

11281



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

RESPUESTA DE LINFOCITOS T CITOTÓXICOS
CONTRA LA PROTEÍNA OmpC DURANTE
INFECCIONES POR *Salmonella*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
-INMUNOLOGÍA-

PRESENTA:

JOSÉ ALBERTO DÍAZ QUIÑONEZ



DIRECTOR DE TESIS:
DR. VIANNEY FRANCISCO ORTIZ NAVARRETE

MÉXICO, D. F.

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central

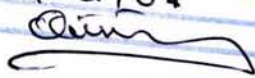


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

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.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a que se forme, reproduzca e imprima el contenido de mi trabajo posdoctoral.
NOMBRE: Jole Alberto
Acosta Quiroga
FECHA: 22/oct/04
FIRMA: 

Este trabajo se realizó bajo la tutoría del Dr. Vianney Francisco Ortiz Navarrete, en el Departamento de Biomedicina Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV).

Durante la realización de este trabajo de investigación recibí una beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, No. 93688) y del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS, No. 11108541). El trabajo recibió apoyo de CONACYT (proyecto No. 3595P-M9608), y del Programa de Apoyo a Estudiantes de Posgrado (PAEP, Nos. 201324 y 102314) de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Miembros del Jurado:

Presidente: Dra. Kaethe Willms Manning

Secretario: Dr. Vianney Francisco Ortíz Navarrete

Primer Vocal: Dra. Gloria Soldevila Melgarejo

Segundo Vocal: Dr. Edmundo de Ibis Lamoyi Velázquez

Tercer Vocal: Dr. Alejandro Rafael Cravioto Quintana

Suplente: Fernando Roger Esquivel Guadarrama

Suplente: Leopoldo Flores Romo

Comité tutorial:

Dr. Vianney Francisco Ortíz Navarrete

Dr. Fernando Roger Esquivel Guadarrama

Dr. Alejandro García Carrancá

AGRADECIMIENTOS

A mi comité tutorial; por los invaluable consejos a lo largo del trabajo experimental. Al Dr. Fernando Esquivel Guadarrama; al Dr. Alejandro García Carrancá; al Dr. Vianney Ortiz Navarrete, mi guía y amigo.

A los miembros del Jurado; por los valiosos comentarios y sugerencias al trabajo.

Al Dr. Armando Isibasi Araujo; por la confianza. Por su paciencia y dedicación.

Al Dr. César Gonzalez Bonilla; por el apoyo moral y el voto de confianza depositado.

Al Dr. Jorge Paniagua Solís; por el honor de regalarme de su amistad.

Al Lic. Juan López de Silanes; por la oportunidad que me brinda de explorar nuevos horizontes.

Hay una amiga que arriesga su alma por mis experimentos, y es mucho más de lo que merezco. Gracias Rosana Pelayo.

A mis padres: *los viejos* y los que ahora Lorena me comparte; porque me enseñaron sobre la sabiduría de la espera.

Siempre tendré un sentimiento de gratitud para mis compañeros de la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica, IMSS y de Biomedicina Molecular, CINVESTAV. Laura Bonifaz; Constantino López, Natalia Martín, Sara Huerta, Mario Vega, Irma Silva, Roberto Rosales, Ma. Teresa Mata, Héctor López, Genaro Patiño, Víctor Hugo Rosales y Penélope Magaña. Gracias a todos.

A Lorena y al pequeño Diego Alberto;
porque el amor los identifica en sus propios ojos.

A quien todavía no está con nosotros;
por constituir un motivo verdadero para seguir creciendo.

EL BURRO SABIO

Yo soy el burro sabio,
el que hace que se asombre la academia.
Yo sé calcular como un hombre.
Con la fusta en la mano, me hace el amo trepar
en un viejo tonel donde he de equilibrar
el cuerpo. Los aplausos resuenan de improviso;
luego bajo y me pongo a bailar; es preciso.
—¿En donde esta París? —me dicen—. Contestad.
Medito un solo instante y en la carta de Francia
con la pezuña un punto señalo con jactancia.
—Asno, pase revista por esta sociedad,
mire a sus circunstantes sin tardar un minuto,
alargue la cabeza y señale al más bruto.

Obedezco y acierto, tengo seguridad...
Cuando me enseñan algo, pienso con aire grave
en el hombre que enseña y en lo poco que sabe.
Y cuando se terminan las farsas, y tras ellas
me duermo a la intemperie, me asalta y acribilla
la obsesión de la ciencia como una pesadilla...
Y sueño que me pongo a contar estrellas.

Francis Jammes

(traducción de Enrique González Martínez, 1915)

Respuesta de linfocitos T citotóxicos contra la proteína OmpC durante infecciones por *Salmonella*

Resumen

Los linfocitos T citotóxicos (LTC) son células con fenotipo CD8⁺ (T_{CD8}⁺) que reconocen péptidos unidos a moléculas de clase I del complejo principal de histocompatibilidad (MHC-I) en la membrana de las células infectadas. Debido a que la mayoría de los péptidos que se unen a MHC-I provienen de proteínas citosólicas, las células T_{CD8}⁺ participan fundamentalmente en la defensa contra los microorganismos que introducen antígenos al citosol de las células infectadas, como los virus.

El presente trabajo describe la identificación de dos epítopes de una proteína muy abundante de la membrana externa de *Salmonella enterica* que pueden ser generados a través del procesamiento citosólico de la proteína, presentados por moléculas MHC-I clásicas, y posteriormente reconocidos por LTC activados durante infecciones *in vivo* con los serotipos Typhi y Typhimurium (*S. typhi* y *S. typhimurium*).

Para identificar epítopes de la porina OmpC de *Salmonella* reconocidos por LTC, se utilizaron dos algoritmos de predicción: *ProPred*, que predice la generación de péptidos por el proteasoma que pueden unirse a moléculas MHC, y *BIMAS* que predice el tiempo medio de disociación de los péptidos unidos a MHC. El resultado mostró que las secuencias de los péptidos 73-TRVAFAGL (OmpC₇₃₋₈₀) y 132-RNTDFFGGL (OmpC₁₃₂₋₁₃₉) pueden ser ligandos naturales de la molécula H2-K^b.

Los péptidos sintéticos se unen y estabilizan *in vitro* a la molécula H2-K^b de manera dosis dependiente. Unidos a la molécula, OmpC₇₃₋₈₀ y OmpC₁₃₂₋₁₃₉ convierten a una línea celular, el timoma RMA-S, en blanco de una respuesta citotóxica. La infección con *S. typhimurium* induce la activación de LTC que reconocen de manera específica a los péptidos sintéticos. La homología entre OmpC de *S. typhimurium* y OmpC de *S. typhi* es del 98% y poseen las secuencias idénticas a nivel de los epítopes predichos. En consecuencia, la respuesta citotóxica se induce también en ratones después de la administración intraperitoneal de *S. typhi* en mucina, lo cual involucra a los macrófagos como las células responsables de la activación de las células citotóxicas *in vivo*.

Los datos presentados en este trabajo demuestran la activación de LTC específicos en el control de infecciones por *Salmonella* y sugieren su participación en la eliminación de macrófagos infectados, donde la bacteria se multiplica intracelularmente. El modelo desarrollado también proporciona un sistema para estudiar la respuesta de células citotóxicas durante procesos infecciosos activos como la salmonelosis en ratones y la fiebre tifoidea en humanos.

Cytotoxic T Lymphocyte response to the OmpC protein during infections by *Salmonella*

Abstract

Cytotoxic T lymphocytes (CTL) are cells with phenotype CD8⁺ (T_{CD8}⁺) that recognize peptides bound to molecules of the major histocompatibility complex class I (MHC-I) in the membrane of infected cells. Since most peptides that bind to MHC-I come from cytosolic proteins, T_{CD8}⁺ fundamentally participate in the defense against microorganisms, like viruses, that introduce antigens into the cytosol of infected cells.

This work describes the identification of two epitopes of a very abundant outer membrane protein of *Salmonella enterica* that can be generated through the cytosolic processing of the protein, presented by classic MHC-I molecules and subsequently recognized by CTL activated during *in vivo* infections with the serotypes Typhi and Typhimurium (*S. typhi* and *S. typhimurium*).

In order to identify epitopes of the *Salmonella* OmpC porin recognized by CTL, two prediction algorithms were used: *ProPred*, that predicts peptide generation by the proteasome that can bind to MHC molecules and *BIMAS* that predicts mean dissociation time for peptides bound to MHC. The result showed that peptide sequences 73-TRVAFAGL (OmpC₇₃₋₈₀) and 132-RNTDFFGL (OmpC₁₃₂₋₁₃₉) can be natural ligands of molecule H2-K^b. The synthetic peptides bind to and stabilize *in vitro* molecule H2-K^b by way of dependent doses. Once bound to the molecule, OmpC₇₃₋₈₀ and OmpC₁₃₂₋₁₃₉ convert a cell line, thymome RMA-S, into the target of a cytotoxic response. Infection by *S. typhimurium* induces activation of CTL that specifically recognize the synthetic peptides. Homology between the OmpC of *S. typhimurium* and the OmpC of *S. typhi* is 98% and they have identical sequences at predicted epitope level. As a consequence, the cytotoxic response is also induced in mice after intraperitoneal administration of *S. typhi* in mucin, which involves macrophages as cells responsible for the activation of cytotoxic cells *in vivo*.

The data presented in this work show the activation of specific CTL in the control of infections by *Salmonella* and suggest their participation in the elimination of infected macrophages, where the bacteria multiply intracellularly. The developed model also provides a system for studying cytotoxic cell response during active infectious processes, such as salmonellosis in mice and typhoid fever in humans.

Abreviaturas y Acrónimos

2-ME	2-Mercapto Etanol (β -Mercapto Etanol).
Ab	Anticuerpo (del inglés « <i>Antibody</i> »).
Ag	Antígeno.
AIF	Adyuvante incompleto de Freund.
APCs	Células presentadoras de antígeno profesionales (del inglés « <i>Antigen Presenting Cells</i> »).
β 2M	β 2-microglobulina.
BHI	Infusión de cerebro y corazón (del inglés « <i>Brain and Heart Infusion</i> »).
°C	Grados centígrados.
CD	Grupos de diferenciación (del inglés « <i>Clusters of Differentiation</i> »).
CLIP	Péptido derivado de Ii (del inglés « <i>Class II-associated invariant chain peptide</i> »).
cpm	Cuentas por minuto.
DCs	Células dendríticas (del inglés « <i>Dendritic Cells</i> »).
DMEM	Medio Modificado de Dulbecco (del inglés « <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> »).
FACS	Citometría de flujo (del inglés « <i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i> »).
FAE	Epitelio asociado al folículo (del inglés « <i>Follicle-associated Epithelium</i> »).
FMOOC	9-fluorenylmethyloxycarbonyl.
g	Gramos.

HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución (del inglés « <i>High Performance Liquid Chromatography</i> »).
HSP	Proteínas de fase aguda (del inglés « <i>Heat Shock Proteins</i> »)
IELs	Linfocitos intra-epiteliales (del inglés « <i>Intraepithelial lymphocytes</i> »).
IFN γ	Interferón gama.
Ig	Inmunoglobulina.
li	Cadena invariante (del inglés « <i>invariant chain</i> »).
IL-	Interleucina.
kDa	Kilodaltones.
KO	Adjetivo aplicado a células o individuos a los que se les eliminó un gen por recombinación homóloga (del inglés « <i>Knock Out</i> »).
LAMP	Proteína de membrana asociada a lisosoma (del inglés « <i>Lysosomal-Associated Membrane Protein</i> »).
LPS	Lipopolisacárido.
lt	Litro.
LTC	Linfocitos T Citolíticos (Citotóxicos).
mAb	Anticuerpo monoclonal (del inglés « <i>Monoclonal Antibody</i> »).
MALT	Tejido linfoide asociado a mucosas (del inglés « <i>Mucosa-Associated Lymphoid Tissue</i> »).
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad (del inglés « <i>Major Histocompatibility Complex</i> »).
mif	Media de intensidad de fluorescencia.
μ g	Microgramo.

mg	Miligramo.
μl	Microlitro.
ml	Mililitro.
ng	Nanogramo.
NK	Células asesinas naturales (del inglés « <i>Natural Killer</i> »).
nm	Nanómetro.
Nramp	Proteína asociada a la resistencia natural de infecciones (del inglés « <i>Natural resistance associated-macrophage protein</i> »).
OmpC	Proteína de membrana externa (del inglés « <i>Outer membrane protein C</i> ») de <i>Salmonella</i> .
Ova	Ovalbúmina.
pag	Genes activados por PhoP (del inglés « <i>PhoP-activated genes</i> »).
PBS	Amortiguador salino de fosfatos (del inglés « <i>Phosphate-buffered saline</i> »).
RE	Retículo endoplásmico.
rpm	Revoluciones por minuto.
RPMI	Medio de cultivo nutritivo (<i>Roswell Park Memorial Institute</i>).
SCV	Vacuola que contiene a <i>Salmonella</i> (del inglés « <i>Salmonella-Containing Vacuole</i> »).
SDS	Dodecilsulfato de sodio (del inglés « <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> »).
SFB	Suero fetal de bovino.
SPI	Isla de patogenicidad de <i>Salmonella</i> (del inglés « <i>Salmonella Pathogenicity Island</i> »).

TAP	Transportador asociado al procesamiento de Ags (del inglés « <i>Transporter associated with Antigen Processing</i> »).
T _{CD4} ⁺	Células T que expresan la molécula CD4.
T _{CD8} ⁺	Células T que expresan la molécula CD8.
TCR	Receptor de la célula T (del inglés « <i>T Cell Receptor</i> »).
Th1	Células T cooperadoras tipo 1 (del inglés « <i>T helper 1</i> »),
Th2	Células T cooperadoras tipo 2 (del inglés « <i>T helper 2</i> »),
TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa (del inglés « <i>Tumor Necrosis Factor alpha</i> »).
UFC	Unidades formadoras de colonias.

Índice General

RESUMEN	7
ABSTRACT	8
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES	16
TABLAS	16
FIGURAS	16
I. INTRODUCCIÓN	18
1.1. LA INFECCIÓN POR SALMONELLA	20
1.1.1. Determinantes genéticos de virulencia	20
1.1.2. Adhesión e invasión de células M.....	24
1.1.3. Invasión de células fagocíticas.....	25
1.1.4. Diseminación sistémica	27
1.2. RESPUESTA INMUNE CONTRA SALMONELLA	28
1.2.1. Respuesta inmune innata.....	29
1.2.2. Respuesta inmune específica	30
1.2.3. Células B y anticuerpos.....	31
1.2.4. Linfocitos T _{CD4} ⁺	32
1.2.5. Linfocitos T _{CD8} ⁺	33
1.3. PROCESAMIENTO Y PRESENTACIÓN DE ANTÍGENOS A LINFOCITOS T	35
1.3.1. Vía citosólica del procesamiento de antígenos: Vía de clase I	35
1.3.2. Vía exógena del procesamiento de antígeno: Vía de clase II	41
1.4. PRESENTACIÓN CRUZADA	42
1.4.1. El fenómeno de presentación cruzada.....	42
1.4.2. Mecanismos de presentación cruzada.....	43
1.4.3. Los fagosomas como organelos involucrados en la presentación cruzada	44
1.5. LAS PORINAS Y OmpC COMO MODELOS DE ESTUDIO	45
1.5.1. Estructura y función de las porinas.....	45
1.5.2. Inmunogenicidad de OmpC de <i>S. typhi</i>	48
II. JUSTIFICACIÓN	50
III. HIPÓTESIS	52
IV. OBJETIVOS	53
Objetivo General.....	53

Objetivos Específicos	53
V. MATERIALES Y MÉTODOS	54
5.1. Reactivos	54
5.2. Animales de experimentación.....	54
5.3. Líneas celulares	54
5.4. Hibridomas y anticuerpos monoclonales (mAb).....	55
5.5. Cepas bacterianas.....	57
5.6. Determinación de LD ₅₀ para <i>Salmonella typhimurium</i>	59
5.7. Síntesis de péptidos y HPLC	60
5.8. Ensayos de unión y citometría de flujo	61
5.9. Inmunización y estimulación <i>in vitro</i>	62
5.10. Infecciones <i>in vivo</i>	63
5.11. Ensayo de citotoxicidad	64
VI. RESULTADOS	66
6.1. Identificación de epítopes OmpC que se unen a la molécula H2-K ^b	66
6.2. OmpC ₇₃₋₈₀ y OmpC ₁₃₂₋₁₃₉ inducen respuesta de LTC péptido-específico <i>in vivo</i>	76
6.3. La infección con <i>S. typhimurium</i> y <i>S. typhi</i> induce LTC específicos contra OmpC ₇₃₋₈₀ y contra OmpC ₁₃₂₋₁₃₉	79
VII. DISCUSIÓN.....	84
7.1. El modelo de <i>Salmonella</i> para estudiar inmunidad celular y respuestas de LTC	84
7.2. Implicaciones de la presencia de LTC durante infecciones con <i>Salmonella</i>	86
7.3. Diferentes especies y diferentes porinas comparten secuencias similares con residuos de anclaje para la molécula H2-K ^b	87
VIII. CONCLUSIONES DEL TRABAJO	90
IX. PERSPECTIVAS.....	91
X. BIBLIOGRAFÍA	92

