 2.5%; como control negativo del anticuerpo primario se utilizó IgG de cabra anti-Hsp70 (sc-1060 Santa Cruz Biotechnology) y posteriormente como anticuerpo secundario se utilizó anti-IgG de cabra conjugado con fosfatasa alcalina (sc-2022 Santa Cruz Biotechnology). Finalmente, se adicionó el sustrato p-Nitro Fenil Fosfato (p-NPP) (Sigma) 1mg/ml disuelto en buffer de Dietanolamina pH 9.8 (DTA, MgCl_2 , NaN_3); y se leyó a una longitud de onda de 405 nm. Como blanco de la prueba se utilizó la concentración más alta de antígeno adsorbido a la placa omitiendo la adición de anticuerpo primario y adicionando las concentraciones de conjugado utilizadas en la prueba.

PRODUCCIÓN DE UN SUERO POLICLONAL A-HSC70

Para la obtención de los anticuerpos policlonales anti-Hsc70, se diseñó un esquema de inmunización en conejo. En el sistema se inmunizó con la proteína rh-Hsc70 previamente purificada utilizando como vehículo adjuvante completo e incompleto de Freund por vía subcutánea y solución salina por vía endovenosa. En total se realizaron 6 inoculaciones con 2.3 mg de proteína en un lapso total de 30 días, con intervalos de 8 días entre cada inoculación (Mayer y Walker, 1987).

Los anticuerpos policlonales se purificaron en una columna de afinidad Hi-Trap Protein A (Amersham Pharmacia Biotech). La sepa-

ración se realizó con una bomba peristáltica para asegurar el flujo constante de la muestra. Las fracciones colectadas fueron cuantificadas en un espectrofotómetro Biospec-1601 (Shimadzu Corporation) a 260 y 280 nm y tituladas por la técnica de Dot-blot. La especificidad de los anticuerpos policlonales de conejo contra la proteína rh-Hsc70 se determinó por Western-blot enfrentándolos a un lisado bacteriano de células inducidas con IPTG y usando un conjugado anti-conejo peroxidasa (SIGMA); como control de la prueba se utilizó IgG de cabra anti-Hsc70 (sc-1059 Santa Cruz Biotechnology) y como anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa se utilizó anti-IgG de cabra (sc-2020, Santa Cruz Biotechnology).

RESULTADOS

Producción y purificación de la proteína recombinante Hsc70 a partir de la CEPA *E. coli* BL21DE3pLysS pET28a(+)/Hsc70

Para establecer la concentración más apropiada del inductor IPTG se realizó un ensayo tomando diversas concentraciones desde 0.5mM hasta 2mM. Como se observa en la figura 1 (panel A), en todas las concentraciones de IPTG (Gibco BRL) se ve una homogénea producción de la proteína recombinante con respecto al control sin inducción. Por consiguiente, para los siguientes ensayos se decidió utilizar una concentración de IPTG 1mM, pues es ampliamente citada en trabajos donde utilizan sistemas de expresión pET en cepas de *E. coli* BL21 (Makeyev y Bamford 2000; Shi et al, 1994; Gatto et al, 1998). Sin embargo, en el control sin inducción se observó la presencia de una proteína a una altura de 70 KDa, la cual puede corresponder a la proteína DnaK, que es la proteína homóloga de las HSPs70 en *E. coli*, (Brent et al, 1994). Otra posibilidad es que la bacteria transformada tuviera bajos niveles de expresión en ausencia del inductor, pero al realizar la

técnica de Western-blot ésta no fue reconocida por el anticuerpo comercial IgG de cabra a-Hsc70 (Figura 1. panel B).

Para favorecer la solubilización de la proteína, la lisis celular se realizó en un sonicador Ultrasonic Homogenizer Branson W450D. Como se observa en la figura 2, el rompimiento celular realizado fue exitoso para la liberación de la proteína rh-Hsc70 al sobrenadante.

Una vez obtenida la proteína rh-Hsc70 en forma soluble, el lisado se sometió a un proceso de purificación utilizando una resina de agarosa Ni-NTA (Crowe *et al*, 1994; Hochuli *et al*, 1987; Qiagen on line), ya que la proteína posee una cola de histidina mediante la cual es atrapada por esta resina. Todo el proceso (lisis y purificación) se realizó en condiciones denaturantes y en presencia de imidazol obteniendo una purificación eficaz de la proteína recombinante (Figura 3.), comparado al proceso en condiciones nativas donde se recuperaron algunas proteínas contaminantes (Datos no mostrados).

