

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

20

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**“Caracterización de la vía de procesamiento y presentación de  
antígenos exógenos por moléculas de clase I del  
Complejo Principal de Histocompatibilidad”**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS**

**-INMUNOLOGIA-**

**P R E S E N T A**

**NATALIA MARTIN OROZCO**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

11281



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

20

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**“Caracterización de la vía de procesamiento y presentación de  
antígenos exógenos por moléculas de clase I del  
Complejo Principal de Histocompatibilidad”**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS**

**-INMUNOLOGIA-**

**P R E S E N T A**

**NATALIA MARTIN OROZCO**

**Miembros del Jurado:**

**Presidente:** Dra. Isaura Meza Gómez-Palacio.

**Secretario:** Dr. Carlos Rosales Ledezma.

**Primer Vocal:** Dr. Vianney Ortiz Navarrete.

**Segundo Vocal:** Dra. Iris Estrada García.

**Tercer Vocal:** Dr. Alejandro Alagón Cano.

**Suplente:** Dr. Fernando Esquivel Guadarrama.

**Suplente:** Dr. Leopoldo Santos Argumedo.

**Comite tutorial:** Dr. Vianney Ortiz Navarrete, Dr. Leopoldo Santos Argumedo y  
Dr. Fernando Esquivel Guadarrama.

Este trabajo de investigación se realizó en la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica del Centro Médico Nacional *Siglo XXI*. IMSS. Para el desarrollo de esta investigación se recibió apoyo económico del proyecto CONACYT No. 3595P-M9608 y beca CONACYT para estudios de doctorado.

## **Agradecimientos:**

El trabajo de investigación y formación académica de mi doctorado involucró a varias personas e instituciones. Quisiera agradecerles el tiempo y esfuerzo invertidos durante este período.

1. Al Dr. Armando Isibasi por transmitirme el entusiasmo necesario para iniciar mi carrera científica. Gracias Armando por todas tus enseñanzas.
2. A mis tutores del Doctorado que me acompañaron durante el trabajo experimental y sufrieron los exámenes tutorales. Al Dr. Fernando Esquivel, al Dr. Leopoldo Santos y al Dr. Vianney Ortiz.
3. Al Dr. Víctor Tsutsumi y a la Dra Mineko del Departamento de Patología del CINVESTAV, por su valiosa colaboración en el análisis de microscopía electrónica.
4. A los miembros del jurado de la tesis por sus valiosos comentarios a este manuscrito.
5. A mi hermana Marita por toda la ayuda durante el trámite de la tesis.
6. A los amigos y compañeros de la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica con los que pude discutir en su momento varios temas de Inmunología: Constantino López, Laura Bonifaz, Sara Huerta, Mario Vega, Araceli Santiago, Alberto Díaz, Roberto Rosales, Ma. Teresa Mata y algunos mas.
7. Al Dr. Cesar González por su cordial ayuda como aval ante CONACYT para obtener la beca de Doctorado.
8. A las instituciones que me apoyaron durante la realización de mis estudios de doctorado: Facultad de Medicina de la UNAM, Coordinación de Investigación Médica del IMSS y CONACYT.
9. Al Dr. Laszlo Radvanyi y a la Dra. Celia Alpuche por sus comentarios al artículo.

## Caracterización de la vía de procesamiento y presentación de antígenos exógenos por moléculas de clase I del Complejo Principal de Histocompatibilidad.

### RESUMEN

Los macrófagos tienen la capacidad de presentar antígenos exógenos por la vía del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) de moléculas clase I para activar la población de linfocitos T CD8<sup>+</sup>. Los macrófagos pueden utilizar la vía endógena clásica u otra ruta que involucra la regurgitación de péptidos al medio externo. El objetivo de este trabajo fue estudiar la capacidad de macrófagos infectados con *Salmonella typhimurium* de generar péptidos en los fagosomas y presentarlos en moléculas MHC clase I. En la primera parte de la tesis se evaluó la secreción de péptidos utilizando co-cultivos de macrófagos con células RMA-S. Se encontró que macrófagos activados con IFN- $\gamma$  e infectados con *Salmonella* secretan péptidos clase I del material fagocitado y estos péptidos se unen a moléculas MHC clase I vacías en la superficie de los macrófagos o en células vecinas. Las moléculas cargadas con los péptidos son estables por varias horas y pueden ser reconocidas por linfocitos T citotóxicos específicos. El cloruro de amonio, la leupeptina y la cloroquina inhibieron parcialmente la secreción de péptidos en macrófagos, lo cual sugiere que parte del material secretado es procesado por proteasas similares a las presentes en los lisosomas. El procesamiento y la secreción de péptidos fue resistente al tratamiento con brefeldina A, lo cual sugiere que el material fagocitado y procesado se encuentra en una vesícula preformada independiente de la exocitosis de vesículas provenientes del aparato de Golgi. En la segunda parte de la tesis se desarrolló el estudio del compartimiento donde se lleva a cabo la generación de los péptidos secretados. Se aislaron vesículas de macrófagos tratados con IFN- $\gamma$  e infectados con *S.typhimurium*. Se encontró *Salmonella* en dos tipos de vesículas. Una vesícula de 1.04 g/ml de densidad donde *Salmonella* se observa completa después de una hora de infección. Esta posee los marcadores lisosomales LAMP-1 y Rab 7. El segundo tipo de vesícula es de 1.09 g/ml de densidad y contiene fragmentos de *Salmonella*. Esta vesícula se aisló únicamente en macrófagos activados con IFN- $\gamma$  y posee Lamp1, Rab7 y moléculas MHC clase I. Probablemente esta vesícula se forme de la fusión de diferentes compartimientos celulares.

## Characterization of the processing and presenting pathway for exogenous antigens by MHC class I molecules.

### ABSTRACT

Macrophages have the ability to present exogenous antigens on MHC class I molecules in order to activate CD8<sup>+</sup>T cells. They can use the classical endogenous pathway or a pathway involving the release of antigenic peptides into the external media. The aim of this work was to study how macrophages generated MHC class I peptides in the phagosome for the presentation by MHC class I molecules. Murine macrophages infected with *Salmonella typhimurium* were used as a model system. In the first part of the thesis the capacity of the infected macrophages to secrete peptides was evaluated using co-cultures of macrophages with RMA-S cells. We found that when macrophages were activated by IFN- $\gamma$  and infected with *S. typhimurium* they are able to secrete peptides from phagocytosed material that load empty class I molecules on the surface of the macrophage or on neighboring cells. The MHC molecules loaded with the secreted peptides were stable on the surface of the cells for several hours and were recognized by antigen specific cytotoxic T cells that were previously primed *in vivo*. Interestingly ammonium chloride, chloroquine and leupeptin partially inhibit the secretion of peptides by infected macrophages, which suggests that part of the phagocytosed material be degraded by lysosomal-like proteases. Processing and secretion of peptides from exogenous antigens can utilize a brefeldin-A-resistant pathway engaging a compartment, which may recycle close to the plasma membrane independent of the Golgi apparatus. In the second part of the thesis a study of the compartment, where the processing of the secreted peptides take place, was developed. Vesicles were isolated from IFN- $\gamma$  activated and *S. typhimurium* infected macrophages. *Salmonella* was found in two types of vesicles, one of 1.04 g/ml density where *Salmonella* was complete after one hour of infection and has the lysosomal markers LAMP1 and Rab7. The second type of compartment had a density of 1.09 g/ml, it contained pieces of *Salmonella*, it was present only in IFN- $\gamma$  activated macrophages and it had Lamp1, Rab7 and MHC class I molecules. This big vesicle may come from the fusion of different compartments.



## CONTENIDO

<b>1. INTRODUCCION</b> .....	p 1
<b>1.1. Participación del macrófago en la inmunidad</b> .....	p1
<b>1.2. Transporte vesicular en macrófagos</b> .....	p5
1.2.1. Endocitosis.....	p6
1.2.2. Fagocitosis.....	p7
1.2.3. Macropinocitosis. ....	p8
<b>1.3. Vías de procesamiento y presentación de antígeno</b> .....	p9
1.3.1. Presentación de antígeno por la vía endógena.....	p10
1.3.2. Presentación de antígeno por la vía exógena.....	p13
<b>1.4. Presentacion cruzada</b> .....	p17
1.4.1. Mecanismos de presentacion de antígenos exógenos por la via de clase I.....	p18
1.4.2. Células que realizan presentación cruzada.....	p18
1.4.3. Modelos antigénicos de presentación cruzada.....	p19
1.4.4. Condiciones particulares de la presentación cruzada.....	p21
<b>2. JUSTIFICACION</b> .....	p22
<b>3. HIPOTESIS</b> .....	p24
<b>4.OBJETIVOS</b> .....	p26
<b>5. MATERIAL Y METODOS</b> .....	p27
5.1 Animales de experimentación.....	p27
5.2. Líneas celulares.....	p27
5.3. Bacterias.....	p28
5.4. Anticuerpos.....	p29
5.5. Activación de macrófagos .....	p32
5.6. Infección de macrófagos con <i>Salmonella</i> .....	p32
5.7. Co-cultivos.....	p33
5.8. Marcaje radioactivo de bacterias.....	p34
5.9. Inmunofluorescencia.....	p34

5.10. Preparación de antígeno: hidrolizado de proteínas de <i>Salmonella typhimurium</i> .....	p35
5.11. Ensayo de citotoxicidad.....	p36
5.12. Ensayo de presentación y cuantificación de IL-2.....	p37
5.13. Separación y aislamiento de vesículas de macrófagos infectados con <i>S.typhimurium</i> .....	p37
5.14. Determinación de b-hexosaminidasa.....	p38
5.15. Inmunoelctrotransferencias.....	p39
5.16. Análisis ultraestructural.....	p41

## 6. RESULTADOS..... p42

### 6.1. CARACTERIZACION DE LA SECRECION DE PEPTIDOS. ....p42

6.1.1 Control de la multiplicación de <i>S.typhimurium</i> en macrófagos activados con IFN- $\gamma$ . ....	p42
6.1.2. Efecto del IFN- $\gamma$ sobre la expresión de moléculas MHC clase I y CD40.....	p43
6.1.3. Macrófagos activados con IFN- $\gamma$ secretan péptidos capaces de unirse a moléculas MHC I vacías.....	p46
6.1.4. Los péptidos que se unen a las moléculas MHC clase I de las células RMA-S provienen de la <i>Salmonella</i> fagocitada por los macrófagos.....	p54
6.1.5. Compartimientos vesiculares donde se generan los péptidos de secreción. ....	p59
6.1.6. La inhibición del transporte de vesículas provenientes del aparato de Golgi con BFA no afecta el proceso de secreción de péptidos. ....	p64
6.1.7. Los péptidos secretados estabilizan moléculas clase I vacías al igual que los péptidos óptimos.....	p67
6.1.8. Cinética de unión de péptidos secretados por macrófagos a moléculas clase I vacías de células RMA-S.....	p69
6.1.9. La secreción de péptidos que pueden unirse a moléculas MHC clase I se observó solamente en macrófagos.....	p71
6.1.10. Los péptidos secretados son reconocidos por linfocitos T citotóxicos.....	p73

6.1.11.	Macrófagos activados con IFN- $\gamma$ secretan péptidos de proteínas solubles.....	p77
<b>6.2.</b>	<b>Caracterización del compartimiento intracelular donde ocurre la degradación de <i>Salmonella</i> para la secreción de péptidos.....</b>	<b>p81</b>
6.2.1.	Aislamiento de vesículas endocíticas de macrófagos infectados con <i>Salmonella typhimurium</i> .....	p81
6.2.2	Aislamiento de vesículas de macrófagos activados y no activados con IFN- $\gamma$ . .....	p89
6.2.3.	Rastreo de marcadores endosomales en las vesículas aisladas de macrófagos activados con IFN- $\gamma$ e infectados con <i>Salmonella</i> . .....	p92
<b>7.</b>	<b>DISCUSION Y CONCLUSIONES .....</b>	<b>p101</b>
7.1.	El IFN- $\gamma$ confiere resistencia al control de la multiplicación de <i>Salmonella</i> e induce la secreción de péptidos de clase I del material fagocitado.....	p101
7.2.	La vesícula que contiene al material fagocitado contiene enzimas lisosomales que generan parte de los péptidos secretados.....	p102
7.3.	Linfocitos T citotóxicos reconocen los péptidos secretados. ....	p103
7.4.	Compartimientos celulares.....	p104
<b>8.</b>	<b>REPERCUSIONES .....</b>	<b>p105</b>
<b>9.</b>	<b>PROPUESTAS PARA EL FUTURO.....</b>	<b>p106</b>
<b>10.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>p108</b>
<b>11.</b>	<b>PUBLICACIONES.....</b>	<b>p120</b>

## **Abreviaciones**

**ATP:** trifosfato de adenosina

**$\beta_2m$ :** beta -2 microglobulina

**BFA:** brefeldina A

**CIIV:** compartimiento de MHC clase II

**CLIP:** péptido de li asociado a MHC clase II

**CPA:** célula presentadora de antígeno

**D:** daltons

**Fc:** fracción cristalizable de las inmunoglobulinas

**FcR:** receptores para la fracción Fc.

**HLA:** Antígeno de leucocitos humanos

**IFN:** interferón

**Ig:** inmunoglobulina

**li:** cadena invariante

**IL:** interleucina

**LC:** linfocito citotóxico

**LMP:** proteína de bajo peso molecular (low molecular mass protein)

**LAMP:** proteína asociada a la membrana del lisosoma (lysosome associated membrane protein)

**LPS:** lipopolisacárido

**MIIC:** compartimiento de MHC clase II

**MIP 1 $\alpha$ :** proteína inflamatoria del macrófago-alfa

**M6Pr:** receptor de la manosa 6 fosfato de las proteínas residentes en los lisosomas

**MCSF:** Factor estimulador de colonias de monocitos-macrófagos.

**MHC:** Complejo Principal de Histocompatibilidad  
(Major Histocompatibility Complex)

**MSR:** Receptor de manosa

**OVA:** Ovoalbúmina

**RE:** retículo endoplásmico

**TAP:** Transportador asociado al procesamiento de antígeno. (Transporter associated with antigen processing)

**TLR:** Receptor similar a "Toll"

**TFr:** receptor de transferrina

**Th:** Linfocito cooperador

**TNF:** Factor de necrosis tumoral

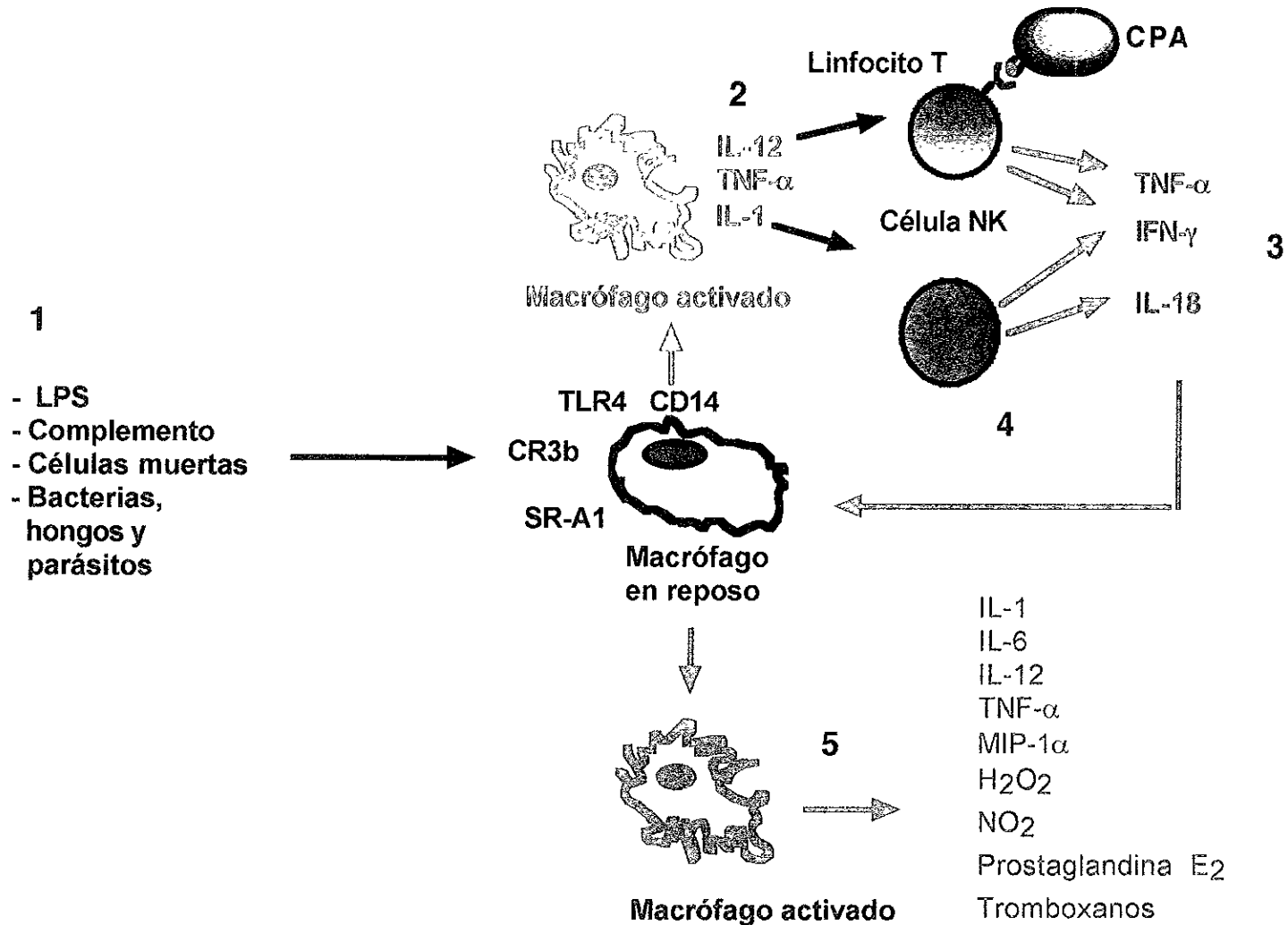
# 1. INTRODUCCION

## 1.1. Participación del macrófago en la inmunidad

El macrófago juega un papel fundamental en la inmunidad innata así como en la inmunidad específica. Es una célula presentadora de antígenos profesional que puede procesar y presentar antígenos por la vía clase I y clase II del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC). A su vez expresa en su superficie celular CD80, CD86 y CD40 necesarias para la co-estimulación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup>.

Durante un proceso infeccioso, el macrófago puede fagocitar virus, bacterias o parásitos vivos. Para realizar esta función posee receptores para la fracción C3b del complemento (CR3/Mac-1), receptores scavenger (SR-A1 y A2, CD163) y receptores para Fc de Ig G (FC $\gamma$ RIII, FC $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RI) que le permiten fagocitar partículas opsonizadas. También posee el receptor de manosa (MSR) con el cual puede unir polisacáridos con manosa o fucosas de las manananas presentes en levaduras y zimosan. Las fagocitosis mediadas por FcR o MSR provocan en el macrófago la producción de IL-1 $\beta$ , IL-6, GM-CSF, TNF- $\alpha$  e IL-12; las cuales promueven la activación de células NK y linfocitos T para la producción de IFN- $\gamma$  (1, 2) (Figura 1).

Posterior a la respuesta inflamatoria local, en los ganglios linfáticos regionales circundantes ocurre la activación de linfocitos T específicos. Si la activación conduce hacia una respuesta de linfocitos T cooperadores 1 (Th1), éstos producen TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . Estas citocinas activan a macrófagos circundantes al sitio de inflamación y a macrófagos residentes de ganglios linfáticos. En respuesta al estímulo de IFN- $\gamma$ , los macrófagos incrementa su capacidad fagocítica y



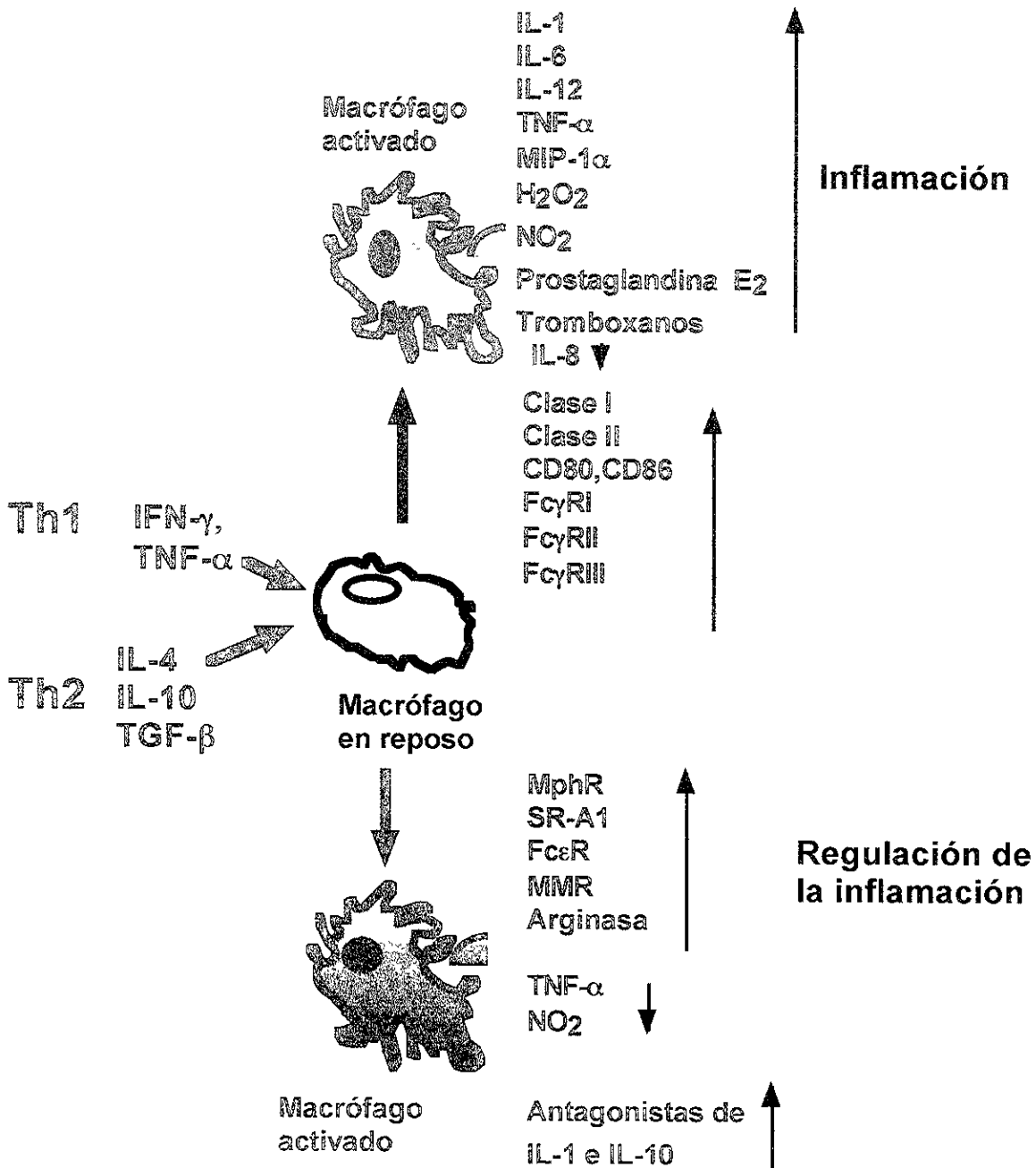
**Figura 1. Activación del macrófago por agentes externos y por IFN- $\gamma$ .** 1. Durante un proceso infeccioso, el macrófago se activa a través de diferentes estímulos. En la membrana del macrófago, células muertas se unen al SR1 (receptor "scavenger"-1), C3b derivado de la activación del complemento se une a su receptor CR3b y moléculas presentes en la superficie del agente infeccioso como el lipopolisacárido (LPS) se une a TLR4 (Toll like receptor). 2. Al activarse, el macrófago secreta IL-1, IL-12 y TNF- $\alpha$ . 3. Estas citocinas inducen en linfocitos T CD4+, T CD8+ y células NK la producción de IFN- $\gamma$ , IL-18 y TNF- $\alpha$ . 4. El IFN- $\gamma$  activa a macrófagos en reposo. 5. El macrófago activado produce varias citocinas, quimiocinas y agentes bactericidas. (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrógeno, NO<sub>2</sub>: óxido nítrico, MIP-1 $\alpha$ : proteína inflamatoria del macrófago).

presentadora de antígenos e incrementan la expresión de varias moléculas en su superficie celular, entre las más relevantes están: MHC clase I y MHC clase II, CD80 , CD86 y los receptores Fc para IgG (FcγRI, FcγRII, FcγRIII) (3,4). La activación por IFN-γ provoca que los macrófagos frenen su ciclo celular en la fase G1/S previniendo su división celular y apoptosis. Lo cual sugieren que el IFN-γ asegura la permanencia de los macrófagos activados en el sitio de inflamación (5).

Los macrófagos activados expresan el receptor de TNF-α, secretan IL-1, IL-6, IL-12, TNF-α, producen MIP-1α, secretan el factor activador de plaquetas y producen peróxido de hidrógeno y óxido nítrico (6). También secretan activador del plasminógeno, elastasa, colagenasa y convertasa de angiotensina. Dichas proteasas participan en la activación del complemento generando C3a, C3b y C5aBb (7). Macrófagos humanos activados con TNF-α e IL1-β secretan metaloproteinasas de matriz extracelular: colagenasa, estromelisinina y gelatinasa (8 ). Esta activación también inhibe la producción de los inhibidores de metaloproteinasa 1 y 2 (TIMP-1 y TIMP-2). Tardíamente los macrófagos activados con IFN-γ, secretan prostaglandina E2 y tromboxanos; y disminuyen su producción de IL-8 (Figura 2).

En contraste, durante el control de la respuesta inflamatoria o en una respuesta de linfocitos T cooperadores tipo 2 (Th2) la producción de IL-4, IL-10, IL-13, TGF-β y glucocorticoides antagonizan la acción de las citocinas producidas en la respuesta Th1 y bloquean la cascada de activación de los macrófagos (9). (Figura 2) La IL-4 provoca fusión de macrófagos en cultivo y la formación de células gigantes además incrementa la expresión de moléculas MHC clase II. El TGF-β activa algunas funciones del macrófago como la secreción de factores de crecimiento PDGF-B y de componentes de la matriz extracelular e incrementa la pinocitosis. Sin embargo inhibe la activación por IFN-γ disminuyendo el efecto del TNF-α y la producción de





**Figura 2.** Respuesta del macrófago a citocinas del tipo Th1 y Th2. El macrófago ante un estímulo de citocinas producidas por linfocitos T cooperadores 1 (Th1 en azul) participa en la inflamación y ante un estímulo de citocinas producidas por linfocitos T cooperadores 2 (Th2 en magenta) participa en la regulación de la inflamación. Las flechas hacia arriba indican aumento en la producción o expresión y flechas hacia abajo disminución de la producción.

óxido nítrico. La IL-10 disminuye la expresión de clase II aún en macrófagos tratados con IFN- $\gamma$  (10).

Cuando el macrófago se estimula en primera instancia con IL-4, IL-10, IL-13, TGF- $\beta$  o glucocorticoides su activación provoca la expresión del receptor Fc $\epsilon$  (CD23), del receptor de manosa (MphR), del receptor scavenger RI, del receptor  $\beta$ -glucan y del receptor CD163. Esto le permite continuar fagocitando células muertas y algunos antígenos para activar linfocitos Th2. También el macrófago produce el antagonista del receptor de la IL-1 e IL-10. Para frenar la producción de óxido nítrico, produce arginasa, la cual utiliza L-arginina como sustrato y compite con la óxido nítrico sintasa (9) (Figura 2).

A pesar de que los macrófagos ingieren grandes cantidades de antígenos, no son tan eficientes como las células dendríticas para activar a los linfocitos T. Sin embargo los macrófagos participan en la amplificación de la respuesta de memoria de linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Estudios *in vivo* han demostrado que los macrófagos son las células presentadoras de antígeno que inician la activación primaria y secundaria de linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos contra tumores y contra algunos virus (11, 12,13).

## **1.2. Transporte vesicular en macrófagos**

En los macrófagos se han descrito varias vías de transporte vesicular para la ingesta de material externo así como para la secreción de proteínas y mediadores solubles como citocinas. Las vías principales de ingesta de material externo son la endocitosis, la fagocitosis y la macropinocitosis. Su funcionamiento es constitutivo o inducido por citocinas, tamaño de la partícula por ingerir y estado de maduración y activación del macrófago.

### 1.2.1. Endocitosis

Se han descrito principalmente tres mecanismos de endocitosis:

- 1) La endocitosis dependiente de clatrina,
- 2) La endocitosis dependiente de caveolina y
- 3) La endocitosis independiente de clatrina y de caveolina.

La endocitosis mediada por clatrina consiste en el reclutamiento de moléculas de clatrina en la membrana plasmática, donde forman grupos de hexágonos y pentágonos, provocando una perturbación en la membrana celular que se convertirá en una invaginación y posteriormente en un endosoma. Este proceso puede ser mediado por receptores como transferrina, EGF (epidermal growth factor) o LDL (low density lipoprotein) y adaptadores como AP2 que se asocian al dominio citoplasmático de estos receptores para permitir el ensamblaje de clatrina. El diámetro reportado para estos endosomas es de 100 nm a 150 nm (14,15).

En un proceso similar se lleva a cabo la endocitosis mediada por caveolina y los receptores que endocita son principalmente los que se encuentran anclados en la membrana a través de glicosil-fosfatidil-inositol (GPI: glycosylphosphatidylinositol). Estos endosomas recubiertos de caveolina tienen un diámetro de 50 a 80 nm (13,14).

El material endocitado se distribuye en diferentes compartimentos endosomales dependiendo del tamaño de la partícula, por ejemplo los solutos pequeños como péptidos pueden reciclar de los lisosomas a endosomas tempranos o tardíos sin ninguna restricción. Por su parte el material particulado o de alto peso molecular puede reciclar hacia otro tipo de endosomas que contengan partículas de tamaño similar para ser transportado a los lisosomas. Existen evidencias de que la vía endosómica puede transportar material al medio exterior de

los macrófagos además de la función de ingresar material a los lisosomas sin involucrar vesículas exportadoras provenientes del aparato de Golgi (16).

### 1.2.2. Fagocitosis

En la fagocitosis se ingieren partículas mayores de 5  $\mu\text{m}$  de diámetro. Es un mecanismo dependiente de actina e independiente de clatrina, es inducida por el tamaño de la partícula que entra en contacto con la membrana del macrófago o por  $\text{TNF-}\alpha$  o  $\text{IFN-}\gamma$ . Componentes de las membranas o paredes de microorganismos como las mananos presentes en levaduras, péptidos formilados, LPS y ácidos lipoteicoicos presentes en bacterias favorecen la fagocitosis mediada por receptores. El receptor de manosa (MR) reconoce manosa y fucosa de la superficie de varios microorganismos. La fagocitosis de material opsonizado es constitutiva en el macrófago y ocurre a través de receptores Fc ( $\text{Fc}\gamma\text{R}$ ). La fagocitosis mediada por  $\text{FcR}$  y a través de MR induce al macrófago a producir las citocinas inflamatorias:  $\text{IL-}1\beta$ ,  $\text{IL-}6$ ,  $\text{GM-CSF}$ ,  $\text{TNF-}\alpha$  e  $\text{IL-}12$ .

Durante la activación de la vía alterna del complemento, material recubierto con  $\text{C3bi}$  puede ser fagocitado por los macrófagos a través del receptor para  $\text{C3bi}$  siempre y cuando los macrófagos estén activados con  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{GM-CSF}$  o se encuentren adheridos a laminina o fibronectina (2). Existen tres receptores para complemento involucrados en la fagocitosis:  $\text{CR1}$ ,  $\text{CR3}$  y  $\text{CR4}$ . El primer receptor se une a  $\text{C3b}$ ,  $\text{C4b}$  y  $\text{C3bi}$  y participa principalmente en la unión a la partícula a ingerir. Los otros receptores se unen específicamente a  $\text{C3bi}$  y favorecen la internalización de la partícula.

El proceso de ingestión consiste en la invaginación de la partícula por recubrimiento con membrana plasmática. Se ha observado que en la fagocitosis

mediada por FcR el material esta completamente circundado por la membrana plasmática y los pseudopodos del macrófago se exponen en la superficie celular, a diferencia de la fagocitosis mediada por CR, donde el material fagocitado se observa sumergido en la superficie celular sin pseudopodos aparentes.

Posterior a la invaginación los fagosomas adquieren el marcador rab 5 y se fusionan con los lisosomas en un promedio de 15 minutos, adquiriendo el 100% de los marcadores lisosomales a los 30 minutos (LAMP1, LAMP2, Igp120, etc) tambien en ese tiempo se ha reportado que los fagosomas pierden marcadores como TFr, M6Pr dependiente de cationes y receptores Fc. No todos los fagosomas siguen esta ruta, algunos fagosomas se fusionan con otros endosomas dependiendo de la naturaleza de la partícula ingerida (17). Tambien se ha reportado el paso de material de lisosoma a endosomas tardíos que poseen el marcador rab 7 y algunos marcadores lisosomales (18,19).

La adquisición de marcadores posterior a la fagocitosis es dependiente del transporte a través de microtúbulos y se ve afectada con el tratamiento de nocodazol. La variedad de fusiones permite establecer una distribución determinada para cada tipo de partícula ingerida y provoca que el material fagocitado permanezca parcialmente intacto por un tiempo mas prolongado previo a su degradación. De manera natural, algunos microorganismos como *Mycobacterium*, *Salmonella* o *Leishmania*, evitan la fusión con los lisosomas para sobrevivir en un ambiente endosomal menos agresivo.

### **1.2.3. Macropinocitosis**

La macropinocitosis en el macrófago es inducida por la activación de M-CSF o ésteres de forbol. Inicia con la formación de invaginaciones de la membrana llamadas "ruffles" las cuales se fusionan en los extremos para dar lugar a los

macropinosomas. Estas vesículas contienen principalmente solutos y líquido, son de tamaño heterogéneo y presentan en promedio un diámetro 0.5 a 2.5  $\mu\text{m}$  (20). Perduran como estructuras independientes varios minutos y posteriormente se fusionan sólo con macropinosomas formando estructuras similares a los lisosomas tubulares (21). También se han descrito macropinosomas gigantes con el contacto de *Salmonella* en la membrana del macrófago (22). Los macropinosomas a diferencia de los fagosomas o endosomas, no se fusionan con endosomas ni vesículas de reciclaje y no se localiza al receptor de Transferrina (TFR) en estos compartimientos. En macrófagos de médula ósea se ha descrito que los macropinosomas se fusionan con lisosomas tubulares sin fusionarse con endosomas tempranos (Rab5 positivos) y fusionándose parcialmente con endosomas tardíos (Rab7 positivos) para luego fusionarse con lisosomas tubulares (23). Por otra parte, los macropinosomas son resistentes al efecto de BFA y no están recubiertos de clatrina. Medios hipertónicos, nocodazol, disminución del potasio intracelular o acidificación del citoplasma no bloquean la macropinocitosis, lo cual sugiere que su regulación es diferente al de endocitosis o fagocitosis.

### **1.3. Vías de procesamiento y presentación de antígeno**

El procesamiento de antígeno se define como el mecanismo intracelular de degradación de antígenos protéicos que genera péptidos capaces de unirse a moléculas de histocompatibilidad (proteínas codificadas dentro del MHC). La presentación del antígeno es la expresión del complejo péptido-molécula de histocompatibilidad en la membrana celular de la célula presentadora. La función de las moléculas MHC clase I es presentar péptidos a los linfocitos T  $\text{CD8}^+$ , mientras que la función de las moléculas MHC clase II es presentar péptidos a los linfocitos T

CD4<sup>+</sup> (24).

Por lo general las células presentadoras de antígeno expresan aproximadamente  $10^5$  moléculas MHC de cada alelo y presentan un promedio de 1000 diferentes péptidos. Se considera que cada célula presentadora de antígeno que ingiere y procesa  $10^5$  o  $10^6$  moléculas de antígeno proteico, presenta solamente 10 o 100 péptidos de este material. La activación de hibridomas de T *in vitro* requiere de aproximadamente 100 a 1000 complejos MHC péptido (25).

### 1.3.1. Presentación de antígeno por la vía endógena

La molécula clase I es un dímero formado por la asociación no covalente entre la cadena pesada  $\alpha$  y la  $\beta_2m$ . La cadena pesada es una glicoproteína transmembranal codificada dentro del MHC, es polimórfica y su expresión es inducible por IFN- $\gamma$ . Consta de tres dominios extracelulares,  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$ ; un segmento transmembranal y una región citoplásmica. Los dominios extracelulares son los más importantes para llevar a cabo la presentación de antígeno:

- los dominios  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  forman un nicho donde se une el péptido antigénico y este es el sitio donde radica el polimorfismo de la cadena pesada.
- el dominio  $\alpha 3$  interacciona con la molécula correceptora CD8.

De acuerdo a la estructura cristalográfica del MHC I, el nicho consiste en una base hoja  $\beta$  formada por 8 filamentos antiparalelos rodeados por dos paredes de hélices  $\alpha$ . La base presenta seis hendiduras donde se acomodan los residuos de inserción del péptido (26,27,28,29).

Los antígenos que se encuentran en el citosol accesibles a la vía endógena pueden provenir de proteínas constitutivas de la célula (endógenas) o bien de

antígenos virales, bacterianos o parasitarios; estos últimos como resultado de una multiplicación citosólica del agente infeccioso, o como se ha reportado experimentalmente en células transfectadas que expresan dichos antígenos en el citosol. No se conoce cual es la señal de inicio de la proteólisis en el citosol. Para algunas proteínas la conjugación covalente con la ubiquitina es el rótulo o etiqueta que facilita su procesamiento, mientras que otras proteínas pueden ser degradadas sin la participación del ciclo de la ubiquitina (30,31,32).

El encargado de la degradación de los antígenos en el citosol es el proteosoma. El cual es un complejo multienzimático compuesto por 28 subunidades (provenientes de 14 o 17 diferentes genes) ordenadas en un cilindro de cuatro anillos de 7 subunidades. Los anillos externos están compuestos de subunidades  $\alpha$  y los internos de subunidades  $\beta$  y el sitio catalítico del proteosoma se encuentra en el centro e interior del cilindro en las subunidades  $\beta$  (33). Al sitio catalítico se le pueden añadir otras subunidades  $\beta$  dependiendo del tipo celular, así se han reportado dos subunidades  $\beta$  codificadas en el MHC que se expresan y asocian al proteosoma por la activación con IFN- $\gamma$ . Estas subunidades se llaman LMP (low - molecular-mass protein)-2 y LMP-7 y al igual que otros productos del MHC son proteínas polimórficas (34,35,36 ). Su actividad proteolítica está involucrada en la generación de algunos péptidos antigénicos no obstante células deficientes en LMP-2 o LMP-7 pueden presentar antígenos por moléculas clase I (37,38).

El proteosoma 20S se asocia con otros complejos reguladores en ambos extremos del cilindro para dar lugar a proteosomas con actividad proteolítica específica. Por ejemplo cuando se asocia con el complejo 19S, el cual contiene subunidades de ATP-asa, forma el proteosoma 26S cuya función es la degradación dependiente de ATP de sustratos conjugados a ubiquitina como los factores de transcripción, proto-oncogenes y ciclinas. Cuando el proteosoma se asocia con el



complejo 11S o PA28 $\alpha$  se incrementa la generacion de péptidos para la presentación por moléculas clase I. La función de PA28 $\alpha$  es inducida por IFN- $\gamma$  y consiste en favorecer la desnaturalización de las proteínas que ingresan al proteosoma ademas de provocar un efecto alostérico en las subunidades  $\beta$  del proteosoma para incrementar su actividad proteolítica (39). En varios tipos celulares se ha descrito que los proteosomas se localizan en el citosol, asociados al núcleo y asociados al retículo endoplásmico (RE) (40). Los péptidos generados por los proteasomas son translocados del citosol al lumen del RE por medio de un mecanismo de transporte activo que requiere de ATP, el cual involucra la participacion del dímero formado por dos transportadores-ABC denominados TAP1 y TAP2 (Transportador asociado al procesamiento de antígeno). Estas dos proteínas transmembranales estan codificadas dentro de la región de moléculas clase II del MHC, su expresión es inducible por IFN- $\gamma$ , son polimórficas y presentan especificidad por el tipo de péptidos que transportan (41, 42, 43, 44). Se localizan insertadas en la membrana del RE donde TAP1 se asocia de manera no covalente al heterodímero cadena pesada- $\beta$ 2m, lo que permite que los péptidos se transporten eficientemente (45,46). La secuencia de ensamblaje de la molécula clase I ocurre de la siguiente manera:

- i. Durante su biosíntesis la cadena pesada se va translocando al lumen del RE donde se asocia a calnexina, posteriormente se asocia con  $\beta$ 2m y con la chaperona calreticulina.
- ii. Este complejo se asocia con otra proteína transmembranal llamada tapasina que sirve de intermediario entre el complejo cadena alfa- $\beta$ 2 m y TAP1.
- iii. Posteriormente los transportadores TAPs translocan el peptido del citosol al RE

donde se unen de inmediato al dímero MHC I cadena pesada- $\beta$ 2m (47).

Los péptidos que se unen a MHC I son de ocho o nueve aminoácidos y poseen dentro de su secuencia residuos de inserción alelo-específicos para unirse al nicho  $\alpha$ 1- $\alpha$ 2 de la molécula clase I (48). La molécula clase I completa es transportada a la superficie celular por la vía exocítica.

Se han encontrado cadenas pesadas  $\alpha$  clase I expresadas en la membrana de células deficientes en los transportadores TAP, a las cuales se les ha llamado "moléculas vacías" debido a que pueden re-ensamblarse con  $\beta$ 2m y péptidos óptimos en la superficie celular. Se desconoce como egresan del RE pero es posible que cadenas pesadas  $\alpha$  se ensamblen con péptidos subóptimos presentes en el RE y ya en la superficie se disocian liberando al péptido y a la  $\beta$ 2m. Aproximadamente un 5% de moléculas clase I vacías están presentes en células normales y se desconoce su función biológica (49, 50, 51, 52).