XI. APÉNDICES	106
APÉNDICE DE MEDIOS DE CULTIVO.....	106
APÉNDICE DE AMORTIGUADORES Y SOLUCIONES.....	107
XII. ANEXOS	109

Índice de Ilustraciones

TABLAS

Tabla I. Líneas celulares y anticuerpos monoclonales.	56
Tabla II. Cepas bacterianas.	58
Tabla III. Predicción de péptidos OmpC ^s que se unen y estabilizan a H2-K ^b utilizando el programa BIMAS.	69
Tabla IV. Predicción de epítopes OmpC generados por el proteosoma ^s utilizando el programa ProPred-I.	70
Tabla V. Péptidos seleccionados para los ensayos de unión a la molécula H2-K ^b .	72
Tabla VI. Homología en las secuencias OmpC de Salmonella y Omp's de bacterias Gram-negativas.	89

FIGURAS

Figura 1. Localización de las islas de patogenicidad en el cromosoma de Salmonella. Las SPI's se muestran representadas por triángulos. Las distancias en el cromosoma bacteriano se indican en minutos.	23
Figura 2. Esquema de las Moléculas MHC-I y MHC-II. (A) La cadena alfa de las moléculas MHC-I tiene tres dominios extracelulares, $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$, y se asocia de manera no covalente con β_2 -microglobulina. La cadena α es muy polimórfica, principalmente en los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$. (B) En las moléculas MHC-II, las dos cadenas son polimórficas, principalmente en los dominios $\alpha 1$ y $\beta 1$. Existen grandes homologías entre las moléculas MHC-I y MHC-II. En las dos moléculas, los dominios más externos interactúan para formar una hendidura donde se unen los péptidos antigénicos, que son reconocidos por el TCR. Tomado de Biochemistry, © 2002 (W. H. Freeman and Company).....	36
Figura 3. Localización de los residuos polimórficos en la molécula MHC-I. Los polimorfismos de las moléculas MHC-I están localizados en los dominios N-terminales ($\alpha 1$ y $\alpha 2$), y forman el sitio de unión a los péptidos antigénicos. La variabilidad entre alelos se localiza en sitios específicos en el piso o en las paredes internas de la hendidura. Tomado de Biochemistry, © 2002 (W. H. Freeman and Company).	37
Figura 4. Estructura del proteasoma. El proteasoma 20S consiste de 28 (14 diferentes) subunidades, y se compone de 4 anillos heptaméricos concéntricos. Los anillos más externos contienen las subunidades α , los anillos internos las subunidades β . Tres de las 7 subunidades en cada anillo son sitios activos ($\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 5$). El regulador 19S, que se une a ambos lados de la estructura 20S, se compone de la "base" (6 subunidades con actividad ATPasa) y la "tapa" (8-10 subunidades). El IFN γ induce la síntesis de tres subunidades β con sitios activos. Estas inmuno-subunidades (LMP2, LMP7 y MECL1) se incorporan al complejo 20S, y junto con las otras subunidades, forman el inmunoproteasoma. Tomado de Current Opinion in Immunology (2004) 16:76-81 (165).	40

- Figura 5. Estructura de OmpC de *S. typhi*.** A; Monómero visto a lo largo del eje de la membrana. L1 a L8 se refieren a los Loops expuestos al exterior de la bacteria. Los giros cortos están expuestos hacia el espacio periplásmico. B; Trímero visto a través del poro. M1, M2 y M3 representan los monómeros. Imagen cortesía del Dr. Krishnaswamy, J Biomol Struct Dyn (2000) 18: 261-71 (230).47
- Figura 6. Pureza de los péptidos sintéticos.** Los péptidos se sintetizaron en un sintetizador automático. Para el análisis se inyectaron 50 μ l de cada uno de los péptidos sintéticos, y se analizó la pureza por HPLC utilizando una columna C18 en fase reversa. A) OmpC₇₃₋₈₀ B) OmpC₁₃₂₋₁₃₉ y C) OVA₂₅₇₋₂₆₄.73
- Figura 7. Los péptidos OmpC se unen específicamente a la molécula H2-K^b.** Se cultivaron células RMA-S con 50 y 100 μ M de los péptidos OmpC₇₃₋₈₀ (), OmpC₁₃₂₋₁₃₉ () y OVA₂₅₇₋₂₆₄ () por 6 h. Testigo sin péptido, (). Se tiñeron las moléculas MHC-I en la superficie celular, y se analizaron por FACS. En la figura se muestran los resultados utilizando anticuerpos anti-K^b (A), anti-K^d (B) y anti-K^d (C).75
- Figura 8. Respuesta citotóxica contra los epítopes predichos de OmpC de *Salmonella*.** Se inmunizaron ratones con los péptidos sintéticos OmpC₇₃₋₈₀ y OmpC₁₃₂₋₁₃₉ de manera subcutánea en AIF. Después de 4 semanas se obtuvieron las células del bazo, y se expandieron in vitro con el péptido correspondiente a la inmunización, estas células se consideraron como efectoras. El ensayo de citotoxicidad se realizó utilizando la célula RMA-S (blanco), cargada con el péptido OmpC correspondiente (OmpC₇₃₋₈₀ u OmpC₁₃₂₋₁₃₉) y utilizando diferentes relaciones efector:blanco como se ilustra. OVA, células RMA-S cargadas con péptido testigo de ovalbúmina (OVA₂₅₇₋₂₆₄).78
- Figura 9. Susceptibilidad de ratones C57Bl6/j a la infección con *S. typhimurium* 14028.** Los ratones se infectaron de manera o.g. con los números de bacterias mostrados en SSI; el grupo control solo recibió SSI. La sobrevivencia se registró diariamente y se muestra como porcentaje de los animales vivos a lo largo del tiempo.80
- Figura 10. La infección con *Salmonella typhimurium* induce respuesta de LTC contra OmpC₇₃₋₈₀ y contra OmpC₁₃₂₋₁₃₉.** Se infectaron ratones orogástricamente con *S. typhimurium* SL3261. Después de 6 semanas, se obtuvieron las células de bazo y se trataron como se describió en la figura anterior. OmpC132/132 significa que las células efectoras se re-estimularon con el péptido OmpC₁₃₂₋₁₃₉ y se evaluaron contra células RMA-S presentando el péptido OmpC₁₃₂₋₁₃₉.82
- Figura 11. *S. typhi* infecta ratones cuando se administra en mucina y la infección genera respuesta de LTC.** Los ratones recibieron una dosis de 5,000 bacterias de manera intraperitoneal en PBS o mucina al 5%. Seis semanas después, se obtuvieron las células de bazo y se trataron como se describió en la figura 8. Mucina/132/132 significa que las células efectoras se obtuvieron de ratones infectados con *Salmonella* en mucina, se re-estimularon con el péptido OmpC₁₃₂₋₁₃₉ y se evaluaron contra células RMA-S presentando el péptido OmpC₁₃₂₋₁₃₉.83

I. Introducción

Las especies del género *Salmonella* son de interés mundial debido al espectro de huéspedes susceptibles, que pueden ser desde ratones y pollos, hasta primates.

Pueden causar infecciones localizadas y sistémicas, además de estados asintomáticos crónicos. Algunas sub-especies pueden causar bacteriemia, meningitis, enfermedad respiratoria, daño cardíaco, osteomielitis, y otras infecciones locales (1). *Salmonella enterica* serotipo Typhi (*S. typhi*) es un patógeno adaptado a los humanos que induce fiebre tifoidea en más de 16 millones de personas anualmente y es responsable de 600,000 muertes al año (2).

Salmonella enterica serotipo Typhimurium (*S. typhimurium*) causa gastroenteritis en una gran cantidad de mamíferos, incluyendo a los humanos. En ratones, la infección con *S. typhimurium* induce una fiebre entérica con síntomas similares a los observados en humanos después de la infección con *S. typhi*, por lo que este modelo se ha convertido en *estándar de oro* para estudiar la patogénesis de la fiebre tifoidea y la respuesta inmune contra el patógeno (3).

Después de la ingestión de alimentos o agua contaminada, *Salmonella* utiliza el tracto gastrointestinal como ruta normal e inicia su ciclo de infección después de atravesar el ambiente ácido del estómago. Tanto *S. typhi* (4, 5) como *S.*

typhimurium (6, 7) invaden de manera selectiva a las células del epitelio intestinal membranoso (células M) en el epitelio asociado al folículo (FAE). En ratones y bovinos, *S. typhimurium* puede adherirse también a otras células, como los enterocitos (8), pero se une de manera preferente a las células M (9). La entrada de *Salmonella* a las células M induce muerte celular, además de la destrucción del

epitelio asociado al folículo, lo que contribuye a una invasión bacteriana masiva (7, 10). Después de invadir y atravesar el epitelio intestinal, la bacteria coloniza la lámina propia y las placas de Peyer (7). Aquí infecta macrófagos, para alcanzar después los ganglios linfáticos mesentéricos, y se disemina al sistema circulatorio a través de los vasos linfáticos eferentes, lo que produce una bacteriemia transitoria. En el bazo y el hígado, los fagocitos eliminan una gran parte de la bacteria presente en la sangre (11-13). Estos primeros estadios de la infección se realizan en pocas horas, luego la bacteria se multiplica y aumentan los títulos bacterianos en el bazo y el hígado durante varios días (3). Después de alcanzar una carga de 10^8 bacterias, los animales ya no controlan la infección, por lo que sobreviene una bacteriemia secundaria, el choque endotóxico y finalmente la muerte. En una infección subletal, los ratones restringen la bacteriemia y la infección se caracteriza por esplenomegalia, supresión inmune y el nivel de carga bacteriana que se mantiene depende de la cepa de ratón y de la cepa bacteriana utilizada.

Esto quiere decir que el resultado de la infección depende de varios factores, entre los que se incluyen los determinantes genéticos de virulencia de la bacteria, la respuesta inmune innata, la capacidad del huésped para montar una respuesta inmune adquirida adecuada, y finalmente de la capacidad para eliminar al patógeno. La protección contra *Salmonella* resulta de una combinación entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa.

1.1. LA INFECCIÓN POR *SALMONELLA*

El género *Salmonella* es muy heterogéneo. Comprende más de 2500 serotipos, o serovares (14), de los cuales solo unos cuantos son patógenos humanos importantes. A pesar de esta complejidad, las especies de *Salmonella* son genéticamente muy parecidas, y las diferencias entre los serotipos representan diferencias en antígenos de superficie como el LPS o los flagelos. Los serotipos de *Salmonella* pueden causar tres enfermedades importantes en humanos: fiebre tifoidea (causada por *S. typhi* y cepas relacionadas); gastroenteritis (causada por la mayoría de las cepas de *Salmonella*); y una enfermedad invasiva (causada por *S. choleraesuis*).

1.1.1. Determinantes genéticos de virulencia

La mayoría de los genes de virulencia de *S. typhimurium* se encuentran agrupados en distintas secuencias que se denominan islas de patogenicidad de *Salmonella* (SPI's). Las SPI's se caracterizan por una gran cantidad de nucleótidos GC, sitios críticos de integración (15-17) y una estructura muy parecida a la de los bacteriófagos o transposones (18, 19). SPI-1 y SPI-2 codifican un aparato secretor (sistema de secreción tipo III), que permite la inyección de proteínas efectoras en el citoplasma de la célula huésped, a través de lo que se ha denominado una "jeringa molecular" (20). El sistema de secreción tipo III se activa después del contacto de la bacteria con células eucarióticas (21), e inyecta proteínas que inducen la modificación del citoesqueleto de actina en células de mamífero, lo cual resulta en la formación de proyecciones de la membrana celular denominadas "ruffles" y en la internalización de *Salmonella* (22-27). SPI-2 contiene genes que

controlan la replicación bacteriana en compartimentos intracelulares de células fagocíticas y en células epiteliales (28-30). Se requiere SPI-3 para que la bacteria sobreviva en macrófagos bajo condiciones limitadas de Mg^{2+} (16, 31). SPI-4 codifica un sistema de secreción tipo I que media la secreción de toxinas, y se piensa que participa también en la adaptación de *Salmonella* al ambiente intracelular del macrófago (32). SPI-5 codifica factores involucrados en la secreción de líquidos por parte de la célula y en reacciones inflamatorias en la mucosa intestinal por *S. dublin*, y en la invasión por *S. typhimurium* (15, 33). En la figura 1 se muestra un diagrama de la distribución de las SPI's en el cromosoma de la bacteria.

Salmonella tiene que adaptarse a cambios drásticos de medio ambiente cuando viaja a lo largo del tracto gastrointestinal, y cuando se mueve del ambiente extracelular al intracelular. Esto lo lleva a cabo modulando su metabolismo y produciendo algunos factores de virulencia (34, 35). Los genes de virulencia se regulan de forma coordinada durante los diferentes estadios de los ciclos infecciosos. El mecanismo de regulación integra una gran variedad de señales ambientales y controla la adaptación de la bacteria activando y/o reprimiendo los genes de virulencia. Para obtener este control, *Salmonella* utiliza varios sistemas de regulación de dos componentes, entre los que se incluyen un sensor de cinasas de histidina y un regulador transcripcional (36). Los sistemas PhoP/PhoQ, PmrB/PmrA, SsrA/SsrB y EnvZ/OmpR, regulan la invasión y supervivencia de la bacteria en compartimentos intracelulares, pero también regulan la supervivencia de las células huésped (37-41). Los sistemas de control de dos componentes controlan a su vez a otros reguladores, como HilA, que en cambio activa la

expresión de genes de virulencia (38, 42). La expresión del gen *hilA* está controlado por los sistemas PhoP/PhoQ y SirA; esto quiere decir que el regulador PhoP reprime a *hilA*, mientras SirA estimula su transcripción. Las señales que activan a SirA son concentraciones bajas de oxígeno, alta osmolaridad y un pH ligeramente alcalino, mientras PhoP se enciende en condiciones limitadas de Mg^{2+} , lo cual podría reflejar el lumen del intestino y el ambiente intracelular, respectivamente (42, 43). De esta manera, *Salmonella* se adapta a las distintas condiciones ambientales que encuentra durante su ciclo infeccioso.

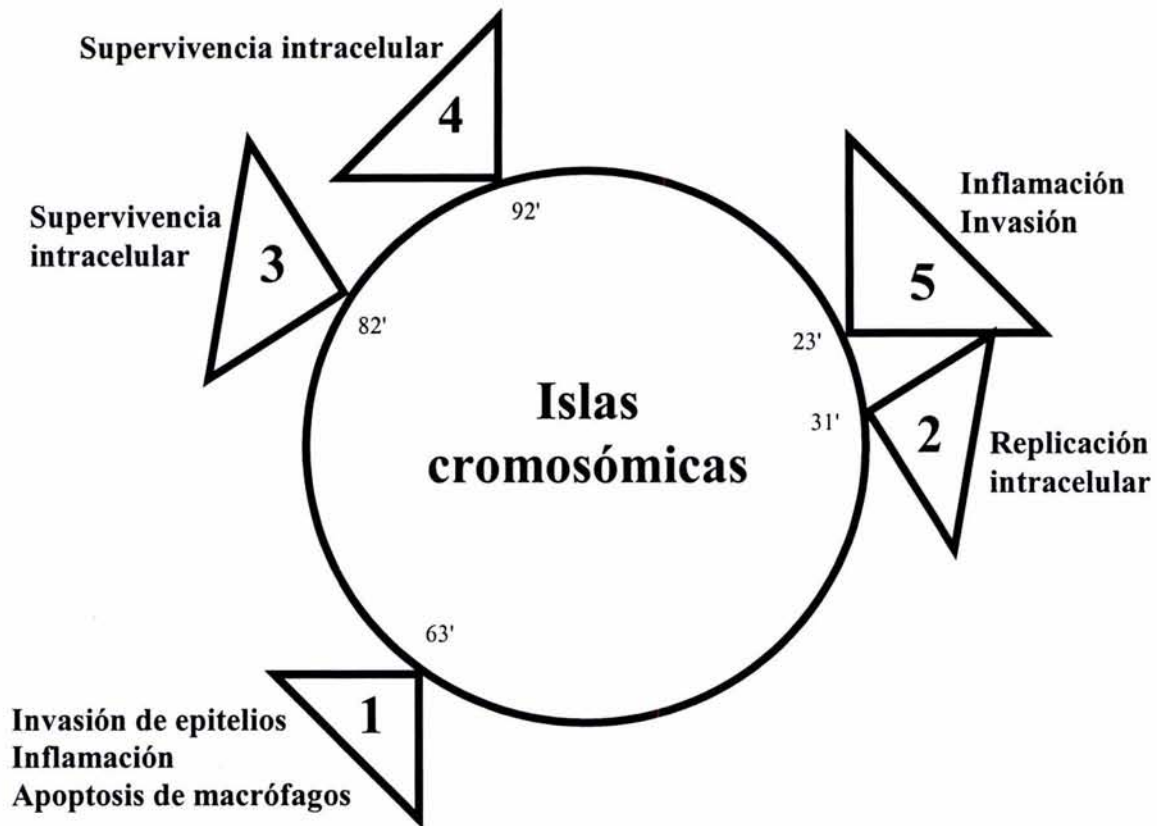


Figura 1. Localización de las islas de patogenicidad en el cromosoma de *Salmonella*. Las SPI's se muestran representadas por triángulos. Las distancias en el cromosoma bacteriano se indican en minutos.