Finalmente, la proteína fue renaturada mediante un proceso de diálisis y cuantificada por un método convencional de Bradford, obteniendo 7.3 mg de proteína a una concentración de 330 mg/ml.

DETECCIÓN DE LA PROTEÍNA HSC70 SOLUBLE MEDIANTE LA TÉCNICA ELISA INDIRECTA

Luego de obtener la proteína rh-Hsc70 purificada, se procedió a establecer un sistema de detección por medio de la técnica ELISA indirecta. Para determinar la cantidad de anticuerpo secundario conjugado que se debería usar en el sistema se evaluaron las concentraciones de 0.4 y 0.8 mg/ml, en un sistema donde se adsorbió a la fase sólida 10, 20 y 30 mg/ml de la proteína. Como un control negativo del antígeno

se usó la proteína rP1. Como se observa en la figura 4 la concentración más apropiada de anticuerpo secundario conjugado fue de 0.4 mg/ml, si se tiene en cuenta que los valores de lectura obtenidos se encuentran en el rango recomendado cercano a 1.5 (Crowther, 1995). De igual forma, se debe resaltar que la proteína rP1 usada como control negativo y en las mismas concentraciones de la rh-Hsc70 no fue detectada por el sistema.

Para determinar la concentración de anticuerpo de reconocimiento a ser utilizada se evaluaron diferentes concentraciones (0.8, 0.4, 0.2 y 0.1 mg/ml). En este análisis se usó como control negativo del anticuerpo de reconocimiento una IgG de cabra anti-Hsp70 (la cual reconoce una proteína homóloga a Hsc70, pero inducible por calor). En la figura 5 se observa que la mayor concentración de anticuerpo de reconocimiento (0.8 mg/ml) es la más óptima para la detección específica de la Hsc70. Es de destacar, que el control negativo del anticuerpo (IgG anti-Hsp70) no reconoció la proteína rh-Hsc70, a pesar de la alta homología presente entre las dos proteínas (Callahan, *et al*, 2002). En este análisis se observa que usando una concentración de 0.1 mg/ml de anticuerpo primario no se presenta una detección de la proteína si se compara con los valores obtenidos en los controles negativos.

Para determinar la sensibilidad del sistema en el reconocimiento específico de la proteína Hsc70 se evaluaron diferentes concentraciones desde 20 mg/ml hasta 0.009 mg/ml. Como controles negativos del antígeno se utilizaron dos proteínas, rP1 y esaf6, y como control negativo del anticuerpo primario se utilizó una IgG de cabra anti-Hsp70. En la figura 6 se puede observar que la concentración mínima de la Hsc70 detectada por el sistema fue de 312 ng/ml de proteína; cabe anotar que los controles

negativos del antígeno no fueron reconocidos por el sistema.

PRODUCCIÓN DE UN SUERO POLICLONAL A-HSC70

A partir de la proteína rh-Hsc70 purificada, también se procedió a producir un suero policlonal en conejo. Al final del esquema de inoculación, las IgGs del suero de conejo se obtuvieron a partir de la purificación con una columna de afinidad Hi-Trap Protein A, y las fracciones eluidas se evidenciaron a través de una electroforesis SDS-PAGE (figura 7, panel A). Las fracciones eluidas del suero policlonal del conejo, fueron cuantificadas por espectrofotometría a 260 y 280 nm; obteniendo concentraciones de anticuerpo en la fracción 1 de 1.2 mg/ml y en la fracción 2 de 20 mg/ml y con un título de 256 y 2048 respectivamente por la técnica de Dot-blot (figura 7, panel B).

La especificidad de los anticuerpos contra la proteína rh-Hsc70 hechos en conejo se determinó mediante Western-blot. En la figura 7 (panel C) las fracciones 1 y 2 del conejo muestran especificidad por una proteína a la misma altura que la presentada por el control. Sin embargo, se observó reconocimiento por parte de los anticuerpos policlonales hechos en conejo hacia otra proteína de mayor peso molecular presente en el lisado bacteriano. Esto genera la posibilidad de una proteína contaminante altamente inmunogénica presente en la fracción obtenida de rh-Hsc70 y que se encuentra en una concentración no detectable por la tinción de coomassie en el SDS-PAGE.

Los anticuerpos policlonales anti-Hsc70 hechos en conejo, fueron efectivos en el reconocimiento de la proteína rh-Hsc70, por lo cual, estos anticuerpos podrán ser utilizados para la elaboración de un anticuerpo conjugado que sea una herramienta

en sistemas de detección de la proteína Hsc70 soluble como la ELISA “sandwich” y de esta manera incrementar la sensibilidad en la detección de la proteína de una forma significativa con respecto a la obtenida en la ELISA indirecta.