Las proteínas de secreción que no adquieren la conformación adecuada no son transportadas y normalmente no egresan del RE. Anteriormente se creía que estas proteínas eran degradadas en el RE de manera similar a la hidrólisis del péptido señal, sin embargo se ha reportado que existe traslocación de proteínas hacia el citosol (retrotranslocación) para ser degradadas por los proteasomas (53). Este mecanismo implica que las proteínas de secreción pueden ser procesadas por los proteasomas después de la retrotranslocación y presentadas por MHC clase I (54).

### **1.3.2. Presentación de antígeno por la vía exógena**

El tipo de células que realizan la función de procesar y presentar antígenos exógenos son los monocitos, los macrófagos, los linfocitos B y las células

dendríticas. Todas estas células adquieren antígenos solubles por endocitosis, además los macrófagos activados y las células dendríticas pueden realizar pinocitosis para adquirir antígenos junto con grandes volúmenes de líquido extracelular. El mecanismo de fagocitosis se ha descrito principalmente en macrófagos y células dendríticas. Además de estos mecanismos, existen los mediados por receptores, en los cuales la partícula o el antígeno por ingerir interaccionan con receptores en la membrana de las células provocando la polimerización de actina en el caso de la fagocitosis y el reclutamiento de clatrina en la membrana en el caso de la endocitosis para dar lugar a la formación de la invaginación celular (55,56).

Se ha reportado que macrófagos cultivados con una concentración de proteína soluble de 1 mg/ml acumulan en los endosomas  $10^5$  moléculas de proteína por hora. La fagocitosis vía receptores Fc incrementa 1000 veces la ingesta de material (57,58).

El procesamiento del material adquirido se lleva a cabo en los lisosomas por proteasas ácidas, a la fecha se han identificado dentro de los compartimientos endosómicos endoproteasas, exopeptidasas y peptido-peptidasas. Las endopeptidasas son; la cistein-proteasa catepsina L y S y la aspartato proteasa catepsina D. Las exopeptidasas son: las carboxipeptidasas catepsina A y B y la aminopeptidasa H. Las péptido-peptidasas son: la aminopeptidasa I o catepsina C, la prolyl-carboxipeptidasa II y la prolina-alanina aminopeptidasa IV. Las catepsinas H y S son inducibles por IFN- $\gamma$ , esta última se expresa exclusivamente en linfocitos B y células dendríticas (59). Recientemente, se reportó la catepsina F como exclusiva de macrófagos.

Recientemente se aisló la proteasa asparagina-endopeptidasa o AEP de

lisosomas de linfocitos B, provenientes de humanos. Se trata de una cistein-proteasa con actividad similar a la legumain/haemoglobinasa presente en plantas y parásitos. Participa en el procesamiento de antígenos bacterianos no glicosilados en asparagina; como por ejemplo el toxoide tetánico (60,61).

Las moléculas clase II están formadas por la asociación no covalente de dos proteínas transmembranales, las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$ , ambas codificadas dentro del MHC. Son proteínas polimórficas y su expresión es inducible por IFN- $\gamma$ . Cada una de estas cadenas posee dos dominios extracelulares ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ), un segmento transmembranal y un segmento citoplásmico. El nicho de unión al péptido de la molécula clase II lo conforman los dominios  $\alpha 1$  y  $\beta 1$  y su estructura es similar al nicho de la molécula clase I con una base de hoja  $\beta$  pero en este caso cuatro filamentos provienen de la cadena  $\alpha$  y cuatro filamentos de la cadena  $\beta$ . También está rodeada por dos  $\alpha$ -hélices (una de cada cadena) pero los extremos del nicho están abiertos lo que permite que péptidos de 15 a 20 aminoácidos se unan a la molécula pero con los extremos amino y carboxilo del péptido colgando fuera del nicho (62).

Durante su biosíntesis las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  se traslocan al lumen del RE donde se asocian entre sí y con una glico-proteína de tipo II llamada cadena invariante (Ii). Estas tres moléculas forman complejos moleculares de nueve subunidades asociadas en una relación estequiométrica de tres dímeros  $\alpha$ - $\beta$  por tres cadenas invariantes (63). La función de la cadena invariante es evitar la unión de péptidos del RE a la molécula clase II, para lo cual un segmento de la cadena invariante llamado CLIP (class II associated li peptide) se une al nicho de la molécula clase II (64). La otra función de la cadena invariante reside en la porción citoplásmica, donde una secuencia señal (lisina-lisina) sirve para dirigir el complejo MHC-Ii a

compartimientos endosómicos (65). Existen vesículas endosomales de pH ácido y semejantes a los endosomas tardíos, que contienen gran cantidad de moléculas clase II y por lo cual se les ha llamado compartimientos de clase II (MIIC o CIIV) (66). Para que se lleve a cabo la presentación de péptidos por las moléculas clase II, la cadena invariante es degradada por las proteasas de los endosomas, especialmente catepsina S y catepsina L. Se ha reportado actividad proteolítica y estabilidad de la catepsina S en ambientes de pH neutro, lo cual implicaría que la degradación de la cadena invariante puede ocurrir también en endosomas tempranos.

A pesar de esto el péptido CLIP permanece unido al nicho de la molécula clase II protegiéndose de la proteólisis. Recientemente se describieron moléculas clase II no convencionales llamadas HLA-DM (DMA y DMB en humanos) y H-2M en ratón que inducen la disociación del péptido CLIP del dímero  $\alpha\beta$  y facilitan la unión de péptidos antigénicos. Las moléculas DM se encuentran distribuidas en los compartimientos endosómicos y en el compartimiento MIIC (67, 68). No se expresan en la membrana celular y a pesar de estar codificadas en el MHC no son polimórficas.

Finalmente, el trímero  $\alpha$ -péptido- $\beta$  es transportado a la superficie de la membrana celular en vesículas endosómicas. Se ha reportado que linfocitos B humanos transformados con el virus de Epstein Barr secretan vesículas al medio extracelular llamadas exosomas. Estas vesículas contienen moléculas clase II ensambladas con péptidos (compactas), las cuales son capaces de activar hibridomas de T. La secreción de los exosomas se han propuesto como el mecanismo natural de transporte de la molécula clase II a la superficie del linfocito B (68).

#### 1.4. Presentación cruzada

La localización de los antígenos proteicos dictamina la vía de procesamiento por la cual van a ser procesados y la población de linfocitos T que va a responder contra estos antígenos. En este sentido las dos trilogías hasta ahora descritas son:

A) Antígenos citosólicos » Via clase I (Proteasomas-TAPs) » Linfocitos T CD8<sup>+</sup>

B) Antígenos extracelulares que son fagocitados, ó endocitados » Via clase II (Catepsinas, li, DMs, MIIC) » Linfocitos T CD4<sup>+</sup>.

Sin embargo, actualmente existen evidencias que indican que antígenos adquiridos por fagocitosis o pinocitosis pueden ingresar a la via clase I y despertar una respuesta de linfocitos T CD8<sup>+</sup> (69,70). Experimentos realizados en 1976 por el grupo del Dr. Michael Bevan mostraron que alotransplantes de piel, con un antígeno menor de histocompatibilidad en común, generaban una respuesta citotóxica contra el antígeno menor de histocompatibilidad y rechazo del transplante en diferentes contextos de MHC. Es decir, el antígeno menor de histocompatibilidad presente en la célula de MHC<sup>a</sup> era presentado por células de MHC<sup>b</sup> de forma "cruzada" para activar linfocitos T citotóxicos restringidos por MHC<sup>b</sup>. A este fenómeno, entonces inexplicable, se le llamó presentación cruzada (71,72).

Posteriormente en otros estudios se reportó que la inmunidad específica contra SV40 de transplantes de células transformadas con este virus es independiente del MHC de las células transformadas. Es decir transplantes alogénicos de células transformadas con SV40 pueden generar inmunidad protectora contra el reto de tumores singénicos transformados con SV40 (73).

Actualmente existen varios modelos que describen la presentación cruzada de

antígenos presentes en tumores o trasplantes y que permiten concluir que la activación de linfocitos CD8+ por moléculas MHC clase I del individuo receptor da inicio a la respuesta contra tumores o al rechazo de trasplantes.

**1.4.1. Mecanismos de presentación de antígenos exógenos por la vía de clase I**

Se han planteado tres posibles rutas biológicas para el procesamiento y la presentación de antígenos exógenos por moléculas clase I:

1. El material pinocitado o fagocitado ingresa del fagosoma al citosol (vía citosólica). Esta vía es sensible al efecto de los inhibidores de proteasomas (peptido-aldehídos y lactacistina) (74), no se observa en macrófagos o células dendríticas de ratones deficientes en TAP's y se inhibe con BFA. Por lo tanto se propone que los antígenos son procesados por lo proteasomas, la presentación es dependiente de TAP's y el ensamble de MHC I con el péptido ocurre en el RE (75).
2. El material fagocitado es procesado en un compartimiento vesicular y luego es regurgitado al medio extracelular (76).
3. Una variante del mecanismo descrito en el inciso 2 es que las moléculas clase I de reciclaje o *de novo* interceptan la vesícula donde se generan estos péptidos del material endocitado y se ensamblan en este ambiente vesicular (77).

**1.4.2 Células que realizan presentación cruzada**

Con diferentes tipos de antígenos los primeros estudios demostraron que los macrófagos pueden realizar presentación cruzada de antígenos que son fagocitados o pinocitados. En particular el M-CSF estimula la pinocitosis o macropinocitosis favoreciendo la presentación cruzada por la vía citosólica (78).

Las células dendríticas obtenidas a partir de cultivos de médula ósea con GM-CSF realizan macripinocitosis de manera constitutiva y también son capaces de

procesar y presentar antígeno por la vía clase I dependiente de TAP's y de proteasomas. Pueden macropinocitar antígenos solubles o bacterias y no se ha reportado que secreten péptidos al medio extracelular (79, 80).

Ratones quiméricos B6 con médula ósea de ratones TAP<sup>-/-</sup> infectados con virus de polio o vaccinia que expresan OVA ó el péptido de OVA 257-264, poseen células provenientes de médula ósea que inducen respuesta de células citotóxicas específicas contra dicho péptido. En este modelo las células infectadas no hematopoyéticas de los ratones B6 no son capaces de inducir respuesta de linfocitos citotóxicos. Estos experimentos confirman que únicamente macrófagos y células dendríticas realizan presentación cruzada (81).

#### 1.4.3. Modelos antigénicos de presentación cruzada

Líneas de linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos que reconocen a la proteína GP46/M2 de *Leishmania amazonensis* son capaces de lisar macrófagos infectados con *L. amazonensis*. La lisis de los macrófagos en cuestión, se ve afectada por el tratamiento con BFA y con inhibidores de proteasomas. Por lo que aparentemente los antígenos de *Leishmania* son capaces de ingresar al citosol para ser procesados por la vía endógena (82).

OVA asociada a partículas de latex ha sido de los antígenos más utilizados, para dilucidar la vía citosólica y la vía de secreción. La herramienta experimental que ha funcionado como sistema de revelado es la presentación del péptido de OVA 257-264 (SIINFEKL) restringido por K<sup>b</sup> y que es reconocido por el hibridoma RF3370 o linfocitos de ratones transgénicos para el TcR de este hibridoma (OT-1). Para ambos sistemas se ha visto un incremento en la presentación del péptido SIINFEKL cuando



los macrófagos fagocitan partícula de latex junto con OVA (83,84).

Proteínas del virus de la corimeningitis linfocítica (LCMV) y del virus de la estomatitis vesicular (VSV) generan una respuesta de linfocitos citotóxicos (LC) protectora contra el reto a la infección viral cuando se administran en una sola dosis de 10 µg sin adyuvante. La co-inmunización de las proteínas virales con un lisado de células de bazo presenta un efecto adyuvante. Este reporte indica que las proteínas solubles pueden ser presentadas por clase I y su presentación se hace más eficiente cuando se favorece la fagocitosis de restos celulares o células muertas (85).

En otro modelo viral se encontró que macrófagos de médula ósea procesan partículas virales del antígeno S de Hepatitis B de aproximadamente 22 µm de diámetro. Dichos macrófagos activan LC provenientes de ratones inmunizados con la partícula que son específicos para el péptido S28-39 en el contexto de las moléculas L<sup>d</sup>. En este modelo se propone que la degradación de la partícula viral ocurre en un endosoma debido a que es sensible al tratamiento con cloruro de amonio. (86)

Recientemente se confirmó la participación de linfocitos T CD8<sup>+</sup> en la protección contra la infección de *Mycobacterium tuberculosis*. Los ratones deficientes en el transportador TAP1 sucumben ante la infección durante los primeros 50 días y el 100% muere al día 80. Este patrón de susceptibilidad no cambia en los ratones TAP1<sup>-/-</sup> con moléculas CD1 ni en los deficientes en CD1. Lo cual confirma que los linfocitos CD8<sup>+</sup> se generan a partir de antígenos de *Mycobacterium* que de alguna manera ingresan a la vía endógena (87).

#### 1.4.4. Condiciones particulares de la presentación cruzada

Las principales condiciones para la presentación cruzada son:

1. *El tamaño de la partícula ingerida por fagocitosis o pinocitosis.* Macrófagos presentan el péptido SIINFEKL mas eficientemente cuando fagocitan partículas de latex conjugadas a OVA que cuando fagocitan la OVA de forma nativa (88)
2. *La concentracion de antígeno.* Altas concentraciones de proteínas solubles son necesarias para favorecer la ingesta y presentación por la via citosólica (84,88)
3. *El estado de activación de la célula presentadora.* El M-CSF estimula la macropinocitosis y la presentación de antígenos exogenos en los macrófagos y en células dendríticas (55,78). No se ha reportado ningún estudio con alguna otra citocina, quimiocina o activador como LPS. Tampoco con la activación a través de receptores o moléculas co-estimuladoras tales como FcR, CD14, CD80, CD86, CD40, etc.

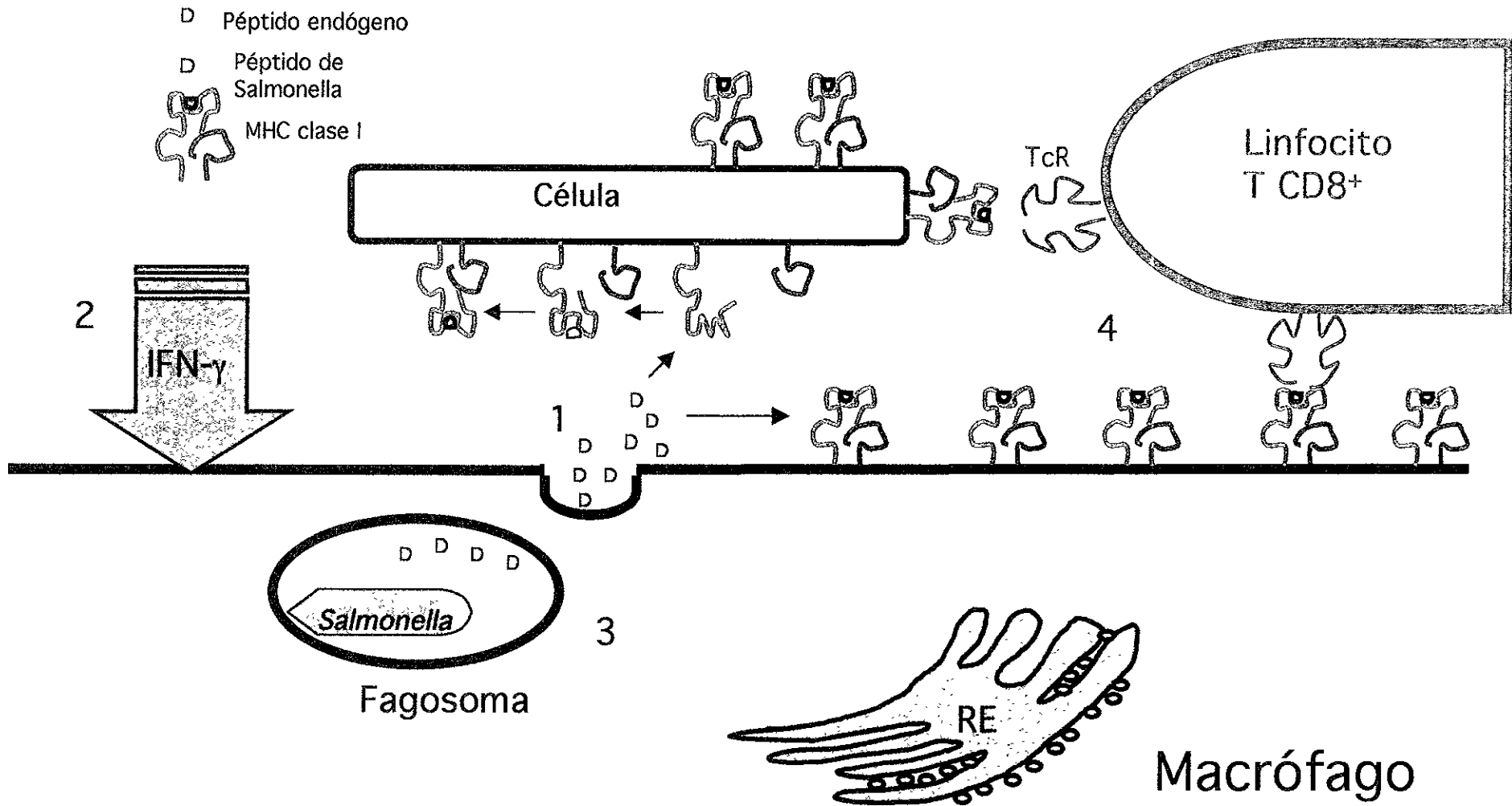
## 2. JUSTIFICACION:

La vacunación de humanos con una cepa de *S. typhi* recombinante y atenuada genera respuesta de linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos contra el antígeno foráneo que esta bacteria expresa de manera constitutiva (89,90). Debido a que *Salmonella* reside y se multiplica en lisosomas y no existe evidencia de que la bacteria o productos de ella ingresen al citosol de los macrófagos o de células epiteliales infectadas, se desconocen los mecanismos de procesamiento de antígeno involucrados en la presentación por moléculas MHC clase I de los péptidos derivados de este antígeno exógeno. La presentación cruzada es un probable mecanismo que pudiese explicar la inducción de linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos contra los antígenos de *Salmonella*, ya que macrófagos y células dendríticas han sido descritas como las responsables de la presentación cruzada. Además sería una vía alternativa por la cual macrófagos presentan antígeno en aquellas infecciones virales que evaden la respuesta de linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos disminuyendo la expresión de MHC clase I de las células infectadas; el mismo mecanismo sería aplicable en la respuesta contra células tumorales. Al igual que las clásicas vías de procesamiento de antígeno la presentación cruzada tiene repercusiones en los mecanismos de tolerancia inmunológica para el reconocimiento de los antígenos propios y extraños.

Hasta la fecha no se han definido las condiciones en las cuales el macrófago utiliza al material fagocitado para la presentación cruzada, también se desconoce la vesícula donde se lleva a cabo el procesamiento de antígeno, y si los péptidos generados presentan características similares a los que se producen durante la degradación por los proteosomas. Por lo tanto el presente trabajo tiene como objetivo el estudio de la vía de procesamiento de antígenos exógenos presentados por moléculas MHC clase I, utilizando como modelo macrófagos infectados con

### 3. HIPOTESIS

1. Macrófagos infectados con *Salmonella* secretan péptidos provenientes del material fagocitado capaces de unirse a moléculas MHC clase I vacías presentes sobre la superficie celular, de ellos mismos y de células vecinas.
2. El IFN- $\gamma$  es también un estímulo necesario que los macrófagos requieren para la secreción de péptidos.
3. Algunos de los compartimientos de la vía fago-lisosomal de los macrófagos es el sitio donde se generan los péptidos que se unen a moléculas MHC clase I vacías.
4. Los péptidos secretados por el macrófagos y que son presentados por sus moléculas clase I son el blanco de linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos.



**Figura 3.** Los macrófagos activados con IFN- $\gamma$ , e infectados con *Salmonella* secretan péptidos al medio externo. En la superficie de otras células y de los macrófagos, estos péptidos secretados se unen a moléculas MHC clase I vacías. Una vez que la molécula MHC clase I adquiere la conformación adecuada ésta puede activar linfocitos T CD8+ específicos contra *Salmonella*. Las flechas representan el ensamble de la molécula MHC clase I vacía con el péptido secretado y los números representan las hipótesis descritas en el texto. TcR: receptor de T. RE: retículo endoplásmico

#### 4. OBJETIVOS

1. Establecer un sistema de infección de macrófagos de ratón con *Salmonella typhimurium* en el cual los macrófagos se encuentren viables y capaces de controlar la infección bacteriana para su procesamiento.
2. Realizar experimentos de co-cultivo de células RMA-S con macrófagos infectados con *S. typhimurium*. Medir moléculas MHC clase I en la superficie de las células RMA-S para verificar que los macrófagos secreten péptidos clase I.
3. Evaluar la participación de enzimas lisosomales en el sistema de co-cultivo y secreción de péptidos con los inhibidores lisosomales, leupeptina, cloroquina y cloruro de amonio.
4. Evaluar la participación de la vía clásica de procesamiento, en el sistema de co-cultivo y secreción de péptidos con el inhibidor brefeldina A (BFA).
5. Verificar que los péptidos secretados sean reconocidos por linfocitos T CD8+ citotóxicos.
6. Aislar vesículas de macrófagos de ratón infectados con *Salmonella typhimurium* con fraccionamiento celular en gradientes de Percoll.
7. Analizar las fracciones obtenidas de los gradientes por inmunoblot con anticuerpos que reconocen marcadores vesiculares de la vía endosomal-lisosomal.
8. Analizar las fracciones obtenidas de los gradientes por microscopía electrónica para verificar que se trata de vesículas.

## 5. MATERIAL Y METODOS

### 5.1 Animales de experimentación:

**RATONES:** Se obtuvieron macrófagos de exudado peritoneal de ratones BALB/c y C3H/HeJ, del Bioterio del Hospital Infantil de Mexico, Departamento de Infectologia. Colonia Doctores, Mexico D.F.

**CONEJOS:** Para generar anticuerpos policlonales, se inmunizaron conejos del Bioterio del Departamento de Control de Calidad del IMMS. La Raza, Mexico D.F

### 5.2. Lineas celulares

Todas las líneas celulares se cultivaron en RPMI-1640 (GIBCO.BRL) con 10% de suero fetal bovino, L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM y 2-mercaptoetanol 50  $\mu$ M, (**RP-10**). Las líneas de macrófagos, fibroblastos, linfocitos B y las RMA-S se cultivaron en medio sin antibiótico. El resto de las células se cultivaron en medio RP-10 con penicilina y estreptomina.

- El timoma RMA y su mutante RMA-S, de haplotipo H-2<sup>b</sup> fueron obsequiados por el Dr. Klas Karre (Karolinska Institute, Estocolmo, Suecia) (91).

-El hibridoma de linfocitos TCD8<sup>+</sup>, RF3370 (C57BL/6-BW.CD8.7) específico para el péptido 257-264 de ovoalbúmina restringido por K<sup>b</sup> fué obsequio del Dr. Kenneth L. Rock (Division of Lymphocyte Biology, Dana Faber Cancer Institute, Department of Pathology, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts) (92).

-Las siguientes líneas celulares se obtuvieron de American Type Cell Collection (ATCC): macrófagos IC21 de haplotipo H-2<sup>b</sup> ATCC TIB 186 (93), macrófagos P388D<sub>1</sub>

de haplotipo H-2<sup>d</sup> ATCC TIB-63 (94) y macrófagos J774A.1 de haplotipo H-2<sup>d</sup> ATCC TIB-67 (95). El mastocitoma P815 de haplotipo H-2<sup>d</sup> ATCC TIB-64 (96). El fibroblasto L929 ATCC CCL-1. Las células de ratón dependientes de IL-2, CTLL-2 ATCC TIB-214 (97)

-Los hibridomas productores de citocinas: XG310 productor de IL-2 obsequio del Dr. Fernando Esquivel (Laboratorio de Virología, Instituto de Biotecnología de la UNAM, Cuernavaca Mor, México). L1210 productor de IFN  $\gamma$  obsequio del Dr. Cesar González Bonilla (Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica, CMN. IMSS)

-La línea de linfocitos B A-20 obsequio del Dr. Jose Moreno Rodríguez (Unidad de Investigación Médica en Inmunobiología, CMN,IMSS)

- Los hibridomas productores de anticuerpos monoclonales: Y3 anti MHC clase I K<sup>b</sup>, W632 anti HLA-A2, ambos fueron obsequio del Dr. G.J. Hammörling, (German Cancer Research Centre, Heidelberg, Alemania) y el hibridoma M1/70.15.11.5 anti-Mac1 o anti CD11b se obtuvo de ATCC.

### 5.3 Bacterias

- *Salmonella typhimurium* LT2 ATCC , *Salmonella typhimurium pho PC* (98) y *Salmonella typhimurium* 14028 ATCC fueron obsequio de la Dra. Celia Alpuche (Laboratorio de Infectología, Microbiología e Inmunología Clínica del Hospital General de México-UNAM).

- En los experimentos donde se empleó bacteria muerta, las bacterias antes mencionadas se lavaron con solución solución salina fisiológica y se incubaron en un baño a 90°C durante 20 minutos.



## 5.4 Anticuerpos

El anticuerpo monoclonal Y3, anti-K<sup>b</sup>, se obtuvo de 4 litros de sobrenadante de cultivo de hibridoma, el cual se cultivo en medio RP-10 a una densidad máxima de 2 millones de células/ml. Las células se separaron del sobrenadante por centrifugación a 2000g y posteriormente al sobrenadante se ajusto a pH 8 con amortiguador de Tris 1 M. El sobrenadante se pasó por una columna de Proteína A-Sefarosa (Pharmacia-Uppsala, Sweden), al menos dos veces a una velocidad de 0.5 ml/min. Una vez unido el anticuerpo a la columna, esta se lavo tres veces con cinco volúmenes de la columna de amortiguador Tris 10 mM pH 8 y tres volúmenes de columna de amortiguador Tris 100mM pH=8. El anticuepo se eluyo de la columna de proteína A con Glicina 2 M pH 3 y las fracciones se colectaron en Tris 1 M pH=8. A cada fracción se determinó concentración de anticuerpo monoclonal por absorbancia a 280 nm utilizando como coeficiente de extincion 1mg de IgG = 0.8 DO a 280. Las fracciones que presentaron mayor concentración de proteínas se dializaron contra amortiguador de fosfatos (PBS). Posteriormente el anticuerpo purificado se conjugó a biotina utilizando Sulfo-N-hydroxysuccinimide-Biotin de Pierce (Rockford, IL) siguiendo el protocolo del proveedor.

El anticuerpo anti-CD11b o M1 se obtuvo del sobrenadante de cultivo de hibridoma M1/70.15.11.5. Este hybridoma se cultivó en medio RP10 a una densidad máxima de 1.5 millones de células/ ml. Los sobrenadantes se separaron de las células por centrifugación a 2000g y se almacenaron congelados en alicuotas de 10 ml a -20 °C.

Para los experimentos de inmunoelectrotransferencia se utilizaron sobrenadantes de anticuerpo monoclonal 1D4B que reconoce LAMP1( Donación

del Dr. David Russel, Washington University, School of Medicine) y sobrenadantes de anticuerpo monoclonal C2F2 que reconoce receptor de transferrina (Donación del Dr. Zuhair Ballas).

Rab 5, Rab 7, Exón 8 y Nramp (Tabla 1) son marcadores de la vía endosomal-lisosomal. Debido a que no se cuentan con los anticuerpos monoclonales contra estas moléculas, se generaron anticuerpos policlonales en conejo contra péptidos de las regiones amino o carboxilo, localizadas en el citosol, de cada una de estas proteínas. En la Tabla 1 están las secuencias de los péptidos que se sintetizaron para realizar las inmunizaciones. Los péptidos se sintetizaron sobre un soporte de poly-L-lisina para generar una molécula ramificada con varias copias de un mismo péptido (99). La síntesis de péptidos se llevó a cabo en un sintetizador Synergy (Applied Biosystem, modelo 432 A ) utilizando aminoácido acoplados a Fmoc (100). Los péptidos se purificaron por cromatografía de alta presión (HPLC) en una columna C18 de fase reversa (Millipore) y posteriormente se liofilizaron.

El esquema de inmunización utilizado para la generación de anticuerpos anti-péptido en conejos es el reportado en la referencia 101 y se describe a continuación para cada uno de los péptidos de la Tabla 1:

- 1ª Inyección con péptido en adyuvante completo de Freund (ACF) por vía intradérmica,
- 2ª Diez días después, inyección con péptido en adyuvante incompleto de Freund (AIF) por vía intramuscular,
- 3ª Diez días después, inyección con péptido en AIF por vía intraperitoneal y finalmente tres inyecciones con péptido en PBS por vía intraperitoneal por intervalos de 10 días.

En cada inmunización se utilizó 1mg /ml de péptido y se aplicó 1 ml en diferentes partes del lomo del conejo. Después de la quinta ocasión se redujo la

**Tabla 1. Secuencias de los péptidos de marcadores endosomales y lisosomales que se sintetizaron y utilizaron para generar anticuerpos policlonales en conejo.**

<b>Secuencia</b>	<b>Proteína</b>	<b>Marcador</b>
(182-197) PKNEPQNPGANSARGR	Rab 5	endosomas tempranos
(175-191) KQETEVELYNEFPEPIK	Rab 7	endosomas tardíos
(338-348) GGVMVHDPHSLA	Exón 8	Péptido intracelular de MHC I
(533-548) LYGLPNEEQGGVQGS	Nramp a	Lisosoma
(63-79) MSIAFLDPGNIESDLQ	Nramp b	Lisosoma

concentración de péptido a 0.5 mg/ml y se aplicó 1 ml. Se realizaron sangrías cada dos inyecciones siete días después de la administración del péptido. Los sueros se evaluaron con ensayos de ELISA e inmunoelectrotransferencia. De la misma manera se generaron sueros contra un extracto de proteínas totales de *Salmonella* y de ovoalbúmina.

### **5.5 Activación de macrófagos con IFN- $\gamma$ .**

Para la activación de macrófagos con IFN- $\gamma$ , las líneas de macrófagos IC21, P388 y J774 se cultivaron durante 48 horas en placas de 12 pozos ( $0.5 - 1 \times 10^5$  células/pozo) ó en botellas de tres niveles de  $400 \text{ cm}^2$  ( $5 \times 10^6$  células/botella) en medio RP-10 con 20% de sobrenadante del hibridoma L1210 (que contiene aproximadamente 20-40 U/ml de IFN- $\gamma$  murino). Durante las 48 horas de activación ocurren tres o cuatro ciclos de división celular en las líneas celulares de macrófagos, los cuales se consideran para calcular el número de bacterias a utilizar para la infección con *S. typhimurium*.

### **5.6 Infección de macrófagos con *Salmonella*.**

Las cepas de *Salmonella* se cultivaron en medio líquido Luria o Infusión Cerebro-Corazón por 18 horas a  $37^\circ\text{C}$  con agitación horizontal. De este cultivo se realizó una dilución 1/1000 en medio de cultivo Luria y se incubó por 4 horas a  $37^\circ\text{C}$  con agitación hasta alcanzar fase logarítmica de crecimiento bacteriano considerado a 0.4 de densidad óptica a  $600 \text{ nm} = 1 \times 10^9$  bacterias/ml. Esta medida se confirmó en cada experimento haciendo diluciones del cultivo bacteriano en PBS y cultivando

(37°C, 18 horas) duplicados de 1 ml de las diluciones correspondientes a  $1 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-8}$  y  $1 \times 10^{-9}$  bacterias/ml en placas de agar MacConkey. Se contaron las colonias de bacteria de todas las placas y se consideró una cuenta viable de bacterias confiable cuando el promedio de los duplicados de cada dilución incrementa diez veces de acuerdo a la dilución.

Con las bacterias de fase logarítmica se realizó la infección de macrófagos ajustando a una relación de macrófago:bacteria de 1:10 hasta 1:100 según la cepa utilizada. Después de 10 a 30 minutos de cultivar a bacterias y macrófagos a 37°C, las bacterias no internalizadas por los macrófagos se eliminaron lavando con amortiguador de fosfatos-salina fisiológica (PBS) pH 7 y 20 µg/ml de gentamicina. Posteriormente los macrófagos se cultivaron en RP10 y 20 µg/ml de gentamicina (102). Para cuantificar el número de bacterias fagocitadas y sobrevivientes, después de los cultivos, los macrófagos se lavaron tres veces con PBS para eliminar la gentamicina y se lisaron con Triton X100 al 25% en PBS. Diluciones seriadas del lisado se cultivaron por duplicado en agar MacConkey durante 20 horas y finalmente se contaron el número de colonias.

## **5.7. Co-cultivos**

Las células RMA-S se colectaron y lavaron dos veces con RPMI sin suero. Posteriormente se contaron y agregaron a los cultivos de macrófagos (IC21 o peritoneales según el caso) en una relación de tres células RMA-S por cada macrófago. Estas mezclas de células se cultivaron durante 18 horas a 37°C o el tiempo indicado en cada experimento.

## 5.8. Marcaje radioactivo de bacterias

*S. typhimurium* 14028 se cultivó en medio mínimo M9 (0.6% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.3% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5% NaCl, 0.1% NH<sub>4</sub>Cl, 2 mM de sulfato de magnesio, 0.2% de glucosa y 0.1 mM de cloruro de calcio, pH 7.4) a 37°C con agitación horizontal durante aproximadamente 24 horas. Cuando el cultivo alcanzó una densidad óptica de 0.4 a 600 nm se adicionaron 50 µCi de cada uno de los siguientes aminocidos leucina, lisina, fenilalanina y tirosina marcados con tritio (NEN, Life Science, Boston, MA) y se cultivaron por 30 minutos a 37°C (103). El exceso de marca radioactiva se lavó cuatro veces con PBS. Las bacterias marcadas radioactivamente se utilizaron para infectar macrófagos en las condiciones descritas previamente.

## 5.9. Inmunofluorescencia

Para la detección de moléculas MHC clase I K<sup>b</sup> sobre la superficie de células RMA-S y macrófagos IC21, se realizó una tinción de inmunofluorescencia indirecta. Para bloquear posibles uniones inespecíficas en las RMA-S y para bloquear receptores Fc de IgG en los macrófagos, las células se incubaron (cada una por separado) con suero normal de caballo (dilución 1:20 en 50µl de PBS-2% suero-fetal-bovino (SFB)) durante 20 minutos a 4°C. Posteriormente las células se centrifugaron a 1200g, se descartó el PBS y se les adicionó 100 µl de sobrenadante del hibridoma M1/70.15.11.5 (productor del anticuerpo anti CD11b) y se incubaron a 4°C por 30 minutos. Las células se lavaron dos veces con PBS-2% SFB y se les adicionó anticuerpo de cabra anti-Ig de rata conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Gibco, BRL Long Island, NY) ( 1µg/millón de células en PBS-2%

SFB) y se incubaron por 30 minutos a 4°C. Posteriormente las células se lavaron dos veces y se adicionó el anticuerpo Y3-biotina (0.5 µg/millón de células en 100 µl de PBS-2% SFB) para dejarlas incubar por 30 minutos a 4°C en hielo. Finalmente las células se lavaron dos veces con PBS-2% SFB y se les adicionó estreptoavidina conjugada a ficoeritrina (1µg/millón de células en 100 µl de PBS-2% SFB) y se incubó y lavo al igual que antes descrito. Las células se resuspendieron en 2.5 µg/ml de ioduro de propidio (**Sigma-Aldhrich**) en PBS. Se analizaron 10 000 células de cada muestra en un citofluorómetro de flujo, FACSsort (**Becton Dickinson**, Mountain View, C.A).

#### **5.10 Preparación de antígeno: hidrolizado de proteínas de *Salmonella typhimurium*.**

La biomasa bacteriana de 4 litros de cultivo de *Salmonella typhimurium* se rompió por presión con una prensa francesa. Se separaron los fragmentos de membrana y citosol por ultracentrifugación a 45 000 rpm durante 45 minutos a 4°C en un rotor Sorvall T865 (ultracentrífuga Ultra-Pro80 de Sorvall). Posteriormente se realizó una extracción de proteínas de membrana empleando un amortiguador de alta fuerza iónica compuesto de NaCl 0.4M, 1% de SDS, EDTA 5mM, 0.05 % de 2-mercaptoetanol y Tris-HCl 50 mM pH 7.7. Las proteínas de membrana obtenidas en esta extracción se mezclaron con las proteínas de la fracción citosólica y se desnaturalizaron con un amortiguador compuesto de 2-mercaptoetanol 0.2M y urea 8 M por 12 horas. Las proteínas se alquilaron con ácido iodoacético 0.25 M por dos horas. Se dializaron exhaustivamente contra agua y se trataron con 1% de tripsina en un amortiguador de carbonato de amonio 50 mM pH 8, por 24 horas. Del hidrolizado se separaron las proteínas mayores de 10, 000 daltones (D) por ultrafiltración con

centriprep-10 (Millipore) y los péptidos menores de 10 000 D se esterilizaron por filtración con membranas de 0.22  $\mu\text{m}$  (104).

### 5.11. Ensayo de citotoxicidad

Ratones BALB/c se inmunizaron por vía oral con *Salmonella LT2* a una dosis de 10 bacterias por ratón y se realizaron tres aplicaciones por espacio de 10 días. Después de la última aplicación, los ratones se sacrificaron y se extrajeron los bazo colocandolos en tubos de 50 ml con 10 ml de medio de cultivo RP10. Estos tejidos se disgregaron con dos agujas estériles No. 22 y las células se centrifugaron a 1400 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. Se descartó el medio de cultivo, y se adicionó a las células de bazo una solución de cloruro de amonio 0.8% (5 ml/ bazo de ratón) para lisar eritrocitos. Las células se incubaron a 37°C por 5 minutos y posteriormente se les adicionó 30 ml de medio RP10. Se lavaron 2 veces con medio RP10. Finalmente se resuspendieron en medio RP con 20% de suero fetal bovino a una densidad de 20 millones/ ml y con 100  $\mu\text{g/ml}$  del hidrolizado de proteínas de *Salmonella* descrito anteriormente. Las células de bazo con antígeno se incubaron por cinco días a 37°C. Al termino de la incubación las células se colectaron y centrifugaron a 1400 rpm por 5 minutos, se resuspendieron en medio RP10 y se lavaron dos veces con medio RP10. Posteriormente se contaron las células vivas y éstas se utilizaron como células efectoras para el ensayo de citotoxicidad.

Las células blanco utilizadas para el ensayo de citotoxicidad fueron P815 provenientes de co-cultivos con IC21 infectados con *Salmonella*. Posterior al co-cultivo las células P815 se lavaron dos veces con medio RP10 y se marcaron con 200  $\mu\text{Ci}$  de  $\text{Cr}^{51}$  por dos horas a 37°C en un baño de agua. Posteriormente se lavaron 5 veces con medio RP10. El ensayo de citotoxicidad se realizó de acuerdo al



protocolo de la referencia No. 105. Los resultados se expresaron en porcentaje de lisis específica = (cromo liberado por cultivo con linfocitos citotóxicos (LC)) - (liberación espontánea de cromo) / (cromo total liberado del lisado de células blanco) -(liberación espontánea de cromo) x 100.

### **5.12. Ensayo de presentación y cuantificación de IL-2**

Macrófagos activados con IFN- $\gamma$  durante 48 horas se lavaron tres veces con RP10. Posteriormente se les adicionaron células RMA-S o RMA en relación tres a uno con respecto a los macrófagos y ovoalbúmina (**Calbiochem**, San Diego CA) en medio RP10. Esta mezcla de células se cultivó por 18 horas. Posteriormente las células RMA o RMA-S se colectaron en medio RP10 a 37°C para evitar despegar a los macrófagos de las placas. Las células RMA-S se lavaron dos veces con medio RP10 y se utilizaron como células presentadoras para estimular a  $1 \times 10^5$  células del hibridoma RF3370 en placas de cultivo de 96 pozos de fondo redondo en medio RP10. A las 24 horas se colectaron 100 $\mu$ l del sobrenadante y se cuantificó su contenido de IL-2 por el bioensayo con CTLL-2 descrito en la referencia 106.

### **5.13. Separación y aislamiento de vesículas de macrófagos infectados con *S. typhimurium*.**

Diez millones de macrófagos activados con IFN- $\gamma$  e infectados con *S. typhimurium* 14028 se lisaron con un amortiguador iso-osmótico compuesto de Tris 10 mM, EDTA 1 mM, inhibidores de proteasas (bestatin 130  $\mu$ M, chymostatin 20  $\mu$ M E64 5  $\mu$ M, leupeptin 1 $\mu$ M, pepstatin 1  $\mu$ M, phosphoramidon 100 nM, pefabloc 2  $\mu$ M y aprotinin 0.3  $\mu$ M, **Roche**) y sacarosa 0.25 M a pH 7.4. La ruptura celular se realizó en un homogenizador Dounce con capacidad para 1 ml. Para eliminar los núcleos y las

células completas el lisado se centrifugó a 900g por dos minutos, este procedimiento generó dos muestras: un sobrenadante y un sedimento. El sobrenadante se dividió en dos partes, una parte se guardó a 4°C y la otra parte se utilizó como medio para lisar células completas presentes en el sedimento (de nuevo se utilizó el homogenizador Dounce y se centrifugó a 900g). Este procedimiento se repitió 20 veces para extraer el mayor número de vesículas presentes en las células completas del sedimento. Así mismo para evitar aumentar el volumen del lisado en cada extracción se utilizó el mismo lisado como medio de extracción.

Para el fraccionamiento del lisado se utilizaron tubos de polyalómero (**Beckman** No. 33137), en los cuales se colocó 1 ml de sacarosa 2.5 M como soporte del gradiente. Sobre la sacarosa se colocaron 7.5 ml de una suspensión de **Percoll** (**Pharmacia**) al 27% en amortiguador de Tris 10 mM, EDTA 1 mM e inhibidores de proteasas. A esta suspensión se le adicionó lentamente el lisado de macrófagos infectados en un volumen máximo de 2 ml. Los tubos con Percoll y el lisado y tubos preparados de igual manera pero con 2 ml de marcadores de gradiente (**Pharmacia**) se centrifugaron a 30 000 r.p.m. en un rotor **Beckman 40 Ti** durante 1 hora a 4°C. A los tubos que contenían marcadores se les midió la distancia que migraron cada uno de los marcadores con respecto al menisco utilizando una regla de 30 cm. A los tubos con lisado se les extrajeron fracciones de 0.5 ml desde el menisco hasta el fondo del tubo cada 0.25 cm, lo cual se realizó perforando el tubo con una aguja del No.22 y una jeringa estéril de 3 ml.