1.1.2. Adhesión e invasión de células M

Salmonella debe sobrevivir al ambiente ácido del estómago para llegar al intestino delgado, donde se mueve a través de las células del epitelio intestinal y alcanza a las células M. Las bacterias interactúan con células epiteliales por medio de las fimbrias, de las cuales se han descrito varios tipos (codificadas por los operones *lpf*, *fim*, *agf*, y *pef*) involucradas en la adhesión de *S. typhimurium* a células epiteliales (44-46). *Salmonella* invade a las células por un mecanismo muy peculiar, caracterizado por la remodelación local de la membrana y del citoesqueleto cortical de actina. Esto lleva a la formación transitoria de unas estructuras muy características denominadas *ruffles* (6, 7, 47), lo que permite que la célula atrape a la bacteria en un proceso semejante a la macropinocitosis que induce el factor de crecimiento epidérmico en células epiteliales (48, 49). La invasión de células epiteliales depende también de otros factores bacterianos, como los reguladores de dos componentes (PhoP/PhoQ, SirA y HilA), y efectores de secreción tipo III, codificados en SPI-1 (23, 50-52). La variedad y la redundancia de factores de invasividad favorecen que *S. typhimurium* alcance los tejidos de la mucosa, a través de diferentes tipos de células epiteliales en diferentes huéspedes.

Durante el proceso de entrada, *S. typhimurium* induce la orientación de una gran cantidad de moléculas de la superficie celular en células epiteliales, entre ellas moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase I (MHC-I), el receptor de fibronectina y CD44 (53). Dentro de la célula epitelial, *S. typhimurium* reside en una vacuola caracterizada por concentraciones bajas de Mg^{2+} y Fe^{2+} , y un pH ligeramente ácido (54). La bacteria viva se acumula en una vacuola que

posteriormente forma extensiones filamentosas dependientes de microtúbulos, y contiene algunos marcadores lisosomales [lysosomal-associated membrane protein (LAMP)1, LAMP2 y cd63] (55, 56). La vacuola que contiene a *Salmonella* (SCV) forma un compartimento único, que es distinto de la vía de degradación endocítica, lo que indica que la bacteria puede regular la composición del compartimiento que la contiene (57). Después de la infección por *S. typhimurium* hay destrucción de células M, lo que facilita la invasión de los tejidos subyacentes y la infección de otras células epiteliales en la superficie basolateral (7, 47).

1.1.3. Invasión de células fagocíticas

El destino de *S. typhimurium* depende del lugar donde la bacteria atraviese la barrera de la mucosa y parece que esto depende del fenotipo invasivo de la bacteria. Los serotipos invasivos utilizan a las células M en el epitelio para cruzar la barrera intestinal (7, 10); los serotipos no invasivos pueden penetrar la barrera intestinal de una manera independiente de las células M (58, 59). Después del transporte por las células M y/o los enterocitos de las vellosidades, *S. typhimurium* se libera en la lámina propia donde es fagocitada por los macrófagos (47, 60, 61), que por mucho tiempo se ha considerado la principal célula blanco que encuentra la bacteria una vez que ha cruzado la barrera epitelial. Los macrófagos residentes constituyen una primera línea de defensa que previene la progresión de la infección por *Salmonella*, pero también son un reservorio en el que la bacteria puede multiplicarse y “ocultarse” del sistema inmune. Se ha descrito que en el domo de los folículos, en las placas de Peyer, hay una gran cantidad de DCs y linfocitos B (62, 63) y muy escasos macrófagos (64). Después de cruzar el FAE,

las DCs también fagocitan *S. typhimurium* (65-67). En contraste a los macrófagos, las DCs no son residentes y pueden migrar a ganglios linfáticos distales después de la ingestión de la bacteria, por lo que pueden ser un nicho importante para la diseminación sistémica de *Salmonella* (68, 69). Por distintas razones, la mayoría de los estudios de patogenicidad *in vivo* se han enfocado a la interacción de *Salmonella* con los macrófagos. *Salmonella* puede infectar a los macrófagos y es capaz de sobrevivir en estas células (70). Inicialmente se pensaba que *Salmonella* inhibía la fusión fagosoma-lisosoma (71), pero más bien parece que la bacteria controla la composición de la vacuola donde reside. Estas vacuolas contienen algunos marcadores lisosomales, entre ellos LAMP1 y fosfatasa ácida lisosomal, pero no tienen actividad de catepsina, ni expresan el receptor de manosa-6-fosfato (72, 73). La bacteria muerta por calor se localiza en compartimentos degradativos que expresan todos los marcadores mencionados. Esto sugiere una participación activa de la bacteria en la composición de las vacuolas. Así que, tanto en células epiteliales como en macrófagos, *Salmonella* puede controlar la fusión de vesículas de la vía secretora y modular la naturaleza de la vesícula donde reside (74). Para sobrevivir en los macrófagos, *S. typhimurium* utiliza un grupo de genes regulados por el sistema PhoP/PhoQ, que incluye los genes activados por PhoP (genes *pag*), el sistema de dos componentes PmrA/PmrB, que controla genes involucrados en la resistencia a péptidos catiónicos, y genes que codifican para transportadores de magnesio (SPI-3).

1.1.4. Diseminación sistémica

Después de la infección de las mucosas, *S. typhimurium* alcanza el bazo y el hígado donde se replica, inicialmente dentro de neutrófilos y macrófagos, y después exclusivamente en los macrófagos (13). Se ha propuesto que la bacteriemia puede alcanzar órganos distantes viajando dentro de los macrófagos. Sin embargo, no hay evidencia experimental que indique que los macrófagos pueden viajar desde la mucosa, drenar a los ganglios linfáticos, alcanzar la circulación, y migrar al bazo. La diseminación sistémica depende del plásmido de virulencia y de la región SPI-2 en la bacteria (29, 30, 75), y las DCs son los mejores candidatos para transportar antígenos, como se mencionó anteriormente (58, 59). Para prevenir la diseminación sistémica y el daño a los tejidos, el huésped infectado requiere de una inmunidad innata competente

1.2. RESPUESTA INMUNE CONTRA *SALMONELLA*

La respuesta inmune contra infecciones primarias por *Salmonella* se ha estudiado en detalle. El curso de un reto subletal podría resumirse como:

- i) Eliminación rápida de una gran cantidad de bacteria;
- ii) Replicación masiva de la bacteria remanente en células del sistema retículo-endotelial (mononucleares y polimorfonucleares) en bazo e hígado;
- iii) Control del crecimiento masivo de la bacteria en estas células, lo que permite mantenerla en una fase estacionaria; y
- iv) Eliminación de la bacteria de los tejidos, lo cual requiere de la participación de mecanismos controlados por genes del complejo MHC y de respuestas específicas de células T.

Se ha demostrado que durante la infección se inducen respuestas inmunes humorales y celulares. También se presenta infiltración masiva de leucocitos polimorfonucleares, hiperplasia de ganglios linfáticos y formación de centros germinales, además de incremento en los títulos de anticuerpo y expresión de citocinas por células presentes en los linfáticos eferentes (76-78). Los mecanismos de protección a largo plazo no están bien definidos, ya que dependen de las combinaciones huésped-parásito, del grado de virulencia de la cepa utilizada, y de la resistencia o susceptibilidad innata del huésped. Sin embargo, lo que si está documentado es que la vacunación con bacteria viva proporciona inmunidad humoral y celular, que ofrece protección óptima en hospederos susceptibles (79, 80). Las vacunas a base de bacterias muertas solo protegen en hospederos resistentes; esto se puede asociar a que solo pueden inducir respuestas humorales y no inducen respuestas celulares (81).

1.2.1. Respuesta inmune innata

La respuesta inmune innata controla los estados agudos de salmonelosis en los ratones. La sobrevivencia de los animales durante la primera fase de la infección depende de su resistencia natural, que controla la multiplicación de *Salmonella* en los macrófagos. Se han descrito varios genes que modifican la resistencia a las infecciones por *Salmonella* (82). El control de la replicación de *S. typhimurium* en el bazo y el hígado depende de la proteína específica de macrófagos / neutrófilos Nramp1 [Natural resistance-associated membrane protein, este gen se conoce también como *Ity*, *Bcg* o *Lsh* (83, 84)]. Los ratones que producen una molécula Nramp1 deficiente, como BALB/c o C57BL6, son susceptibles (*Ity*^s) a la infección por *S. typhimurium* (85, 86). Se ha descrito que Nramp1 también influye en el procesamiento de los antígenos de la bacteria y en el resultado final de la respuesta inmune (87, 88).

Los macrófagos son responsables de muchos de los mecanismos iniciales de la respuesta inmune temprana, y se reconocen como las principales células efectoras contra el patógeno (60, 61). Los PMN aparecen en la sub-mucosa dentro de las primeras horas de la infección, y son las primeras células que infiltran tejidos extraintestinales (89). También se ha descrito que existe activación de células NK, entre 2 y 4 días después de la infección (90, 91). Durante estas etapas tempranas de infección, algunos componentes de *Salmonella*, como el lipopolisacárido (LPS) y otras lipoproteínas en la membrana externa de la bacteria, inducen una respuesta inflamatoria masiva en los tejidos cercanos y señalizan la presencia de la bacteria dentro de las células del huésped. En respuesta, las células endoteliales sobreexpresan moléculas de adhesión (92). El LPS también

activa la producción de citocinas, como factor de necrosis tumoral alfa ($TNF\alpha$) (93, 94), interleucina (IL)-1 (95-97), interferón gamma ($IFN\gamma$) (98-100), IL-12 (101-103), y una gran cantidad de quimiocinas que reclutan células del sistema inmune hacia el sitio de la infección (104, 105). Estas citocinas son reguladores muy importantes durante los estadios iniciales de la infección porque inducen mecanismos bactericidas en los macrófagos, que incluyen la producción de intermediarios reactivos de oxígeno y nitrógeno, y el manejo celular de la bacteria para dirigirla a los lisosomas (106). La presencia temprana de citocinas pro-inflamatorias estimula la respuesta de células T cooperadoras tipo 1 (Th1), que se requiere para establecer la inmunidad protectora (105).

Todos los mecanismos efectores de la respuesta inmune innata descritos controlan la multiplicación de la bacteria, al tiempo que empieza a disminuir la colonización (entre los 7 a 14 días), y la respuesta inmune específica se desarrolla durante la fase de eliminación de la bacteria.

1.2.2. Respuesta inmune específica

Aunque los mecanismos iniciales de resistencia restringen la multiplicación inicial de *Salmonella* durante varios días, los mecanismos efectores de la respuesta inmune innata son incapaces de eliminar a la bacteria del huésped. Los mecanismos efectores de la respuesta inmune específica son los que controlan y erradican a la bacteria, además de proporcionar protección contra la reinfección (3).

1.2.3. Células B y anticuerpos

La participación de las células B, a través de la producción de anticuerpos específicos, durante las infecciones con *Salmonella* está bien documentada.

La infección de ratones con *Salmonella* induce una fuerte respuesta de anticuerpos contra antígenos proteicos, y también contra antígenos no proteicos, como el LPS y el polisacárido Vi (107-110). Sin embargo, los resultados en distintos modelos de protección, mediada por anticuerpos específicos, han sido muy contradictorios:

La vacunación de ratones resistentes (Ity^r) con cepas muertas o atenuadas de *Salmonella* induce protección contra la infección secundaria usando dosis letales de bacteria virulenta, y la protección se puede transferir con suero (111, 112). En ratones susceptibles (Ity^s), la situación es diferente, las vacunas a partir de bacterias muertas solo generan una protección parcial contra el reto con la bacteria virulenta, y la transferencia del suero no transfiere la protección (81). La vacunación de ratones susceptibles con vacunas vivas induce protección contra el reto con la bacteria virulenta, pero para transferir la protección se requiere de la combinación de anticuerpos y de células T (113).

Como se puede ver, la transferencia de suero puede proteger a ratones resistentes, pero no protege a cepas de ratones congénicos con genes de susceptibilidad. Esto ofrece una explicación a la inconsistencia de los resultados de protección mediada por anticuerpos (81). La infección de ratones deficientes de células B (KO de $Ig\mu$) confirma que los anticuerpos no son indispensables en el control de cepas atenuadas. Sin embargo, estos ratones son más susceptibles a la

infección con bacteria virulenta, durante las respuestas primarias y secundarias (114).

Se puede concluir que en animales Ity^f , los anticuerpos son suficientes para controlar a la bacteria virulenta. En cambio, en ratones Ity^s donde la infección con *Salmonella* virulenta representa un reto todavía mayor, los anticuerpos participan en el control de la bacteria, pero la protección depende de otros mecanismos adicionales, principalmente la participación de las células T.

1.2.4. Linfocitos T_{CD4}^+

La localización intracelular de *Salmonella* predispone a que la vía de presentación de antígeno por MHC-II sea la más significativa. De hecho, las células T_{CD4}^+ participan de manera importante en la inmunidad contra la bacteria. Los ratones deficientes de células T_{CD4}^+ (ratones *KO* de MHC-II, o ratones a los que se les eliminaron las células T_{CD4}^+ con anticuerpos) no eliminan a la bacteria de manera eficiente cuando se infectan con cepas atenuadas de *S. typhimurium* (115). En ratones vacunados, la eliminación de las células T_{CD4}^+ reduce la resistencia contra la infección, y la transferencia de células T_{CD4}^+ procedente de ratones donadores vacunados puede proteger a los ratones receptores (115-118). *S. typhimurium* induce una fuerte respuesta de células Th1, que es la responsable de la protección (3, 119). Las citocinas producidas por las células Th1, principalmente $IFN\gamma$ y $TNF\alpha$, son esenciales durante los estadios iniciales de la infección porque están involucradas en la inducción de mecanismos bactericidas en los macrófagos (94, 120). Además, las células T_{CD4}^+ también cooperan con las células B para

producir anticuerpos, ayudan a la formación de granulomas que restringen la diseminación de la bacteria, y activan células T_{CD8}^{+} específicas contra *Salmonella* (3, 121).

1.2.5. Linfocitos T_{CD8}^{+}

Son varios y muy diversos los estudios que involucran a los Linfocitos T_{CD8}^{+} en la inmunidad contra *Salmonella*. Desde 1990 se reconoce que existe una respuesta de tipo citolítica contra la bacteria (122, 123), y se ha demostrado que las células T_{CD8}^{+} participan en infecciones primarias y secundarias en el modelo de ratón (124, 125). En humanos, también se pueden inducir respuestas de LTC inmunizando con cepas atenuadas de *S. typhi* (126-129). En los primeros estudios de las células T_{CD8}^{+} inducidas por *Salmonella*, se demostró que la bacteria utilizaba el sistema de secreción tipo III para inyectar proteínas bacterianas en el citosol de la célula blanco de la respuesta. Esto permite el acceso directo de los antígenos a la vía de procesamiento de antígeno por MHC clase I (130), proporcionando inmunidad protectora (131, 132). Distintas cepas de *S. typhi* y *S. typhimurium* se han utilizado para expresar antígenos extraños y activar células T_{CD8}^{+} específicas contra los antígenos recombinantes (133-135). Utilizando este sistema "acarreador", se ha demostrado actividad de LTC en modelos de protección contra patógenos como *Listeria* (136-138), *Plasmodium* (122, 139), *Leishmania* (140) y virus de influenza (141). Los LTC de los ratones infectados con *S. typhimurium* reconocen células infectadas *in vitro* con *Salmonella* (142), y también reconocen células que presentan péptidos provenientes de macrófagos infectados (143). Estos estudios demuestran que, al igual que otras bacterias

intracelulares, existen antígenos de *Salmonella* que pueden ser procesados y presentados en moléculas MHC-I para ser reconocidos por LTC.

En 1996 se demostró que los ratones deficientes de células T_{CD8}^+ ($\beta 2M^{-/-}$, o tratados con anticuerpo anti-CD8) eliminan cepas de *S. typhimurium* avirulentas con la misma eficiencia que los ratones normales (117). Este trabajo permitía concluir que las células T_{CD8}^+ no eran críticas para la inmunidad protectora contra *Salmonella*. Sin embargo, en el modelo natural de reto oral, con bacteria virulenta, se requieren las dos poblaciones de linfocitos T (T_{CD4}^+ y T_{CD8}^+) para la transferencia efectiva de la inmunidad protectora. Esto concuerda con experimentos posteriores de infección con cepas atenuadas de *S. typhimurium*, donde los ratones $\beta 2M^{-/-}$ tienen una respuesta ligeramente disminuida (79, 144). Pero cuando los ratones son vacunados con cepas atenuadas e infectados con cepas silvestres, la protección se reduce de manera considerable (115, 117, 118, 142, 145), los animales tienen colonización de hígado y bazo por *Salmonella* virulenta después del reto (115, 118, 124, 125), y la transferencia de células de estos animales a ratones no inmunes ya no transfiere la inmunidad observada (115, 146). Todos estos datos indican que existen antígenos de *Salmonella* que pueden ser procesados y presentados a poblaciones de LTC, y además sugieren que estas células pueden tener una participación importante en la inmunidad protectora.