DISCUSIÓN

El papel de proteínas de choque térmico en la inducción de la inmunidad antitumoral se ha estudiado en modelos tanto *in vivo* como *in vitro* (Suto y Srivastava, 1995; Tamura *et al*, 1997). En estos estudios se ha demostrado que la proteína inducible Hsp70 al ser aislada de células tumorales lleva consigo péptidos antigénicos, los cuales serán entregados a las células dendríticas para su posterior presentación a linfocitos T CD8+ específicos de tumor (Castellino *et al*, 2000; Todryk *et al*, 1999). Además, estas proteínas al interactuar con células dendríticas mediante receptores específicos de membrana como el CD91, Toll2 y Toll4, inducen la maduración de estas células presentadoras de antígeno (Asea *et al*, 2002; Basu *et al*, 2001). Arnold-Shild *et al* (1999) proponen un papel similar para la isoforma constitutiva de 70 KDa Hsc70, demostrando que esta proteína de choque térmico es internalizada por células dendríticas a través de un mecanismo de endocitosis mediado por receptor. Este mecanismo de la Hsc70 puede estar asociado con la presencia de esta proteína en exosomas derivados de tumor, los cuales se ha demostrado que son efectivos en la entrega de antígenos y señales de maduración a las células dendríticas (Skokos *et al* 2003; Andre *et al*, 2002). Para poder profundizar en el papel que desempeña la proteína Hsc70 en su asociación con células dendríticas es necesario disponer de una buena cantidad de proteína Hsc70 soluble. Por lo tanto en este trabajo se propuso como objetivo principal la obtención de la proteína rh-Hsc70 a partir de un sistema de expresi-

ón en *E. coli*. Al haber logrado una buena expresión de la proteína rh-Hsc70 y tenerla en forma soluble, una de las preocupaciones es si es biológicamente funcional. Respecto a este punto hay que tener en cuenta que la funcionalidad de la proteína recombinante podría verse afectada ya que el gen que codifica para la proteína humana al haber sido clonado en un vector de expresión pET28a(+), produce una proteína recombinante que en la región N-terminal tiene aproximadamente 23 amino ácidos adicionales representados en una secuencia His-Tag (6 Histidinas), una región trombina (6 residuos) y una secuencia T7-Tag (11 amino ácidos), y en la región C-terminal tiene una secuencia adicional His-Tag correspondiente a 5 prolinas (Novagen on line). Sin embargo, un hecho importante a tener en cuenta es que el proceso de purificación solo fue posible cuando se realizó bajo condiciones denaturantes, ya que al realizarlo en condiciones nativas se observa la presencia de proteínas contaminantes en las fracciones eluidas de la columna de níquel Ni-NTA (Qiagen on line). Esto puede ser debido a la interacción de esta HSP con otras proteínas a través de su porción de 17 KDa en el dominio C-terminal, el cual es el sitio de unión a péptidos (función de chaperona); además, mediante este sitio también se favorece la formación de agregados de la proteína (oligomerización) (Fouchaq *et al*, 1999; Charalampos *et al*, 1999). Por tanto, es muy posible que al realizar estos procesos en condiciones denaturantes, se haya permitido la disgregación de dichos complejos al alterar la conformación estructural de la proteína, y por tanto facilitar la solubilización y purificación de la misma (Qiagen on line). Por consiguiente, esto haría pensar que la proteína recombinante que se obtuvo en este trabajo, mantiene por lo menos algunas de sus funciones biológicas normales, y por lo tanto habría que analizar su papel funcional en la interacción con células dendríticas.

La liberación de las proteínas de choque térmico por las células tumorales fue asociada inicialmente como un evento dependiente de la muerte celular por necrosis (Basu *et al* 2000; Somersan *et al*, 2001). En estudios recientes realizados por Barreto *et al*, (2003) se demostró una liberación activa de la proteína Hsc70 a partir de líneas celulares tumorales que han sido estimuladas por calor o por la presencia de IFN- γ mediante la utilización de un sistema comercial de ELISA. Por consiguiente, para poder continuar con estudios conducentes a la dilucidación de los mecanismos de regulación asociados con la liberación de la proteína Hsc70 por parte de células tumorales en modelos *in vitro* e *in vivo* es necesario tener un sistema que permita la detección de esta HSP en su forma soluble. Así, en este trabajo se estableció un sistema de detección por ELISA indirecta de la proteína rh-Hsc70 donde la concentración mínima de antígeno detectada por este sistema fue de 312 ng/ml de proteína. Sin embargo, en los trabajos previos asociados con los eventos de liberación de la proteína por parte de líneas celulares tumorales, la Hsc70 se detectó en un rango entre 80 y 200 ng/ml (Barreto *et al*, 2003). Por lo tanto, para poder establecer un sistema de detección más sensible, por medio de la proteína recombinante se produjo un anticuerpo policlonal específico contra la proteína de 70 KDa Hsc70, el cual podrá ser usado en un sistema de detección por ELISA en "sandwich".