#### 5.14. Determinación de $\beta$ -hexosaminidasa

La actividad enzimática de  $\beta$ -hexosaminidasa contenida en cada una de las

fracciones del lisado de macrófagos se determinó cuantificando la liberación de *p*-nitrofenilo por la hidrólisis de *p*-nitrofenil-N-acetil-β-D-glucosaminida (5 mM). La reacción se llevó a cabo con 100 μl del lisado en 800 μl de amortiguador de acetato de sodio 0.5 M pH 4.4 con 0.5 mM de Tritón X-100 y la reacción se incubó durante 1 hora a 37°C en baño de agua. La liberación de *p*-nitrofenilo se determinó a 405 nm.

### 5.15. Inmunoelectrotransferencia

Macrófagos IC21 ( $1 \times 10^7$  células) o las fracciones celulares se lisaron con amortiguador de Tris 50 mM, EDTA 5 mM, NaCl 150 mM y SDS 1% pH 7.4 con inhibidores de proteasas (a las concentraciones descritos anteriormente). Las muestras se mezclaron 1:1 v/v con amortiguador de muestra (1.5% de SDS, 5% de β-mercaptoetanol, glicerol, Tris 100 mM pH=6.8) y se calentaron por cinco minutos a 95°C. Las proteínas se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (ECL-Hybond nitrocellulose RPN303D **Amersham-Pharmacia**) (107). Las membranas se incubaron con los anticuerpos en las diluciones indicadas en la Tabla 2.

Para revelar los anticuerpo utilizados en el inmunoblot se adicionaron como segundos anticuerpos, inmunoglobulinas de cabra anti-conejo o anti-rata conjugadas a peroxidasa (**Gibco, BRL**). El revelado se realizó con reactivos de quimioluminiscencia acorde al protocolo del proveedor (ECL-Western blotting detection reagent, RPN2106-**Amersham-Pharmacia**).

**Tabla 2. Condiciones para la electroforesis (SDS-PAGE) y diluciones de anticuerpos utilizadas en los experimentos de inmunoelectrotransferencia.**

<b>Marcador celular</b>	<b>Peso Molecular esperado (kD)</b>	<b>% de acrilamida utilizada en geles de SDS-PAGE</b>	<b>Origen del anticuerpo</b>	<b>Dilución del anticuerpo (suero o sobrenadante de cultivo)</b>
Receptor de Transferrina	80	7.5	Rata	1:1000
Rab 7	25-27	15	Conejo	1:500
Exón 8	42	15/12	Conejo	1:1000
<i>Salmonella</i>		15/12	Conejo	1:10 000
Lamp 1	110	7.5	Rata	1:500

## 5.16. Análisis ultraestructural.

Para el análisis ultraestructural se tomaron muestras representativas de *Salmonella typhimurium* 14028, macrófagos IC21 no activados, macrófagos IC21 activados con IFN- $\gamma$  y macrófagos IC21 activados con IFN- $\gamma$  e infectados con *S. typhimurium* 14028. Así mismo se tomaron muestras de las fracciones obtenidas del fraccionamiento del lisado de cada grupo de macrófagos.

Las muestras se fijaron en glutaraldehído al 2.5% en amortiguador de cacodilato de sodio 0.1M pH 7.4. Después de la fijación se lavaron tres veces durante diez minutos con glutaraldehído al 2.5% en PBS. Se realizó una segunda fijación con tetróxido de osmio ( $OsO_4$ ) al 1% en amortiguador de cacodilato de sodio 0.1M pH 7.4 a temperatura ambiente durante dos horas. Posteriormente las muestras se lavaron tres veces con el mismo amortiguador de caodilato de sodio durante 10 minutos y se deshidrataron en concentraciones ascendentes de etanol: 70%, 90%, y 95% en forma consecutiva por 10 minutos. En cada cambio de concentración se hicieron dos cambios en etanol absoluto. Posteriormente se realizaron dos cambios con óxido de propileno por 30 minutos cada vez y se incubaron las muestras con una mezcla de óxido de propileno y epón 812 (1:1) durante 18 horas. Finalmente las muestras se colocaron en moldes y se incluyeron en epón 812 (SIGMA), dejando polimerizar en una estufa a 65°C por 24 horas.

Los cortes semifinos de 0.5  $\mu$ m de espesor se tiñeron con azul de toluidina y los cortes finos de 50-70 nm de espesor se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo. Las rejillas de cobre, conteniendo los cortes se examinaron en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss modelo EM-10.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. CARACTERIZACION DE LA SECRECION DE PEPTIDOS

#### 6.1.1. Control de la multiplicación de *S.typhimurium* en macrófagos activados con IFN- $\gamma$ .

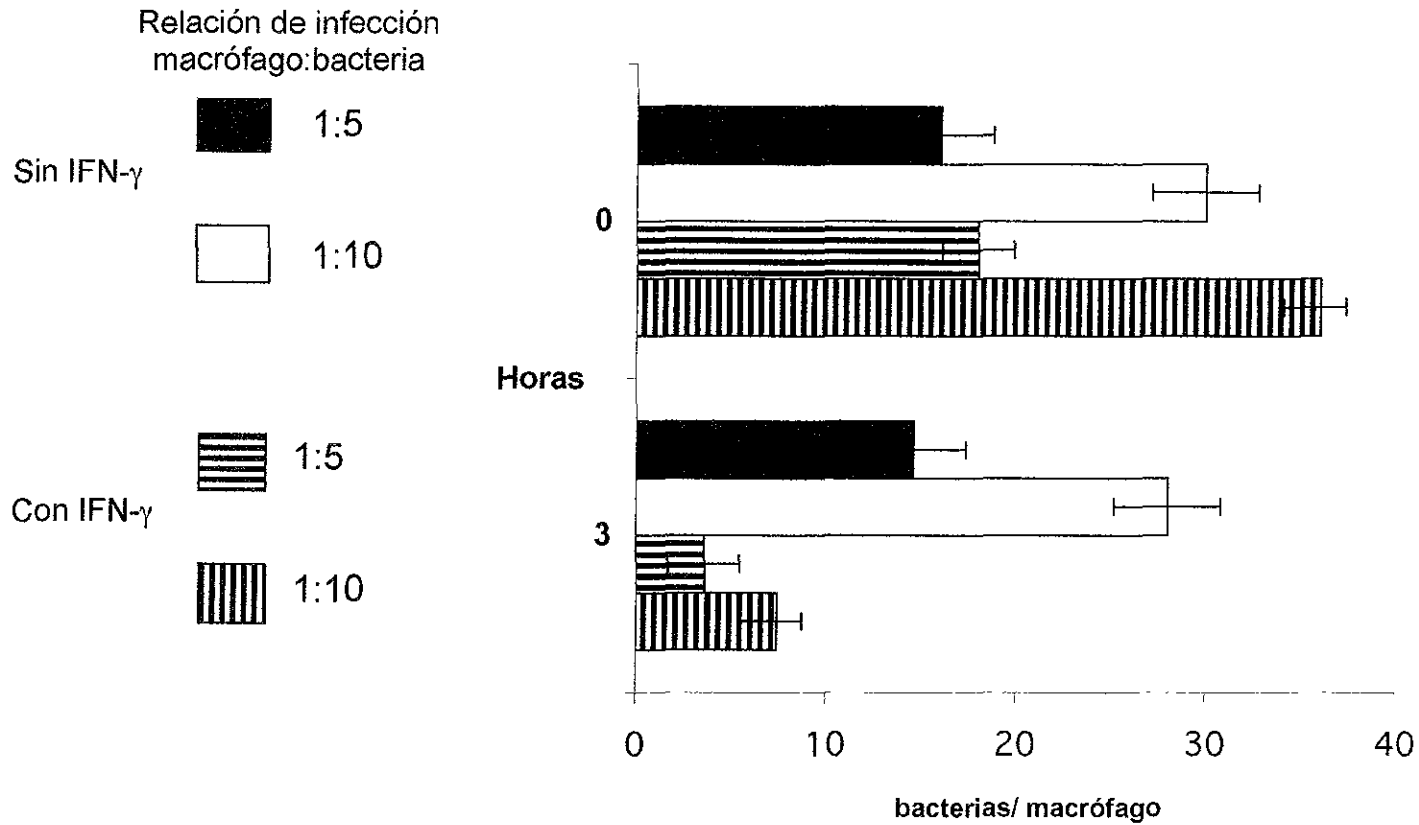
La susceptibilidad a la infección de *S. typhimurium* en las diferentes cepas de ratones de experimentación, está directamente relacionada con la capacidad de los macrófagos residentes en el sistema retículo endotelial de controlar la multiplicación bacteriana durante el inicio de la infección. La resistencia natural a esta primera etapa de infección se ha identificado como el locus *Ity* (*Bcg* para tuberculosis y *Lesh* para leishmania) localizado en el cromosoma 1. En el locus *Bcg* se ha encontrado el gen de *Nramp* (proteína de macrófagos asociada a la resistencia natural) que codifica para una proteína transmembranal presente en los lisosomas. *Nramp* presente en ratones susceptibles a la infección con *Mycobacterium* o *Bcg*<sup>s</sup>, difiere en algunos aminoácidos con *Nramp* presente en cepas resistentes. Ratones “knock-outs” o deficientes en *Nramp* provenientes de cepas resistentes se vuelven susceptibles a *M. bovis*, *Leishmania* y *Salmonella*. Durante infecciones subletales el crecimiento bacteriano en el sistema retículo endotelial está controlado por mecanismos de defensa que no involucran la activación y la respuesta de linfocitos T específicos, pero que requieren células provenientes de médula ósea, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . En los ratones en los que se genera protección después de una primo infección con *Salmonella*, se han detectado linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> específicos, anticuerpos opsonizantes, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  involucrados en la resistencia. A su vez, la administración de IFN- $\gamma$  o IL-12 en cepas de ratón susceptibles a *Salmonella* confiere resistencia durante la fase invasiva de la infección.

Con la finalidad de conocer la dosis de *Salmonella* capaz de infectar a macrófagos, sin generar daño celular y permitir detección de bacteria viva y procesada se infectó a macrófagos de la línea celular IC21 con cepas virulenta de *Salmonella typhimurium* 14028. Posteriormente se cuantificaron el número de bacterias fagocitadas por macrófago. Para evaluar el efecto del IFN- $\gamma$  sobre la capacidad de los macrófagos en el control de la multiplicación bacteriana, los macrófagos se cultivaron con 20U/ml de IFN- $\gamma$  durante 48 h previo a la infección con *Salmonella*. En la figura 4A se muestra como macrófagos tratados con IFN- $\gamma$  controlan la multiplicación de *S. typhimurium* 14028 en las primeras horas de infección. También es evidente que el IFN- $\gamma$  induce la fagocitosis de un mayor número de bacterias. El efecto del control de la multiplicación se observa claramente a las 24 horas post infección en la figura 4B.

Para los fines de nuestro estudio, consideramos que macrófagos IC21 son el modelo adecuado para estudiar el procesamiento de los antígenos de *Salmonella*. Los macrófagos activados fagocitan mayor número de bacterias de manera que este sistema permanece con altas dosis de antígeno durante los experimentos.

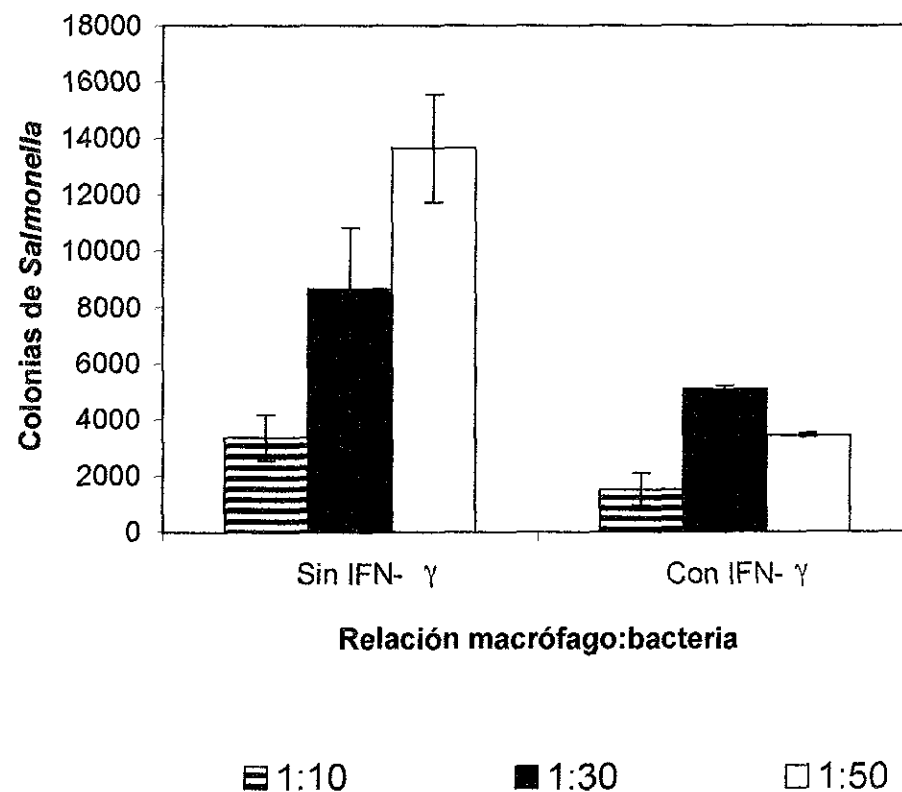
### **6.1.2. Efecto del IFN- $\gamma$ en la expresión de moléculas MHC clase I y de CD40.**

La activación de macrófagos mediada por IFN- $\gamma$  se puede evaluar en función de la inducción de la expresión de moléculas clase I y de moléculas co-estimuladoras tales como CD40, CD80 y CD86. En nuestro sistema experimental se evaluó el efecto del IFN- $\gamma$  en los macrófagos infectados y no infectados con *Salmonella* sobre la expresión de moléculas MHC clase I K<sup>b</sup> y de moléculas CD40. El IFN- $\gamma$  incrementó la expresión de moléculas MHC clase I K<sup>b</sup> y de CD40 (Figura 5). La infección con *Salmonella* sin el tratamiento con IFN- $\gamma$  no indujo esta expresión de moléculas. Lo cual indica que al contacto con *Salmonella* el macrófago no genera una señalización que



**Figura 4A. Macrófagos tratados con IFN- $\gamma$  controlan la multiplicación de *Salmonella* desde el inicio de la infección.** Grupos de  $3 \times 10^5$  macrófagos IC21 se cultivaron por 48 h en medio RP10 **sin IFN- $\gamma$**  o con 20 U/ml de IFN- $\gamma$  (**con IFN- $\gamma$** ). Posteriormente los macrófagos se infectaron con *S. typhimurium* 14028 utilizando cinco y diez bacterias por macrófago. Al inicio de la infección y a las tres horas post-infección se cuantificaron bacterias fagocitadas como se indica en Material y Métodos





**Figura 4B. Efecto del IFN- $\gamma$  en el control de la multiplicación de *Salmonella* dentro de los macrófagos.** Grupos de  $3 \times 10^5$  macrófagos IC21 se cultivaron por 48 h en medio RP10 sin IFN- $\gamma$  o con 20 U/ml de IFN- $\gamma$  (**con IFN- $\gamma$** ). Posteriormente los macrófagos se infectaron con *S. typhimurium* 14028 utilizando diez treinta y cincuenta bacterias por macrófago. A la 24 horas post-infección se cuantificaron bacterias fagocitadas.

modifique el repertorio de moléculas coestimuladoras en su superficie, ni que aumente su expresión de MHC clase I.

### **6.1.3. Macrófagos activados con IFN- $\gamma$ secretan péptidos capaces de unirse a moléculas MHC I vacías.**

Para evaluar la capacidad de los macrófagos de secretar péptidos antígenicos, se utilizaron células RMA-S, las cuales en su superficie celular unen péptidos clase I a sus moléculas MHC clase I. Esta propiedad se debe a que las células RMA-S poseen una mutación en el transportador TAP2 la cual evita parcialmente la translocación de péptidos presentes en el citoplasma hacia el lumen del retículo endoplásmico (104). En ausencia de péptidos el ensamblaje de las moléculas MHC clase I sufre problemas y la cadena pesada  $\alpha$  y  $\beta$ -2m permanecen en el retículo endoplásmico. Sin embargo, en la superficie de células RMA-S se ha detectado cadenas pesadas  $\alpha$  sin péptidos y debilmente asociadas con  $\beta$ -2 microglobulina, las cuales se ha denominado "moléculas vacías". En la superficie de la membrana celular estas moléculas vacías pueden unen péptidos clase I que posean en su secuencia sitios de inserción alelo específico (o péptidos óptimos). El péptido de OVA <sup>257-264</sup> posee los residuos de inserción a la molécula K<sup>b</sup> y se ha reportado que estabiliza moléculas vacías K<sup>b</sup>. Las células RMA-S se cultivaron por 18 horas con 10 nmoles del péptido OVA <sup>254-264</sup> y se detectaron moléculas MHC clase I con el anticuerpo Y3, el cual reconoce específicamente moléculas K<sup>b</sup> con estructura estable, es decir con péptido unido. Las células RMA-S provenientes del cultivo sin péptido mostraron una intensidad media de fluorescencia (IMF) de 20 (figura 6B) mientras que las células RMA-S cultivadas con péptido (OVA <sup>257-264</sup>) mostraron una IMF de 90 (Figura 6C), cuando se analizaron por citometría de flujo. Para este experimento el anticuerpo anti CD11b fué la referencia para el ajuste de autofluorescencia de las células RMA-S (Figura 6A). Se consideró entonces realizar

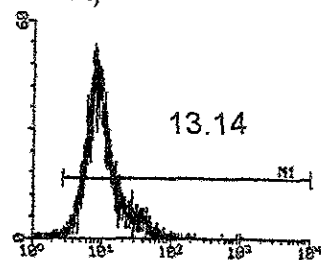
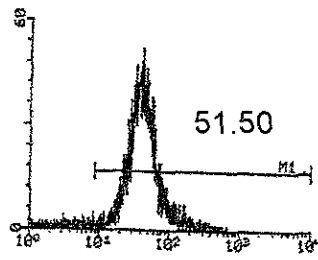
Clase I (K<sup>b</sup>)

CD40

A)

A)

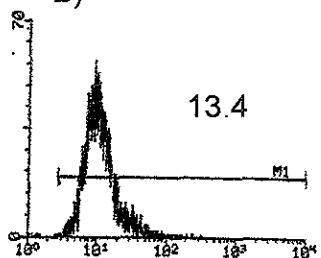
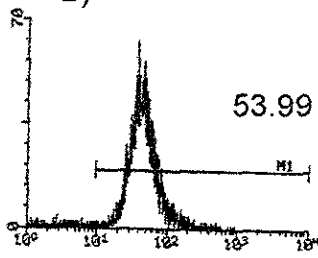
A) Macrófagos sin IFN- $\gamma$



B)

B)

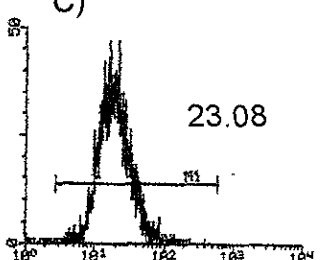
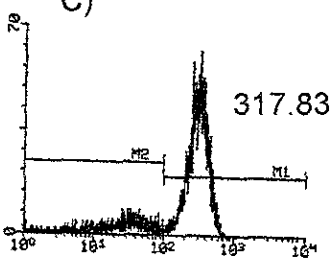
B) Macrófagos sin IFN- $\gamma$  infectados con *S. typhimurium*



C)

C)

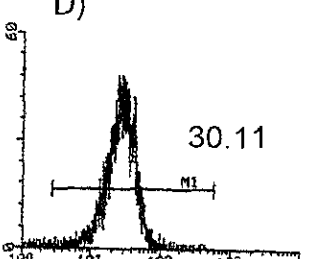
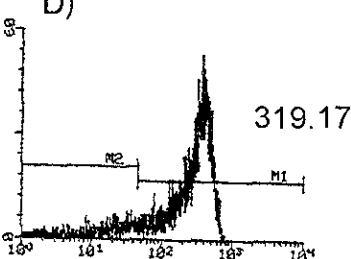
C) Macrófagos con IFN- $\gamma$



D)

D)

D) Macrófagos con IFN- $\gamma$  infectados con *S. typhimurium*



Intensidad de fluorescencia

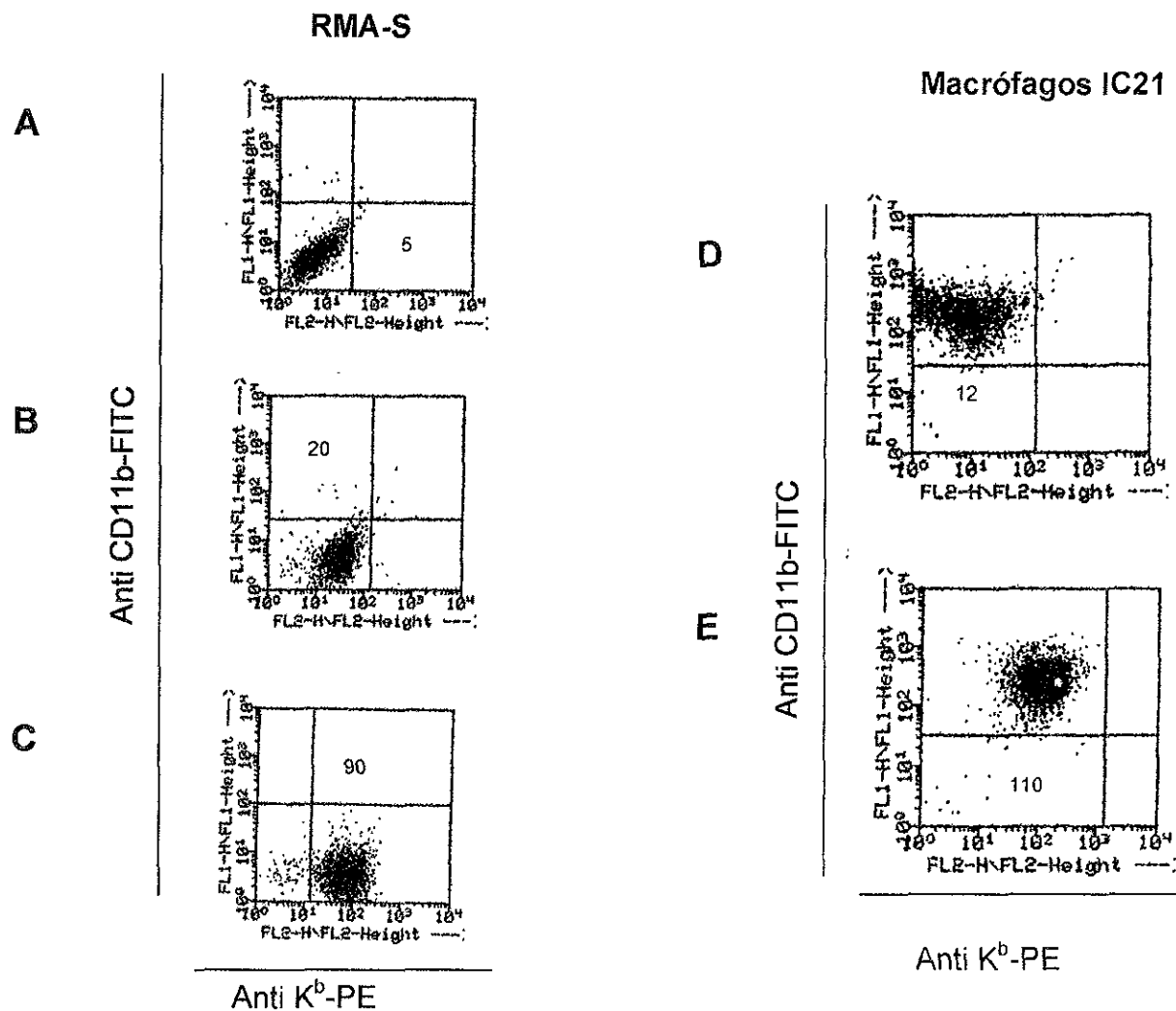
Figura 5. El IFN- $\gamma$  incrementa la expresión de clase I y CD40 en los macrófagos pero no la infección con *S. typhimurium*. Grupos de  $3 \times 10^5$  macrófagos IC21 se cultivaron en medio sin antibiótico A) y C), medio sin antibiótico con 20U/ml de IFN- $\gamma$  B) y D) durante 48 horas a 37 °C. Posteriormente los macrófagos de B) y D) se infectaron con *S. typhimurium* LT2 (relación 100 bacterias por macrófago). Después de 18 horas de cultivo a 37 °C, a los macrófagos se les realizó inmunofluorescencia indirecta de moléculas K<sup>b</sup> y CD40. Los números en los histogramas indican la media de intensidad de fluorescencia.

experimentos de co-cultivo de macrófagos con células RMA-S y detectar los péptidos secretados unidos a las moléculas vacías de las células RMA-S con el anticuerpo Y3. Sin embargo, los macrófagos IC21 por utilizar en los experimentos de co-cultivo también expresan moléculas  $K^b$  que pueden ser reconocidas por el anticuerpo Y3. Para diferenciar y separar a los macrófagos en el análisis de citometría, estos se marcaron con el anticuerpo anti CD11b (Figura 6 D). Los macrófagos IC21 con la doble tinción anti-CD11b y anti  $K^b$  aparecen en una posición diferente al de las RMA-S en el plano anti CD11b-FITC/anti  $K^b$  -PE del análisis de citometría de flujo (Figura 6E). Por lo tanto la combinación de anticuerpos anti CD11b (M1) y anti MHC clase I (Y3) se eligió para detectar moléculas  $K^b$  con péptido en las células RMA-S provenientes del co-cultivo con macrófagos IC21.

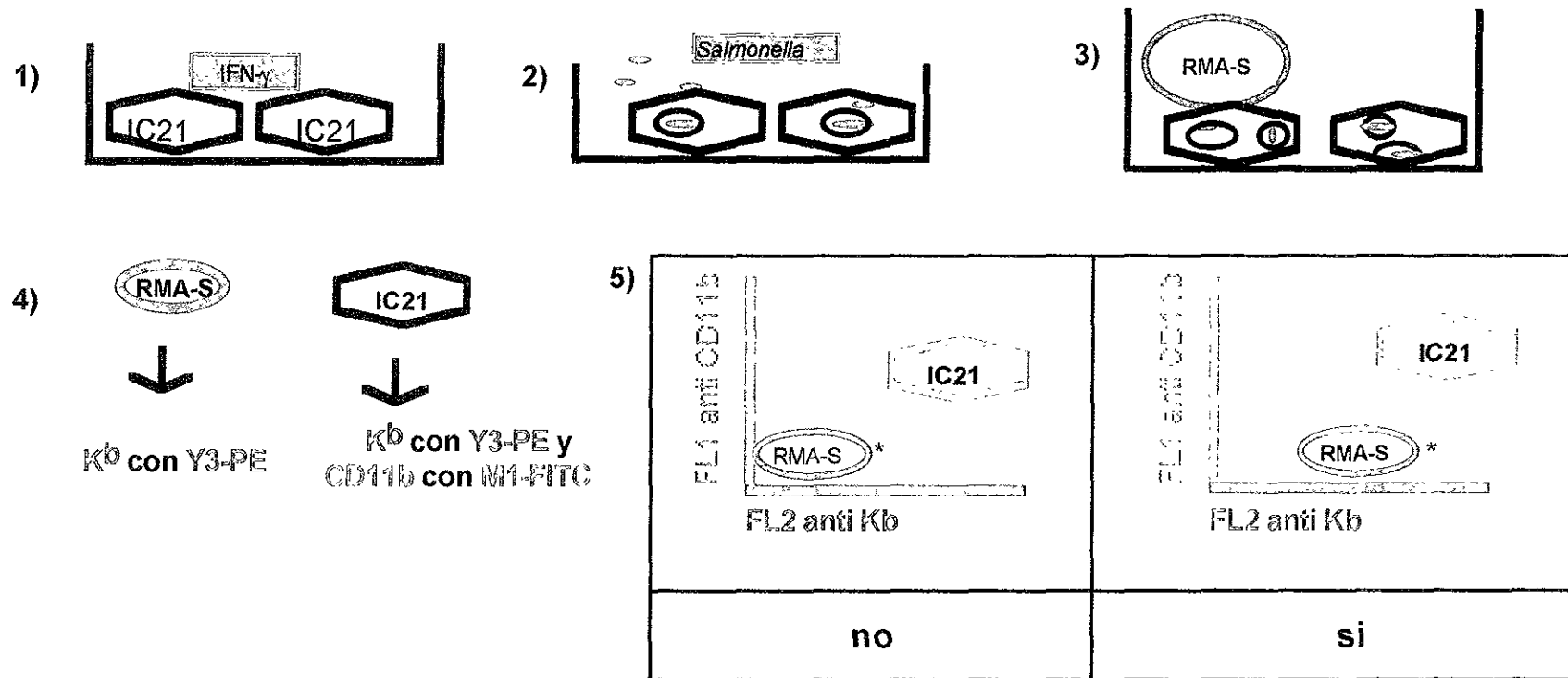
La secuencia de eventos de los experimentos de co-cultivo para detectar secreción de péptidos está representado en la figura 7 y consta de las siguientes etapas:

1. Activación de macrófagos con IFN- $\gamma$  por 48 horas.
2. Infección con *Salmonella typhimurium*.
3. Co-cultivo de macrófagos infectados con células RMA-S por 18 horas .
4. Inmunofluorescencia indirecta para la detección de las moléculas  $K^b$  en las células RMA-S y en los macrófagos y para la detección de CD11b en los macrófagos.
5. Citometría de las células RMA-S y de los macrófagos provenientes de los cocultivos.

De acuerdo a nuestra hipótesis, los macrófagos secretan péptidos al medio de cultivo y en el co-cultivo estos péptidos tienen la oportunidad de unirse a las moléculas MHC clase I vacías de las células RMA-S. Por lo tanto cualquier cambio en la intensidad media de fluorescencia de moléculas  $K^b$  detectado por el anticuerpo Y3 sobre las células RMA-S fue indicativo de presencia en el medio del co-cultivo de péptidos capaces de unirse a MHC clase I.



**Figura 6. Expresión de moléculas MHC clase I en células RMA-S y macrófagos IC21.** Células RMA-S (A, B y C) y macrófagos IC21 D y E se sometieron a inmunofluorescencia indirecta con anti-CD11b (A, B, C, D y E) y anti MHC clase I K<sup>b</sup> (B,C,E). En C) RMA-S se cultivaron con 10 nM del péptido OVA<sup>257-264</sup> por 18 horas antes de realizar la inmunofluorescencia indirecta. Los números en cada plano representan la intensidad media de fluorescencia de la población celular para MHC clase I K<sup>b</sup>.



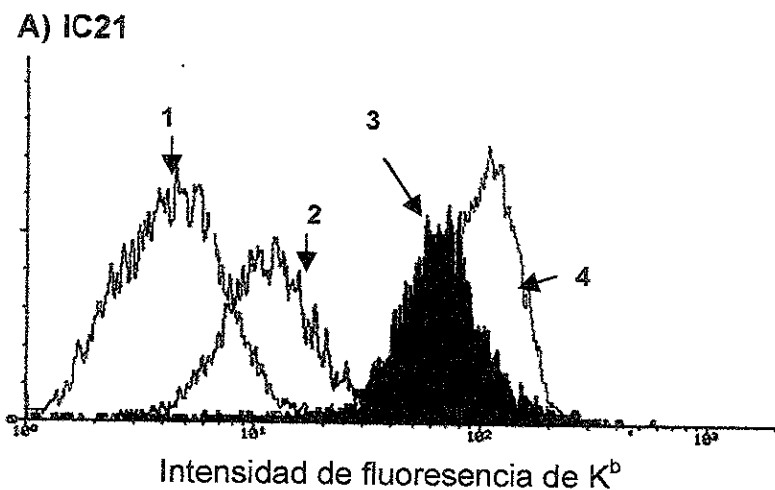
**Figura 7. Experimento de co-cultivo para la detección de secreción de péptidos.** 1) macrófagos IC21 se activaron con IFN- $\gamma$  por 48 horas. 2) Posteriormente se infectaron con *Salmonella* y 3) se co-cultivaron con células RMA-S. 4) Las células RMA-S se separaron de los macrófagos y se realizó inmunofluorescencia indirecta para moléculas clase I  $K^b$  y CD11b. 5) Planos de análisis después de la citometría de flujo. 6) Conclusión del patrón que se muestra en los diagramas.

**Clave :** IC21: macrófagos, Y3-anti MHC clase I, FL-Canal de fluorescencia.

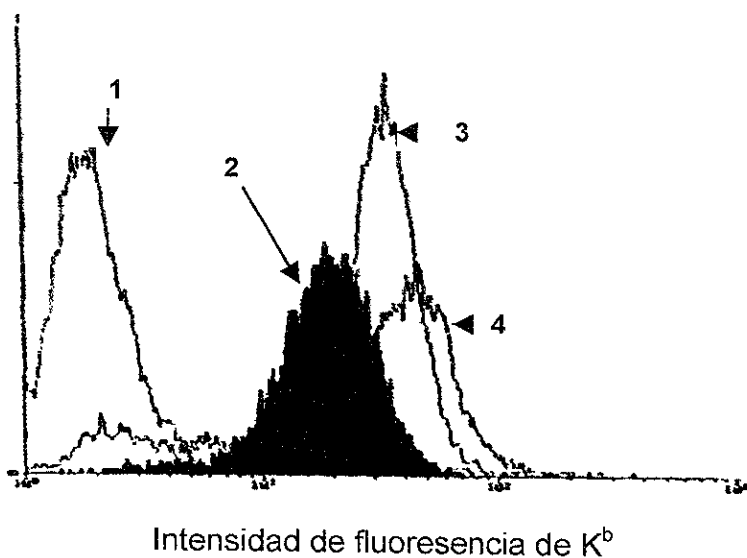
En los co-cultivos de células RMA-S con macrófagos no infectados y con macrófagos infectados; ambos grupos de macrófagos incrementaron la unión de péptidos a las moléculas  $K^b$  de las RMA-S. Lo cual indica que ambos tipos de macrófagos son capaces de generar péptidos que pueden unirse a moléculas MHC clase I (Figura 8). Sin embargo, las células RMA-S provenientes de macrófagos infectados presentan un mayor incremento de moléculas  $K^b$ , lo que aparentemente indica que la infección de *Salmonella* provee de mayor material para la secreción de péptidos. Este experimento se repitió al menos siete veces y la diferencia de intensidad de fluorescencia de las células RMA-S provenientes del co-cultivo con macrófagos infectados y no infectados de varios experimentos siempre se observó. Sin embargo los valores absolutos de las intensidades de fluorescencia fueron diferentes. Por esta razón, se realizó un análisis estadístico de las intensidades de fluorescencia de los siete experimentos con una prueba Wilcoxon para muestras pareadas y se obtuvo diferencia estadística significativa con  $P = 0.012$ . Lo cual confirma que macrófagos infectados con *Salmonella* secretan mayor número de péptidos con respecto a los macrófagos no infectados (Figura 9).

De estos resultados surgieron varias interrogantes:

1. ¿Los péptidos que se unen a las moléculas  $K^b$  de las células RMA-S provienen del medio de cultivo? ó ¿de la infección por *Salmonella* o es un fenómeno provocado por el cocultivo?
2. ¿La secreción de péptidos depende de la activación de los macrófagos?; ¿La secreción de péptidos depende de la infección por *Salmonella*?



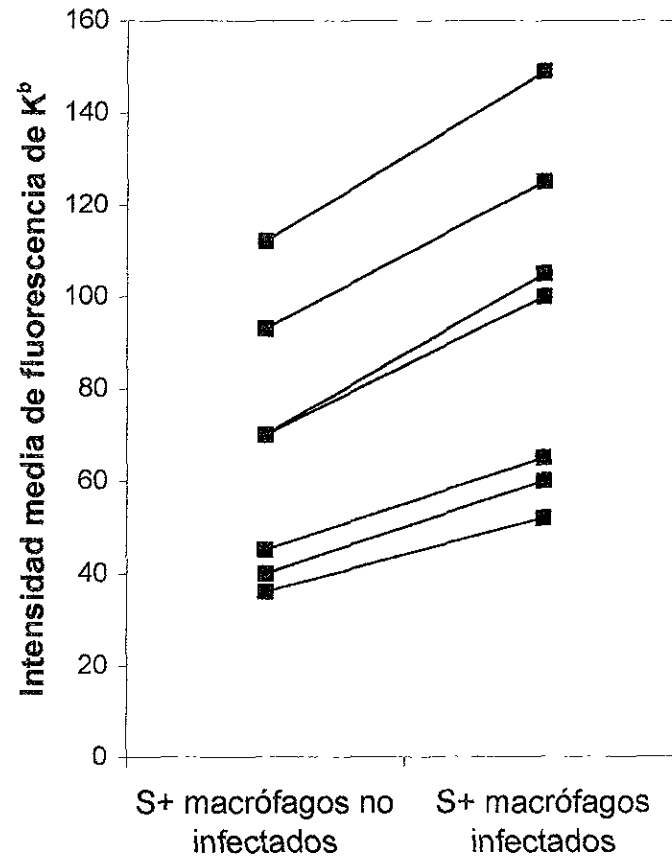
**B) Macrófagos de peritoneo de ratones BALB/c**



**Figura 8. Los macrófagos inducen aumento de moléculas MHC clase I en células RMA-S.**

**A)** Macrófagos IC21 se cultivaron en medio sin antibiótico y 20 U/ml de IFN- $\gamma$  durante 48 horas a 37 °C. Posteriormente se infectaron con *S. typhimurium* 14028. Se añadieron a los cultivos de macrófagos células RMA-S y después se cultivaron 18 horas a 37°C. Se realizó inmunofluorescencia indirecta de moléculas CD11b y MHC clase I en las células RMA-S provenientes de los co-cultivos **1**. RMA-S no co-cultivada + anti CD11b; **2** RMA-S no co-cultivada + Y3. **3**.RMA-S co-cultivada con macrófago no infectados y **4** RMA-S co-cultivada con macrófagos no infectados **B** El mismo experimento del inciso A, se realizó con macrófagos de exudado peritoneal de ratones BALB/c.





**Figura 9. Incrementos en la expresión de moléculas  $K^b$  de células RMA-S co-cultivadas con macrófagos infectados con *S. typhimurim*.** Expresión de  $K^b$  en la superficie de células RMA-S proveniente del co-cultivo con macrófagos (S+ macrófagos no infectados) y RMA-S provenientes del co-cultivo con macrófagos infectados con *S. typhimurim* (S+ macrófagos infectados) de siete experimentos. ( $P = 0.012$  de acuerdo a la prueba Wilcoxon para muestras pareadas).

3. ¿La generación de estos péptidos ocurre en un compartimiento vesicular como los lisosomas? ó ¿endosomas tardíos al igual que el material endocitado que es degradado por la vía exógena para la presentación de antígeno por moléculas clase II?

4. ¿Los péptidos secretados estabilizan a las moléculas clase I para la activación de linfocitos CD8+ citotóxicos?

5. ¿Ocurre lo mismo con otros antígenos?

#### **6.1.4. Los péptidos que se unen a las moléculas MHC clase I de las células RMA-S provienen de la *Salmonella* fagocitada por los macrófagos.**

Para responder a la primera pregunta, se realizaron experimentos de co-cultivo, pero en esta ocasión la infección se llevó a cabo con *S. typhimurium* cultivada en presencia de aminoácidos radioactivos. Se utilizaron los aminoácidos que frecuentemente se presentan en los péptidos que se unen a moléculas K<sup>b</sup> y que sirven de anclaje a las hendiduras de los dominios  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  (<sup>3</sup>H-Alanina, <sup>3</sup>H-Leucina, <sup>3</sup>H-Valina y <sup>3</sup>H-Fenilalanina). Después de 18 horas de co-cultivo (RMA-S- con macrófagos IC21 infectados), se colectaron las células RMA-S y los macrófagos por separado y se llevo a cabo una inmunoprecipitación de las moléculas K<sup>b</sup> con el anticuerpo Y3 de ambas muestras celulares. Posteriormente se eluyeron los péptidos de la inmunoprecipitación con ácido acético al 10% y se midió la radioactividad proveniente de cada muestra. En dos experimentos independientes se observó que parte del material eluido de las moléculas K<sup>b</sup> de las RMA-S y de los macrófagos proviene de la bacteria marcada radioactivamente (Tabla 3). Lo cual nos indicó que parte del material que detectamos en las células RMA-S con péptido secretado corresponde a la *Salmonella* fagocitada por los macrófagos

**Tabla 3. Los péptidos que se asocian a las moléculas K<sup>b</sup> provienen de la *Salmonella* fagocitada por los macrófagos.**

<b>Muestra</b>	<b>Exp 1 (cpm)</b>	<b>Exp 2 (cpm)</b>
Sobrenadante de la infección de macrófagos con <i>S. typhimurium</i> no marcada.	48	50
Sobrenadante de la infección de macrófagos con <i>S. typhimurium</i> marcada con tritio.	8664	10870
<i>Salmonella typhimurium</i> marcada con tritio.	2469767	3548205
Inmunoprecipitación del lisado de células RMA-S con anticuerpo W632.	44	40
Inmunoprecipitación del lisado de células RMA-S con Y3.	326 <sup>#</sup>	300 <sup>#</sup>
Inmunoprecipitación del lisado de macrófagos IC21 con W632.	102	120
Inmunoprecipitación del lisado de macrófagos IC21 con Y3.	274 <sup>#</sup>	1000 <sup>#</sup>

**Exp:** experimento

**cpm:** cuentas por minuto

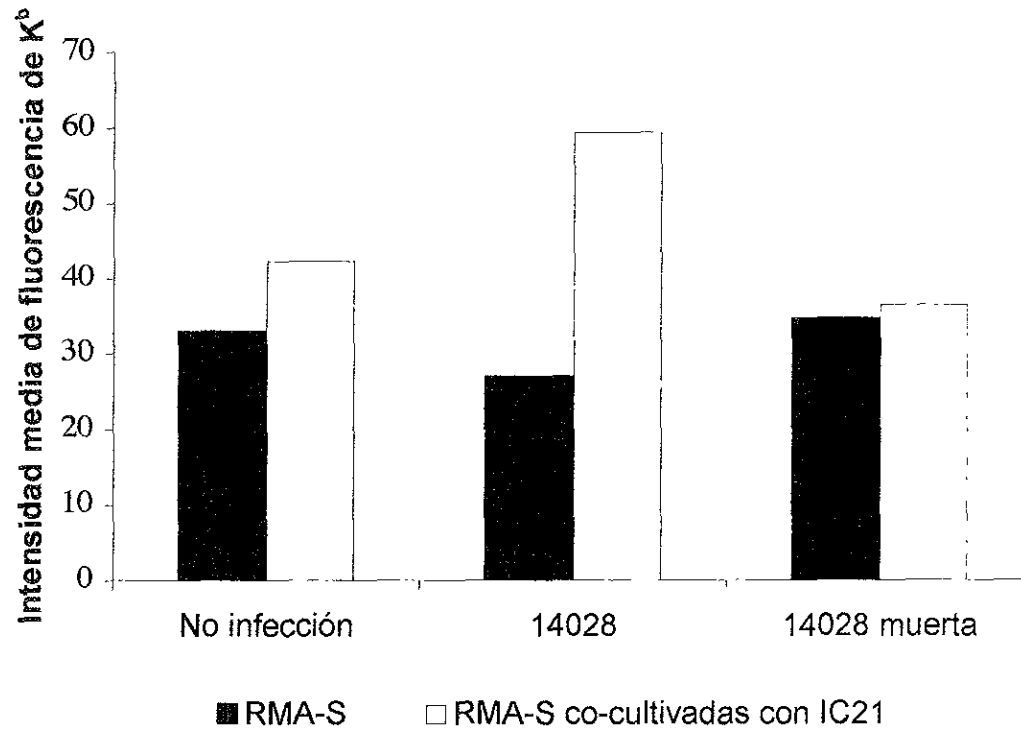
**W632:** anticuerpo monoclonal anti HLA-A2.