La activación de las células T durante la infección por *Salmonella* requiere del coestímulo por CD28 (147). Después de 3-4 semanas de establecida la infección, entre el 20% y 30% de las células T_{CD8}^+ tienen un fenotipo activado y una gran

proporción de estas células producen $\text{IFN}\gamma$ (119). Después de la eliminación bacteriana, una fracción de estas células mantienen una alta expresión de CD44 y una baja expresión de CD62L ($\text{CD44}^{\text{high}}$, $\text{CD62L}^{\text{low}}$), característica de las células T de memoria (119, 148). Potencialmente una mayoría de las células T_{CD8}^+ productoras de $\text{IFN}\gamma$ podrían recircular al tejido mucoso, ya que expresan la integrina $\beta 7$ (129). Pero, no se sabe si estas células T_{CD8}^+ activadas y productoras de $\text{IFN}\gamma$, reconocen antígenos de *Salmonella* de manera específica. Actualmente se conocen muy pocos epítopes para T_{CD4}^+ (149, 150) y solo uno para T_{CD8}^+ (151).

1.3. PROCESAMIENTO Y PRESENTACIÓN DE ANTÍGENOS A LINFOCITOS T

El procesamiento y la presentación de antígenos son necesarios para la inducción de respuestas inmunes específicas contra los antígenos proteicos, ya que el procesamiento proteolítico de antígenos produce péptidos que se pueden unir a las moléculas MHC para producir complejos MHC-péptido, que posteriormente son presentados a las células T (152). Las moléculas MHC clase I (MHC-I) presentan antígenos a Linfocitos T_{CD8}^+ mientras que las moléculas MHC-II presentan antígeno a las células T_{CD4}^+ . En la figura 2 se muestra un esquema de las moléculas MHC-I y MHC-II, con los sitios de unión a los péptidos antigénicos

1.3.1. Vía citosólica del procesamiento de antígenos: Vía de clase I

La mayoría de las moléculas MHC-I unen péptidos derivados de antígenos presentes en el citosol ("antígenos endógenos") como las proteínas virales, antígenos tumorales, proteínas propias, y antígenos de bacterias o parásitos que penetran al citosol.

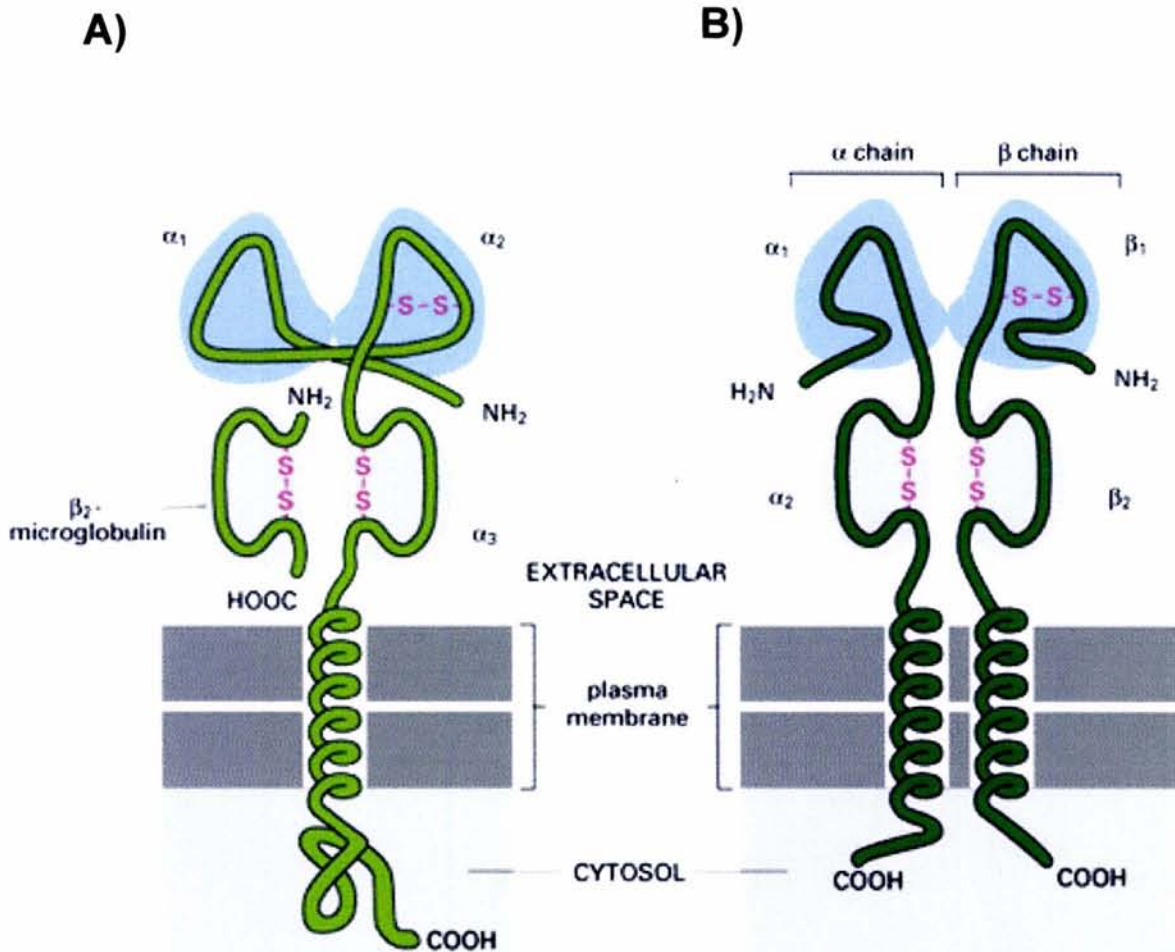


Figura 2. Esquema de las Moléculas MHC-I y MHC-II. (A) La cadena alfa de las moléculas MHC-I tiene tres dominios extracelulares, α_1 , α_2 y α_3 , y se asocia de manera no covalente con β_2 -microglobulina. La cadena α es muy polimórfica, principalmente en los dominios α_1 y α_2 . (B) En las moléculas MHC-II, las dos cadenas son polimórficas, principalmente en los dominios α_1 y β_1 . Existen grandes homologías entre las moléculas MHC-I y MHC-II. En las dos moléculas, los dominios más externos interactúan para formar una hendidura donde se unen los péptidos antigénicos, que son reconocidos por el TCR. Tomado de Biochemistry, © 2002 (W. H. Freeman and Company).

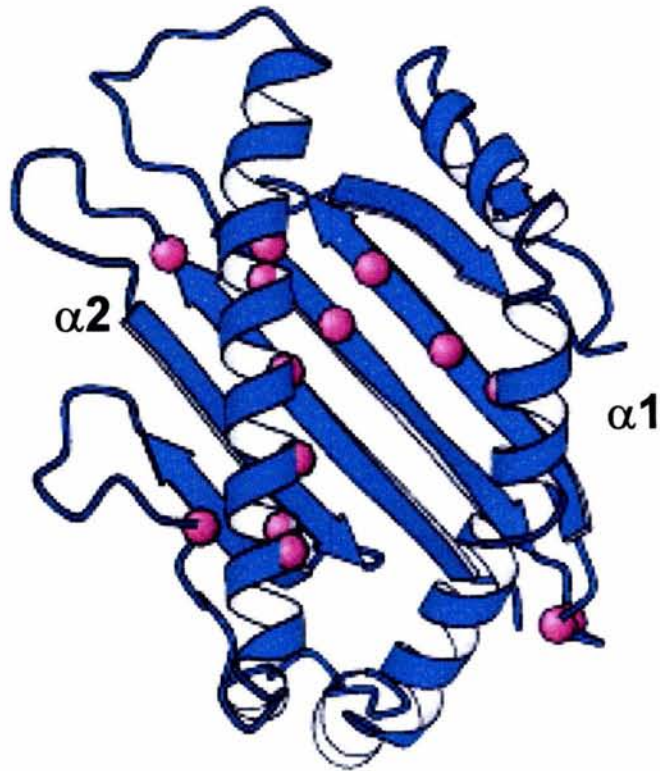


Figura 3. Localización de los residuos polimórficos en la molécula MHC-I. Los polimorfismos de las moléculas MHC-I están localizados en los dominios N-terminales ($\alpha 1$ y $\alpha 2$), y forman el sitio de unión a los péptidos antigénicos. La variabilidad entre alelos se localiza en sitios específicos en el piso o en las paredes internas de la hendidura. Tomado de Biochemistry, © 2002 (W. H. Freeman and Company).

Los antígenos que se unen a MHC-I son degradados por el sistema ubiquitina-proteasoma, que de manera normal está involucrado en la proteólisis de proteínas endógenas (153, 154). En esta vía, la ubiquitina se conjuga primero a los grupos ϵ -amino de las proteínas (155) y requiere de la enzima E1 para activarse y otras dos enzimas, E2 (una proteína acarreadora de ubiquitina), y E3 (una proteína ligasa) para transferir la ubiquitina activada a la proteína que va a ser degradada (155). La cadena de poli-ubiquitina sobre la proteína sirve como una marca que dirige la proteína a la degradación por la partícula proteolítica, el proteasoma 26S (figura 4).

La estructura catalítica de la partícula 26S es el proteasoma 20S, que se compone de 14 diferentes subunidades, arreglados en 4 anillos concéntricos con un canal interno donde se lleva a cabo la proteólisis (153, 154). Los dos anillos externos contienen 7 subunidades α cada uno y no son catalíticos, pero se necesitan para el ensamble de la partícula. Tres de las 7 subunidades β localizadas en los dos anillos internos proporcionan las actividades hidrolíticas de la estructura 20S. Por lo tanto, cada proteasoma contiene seis sitios activos con actividades de tripsina, quimotripsina y glutamil-peptidasa (156). Los complejos reguladores 19S se unen a los dos extremos (anillos- α heptaméricos de la estructura 20S) y contienen sitios de unión a poli-ubiquitina, lo que permite el reconocimiento de las proteínas marcadas por ubiquitina (153, 157). El IFN γ aumenta la presentación de antígenos induciendo la expresión de moléculas MHC y TAPs. Además, induce la incorporación de tres inmuno-subunidades [LMP2 ($i\beta$ 1), LMP7 ($i\beta$ 5) y MECL-1 ($i\beta$ 2)] para reemplazar a las subunidades β 1 (δ), β 2 (MB1) y β 5 (Z) constitutivas en

la estructura del proteasoma 20S (158, 159) (figura 4). Los “inmunoproteosomas” son más eficientes para generar péptidos antigénicos que los “proteosomas constitutivos” (160). LMP2 y LMP7 son importantes para la respuesta inmune celular ya que tienen influencia en la especificidad de la respuesta inmune (161, 162). El IFN γ también regula la expresión de otras dos proteínas, PA28 α y PA28 β , que forman el complejo heptamérico activador del proteasoma PA28. Este multímero es capaz de unirse a los anillos α del proteasoma 20S, aumentando su actividad proteolítica. PA28 $\alpha\beta$ aumenta la actividad proteolítica por el proteasoma 20S, y aumenta también la liberación de epitopes y la sensibilidad a la lisis por LTC (163, 164). Aunque el proteasoma es el principal sistema proteolítico que produce péptidos antigénicos, existe evidencia de otros sistemas de enzimas proteolíticas en el citosol (165).

Los péptidos antigénicos generados en el citosol entran al RE a través de los transportadores asociados al procesamiento de péptidos (TAPs). El dímero de TAP (TAP1 y TAP2) transporta péptidos de entre 6 – 30 aminoácidos de longitud con residuos carboxi-terminal (C-terminal) básicos o hidrofóbicos. TAP se encuentra unida a moléculas MHC-I en la membrana interna del RE a través de Tapasina. Cuando los péptidos antigénicos entran al lumen del RE se unen a la molécula MHC-I; entonces el complejo MHC-I-péptido se libera de tapasina, y egresa del RE hacia la membrana celular. En ausencia de péptido los dímeros cadena α/β 2M son inestables, por lo que no se transportan de manera eficiente hacia la superficie celular y son degradados en el RE o en el citosol por un proceso conocido como degradación asociada al RE, ERAD (166).

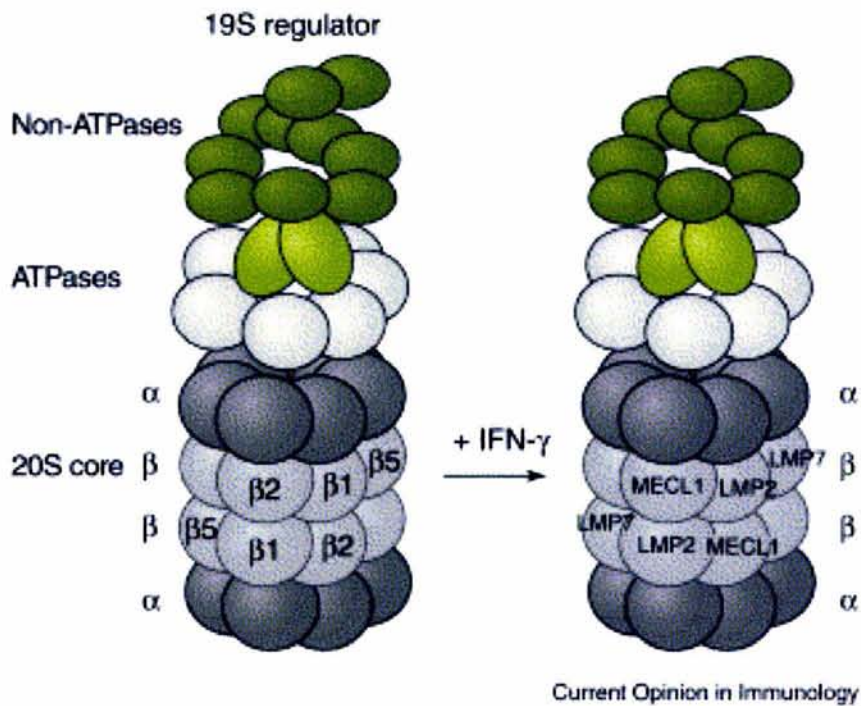


Figura 4. Estructura del proteasoma. El proteasoma 20S consiste de 28 (14 diferentes) subunidades, y se compone de 4 anillos heptaméricos concéntricos. Los anillos más externos contienen las subunidades α , los anillos internos las subunidades β . Tres de las 7 subunidades en cada anillo son sitios activos ($\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 5$). El regulador 19S, que se une a ambos lados de la estructura 20S, se compone de la "base" (6 subunidades con actividad ATPasa) y la "tapa" (8-10 subunidades). El $\text{IFN}\gamma$ induce la síntesis de tres subunidades β con sitios activos. Estas inmuno-subunidades (LMP2, LMP7 y MECL1) se incorporan al complejo 20S, y junto con las otras subunidades, forman el inmunoproteasoma. Tomado de *Current Opinion in Immunology* (2004) 16:76-81 (165).

1.3.2. Vía exógena del procesamiento de antígeno: Vía de clase II

A diferencia de la vía de clase I, el procesamiento y la presentación de antígenos por MHC-II la realizan APCs especializadas, como los macrófagos, las DCs y las células B. Las moléculas MHC-II unen péptidos que provienen de antígenos internalizados por endocitosis, y los degradan en la vía endocítica. Estos antígenos incluyen "antígenos exógenos" (proteínas solubles y antígenos particulados de los patógenos), además de proteínas de la membrana plasmática y membranas de compartimentos vacuolares (152). Los antígenos solubles pueden ser internalizados por las APCs a través de una endocitosis mediada por receptor (dependiente de clathrina) o a través de macropinocitosis (independiente de clathrina) para alcanzar la vía endosomal. Después de la incorporación al sistema de vesículas, las proteínas sufren un desplegamiento y la reducción de los puentes disulfuro, además de la degradación por cistein-proteasas (catepsina L y S) y aspartil-proteasas (catepsina D), que tienen actividad óptima a pH ácido (167-169). Las moléculas de clase II se sintetizan *de novo* en el RE donde se ensamblan y se transportan al Aparato de Golgi reguladas por proteínas chaperonas, entre ellas la cadena invariante (Ii)(170). Los complejos MHC-II-Ii pueden dirigirse tanto a los endosomas (171, 172), como a los fagosomas (173). Junto con las chaperonas DO y DM, Ii regula la unión de péptidos a la molécula MHC-II (174, 175). El péptido derivado de Ii (CLIP) permanece asociado en la hendidura de la molécula MHC-II hasta que DM cataliza su disociación y la unión de los péptidos antigénicos (176). Después de que los péptidos se unen a las

moléculas MHC-II los complejos son excitados a la superficie celular para ser presentados a las células T_{CD4}^{+} (172, 177).

1.4 PRESENTACIÓN CRUZADA

Las dos vías de presentación de antígenos descritas anteriormente están bien documentadas (178, 179). Sin embargo, algunos estudios han demostrado que las APC profesionales pueden procesar antígenos exógenos y presentarlos en moléculas MHC-I (180-182), a través de un proceso conocido como presentación cruzada (del inglés «*cross-presentation*») (183, 184).