Por último, en el Western-blot de reconocimiento de la Hsc70 en lisados bacterianos se insinúa la presencia de bandas de reacción a alturas superiores a 70 kDa esto podría ser el resultado del reconocimiento de una forma de la proteína asociado a una porción de una proteína rh-Hsc70.

CONCLUSIONES

Durante este trabajo se logró obtener exitosamente una fracción enriquecida de

la proteína recombinante Hsc70 humana, bajo condiciones denaturantes en presencia de imidazol a partir de la cepa *E. coli* BL21DE3pLysS transformada con el vector de expresión pET28a(+)/Hsc70. Esta proteína recombinante (rh-Hsc70) podría ser un elemento útil en ensayos funcionales donde se quiera estudiar el papel de estas proteínas en la respuesta inmune antitumoral. A partir de la fracción enriquecida de la proteína recombinante Hsc70 humana obtenida, se logró desarrollar una técnica ELISA indirecta para la detección de la proteína Hsc70 soluble, la cual podrá ser una herramienta útil en el desarrollo de posteriores trabajos. Por último, se produjeron anticuerpos policlonales anti-Hsc70 a partir de conejo los cuales mostraron ser efectivos en el reconocimiento de la proteína rh-Hsc70. Por lo tanto estos anticuerpos serán de utilidad en una posterior implementación de una técnica ELISA tipo "sandwich" directa.

AGRADECIMIENTOS

El presente estudio fue realizado gracias al apoyo financiero brindado por la Vicerrectoría Académica de la Pontificia Universidad Javeriana. Los autores también agradecen al Doctor Carlos Guerrero del Laboratorio de Bioquímica de Virus de la Universidad Nacional de Colombia por suministrar la bacteria *E. coli* BL21DE3pLysS pET28a(+)/Hsc70.

LITERATURA CITADA

- ANDRE F, SCHARTZ NE, CHAPUT N, FLAMENT C, RAPOSO G, AMIGORENA S, ANGEVIN E, ZITVOGEL L. 2002. Tumor-derived exosomes: a new source of tumor rejection antigens. *Vaccine* 20 Suppl 4:A28-31.
- ARNOLD-SCHILD D, HANAU D, SPEHNER D, SCHMID C, RAMMENSEE G, DE LA SALLE H, SCHILD H. 1999. Receptor-Mediated Endocytosis of Heat Shock Proteins by Professional