**Y3:** anticuerpo monoclonal anti K<sup>b</sup>

**#** Radioactividad de péptidos derivados de *Salmonella* asociados a moléculas MHC clase I K<sup>b</sup>.

Existía la posibilidad de que *Salmonella* extracelular (no eliminada por los macrófagos o por la gentamicina del medio de cultivo) invadiera las células RMA-S provocando un incremento en la expresión de moléculas clase I. Para verificar que la infección no participaba como fuente de péptidos, se realizaron infecciones de células RMA-S con las diferentes cepas de *Salmonella* y posteriormente se cuantificó su expresión de moléculas K<sup>b</sup>. A la par se revelaron co-cultivos con infecciones equivalentes en el mismo experimento. *Salmonella* viva o muerta por calor no incrementó la expresión de K<sup>b</sup> en células RMA-S infectadas con dichas bacterias. (Figura 10) El incremento de moléculas K<sup>b</sup> se presentó sólo cuando las células RMA-S se co-cultivaron con macrófagos infectados (Figura 10).

Para determinar la influencia de la activación del IFN- $\gamma$  y la influencia de la infección por *Salmonella* en el proceso de secreción de péptidos que se pueden unir a moléculas MHC clase I; se realizaron co-cultivos de células RMA-S con macrófagos activados y no activados y con macrófagos infectados y no infectados. Los macrófagos no activados y no infectados no provocaron el aumento en la expresión de las moléculas Kb en las células RMA-S. Los macrófagos infectados con *Salmonella* pero no activados mostraron aumento discreto en la expresión de las moléculas Kb en las células RMA-S y un aumento evidente en la expresión de MHC clase I se presentó cuando las células RMA-S se co-cultivaron con los macrófagos activados e infectados con *Salmonella*. Lo cual sugiere que la sola infección con *Salmonella* no es suficiente para inducir la secreción de péptidos por los macrófagos y que el IFN- $\gamma$  es el estímulo que provoca la secreción de péptidos (Tabla 4).



**Figura No.10 . *S. typhimurium* no incrementa la expresión de moléculas K<sup>b</sup> de las células RMA-S.**  $3 \times 10^5$  células RMA-S se infectaron con *S.typhimurim* 14028 (relación 1:10) y 14028 muerta por calor (relación 1:300). A su vez se realizaron experimentos de co-cultivos de células RMA-S no infectadas con macrófagos IC21 infectados con bacteria viva y muerta y no infectados. Posteriormente se evaluó la expresión de moléculas K<sup>b</sup> en células RMA-S de cada uno de los experimentos.

**Tabla 4. La activación con IFN- $\gamma$  es necesaria para que los macrófagos secreten péptidos del material fagocitado.**

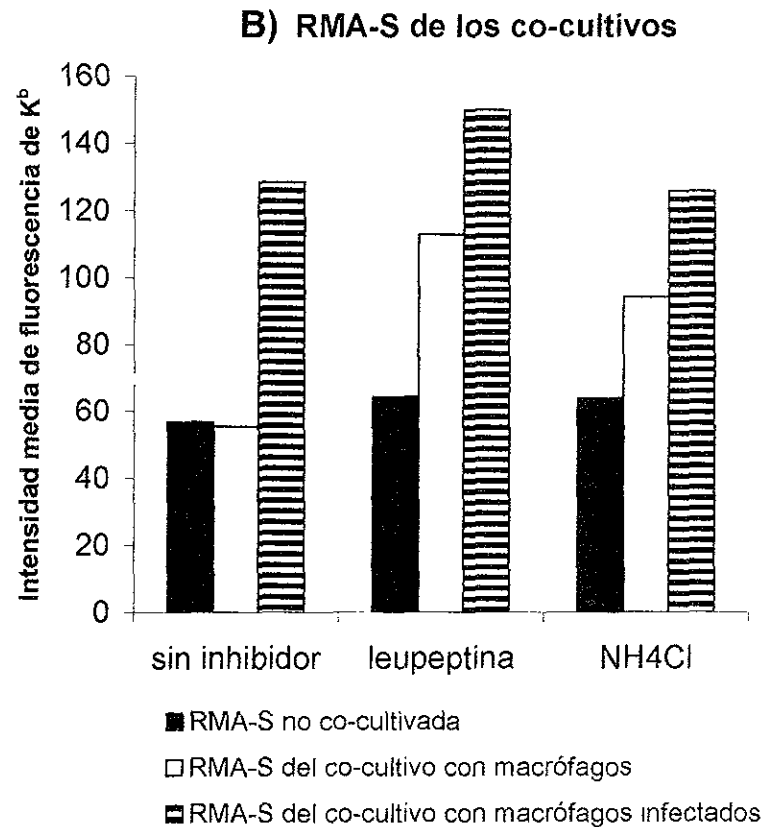
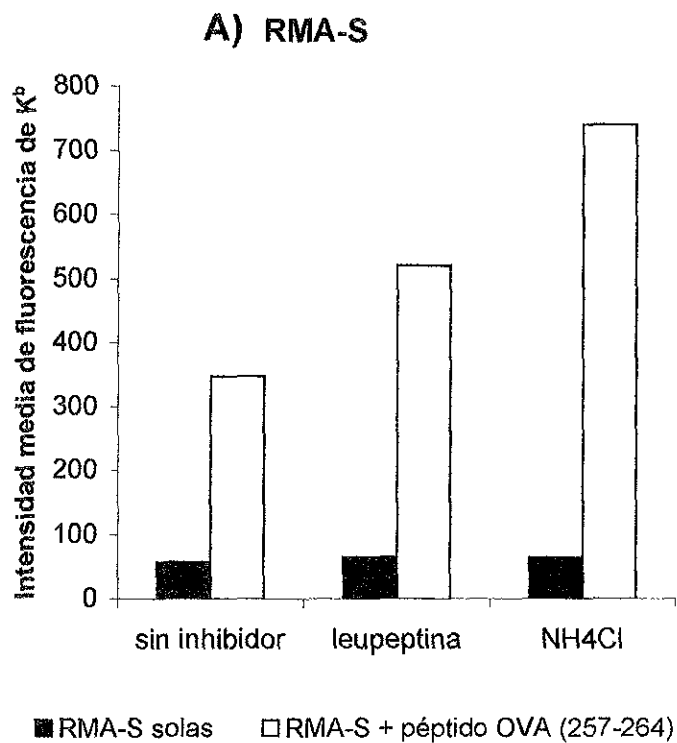
Células RMA-S	Macrófagos IC21	IFN- $\gamma$	<i>Salmonella</i>	M1 <sup>#a</sup>	Y3 <sup>#b</sup>	Y3-M1 <sup>#c</sup>
+	-	-	-	6.8	35.8	29
+	+	-	-	10.3	24.5	14.2
+	+	-	+	10.7	48.9	38.2
+	+	+	-	8.8	61.2	52.4
+	+	+	+	12.4	71.3	58.9

# Los valores son intensidad media de fluorescencia.

a. Fluorescencia detectada con el anticuerpo anti CD11b.

b. Expresión de moléculas clase I K<sup>b</sup> detectada con el anticuerpo Y3

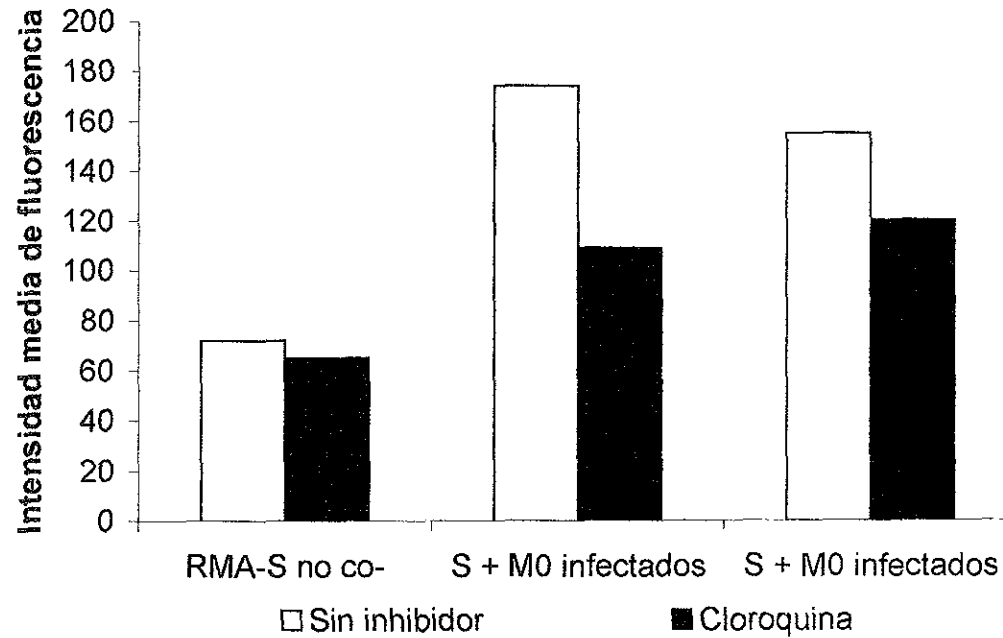
c. Diferencia entre el valor de la intensidad de fluorescencia de moléculas K<sup>b</sup> menos la autofluorescencia de RMA-S.



**Figura 11. Efecto de inhibidores de actividad lisosomal sobre la expresión de moléculas MHC clase I K<sup>b</sup> en células RMA-S y sobre la generación de péptidos clase I secretados por macrófagos. En A) se muestra la expresión de K<sup>b</sup> de RMA-S no co-cultivada con macrófagos y RMA-S cultivadas con 10 nanomoles del péptido OVA (257-264). En B) se muestra la expresión de K<sup>b</sup> de RMA-S no co-cultivada y de RMA-S proveniente de los co-cultivos con macrófagos y con macrófagos infectados con *S. typhimurium*.**

En ausencia de inhibidores la IMF de moléculas  $K^b$  en las células RMA-S provenientes del co-cultivo con macrófagos infectados es dos veces mayor que la IMF de las células RMA-S provenientes de macrófagos no infectados. Mientras que con leupeptina y cloruro de amonio esta proporción es solamente de 1.3 veces; lo cual nos sugiere que el cloruro de amonio y la leupeptina inhiben parcialmente la secreción de péptidos (Figura 11). Resultados similares se observaron con macrófagos IC21 tratados con cloroquina (Figura 12) e infectados con *S. typhimurium* LT2 o con la mutante *PhoP*- (incapaz de multiplicarse en macrófagos debido a que no transcribe los genes de resistencia *pag* que le permiten adaptarse a las condiciones ácidas del ambiente lisosomal). La inhibición es equivalente con las cepas *PhoP*- y LT2, lo cual nos indica que la generación de algunos péptidos ocurren en un ambiente ácido y es independiente de la multiplicación de la bacteria en los lisosomas. Para corroborar el efecto de cloroquina, se realizó un experimento de inmunoprecipitación de moléculas  $K^b$  de células RMA-S co-cultivadas con macrófagos tratados con cloroquina después de la infección con *S. typhimurium* LT2 marcada radioactivamente y durante el co-cultivo. La cloroquina inhibió el 80% de la secreción de péptidos en macrófagos infectados con *Salmonella typhimurium* (Tabla 5).





**Figura 12. Efecto de cloroquina sobre la secreción de péptidos clase I por macrófagos infectados con *Salmonella*.** Macrófagos IC21 (M0) activados con IFN- $\gamma$  durante 48 h se cultivaron en medio RP10 con 50  $\mu$ M de cloroquina durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente se realizó la infección *S.typhimurium* LT2 y *PhoP*-. Finalmente se adicionaron células RMA-S (S) al cultivo de macrófagos adicionando al medio 50  $\mu$ M de cloroquina. Se realizó inmunofluorescencia indirecta de moléculas CD11b y MHC clase I en las células RMA-S provenientes de los co-cultivos después de 18 horas de cultivo en estas condiciones.

**Tabla 5. La cloroquina afecta el procesamiento de *Salmonella* dentro de los macrófagos.**

<b>Muestra<sup>✕</sup></b>	<b>W632 (cpm)</b>	<b>Y3 (cpm)</b>	<b>Y3-W632<sup>√</sup> (cpm)</b>
RMA-S + macrófagos no infectados	40	52	12
RMA-S + macrófagos infectados con <i>Salmonella</i> marcada con tritio.	110	318	208
RMA-S + macrófagos infectados con <i>Salmonella</i> marcada con tritio + cloroquina <sup>†</sup>	46	88	42

✕: Las muestras son células RMA-S después del co-cultivo con macrófagos.

†: Para este experimento se cultivaron los macrófagos con 50  $\mu$ M de cloroquina previo a la infección con *Salmonella* y durante el co-cultivo con células RMA-S.

cpm: cuentas por minuto

**W632:** Radioactividad recuperada de la inmunoprecipitación con el anticuerpo anti HLA-A2.

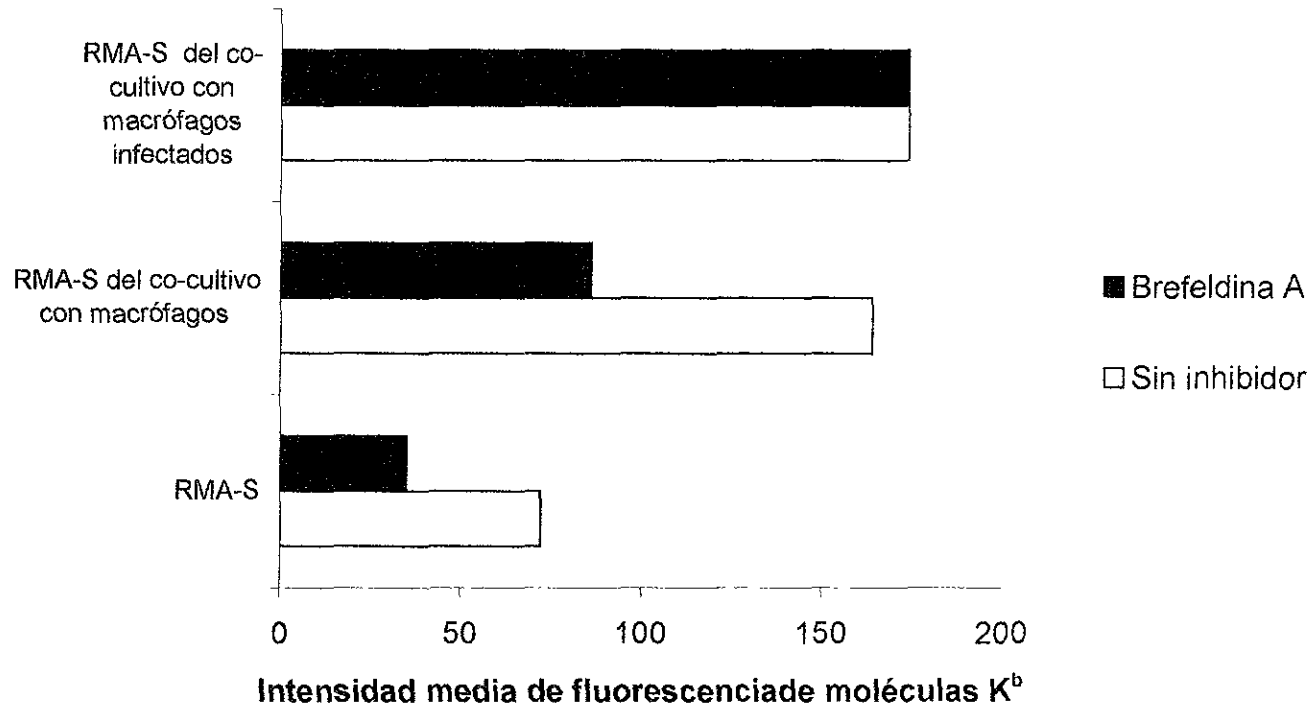
**Y3:** Radiactividad recuperada de la inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-H-2 K<sup>b</sup>

√: Diferencia entre la radioactividad recuperada de péptidos de *Salmonella* unidos a moléculas K<sup>b</sup> y péptidos unidos a HLA-A2 de la misma muestra.

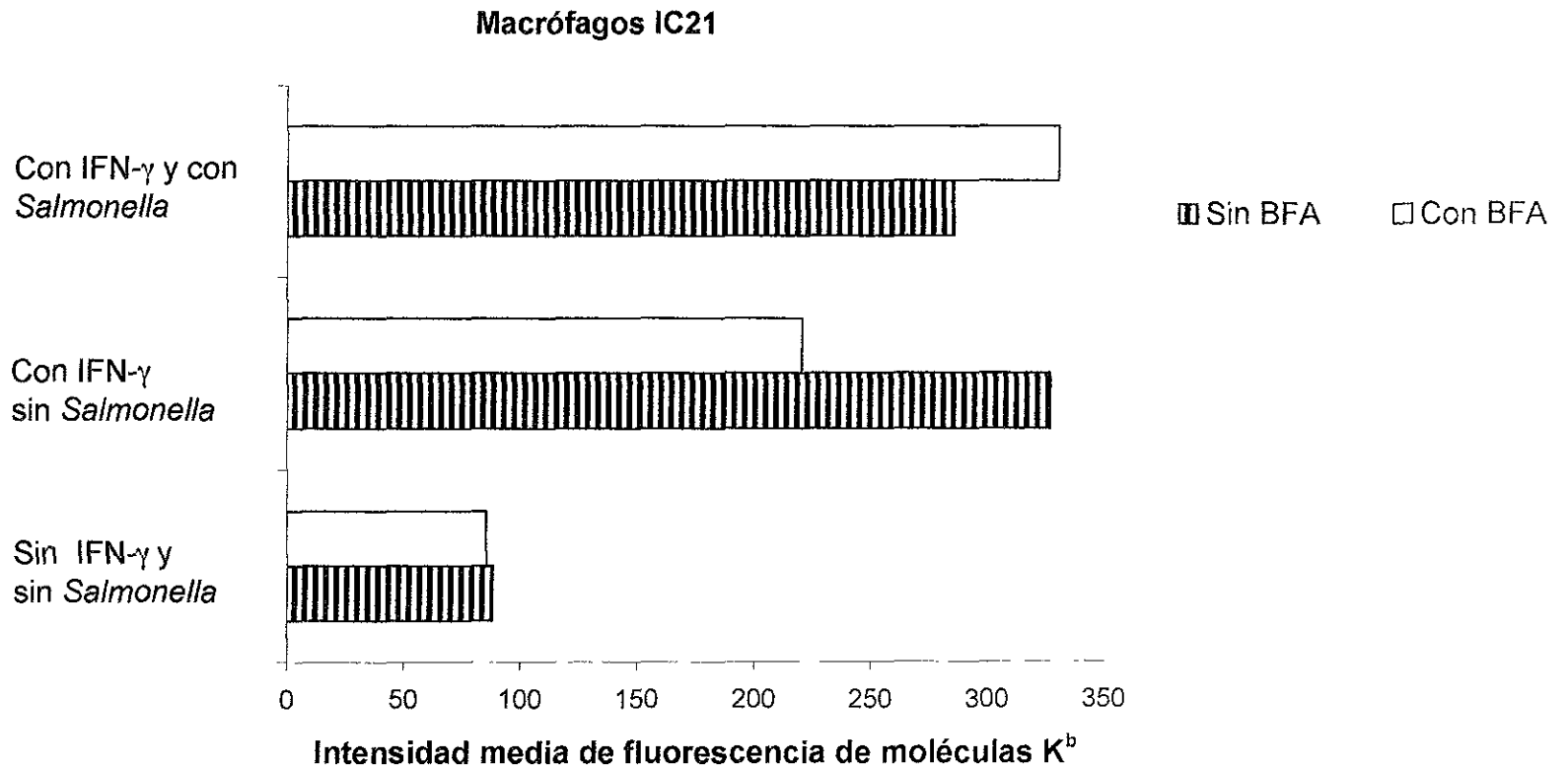
### 6.1.6. La inhibición del transporte de vesículas provenientes del aparato de Golgi con Brefeldina A no afecta el proceso de secreción de péptidos.

Brefeldina A (BFA) bloquea la exportación de vesículas provenientes del aparato de Golgi y no afecta vesículas de reciclaje. Se realizaron experimentos de co-cultivo en presencia de BFA con la finalidad de determinar si los péptidos se generan por el camino clásico de presentación de antígeno de la vía clase I.

Los macrófagos infectados con *Salmonella* y tratados con BFA mostraron el patrón de secreción de péptidos al igual que los macrófagos no tratados con BFA (Figura 13). Por otro lado en macrófagos no infectados la secreción se bloquea en un 50% (Figura 13). Para corroborar que la BFA estaba funcionando adecuadamente se analizó también la expresión de moléculas MHC clase I K<sup>b</sup> de los macrófagos presentes en los co-cultivos. Se esperaba que en los macrófagos la expresión de MHC clase I disminuyera por el tratamiento con BFA. Los macrófagos no infectados tratados con BFA efectivamente disminuyen su expresión de moléculas K<sup>b</sup> con el tratamiento de BFA, sin embargo los macrófagos infectados y tratados con BFA expresan moléculas K<sup>b</sup> de igual manera que los no tratados con BFA (Figura 14). Esto nos sugiere que parte de los péptidos secretados se unen a moléculas vacías en la superficie de los macrófagos o que en estos macrófagos la presencia de *Salmonella* y el tratamiento con BFA provoca que aumente la exocitosis y observemos mayor número de moléculas K<sup>b</sup> preformadas provenientes de vesículas exocíticas.



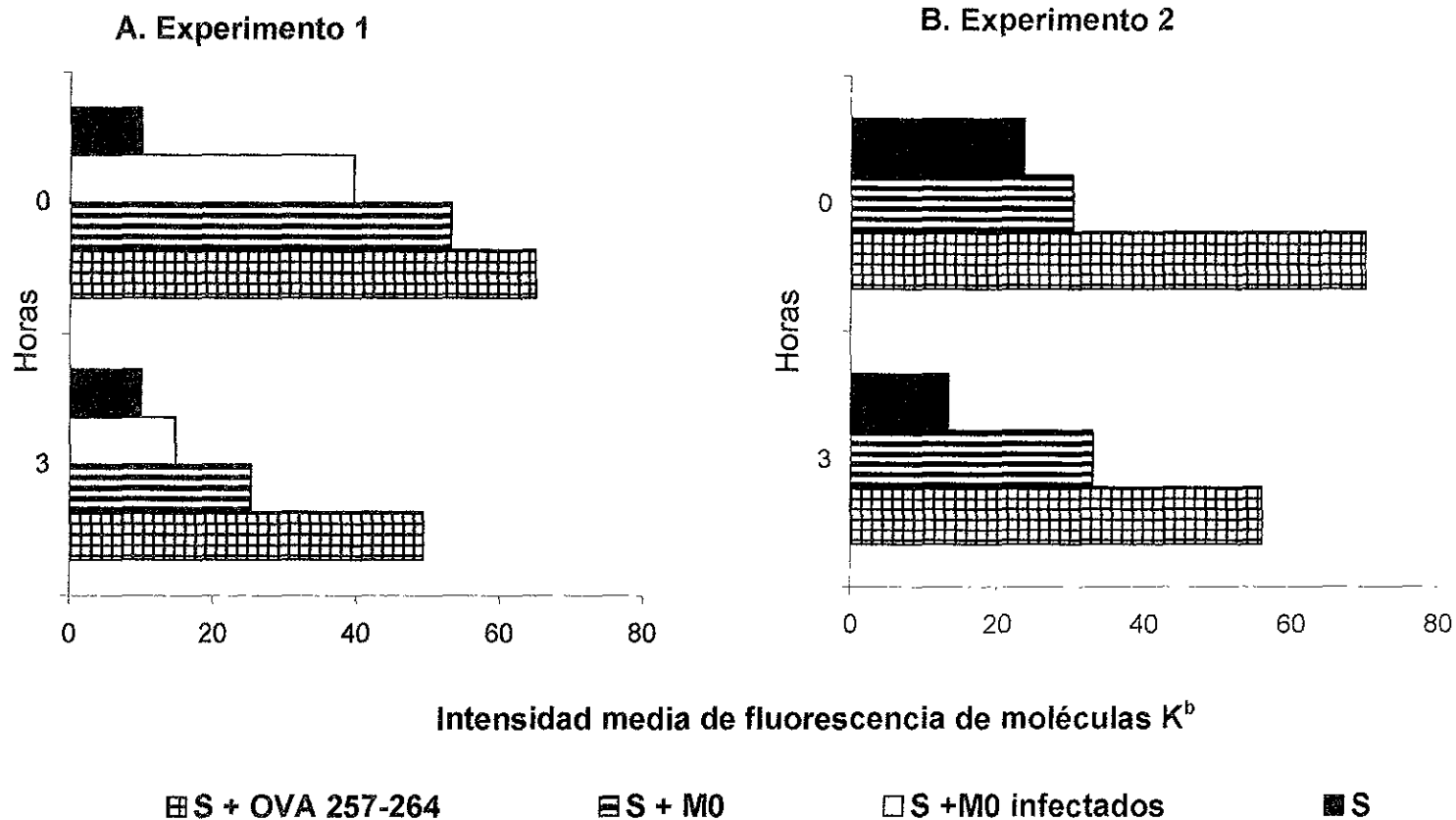
**Figura13. Efecto de Brefeldina A en la secreción de péptidos por macrófagos infectados con *S.typhimurium*.** Macrófagos IC21 se cultivaron en medio sin antibiótico y 20U/ml de IFN- $\gamma$  durante 48 horas a 37 °C y posteriormente se infectaron con *S. typhimurium* 14028 (relación 10 bacterias por macrófago). Se añadieron entonces células RMA-S en presencia (barras negras) o ausencia (barras blancas) de 1 mg/ml de Brefeldina A. Después se cultivaron 18 h a 37°C. Se realizó inmunofluorescencia indirecta de moléculas CD11b y de moléculas MHC clase I en las células RMA-S.



**Figura 14. Efecto de BFA en la secreción de péptidos por macrófagos activados.** Macrófagos IC21 activados y no activados con IFN- $\gamma$  durante 48 horas se infectaron o no con *S. typhimurium* LT2 (relación 100 bacterias por macrófago). Se añadieron a los cultivos células RMA-S en medio RP10 con 1  $\mu$ g/ml de Brefeldina A y se cultivaron 18 horas a 37°C. Posteriormente las células RMA-S se separaron y a los macrófagos IC21 se les realizó inmunofluorescencia indirecta de moléculas CD11b y moléculas MHC clase I.

### 6.1.7. Los péptidos secretados estabilizan moléculas clase I al igual que los péptidos óptimos.

Para confirmar que los péptidos secretados por los macrófagos permanecen unidos a las moléculas MHC clase I vacías al igual que los péptidos que poseen residuos de anclaje a las moléculas  $K^b$ , se realizaron experimentos de estabilidad. Después de los co-cultivos, las células RMA-S separaron de los macrófagos, se lavaron con PBS para eliminar el medio del co-cultivo y se incubaron por tres horas a  $37^{\circ}\text{C}$ . Durante este tiempo de incubación se esperó que los péptidos asociados débilmente a las moléculas MHC clase I vacías se separaran. Posteriormente se realizó la inmunofluorescencia de moléculas clase I y CD11b (Figura 15) sobre las células RMA-S. La referencia para estos experimentos fue la unión del péptido óptimo OVA<sup>257-264</sup> a células RMA-S. Encontramos que las células RMA-S cultivadas con el péptido OVA<sup>257-264</sup> mostraron una disminución de 20% en la IMF de  $K^b$  después de las tres horas de incubación. La IMF de moléculas  $K^b$  de células RMA-S provenientes del co-cultivo con macrófagos disminuyeron un 70% después de las tres horas de incubación y el valor absoluto de IMF fue idéntico al de la expresión de  $K^b$  en las células RMA-S sin péptido. Por su parte las células RMA-S provenientes del co-cultivo con macrófagos infectados con *Salmonella*, mostraron una disminución de IMF de moléculas  $K^b$  de 48% y de 8%, en dos experimentos independientes, pero el valor absoluto de IMF de  $K^b$  fue al menos dos veces mayor que la expresión de  $K^b$  de las RMA-S sin péptido. Por lo tanto los macrófagos activados e infectados con *Salmonella* secretan péptidos que estabilizan moléculas clase I después de tres horas de incubación. Esto nos sugiere que los péptidos secretados probablemente posean los residuos óptimos para anclarse a moléculas vacías MHC clase I  $K^b$ . Los macrófagos no infectados pero activados con IFN- $\gamma$  también secretan péptidos provenientes de las proteínas del medio de cultivo pero estos péptidos se unen transitoriamente a las moléculas  $K^b$ .

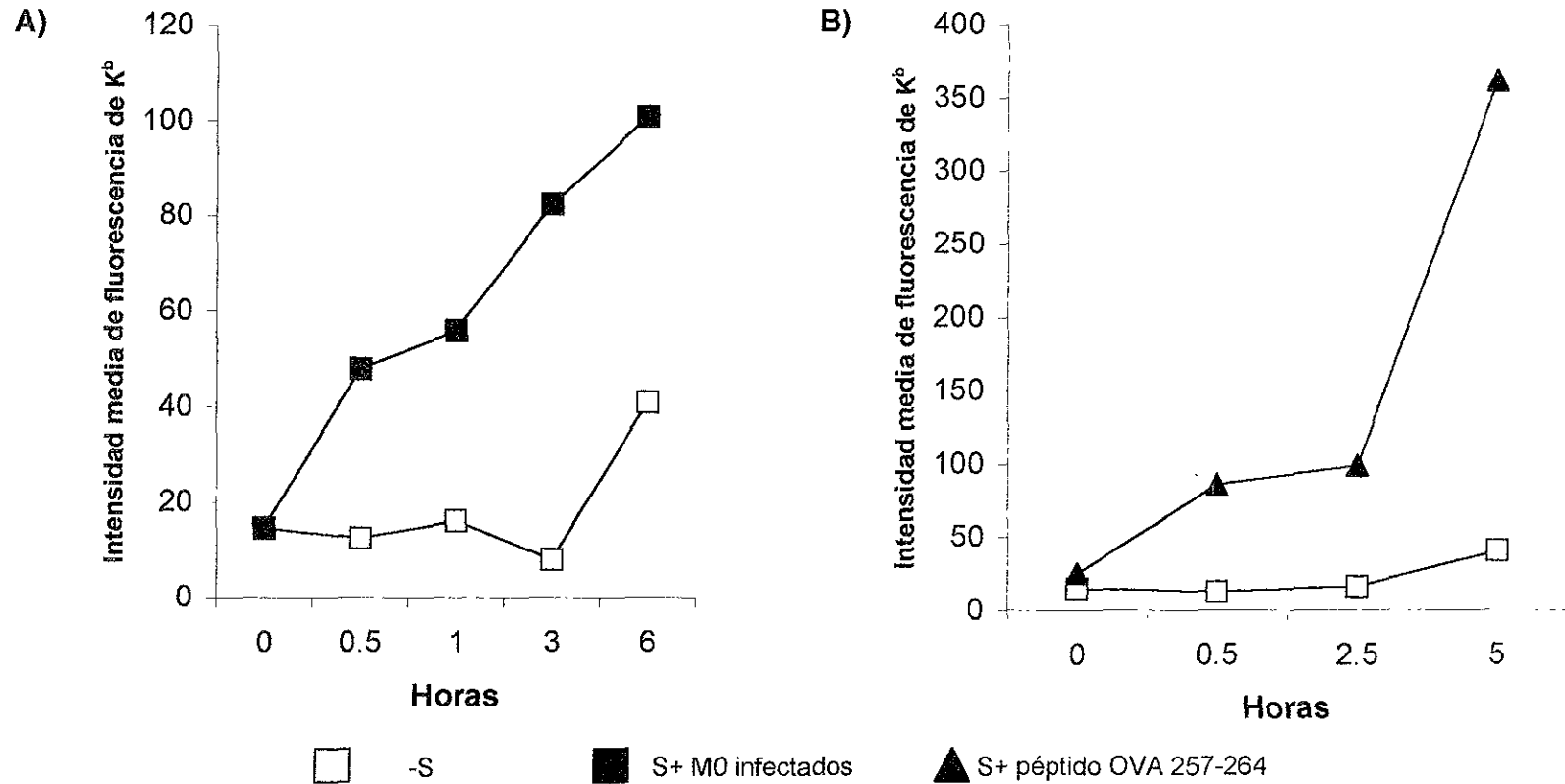


**Figura 15. Los péptidos secretados estabilizan moléculas clase I.** Macrófagos IC21 activados con IFN- $\gamma$  no infectados (M0) e infectados con *S. typhimurium* LT2 (M0 infectados) se co-cultivaron con células RMA-S (S) por 18 h a 37°C. También células RMA-S no co-cultivadas con macrófagos se cultivaron con 10 nanomoles de péptido OVA (257-264). Posteriormente se separaron las células RMA-S del cultivo con macrófagos o con péptido y se lavaron tres veces con PBS. Estas células se volvieron a cultivar a 37 °C por tres horas y se les realizó inmunofluorescencia indirecta de moléculas CD11b y MHC clase I.

### 6.1.8. Cinética de unión de péptidos secretados por los macrófagos a moléculas MHC clase I vacías de células RMA-S.

Todos los experimentos hasta ahora mostrados se realizaron a las 18 horas de co-cultivo de células RMA-S con macrófagos IC21. Durante este tiempo es probable que los macrófagos secretaran TNF- $\alpha$  o alguna otra citocina que pudiera inducir la expresión de moléculas MHC clase I en las células RMA-S (IFN- $\gamma$ , IL12 o IL-18). Para determinar el tiempo de unión de los péptidos secretados a las moléculas vacías de las RMA-S, se colectaron RMA-S a diferentes tiempos e inmediatamente se les realizó inmunofluorescencia indirecta de moléculas MHC clase I. A los treinta minutos de cultivo con 10 nM del péptido OVA<sup>257-264</sup>, las células RMA-S mostraron una IMF de moléculas K<sup>b</sup> de 86 y a las dos horas y media la IMF de estas células incrementó a 98. Un segundo incremento de IMF se observó en estas células RMA-S a las cinco horas de cultivo (IMF=361). Las células RMA-S sin péptido no presentaron cambio significativo en la IMF de K<sup>b</sup> en las primeras dos y media horas pero se observó un ligero aumento a las cinco horas (Figura 16 B). Estos resultados nos sugieren que en las primeras dos horas de cultivo con péptido se saturaron las moléculas MHC clase I vacías de la superficie de las células RMA-S. Probablemente a las cinco horas de cultivo con péptido, en las RMA-S existen nuevas moléculas clase I vacías provenientes de la biosíntesis de proteínas. Este hecho podría explicar que se haya observado un segundo incremento de IMF de moléculas K<sup>b</sup>. Por su parte células RMA-S co-cultivadas con macrófagos infectados mostraron un aumento de tres veces la IMF basal de RMA-S (no cocultivada con macrófagos) a los 30 minutos de co-cultivo. A las seis horas de co-cultivo, las células RMA-S mostraron un máximo de IMF de 100. Por lo tanto los macrófagos activados con IFN- $\gamma$  e infectados secretan péptidos permanentemente, los cuales se unen a las moléculas vacías de las células RMA-S en menos de 30 minutos.





**Figura 16. Cinética de unión de péptidos secretados por los macrófagos a moléculas MHC clase I vacías.** **A)** Macrófagos IC21 activados con IFN- $\gamma$  se infectaron con *S. typhimurium* 14028 y se co-cultivaron con células RMA-S (**S+ M0 infectados-cuadros negros**). Posteriormente en los tiempos indicados se colectaron muestras de células RMA-S para realizar inmunofluorescencia indirecta de moléculas MHC clase I. **B)** Células RMA-S (**S cuadros blancos**) y células RMA-S cultivadas con 10 nanomoles del péptido OVA<sup>257-264</sup> (**triángulos negros**) se cultivaron en medio RP10 y en los tiempos indicados se colectaron muestras de células RMA-S para la inmunofluorescencia indirecta.

### **6.1.9. La secreción de péptidos que pueden unirse a MHC clase I se observó solamente en macrófagos.**

Se realizó el experimento de co-cultivo con líneas de linfocitos B A-20 y fibroblastos L929 para verificar si estos tipos celulares, al activarse con IFN- $\gamma$ , realizaban secreción de péptidos que se unan a MHC clase I (Tabla 6). En el mismo experimento de co-cultivo se analizaron macrófagos de peritoneo de ratones BALB/c y la línea de macrófagos J774.

Las células RMA-S del co-cultivo con fibroblastos L929, infectados y no infectados, no presentaron aumento en la IMF de moléculas MHC clase I K<sup>b</sup> (Inciso A, Tabla 6). A diferencia de las células RMA-S provenientes del co-cultivo con macrófagos de peritoneo de ratones BALB/c y con macrófagos J774 no infectados e infectados, que presentaron aumentos de IMF de K<sup>b</sup> (dos y tres veces el valor basal de RMA-S no cultivada con Y3). De igual manera cuando las células RMA-S se co-cultivaron con linfocitos A-20 no presentaron aumento en la IMF de moléculas K<sup>b</sup> (Inciso B, Tabla 6). Estos resultados nos sugieren que la secreción de péptidos es una vía alternativa de presentación de antígenos exógenos para moléculas MHC clase I propia de macrófagos.

**Tabla 6. Linfocitos B y fibroblastos no secretan péptidos capaces de unirse a moléculas MHC clase I.**

A)

Co-cultivos de RMA-S	M1 (IMF)	Y3 (IMF)	Y3-M1 <sup>¥</sup> (IMF)
No co-cultivadas	2.28	18.04	15.76
+ fibroblastos L-929	3.4	13.02	9.62
+ fibroblastos L-929 + <i>Salmonella</i>	3.05	14.4	11.09
+ macrófagos de peritoneo <sup>#</sup>	4.15	33.19	29.04
+ macrófagos de peritoneo <sup>#</sup> + <i>Salmonella</i>	3.89	45.35	41.46
+ macrófagos J774	2.95	48.2	45.25
+ macrófagos J774+ <i>Salmonella</i>	2.67	66.31	63.64

B)

Co-cultivos de RMA-S	M1 (IMF)	Y3 (IMF)	Y3-M1 <sup>¥</sup> (IMF)
No co-cultivadas	7.98	30.59	22.61
+ linfocitos A20	9.41	29.08	19.67
+ linfocitos A20 + <i>Salmonella</i>	4.13	28.94	24.81

**IMF:** Intensidad media de fluorescencia

**M1:** anti-CD11b

**Y3:** anti K<sup>b</sup>

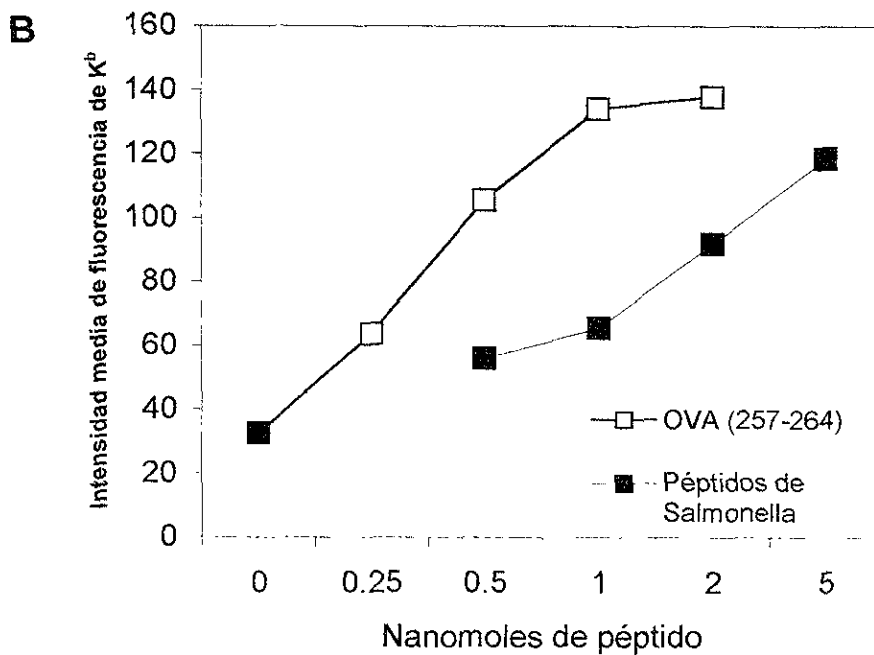
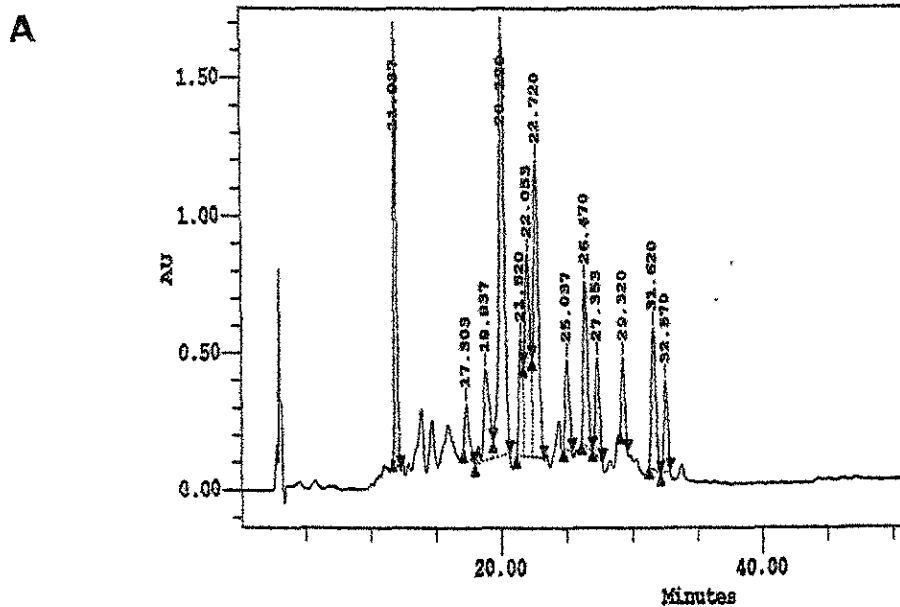
**#:** macrófagos de peritoneo de ratones BALB/c

**¥:** Diferencia entre el valor de la intensidad de fluorescencia de moléculas K<sup>b</sup> menos la autofluorescencia de RMA-S.