1.4.1. El fenómeno de presentación cruzada

Inicialmente se demostró actividad de LTC en respuesta a antígenos de células alogénicas presentados por moléculas MHC-I (183), esto implicaba a las moléculas MHC-I en la presentación de aloantígenos exógenos en células APCs del huésped. Otro trabajo demostró respuestas de linfocitos T_{CD8}^{+} restringidas a MHC-I contra el antígeno T de SV40, después de la inyección de células singénicas, alogénicas o xenogénicas (185), demostrando de nuevo que las APCs del huésped podían incorporar antígenos derivados de las células inyectadas, y presentarlos en moléculas MHC-I. Distintos experimentos *in vitro* han confirmado la presentación de antígenos exógenos por moléculas MHC-I, en modelos tan diversos como células fagocitadas (181, 186), antígenos encapsulados en liposomas (187), antígenos expresados por bacterias que residen en vacuolas (188, 189), antígenos unidos a partículas de látex (190, 191), cuerpos apoptóticos

atrapados por DCs (192-194), antígenos de virus de hepatitis B, y virus de Sendai inactivados por calor (195-197).

1.4.2. Mecanismos de presentación cruzada

Se han propuesto algunos modelos para explicar los mecanismos de procesamiento y presentación de antígenos exógenos por MHC-I. Algunos estudios demuestran que los antígenos particulados son fagocitados y procesados por los macrófagos (143, 188), y que los antígenos bacterianos no escapan del citosol, lo que sugiere que el procesamiento se puede iniciar dentro de los fagosomas de los macrófagos (143, 189, 198, 199). Otros autores sugieren que las DC's son las células más importantes en la presentación cruzada (200, 201). Con solo un par de excepciones (202, 203), se ha documentado que este fenómeno solo ocurre en macrófagos y las células dendríticas.

Los mecanismos de procesamiento de antígeno utilizados en la presentación cruzada podrían resumirse en dos rutas posibles, aunque pueden existir variantes de las mismas. En la primera, una ruta *endosomal*, los antígenos proteicos internalizados en la vía endocítica se degradan por proteasas lisosomales y los péptidos se unen a moléculas MHC-I de reciclaje en endosomas/lisosomas, o en la membrana celular. En la segunda, una ruta *citosólica*, las proteínas internalizadas se transfieren de los endosomas al citosol, y son procesadas por degradación proteosomal y traslocación de péptidos al RE. Normalmente la utilización de TAPs se toma como evidencia de la ruta citosólica.

1.4.3. Los fagosomas como organelos involucrados en la presentación cruzada

En las APCs profesionales se ha demostrado que los fagosomas contienen proteínas de RE (204) y que se requiere reclutamiento directo de la membrana del RE para la formación de estos fagosomas (205). En las membranas de los fagosomas, en estas células, están presentes dos de los componentes que se requieren para explicar la presentación cruzada por el segundo mecanismo (la ruta citosólica). Uno es el aparato que transloca proteínas del RE al citosol para la degradación de proteínas asociada al RE (ERAD). El otro es el complejo cargador de péptidos, que reúne a TAPs, tapasina, calreticulina, Erp57 y dímeros MHC- β 2M (206). La retro-translocación de proteínas del RE por ERAD se realiza a través de componentes del complejo Sec61, cuya función es la transferencia co-traduccional de proteínas sintetizadas *de novo* en el RE (166). Sec61 está presente en los fagosomas de macrófagos y DCs, junto con todos los componentes del complejo de cargaje de péptidos (207-209). La aminopeptidasa del RE (ERAP) es crítica para generar muchos péptidos restringidos a MHC clase I, y también está presente en los fagosomas de DCs (209-211). En estos trabajos se ha demostrado que los fagosomas de los macrófagos contienen proteínas ubiquitinadas y proteosomas asociados en el lado citosólico, de tal manera que las proteínas retro-translocadas del RE al citosol son degradados por los proteosomas (207). Estos datos sugieren que los fagosomas son capaces de llevar a cabo la degradación de proteínas adquiridas por fagocitosis y que pueden generar

péptidos citosólicos a partir de proteínas exógenas, lo cual reforzaría la segunda hipótesis descrita arriba.

Es probable que todavía puedan existir otros mecanismos de presentación cruzada. Al parecer, la presentación cruzada de antígenos exógenos es un mecanismo importante para la activación de T_{CD8}^{+} en enfermedades infecciosas, ya que permitiría la activación de LTC contra patógenos que no infectan directamente APC profesionales o contra patógenos que inhiben la actividad de las APC profesionales.

1.5. LAS PORINAS Y OmpC COMO MODELOS DE ESTUDIO

1.5.1. Estructura y función de las porinas

La membrana externa (ME) de *S. typhimurium* contiene una familia de proteínas formadoras de poro denominadas porinas. Estas proteínas, que oscilan entre 30 y 50 kDa, funcionan como canales que permiten la difusión pasiva de nutrientes a través de la ME, formando homotrímeros que permiten el paso de solutos menores a 600 Da (212). *S. typhimurium* sintetiza cuatro porinas: OmpC, OmpF, PhoE y OmpD (212, 213), que en términos de masa pueden representar hasta un 2%, por lo que constituyen las proteínas más abundantes de la bacteria (214, 215). Las estructuras de OmpF y PhoE de *E. coli*, una porina de *Rhodobacter capsulatus* y OmpC de *S. typhi* ya fueron analizadas por cristalografía de rayos-X (216-218). Cada monómero es un cilindro hueco, que forma el poro a lo largo del eje del barril, con hebras β antiparalelas, *loops* hidrofílicos de longitud irregular en la superficie externa, y giros β cortos que conectan las hebras en la superficie

periplásmica de la ME; presentan una longitud aproximada de 55 Å y un diámetro mínimo de ~7 Å. (216, 217, 219, 220). Las cadenas laterales de la superficie expuesta a la membrana son no-polares, lo que permite la formación de una banda hidrofóbica de ~25 Å de altura que rodea al trímero (Figura 5). En contraste, las cadenas laterales de la superficie de la proteína expuesta al solvente son polares. Todas las porinas descritas en la literatura son muy semejantes entre sí, y solo difieren en su selectividad por grupos iónicos; presentan una alta estabilidad en presencia de detergentes como el SDS y sales biliares; además son muy resistentes a la acción de algunas proteasas (214, 221). La estructura primaria varía entre las porinas (222), pero la estructura de hebras β (7 a 14 residuos cada una) se conserva en el barril de la proteína (Figura 5).

Las porinas de *S. typhi* y *S. typhimurium* están relacionadas inmunológica y estructuralmente (223, 224). Éstas contienen 5 o más epítopes en la superficie, entre 6 a 25 residuos de longitud (225-227), que son parcialmente enmascarados por el Lipopolisacárido (LPS) y por los azúcares del antígeno O (228, 229). También se ha descrito que tienen epítopes conservados en las hebras β transmembranales (224, 225, 227).

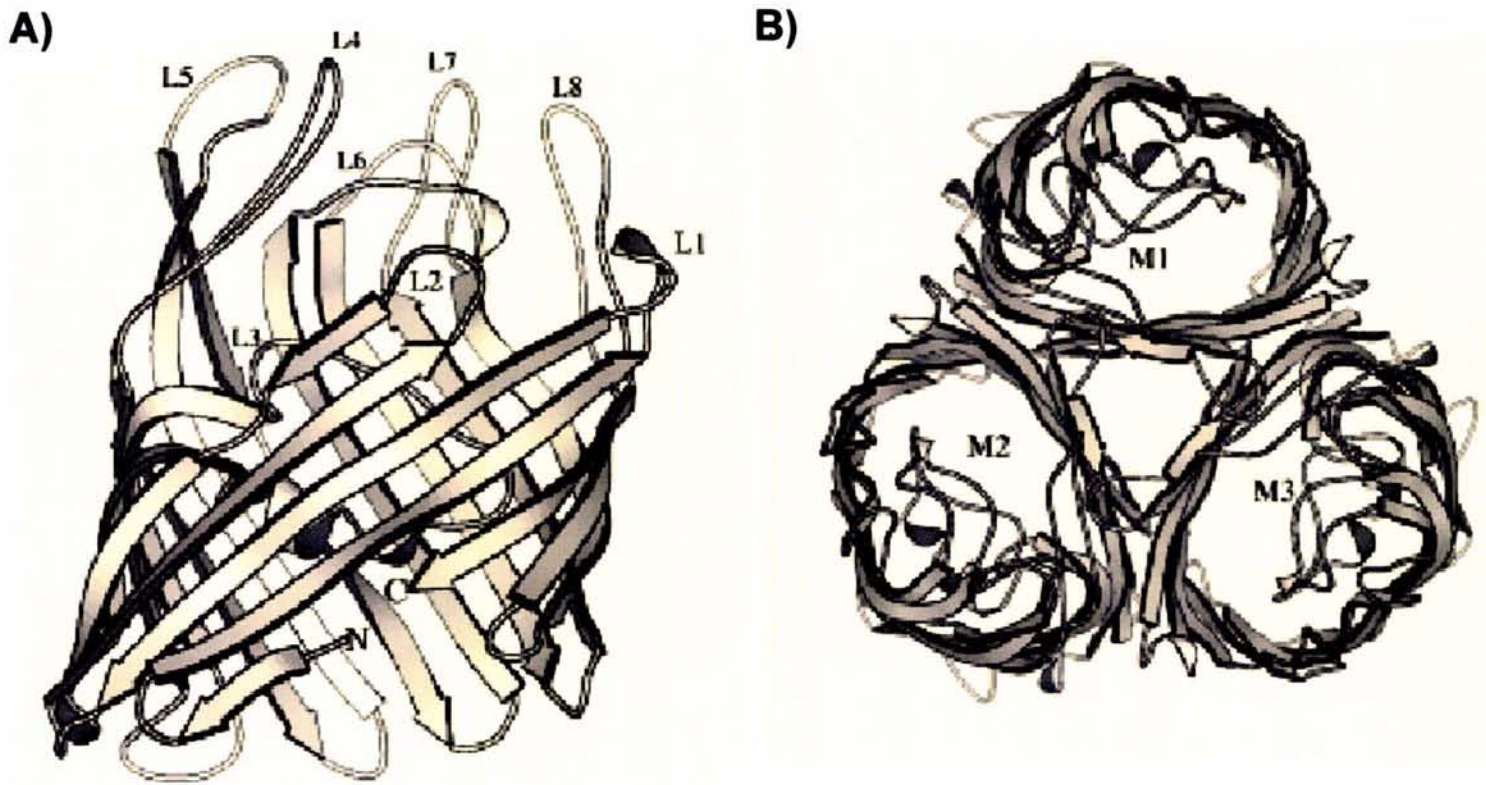


Figura 5. Estructura de OmpC de *S. typhi*. A; Monómero visto a lo largo del eje de la membrana. L1 a L8 se refieren a los *Loops* expuestos al exterior de la bacteria. Los giros cortos están expuestos hacia el espacio periplásmico. B; Trímero visto a través del poro. M1, M2 y M3 representan los monómeros. Imagen cortesía del Dr. Krishnaswamy, *J Biomol Struct Dyn* (2000) 18: 261-71 (230).

1.5.2. Inmunogenicidad de OmpC de *S. typhi*

La participación de las porinas en la inducción de respuestas inmunes está bien documentada. Diversos estudios han mostrado que la inmunización con porinas de bacterias gram-negativas como *Neisseria gonorrhoeae* y *N. meningitidis* induce protección contra las infecciones causadas por estas bacterias (231-234). Las porinas de otras bacterias gram negativas también inducen un estado de protección en modelos experimentales (235-237).

La vacunación de ratones con porinas purificadas de *S. typhi* proporciona protección contra el reto con cepas virulentas de *Salmonella* (238-242), y se ha demostrado que las porinas OmpC y OmpF participan en esta inmunidad protectora, donde actúan tanto la respuesta de anticuerpos como respuestas de Linfocitos T_{CD4}⁺ (238, 243).

Las porinas de *S. typhi* también inducen respuestas inmunes en el humano. Al evaluar la respuesta inmune humoral de pacientes con fiebre tifoidea en fase de convalecencia, se encontraron anticuerpos con isotipo IgG que reconocen a las porinas (244). Los individuos con fiebre tifoidea y los individuos a quienes se administró una vacuna oral presentaron una respuesta inmune celular en contra de las porinas (245). Además, la vacunación de voluntarios sanos con una dosis subcutánea de porinas induce una respuesta de anticuerpos de subtipo IgG1 e IgG2, y respuestas de células T caracterizadas por la producción de IFN γ (246). Estos resultados demuestran la utilidad de estas proteínas en la inducción de un status protector contra *S. typhi*, tanto en el modelo de ratón como en el modelo humano.

El gen de la porina OmpC ha sido clonado y secuenciado (247), y la inmunización de ratones con la proteína recombinante induce una protección de 40% al reto con 100 DL50 de la bacteria viva (248). El monómero de OmpC tiene 357 aminoácidos y un peso molecular de 39 kDa. OmpC se expresa durante la infección (224) y se ha demostrado que puede expresar epítopes heterólogos en la superficie bacteriana (249, 250). Dado que OmpC es uno de los principales antígenos con epítopes únicos expuestos en la superficie de la bacteria (251, 252), esta proteína se podría utilizar en el diagnóstico y diseño de vacunas polivalentes. Por todo esto, la proteína OmpC de *S. typhi* ha sido un buen antígeno candidato para realizar estudios estructurales y de caracterización de regiones antigénicas (218, 253).

II. Justificación

La respuesta inmune protectora contra infecciones bacterianas intracelulares requiere de una respuesta inflamatoria mediada por Linfocitos T_{CD4}^{+} y Linfocitos T Citotóxicos (LTC), donde el $IFN\gamma$ juega un papel fundamental. La vacunación con porinas de *S. typhi* protege ratones contra el reto con cepas virulentas de *S. typhi* y *S. typhimurium*. Las proteínas OmpC y OmpF en la membrana externa de la bacteria son las responsables de este efecto protector, donde es evidente una respuesta inmune celular tanto proliferativa como citotóxica. Se ha descrito que los LTC de ratones infectados por *Salmonella* pueden estar restringidos por moléculas MHC no clásicas (MHC-Ib) y por moléculas clásicas (MHC-Ia). Para la respuesta restringida por MHC-Ib solo se ha descrito un antígeno, y no se han identificado antígenos blanco de la respuesta citotóxica para MHC-Ia. La ingestión de cepas atenuadas de *S. typhi* por voluntarios sanos induce respuesta de LTC restringidos a MHC-I (126); Pasetti y colaboradores describieron una respuesta de LTC restringidos por la molécula clásica H2-L^d después de la infección con cepas atenuadas de *Salmonella* (254); y la infección de macrófagos, activados por $IFN\gamma$, con *Salmonella* virulenta induce la secreción de péptidos que pueden estabilizar a la molécula clásica H2-K^b en la superficie de células RMA-S (143). Estos hallazgos involucran a las moléculas MHC-Ia en la activación de los LTC. Este trabajo está dirigido a demostrar la presencia de LTC en un modelo particular de salmonelosis en ratón (fondo genético H2^b/K^b), por un lado; y por otro, a conocer la especificidad de los mismos caracterizando a la porina OmpC, una proteína muy abundante en

la membrana externa de *Salmonella* y uno de los dos componentes de la preparación utilizada en ensayos de protección (238).

III. Hipótesis

Durante la infección con *Salmonella enterica* se generan Linfocitos T Citotóxicos restringidos por moléculas MHC clase I dirigidos contra la proteína de membrana externa OmpC.

IV. Objetivos

Objetivo General

Identificar las secuencias de la proteína OmpC que se presentan por moléculas MHC clase I y que son blanco de Linfocitos T Citotóxicos.

Objetivos Específicos

1. Identificar las secuencias de OmpC que presenten las características de unión a la molécula MHC clase I H2-K^b, y que puedan ser generados por el proteasoma.
2. Sintetizar los péptidos en fase sólida y demostrar su capacidad de unión a la molécula H2-K^b.
3. Demostrar la presencia de clonas que reconocen las secuencias identificadas en ratones inmunizados con los péptidos de OmpC.
4. Evaluar la respuesta de Linfocitos T Citotóxicos de ratones infectados con los serotipos Typhi y Typhimurium, contra células que presentan los péptidos sintéticos de OmpC.

V. Materiales y Métodos

5.1. Reactivos

Todas las sales y reactivos utilizados fueron de marca Sigma (St. Louis, MO), a menos que se indique otra marca en el texto.

5.2. Animales de experimentación

Se utilizaron ratones hembras C57Bl/6j (B6, H2^b/K^b), de 8 a 10 semanas de edad, obtenidos de Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Los animales se mantuvieron en el bioterio de Posgrado de Facultad de Química, UNAM, donde se les suministró alimento y agua *ad libitum*.

5.3. Líneas celulares

Todas las líneas celulares se cultivaron en medio RPMI-1640 (Gibco, Grand Island, NY). Para los ensayos de citotoxicidad solo se utilizó medio DMEM (Gibco) con 20% de SFB, 2 mM de L-glutamina, 1mM de piruvato de sodio y 50 μ M de 2-ME. La línea celular RMA-S (donación del Dr Günter Hammerling; *German Cancer Research Center*, DKFZ, Heidelberg, Alemania) es un timoma deficiente en TAP2 que expresa moléculas de clase I H-2K^b sin péptido en la superficie celular (255). Esta línea celular se usó en los ensayos de unión de péptidos a la molécula K^b, y como blanco en los ensayos de citotoxicidad. Las líneas celulares utilizadas se resumen en la tabla I.