- Antigen-Presenting Cells. *J Immunol* 162:3757-3760.
- ASEA A, REHLI M, KABINGU E, BOCH J, BARE O, AURON P, STEVENDON M, CALDERWOOD S. 2002. Novel Signal Transduction pathway utilized by extracellular Hsp70. *J Biol Chem* 277:15028-15034.
- BARRETO, A. 2001. Análisis de la Localización en la superficie celular de las proteínas de choque térmico Hsc70 y Hsp70 en la línea tumoral K562. Tesis de Maestría en Biología. Pontificia Universidad Javeriana.
- BARRETO A, GONZÁLEZ J.M, KABINGU E, CALDERWOOD S, ASEA A, FIORENTINO S. 2003. Stress Induced Release of Hsc70 from human tumors. *Cell. Immunology* 222:97-104.
- BASU S, BINDER R, SUTO R, ANDERSON K, SRIVASTAVA P. 2000. Necrotic but not apoptotic cell death released heat shock proteins, wich deliver a parcial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kB pathway. *Intern Immunol* 12: 1539-1546.
- BASU S, BINDER R.J, RAMALINGAM T, SRIVASTAVA P.K. 2001. CD91 is a Common Receptor for Heat Shock Proteins gp96, hsp90, hsp70 and Calreticulin. *Immunity* 14:303.
- BRENT S, LARRY E. 1994. A gene encoding a DnaK/hsp70 homolog in *Escherichia coli*. *Biochem* 91: 2066-2070.
- CALLAHAN M, CHAILLOT D, JACQUIN C, CLARK P, MENORET A. 2002. Differential Acquisition of Antigenic Peptides by Hsp70 and Hsc70 under Oxidative Conditions. *J Biol Chem* 277(37):33604-33609.
- CARRASCAL A. 2001. Expresión de la histona H2A de *Tripanozoma cruzi* en *Escherichia coli*. Análisis de la respuesta humoral en pacientes chagásicos frente a este antígeno. Tesis de Maestría en Microbiología. Pontificia Universidad Javeriana.
- CASTELLINO F, BOUCHER P, EICHELBERG K, MAYHEW M, ROTHMAN J, HOUGHTON A, GERMANI R. 2000. Receptor-mediated Uptake of Antigen/Heat Shock Proteins complexes results in Major Histocompatibility Complex Class I Antigen Presentation Via two distinct processing Pathway. *J Exp Med* 191:1957-1964.
- CHARALAMPOS E, IOANNIS L, GERASSIMOS N. 1999. Aggregation of Hsp70 and Hsc70 in vivo is distinct and temperature-dependent and their chaperone function is directly related to non-aggregated form. *Eur J Biochem* 259:505-512.
- CROWE J, DOBELI H, GENTZ R, HOCHULI E, STUBER D, HENCO K. 1994. 6xHis-Ni-NTA Chromatography as a Superior Technique in Recombinant Protein Expression / Purification. *Methods Mol Biol.* 31:371-87.
- CROWTHER J.R. 1995. ELISA Theory and Practice, *Methods in Molecular Biology*. Human Press. Totowa, New Jersey. pp. 13,14.
- FOUCHAQ B, BENAROUJ N, EBEL C, LADJIMI M. 1999. Oligomerization of the 17 KDa peptide-binding domain of the molecular Chaperone Hsc70. *Eur J Biochem* 259:379-384.
- FOURIE A.M, SAMBROOK J.F, GETHING M. 1994. Common and Divergent Peptide Specificities of Hsp70 Molecular Chaperones. *J. Biol. Chem* 269:30470-30478.

- GATTO C, WANG A, KAPLAN, J. 1998. The M4M5 cytoplasmic Loop of the Na, K-AT-Pase, overexpressed in *Escherichia coli*, binds nucleoside Triphosphates with the same selectivity as the intact native protein. *J Biol Chem* 273: 10578-10585.
- HOCHULI E, DOBELI H, SCHACHER A. 1987. New Metal Chelate Adsorbent Selective for Proteins and Peptides Containing Neighbouring Histidine Residues. *J. Chromatogr* 411:177-84.
- JOLLY C, MORIMOTO R.I. 2000. Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. *J Natl Cancer Inst* 92:1564-1572.
- KISHI A, ICHINOHE T, HIRAI I, KAMIGUCHI K, TAMURA Y, KINEBUCHI M, TORIGOE T, ICHIMIYA S, KONDO N, ISHITANI K YOSHICAWA T, KONDO M, MATSUURA A, SATO N. 2001. The Cell Surface-expressed Hsc70-like Molecule Preferentially Reacts with the Rat T-Cell Receptor Vdelta6 Family. *Immunogenetics*. 53:401-409.
- KUPPNER M, GASTPAR R, GELWER S, NÖSSNER E, OSWINDO, SCHARNER A, ISSELS R. 2001. The Role of Heat Shock Protein (hsp70) in Dendritic Cell Maturation: Hsp70 Induces The Maturation of Immature Dendritic Cells but Reduces DC Differentiation from Monocyte Precursors. *Eur. J. Immunol* 31:1602-1609.
- MAKEYEV E, BAMFORD D. 2000. Replicase activity of purified recombinant protein P2 of double-stranded RNA bacteriophage 6. *EMBO Journal* 19:124-133.
- MAYER R.J, WALKER J.H. 1987. *Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology*. Editorial Academic Press. Londrés. pp. 1-10, 53-55.
- MULTHOFF G, BOTZLER C, WIESNET M, EISER G, ISSELS R. 1995a. CD3-large Granular lymphocytes recognize a heat-inducible immunogenic determinant associated with the 72-kDa heat shock protein of human sarcoma cells. *Blood* 86:1374-1382
- MULTHOFF G, BOTZLER C, WIESNET M, MULLER E, WILMANN S, ISSELS R. 1995b. A Stress-inducible 72 KDa Heat Shock Protein (HSP72) is Expressed on the Surface of Human Tumor Cells, but not on Normal Cells. *Inter. J. Cancer* 61:272-279.
- MULTHOFF G, BOTZLER C, JENNEN L, SCHMIT J, ELLWART J, ISSELS R. 1997. Heat Shock Protein 72 on Tumor Cells are Recognition Structures for Natural Killer Cells. *J. Immunol* 158:4341-4350.
- NOESSNER E, GASTPAR R, MILANI V, BRANDL A, HUTZLER P, KUPPNER M, ROOS M, KREMMER E, ASEA A, CALDERWOOD S, ISSELS R. 2002. Tumor – Derived Heat Shock Protein 70 Peptide Complexes are Cross – Presented by Human Dendritic Cells. *J Immunol* 169:5424 –5432.
- SCHLESINGER M.J. 1990. Heat Shock Proteins. *J Biol Chem* 265:12111-12114.
- SHI Y, BROWN E, WALSH C. 1994. Expression of recombinant human casein kinase II and recombinant heat shock protein 90 in *Escherichia coli* and characterization of their interaction. *Biochemistry* 91:2762-2771.
- SINGH-JASUJA H, TOES R, SPEE P, MUNZ C, HILF N, SCHOENBERG S, RICCIARDI-CASTAGNOLI P, NEEFJES J, RAMMENSEE H, ARNOLD-SHILD D, SHILD H. 2000. Cross-presentation of glycoprotein 96-associated antigens on major histocompatibility complex class I molecules requires receptor-mediated endocytosis. *J Exp Med* 191:1965-1974.