#### 6.1.10. Los péptidos secretados son reconocidos por linfocitos T citotóxicos.

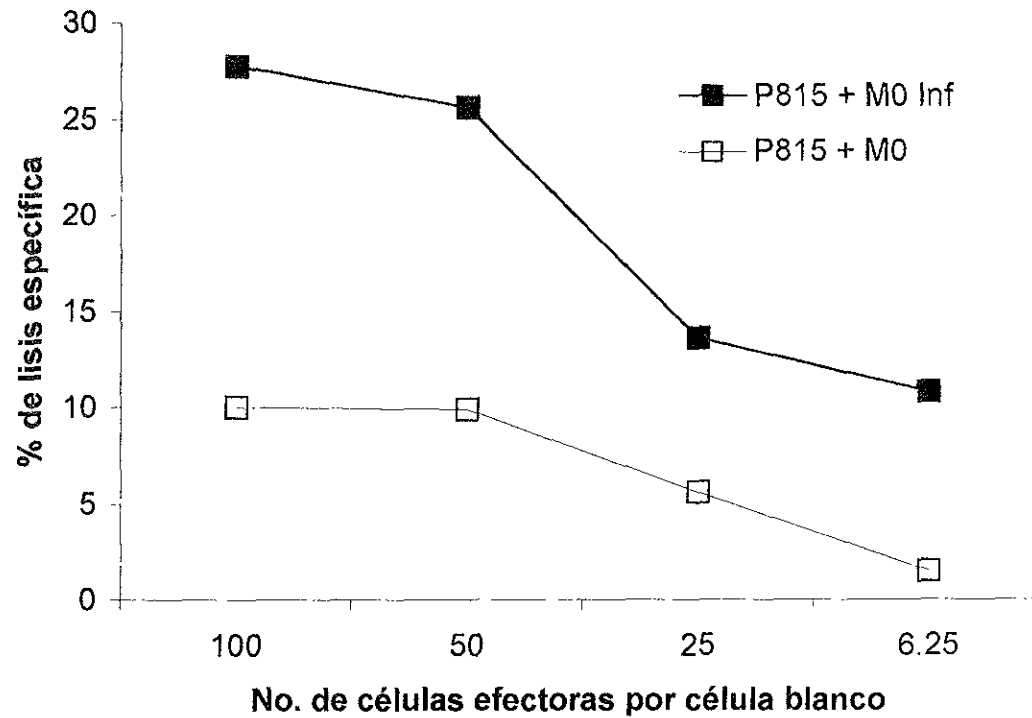
En varios modelos experimentales donde el antígeno no está presente de manera natural en el citosol de las células presentadoras, se ha propuesto la presentación cruzada como vía alterna de activación de clones de linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos. Para corroborar que los péptidos secretados provenientes de la infección con *Salmonella* son reconocidos por linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos, se analizó la reactividad de linfocitos T citotóxicos de ratones infectados con *Salmonella* contra células co-cultivadas con macrófagos infectados. En este modelo no se cuenta con epítomos específicos de *Salmonella* que sean presentados por moléculas K<sup>b</sup> y no se conoce la frecuencia ni el tipo de población de linfocitos T CD8<sup>+</sup> involucrados en la respuesta contra *Salmonella*. Para solucionar este problema se generaron péptidos de la hidrólisis de proteínas totales de *Salmonella* con tripsina, los cuales se utilizaron para activar a linfocitos de ratones infectados con *Salmonella*. La presencia de péptidos en la digestión de proteínas se verificó por análisis de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) (Figura 17A). A si mismo la presencia de péptidos que pudieran unirse a moléculas K<sup>b</sup> en esta preparación se analizó con el ensayo de unión de péptidos a células RMA-S. La IMF de moléculas K<sup>b</sup> en células RMA-S con cinco nanomoles de la mezcla de péptidos de *Salmonella* fué equivalente a la IMF que mostraron células RMA-S con 0.6 nanomoles del péptido OVA<sup>257-264</sup> (Figura 17B). Por lo tanto en esta digestión de proteínas de *Salmonella* existen una serie de péptidos óptimos que se unen moléculas K<sup>b</sup> y que podrian eventualmente reactivar linfocitos T *in vitro*.

Esplenocitos de ratones que fueron infectados con *Salmonella typhimurium* a dosis subletales, se estimularon *in vitro* con la mezcla de péptidos de *Salmonella*. Al quinto día de estimulación, se analizó la reactividad de estos linfocitos contra células co-cultivadas con macrófagos infectados y no infectados en un ensayo de citotoxicidad.



**Figura No.17.** La digestión de proteínas de *Salmonella* con tripsina contiene péptidos que se pueden unir a moléculas MHC clase I K<sup>b</sup>. A. Cromatografía de líquidos del hidrolizado de proteínas de *Salmonella*. B. Células RMA-S se cultivaron con este hidrolizado (péptidos de *Salmonella*) o con el péptido OVA<sup>257-264</sup> por 18 horas y se les analizaron moléculas MHC clase I por inmunofluorescencia.

Los linfocitos provenientes de ratones infectados con *Salmonella* lisaron a las células P815 provenientes de los co-cultivos con macrófagos infectados con *Salmonella*. Las células P815 provenientes de los co-cultivos con macrófagos no infectados no fueron reconocidas por estos linfocitos. Estos resultados nos confirman que los péptidos secretados por los macrófagos infectados provienen de *Salmonella* y pueden ser generados *in vivo* para la activación de linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos específicos (Figura 18).



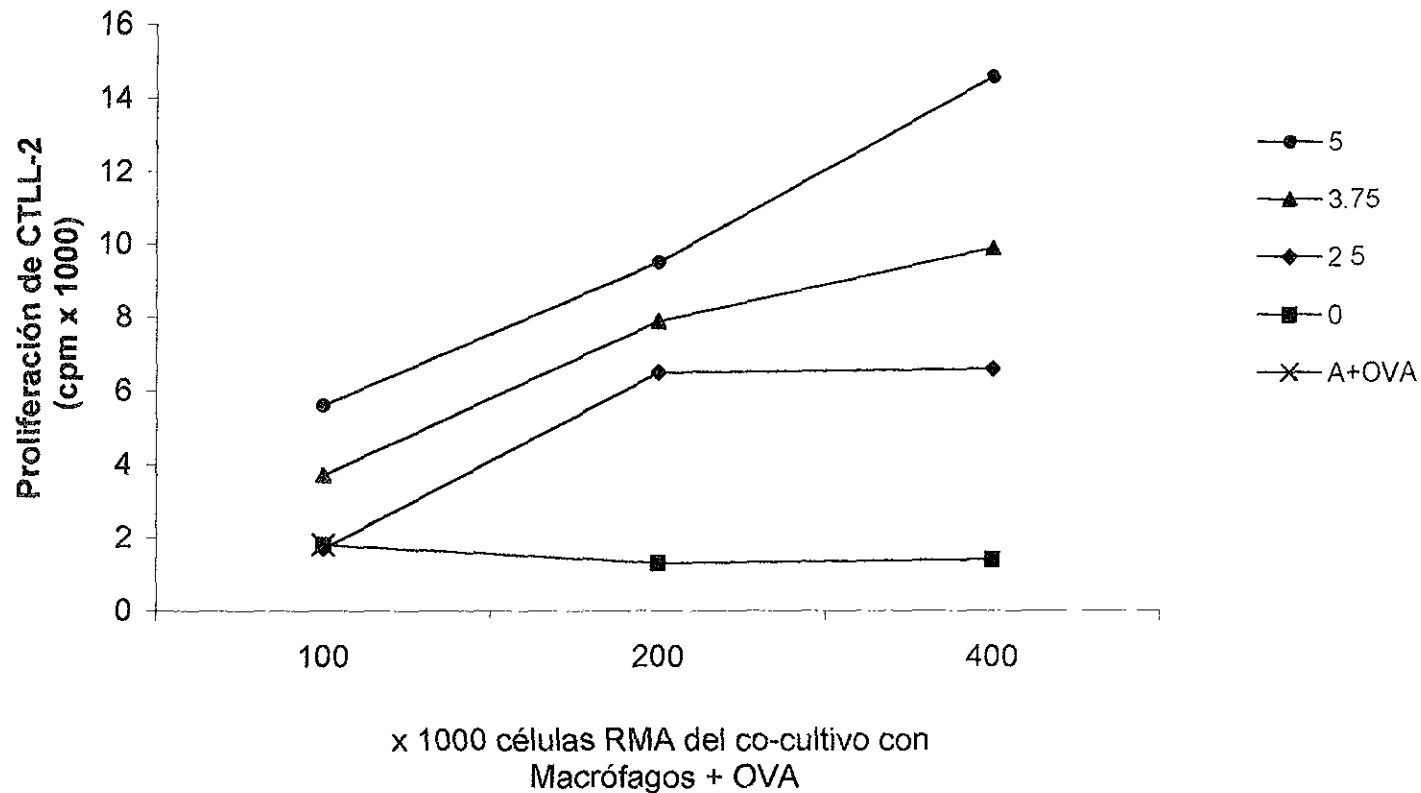
**Figura 18. Linfocitos citotóxicos de ratones infectados con *Salmonella* reconocen y lisan células portadoras de péptidos secretados.** Células P815 se co-cultivaron con macrófagos (M0) y con macrófagos infectados con *S.typhimurium* LT2 (M0 Inf). Posteriormente se marcaron con Cr<sup>51</sup> y se utilizaron como células blanco. Esplenocitos de ratones BALB/c infectados con *S.typhimurium* LT2 estimuladas *in vitro* con péptidos de *Salmonella* por cinco días se utilizaron como células efectoras en el ensayo de citotoxicidad.

#### 6.1.11. Macrófagos activados con IFN- $\gamma$ secretan péptidos de proteínas solubles.

Macrófagos activados con IFN- $\gamma$  mostraron cierta actividad de secreción de péptidos provenientes del medio de cultivo, lo cual nos motivó a realizar experimentos con ovoalbumina (OVA) y evaluar la capacidad de los macrófagos activados de generar el péptido 257-264 que se presenta en el contexto de K<sup>b</sup>. Para revelar la presencia del péptido 257-264 utilizamos el hibridoma RF3370 que reconoce este péptido y genera IL-2 post-activación. El sistema experimental utilizado fueron co-cultivos de células RMA con macrófagos de peritoneo activados y OVA de alta pureza. Después del co-cultivo las células RMA se utilizaron como células presentadoras para el hibridoma RF3370. La concentración de IL-2 producida en el sobrenadante de cultivo de 24 horas de activación se evaluó con la proliferación de células dependientes de IL-2, CTLL-2. (Figura 19). Entonces la proliferación de células CTLL-2 es equivalente a la activación del hibridoma, es decir a la presentación del péptido de OVA 257-264. La activación del hibridoma RF3370 incrementó a medida que se aumentó la concentración de OVA en el co-cultivo de RMA y macrófagos. De igual manera la activación del hibridoma incrementó con un mayor número de células RMA provenientes de los co-cultivos (Figura 19). Estos resultados indican que los macrófagos activados con IFN- $\gamma$  cultivados con OVA secretan el péptido 257-264 y este péptido se une a las moléculas MHC clase I de las células RMA.

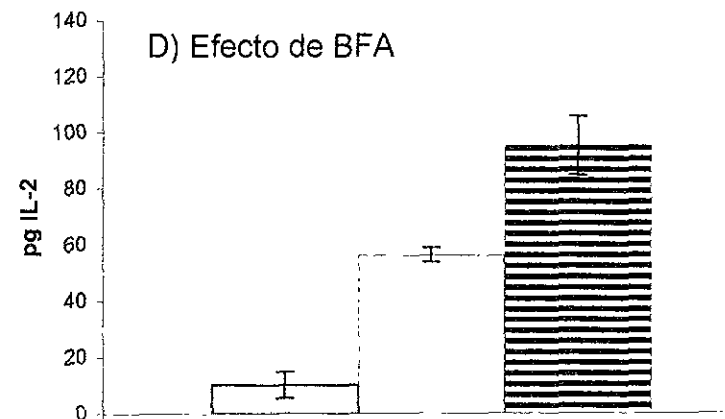
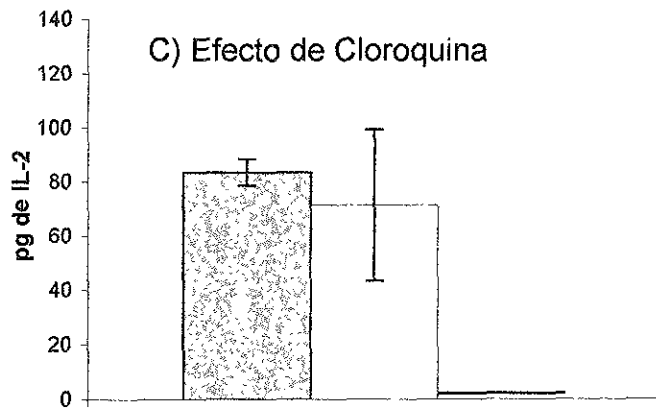
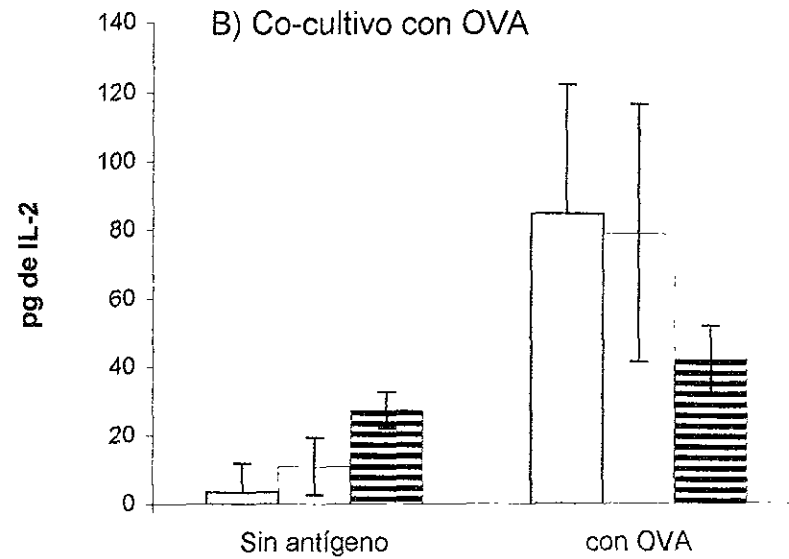
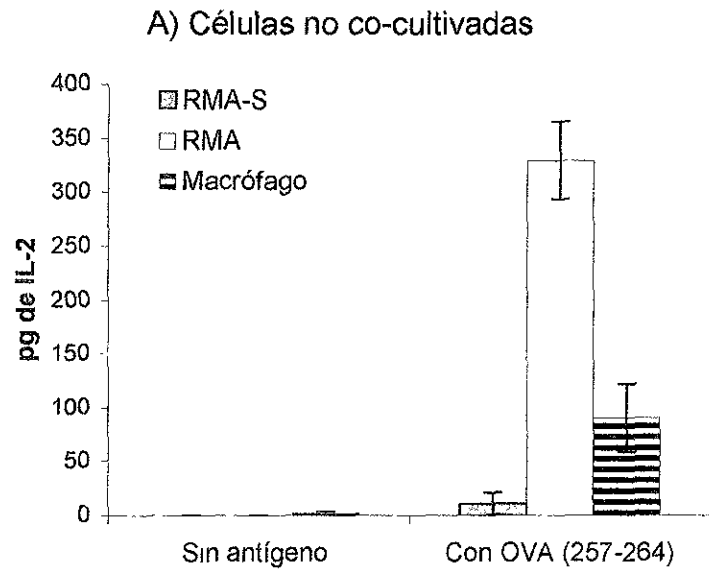
Los macrófagos activados con IFN- $\gamma$  aparentemente procesan de igual forma OVA y *Salmonella*, a pesar de que en un caso el antígeno es endocitado y en otro el antígeno es fagocitado. El procesamiento de antígenos de *Salmonella*, detectado hasta ahora como unión de péptidos a moléculas clase I, es sensible a inhibidores endosomales y resistente a BFA. Por lo tanto se realizaron experimentos de co-cultivo con OVA en presencia de cloroquina y BFA para conocer los compartimientos endosomales involucrados para el procesamiento de antígeno soluble (Figura 20).





**Figura 19. Macrófagos activados con IFN- $\gamma$  pueden generar y secretar el péptido de OVA 257-264.** Macrófagos de peritoneo de ratones Balb/c activados con IFN- $\gamma$  se co-cultivaron con células y OVA (2.5, 3.75, y 2.5 mg/ml). Después de 18 horas de cultivo las células RMA se separaron y se utilizaron como células presentadoras de antígeno a diferentes concentraciones (100, 200 y 400 mil células) para activar  $1 \times 10^5$  células RF337. Posteriormente se colectaron los sobrenadantes a las 24 horas de cultivo. Células CTLL-2 se cultivaron con  $50 \mu\text{l}$  de estos sobrenadantes y a las 17 horas de cultivo se adicionó timidina marcada con tritio. La incorporación de timidina de las células CTLL-2 se determinó a las 30 horas de cultivo. X sobrenadante de RMA (A) no co-cultivada con macrófagos y 5 mg/ml de OVA. cpm: cuentas por minuto.

Las células RMA no co-cultivadas presentan mejor el péptido OVA<sup>257-264</sup> al hibridoma RF3370 que las células RMA-S o que los macrófagos. Se ha descrito que las células RMA poseen mayor número de moléculas vacías que las células RMA-S y esta propiedad les permite ser mejores células presentadoras de péptidos (Figura 20 A) (104). Cuando las células provienen del co-cultivo con OVA completa se observa que las células RMA y RMA-S presentan el péptido OVA<sup>257-264</sup> con la misma eficiencia y son mejores que los macrófagos para presentar el mismo péptido (Figura 20 B). El mismo experimento pero en presencia de cloroquina no se observa una inhibición de la presentación del péptido OVA<sup>257-264</sup> por las células RMA o RMA-S pero desaparece la activación debida a la presentación por macrófagos (Figura 20 C). Estos resultados sugieren que el procesamiento de OVA para la secreción del péptido 257-264 no involucran proteasas activas a pH ácidos. Finalmente cuando se realizaron los co-cultivos en presencia de BFA, las células RMA no presentaron el péptido, las RMA-S presentaron el péptido de igual manera que sin inhibidores y los macrófagos fueron muy eficientes en la presentación de OVA<sup>257-264</sup> (Figura 20 D). Por lo tanto los macrófagos endocitan OVA y secretan el péptido OVA<sup>257-264</sup> utilizando una vía de exocitosis insensible a BFA. Las células RMA requieren de exportar moléculas MHC clase I vacías del RE a la superficie para poder presentar los péptidos secretados al hibridoma RF3370. Sin embargo las células RMA-S y los macrófagos, poseen moléculas MHC clase I vacías que les permiten presentar los péptidos secretados sin requerir de nuevas moléculas vacías provenientes del RE.



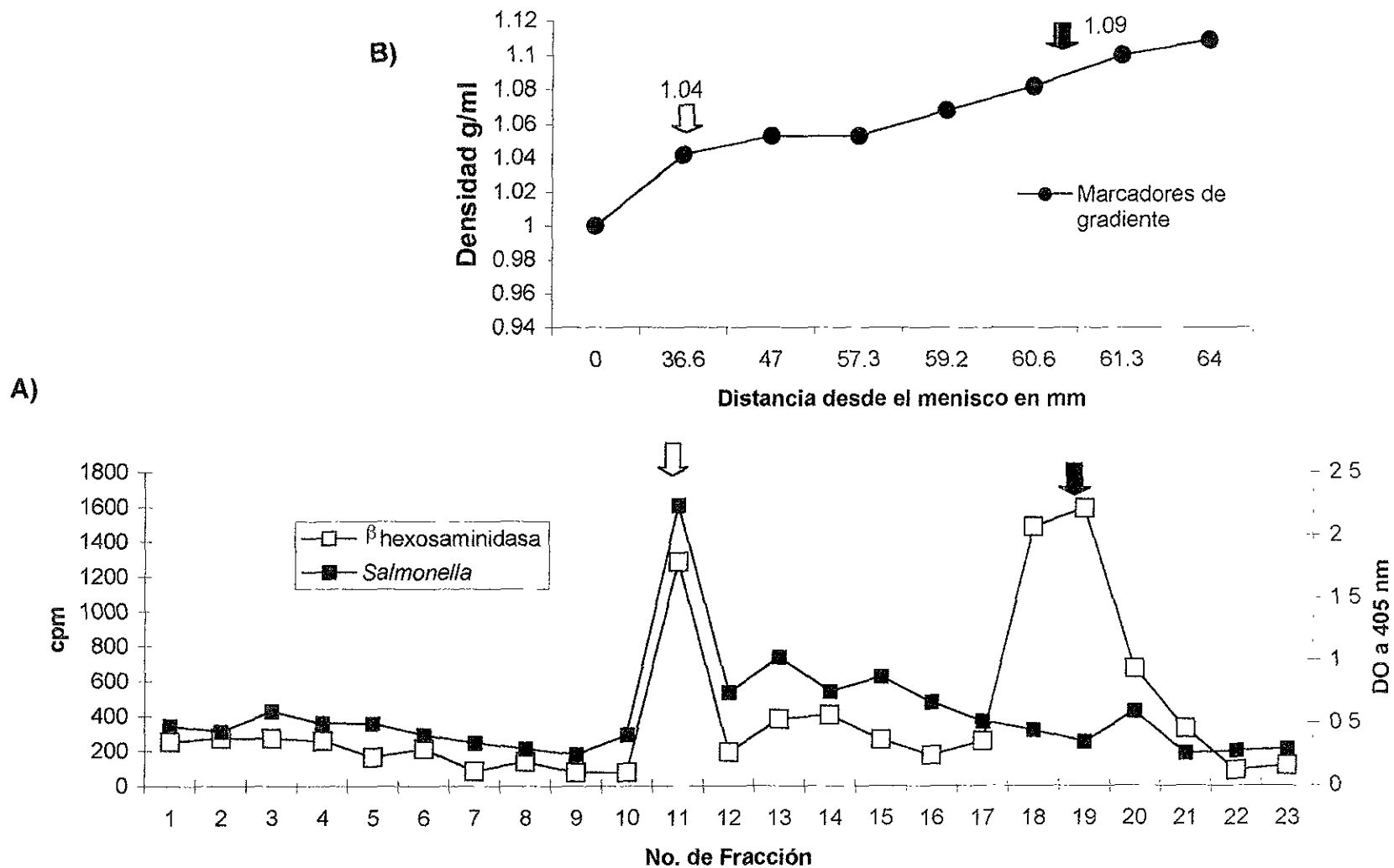
**Figura 20. Generación del péptido OVA 257-264.** **A)** Células RMA, células RMA-S y macrófagos IC21 activados con IFN- $\gamma$  se cultivaron con el péptido OVA 257-264 y se utilizaron como células presentadoras para el hibridoma RF3370. **B)** Macrófagos IC21 activados con IFN- $\gamma$  se co-cultivaron con células RMA o células RMA-S y 5 mg/ml de ovoalbúmina (OVA) durante 18 h posteriormente se separaron las células RMA, RMA-S y macrófagos y se utilizaron como células presentadoras para el hibridoma RF3370. **C)** Los co-cultivos se realizaron igual que en B pero con 50  $\mu$ M de cloroquina. **D)** Los co-cultivos se realizaron igual que en B pero con 1  $\mu$ g/ml de BFA. Los valores en las gráficas representan la concentración de IL-2 de los sobrenadantes de cultivos de RF3370 determinados por ELISA

## **6.2. Caracterización del compartimiento intracelular donde ocurre la degradación de *Salmonella* para la secreción de péptidos.**

### **6.2.1 Aislamiento de vesículas endocíticas de macrófagos infectados con *Salmonella typhimurium*.**

Con la finalidad de caracterizar el compartimiento que hospeda a *Salmonella* dentro del macrófago se infectaron macrófagos IC21 con *Salmonella* marcada radioactivamente con  $^3\text{H}$ -Alanina,  $^3\text{H}$ -Leucina,  $^3\text{H}$ -Valina y  $^3\text{H}$ -Fenilalanina. Después de cultivarlos por una hora se lisaron en condiciones iso-osomóticas con un homogenizador Dounce. El lisado se aplicó sobre un gradiente de densidad lineal compuesto de Percoll® al 27% (Pharmacia). Posteriormente se evaluó actividad de  $\beta$ -hexosaminidasa y marca radioactiva en cada una de las fracciones provenientes del gradiente. La densidad de las fracciones se calculó comparando la migración de marcadores de densidad en el gradiente de Percoll al 27% centrifugados a la par del fraccionamiento del lisado de macrófagos (Figura No. 21 Ay B). En la separación del lisado de macrófagos infectados con *Salmonella*, se encuentran rastros de bacteria en dos fracciones principales, una localizada en el fondo del gradiente con una densidad de 1.09 g/ml y otra fracción en medio del gradiente cuya densidad es 1.04 g/ml. La actividad enzimática de  $\beta$ -hexosaminidasa se encuentra principalmente en la fracción de 1.04 g/ml y va disminuyendo en las fracciones de mayor densidad.  $\beta$ -hexosaminidasa es una enzima localizada principalmente en lisosomas y endosomas tardíos, por esta razón los resultados nos indicaron que la fracción de 1.04 g/ml corresponde a un lisosoma y que la fracción de 1.09 g/ml corresponde a otro organelo donde *Salmonella* o fragmentos de esta bacteria se encuentran después de una hora de infección.

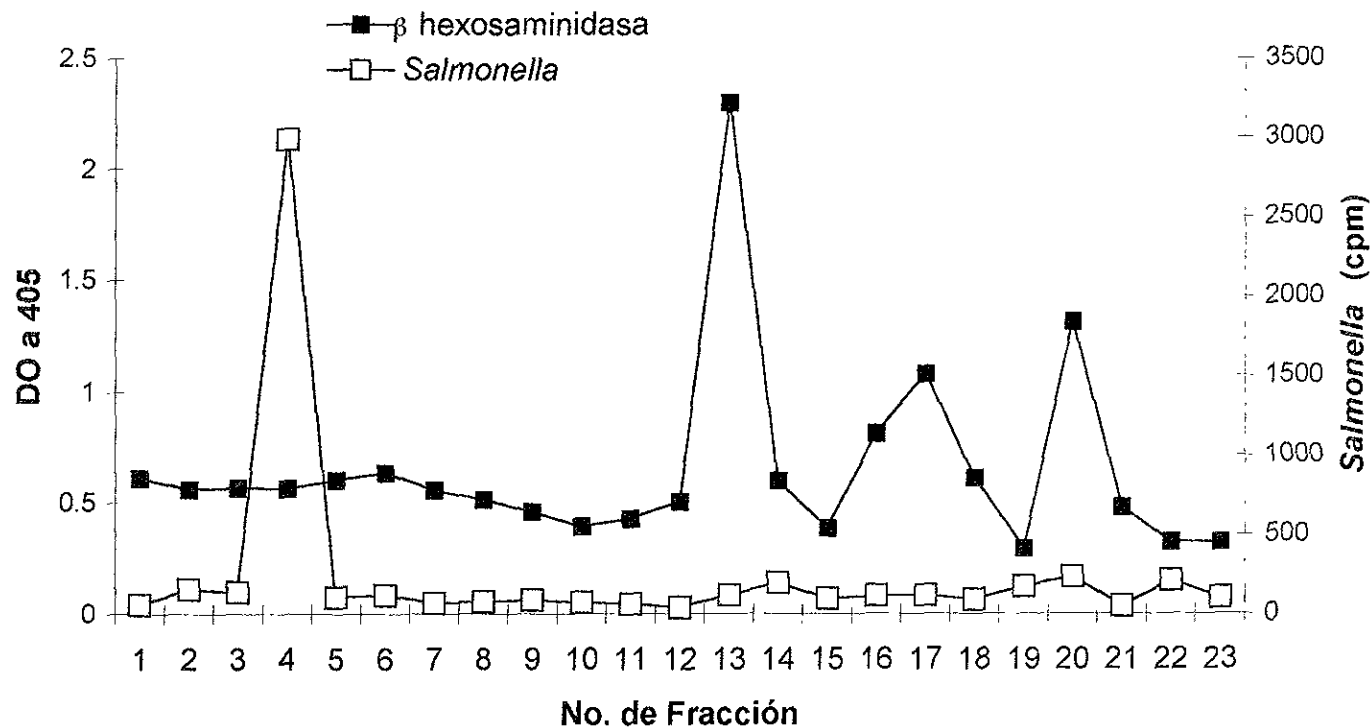
Se realizó un fraccionamiento de la mezcla del lisado de macrófagos no infectados y bacteria marcada para localizar en que fracción del gradiente migra



**Figura No. 21. Rastros de *Salmonella* se localizan en dos compartimientos de diferentes densidades.**

**A)** Macrófagos IC21 activados con IFN- $\gamma$  se infectaron con *S. typhimurium* 14028 marcada con aminoácidos radiactivos. Después de la infección y una hora de cultivo a 37°C, los macrófagos se lisaron en medio iso-osmótico. El lisado de macrófagos se fraccionó en un gradiente de Percoll al 27% y a cada fracción del gradiente se le determinó actividad de  $\beta$ -hexosaminidasa y radioactividad (*Salmonella*). **B)** Para conocer la densidad de cada fracción, se realizó la separación de marcadores de densidad en el mismo gradiente de Percoll al 27% y se midió la migración en milímetros desde el menisco hasta cada marcador y cada fracción. Las flechas indican las densidades de las principales fracciones. **cpm:** cuentas por minuto

*Salmonella* no internalizada por los macrófagos (Figura 22). La bacteria no fagocitada posee una densidad menor de 1.0 g/ml y se localiza en fracciones cercanas al menisco del gradiente. Por lo tanto la bacteria que detectamos en los gradientes con macrófagos infectados no corresponde a bacteria libre en el lisado. Sin embargo, no teníamos pruebas contundentes de que las fracciones obtenidas de la separación del lisado de macrófagos realmente fuesen vesículas. Entonces se decidió analizar por microscopía electrónica muestras de la fracción de 1.04 g/ml y de la fracción de 1.09 g/ml, así como de macrófagos infectados con *Salmonella* (Figuras 23, 24, 25 y 26). En la microscopía electrónica de la fracción de 1.04 g/ml se observó a *Salmonella* dentro un organelo circular, es decir una vesícula. Estas vesículas contenían una o dos bacterias en cada una de ellas (Figura 23). Por su parte la microscopía de la fracción de mayor densidad (1.09 g/ml) no mostró organelos, tal vez se fraccionó la membrana o este organelo no resiste la fijación. Sin embargo en esta fracción se observan fragmentos de *Salmonella* y bacteria muerta. Los macrófagos infectados con *Salmonella* mostraron vesículas similares a las aisladas en el fraccionamiento, es decir vesículas pequeñas que contenían una o dos bacterias en cada una (Figura 25) y vesículas gigantes que contenían varias bacterias y fragmentos de bacterias (Figura 26).



**Figura 22. *Salmonella* no fagocitada se localiza en densidades diferentes a los compartimientos endosomales que poseen  $\beta$ -hexosaminidasa.** Macrófagos IC21 activados con IFN- $\gamma$  se lisaron en medio iso-osmótico. El lisado de macrófagos se mezcló con *S. typhimurium* marcada con aminoácidos radioactivos y se fraccionó en un gradiente de Percoll al 27%. A cada fracción del gradiente se le determinó actividad de  $\beta$ -hexosaminidasa y radioactividad (*Salmonella*).

DO: densidad óptica. cpm: cuentas por minuto.

A)



B)

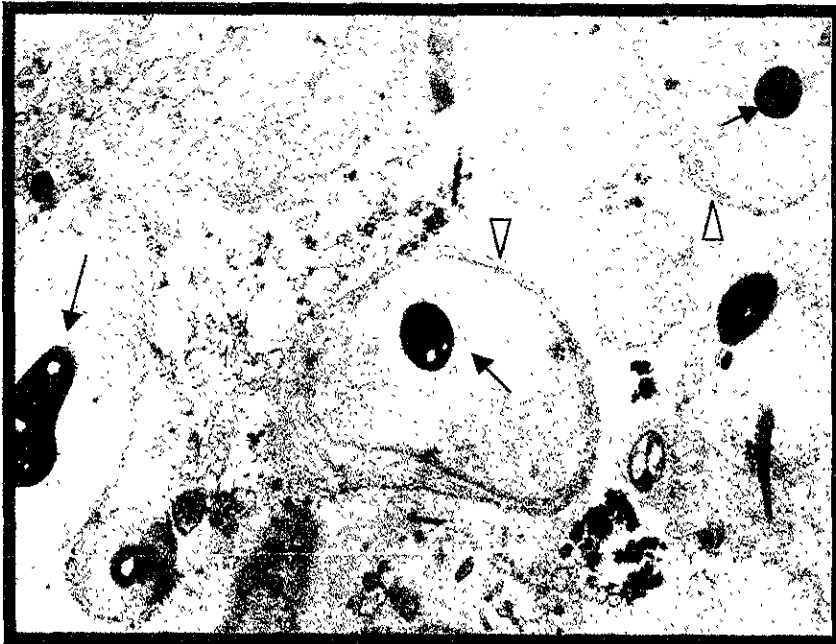
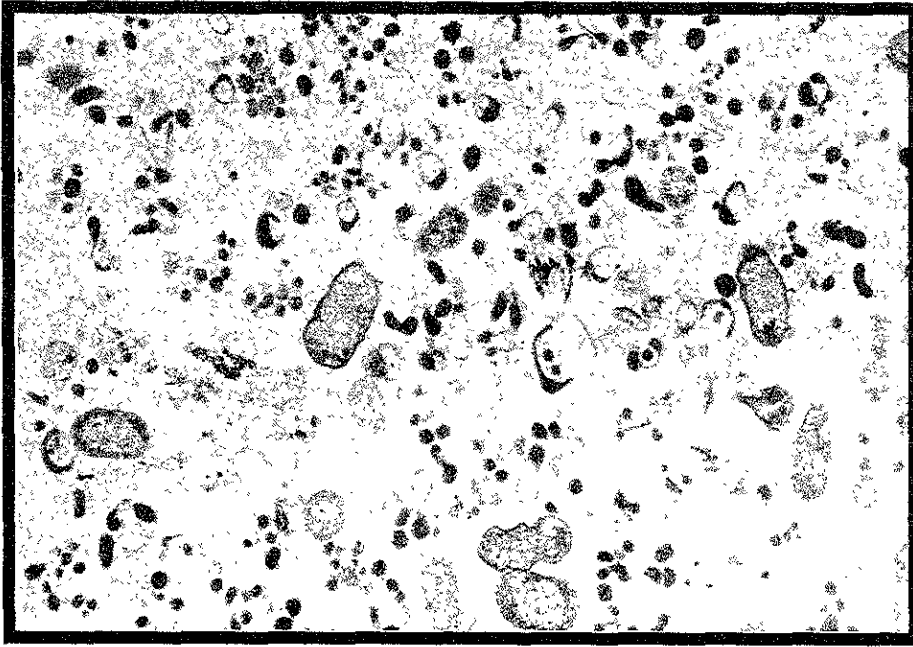


Figura 23. *Salmonella* completa se localiza en las vesículas de 1.04 mg/ml de densidad obtenidas del fraccionamiento del lisado de macrófagos en el gradiente de Percoll al 27%. A) Microscopía electrónica de la fracción de 1.4 mg/ml del lisado de macrófagos (3 $\mu$ m). B) Acercamiento de la foto anterior. Las flechas indican *Salmonella* y los triangulos las membranas de las vesículas (2 $\mu$ m).



A)



B)

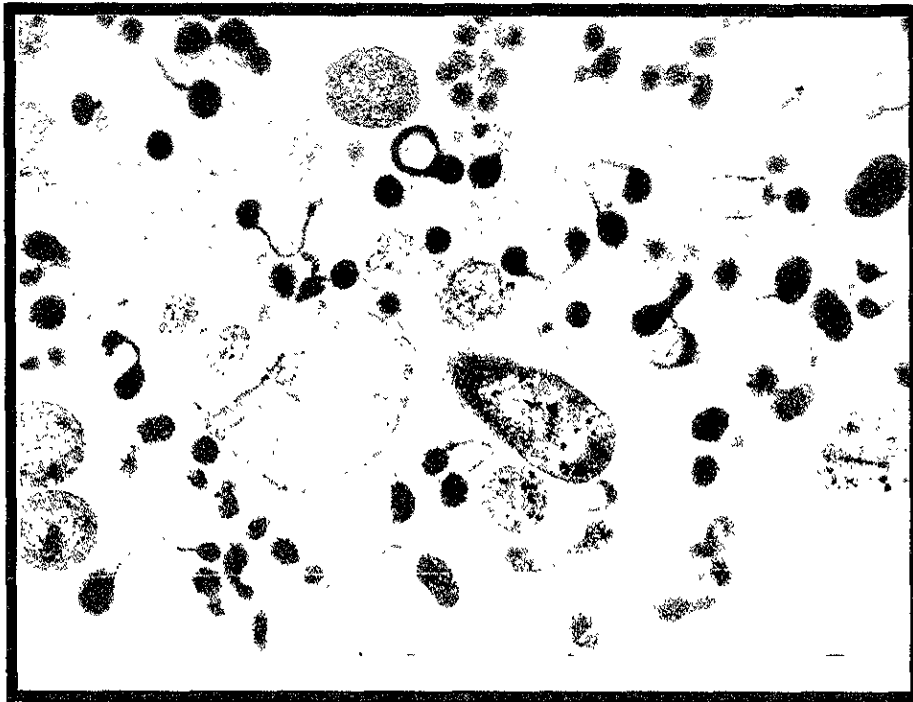
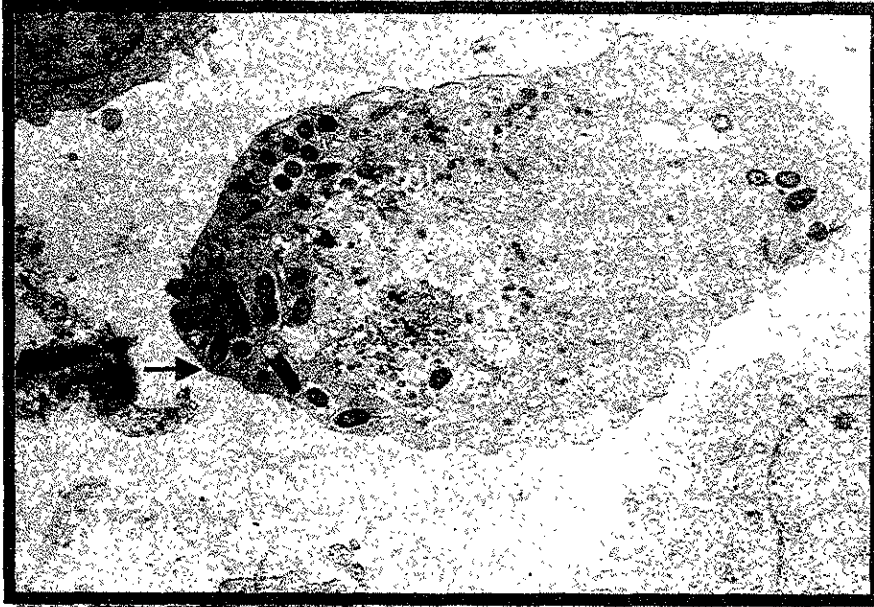
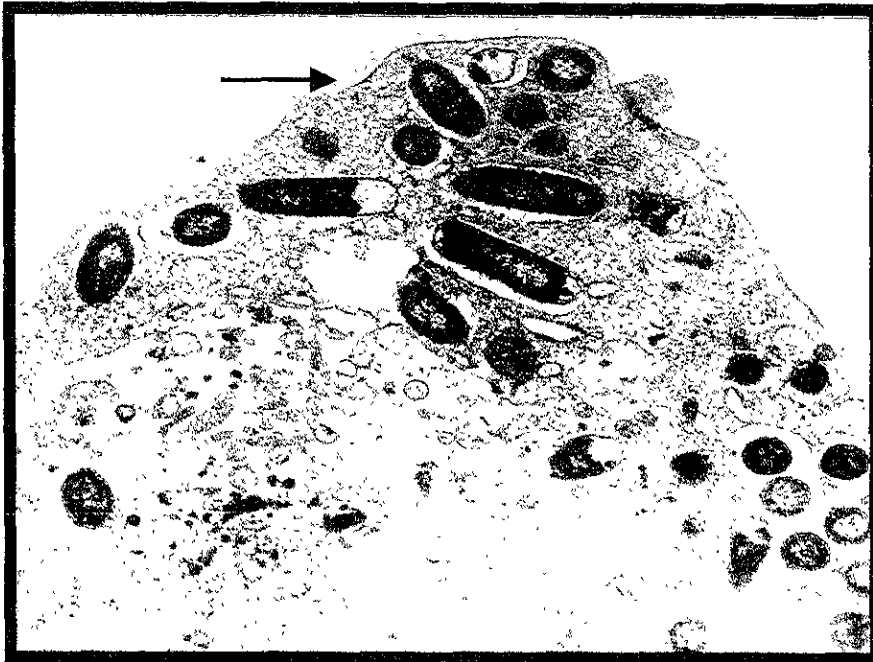


Figura 24. Fragmentos de *Salmonella* se localizan en las fracciones de 1.09 g/ml e densidad obtenidas del fraccionamiento de lisado de macrófagos en gradientes de Percoll al 27%. A) Microscopía electrónica de la fracción de 1.09 g/ml del lisado de macrófagos (2 $\mu$ m). B) Acercamiento del campo anterior (1 $\mu$ m)

A)



B)



**Figura 25.** Después de una hora de infección, *S. typhimurium* se localiza dentro de vesículas pequeñas en macrófagos activados con IFN- $\gamma$ . **A)** Microscopía electrónica de un macrófago IC21 activado con IFN- $\gamma$  e infectado con *S.typhimurium* 14028 (2 $\mu$ M). **B)** Aumento de la foto anterior (1 $\mu$ M). La flechas indican el sitio de aumento de la foto A) mostrado en B).