5.4. Hibridomas y anticuerpos monoclonales (mAb).

Los hibridomas se mantuvieron en cultivo en medio RPMI-10 a una densidad máxima de 2×10^6 células por ml. Las células se separaron por centrifugación a 2000 rpm en una centrífuga (SORVALL[®] RT 6000D) y se colectó el sobrenadante (SN) de cultivo. El mAb producido por el hibridoma Y3 reconoce a la molécula H2-K^b estabilizada presentando péptidos (256). Se utilizaron también mAbs obtenidos de los SN de los hibridomas anti-D^b 28-14-8S (ATCC HB-27, Rockville MD (257)) y anti-K^d SF1-1.1.10 (ATCC HB-159). Los sobrenadantes de cultivo se utilizaron para hacer evidente la unión de péptidos a las moléculas H2-K^b, D^b y K^d en los ensayos de unión de los péptidos a las moléculas.

Tabla I. Líneas celulares e hibridomas.

Líneas Celulares e hibridomas	Descripción	Fuente o Referencia
RMA	Línea celular proveniente de un linfoma de células T. Fue donada por el Dr. Günter Hammerling. German Cancer Research Center, DKFZ, Heidelberg, Alemania.	Ref (256)
RMA-S	Línea celular mutante derivada de RMA con deficiencia en TAP2. Donada por el Dr. Günter Hammerling. German Cancer Research Center, DKFZ, Heidelberg, Alemania.	Ref (258)
Y3	Donada por el Dr. Günter Hammerling. Es un hibridoma productor del mAb anti-K ^b (subtipo IgG2a).	Ref (259)
28-14-8S	Obtenido de ATCC. Es un hibridoma productor del mAb Anti-D ^b (Subtipo IgG2a).	ATCC HB-27
SF1-1.1.10	Obtenido de ATCC. Es un hibridoma productor del mAb Anti-K ^d (subtipo IgG2a).	ATCC HB-159

5.5. Cepas bacterianas

La cepa virulenta de *S. typhi* 9,12,Vi:d (9,12,Vi:d) se aisló originalmente de un paciente con fiebre tifoidea, y se ha mantenido en el laboratorio de Inmunoquímica, CMN Siglo XXI IMSS, desde 1979 (239).

S. typhimurium SL3261 (SL3261) es una mutante derivativa *aroA* (SL1344 atenuada Δ *aroA*, *hisG*, *xyl*, *rpsL*) de la cepa virulenta de ratón SL1344 (138).

S. typhimurium 14028 es una cepa virulenta, serotipo 4,5,12:i:1,2, que se obtuvo de *American Type Culture Collection* (ATCC CDC 6516-60) y fue un obsequio de la Dra. Celia Alpuche-Aranda (Laboratorio de Infectología, Microbiología e Inmunología; Hospital General de México-UNAM).

Todas las cepas bacterianas se crecieron en caldo BHI (Bioxon; Becton Dickinson de México) ó en placas de agar BHI (Bioxon). La descripción de las cepas bacterianas utilizadas se resume en la tabla II.

Tabla II. Cepas bacterianas.

Cepas Bacterianas	Descripción	Fuente o Referencia
9,12,Vi:d	<i>Salmonella enterica</i> serotipo Typhi. Aislada de un paciente mexicano. CMN Siglo XXI, IMSS.	Refs. (238, 239)
SL3261	<i>Salmonella enterica</i> serotipo Typhimurium. Cepa atenuada obtenida a partir de la cepa SL1344 Δ aroA, hisG, xyl, rpsL.	Ref. (260)
14028	<i>Salmonella enterica</i> serotipo Typhimurium, cepa Wild type, depositada como <i>Salmonella typhimurium</i> . Donada por la Dra. Celia Alpuche-Aranda.	ATCC CDC 6516-60 Ref. (261)

5.6. Determinación de LD₅₀ para *Salmonella typhimurium*

El número de bacterias se calculó a partir de una curva estándar graficando UFC vs Absorbancia a 540 nm (A_{540}). Las cepas bacterianas se crecieron toda la noche en BHI caldo a 37 °C, en un baño de agua con agitación. Al día siguiente, los cultivos bacterianos en fase logarítmica se diluyeron en el mismo medio de cultivo (1:1000), y se incubaron con agitación hasta alcanzar una densidad de 0.59 - 0.61 unidades de A_{540} (considerando este punto = 1×10^9 bacterias por ml). El número de bacterias se confirmó en cada experimento realizando diluciones seriadas (1:5) del cultivo bacteriano en solución salina fisiológica y cultivando 18 h a 37 °C, por duplicado, en placas de agar Mc Conckey. Se agregaron 100 μ l de cada dilución, se esparcieron en las placas, y se contaron las UFC a las 24h de cultivo. Se consideró un número confiable cuando el promedio de los duplicados correspondió a la dilución. Previo a la infección con *S. typhimurium*, los ratones recibieron 100 μ l de NaHCO₃ para neutralizar el pH ácido del estómago usando una sonda/alimentador de acero inoxidable (22 X 1[1/2] no. 7920. Popper & Sons, Inc., New Hyde Park, NY). Inmediatamente después, los ratones se infectaron de manera orogástrica (o.g.) utilizando la misma sonda/alimentador con 4, 20, 100, 500, 2560, 12800, y 64000 bacterias de la cepa *S. typhimurium* 14028. La sobrevivencia de los animales se registró diariamente y se representó como porcentaje de los animales vivos.

5.7. Síntesis de péptidos y HPLC

Los péptidos correspondientes a OmpC de *S. typhimurium* en las secuencias [73-TRVAFAGL], [132-RNTDFFGL] y el correspondiente a ovoalbúmina [257-SIINFEKL], se sintetizaron en el laboratorio de Inmunoquímica CMN Siglo XXI del IMSS. Se obtuvieron utilizando síntesis Fmoc (fluorenyl-methoxycarbonyl) en un sintetizador automático Synergy modelo 432A (Applied Biosystems; Foster City, CA), de acuerdo a los procedimientos descritos (262). Después de la síntesis, cada péptido unido a la resina se transfirió a un tubo falcon de 50ml (Becton Dickinson; San Jose, CA) donde se desprendió de la resina, y se eliminaron los grupos protectores usando métodos estándar (263, 264). Brevemente, se preparó un coctel con 0.75 g de fenol cristalino ultrapuro, 0.25 ml de 1,2-etanedithiol, 0.5 ml de thioanisole, 0.5 ml de agua desionizada y 10 ml de ácido trifluoroacético. Se agregaron 2.5 ml de esta mezcla y se incubó a temperatura ambiente por 1h 30 min. con agitación. Posteriormente se agregaron 15 ml de metil tert-butil eter frío (4 °C) para lavar, y se agitó vigorosamente en un vórtex. Los tubos se centrifugaron a 2000 rpm por 10 min a 4 °C. Se decantó el sobrenadante y se repitieron los lavados en 3 ocasiones. Se permitió que los péptidos se secaran a temperatura ambiente, y se reconstituyeron en 3 ml de agua desionizada. La pureza de los péptidos se verificó inyectando un volumen de 50 µl en un HPLC (Waters-Millipore, Bedford, MA) usando una columna delta pak C18 fase reversa (Millipore Corporation; Bedford, MA; 3.9 X 150 mm). Los péptidos se liofilizaron en un sistema de liofilización (Heto-Holten, Allerød, Denmark), y se almacenaron a temperatura ambiente. Para los ensayos, los péptidos se reconstituyeron en buffer

salino de fosfatos (PBS) a una concentración de 1 mg/ml, y posteriormente se diluyeron en medio RPMI-1640 (GIBCO; Grand Island, NY) a las concentraciones requeridas.

5.8. Ensayos de unión y citometría de flujo

En una placa de 96 pozos de fondo plano (Nalge Nunc International) se incubaron 300,000 células RMA-S con 5, 25, 50 y 100 μ M de cada péptido por 6-8 hrs, en un volumen final de 200 μ l de medio de cultivo RPMI amortiguado con NaHCO_3 y suplementado con 10% (vol/vol) de suero fetal de bovino (SFB; Equitek, BQ; México), 2 mM L-glutamina (GIBCO; Grand Island, NY), y 50 μ M 2-ME. La incubación se realizó en una estufa de cultivo (NUAIRE, Plymouth, MN) a 37 °C y atmósfera con 5% de CO_2 . Después de tres lavados con solución de lavado (PBS conteniendo 2% SFB), las células se centrifugaron 1100 rpm (290 x g) en una centrífuga (SORVALL® RT 6000D) por 2 min. Se retiró el sobrenadante (SN) y las células se resuspendieron en 100 μ l de SN de cultivo de los hibridomas Y3 (anti K^b (256)), 28-14-8S (anti- D^b (257), ATCC HB-27) o SF1-1.1.1 (anti- K^d , ATCC HB-159) por 30 min a 4 °C (Tabla I). Se lavaron las células en tres ocasiones con solución de lavado y se incubaron 30 min. con un segundo anticuerpo (dilución 1:100), de cabra anti-IgG de ratón y conjugado a isotiocianato de fluoresceína (GIBCO BRL®, Grand Island, NY). Las células se lavaron en tres ocasiones y se agregó ioduro de propidio (25 μ g/ml en solución de lavado) para excluir las células muertas en un ensayo de separación celular activada por fluorescencia (FACS). Las células se

analizaron en un citómetro de flujo FACSsort (Becton Dickinson; San Jose, CA) usando el software CellQuest (Becton Dickinson).

5.9. Inmunización y estimulación *in vitro*

La inducción de LTC contra los péptidos se evaluó de manera restringida a MHC-I. Se inmunizaron grupos de 5 ratones de manera subcutánea en la base de la cola con 100 µg de péptido libre en adyuvante incompleto de Freund (AIF), en tres ocasiones con intervalos de 1 semana, como se ha descrito (265). Diez días después de la última inmunización, se sacrificaron los animales. Se les extrajo el bazo, que se disgregó en cajas petri esteriles de vidrio con 5 ml de medio DMEM-5 usando agujas estériles calibre no. 22. Las células se recuperaron centrifugando por 5 min. a 1100 rpm a 37 °C. Se descartó el medio de cultivo y se eliminaron los eritrocitos utilizando 5 ml de buffer de lisis ACK por cada bazo de ratón. Las células se incubaron por 5 min a 37 °C . Se lavaron en 2 ocasiones con medio DMEM-5 y finalmente se resuspendieron en DMEM-20 a una densidad de 6×10^6 células/ml en un volumen de 5 ml. Las células se estimularon *in vitro* en botellas de cultivo de 25cm² (Nalge Nunc International) con 50 µM de cada péptido, por 5 días. Después de la incubación, las células se colectaron y se centrifugaron 5 min. a 1100 rpm, se resuspendieron en medio DMEM-20 y se contaron las células viables en un hemocitómetro por exclusión de azul tripano. Estas células se usaron como efectoras en los ensayos de citotoxicidad.

5.10. Infecciones *in vivo*

El número de bacterias se calculó a partir de una curva estándar graficando UFC vs Absorbancia a 540 nm (A_{540}). Las cepas bacterianas se crecieron toda la noche en BHI caldo a 37 °C, en un baño de agua con agitación. Al día siguiente, los cultivos bacterianos en fase logarítmica se diluyeron en el mismo medio de cultivo (1:1000), y se incubaron con agitación hasta alcanzar una densidad de 0.59 - 0.61 unidades de A_{540} (considerando este punto = 1×10^9 bacterias por ml). El número de bacterias se confirmó en cada experimento realizando diluciones seriadas (1:5) del cultivo bacteriano en PBS y cultivando 18 h a 37 °C, por duplicado, en placas de agar Mc Conckey. Se agregaron 100 μ l de cada dilución, se esparcieron en las placas, y se contaron las UFC a las 24h de cultivo. Se consideró un número confiable cuando el promedio de los duplicados correspondió a la dilución.

Previo a la infección con *S. typhimurium* (SL3261 o 14028) a los ratones se les administró 100 μ l de NaHCO_3 para neutralizar el pH ácido del estómago usando una sonda/alimentador de acero inoxidable (22 X 1[1/2] no. 7920. Popper & Sons, Inc., New Hyde Park, NY).

Inmediatamente después, los ratones se infectaron de manera orogástrica (o.g.) con 1×10^6 UFC's de la cepa SL3261 utilizando la misma sonda/alimentador.

Después de 6 semanas se obtuvieron los bazos de los ratones, se restimularon las células con péptido *in vitro* y se evaluó la actividad citotóxica. La infección de ratones con *S. typhi* se realizó por vía intraperitoneal (i.p.) con 5×10^3 UFC de la cepa 9,12,Vi:d en 0.5 ml de PBS. Otro grupo se infectó con la misma cantidad de bacteria usando 0.5 ml de mucina al 5% en PBS. Seis semanas después de la

infección se sacrificaron los ratones, se obtuvieron los bazos, y las células se estimularon *in vitro* como se describió anteriormente.

5.11. Ensayo de citotoxicidad

La actividad de LTC se evaluó en un ensayo estándar de liberación de ^{51}Cr con diferentes relaciones efector:blanco de acuerdo al protocolo descrito (266). Los linfocitos obtenidos del bazo de ratones infectados, o inmunizados con péptido, se estimularon *in vitro* como se describió anteriormente (*ver inmunización y estimulación in vitro*), y se evaluó su actividad citolítica sobre las células apropiadas (RMA-S pulsadas con el péptido correspondiente).

Células blanco. Las células RMA-S (800,000 cels/pozo) se mantuvieron a 37 °C por 24 h, en placas de 12 pozos (Nalge Nunc International). Posteriormente, se les agregó péptido a una concentración de 50 μM por 6-8 h, en un volumen final de 2 ml de medio DMEM-10. Se lavaron en tres ocasiones con DMEM-5, y se marcaron con 100 μCi de $^{51}\text{CrO}_4\text{Na}_2$ (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) por 2 h a 37 °C. Después de tres lavados con DMEM-5, las células RMA-S pulsadas con péptido se resuspendieron en DMEM-20, se contaron, se ajustaron a 30,000 células/ml, y se usaron como blanco para la lisis por LTC.

Células efectoras. Se prepararon diluciones por triplicado en placas de 96 pozos de fondo redondo (Nalge Nunc International). Se preparó una suspensión celular a 3,000,000 cels/ml y se tomaron 100 μl para depositar por triplicado en la placa de 96 pozos para la primera dilución. Se agregaron 100 μl de medio DMEM-20 a los siguientes pozos para realizar diluciones seriadas 1:2, a partir de esta primera

dilución de células efectoras. Se depositaron 100 µl de la suspensión de células blanco (30,000 células/ml) en toda la placa. La placa se centrifugó a 1000 rpm por 1 min y se depositó en la estufa de cultivo por 5 horas. El volumen final para cada pozo fue de 200 µl conteniendo 300,000 células efectoras para 3,000 células blanco en la primera dilución (relación 100:1); 150,000 efectoras para 3,000 para la segunda (relación 50:1); 75,000 para 3,000 (relación 25:1) y 37,500 para 3,000 (relación 12.5:1).

Los resultados se expresan como porcentaje de la lisis específica y se calcularon de la siguiente manera:

$$\% \text{ de Lisis} = 100 \times \frac{[\text{liberación experimental} - \text{liberación espontánea}]}{[\text{liberación máxima} - \text{liberación espontánea}]}$$

La liberación espontánea para todas las células blanco utilizadas nunca excedió el 15% de la liberación máxima.

VI. Resultados

6.1. Identificación de epítopes OmpC que se unen a la molécula H2-K^b

Los péptidos eluidos de la molécula MHC-I de ratón H-2K^b tienen, en promedio, 8-9 aminoácidos de longitud y presentan en la posición 5 (P5) un residuo aromático (como Tirosina ó Fenilalanina) y en P8 un aminoácido hidrofóbico (como Leucina, Valina, o Isoleucina) (267): XXXXF/YXXL/V/I (los aminoácidos están expresados en código de una letra, donde X puede ser cualquier aminoácido). Varios procesos celulares contribuyen a la generación de epítopes para LTC, y entre los más importantes se encuentran la producción de péptidos por el proteosoma, el transporte de péptidos al RE, y la unión de péptidos a las moléculas MHC-I dentro del RE (268, 269). Las reglas que rigen estos mecanismos son bien conocidas, y se han utilizado para diseñar algoritmos de predicción. Los algoritmos que están disponibles en la red ("*world wide web*") se basan en estructuras, motivos de unión, matrices o redes neurales artificiales (270, 271). El C-terminal de la mayoría de los ligandos de MHC-I es generado por el proteosoma. El N-terminal se produce directamente por el proteosoma o puede "ajustarse" al tamaño correcto por la acción de aminopeptidasas residentes del RE (165). Para la identificación de epítopes (péptidos octámeros) para células T_{CD8}⁺ derivados de OmpC de *S. typhimurium*, se siguieron los siguientes pasos:

- Primero, se seleccionó el alelo de ratón K^b (H2-K^b), utilizando el programa **BIMAS** (en la dirección electrónica: http://bimas.dcrf.nih.gov/molbio/hla_bind/), para predecir potenciales ligandos de OmpC. BIMAS clasifica péptidos octámeros, nonámeros o decámeros, basado en estimaciones del tiempo medio de

disociación del péptido que se une a la molécula MHC. El análisis se basa en tablas de coeficientes deducidas de la literatura publicada por el Dr. Kenneth Parker (272, 273). Se ingresó la secuencia de la proteína OmpC madura (sin secuencia señal) al programa, y se solicitaron péptidos de ocho residuos aminoácidos. Los péptidos listados en la tabla III representan, en el orden descrito, los mejores ligandos potenciales dentro de la secuencia de la proteína OmpC. El análisis de Ovalbúmina reportó la secuencia [257-SIINFEKL] como el mejor ligando para la molécula H2-K^b con un score de 17.424. Este péptido (Ova₂₅₇₋₂₆₄) se describió a partir de la elusión y secuenciación de ligandos naturales de la molécula H2-K^b, y es un péptido utilizado como testigo en la mayoría de los ensayos de unión debido a que se une con una gran afinidad a la molécula K^b (258).