SKOKOS D, BOTROS H.G, DEMEURE C, MORIN J, PERONET R, BIRKENMEIER G, BOUNDALY S, MECHELI S. 2003. Mast Cell-derived Exosomes Induce Phenotypic and Functional Maturation of Dendritic Cells and Elicit Specific Immune Response In Vivo. *J. Immunol.* 170:3037-3045.

SOMERSAN S, LARSSON M, FONTENEAU J, BASU S, SRIVASTAVA P, BHARDWAJ N. 2001. Primary tumor Tissue Lysates are Enriched in Heat Shock Proteins and Induce the Maturation of Human Dendritic Cells. *J. Immunol.* 167:4844-4852.

SUTO R, SRIVASTAVA P.K. 1995. A Mechanisms for the Specific Immunogenicity of Heat Shock Protein-Chaperoned Peptides. *Science* 269:1585-1588.

TAMURA Y, TSUBOY N, SATO N, KIKUCHI K. 1993. 70 kDa heat shock cognate protein is a transformation-associated antigen and possible target for the host's anti-tumor immunity. *J Immunol* 151:5516-5524.

TAMURA Y, PENG P, LIU K, DAOU M, SRIVASTAVA P.K. 1997. Immunotherapy of Tumors with Autologous Tumor-derived Heat Shock Protein Preparations. *Science* 278:117-120.

TODRYK S, MELCHER A, HARDWICK N, LINARDAKIS E, BATEMAN A, COLOMBO M, STOPPACCIARO A, VILE R. 1999. Heat Shock Protein 70 Induced During Tumor Cell Killing Induces Th1 Cytokines and Targets Immature Dendritic Cell Precursors to Enhance Antigen Uptake. *J. Immunol.* 163:1398-1408.

RECURSOS ELECTRÓNICOS

Protein Expression, Purification, Detection and Assay. Handbooks and Protocols QIAGEN. On line. <http://www.qiagen.com>

Technical Resources. pET *E. coli* T7 Expression Vectors. NOVAGEN. On line. <http://www.Novagen.com>

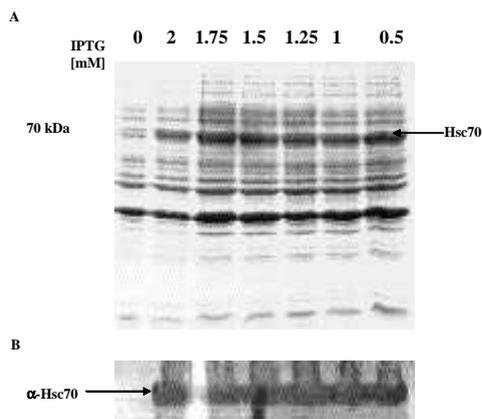


Figura 1. Determinación de la expresión de la proteína recombinante Hsc70 a diferentes concentraciones del inductor IPTG mediante SDS-PAGE (panel A) y por Western-blot (panel B) utilizando un anticuerpo específico (IgG de cabra anti-HSC70 sc-1059 Santa Cruz Biotechnology).