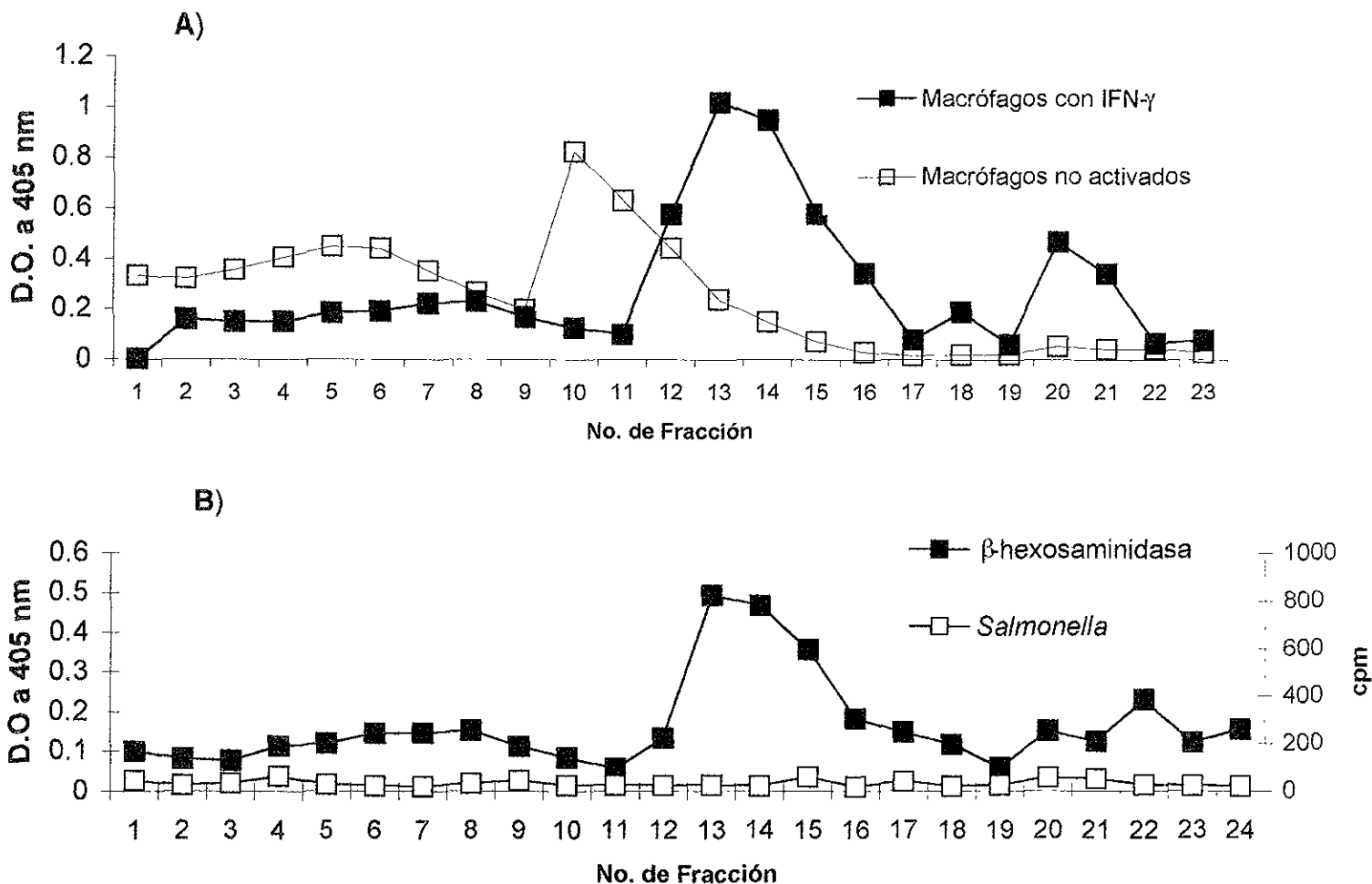


Figura 26. *Salmonella typhimurium* se localiza dentro de vesículas grandes en macrófagos IC21 tratados con IFN- $\gamma$  después de una hora de infección. Microscopía electrónica de un macrófago IC21 infectado con *S.typhimurium* 14028 (1 $\mu$ M).

### 6.2.2 Aislamiento de vesículas de macrófagos activados y no activados con IFN- $\gamma$ .

La actividad de  $\beta$ -hexosaminidasa en las fracciones de mayor densidad (1.09 g/ml) nos indicó que posiblemente en esa fracción se encuentre una vesícula proveniente de los lisosomas o de la vía endosomal o bien podría tratarse de la fusión de varios endosomas. La presencia de dicha "vesícula" en el macrófago podría deberse a la activación con IFN- $\gamma$  o a la infección por *Salmonella*, o a ambos estímulos. De manera que, se aislaron vesículas de macrófagos tratados con IFN- $\gamma$  y de macrófagos no tratados (Figura 27). La vesícula de mayor densidad (1.09 g/ml) esta ausente en los macrófagos no activados con IFN- $\gamma$ . Los macrófagos no infectados pero activados con IFN- $\gamma$  analizados por microscopía electrónica mostrarán grandes vesículas en el citosol, lo cual nos indica que estas vesículas se forman por el estímulo de IFN- $\gamma$  (Figura 28).

También se realizó un experimento en el que se aislaron vesículas de macrófagos infectados con *Salmonella* marcada con aminoácidos radioactivos y muerta por calor. Las fracciones aisladas de estos macrófagos presentaron el mismo patrón de dos fracciones con mayor actividad de  $\beta$ -hexosaminidasa. No se detectó radioactividad proveniente de *Salmonella* en ninguna de las fracciones provenientes de este lisado (Figura 27.B). Los resultados nos indicaron que los dos tipos de vesículas que obtenemos de los lisados de macrófagos están presentes en macrófagos activados con IFN- $\gamma$  y que son independientes de la estimulación por *Salmonella*. Los macrófagos no fagocitan *Salmonella* muerta por calor durante 30 minutos de infección, por lo cual es probable que cuando se realiza la infección de macrófagos con *Salmonella* viva, la bacteria provoca su entrada en los macrófagos.

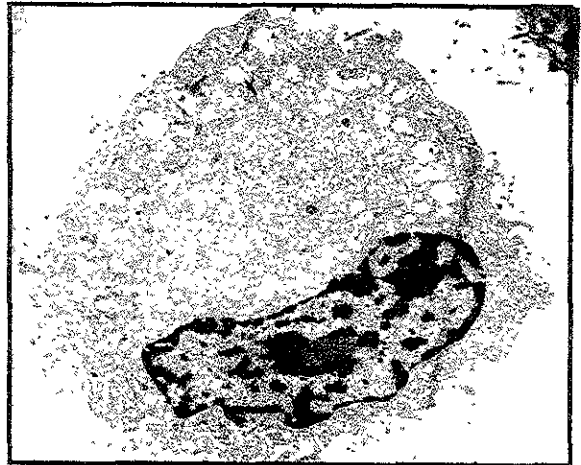


**Figura No.27 El IFN- $\gamma$  induce la formación de una vesícula de mayor densidad.** A) Macrófagos activados con IFN- $\gamma$  y no activados se lisaron con medio iso-osmótico y el lisado se fraccionó en Percoll al 27%. A cada fracción del gradiente se le determinó actividad de  $\beta$ -hexosaminidasa. B) Macrófagos IC21 se activaron con IFN- $\gamma$  y posteriormente se infectaron con *S. typhimurium* 14028 marcada con aminoácidos radiactivos y muerta por calor (**Salmonella**). Después de la infección y cultivo por una hora, los macrófagos se lisaron y se fraccionaron al igual que en A). A estas fracciones se les determinó radioactividad y actividad de  $\beta$ -hexosaminidasa.

A)



B)



C)



D)

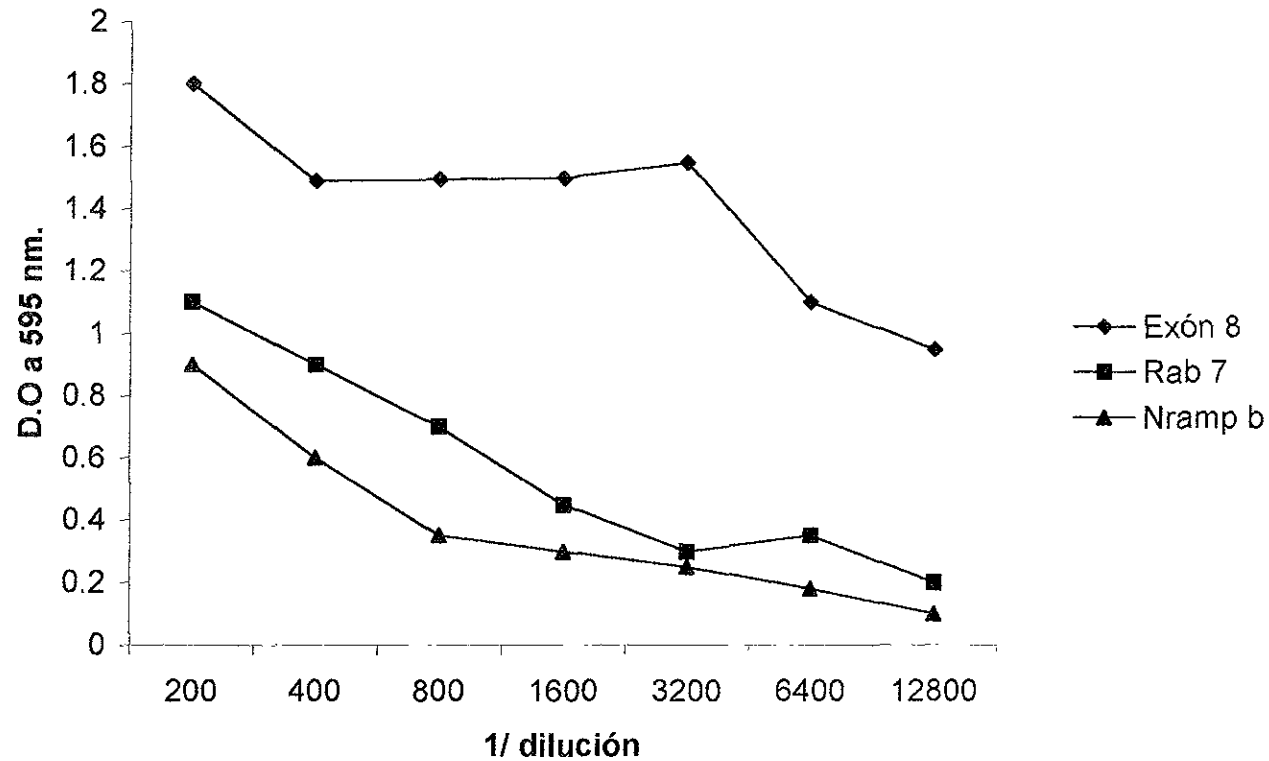


**Figura 28. Macrófagos IC21 tratados con IFN- $\gamma$  poseen grandes vesículas.**  
A,B,C y D son macrófagos activados con IFN- $\gamma$  por 48 horas (5 $\mu$ m).

### 6.2.3. Rastreo de marcadores endosomales en las vesículas aisladas de macrófagos activados con IFN- $\gamma$ e infectados con *Salmonella*.

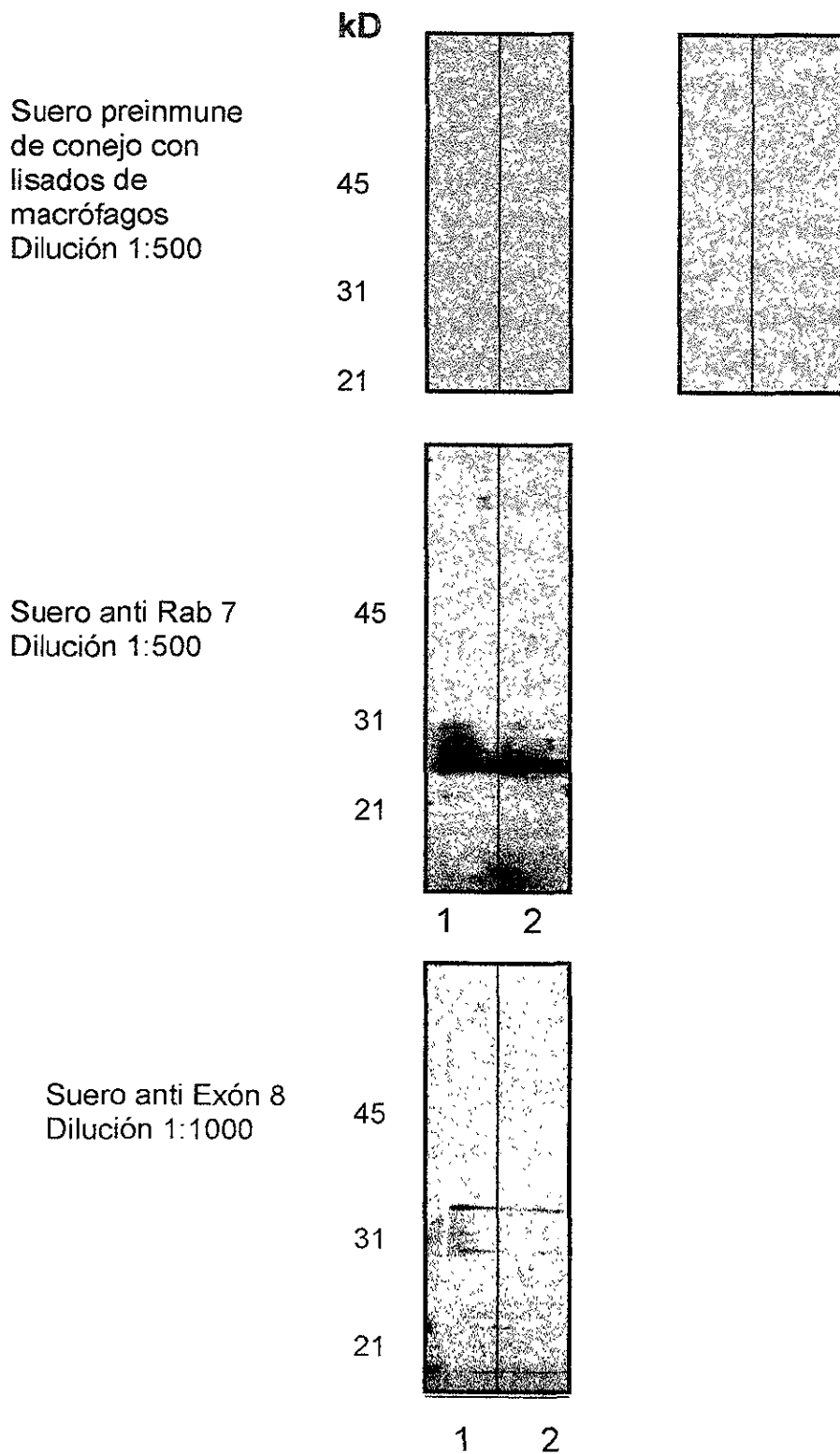
Para finalizar la caracterización de las vesículas aisladas de los macrófagos activados con IFN- $\gamma$  e infectados con *Salmonella*, fué necesario identificar la presencia de marcadores lisosomales o endosomales en estas fracciones. Esto se realizó por inmunoelectrotransferencia de las fracciones en cuestión tratando de revelar la presencia de los siguientes marcadores vesiculares específicos: LAMP1 para lisosomas; Nramp para lisosomas y endosomas; Rab7 para endosomas tardíos; Rab 5 para endosomas tempranos; MHC clase I para vesículas de exportación provenientes del aparato de Golgi y del RE; y receptor de transferrina para vesículas de reciclaje.

No se contaba con anticuerpos específicos para las moléculas Rab 7, Rab 5, Nramp y moléculas MHC clase I que pudieran utilizarse para los experimentos de inmunoelectrotransferencia. Por lo tanto se decidió preparar anticuerpos policlonales contra péptidos correspondientes a regiones intracelulares de estas proteínas. Se consideró que las regiones intracelulares son altamente hidrofílicas y por lo tanto de fácil acceso para el reconocimiento de anticuerpos (Tabla 1). Conejos se inmunizaron con péptidos sintéticos por un período de seis meses y después de la última sangría los sueros de estos conejos se titularon por ELISA contra los péptidos (Figura 29). Los sueros anti clase I (Exón 8), anti-Rab 7 y anti Nramp-b reconocieron los péptidos con los que fueron generados. En inmunoelectrotransferencia con lisados de macrófagos y macrófagos infectados (figura 30), los sueros anti Exón 8 y anti Rab 7 reconocen a las proteínas clase I y Rab 7 respectivamente. El suero anti Nramp no mostró un patrón consistente en la inmunoelectrotransferencia de lisado de macrófagos, por lo cual no se utilizó para experimentos posteriores.



**Figura 29. Titulación de los sueros anti-péptido por ensayo de ELISA:** Placas de plástico de 96 pozos (Costar) se recubrieron con 20mg/ml de péptidos en PBS con poly-L-lisina al 2% durante 18 horas a 4 °C. Las placas se lavaron y bloquearon con leche descremada al 2%. (Sveltes-Nestle) en PBS-Tween (0.5%) y se incubaron durante 1.5 horas a 4°C. Las placas se lavaron y se les adicionó 100 µl de las diluciones de los sueros de conejo por duplicado y se incubó la placa a temperatura ambiente por 1.5 horas. La presencia de anticuerpos se reveló con suero de burro anti-conejo marcado con peroxidasa.





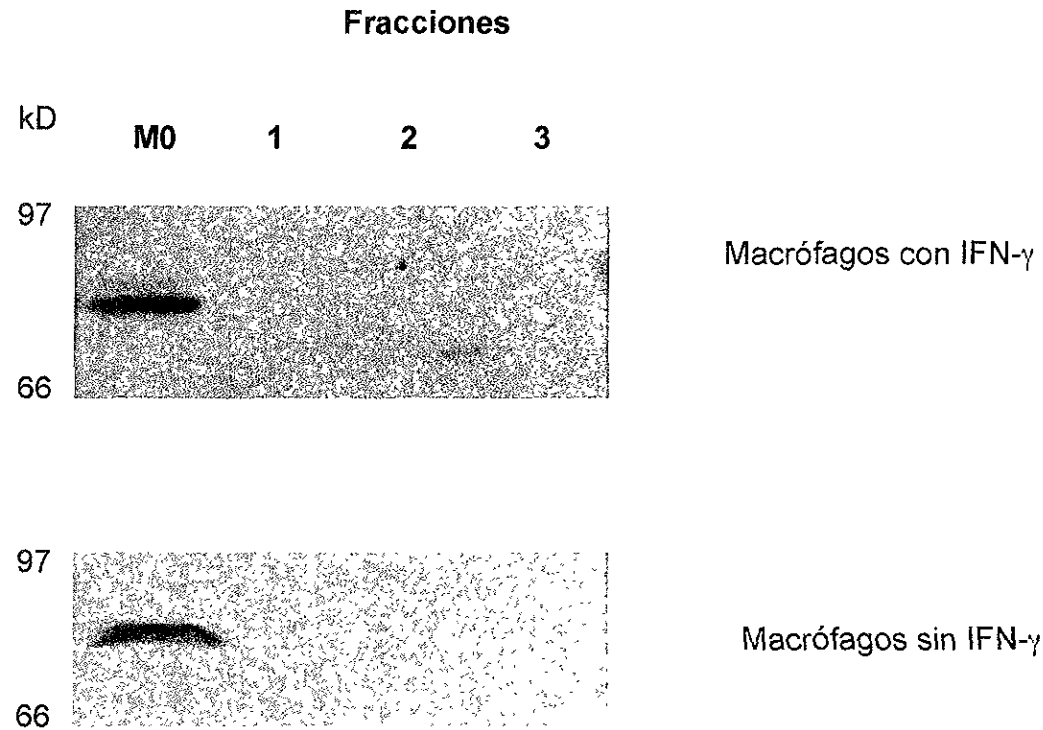
**Figura 30. Evaluación de la reactividad de sueros de conejo anti Rab 7 y anti Exón 8.** Lisados de macrófagos IC21 se analizaron por inmunoelectrotransferencia utilizando los sueros de conejo anti Rab7 y anti Exón 8 en las diluciones indicadas. Muestra 1:Macrófagos Muestra 2: Macrófagos infectados con *S.typhimurium*.

Las fracciones principales del gradiente del lisados de macrófagos tratados con IFN- $\gamma$  y no tratados con IFN- $\gamma$ , fracción de 1.04 g/ml (No.2), 1.09 g/ml (No.3) y una fracción menor de 1g/ml (1) se separaron en electroforesis SDS-PAGE. Posteriormente se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa y estas membranas se probaron con los diferentes anticuerpos a las diluciones indicadas en la Tabla 2.

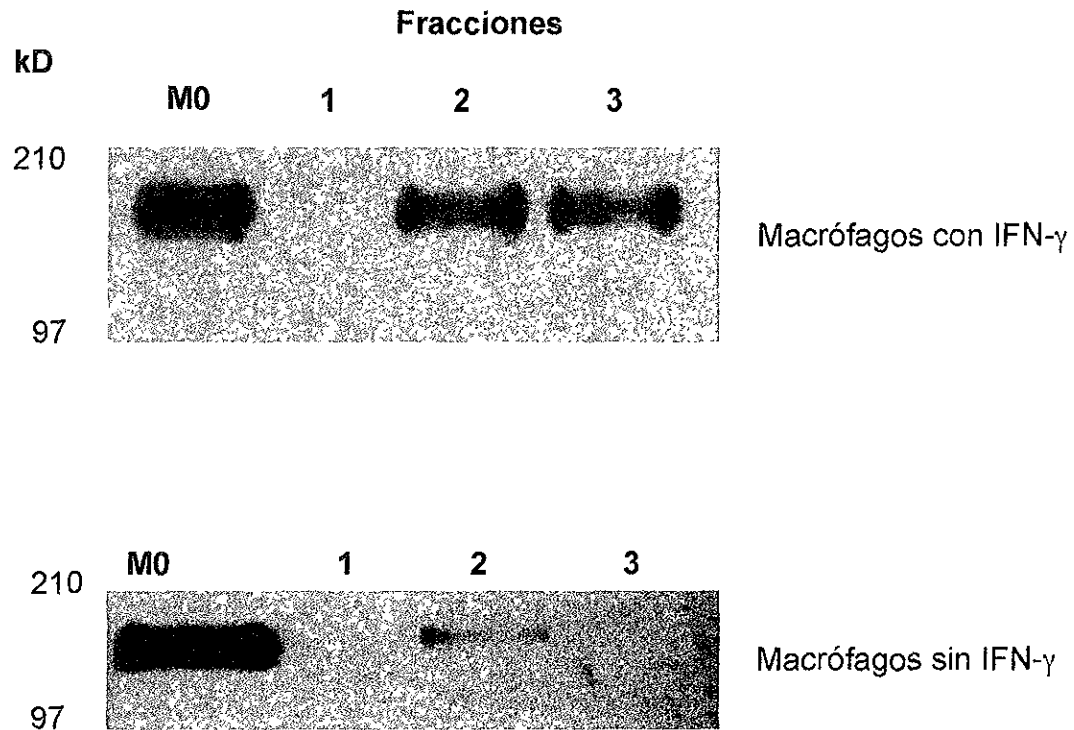
El anticuerpo anti receptor de transferrina reconoce una banda de 80 kD en el lisado de macrófagos activados y no activados con IFN- $\gamma$ . Sin embargo este anticuerpo no mostró reactividad contra las fracciones del lisado de macrófagos tratados o no tratados con IFN- $\gamma$  obtenidas de la separación con Percoll al 27% (Figura 31). Los resultados sugieren que las fracciones aisladas no contienen vesículas de reciclaje. También es señal de que en la fracción de menor densidad no se detectan fragmentos de membrana celular.

En los macrófagos tratados con IFN- $\gamma$  se detectó una banda correspondiente a LAMP1 en la fracción intermedia (1.04 g/ml) y de alta densidad (1.09 g/ml), mientras que en macrófagos sin IFN- $\gamma$  solo se detecta LAMP1 en la fracción intermedia (Figura 32). La presencia de  $\beta$ -hexosaminidasa en la fracción intermedia sugiere que esta vesícula es un lisosoma, y probablemente la fracción de mayor densidad es otro compartimento.

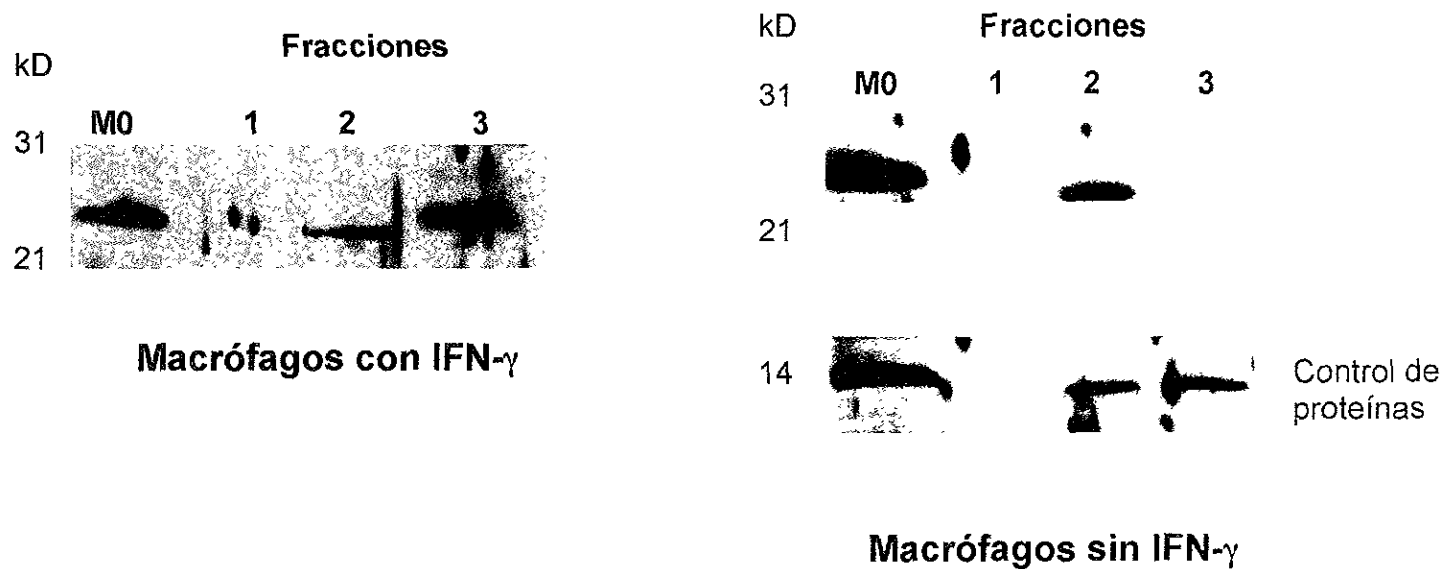
El anticuerpo policlonal anti-Rab 7 reconoce una banda de 25 kD en el lisado de macrófagos activados y no activados con IFN- $\gamma$ . Sin embargo, solamente se detectó la presencia de Rab 7 en la fracción intermedia y de mayor densidad, provenientes del lisado de macrófagos activados. Los macrófagos no activados mostraron una banda similar a Rab 7 únicamente en la fracción intermedia (Figura 33). El anticuerpo policlonal anti Rab 7 reveló una banda de aproximadamente 14 kD en el lisado de macrófagos, en la fracción intermedia y en la fracción de mayor densidad. Esta banda inespecífica nos sirvió de referencia para confirmar la cantidad de proteína analizada en cada fracción.



**Figura 30. Las fracciones del lisado de macrófagos no contienen receptor de transferrina.** Las fracciones principales de la separación vesicular de macrófagos tratados con IFN- $\gamma$  y no tratados se lisaron con 1% de SDS (descrito en Material y Métodos). Posteriormente las proteínas de estas fracciones se separaron por electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) en un gel de 7.5% de acrilamida. Las proteínas se transfirieron a papel de nitrocelulosa y la presencia de receptor de transferrina se reveló con el anticuerpo monoclonal C2F2. **M0**: lisado de macrófagos previo al fraccionamiento. **1**. fracción de menor densidad, **2**. fracción de 1.04 mg/ml densidad intermedia y **3**. fracción de mayor densidad de 1.091 mg/ml.



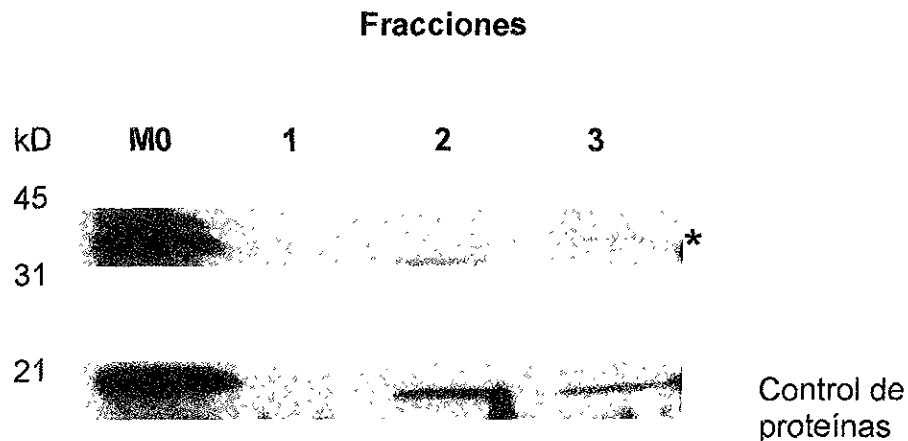
**Figura 31. Lamp 1 está presente en las fracciones de 1.04 g/ml y de 1.09 g/ml provenientes de macrófagos activados con IFN- $\gamma$ .** Las fracciones principales de la separación vesicular de macrófagos tratados con IFN- $\gamma$  y no tratados se lisaron con 1% de SDS. Posteriormente las proteínas de estas fracciones se separaron por electroforesis (SDS-PAGE) y se transfirieron a papel de nitrocelulosa. La presencia de receptor de Lamp 1 se reveló con el anticuerpo monoclonal 1D4B. **M0**: lisado de macrófagos previo al fraccionamiento. **1**. fracción de menor densidad, **2**. fracción de 1.04 mg/ml densidad intermedia y **3**. fracción de mayor densidad de 1.091 mg/ml.



**Figura 32. Rab7 esta presente en las fracciones de 1.04 g/ml y de 1.09 g/ml provenientes de macrófagos activados con IFN- $\gamma$ .** Las fracciones principales de la separación vesicular de macrófagos tratados con IFN- $\gamma$  y no tratados se lisaron con 1% de SDS. Posteriormente las proteínas de estas fracciones se separaron por electroforesis (SDS-PAGE) y se transfirieron a papel de nitrocelulosa. La presencia de receptor de Rab 7 se reveló con el anticuerpo policlonal anti Rab7 producido en conejo. **MO**: lisado de macrófagos previo al fraccionamiento. **1.** fracción de menor densidad, **2.** fracción de 1.04 mg/ml densidad intermedia y **3.** fracción de mayor densidad de 1.091 mg/ml.

Es decir, la ausencia de Rab 7 en la fracción de mayor densidad detectada con el anticuerpo policlonal no se debe a la falta de muestra en la membrana de nitrocelulosa.

Con la finalidad de rastrear compartimientos provenientes del la exocitosis del aparato de Golgi y RE, las fracciones del lisado de macrófagos, se revelaron por inmunoelectrotransferencia con el anticuerpo anti Exón 8. Este anticuerpo reconoce un péptido de la región carboxilo terminal de todos los alelos de las molécula MHC clase I, el cual esta localizado en la parte intracelular. Los macrófagos activados con IFN- $\gamma$  mostraron la presencia de moléculas clase I en la fracción intermedia y de mayor densidad. A la fecha no se ha reportado que lisosomas o endosomas contengan moléculas MHC clase I. Probablemente la activación por IFN- $\gamma$  esté induciendo la fusión de vesículas de exocitosis con lisosomas y endosomas; y como resultado de esta fusión se forme la vesícula de mayor densidad.



### Macrófagos con IFN- $\gamma$

**Figura 33. Moléculas MHC clase I se encuentran en la fracción de 1.09 g/ml proveniente de macrófagos activados con IFN- $\gamma$ .** Las fracciones principales de la separación vesicular de macrófagos tratados con IFN- $\gamma$  se lisaron con 1% de SDS. Posteriormente las proteínas de estas fracciones se separaron por electroforesis (SDS-PAGE) y se transfirieron a papel de nitrocelulosa. La presencia de receptor de moléculas MHC clase I se reveló con el anticuerpo policlonal Exon 8. **M0**: lisado de macrófagos previo al fraccionamiento. **1**. fracción de menor densidad, **2**. fracción de 1.04 mg/ml densidad intermedia y **3**. fracción de mayor densidad de 1.091 mg/ml.

\* Cadena pesada  $\alpha$  de MHC clase I

## 7. DISCUSION Y CONCLUSIONES

### 7.1. El IFN- $\gamma$ confiere resistencia al control de la multiplicación de *Salmonella* e induce la secreción de péptidos de clase I del material fagocitado.

El IFN- $\gamma$  se describió originalmente como el factor activador de macrófagos y es indispensable para potenciar diversas actividades de los macrófagos. Induce el incremento de fagocitosis, la expresión de receptores en la membrana extracelular y la producción de agentes bactericidas y bacteriostáticos. En los experimentos de este trabajo, macrófagos de la línea celular IC21 tratados con IFN- $\gamma$  presentaron un aumento en la expresión de clase I y CD40 en los macrófagos (figura 3). Es interesante señalar que la expresión de clase I y CD40 no se induce en macrófagos no tratados con IFN- $\gamma$  pero infectados con *Salmonella*. Lo cual sugiere que el LPS no promueve la expresión de CD40 durante la infección de las condiciones de cultivo, a diferencia de lo que se ha reportado para sistemas similares con células dendríticas. Por otra parte el efecto aditivo de ambos estímulos, primero IFN- $\gamma$  y después la infección con *Salmonella* incrementa clase I y CD40 lo cual sugiere que el IFN- $\gamma$  prepara la maquinaria de señalización del macrófago para responder al LPS. Recientemente se reportó el primer análisis comparativo de RNAm de los genes de macrófagos RAW264.7 tratados con IFN- $\gamma$  y no tratados con IFN- $\gamma$  e infectados con *Salmonella typhimurium* (109). Entre los genes que se inducen al tratamiento con IFN- $\gamma$  se encuentran factores de transcripción tales como fosB, I- $\kappa$ Ba, I- $\kappa$ Bb, NF- $\kappa$ b, C-EB y Stat 5. Esta inducción de genes no se observó en ratones no tratados con IFN- $\gamma$  e infectados con *Salmonella*. Sugiriendo que el IFN- $\gamma$  provee la señal primaria requerida para una respuesta rápida en el segundo reto con LPS.

Los macrófagos pueden secretar IFN- $\gamma$  después del contacto con LPS pero en concentraciones mínimas, razón por la cual requieren de IFN- $\gamma$  proveniente de linfocitos T o células NK. Durante la infección en el ratón, es probable que macrófagos de ratones susceptibles secreten IL-18 tardíamente y no activen a células NK productoras de IFN- $\gamma$  (110). De manera que en la espera de la respuesta específica, los macrófagos sucumban ante la infección por *Salmonella*.



El efecto que observamos en macrófagos activados con IFN- $\gamma$  es que pueden secretar péptidos al medio extracelular del material fagocitado. Estos péptidos que secretan se unen a moléculas clase I vacías de los macrófagos o de células vecinas. En nuestro sistema experimental el material fagocitado fué *Salmonella* y con los experimentos de inmunoprecipitación de clase I de RMA-S co-cultivadas con macrófagos infectados corroboramos que parte de los péptidos eluidos provienen de la bacteria marcada radioactivamente.

La dificultad de revelar la presencia de la actividad secretora de los macrófagos sugiere que no es una vía principal de procesamiento sino una alternativa para lidiar con antígenos exógenos en una situación de inflamación. De manera que la secreción de péptidos proveniente de material propio no genera respuesta de linfocitos citotóxicos pero en presencia de un agente externo (infección bacteriana o viral) los péptidos del material exógeno compiten con los de material endógeno por moléculas vacías. Por lo tanto, la saturación de macrófagos con bacteria representa el único caso donde los macrófagos estarían secretando mayoritariamente péptidos bacterianos.

## **7.2. La vesícula que contiene al material fagocitado contiene enzimas lisosomales que generan parte de los péptidos secretados.**

Los inhibidores de actividad proteolítica lisosomal, cloruro de amonio y leupeptina en nuestro sistema experimental disminuyeron parcialmente la secreción de péptidos en los macrófagos activados con IFN- $\gamma$ . Lo cual nos sugiere que algunos de los péptidos de secreción son generados por proteasas similares a las presentes en los lisosomas. Existe la posibilidad de que otras enzimas que funcionen a pH neutro también estén involucradas en este proceso. Los macrófagos activados con IFN- $\gamma$  secretan una serie de proteasas que normalmente actúan al exterior del macrófago, es decir en un ambiente de pH no lisosomal. En este grupo se encuentran la metaloelastasa, la metalo proteinasa 1 (MMP1), la gelatinasa A y B (matriz metalo-proteinasas), la colagenasa tipo IV y el activador del plasminógeno (7). Probablemente alguna de estas enzimas esté involucrada en la generación de los péptidos dentro de la vesícula que contiene a *Salmonella*. Sin embargo para que esto pudiese ocurrir la vesícula de exportación de estas enzimas debería fusionarse con el fagosoma

conteniendo *Salmonella*. La cloroquina inhibe la secreción de péptidos en macrófagos infectados con *Salmonella* LT2 y *Pho P-*, las cuales son menos virulentas que la cepa 14028. De hecho el macrófago resiste mayores dosis de infección con las cepas LT2 y *Pho P-* que con la cepa 14028. Una posible explicación es que la cloroquina sea tóxica para estas dos cepas e inhiba la multiplicación bacteriana y por lo tanto la fuente de antígeno. La segunda explicación es que *S. typhimurium* 14028 genera mucho mas péptidos que no fueron inhibidos en las condiciones del ensayo.

BFA es un inhibidor que provoca la fusión del aparato de Golgi con el retículo endoplásmico (RE) evitando la exportación de proteínas del RE hacia la membrana externa. Sin embargo este inhibidor no altera la movilidad de las vesículas de reciclaje ni los endosomas ya formados en la célula (111). El mecanismo de inhibición de BFA consiste en evitar la interacción de proteínas que unen GTP, llamadas factores de ribosilación dependientes de ADP (ARF), con la membrana del Golgi. La ARF asociada a GTP provee la energía necesaria para que proteínas abrigadoras o "coatomer proteins" provenientes del citosol se unan a la membrana del Golgi y provoquen la formación de las vesículas que migran del Golgi a la superficie extracelular o de regreso al RE y este transporte en general mantienen al Golgi como organello independiente (112). Existe una familia de moléculas ARF y su distribución es vesícula-específica. En los experimentos con macrófagos infectados con *Salmonella* y tratados con BFA existe un incremento en la secreción de péptidos. Lo cual nos sugiere que la vesícula que contiene *Salmonella* se fusiona con la membrana externa y libera los péptidos a la superficie. Algunas vesículas de reciclaje que poseen ARF6 son insensibles al tratamiento con BFA y probablemente la vesícula que contiene los péptidos de *Salmonella* posea ARF6 (113).

### **7.3 Linfocitos T citotóxicos reconocen los péptidos secretados**

Células co-cultivadas con macrófagos infectados son reconocidas y lisadas por linfocitos provenientes de ratones infectados con *Salmonella*. Lo cual nos sugiere que los mismos epitopos son generados durante la infección en el ratón. La respuesta de linfocitos CD8 no se ha definido completamente en la infección de *S. typhimurium* en

ratones, no se conocen los antígenos ni los epitopos que estos linfocitos CD8 reconocen.

Cuando se utilizó OVA como antígeno, los macrófagos secretaron el péptido 257-264 a diferentes dosis de OVA y cuando se cultivaron con cloroquina y BFA. En estos experimentos las células RMA fueron las mejores receptoras de los péptidos secretados y las menos sensibles al efecto de cloroquina.. No se conoce cual es la proporción de moléculas vacías en los diferentes tipos celulares en tejidos ni cual es la importancia de las moléculas vacías en cada tipo celular.

#### **7.4. Compartimientos celulares**

*Salmonella* penetra a los macrófagos al provocar la formación de largas invaginaciones en la membrana extracelular o "ruffles", los cuales se cierran en los extremos formando fagosomas gigantes. Estos fagosomas adquieren grandes cantidades de líquido y a *Salmonella* por lo cual a esta manera de engullir material externo se le ha llamado macropinocitosis y no fagocitosis de *Salmonella* (114). El macropinosoma se fusiona con otros endosomas y evita la fusión con lisosomas, aparentemente la vesícula que contiene *Salmonella* adquiere el marcador Rab5 (115) y permanece como endosoma de reciclaje (116).