- Segundo, se utilizó el programa **ProPred-I** (disponible en la dirección electrónica: <http://www.imtech.res.in/raghava/propred1/index.html>) para predecir la generación proteosomal del C-terminal para los péptidos potenciales de H2-K^b. ProPred-I predice la generación de péptidos por el proteasoma que pueden unirse a moléculas MHC-I. Para esto, ProPred-I utiliza matrices para 47 alelos MHC-I, modelos proteasomales y modelos inmuno-proteasomales para identificar las regiones "promiscuas" en una secuencia dada (274). El análisis de OmpC de *S. typhimurium* proporcionó las secuencias de péptidos listadas en la tabla IV. La secuencia [11-FCFDVFKEL] de Ova fue el mejor péptido predicho tener el mejor score para ser generado por el proteasoma (score 28.8; Log score 3.3604; y 52.95 % del mejor score), y se muestra con fines comparativos (tabla IV).

- Tercero, se seleccionaron las secuencias que cumplieron ambos criterios para sintetizar los péptidos y realizar los ensayos biológicos. De manera interesante, el péptido mejor ligando potencial predicho para H2-K^b por el programa BIMAS a partir de OmpC, [31-GDQTYMRI], aparece en la posición 39 con muy pocas posibilidades de ser generado por el proteasoma (tabla IV).

Tabla III. Predicción de epítopes de OmpC[§] que se unen y estabilizan a H2-K^b utilizando el programa BIMAS.

Prioridad	Residuo aminoácido	Secuencia ^ψ	Score* (t ^{1/2} de disociación del péptido con esta secuencia a la molécula H2-K ^b)
1	31	GDQTYMRI	21.600
2	132	RNTDFGL	15.840
3	236	YFQTYNAT	7.200
4	314	TYFNTNM	6.600
5	325	VDYKINLL	6.000
6	43	ETQVNDQL	3.600
7	262	KAQNFVV	3.300
8	73	TRVAFGL	3.300
9	127	GYATYRNT	2.880
10	94	YGVTYDVT	2.880
11	304	DIVKYVDV	2.880
12	227	ANNIYVAA	2.640
13	312	GATYYFNT	2.400
14	232	VAAQYFQT	2.400
15	292	ISNGYGAS	2.200
16	216	ATVYTGGL	2.200
17	100	VTSWTDVL	2.000
18	78	AGLKFADA	1.742
19	29	SDGDQTYM	1.452
20	13	LFGKVDGL	1.320
...
1	OVA257	SIINFEKL	17.424

[§]El análisis se realizó sobre la secuencia "madura" de OmpC de *S. typhimurium*, eliminando la secuencia del péptido líder (acceso GenBank O52503).

^ψLa secuencia de aminoácidos está expresada en código de una letra.

^{*}Tiempo medio de disociación de β2m de complejos H2-K^b / péptido, en minutos a 37 °C.

Tabla IV. Predicción de epítopes OmpC generados por el proteosoma[§] utilizando el programa ProPred-I.

Alelo: MHC H2-K^b					
Prioridad	Secuencia^ψ	Residuo aminoácido	Score	Log Score[‡]	% del mejor (escala Log)
1	RNTDFFGL	132	12.000	1.2809	20.18
2	TRVAFAGL	73	6.600	0.6931	10.92
3	NTDDIVAL	344	3.600	0.4600	7.25
4	ENTNGRSL	159	2.880	0.1823	2.87
5	AFAGLKFA	76	2.400	-1.4271	0
6	AITTSKRT	191	2.400	-1.8426	0
7	VAFAGLKF	75	2.400	-3.4112	0
8	TRDAGINT	338	2.200	-3.7297	0
9	DFGLRPSV	275	2.200	-3.9120	0
10	DSWTRVAF	70	2.000	-5.8091	0
...
39	GDQTYMRI	31	0.600	-9.7211	0
...
1 (OVA)	FCFDVFKEL	11	28.800	3.3604	52.95

[§] El análisis se realizó sobre la secuencia "madura" de OmpC de *S. typhimurium*, eliminando la secuencia del péptido líder (acceso GenBank O52503).

^ψ La secuencia de aminoácidos está expresada en código de una letra.

[‡] El score más alto alcanzable por un péptido, en escala logarítmica, es 6.346.

De acuerdo al análisis de las dos predicciones anteriores, los péptidos **[132-RNTDFFGL]** y **[73-TRVAFAGL]** mostraron las posibilidades más altas de constituir epítopes naturales para H2-K^b, y por esta razón se seleccionaron para los ensayos biológicos. En adelante, estos péptidos serán referidos como OmpC₇₃₋₈₀ y OmpC₁₃₂₋₁₃₉ (tabla V). Los péptidos OmpC₇₃₋₈₀ y OmpC₁₃₂₋₁₃₉ se sintetizaron como ya se describió y la pureza en todos los casos fue >90% de acuerdo con los datos obtenidos por HPLC (figura 6).

El hecho de que los epítopes OmpC₇₃₋₈₀ y OmpC₁₃₂₋₁₃₉ pueden unirse a la molécula H2-K^b se evaluó por su capacidad para incrementar la expresión de H2-K^b nativa en la superficie de RMA-S, como se ha descrito previamente (275). RMA-S es una línea celular mutante proveniente de un linfoma de células T, que expresa en la superficie celular <10% de la cantidad de moléculas MHC-I comparado con el control, la línea celular RMA de la cual deriva (258, 276). RMA-S es ineficiente para presentar antígenos endógenos a LTC restringidos por MHC-I, y esto se ha atribuido a la incapacidad de las células para liberar péptidos antigénicos al RE, donde se deben asociar con moléculas MHC-I (275). Sin embargo, en condiciones fisiológicas (37 °C) aparecen moléculas H-2 sin péptido (a las que se ha designado como “moléculas vacías”) en la membrana celular. En la superficie celular, las moléculas pierden conformación rápidamente y persisten en una forma desnaturalizada (277).

Tabla V. Péptidos seleccionados para los ensayos de unión a la molécula H2-K^b.

Péptido	Origen	Posición	Secuencia^ψ
OmpC ₇₃₋₈₀	OmpC de <i>S. typhi</i>	73-80	TRVAFAGL
OmpC ₁₃₂₋₁₃₉	OmpC de <i>S. typhi</i>	132-139	RNTDFFGGL
OVA ₂₅₇₋₂₆₄	Ovalbúmina	257-264	SIINFEKL

^ψ La secuencia de aminoácidos está expresada en código de una letra.

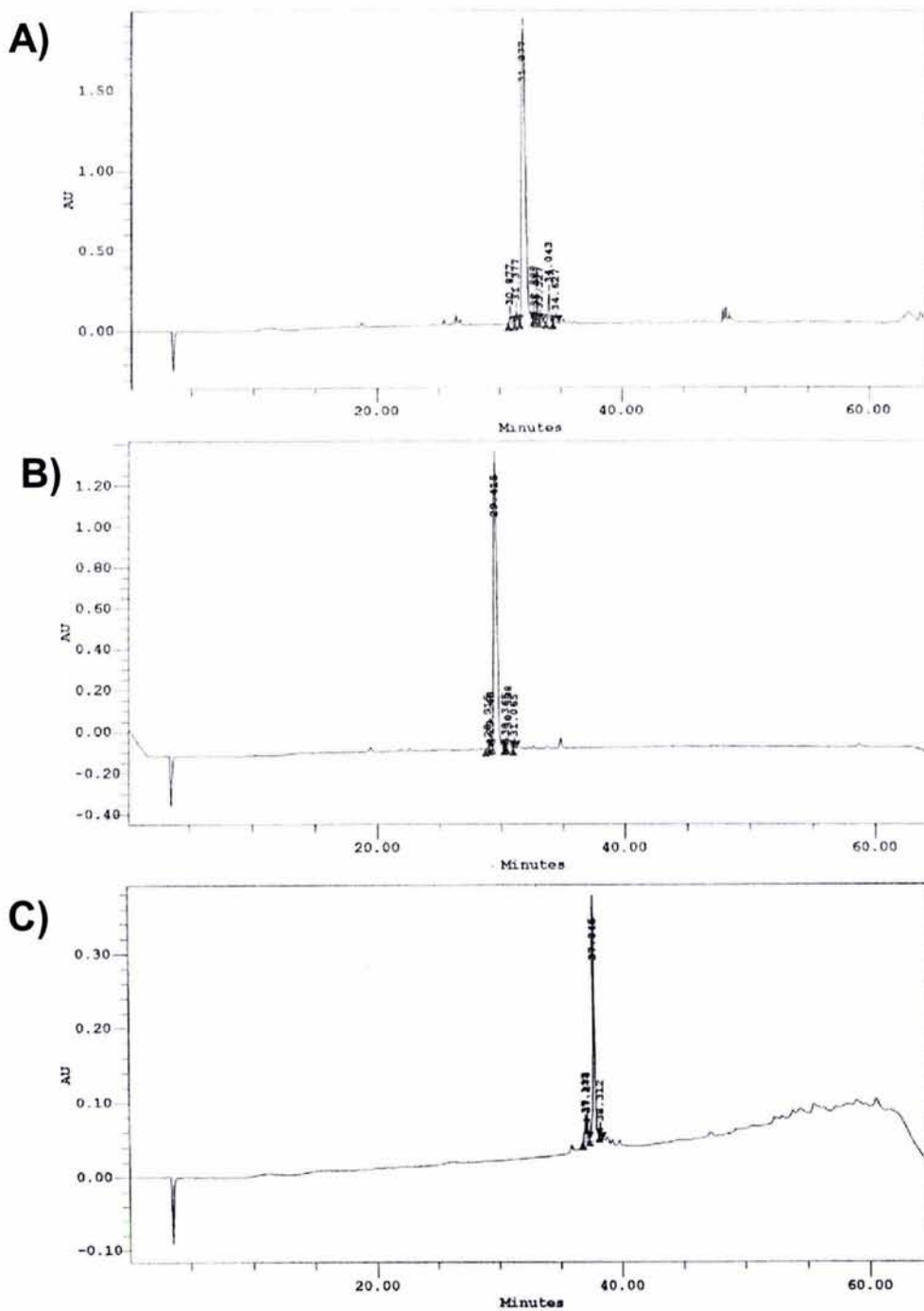


Figura 6. Pureza de los péptidos sintéticos. Los péptidos se sintetizaron en un sintetizador automático. Para el análisis se inyectaron 50 μ l de cada uno de los péptidos sintéticos, y se analizó la pureza por HPLC utilizando una columna C18 en fase reversa. A) OmpC₇₃₋₈₀ B) OmpC₁₃₂₋₁₃₉ y C) OVA₂₅₇₋₂₆₄.

El ensayo de unión de los péptidos se realizó usando distintas concentraciones y se estandarizó a una concentración de 50 μM . Después de los lavados, las células se incubaron, de manera independiente, con anticuerpos monoclonales anti-K^b (Y3), anti-D^b (28-14-8S) y anti-K^d (SF1-1.1.1), y se analizaron en un ensayo de citometría de flujo activado por fluorescencia (FACS). La figura 7 muestra los perfiles de expresión de la molécula H2-K^b para células RMA-S cultivadas con los péptidos predichos de OmpC de *S. typhi*. Como se esperaba, OmpC₇₃₋₈₀ y OmpC₁₃₂₋₁₃₉ pueden unirse a las moléculas H2-K^b y estabilizan a las cadenas pesadas en la membrana de las células RMA-S (figura 7A). Esto sucede de manera dosis dependiente, ya que se observa un incremento de 3.8 veces la media de intensidad de fluorescencia (mif) cuando se utilizan 100 μM comparado contra la concentración de 50 μM del péptido OmpC₇₃₋₈₀. También se observa un incremento de 2.1 veces la mif con 100 μM contra 50 μM del péptido OmpC₁₃₂₋₁₃₉. La unión es específica a la molécula H2-K^b debido a que cuando se utilizaron altas concentraciones de los péptidos, las moléculas D^b no se estabilizaron (la mif fue de 16.26 en las células sin péptido, 21.19 en muestras con OmpC₇₃₋₈₀, y 25.84 en muestras con OmpC₁₃₂₋₁₃₉). Estos resultados son claros para los péptidos OmpC, sin embargo, el péptido OVA₂₅₇₋₂₆₄ mostró unión inespecífica a la molécula D^b cuando se cultivaron las células RMA-S con 100 μM del péptido (fig. 7B). En todos los experimentos se utilizó un anticuerpo anti-K^d (SF1-1.1.10) como control de isotipo y no se observó aumento de la mif en las células RMA-S en ninguno de los ensayos realizados (figura 7C).

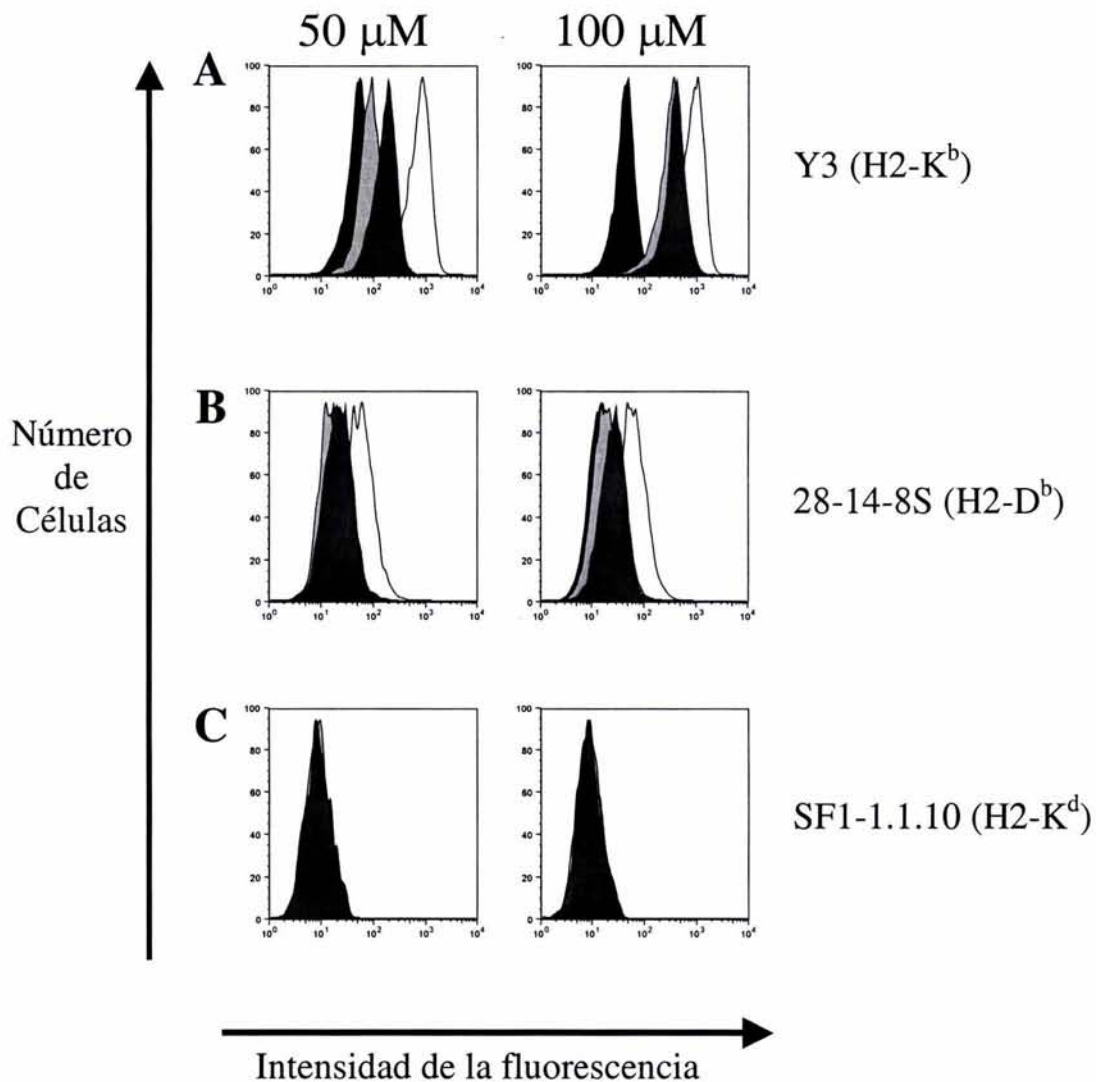


Figura 7. Los péptidos OmpC se unen específicamente a la molécula H2-K^b. Se cultivaron células RMA-S con 50 y 100 μ M de los péptidos OmpC₇₃₋₈₀ (), OmpC₁₃₂₋₁₃₉ () y OVA₂₅₇₋₂₆₄ () por 6 h. Testigo sin péptido, (). Se tiñeron las moléculas MHC-I en la superficie celular, y se analizaron por FACS. En la figura se muestran los resultados utilizando anticuerpos anti-K^b (A), anti-D^b (B) y anti-K^d (C).