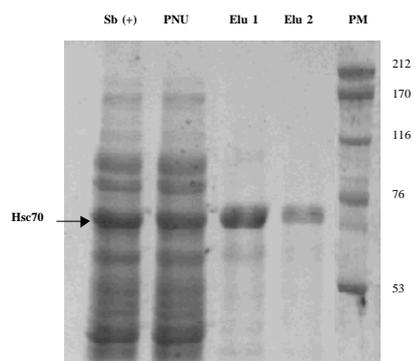


Figura 2. Lisis celular utilizando el sonicador Ultrasonic Homogenizer Branson W450D. Las proteínas tanto del sobrenadante como del botón celular de bacterias inducidas y sin inducción, se resolvieron en SDS-PAGE. Como marcador de peso molecular se utilizó HMW (High Molecular Weight SDS Calibration Kit) de un rango de 53-212 Kda (Pharmacia Biotech).

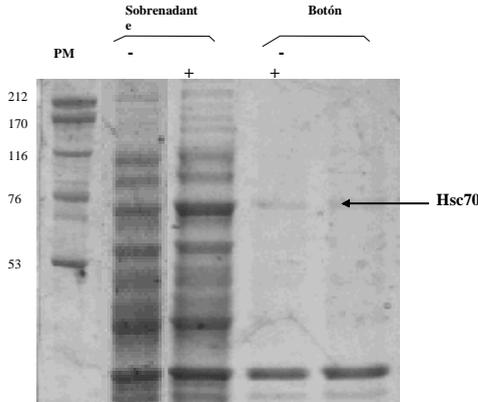


Figura 3. Extracción de la proteína recombinante Hsc70 en una resina Ni-NTA bajo condiciones denaturantes en presencia de Imidazol. En el SDS-PAGE se observa el marcador de peso molecular (High Molecular Weight SDS Calibration Kit) de un rango de 53-212 Kda (PM), el sobrenadante de la bacteria inducida después de sonicar y antes de la purificación (Sb+), la Proteína No Unida a la resina Ni-NTA (PNU), y las fracciones correspondientes al primer y segundo eluído (Elu 1 y Elu 2).

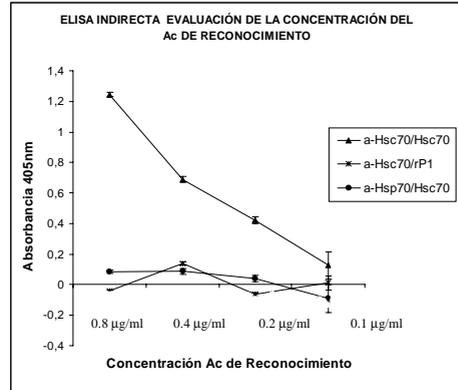


Figura 5. Evaluación de diferentes concentraciones de anticuerpo de reconocimiento IgG de cabra a-Hsc70 (0.8, 0.4, 0.2 y 0.1 mg/ml). a-Hsc70/Hsc70 (reconocimiento de la proteína rHsc70 por un anticuerpo primario IgG de cabra a-Hsc70 a diferentes concentraciones), a-Hsc70/rP1 (control negativo de antígeno, rP1 incubada con el anticuerpo de reconocimiento IgG de cabra a-Hsc70) y a-Hsp70/Hsc70 (control negativo del anticuerpo de reconocimiento a-Hsc70). Los datos obtenidos corresponden a un único experimento (cada pozo por duplicado) y son citados como el promedio de las absorbancias más o menos la desviación estándar, el valor del blanco fue descontado de cada uno de los datos.

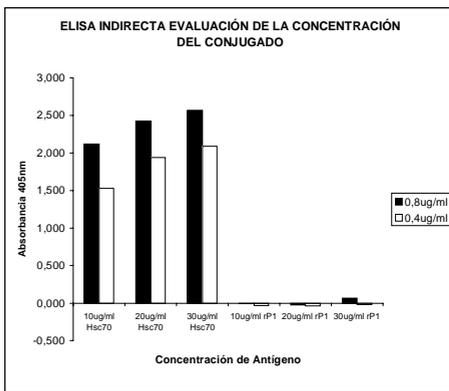


Figura 4. Evaluación a dos concentraciones de anticuerpo anti-IgG de cabra marcado con fosfatasa alcalina (0.8 y 0.4 mg/ml) en un sistema ELISA indirecta, utilizando diferentes concentraciones de los antígenos rh-Hsc70 y rP1 (10, 20, y 30 mg/ml) y un anticuerpo de reconocimiento IgG de cabra anti-Hsc70 a una concentración de 0.8 mg/ml. A cada uno de los datos de absorbancia obtenidos se les restó el valor obtenido en el blanco correspondiente a cada muestra.