En este trabajo aislamos y caracterizamos vesículas de macrófagos activados con IFN- $\gamma$  e infectados con *Salmonella*. Del fraccionamiento celular realizado en Percoll al 27%, encontramos dos tipos de vesículas. Una de densidad 1.04 y otra de 1.091g/ml, estas densidades son las reportadas para lisosomas y endosomas. La actividad de  $\beta$ -hexosaminidasa esta directamente relacionada con los lisosomas, por lo cual creemos que la fracción intermedia corresponde a un lisosoma. *Salmonella* se distribuye en ambas vesículas y aparentemente hay dos patrones de distribución, en las vesículas ligeras hay una bacteria por vesícula y en las de vesículas pesadas hay varias bacterias por vesícula. Cabe señalar que los macrófagos activados con IFN- $\gamma$  poseen esta vesícula de alta densidad y no esta presente en los macrófagos no infectados.

El rastreo de marcadores por inmunoelectrotransferencia muestra que en macrófagos tratados con IFN- $\gamma$  las dos vesículas poseen Rab 7 y LAMP1 pero no contienen receptor de transferrina y la vesícula de mayor tamaño posee moléculas

clase I. Esto nos hace pensar que la vesícula de mayor densidad sea el resultado de la fusión de varios endosomas con lisosomas. En los macrófagos sin IFN- $\gamma$  no detectamos la vesícula de mayor densidad ni la presencia de Rab7 o LAMP1. El IFN- $\gamma$  provoca la fusión de endosomas con lisosomas y durante la infección de *Salmonella*, se puede provocar la fusión fagolisosomal y la destrucción bacteriana (117). Es claro en las microscopías que la bacteria viva reside en las vesículas pequeñas y solo observamos bacteria muerta o restos de bacteria en las vesículas de alta densidad que poseen Rab7 y Lamp 1.

La presencia de esta fusión de vesículas enriquece el contenido de proteasas que podrían estar generando los péptidos de secreción; y probablemente de esta vesícula emigren exosomas que secreten los péptidos. En un estudio de macrófagos humanos tratados con IFN- $\gamma$  se ha observado por microscopía electrónica la formación de lisosomas perinucleares que no aparecen en macrófagos tratados con IL-4, IL-13 o no tratados (118).

## **8. REPERCUSIONES.**

Indiscutiblemente el mecanismo de secreción péptidos inducido por IFN- $\gamma$  podría tener repercusiones en los procesos inflamatorios que ocurren en los tejidos. Macrófagos y células dendríticas fagocitan células muertas por apoptosis o por necrosis (119). Las células muertas por apoptosis no generan respuesta antigénica, es decir hay tolerancia cuando se presentan autoantígenos de células muertas por apoptosis. Sin embargo las células muertas por necrosis despiertan respuestas inmunes (120). Los macrófagos activados con IFN- $\gamma$  probablemente estén participando en estos mecanismos de respuesta y tolerancia involucrados con la ingestión de células muertas.

Los principales problemas en la respuesta de linfocitos T CD8+ contra tumores es la generación de péptidos clase I de antígenos tumorales y la activación de linfocitos T CD8+ considerando las condiciones de tolerancia inmunológica establecida para antígenos propios. Se ha reportado que monocitos tratados con IFN- $\gamma$  expresan TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) y adquieren la habilidad de matar células tumores (121), por lo tanto los antígenos tumorales tendrían la posibilidad de

clase I. Esto nos hace pensar que la vesícula de mayor densidad sea el resultado de la fusión de varios endosomas con lisosomas. En los macrófagos sin IFN- $\gamma$  no detectamos la vesícula de mayor densidad ni la presencia de Rab7 o LAMP1. El IFN- $\gamma$  provoca la fusión de endosomas con lisosomas y durante la infección de *Salmonella*, se puede provocar la fusión fagolisosomal y la destrucción bacteriana (117). Es claro en las microscopias que la bacteria viva reside en las vesículas pequeñas y solo observamos bacteria muerta o restos de bacteria en las vesículas de alta densidad que poseen Rab7 y Lamp 1.

La presencia de esta fusión de vesículas enriquece el contenido de proteasas que podrían estar generando los péptidos de secreción; y probablemente de esta vesícula emigren exosomas que secreten los péptidos. En un estudio de macrófagos humanos tratados con IFN- $\gamma$  se ha observado por microscopía electrónica la formación de lisosomas perinucleares que no aparecen en macrófagos tratados con IL-4, IL-13 o no tratados (118).

## **8. REPERCUSIONES.**

Indiscutiblemente el mecanismo de secreción péptidos inducido por IFN- $\gamma$  podría tener repercusiones en los procesos inflamatorios que ocurren en los tejidos. Macrófagos y células dendríticas fagocitan células muertas por apoptosis o por necrosis (119). Las células muertas por apoptosis no generan respuesta antigénica, es decir hay tolerancia cuando se presentan autoantígenos de células muertas por apoptosis. Sin embargo las células muertas por necrosis despiertan respuestas inmunes (120). Los macrófagos activados con IFN- $\gamma$  probablemente estén participando en estos mecanismos de respuesta y tolerancia involucrados con la ingestión de células muertas.

Los principales problemas en la respuesta de linfocitos T CD8+ contra tumores es la generación de péptidos clase I de antígenos tumorales y la activación de linfocitos T CD8+ considerando las condiciones de tolerancia inmunológica establecida para antígenos propios. Se ha reportado que monocitos tratados con IFN- $\gamma$  expresan TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) y adquieren la habilidad de matar células tumores (121), por lo tanto los antígenos tumorales tendrían la posibilidad de

ser presentados por clase I a través del mecanismo descrito en este trabajo e iniciar la activación de linfocitos T CD8<sup>+</sup>. A este respecto, cepas atenuadas de *Salmonella* transfectadas con proteínas antigénicas de *Plasmodium* o *Leishmania* se han estudiado como posibles candidatos a vacunas para uso en humanos. *Salmonella* podría servir como acarreador de proteínas tumorales.

## 9. PROPUESTAS PARA EL FUTURO.

Probablemente algunos de los factores de transcripción que es inducido por el IFN- $\gamma$  promuevan la expresión de proteasas que radican en los lisosomas o vesículas de secreción, las cuales podrían participar en el la generación de los péptidos de secreción. Un experimento interesante sería buscar RNAm de catepsinas y proteosomas en macrófagos tratados con IFN- $\gamma$  y contrastar con los macrófagos no tratados con la finalidad de localizar alguna proteasa nueva en estos macrófagos.

Sería interesante medir receptores para LPS en macrófagos tratados con IFN- $\gamma$  y ver la influencia en la señalización que hace a los macrófagos mas sencibles a LPS (fosforilación de proteínas intracelulares).

El aspecto que ha quedado sin resolver es determinar si macrófagos cargados con péptidos de *Salmonella* inducen respuesta de linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos en un sistema *in vivo*. Sería interesante transferir macrófagos tratados con IFN- $\gamma$  e infectados con *Salmonella* a ratones y evaluar respuesta citotóxica contra células co-cultivadas con macrófagos infectados o con los mismos macrófagos.

A nivel celular se requiere caracterizar los compartimientos de macrófagos tratados y no tratados con IFN- $\gamma$  realizando experimentos de inmunogold de los cortes de macrófagos para microscopía electrónica utilizando anticuerpos dirigidos contra marcadores lisomales y endosomales. Tambien sería interesante estudiar la cinética de fusión durante la activación con IFN- $\gamma$  al igual que el pH de las vesículas.

Para conocer en donde se generan estos péptidos secretados *in vivo* e *in vitro* se podría rastrear el atígeno con proteínas conjugadas a fluorocromos por ejemplo OVA-FITC o utilizando *Salmonella* transformada con GFP (proteína verde fluorescente).

ser presentados por clase I a través del mecanismo descrito en este trabajo e iniciar la activación de linfocitos T CD8<sup>+</sup>. A este respecto, cepas atenuadas de *Salmonella* transfectadas con proteínas antigénicas de *Plasmodium* o *Leishmania* se han estudiado como posibles candidatos a vacunas para uso en humanos. *Salmonella* podría servir como acarreador de proteínas tumorales.

### 9. PROPUESTAS PARA EL FUTURO.

Probablemente algunos de los factores de transcripción que es inducido por el IFN- $\gamma$  promuevan la expresión de proteasas que radican en los lisosomas o vesículas de secreción, las cuales podrían participar en el la generación de los péptidos de secreción. Un experimento interesante sería buscar RNAm de catepsinas y proteosomas en macrófagos tratados con IFN- $\gamma$  y contrastar con los macrófagos no tratados con la finalidad de localizar alguna proteasa nueva en estos macrófagos.

Sería interesante medir receptores para LPS en macrófagos tratados con IFN- $\gamma$  y ver la influencia en la señalización que hace a los macrófagos mas sencibles a LPS (fosforilación de proteínas intracelulares).

El aspecto que ha quedado sin resolver es determinar si macrófagos cargados con péptidos de *Salmonella* inducen respuesta de linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos en un sistema *in vivo*. Sería interesante transferir macrófagos tratados con IFN- $\gamma$  e infectados con *Salmonella* a ratones y evaluar respuesta citotóxica contra células co-cultivadas con macrófagos infectados o con los mismos macrófagos.

A nivel celular se requiere caracterizar los compartimientos de macrófagos tratados y no tratados con IFN- $\gamma$  realizando experimentos de inmunogold de los cortes de macrófagos para microscopía electrónica utilizando anticuerpos dirigidos contra marcadores lisomales y endosomales. También sería interesante estudiar la cinética de fusión durante la activación con IFN- $\gamma$  al igual que el pH de las vesículas.

Para conocer en donde se generan estos péptidos secretados *in vivo* e *in vitro* se podría rastrear el atígeno con proteínas conjugadas a fluorocromos por ejemplo OVA-FITC o utilizando *Salmonella* transformada con GFP (proteína verde fluorescente).

Durante la infección de *Salmonella* en el ratón no se conoce en donde inicia la respuesta de linfocitos T CD8<sup>+</sup>. Un experimento interesante sería marcar linfocitos CD8<sup>+</sup> ,de ratones no infectados , con CFSE (5,6-carboxi-succimidil-fluorescein-ester) y transferirlos a ratones infectados con *Salmonella typhimurium*. Posteriormente evaluar la proliferación de linfocitos CD8<sup>+</sup> (se observa la pérdida de CFSE en cada división celular) en bazo, ganglios mesentéricos, ganglios inguinales e hígado. Con base en estos resultados, se evaluarían el estado de activación de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> que están proliferando así como el patrón de citocinas. Finalmente se evaluarían poblaciones de macrófagos en los sitios de proliferación específica.



## Bibliografia

1. Gordon S., S. Clarke, D. Greaves and A. Doyle. 1995. Molecular immunobiology of macrophages: recent progress. *Curr. Op. Immunol.* 7:24-33.
2. Aderem A. and D.M. Underhill. 1999. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev. Immunol* 17: 593-623.
3. Stout R.D. 1993. Macrophage activation by T cells: cognate and non-cognate signals. *Curr. Op. Immunol* 5:398-403.
4. Trinchieri G. 1997. Cytokines acting on or secreted by macrophages during intracellular infection (IL-10, IL-12, IFN- $\gamma$ ). *Curr. Op. Immunol* 9:17-23.
5. Xaus J., C.M. Cardo, A.F. Valledor, C. Soler, J. Lloberas and A. Celada. 1999. Interferon- $\gamma$  induces the expression of p21 waf1 and arrests macrophage cell cycle, preventing induction of apoptosis. *Immunity* 11:103-111.
6. MacMicking J., Q. Xie and C. Nathan. 1997. Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Rev. Immunol.* 15:323-350.
7. Nathan C.F. 1986. Secretory products of macrophages. *J.Clin.Invest.* 79: 319-326.
8. Saren P., H.G. Welgus, and P.T. Kovanen. 1996. TNF- $\alpha$  and IL1- $\beta$  selectively induce expression of 92 kDa gelatinase by human macrophages. *J. Immunol.* 157:4159-4165.
9. Goerdt S. and C.E. Orfanos. 1999. Other functions, other genes: alternative activation of antigen-presenting cells. *Immunity* 10: 137-142.
10. Bruce Koppelman, Neefjes J.J. de Vries J.E. and de Waal Malefyt R. 1997. Interleukin-10 down-regulates MHC class II ab peptide complexes at the plasma membrane of monocytes by affecting arrival and recycling. *Immunity* 7:861-871.
11. Debrick J.E., P.A. Campbell and U.D. Staerz. 1991. Macrophages as accessory cells for class I MHC-restricted immune responses. *J. Immunol.* 147:2846-2851.
12. Sigal L.J., Crotty S, Andino R. and K. Rock. 1999. Cytotoxic T cell immunity to virus-infected non-haematopoietic cells requires presentation of exogenous antigen. *Nature* 398: 77-80.

13. Faló L.D., M.Korsacsovics-Bankowski, K.Thompson and K.L. Rock. 1995. Targeting antigen into the phagocytic pathway in vivo induces protective tumour immunity. *Nature Med.* 1:649-653.
14. Robinson M.S., C. Watts and M. Zerial. 1996. Membrane dynamics in endocytosis. *Cell* 84:13-21.
15. Riezman H., P.G. Woodman, G. van Meer and M. Marsh. 1997. molecular Mechanism of endocytosis. *Cell* 91: 731-738.
16. Berthiaume, E.P., C. Medina and J.A. Swanson. 1995. molecular size - fractionation during endocytosis in macrophages. *J. Cell. Biol.* 129: 989-998.
17. Desjardins, M., L.A. Huber, R.G. Parton and G. Griffiths. 1994. Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus. *J. Cell. Sci.* 107:145-157.
18. Oh, Y.K., and J.A. Swanson. 1996. Different fates of phagocytosed particles after delivery into macrophage lysosomes. *J. Cell. Biol.* 132: 585-593.
19. Jahraus ,A., B. Storrie, G. Griffiths. and M. Desjardins. 1994. Evidence for retrograde traffic between terminal lysosomes and the prelysosomal/late endosome compartment. *J. Cell. Sci.* 107:145-157.
20. Racoosin; E.L., and J.A. Swanson.1992. M-CSF-induced macropinocytosis increases solute endocytosis but not receptor-mediated endocytosis in mouse macrophages. *J. Cell. Sci.* 102:867-880.
21. Hewlett, L.H. A.R. Prescott and C. Watts. 1994. The coated pit and macropinocytic pathways serve distinct endosome populations. *J. Cell. Biol.* 124:689-703.
22. Alpuche-Aranda CM. Racoosin EL, Swanson JA, Miller SI, 1994. *Salmonella* stimulate macrophage macropinocytosis and persist within spacious phagosomes. *J.Exp.Med.* 179:601-608.
23. Racoosin; E.L., and J.A. Swanson.1993. Macropinosome maturation and fusion with tubular lysosomes in macrophages. *J. Cell. Biol.* 121: 1011-1020.
24. Yewdell J.W. and J.R. Bennink. 1990. The binary logic of antigen processing and presentation to T cells. *Cell* 62:203-206.
25. Steinman R.M., and J. Swanson. 1995. The endocytic activity of dendritic cells. *J. Exp. Med* 182:283-288.

26. Bjorkman P.J., M.A. Samper, B. Samraoui, W.S. Bennett, J.L. Strominger and D.C. Willey. 1987. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 329:506-512.
27. Bjorkman P.J., M.A. Samper, B. Samraoui, W.S. Bennett, J.L. Strominger and D.C. Willey. 1987. The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature* 329:512-518.
28. Garrett T.P.J., M.A. Samper, P.J. Bjorkman, J.L. Strominger and D.C. Willey. 1989. Specificity pockets for the side chains of peptide antigens in HLA-Aw68. *Nature* 324:692-696.
29. Madden D.R., J.C. Gorga, J.L. Strominger and D.C. Willey. 1992. The three-dimensional structure of HLA-27 at 2.1 Å resolution suggests a general mechanism for tight peptide binding to MHC. *Cell* 70:1035-1048.
30. Hershko A. and A. Ciechanover. 1992. The ubiquitin system for protein degradation. *Annu. Rev. Biochem.* 61:761-807.
31. Michalek. M.T., E.P. Grant, C. Gramm, A.L. Goldberg and K.L. Rock. 1993. A role for the ubiquitin-dependent proteolytic pathway in MHC class I restricted antigen presentation. *Nature* 363:552-554.
32. Michalek. M.T., E.P. Grant and K.L. Rock. 1996. Chemical denaturation and modification of ovalbumin alters its dependence on ubiquitin conjugation for class I antigen presentation. *J. Immunol.* 157:617-624.
33. Groll. M, L. Ditzel, J. Lowe, D. Stock, M. Bochtler, H.D. Bartunik, and R. Huber. 1997. Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* 386:463-471.
34. Ortiz-Navarrete V., A. Seeling, M. Gernold, S. Frentzel, P.M. Kloetzel and G.J. Hämmerring. 1991. Subunit of "20S" proteasome (multicatalytic proteinase) encoded by the major histocompatibility complex. *Nature* 353:662-664.
35. Martinez C.K. and J.J. Monaco. Homology of proteasome subunits to a major histocompatibility complex-linked LMP gene. *Nature* 353:664-667.
36. Gaczynska M., K.L. Rock, and A.L. Goldberg. Gamma-interferon and expression of MHC genes regulate peptide hydrolysis by proteasomes. *Nature* 1993:365:264-267.

37. Fehling H.J. W. Swart, C. Laplace. R. Kühn, K. Rajewsky, U. Müller and H. von Bohemer. 1994. MHC class I expression in mice lacking the proteasome subunit LMP7. *Science* 265:1234-1237.
- 38 Momburg F., V. Ortiz-Navarrete, J. Neefjes, E. Goulmy, Y Vand de Wall, S.J. Powis, J. Howard, P. Waden and G.J. Hämmerling. 1992. Proteasomes subunits encoded by the major histocompatibility complex are not essential for antigen presentation. *Nature* 360:174-177.
39. Groettrup M., A. Soza. M. Eggers, L. Kuehn, T.P. Dick, H. Schild, H.G. Rammensee, U.H. Koszinowski and P.M. Kloetzel. 1996. A role for the proteasome regulator PA28 $\alpha$  in antigen presentation. *Nature* 381:166-168.
- 40 Rivett A.J. 1998. Intracellular distribution of proteasomes. *Curr Opin Immunol* 10:110-114.
- 41 Neefjes J., F. Momburg and G.J. Hämmerling. 1993. Selective and ATP dependent translocation of peptides by MHC-encoded transporter. *Science* 261:769-771.
- 42 Trowsdale J, I. Hanson, I Mockridge, S. Beck, A. Townsend, and A. Kelly. 1990. Sequences encoded in the class II region of the MHC related to the "ABC" superfamily of transporters. *Nature* 384:741-744.
43. Powis S.J., E.V. Deverson, W.J. Coadwell, A. Ciruela, N.S. Huskinson, H. Smith, G.W. Butcher and J.C. Howard. 1992. Effect of polymorphism of an MHC linked transporter on the peptides assembled in a class-I molecule. *Nature* 357:211-215.
44. Heemes M-T., T.N.M. Shumacher, K. Wonigeit and H.L. Ploegh. 1994. Peptide translocation by variants of the transporter associated with antigen processing. *Science* 262:2059-2063.
45. Kleinmer M.J. A. Jelly H.J. Geuze. J.W Slot, A. Townsend and J. Trowsdale. 1992. Location of MHC-encoded transporter in the endoplasmic reticulum and cis-Golgi. *Nature* 357:342-344.
46. Ortmann B., M. Androlewics and P. Cresswell. 1994. MHC class I/ $\beta$ 2m microglobulin complexes associate with TAP transporters before peptide binding. *Nature* 368:864-867.
47. Sadasivan B., P.J. Lenner, B. Ortmann and P. Cresswell. 1996. Roles for calreticulin and a novel glycoprotein, tapasin, in the interaction of MHC class I molecules with TAP. *Immunity* 5:103-114.

48. Falk K. O. Rötzschke, S. Stevanovic, G. Jung and H.G. Rammensee. 1991. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* 351:290-296.
49. Ljunggren H-G., N.J. Stam, C. Öhlen, J.J. Neefjes, P. Höglund, M.T. Heemels, J. Bastin, T.N.M. Shumacher, A. Townsend, K. Kjer and H/L/ Ploegh. 1990. Empty class I molecules come out in the cold. *Nature* 346:476-480.
50. Ortiz-Navarrete V. and G.J. Hammerling. 1991. Surface appearance and instability of empty H-2 class I molecules under physiological conditions. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:3594-3597.
51. Rock K.L., S. Gamble, L. Rothstein, C. Gramm and B. Benacerraf. 1991. Dissociation of Beta2-microglobulin leads to the accumulation of a substantial pool of inactive class I MHC heavy chains on the cell surface. *Cell* 65:511-520.
52. Benjamin R.J., A. Madrigal and P. Parham. 1991. Peptide binding to empty HLA-B27 molecules of viable human cells. *Nature* 351:74-77.
53. Wiertz E.J.H.J., D. Tortorella, M. Bogoy, J. Yu, W. Mothes, T.R. Jones, T.A. Rapoport and H.L. Ploegh. 1996. Sec 61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction. *Nature* 384:432-438.
54. Mosse C.A., L. Meadows, C.J. Luckey, D.J. Kittlesen, E.L. Huczko, C.L. Slingluff, J. Shabanowitz, D.F. Hunt, and V.H. Engelhard. 1998. The class I antigen-processing pathway for the membrane protein tyrosinase involves translocation in the endoplasmic reticulum and processing in the cytosol. *J. Exp Med.* 187: 37-48.
55. Watts C. 1997. Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules. *Annu Rev. Immunol.* 15:821-850.
56. Geuze H.J., 1998. The role of endosomes and lysosomes in MHC class II functioning. *Immunology Today.* 19:282-287.
57. Steinman, R.M., and Z.A. Cohn. 1972. The interaction of soluble horseradish peroxidase with mouse peritoneal macrophages *in vitro*. *J. Cell Biol.* 55:186-204.
58. Steinman, R.M., and Z.A. Cohn. 1972. The interaction of particulate horseradish peroxidase (HRP) -anti HRP immune complex with mouse peritoneal macrophages *in vitro*. *J. Cell Biol.* 55:616-634.

59. Chapman H.A. 1998. Endosomal proteolysis and MHC class II function. *Curr Op Immunol.* 10:93-102.
60. Bogyo M. and H.L.Ploegh. 1998. A protease draws first blood. *Nature* 396:625-626.
61. Manoury B, E.W. Hewitt, N. Morrice, P.M. Dando, A.J. Barret and C. Watts. 1998. An asparagyl endopeptidase processes a microbial antigen for class II MHC presentation. *Nature* 396:695-699.
62. Brown, J.H., T.S. Jardetzky, J.C. Gorga, L.J. Staern, R.G. Urban J.L. Strominger and D.C. Wiley. 1993. Three-dimensional structure of the human class I histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* 364:33-39.
63. Roche P.A., M.S. Marks and P.Creswell. 1991. Formation of a nine-subunit complex by HLA class II glycoproteins and the invariant chain. *Nature.* 354:392-394.
64. Gohsp P., M.Amaya, E. Mellins, and D.C. Wiley. 1995. The structure of an intermediate in class II MHC maturation: CLIP bound to HLA-DR3. *Nature* 378:457-462.
65. Bakke, O. and B. Dobberstein. 1990. The MHC class II-associated invariant chain contains a sorting signal for endosomal compartments. *Cell* 63:707-716.
66. Amigorena S., J.R. Drake, P. Webster and I. Mellman. 1994. Transient accumulation of new class II MHC molecules in a novel endocytic compartment in B lymphocytes. *Nature* 369:113-120.
67. Denzin L.K. and P. Cresswell. 1995. HLA-DM Induces CLIP dissociation from MHC class II  $\alpha\beta$  dimers and facilitates peptide loading. *Cell* 82:155-165.
68. Raposo G., H.W. Nijman, W. Stoorvogel, R. Leijendekker, C.V. Harding, C.J.M. Melief and H.J. Geuze. 1996. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J.Exp. Med.* 183:1161-1172.
69. Jonal M., R. Schirmbeck and J. Reimann. 1996. MHC class I-restricted CTL responses to exogenous antigens. *Immunity* 5:295-302.
70. Bevan, M.J. 1995. Antigen presentation to cytotoxic T lymphocytes *in vivo*. *J. Exp. Med.* 182: 639-641.

71. Bevan, M.J. 1976. Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. *J. Exp. Med.* 143, 1283-1288.
72. Bevan, M.J. 1976. Minor H antigens introduced on H-2 different stimulating cells cross-react at the cytotoxic T cell level during *in vivo* priming. *J. Immunol.* 177: 2233-2238.
73. Gooding L.R., and C.B. Edwards. 1980. H-2 antigen requirements in the *in vitro* induction of SV40-specific cytotoxic T lymphocytes. *J. Immunol.* 124: 1258-1262.
74. Hee Lee D. and A.L. Goldberg. 1998. Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologist. *Trends in Cell Biology* 8:397-403.
75. Kovacsovics-Bankowski M. & Rock K.L. 1995. A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science* 26, 243.
76. Pfeifer, J.D., Wick M.J., Roberts R.L., Findlay K., Normark S.J. and Harding C.V. 1993. Phagocytic processing of bacterial antigens for class I MHC presentation to T cells. *Nature* 361, 359.
77. Rock, K.L. 1996. A new foreign policy: MHC class I molecules monitor the outside world. *Immunol Today* 17:131-137.
78. Norbury C.C., L.J. Hewlett, A.R. Prescott, N. Shastri and C. Watts. 1995. Class I presentation of exogenous soluble antigen via macropinocytosis in bone marrow macrophages. *Immunity* 3:783-791.
79. Norbury C.C., B.J. Chambers, A.R. Prescott, H-G Ljunggren and C. Watts. 1997. Constitutive macropinocytosis allows TAP-dependent major histocompatibility complex class I presentation of exogenous soluble antigen by bone marrow-derived dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 27:280-288.
80. Svensson M. and M.J. Wick. 1999. Classical MHC class I peptide presentation of a bacterial fusion protein by bone marrow-derived dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 29:180-188.
81. Sigal L.J., S. Crotty, R. Andino and K. Rock. 1999. Cytotoxic T cell immunity to virus-infected non-haematopoietic cells requires presentation of exogenous antigens. *Nature* 398:77-80.

82. Kima P.E., NH. Ruddle and D. McMahon-Pratt. 1997. Presentation via the class I pathway by *Leishmania amazonensis* -infected macrophages of an endogenous leishmanial antigen to CD8<sup>+</sup> T cells.
83. Reis e Sousa C and R.N. Germain. 1995. Major histocompatibility complex class I presentation of peptides derived from soluble exogenous antigen by a subset of cells engaged in phagocytosis. *J. Exp. Med.* 182:841-851.
84. Song R. and C.V. Harding. 1996. Roles of proteasomes, transporter for antigen presentation (TAP), and  $\beta$ 2-microglobulin in the processing of bacterial or particulate antigens via an alternate class I MHC processing pathway. *J. Immunol.* 156:4182-4190.
85. Bachmann, M.F., Kundig T.M., Freer G., Y. Li, C. Y. Kang, D.H. Bishop, H. Hengartner and R.M. Zinkernagel. 1994. Induction of protective cytotoxic T cells with viral proteins. *Eur. J. Immunol.* 24:2128-2236.
86. Shirmbeck R., K. Melber and J. Reinmann. 1995. Hepatitis B virus small surface antigen particles are processed in a novel endosomal pathway for major histocompatibility complex class I-restricted epitope presentation. *Eur. J. Immunol.* 25:1063-1070.
87. Behar S.M., C.C. Dasher, M.J. Grusby, C-R. Wang and M.B. Brenner. 1999. Susceptibility of mice deficient in CD1D or TAP1 to infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Exp Med.* 189: 1973-1980
88. Harding C.V, Song R. 1994. Phagocytic processing of exogenous particulate antigens by macrophages for presentation by class I MHC molecules. *J. Immunol.* 153:4925-4933.
89. Gonzalez C, Hone D, Noriega FR, Tacket CO, et al. 1994. *Salmonella typhi* vaccine strain CVD 908 expressing the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum*: strain construction and safety and immunogenicity in humans. *J Infect Dis.* 169:927-931.
90. Aggarwal A., Kumar S, Jaffe R, Hone D, Gross M, Sadoff J. 1990. Oral *Salmonella*: malaria circumsporozoite recombinants induce specific CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cells. *J. Exp. Med.* 172:1083-1090.
91. Kärre K, Ljunggren HG, Piontek G, Kiessling R. 1986. Selective rejection of H-2 deficient lymphoma variants suggests alternative immune defense strategy. *Nature.* 319:675-678.



92. Rock KL, Rothstein L, Gamble S. 1990. Generation of class I MHC-restricted TT hybridomas. *J. Immunol.* 143:804-811.
93. Walker W, Demus A. 1975. Antibody-dependent cytolysis of chicken erythrocytes by an in vitro established line of mouse peritoneal macrophages. *J. Immunol.* 114:765-769.
94. Koren HS, Handwerker BS, Wunderlich JR. 1975. Identification of macrophage-like characteristics in a cultured murine tumor line. *J. Immunol.* 114:894-897.
95. Ralf P, Prichard J, Cohn M. 1975. Reticulum cell sarcoma: an effector cell in antibody-dependent cell mediated immunity. *J. Immunol.* 114:895-905.
96. Plaut M, Lichtenstein LM, Gillespie E, Henney C. 1973. Studies on the mechanism of lymphocyte-mediated cytolysis. *J Immunol.* 111:389-394.
97. Gillis S, Smith KA. 1975. Long term culture of tumor-specific cytotoxic T cells. *Nature.* 268:154-156.
98. Miller SI., Kukral A.M., Mekalanos J.J. 1989. A two component regulatory system (*phoP phoQ*) controls *Salmonella typhimurium* virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:5054-5058.
99. Tam J.P. 1988. Synthetic peptide vaccine design: Synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85:5409-5413.
100. Atherton E., Logan C.J. and Sheppard R.C. 1980. Peptide synthesis. Part 2. Procedures for solid-phase synthesis using N(-Fluorenylmethoxycarbonylamino)-acids on polyamide supports. Synthesis of substance P and of acyl carrier protein 65-74 decapeptide. *J.C.S. Perkin I.* 538-545.
101. Smith M.H., Parker J.M.R., Hodges R.S. and Barber B.H. 1986. The preparation and characterization of anti-peptide heteroantisera recognizing subregions of the intracytoplasmic domain of class I H-2 antigens. *Molec. Immunol.* 23:1077-1092.
102. Buchmeier NA and Heffron F. 1989. Intracellular survival of wild-type *Salmonella typhimurium* and macrophage-sensitive mutants in diverse populations of macrophages. *Infect. Immun.* 57:1-7.
103. Harlow E and Lane David. 1988. Metabolic labeling of bacteria with radioactive amino acids. In *Antibodies. A Laboratory Manual.* Ed. Cold Spring Harbor Laboratory. Chapter 11: 442. United States of America.

104. Moore MW, Carbone FR, Bevan MJ. 1988. Introduction of Soluble Protein into the class I pathway of antigen processing and presentation. *Cell*. 54:777-785.

105 . Wunderlich J, Shearer G. Induction and measurements of of cytotoxic T lymphocyte activity. *Current Protocols in Immunology*, 2nd ed. Ed:Coligan JE, Kruisbeek A.M., Margulies D., Sevak EM., Strober W. New York. NY: Green Publishing Associates, Inc and John Wiley & Sons, Inc., 1992. 1:3.11.1.

106 . Bottomly K., Davis L., Lipsky P.E. 1994. Measurement of Human and Murine Interleukin- 2 and Interleukin-4. In *Current Protocols in Immunology*. Coligan J., Kruisbeek A.M., Margulies D.H., Shevak E.M., Strober W. Eds. Greene Publishing Associates, Inc and John Wiley & Sons, Inc. Pags. 6.3.1. - 6.3.5. United States of America.

107. Harlow E and Lane David. 1988. Immunoblotting. In *Antibodies. A Laboratory Manual*. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory. Chapter 12:479-506. United States of America.
108. Esquivel, F. Yewdell J and Bennik J. 1992. RMA/S cells present endogenously synthesized cytosolic proteins to class I restricted cytosolic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 175:163-168.
- 
109. Rosenberg C.M., Scott M.G., Gold M.R., Hancock R.E.W. and Finaly B.B. 2000. *Salmonella typhimurium* infection and lipopolisaccharide stimulation induce similar changes in macrophage gene expression. *J.Immunol.* 164:5894-5904.
110. Elhofy A. and Bost K.L.. 1999. Limited interleukin-18 rsnse in *Salmonella*-infected murine macrophages and in *Salmonella* -infected mice. *Infect. and Immun.* 67: 5021-5026.
111. Lippincott-Schwartz, Yuan L., Tipper Ch, Amherdt M. Orci L and Klausner R.D. 1991. Brefeldin A's effects on endosomes, lysosomes, and the TGN suggest a general mechanism for regulating organelle structure and membrane traffic. *Cell.* 67: 601-616.
112. Donaldson J.G. Finazzi D. and Klausner R.D. 1992. Brefeldin A inhibits Golgi membrane -catalysed exchange of guanine nucleotide onto ARF protein. *Nature* 360:(6402):350-352.
- 113 . Zhang Q., Cox D., Tseng C.C., Donaldson J.G.and Greenberg S. 1998. A requirement for ARF6 in Fc $\gamma$  receptor-mediated phagocytosis in macrophages. *J. Biol. Chem.* 273:19977.
114. Alpuche-Aranda CM., Raccoosin EL., Swanson JA. And Miller SI. 1994. *Salmonella* stimulate macriophage macripinocytosis and persist within spacious phagosomes. *J. Exp Med.* 179:601-608.
115. Hashim Sh, Mukherjee K, Raje M, Basu SK and Mukhopadhyay A. 2000. Live *Salmonella* modulate exptession of Rab proteins to persist in a specialized compartment and escape transport to lysosomes. *J. Biol. Chem.* 275:16281-16288.
- 116 . Sonnichsen, B., De Renzis S, Nielsen E, Rietdorf J and Mariano Zerial. 2000. Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4,Rab5 and Rab 11. *J. Cell. Biol.* 901-913.

- 
17. Ishibashi Y, Arai T. 1990. Effect of gamma interferon on phagosome –lysosome fusion in *Salmonella typhimurium*-infected murine macrophages. *FEMS Microbiol Immunol Sep*;2(2):75-82.
18. Montaner L.J., Da Silva R.P., Sun J, Sutterwala Sh., Hollinshead M. Vaux D and Gordon S. 1999. Type 1 and type 2 cytokine regulation of macrophage endocytosis:differential activation by IL-4/IL-13 as opposed to IFN- $\gamma$  or IL-10. *J. Immunol.* 162: 4606-4613.
19. Platt N., Da Silva R.P. and Gordon S.1998. Recognizing death: the phagocytosis of apoptotic cells. *Trends Cell Biol* 8:365.
20. Steinman, R.M., Turley S., Mellman I. and Inaba K. 2000. The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic bodies. *J. Exp. Med.* 191: 411.
21. Griffith T.S., Wiley S.R. Kubin M.Z., Sedger L.M., Maliszewski C. R. Fanger N.A. 1999. Monocyte-mediated tumoricidal activity via the tumor necrosis factor-related cytokine TRAIL. *J.Exp. Med.* 189:1343-1353.

## 11. PUBLICACION

## Macrophages present exogenous antigens by class I major histocompatibility complex molecules via a secretory pathway as a consequence of interferon- $\gamma$ activation

NATALIA MARTÍN-OROZCO,\*<sup>‡</sup> ARMANDO ISIBASI\* & VIANNEY ORTIZ-NAVARRETE† \*Unidad de Investigación Médica en Inmunología, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional SXXI Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexico, and †Departamento de Biomedicina Molecular, Colonia San Pedro Zacatenco, Mexico

### SUMMARY

Macrophages can process and present exogenous antigens on major histocompatibility complex (MHC) class I molecules through an alternative mechanism involving the internalization of antigens and the secretion of peptides loading MHC class I molecules at the cell surface. In this paper, we found that interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )-activated macrophages infected with *Salmonella typhimurium* secreted peptides able to load empty MHC K<sup>b</sup> molecules on co-cultured TAP-2-deficient RMA-S cells, added as targets for peptide loading. The increase in class I K<sup>b</sup> on the RMA-S cells, resulting from the macrophage-derived peptides, exhibited a comparable stability as the direct addition of an exogenous K<sup>b</sup>-binding peptide (OVA<sup>257–264</sup>) to the RMA-S cells. In both cases, the K<sup>b</sup> complexes were stable for at least 3 hr after separating the RMA-S cells from the macrophages. The endosomal inhibitors, leupeptin and ammonium chloride, did not inhibit the release of peptides and the increase in K<sup>b</sup> staining on the RMA-S cells in the co-culture systems. Brefeldin A also had no effect. P815 cells previously co-cultured with *Salmonella*-infected macrophages became targets for cytotoxic T lymphocytes isolated from *Salmonella*-infected BALB/c mice. Taken together, our data suggest that IFN- $\gamma$ -activated macrophages process exogenous antigens in an intracellular compartment where serine proteases generate peptides released to the external environment for loading empty MHC class I molecules at the cell surface. This TAP-independent mechanism for the MHC class I presentation may be involved in priming cytotoxic T lymphocytes against intracellular pathogens *in vivo*.

### INTRODUCTION

Macrophages are the host cell of *Salmonella* and the main site for bacterial proliferation and survival during an infection.<sup>1</sup> The ability of the macrophages to kill *Salmonella* during early infection determines the outcome of the disease.<sup>2</sup> Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) potently stimulates a number of macrophage effector activities, including receptor expression, phagocytosis, antigen presentation and oxidative and nitric oxide (NO) burst.<sup>3</sup> During *Salmonella* infection, IFN- $\gamma$  greatly strengthens the capacity of macrophages to clear circulating bacteria and

present bacterial antigens to T cells.<sup>4</sup> Another quality of macrophages is their ability to present exogenous antigens on major histocompatibility complex (MHC) class I molecules in order to activate CD8<sup>+</sup> T cells.<sup>5</sup> Macrophages can use the classical TAP (transporter associated with antigen processing)-dependent endogenous pathway, or a pathway involving the release of antigenic peptides into the external media.<sup>6</sup> In the classical pathway, soluble exogenous antigens entering the cytoplasm are processed by the proteasome complex into peptides like other cytosolic proteins.<sup>7</sup> Here, the dimer of TAP transports the peptides generated in the cytosol into the endoplasmic reticulum lumen, where loading of the peptide on class I MHC occurs via bridging with tapasin.<sup>8,9</sup> After the peptide-heavy chain- $\beta_2$  microglobulin ( $\beta_2m$ ) complex is assembled, it is transported to the cell surface. This mechanism is greatly reduced in macrophages from TAP-deficient mice and is inhibited in normal bone marrow macrophages by brefeldin A (BFA) and proteasome inhibitors.<sup>7</sup> Nevertheless, TAP-1-deficient macrophages can process *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, or polystyrene beads containing the

Received 26 April 2000; revised 3 January 2001; accepted 31 January 2001

<sup>‡</sup>Present address: Immunology and Immunogenetics, Joslin Diabetes Center, Boston, MA 02215, USA

Correspondence: Dr Vianney Ortiz-Navarrete, Departamento de Biomedicina Molecular, Cinvestav, Avenida Instituto Politécnico Nacional #2508, Colonia San Pedro Zacatenco, Mexico, DF 07320, Mexico. E-mail: vortiz@mail.cinvestav.mx

OVA(257-264) epitope for presentation on K<sup>b</sup>.<sup>10</sup> TAP-1-deficient macrophages can also present peptides from the recombinant glycoprotein and nucleoprotein of lymphocytic choriomeningitis virus and the nucleoprotein of vesicular stomatitis virus on their MHC class I, suggesting that alternative TAP-independent presentation pathways exist.<sup>11</sup>

The pathway leading to secretion of antigenic peptides by macrophages involves sequestration of the internalized antigen in the phagosome; here peptides from the internalized material can be generated and then released to the surface to load empty MHC class I molecules. This pathway has been found to be resistant to BFA and to proteasome inhibitors.<sup>5,12,13</sup> Empty class I molecules can be loaded externally with natural or synthetic peptides. They can also be stabilized with  $\beta_2m$  found in the serum.<sup>14-16</sup> In this secretory pathway it is unclear exactly where antigen degradation takes place, and whether the released peptides are the same as those generated by proteasomes. Another uncertainty is whether the released peptides can be loaded into empty class I MHC on neighbouring cells or in the same cell inside endosomes.

In the study presented here, we provide evidence for the participation of a release pathway in the generation of peptides from internalized *Salmonella typhimurium*. Our results suggest that when macrophages are activated by IFN- $\gamma$  and infected with *Salmonella typhimurium* they are able to secrete peptides from phagocytosed material that load empty class I molecules on the surface of the macrophage or on neighbouring cells. The previously empty molecules loaded with the secreted peptides were stable on the surface of the cells for several hours and were recognized by antigen-specific cytotoxic T cells previously primed *in vivo*.

## MATERIALS AND METHODS

### Mice

Female BALB/c mice (8-12 weeks old) were obtained from the Mexican Children's Hospital (Mexico City, Mexico).

### Bacteria

*Salmonella typhimurium* strain LT2 was donated by Dr C. Alpuche (Experimental Medicine, UNAM, Mexico City, Mexico). The bacteria were grown in brain-heart infusion (Difco, Detroit, MI) for 3 hr at 37° until they reached logarithmic phase and were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) before the infection.

### Cells

Dr G. J. Hammerling (German Cancer Research Centre, Heidelberg, Germany) donated RMA-S and RMA cells.<sup>17</sup> IC21 macrophages (H-2<sup>b</sup>),<sup>18</sup> J774 macrophages (H-2<sup>b</sup>),<sup>19</sup> P815 mastocytoma (H-2<sup>d</sup>)<sup>20</sup> and L929 fibroblast (ATCCCL-1) were all obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD). The L-1210 cells were donated by Dr Cesar Gonzalez (Hospital La Raza, Mexico City). All cells were grown in RPMI-1640 supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 50  $\mu$ M 2-mercaptoethanol, 2 mM L-glutamine and 1 mM sodium pyruvate (Gibco-BRL, Long Island, NY) without antibiotic. The designation, RP-10, refers to the media mentioned above. Gentamycin (at 20  $\mu$ g/ml; Boehringer Mannheim, Mexico City) was added to the infected macrophages to control the growth of extracellular bacteria.