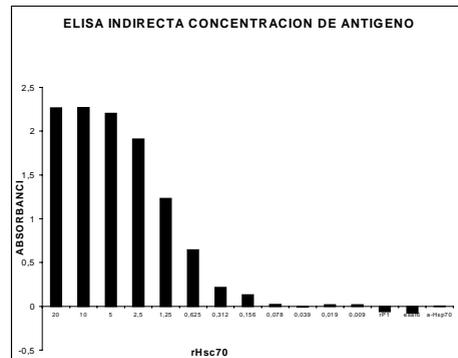


Figura 6. Evaluación de diferentes concentraciones de antígeno detectada por el sistema, desde 20mg/ml hasta 0.009 mg/ml. Como controles negativos de antígeno se utilizaron las proteínas rP1 y esaf6 y como control negativo de anticuerpo de reconocimiento, a-Hsp70.

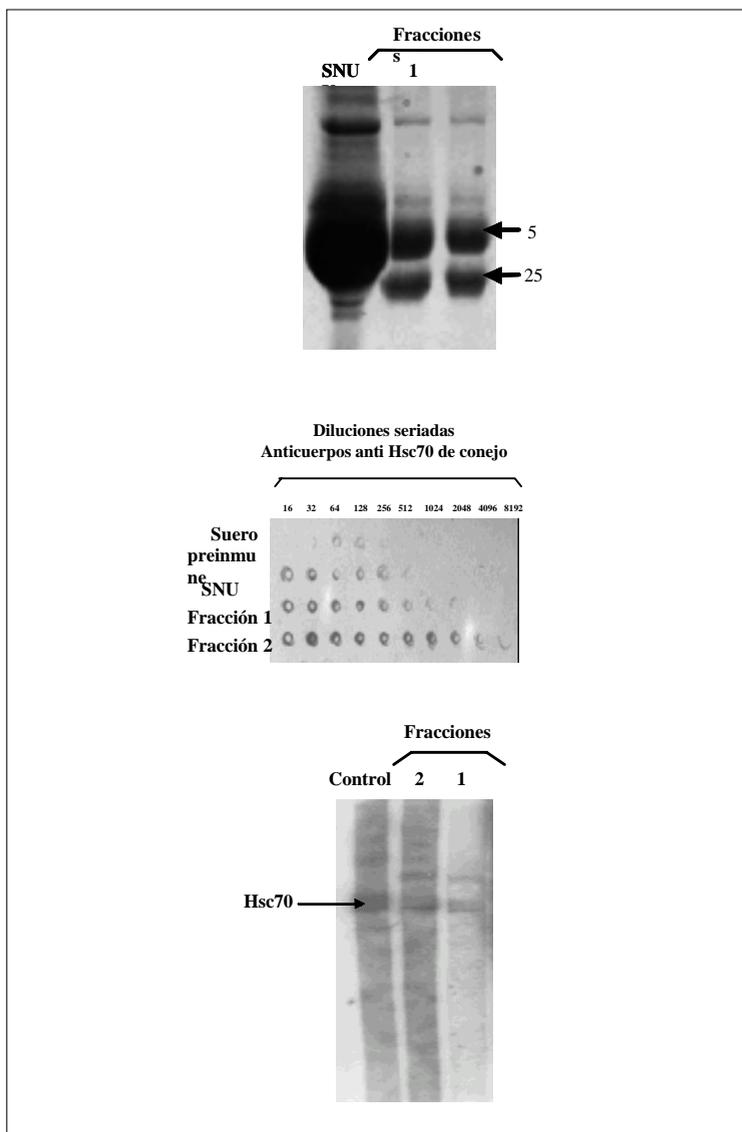


Figura 7. Panel A. SDS-PAGE de las fracciones de IgGs purificadas del suero de conejo mediante la utilización de la columna de afinidad Hi-Trap. SNU (Suero no unido a la columna de afinidad) y fracciones eluidas de la columna 1 y 2. Panel B. Titulación de los anticuerpos presentes en las fracciones mediante la técnica de Dot-blot (Suero preinmune, suero no unido y fracciones eluidas de la columna 1 y 2). Panel C. Determinación de la especificidad de los anticuerpos policlonales contra la proteína rh-Hsc70 (IgG a-Hsc70) obtenidos a partir de conejo. Control: anticuerpo comercial IgG de cabra anti-Hsc70, y fracciones de los anticuerpos purificados a partir del suero de conejo.

Recibido: 19-08-2003
Aceptado: 18-03-2004