### Antibodies

Y3 hybridoma (anti-K<sup>b</sup>)<sup>21</sup> was donated by Dr G. J. Hammerling and M1/70-15.11.5 hybridoma (anti-Mac-1) was obtained from ATCC. Hybridomas were grown in RP-10 with antibiotics (100  $\mu$ g/ml streptomycin and 100 U/ml penicillin G). The monoclonal antibody (mAb) Y-3 was affinity-purified in a Protein A-Sepharose column (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) and was conjugated to biotin using Sulpho-N-hydroxysuccinimide-Biotin (Pierce, Rockford, IL) in carbonate buffer according to the manufacturer's instructions. Streptavidin-phycoerythrin (PE) conjugate, goat anti-rat antibody-fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugate and goat anti-mouse antibody-FITC conjugate were purchased from Gibco-BRL.

### Peptides

*Salmonella* peptides were obtained from an extraction of total membrane and cytosolic proteins<sup>22</sup> treated with 1% trypsin as described by Moore *et al.*<sup>23</sup> OVA peptide 257-264 (SIINFEKL) was synthesized by solid-phase Fmoc-peptide synthesis in an ABI 430-A automated synthesizer (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA) and purified by reverse-phase high-performance liquid chromatography in a C18 column (Millipore, Bedford, MA).

### Macrophage infection and RMA-S co-cultures

In order to activate macrophages,  $2 \times 10^5$  IC21 or J774 macrophages were cultivated for 48 hr in 12-well Costar plates (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) with 20 U/ml of IFN- $\gamma$  or 20% of L-1210 supernatant (containing IFN- $\gamma$ ) in antibiotic-free medium. The macrophages were gently washed to remove the IFN- $\gamma$  from the media and to eliminate any dead cells. The macrophages were then infected by adding a ratio of 100 bacteria (LT2 strain) per macrophage and the plate was centrifuged at 1000 g for 5 min at room temperature.<sup>24</sup> The plates were incubated for 30 min at 37°, and the extra cellular bacteria were removed by four washes with warm PBS. RMA-S cells were then added to the macrophage monolayer at a ratio of 1:1. The co-culture was incubated in RP-10 supplemented with 20  $\mu$ g/ml gentamycin (RP-10-gentamycin) at 37° for 18 hr. Following the incubation period, RMA-S cells were harvested and washed with PBS before immuno-staining.

### Co-cultures in the presence of inhibitors

IFN- $\gamma$ -activated macrophage monolayers were treated with 1  $\mu$ M of leupeptin (Boehringer Mannheim, Mexico City) or 20 mM of ammonium chloride (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI) for 30 min at 37° before infection with *Salmonella*. All other procedures were performed as described above, except that more leupeptin and ammonium chloride was added with the RMA-S cells to keep the endosome inhibitor concentration constant during 18 hr of incubation time. As control, cells were incubated for 18 hr with the inhibitors at the same concentration. BFA (Boehringer Mannheim) was added to the final co-cultures with RMA-S cells where indicated, at a final concentration of 1  $\mu$ g/ml. RMA-S control cells were incubated under the same conditions as described above.

### Flow cytometric analysis

MHC class I K<sup>b</sup> molecules were stained on the surface of RMA-S and IC21 cells using biotin-conjugated Y3

mAb and counter-stained with streptavidin-PE conjugate. Contaminating macrophages in the RMA-S samples were stained with mAb Mac-1 and revealed with a FITC-conjugated goat anti-rat antibody. Cells were analysed using a FACScan<sup>®</sup> cytometer and Lysis II<sup>®</sup> software (Becton Dickinson, Mountain View, CA). Dead cells were detected using propidium iodide (Sigma-Aldrich) and were gated out during the analysis.

**Salmonella labelling and immunoprecipitation of K<sup>b</sup> molecules**  
*Salmonella typhimurium* LT2 was grown in M9 medium and labelled with <sup>3</sup>H-labelled leucine, <sup>3</sup>H-labelled alanine, <sup>3</sup>H-labelled valine and <sup>3</sup>H-labelled phenylalanine (NEN Life Science, Boston, MA) for 1 hr. After three washes with PBS, the labelled bacteria was used to infect  $1 \times 10^7$  IC21 macrophages followed by co-culture with RMA-S in RP-10-gentamycin as described above. After an 18-hr incubation period, the RMA-S cells and the macrophages were harvested and lysed with 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 1% Nonidet P-40, 150 mM NaCl, 1 mM ethylenediamine tetraacetic acid, 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride, leupeptin and aprotinin. K<sup>b</sup> class I MHC protein was immunoprecipitated using Y3 mAb (20  $\mu$ g); W6-32 was used as an irrelevant mAb control. The peptides were eluted from the complexes using 10% acetic acid and boiling for 2 min. The released K<sup>b</sup> peptides were separated from the MHC protein by filtration using Centrprep-10 (Millipore), and the amount of radioactivity was determined using a  $\beta$ -scintillation counter (Beckman Instruments, Irvine, CA).

**Cytotoxic T lymphocyte assay**  
BALB/c mice were sublethally infected with *Salmonella typhimurium* LT2 (10 bacteria/mouse injected intraperitoneally every 10 days for 1 month). Spleens were harvested and isolated splenocytes were stimulated with 100  $\mu$ g/ml of *Salmonella* peptides for 5 days *in vitro*. P815 cells co-cultivated for 18 hr with *Salmonella*-infected IC21 macrophages were used as cytotoxic T lymphocytes (CTL) targets in a <sup>51</sup>Cr-release assay.<sup>25</sup> Target cells ( $1 \times 10^3$  cells) were incubated for 4 hr with different numbers of CTL effectors in 96-well round-bottom plates, in a final volume of 200  $\mu$ l/well of complete medium. Supernatants were harvested mechanically using a supernatant collection system (Skatron Instruments, Sterling VA). Supernatant radioactivity was measured in a gamma-counter (Beckman Instruments). Per cent specific release was calculated from the mean of triplicate cultures according to the following formula: % specific release =  $100 \times [(\text{experimental release} - \text{spontaneous release}) / (\text{maximal release} - \text{spontaneous release})]$ .

#### Statistical analysis

The mean fluorescence channel of RMA-S cells from infected and non-infected macrophages was compared by non-parametric Wilcoxon signed-rank test for paired samples using SPPSS 9.0 statistical software.

## RESULTS

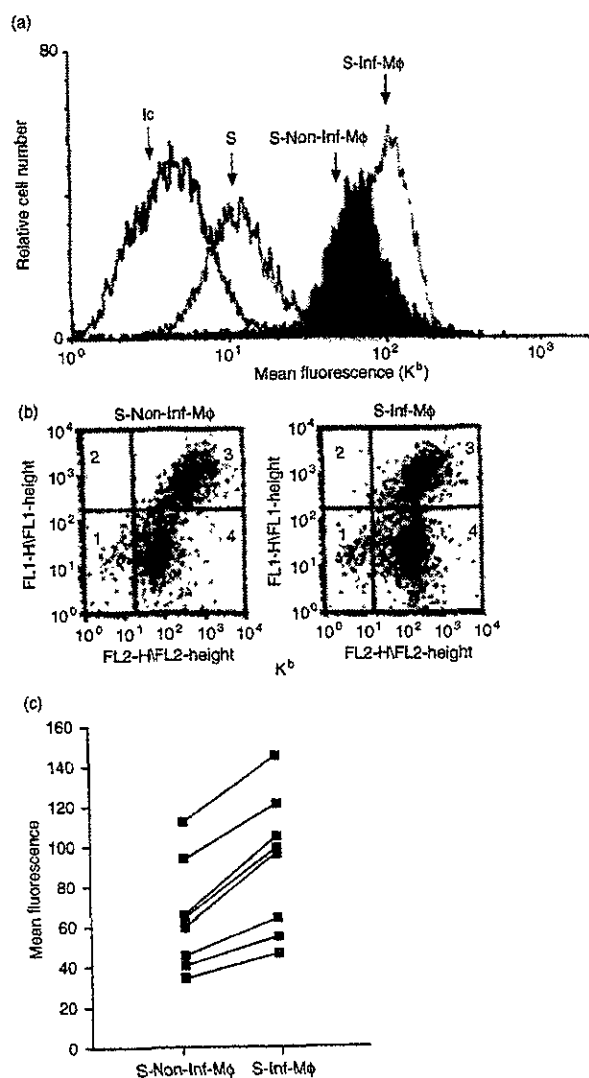
### Macrophages secrete peptides that load empty class I K<sup>b</sup> molecules

We determined whether IFN- $\gamma$ -activated macrophages were able to secrete peptides into the external medium. After 48 hr

of activation with IFN- $\gamma$ , the IC21 cells were washed to remove any free IFN- $\gamma$  and RMA-S cells were added and incubated with the washed macrophages for 18 hr. Class I K<sup>b</sup> molecule expression on the surface of the RMA-S cells was then determined by indirect immunofluorescence using the Y3 mAb (recognizing only peptide-loaded K<sup>b</sup> molecules). As seen in Fig. 1(a), co-cultures with *Salmonella*-infected macrophages increased the expression of detectable K<sup>b</sup> complexes on the RMA-S cells [mean fluorescence channel (MFC) of 150 compared to a MFC of 17 on RMA-S cells alone]. Any contaminating macrophages (Mac-1 and K<sup>b</sup> double-positive stained cells, Fig. 1b, quadrant 3 of each dot plot) within the RMA-S samples were excluded from the analysis. Interestingly, co-culture with non-infected, IFN- $\gamma$ -activated macrophages also increased RMA-S surface K<sup>b</sup> expression but not to the same extent as when the macrophages were previously infected with *Salmonella*. As seen in Fig. 1(c), this up-regulation of K<sup>b</sup> on RMA-S cells showed some variation, probably due to the efficiency of *Salmonella* infection between experiments. However, according to statistical analysis using the non-parametric Wilcoxon test for paired samples, in fact IFN- $\gamma$ -activated *Salmonella*-infected macrophages secreted more peptides than the IFN- $\gamma$ -activated non-infected macrophages ( $P=0.012$ ). No increase in K<sup>b</sup> expression was observed when RMA-S cells alone were incubated with bacteria (data not shown). As a control, macrophages were fixed with formaldehyde immediately after the infection with *Salmonella*; under these conditions no increase in K<sup>b</sup> staining in RMA-S cells was found (data not shown). Thus, macrophages co-cultured with RMA-S cells induced an increase in class I MHC K<sup>b</sup> molecule expression on the RMA-S cells, especially after bacterial infection, suggesting that peptides secreted from the macrophage load empty class I molecules on neighbouring cells.

In order to determine whether the increase in K<sup>b</sup> staining on RMA-S cells after co-culture with infected macrophages was due to released peptides of bacterial origin, *Salmonella* were first labelled with <sup>3</sup>H-labelled alanine, leucine, valine and phenylalanine (amino acids often used as anchor residues in optimal peptides that bind K<sup>b</sup> molecules). The labelled bacteria were washed and used to infect the macrophages. The macrophages infected with radiolabelled bacteria were co-cultured with RMA-S cells as before. Following co-culture, the RMA-S cells and macrophages were isolated separately and class I MHC K<sup>b</sup> molecules were immunoprecipitated from lysates of the two cell populations using Y3 mAb; the radioactivity was then determined in the peptides eluted from the immunoprecipitates. The same elution procedure was performed with immunoprecipitates of an isotype-matched non-K<sup>b</sup>-specific mAb (W632) as a control and the radioactivity was subtracted from the amount recovered from the peptides eluted from the Y3 immunoprecipitates. In these experiments  $300 \pm 10$  counts per min (c.p.m.) and  $1000 \pm 40$  c.p.m. (average of three experiments) were recovered from RMA-S cells and macrophages, respectively. The background levels of W632 mAb immunoprecipitations were 44 c.p.m. for the RMA-S and 100 c.p.m. for the macrophages (these values were subtracted). Thus, at least some of the loaded peptides binding to class I MHC on the TAP-deficient RMA-S cells were of bacterial origin.





**Figure 1.** Macrophages secrete peptides that load empty  $K^b$  molecules on the surface of RMA-S cells. IC21 macrophages were pretreated with 20 U/ml of IFN- $\gamma$  for 48 hr and then infected at an ratio of 100 bacteria (*Salmonella typhimurium* LT2) per macrophage. RMA-S cells were then added to the washed macrophage monolayer at a ratio of 1:1. RMA-S cells were harvested after 18 hr incubation period and immunostained using anti- $K^b$  mAb Y3-biotin and streptavidin PE. Contaminant macrophages in the RMA-S samples were stained using mAb M1/70.15.11.5 (anti-Mac-1) and anti-rat-FITC (dot plot). (a) The histograms show RMA-S stained with an isotype-control antibody (Ic),  $K^b$  expression on RMA-S cultured alone (S) and  $K^b$  expression on the gated population of RMA-S cells from co-culture with non-infected macrophages (S-Non-Inf-M $\phi$ ) and with infected macrophages (S-Inf-M $\phi$ ). (b) The dot blot shows co-culture population: macrophages quadrant 3 and RMA-S gated population on quadrant 4. (c) Graphic lines present the significant increase of mean fluorescence channel of RMA-S from infected macrophages (S-Inf-M $\phi$ ) compared to the non-infected macrophage (S-Non-Inf-M $\phi$ ) in eight different experiments. ( $P = 0.012$  according to Wilcoxon test for paired samples).

**Table 1** The macrophages require activation by IFN- $\gamma$  for secretion of peptides

Co-culture conditions				$K^b$ expression on RMA-S		
RMA-S	IC-21	IFN- $\gamma$	<i>Salmonella</i>	I	Y3	Y3-1
+	+	-	-	10.3	24.5	14.2
+	+	-	+	10.7	48.9	38.2
+	+	+	-	8.8	61.2	52.4
+	+	+	+	12.4	71.3	58.9

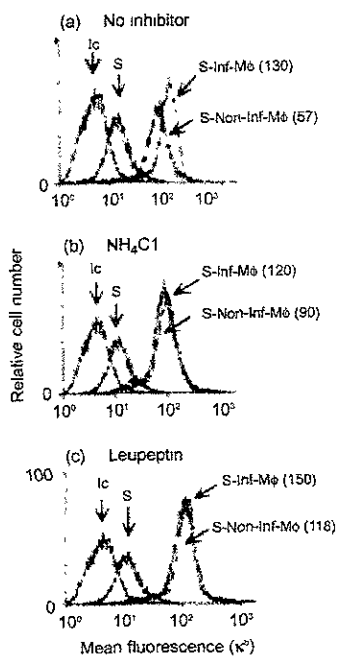
Results are shown as the Mean Fluorescence Channel (MFC). Co-cultures were carried out as described in Fig. 1. When indicated, 20 U/ml of IFN- $\gamma$  was used to activate macrophages during 48 hr. I, isotype control antibody; Y3, antibody against  $K^b$  molecules. The MFC of RMA-S  $K^b$  expression, with and without IFN- $\gamma$ , was 16.3, that of IC21  $K^b$  expression was 507.30 and after IFN- $\gamma$  activation it was 602.80.

#### IFN- $\gamma$ activation and *Salmonella* infection of macrophages promotes the secretion of peptides

We examined whether the activation of macrophages by IFN- $\gamma$  played a significant role in the observed secretion of class I-loading peptides following *Salmonella* infection. IC21 cells were treated with or without IFN- $\gamma$  for 48 hr, washed, and then infected with bacteria before co-culture with RMA-S cells. The activity of the IFN- $\gamma$  preparation used was confirmed by the increase in class I MHC staining on the macrophages themselves (Table 1). After 18 hr of co-culture, the expression of  $K^b$  molecules on the RMA-S cells was evaluated after separation from the macrophages. Non-IFN- $\gamma$ -activated macrophages, in the absence of *Salmonella* infection, were unable to induce an increase in  $K^b$  expression on the RMA-S cells (Table 1). In contrast, when macrophages were treated with IFN- $\gamma$  prior to RMA-S co-culture, an increase in  $K^b$  molecules was observed, which was significantly enhanced if the macrophages were also infected with *Salmonella*. However, *Salmonella* infection of non-IFN- $\gamma$ -activated macrophages caused only a slight increase in  $K^b$  expression on the co-cultured RMA-S cells. Thus, IFN- $\gamma$  activation was required for macrophages to secrete class I  $K^b$ -loading peptides from endocytosed material.

#### Endosomal inhibitors do not affect peptide release

We next determined whether the generation of secreted peptides loading class I  $K^b$  molecules following *Salmonella* infection required proteolytic activity from an endosomal-lysosomal compartment of the macrophages. To test this we treated IC21 macrophages with ammonium chloride (prevents lysosomal functions), or leupeptin (a serine and thiol protease inhibitor) before *Salmonella* infection and during the co-culture with RMA-S cells. RMA-S culture alone in the presence of these inhibitors did not produce any change in their  $K^b$  expression. The increase in RMA-S  $K^b$  staining from the co-culture with infected macrophages was not affected by leupeptin or ammonium chloride treatment. Interestingly, the non-infected controls showed increased  $K^b$  expression on RMA-S cells (Fig. 2). Thus, leupeptin and ammonium chloride did not affect *Salmonella*-infected macrophage  $K^b$  peptide secretion and seemed to increase the processing of soluble proteins from the culture media.

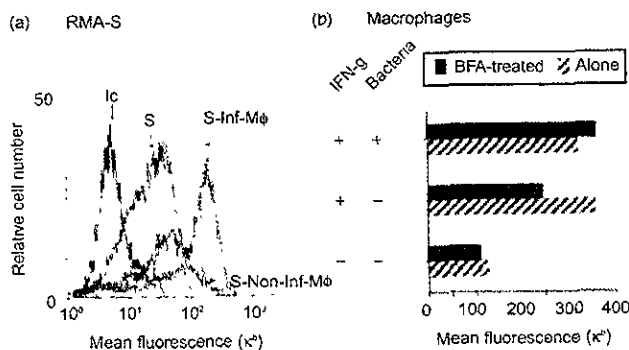


**Figure 2.** Proteolytic endosomal inhibitors partially decrease the secretion of  $K^b$  peptides from *Salmonella*-infected macrophages. IFN- $\gamma$ -activated macrophage monolayers were treated with: (a) no inhibitor (b) 20 mM ammonium chloride, or (c) 1 mM leupeptin for 30 min at 37° before infection with *Salmonella*. The co-cultures with RMA-S were performed as described in Fig. 1 Both ammonium chloride and leupeptin were also added at the time of co-culture initiation. As control, RMA-S alone were also treated with the inhibitors for 18 hr. MHC class I  $K^b$  expression on RMA-S cells was analysed by FACS staining as described in Fig. 1. The histograms show RMA-S stained with an isotype-control antibody (Ic),  $K^b$  expression on RMA-S cultured alone (S) and  $K^b$  expression on the gated population of RMA-S cells from co-culture with non-infected macrophages (S-Non-Inf-M $\phi$ ) and with infected macrophages (S-Inf-M $\phi$ ) RMA-S cells from the co-cultured with macrophages. The results from one of six experiments are shown. Values in parenthesis correspond to mean fluorescence channel.

**BFA does not inhibit the generation of  $K^b$ -loading peptides following *Salmonella* infection**

BFA blocks protein transport into the Golgi apparatus. It generates redistribution of the Golgi into the endoplasmic reticulum, inhibiting vesicle traffic to the cell surface. However, it does not inhibit recycling of endosomes at the membrane level (e.g. recycling of transferrin receptor).<sup>26</sup> We treated the RMA-S and IFN- $\gamma$ -activated macrophage co-cultures with BFA for 18 hr before the fluorescence-activated cell sorter (FACS) analysis of  $K^b$  molecules. We first asked whether the generation and secretion of peptides by macrophages after *Salmonella* infection involved the exportation of vesicles coming from the Golgi; and second whether the secreted peptides loaded preformed MHC class I molecules on the surface of the RMA-S. Interestingly, we found that RMA-S cells co-cultured with *Salmonella*-infected macrophages still showed an increase in  $K^b$  molecules in the presence of BFA (Fig. 3a) over that seen with RMA-S control cells treated with BFA or RMA-S cells co-cultured with non-infected macrophages treated with BFA. Thus, the macrophages release *Salmonella* peptides from the phagosomes and not from material contained in vacuoles coming from the endoplasmic reticulum. In addition, the secreted peptides load preformed class I molecules on the surface of RMA-S.

We also determined the level of  $K^b$  expression on the macrophages used in the experiment shown in Fig. 3(a). In the absence of bacterial infection, IFN- $\gamma$  induced an increase in  $K^b$  expression on the macrophages, as expected. This increase was markedly inhibited with BFA. This confirms that the BFA was active in our culture system inhibiting the endogenous pathway of MHC class I shuttling to the cell surface. Interestingly, infection of macrophages with *Salmonella* also induced an increase in  $K^b$  expression on the macrophages themselves, even in the presence of BFA in the culture. Thus, it seems that the secreted peptides load any possible empty molecules on the surface of the macrophages. Alternatively, the *Salmonella* inside the phagosomes may prevent the internalization of class I molecules on the surface of the macrophage.



**Figure 3.** (a) Brefeldin A does not inhibit the secretion of  $K^b$ -loading peptides. RMA-S and IC21 macrophage co-cultures were treated with 1  $\mu$ g/ml of BFA for a period of 18 hr. RMA-S controls were treated with BFA as well.  $K^b$  expression on harvested RMA-S cells was analysed as described in Fig. 1. The histograms show RMA-S stained with an isotype-control antibody (Ic),  $K^b$  expression on RMA-S cultured alone (S) and  $K^b$  expression on the gated population of RMA-S cells from co-culture with non-infected macrophages (S-Non-Inf-M $\phi$ ) and with infected macrophages (S-Inf-M $\phi$ ). (b)  $K^b$  expression was also determined on the IC21 macrophages.

**Table 2** Only phagocytic secrete peptides that load MHC class I molecules

Co-culture	K <sup>b</sup> expression on RMA-S		
	I	Y3	Y3-I
RMA-S	2.28	18.04	15.76
RMA-S+I929	3.4	13.02	9.62
RMA-S + infected I929	3.05	14.14	11.09
RMA-S peritoneal macrophages	4.15	33.19	29.04
RMA-S + infected peritoneal macrophages	3.89	45.35	41.46
RMA-S+J774	2.95	48.2	45.25
RMA-S + infected J774	2.67	66.31	63.64
RMA-S	7.98	30.59	22.61
RMA-S+A20	9.41	29.08	19.67
RMA-S+ infected A20	4.13	28.94	24.81

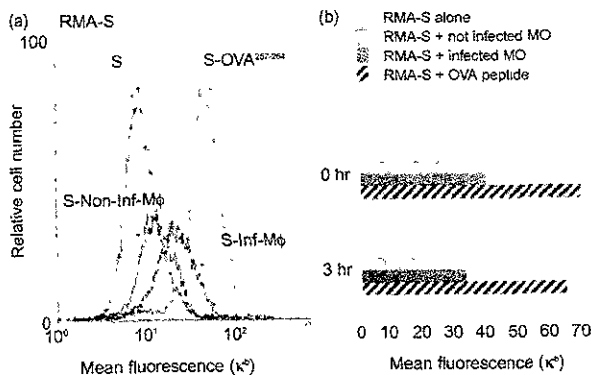
Results are shown as the mean fluorescence channel. Co-cultures were performed as described in Fig. 1. I929, peritoneal macrophages from BALB/c mice. J774 and A20 were treated with IFN- $\gamma$  for 48 hr and infected with *Salmonella typhimurium* at ratio of 100 bacteria per cell. I, isotype control antibody, Y3, antibody against K<sup>b</sup> molecules.

**Only phagocytic cells are able to secrete peptides that load empty class I molecules**

We determined whether cell types other than macrophages, treated with IFN- $\gamma$ , were able to induce an increase in K<sup>b</sup> expression on RMA-S cells following co-culture. In these experiments (Table 2), only peritoneal macrophages and infected or non-infected macrophage cell lines (J774 and IC21 shown in Fig. 1) were able to induce an increase in K<sup>b</sup> expression on co-cultured RMA-S cells. In contrast, L929 fibroblasts and A20 B lymphoma cells did not induce any significant differences in K<sup>b</sup> expression. In these experiments we also found that activated peritoneal macrophages in primary culture could also induce an increase in K<sup>b</sup> molecules on the surface of co-cultured RMA-S cells after infection with *Salmonella* (Table 2 and data not shown).

**Empty class I molecules loaded with peptides secreted by infected macrophages stay on the surface for several hours**

Only added octamer or nonamer peptides which contain anchor-motif amino acids in their sequence are able to stabilize MHC class I molecules on the cell surface.<sup>16</sup> Therefore we examined the stability of the increased K<sup>b</sup> expression on the surface of RMA-S cells after incubation with infected macrophages. In these experiments the RMA-S cells were isolated after 18 hr co-culture with infected macrophages, washed twice and cultured for an additional 3 hr before determination of K<sup>b</sup> expression using flow cytometry. The OVA<sup>257-264</sup> peptide was used as a positive control for an octamer K<sup>b</sup>-binding peptide. Addition of OVA<sup>257-264</sup> led to a large increase in MHC class I K<sup>b</sup> expression on the RMA-S cells, which was stable for at least 3 hr after washing the cells to remove unbound peptide (Fig. 4). Similarly, no significant decrease in K<sup>b</sup> fluorescence intensity on RMA-S cells was found in co-cultures containing *Salmonella*-infected macrophages after the additional 3 hr. The overall staining intensity was lower than that obtained with exogenous free OVA peptide (Fig. 4), owing to the high amounts of exogenous OVA peptide



**Figure 4.** (a) The secreted peptides stabilize empty class I molecules. IC21 macrophages were co-cultured with RMA-S cells for 18 hr as described in Fig. 1. Afterward the RMA-S were harvested (0 hr) and washed three times with PBS and cultured alone for three additional hours at 37<sup>o</sup> (3 hr). MHC class I K<sup>b</sup> expression on RMA-S cells was analysed by FACS staining as described in Fig. 1. The histograms show RMA-S stained with an isotype-control antibody (Ic), K<sup>b</sup> expression on RMA-S cultured alone (S) and K<sup>b</sup> expression on the gated population of RMA-S cells from co-culture with non-infected macrophages (S-Non-Inf-M $\phi$ ) and with infected macrophages (S-Inf-M $\phi$ ). RMA-S cells cultured with 15  $\mu$ M/ml of OVA<sup>257-264</sup> peptide were used as positive control (S-OVA<sup>257-264</sup>). (b) K<sup>b</sup> expression on RMA-S cell at both experimental times.

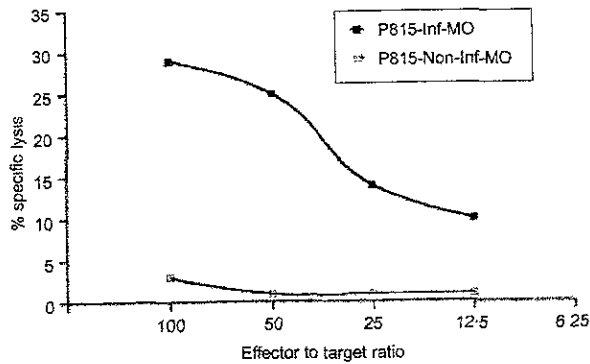
added relative to the low amounts of K<sup>b</sup>-binding peptides that could be secreted from the bacterial infection. Thus, the class I molecules loaded with secreted peptides stayed on the cell surface and were not internalized or degraded for at least 3 hr.

**Loading of target cells with secreted peptides from *Salmonella*-infected macrophages can activate antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells**

We next determined if the secretion of peptides from activated macrophages and the loading of MHC empty class I molecules on neighbouring cells would create recognition structures for the stimulation of antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells. We tested this by employing *Salmonella*-infected macrophages co-cultured with P815 mastocytoma cells that were later used as target cells for CTL. Spleen cells from BALB/c mice, previously primed with *Salmonella*, were restimulated *in vitro* with a mix of peptides from *Salmonella* proteins for 5 days; this was the source of antigen-specific CTL. As shown in Fig. 5, *Salmonella*-specific CTL from BALB/c mice lysed P815 cells that were previously cultured with infected macrophages. Thus, the secreted peptides from *Salmonella*-infected macrophages can generate MHC class I structures that are recognized by specific CD8<sup>+</sup> T cells.

**DISCUSSION**

Exogenous antigens can be presented by MHC class I molecules through different antigen-processing pathways.<sup>27</sup> Our results agree with previous studies in which release of peptides by macrophages was demonstrated.<sup>9,10</sup> However, in these previous studies, it was not clear how the class I molecules



**Figure 5.** Target cells loaded with secreted peptides from macrophages can activate antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells. P815 mastocytoma was co-cultured with non-infected activated IC21 macrophages (P815+M $\phi$ ) or *Salmonella*-infected IC21 macrophages (P815+Inf M $\phi$ ). After 18 hr, P815 cells were harvested, labelled for 1 hr with <sup>51</sup>Cr, and mixed with *Salmonella*-specific CTL. The source of CTL were spleen cells from *Salmonella*-infected BALB/c mice. The spleen cells were re-stimulated *in vivo* for 5 days with 100  $\mu$ g/ml of *Salmonella* peptides generated by trypsin digestion before use in the CTL assay.

were loaded because fixed macrophages were used as recipients of the released peptides. Furthermore, the nature of factors (e.g. IFN- $\gamma$ ) inducing this secretory pathway has not been previously investigated. The size, amount and origin of the antigen have been the principal variables.<sup>12,13</sup> In the work presented here, we show that IFN- $\gamma$  can be a decisive stimulus for the macrophage to induce the secretion of peptides that load empty class I molecules on the surface of neighbouring cells and on the macrophages themselves. The dependency of IFN- $\gamma$  stimulation shown here might explain why a TAP-independent peptide release pathway was detected in some studies but not in others.<sup>12,13,28</sup> Peptone-activated macrophages isolated from peritoneal exudates also showed this peptide secretory pathway and IC21 macrophages not treated with IFN- $\gamma$  were unable to induce the loading and stabilization of RMA-S K<sup>b</sup> molecules (Table 1, Table 2 and data not shown). MHC K<sup>b</sup> molecules were present on the surface of RMA-S for at least 3 hr in a similar fashion to the octamer OVA<sup>257-264</sup> (SIINFEKL). In addition, secreted peptides loaded into class I molecules of P815 target cells can be recognized by CTLs from BALB/c mice primed *in vivo* with *Salmonella*. Thus, this secretory antigen presentation pathway can release peptides that can form recognition structures for CTL. Dendritic cells treated with IFN- $\gamma$  increase their presentation of exogenous antigens by class I molecules using proteasome and TAP endogenous pathways,<sup>29</sup> the pathway described here for IFN- $\gamma$ -activated macrophages may co-operate with dendritic cells during the induction of T-cell responses against foreign antigens. During an inflammatory response tumour necrosis factor- $\alpha$  activates macrophages to produce interleukin-12 and, as a consequence, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells produce IFN- $\gamma$ .<sup>30</sup> These events may induce and prolong the activation of the macrophage in order to recruit specific CD8<sup>+</sup> effector T cells in the tissues.

We were able to detect radiolabelled peptides loaded on RMA-S cells after co-culture with activated macrophages

infected with radiolabelled *Salmonella* by K<sup>b</sup> immunoprecipitation experiments. Thus, secreted material came from the internalized *Salmonella*. Interestingly, ammonium chloride and leupeptin did not inhibit the K<sup>b</sup> fluorescence increase on RMA-S cells induced by *Salmonella* infection of IFN- $\gamma$ -activated macrophages and also induced an increase in the K<sup>b</sup> expression induced by the macrophages without bacterial infection. These results suggest that IFN- $\gamma$ -activated macrophages can cleave exogenous antigens with a set of proteases that can function at neutral pH. Indeed, our results further suggest that the neutralization of the phagosome or the endosomal compartments increases the proteolytic activity of these proteases. The neutralization of the phagosome can be achieved by *S. typhimurium*, which normally attenuates the acidification of this compartment in order to survive.<sup>31</sup> This may be an explanation why there are always more secreted peptides from infected macrophages than from non-infected macrophages.

BFA blocks the transport of proteins from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus, a step critical for the classical TAP-dependent pathway for the transport of newly synthesized peptide-loaded MHC molecules. Our results suggest that processing and secretion of peptides from exogenous antigens can utilize a BFA-resistant pathway engaging a compartment, which may recycle close to the plasma membrane independent of the Golgi apparatus. Recently, a Fc- $\gamma$ -receptor-mediated phagocytic pathway mediated by the ARF6 protein was shown to be resistant to BFA in macrophages.<sup>32</sup> IFN- $\gamma$  can induce the expression of two subunits of the proteasome, LMP-2 and LMP-7, as well as the regulator PA28.<sup>33-35</sup> It is possible that the IFN- $\gamma$  activation of the macrophages before the uptake of *Salmonella* could induce a proteolytic activity inside the phago-lysosome that could generate peptides similar to those generated by the proteasomes.

The peptide release pathway described here needs to be evaluated *in vivo*. This pathway may be part of the mechanism of 'cross-priming' demonstrated by other investigators. In an inflamed tissue, dendritic cells may present peptides released from macrophages and then migrate to the lymph nodes to activate specific T cells, in this way even if the immature dendritic cell is not able to process the antigen, it can be the carrier of peptides for the macrophage.<sup>36,37</sup> Alternatively, the release of self-peptides from phagocytosed self-proteins and apoptotic bodies in the tissues could be a mechanism by which activated macrophages could participate in break down of the tolerance and generate autoimmunity.<sup>38,39</sup> This mechanism could be dangerous for bystander non-infected cells, however, the activation of CD8<sup>+</sup> T cells in the tissues could generate the production of IFN- $\gamma$  to help macrophage killing of *Salmonella*. Alternatively, other regulatory mechanisms can control CD8<sup>+</sup> T attack in the tissues like CD30-CD30 ligand interactions.<sup>40</sup>

#### ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful for the generous gifts of cell lines from Dr G. J. Hammerling and Dr Kenneth Rock. We thank Dr Lazio Radvanyi and Dr Celia Alpuche for helpful discussions and careful scrutiny of the manuscript. This work was supported by Research Grant No.3595P-M9608 of Consejo Nacional de Ciencia y Tecnologia (CONACYT), Mexico. N.M.O. is a recipient of a doctoral fellowship from CONACYT.

## REFERENCES

- 1 Richter-Dahlfors A, Buchan AMJ, Finlay B. Murine Salmonellosis studied by confocal microscopy: *Salmonella typhimurium* resides intracellularly inside macrophages and exerts a cytotoxic effect on phagocytes in vivo. *J Exp Med* 1997; **186**:569–80.
- 2 Kaufmann SH. Immunity to intracellular bacteria. *Annu Rev Immunol* 1993; **11**:129–63.
- 3 Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. Cellular responses to Interferon- $\gamma$ . *Annu Rev Immunol* 1997; **15**:749–95.
- 4 Hess J, Ladel C, Miko D, Kaufmann SH. *Salmonella typhimurium* aroA- infection in gene-targeted immunodeficient mice: major role of CD4<sup>+</sup> TCR- $\alpha\beta$  cells and IFN- $\gamma$  in bacterial clearance independent of intracellular location. *J Immunol* 1996; **156**:3321–26.
- 5 Pfeifer JD, Wick MJ, Roberts RL, Findlay K, Normark SJ, Harding CV. Phagocytic processing of bacterial antigens for class I MHC presentation to T cells. *Nature* 1993; **361**:359–62.
- 6 Rock KL. A new foreign policy: MHC class I molecules monitor the outside world. *Immunol Today* 1996; **17**:131–7.
- 7 Kovacsovics-Bankowski M, Rock KL. A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science* 1995; **264**:243–53.
- 8 Lehner PJ, Cresswell P. Processing and delivery of peptides presented by MHC class I molecules. *Curr Opin Immunol* 1996; **8**:59–67.
- 9 Sadasivan B, Lehner PJ, Ortmann B, Spies T, Cresswell P. Roles for calreticulin and a novel glycoprotein, tapasin, in the interaction of MHC class I molecules with TAP. *Immunity* 1996; **5**:103–14.
- 10 Wick MJ, Pfeifer JD. Major histocompatibility complex class I presentation of ovalbumin peptide 257–264 from exogenous sources: protein context influences the degree of TAP-independent presentation. *Eur J Immunol* 1996; **26**:2790–99.
- 11 Bachman MF, Oxenius A, Pircher H, Hengartner H, Ashton-Richardt PA, Tonegawa S, Zinkernagel RM. TAP1-independent loading of class I molecules by exogenous viral proteins. *Eur J Immunol* 1995; **25**:1739–43.
- 12 Harding CV, Song R. Phagocytic processing of exogenous particulate antigens by macrophages for presentation by class I MHC molecules. *J Immunol* 1994; **153**:4925–33.
- 13 Song R, Harding CV. Roles of proteasomes, transporter for antigen presentation (TAP) and Beta 2-Microglobulin in the processing of exogenous or particulate antigens via an alternate class I MHC processing pathway. *J Immunol* 1996; **156**:4182–90.
- 14 Ljunggren HG, Stam NJ, Ohlen C *et al*. Empty MHC class I molecules come out in the cold. *Nature* 1990; **346**:476–80.
- 15 Rock KL, Gambie S, Rothstein L, Gramm C, Benacerraf B. Dissociation of  $\beta$ 2-Microglobulin leads to the accumulation of a substantial pool of inactive class I MHC heavy chains on the cell surface. *Cell* 1991; **65**:511–20.
- 16 Ortiz-Navarrete V, Hammerling GJ. Surface appearance and instability of empty H-2 class I molecules under physiological conditions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**:3594–7.
- 17 Kärre K, Ljunggren HG, Piontek G, Kiessling R. Selective rejection of H-2 deficient lymphoma variants suggests alternative immune defense strategy. *Nature* 1986; **319**:675–9.
- 18 Walker W, Demus A. Antibody-dependent cytotoxicity of chicken erythrocytes by an in vitro established line of mouse peritoneal macrophages. *J Immunol* 1975; **114**:765–9.
- 19 Ralf P, Prichard J, Cohn M. Reticulum cell sarcoma: an effector cell in antibody-dependent cell mediated immunity. *J Immunol* 1975; **114**:895–905.
- 20 Plaut M, Lichtenstein LM, Gillespie E, Henney C. Studies on the mechanism of lymphocyte-mediated cytotoxicity. *J Immunol* 1973; **111**:389–94.
- 21 Ozato K, Sachs DH. Monoclonal antibodies to mouse MHC antigens. III. Hybridoma antibodies reacting to antigens of the H-2b haplotype reveal genetic control of isotype expression. *J Immunol* 1981; **126**:317–21.
- 22 Isibasi A, Ortiz-Navarrete V, Vargas M, Paniagua J, Gonzalez C, Moreno J, Kumte J. Protection against *Salmonella typhi* infection in mice after immunization with outer membrane proteins isolated from *Salmonella typhi* 9,12, d, Vi. *Infect Immun* 1988; **56**:2953–9.
- 23 Moore MW, Carbone FR, Bevan MJ. Introduction of soluble protein into the class I pathway of antigen processing and presentation. *Cell* 1988; **54**:777–85.
- 24 Buchencier NA, Heffron F. Intracellular survival of wild type *Salmonella typhimurium* and macrophage-sensitive mutants in diverse populations of macrophages. *Infect Immun* 1989; **57**:1–7.
- 25 Wunderlich J, Shearer G. Induction and measurements of cytotoxic T lymphocyte activity. In: Coligan JE, Kruisbeck AM, Margulies D, Shevach EM, Strober W, eds. *Current Protocols in Immunology*, 2nd edn. New York, NY: Greene Publishing Associates, Inc and John Wiley & Sons, Inc., 1992; 1:3.11.1.
- 26 Lippincott-Schwartz J, Yuan L, Tipper C, Amherdt M, Orci L, Klausner RD. Brefeldin A's effects on endosomes, lysosomes, and the TGN suggests a general mechanism for regulating organelle structure and membrane traffic. *Cell* 1991; **67**:601–16.
- 27 Jondal M, Schirmbeck R, Reimann J. MHC class I-restricted CTL responses to exogenous antigens. *Immunity* 1996; **5**:259–302.
- 28 Reis e Sousa C, Germain RN. Major histocompatibility complex class I presentation of peptides derived from soluble exogenous antigen by a subset of cells engaged in phagocytosis. *J Exp Med* 1995; **182**:841–51.
- 29 Brossart P, Bevan MJ. Presentation of exogenous protein antigens on major histocompatibility complex class I molecules by dendritic cells: pathway of presentation and regulation by cytokines. *Blood* 1997; **90**:1594–99.
- 30 Trinchieri G. Cytokines acting on or secreted by macrophages during intracellular infection (IL-10, IL-12, IFN- $\gamma$ ). *Curr Opin Immunol* 1997; **9**:17–23.
- 31 Aipuche ACM, Swanson JA, Loomis WP, Miller SI. *Salmonella typhimurium* activates virulence gene transcription within acidified macrophages phagosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**:10079–83.
- 32 Zhang Q, Cox D, Tseng CC, Donaldson JG, Greenberg S. A requirement for ARF6 in Fc $\gamma$  receptor-mediated phagocytosis in macrophages. *J Biol Chem* 1998; **273**:19977–81.
- 33 Fruh K, Yang Y. Antigen presentation by MHC class I and its regulation by interferon  $\gamma$ . *Curr Opin Immunol* 1999; **11**:76–81.
- 34 Ortiz-Navarrete V, Seelung A, Gernold M, Frentzel S, Kloetzel PM, Hammerling GJ. Subunit of "20S" proteasome (multicatalytic proteinase) encoded by the major histocompatibility complex. *Nature* 1991; **353**:662–4.
- 35 Gaczynska M, Rock KL, Goldberg AL. Gamma-interferon and expression of MHC genes regulate peptide hydrolysis by proteasomes. *Nature* 1993; **365**:264–7.
- 36 Kuits C, Heath WR, Carbone FR, Allison J, Miller JFAP, Kosaka H. Constitutive Class I-restricted exogenous presentation of self antigens in vivo. *J Exp Med* 1996; **184**:923–30.
- 37 Carbone FR, Kuits C, Bennet SRM, Miller JFAP, Heath WR. Cross-presentation: a general mechanism for CTL immunity and tolerance. *Immunol Today* 1998; **19**:368–75.
- 38 Platt N, Da Silva RP, Gordon S. Recognizing death: the phagocytosis of apoptotic cells. *Trends Cell Biol* 1998; **8**:365–16.
- 39 Steinman RM, Turley S, Mellman I, Inaba K. The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic bodies. *J Exp Med* 2000; **191**:411–16.
- 40 Heath WR, Kuits C, Caminschi I, Carbone FR, Miller JF. CD30 prevents T-cell responses to non lymphoid tissues. *Immunol Rev* 1999; **169**:23–9.