6.2. OmpC₇₃₋₈₀ y OmpC₁₃₂₋₁₃₉ inducen respuesta de LTC péptido-específico *in vivo*

La unión de los péptidos sugirió que las células RMA-S presentando estos epítopes podrían convertirse en blanco de una respuesta citolítica. Para evaluar si los péptidos de OmpC podrían inducir respuesta de LTC *in vivo*, se inmunizaron ratones con los péptidos OmpC₇₃₋₈₀ y OmpC₁₃₂₋₁₃₉ de manera subcutánea en la base de la cola, en una emulsión con 100 µg de péptido en AIF. Este régimen se repitió tres veces con intervalos de una semana. En el día 31 se sacrificaron los ratones para obtener el bazo, obtener las células y realizar una estimulación *in vitro* con los péptidos OmpC₇₃₋₈₀ y OmpC₁₃₂₋₁₃₉. Las células que sobrevivieron después de 5 días de cultivo se evaluaron en su capacidad de inducir citotoxicidad contra células RMA-S presentando péptido, como ya se describió (266, 275). En la figura 8 se muestra que los LTC de ratones inmunizados con OmpC₇₃₋₈₀ y re-estimulados *in vitro* reconocen de manera específica células RMA-S que presentan el péptido correspondiente. Estas células no lisan a la RMA-S que presenta el péptido OVA₂₅₇₋₂₆₄, lo que indica que la actividad de LTC observada es específica y que no se debió a la actividad de otras células citolíticas (como células NK). Es importante subrayar que los péptidos derivados de OmpC estabilizan a la molécula H2-K^b, lo cual no sucede para H2-D^b, una molécula que también está presente en la membrana de las células RMA-S (figuras 7A y 7B). Esto demuestra que los LTC de ratones inmunizados con péptido reconocen los epítopes de manera restringida a la molécula H2-K^b. Además, OmpC₁₃₂₋₁₃₉ indujo una respuesta más intensa que la observada durante la inmunización con OmpC₇₃₋

⁸⁰, lo cual correlaciona con la predicción obtenida de los análisis en BIMAS y ProPred-I (tablas III y IV) y con el nivel de unión de los péptidos a las células RMA-S que se observa en la figura 7.

El resultado anterior también demuestra que las clonas que reconocen a OmpC₇₃₋₈₀ y OmpC₁₃₂₋₁₃₉ de *Salmonella typhimurium*, están presentes en el fondo genético (*H2^b*) de los ratones C57Bl/6J. Además, el modelo RMA-S + péptido se puede utilizar para evaluar la participación de OmpC en la inducción de respuestas citotóxicas contra la bacteria viva en este mismo modelo.

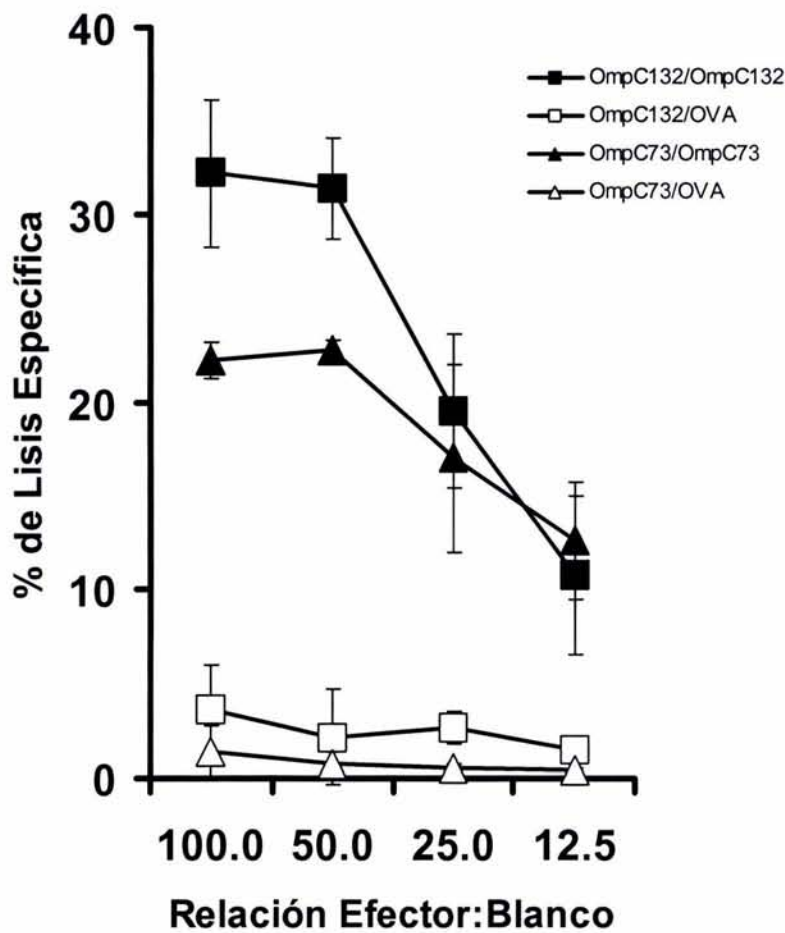


Figura 8. Respuesta citotóxica contra los epítodos predichos de OmpC de *Salmonella*. Se inmunizaron ratones con los péptidos sintéticos OmpC₇₃₋₈₀ y OmpC₁₃₂₋₁₃₉ de manera subcutánea en AIF. Después de 4 semanas se obtuvieron las células del bazo, y se expandieron *in vitro* con el péptido correspondiente a la inmunización, estas células se consideraron como efectoras. El ensayo de citotoxicidad se realizó utilizando la célula RMA-S (blanco), cargada con el péptido OmpC correspondiente (OmpC₇₃₋₈₀ u OmpC₁₃₂₋₁₃₉) y utilizando diferentes relaciones efector:blanco como se ilustra. OVA, células RMA-S cargadas con péptido testigo de ovalbúmina (OVA₂₅₇₋₂₆₄).

6.3. La infección con *S. typhimurium* y *S. typhi* induce LTC específicos contra OmpC₇₃₋₈₀ y contra OmpC₁₃₂₋₁₃₉

C57Bl6/J es una cepa de ratón sensible (Ity^s) que no resiste una infección con *S. typhimurium* virulenta (85). Dosis tan pequeñas como 4 bacterias de la cepa patógena, *S. typhimurium* 14028, administrados de manera oral fueron suficientes para matar al 100% de los ratones infectados (figura 9). Para resolver este problema, y para evaluar el curso natural de una infección por *Salmonella*, se infectaron ratones con 1×10^6 UFC de la cepa de *S. typhimurium* atenuada *AroA*^{-/-} SL3261, de manera oral. Se sabe que este protocolo induce una respuesta inmune específica y, además, la eliminación de la bacteria en ratones (278). Después de 6 semanas de infección, se obtuvieron los bazos de los ratones, las células se estimularon con péptido y se evaluó la actividad de LTC, como se describió en *Materiales y Métodos* anteriormente. En la figura 10 se muestra que los ratones que recibieron una dosis de la bacteria atenuada *AroA*^{-/-} SL3261 generan *in vivo* una respuesta de LTC específicos contra ambos péptidos, OmpC₇₃₋₈₀ y OmpC₁₃₂₋₁₃₉, ya que no reconoce a las células presentando el péptido OVA₂₅₇₋₂₆₄.

Los genomas de *S. typhimurium* y *S. typhi* están estrechamente relacionados, y tienen una gran cantidad de genes transferidos de manera lateral entre los dos serotipos (279). El alineamiento de las secuencias de la proteína OmpC en los dos serotipos revela una homología de más del 98%, lo cual puede implicar que la infección con cualquiera de los serotipos puede inducir actividad de LTC contra los epítopes descritos. Sin embargo, *S. typhi* no infecta de manera natural al ratón,

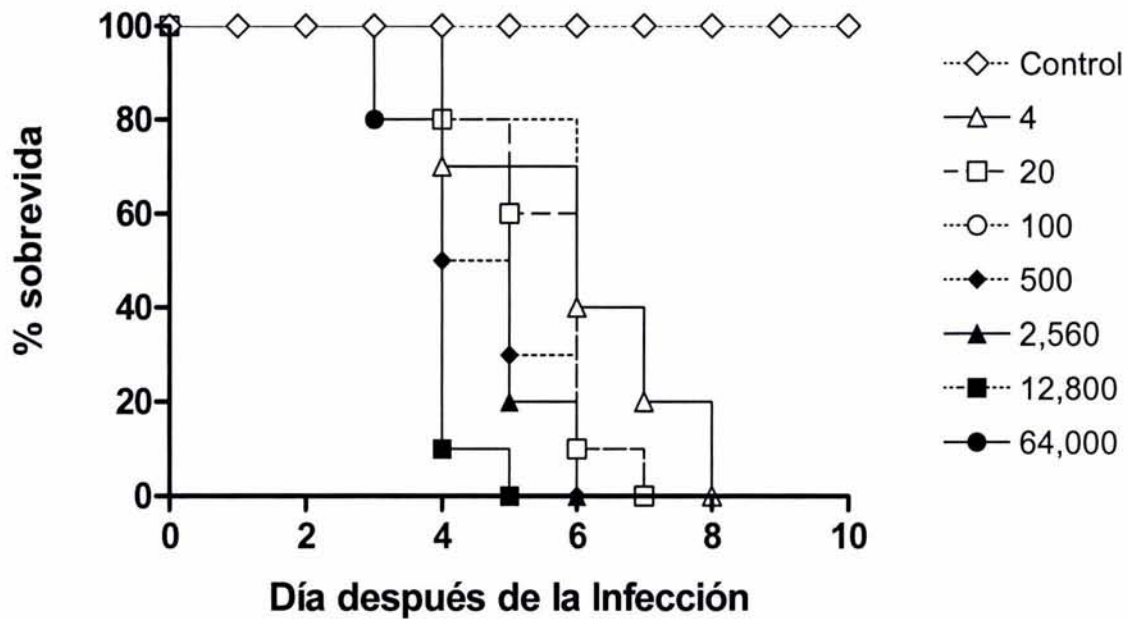


Figura 9. Susceptibilidad de ratones C57Bl6/j a la infección con *S. typhimurium* 14028. Los ratones se infectaron de manera o.g. con los números de bacterias mostrados en SSI; el grupo control solo recibió SSI. La sobrevivida se registró diariamente y se muestra como porcentaje de los animales vivos a lo largo del tiempo.

por lo que no le causa una enfermedad sistémica (280). Para simular la infección se ha utilizado la administración de la bacteria de manera intraperitoneal (ip) suspendida en mucina, lo cuál permite una infección transitoria de las células fagocíticas peritoneales (principalmente macrófagos) del ratón, aunque el mecanismo de entrada de la bacteria a las células se desconoce. Esta infección transitoria en el ratón produce un esquema similar al observado en la fiebre tifoidea en humanos (281). Para confirmar que se requiere la invasión de macrófagos por *Salmonella* en la generación de la respuesta de LTC específicos, se aplicaron 5,000 UFC de la cepa *S. typhi* 9,12,Vi:d en mucina de manera intraperitoneal (dosis de bacteria sub-letal, datos no mostrados). Un grupo utilizado como control recibió la misma dosis de bacteria en un amortiguador de fosfatos (PBS). Seis semanas después, las células del bazo se evaluaron en cuanto a la actividad de LTC contra los péptidos de OmpC, como ya se describió. La figura 11 muestra que solamente los ratones que recibieron *S. typhi* en mucina fueron capaces de generar una respuesta de LTC contra células RMA-S presentando los péptidos de la porina OmpC. Al parecer, *Salmonella* necesita colonizar macrófagos para generar una respuesta de LTC contra los péptidos de la porina OmpC. El resultado también sugiere que los macrófagos infectados son las células que contribuyen a la generación de los complejos MHCI-péptido. Sin embargo, no se puede excluir la contribución de otras APCs (como células dendríticas o linfocitos B) en la presentación de antígenos de *Salmonella* en este modelo (69, 134, 282).

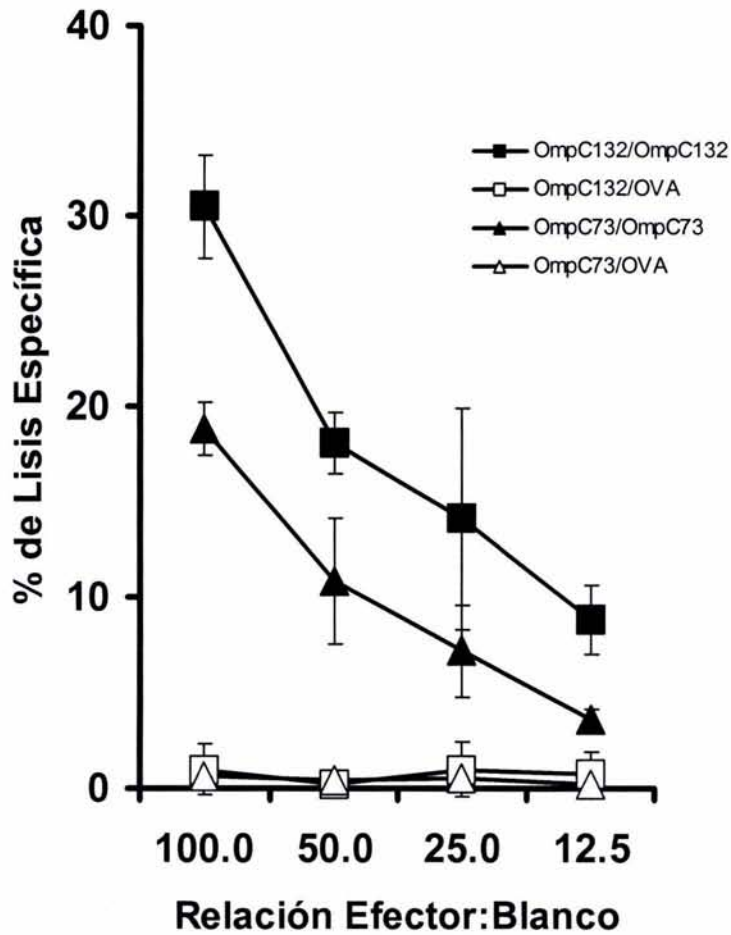


Figura 10. La infección con *Salmonella typhimurium* induce respuesta de LTC contra OmpC₇₃₋₈₀ y contra OmpC₁₃₂₋₁₃₉. Se infectaron ratones orogástricamente con *S. typhimurium* SL3261. Después de 6 semanas, se obtuvieron las células de bazo y se trataron como se describió en la figura anterior. OmpC132/132 significa que las células efectoras se re-estimularon con el péptido OmpC₁₃₂₋₁₃₉ y se evaluaron contra células RMA-S presentando el péptido OmpC₁₃₂₋₁₃₉.

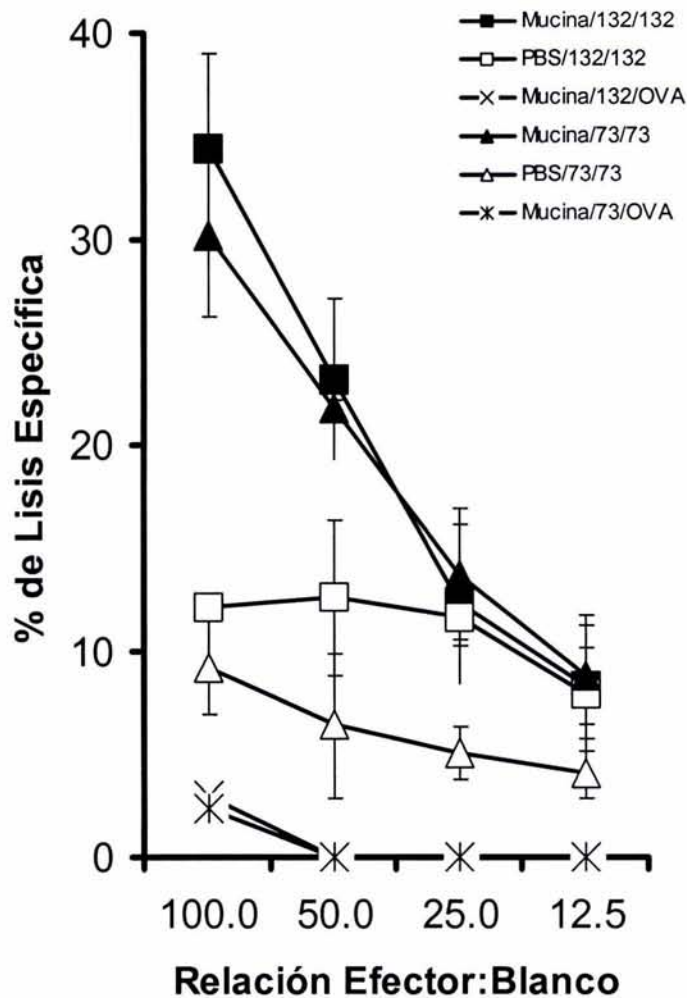


Figura 11. *S. typhi* infecta ratones cuando se administra en mucina y la infección genera respuesta de LTC. Los ratones recibieron una dosis de 5,000 bacterias de manera intraperitoneal en PBS o mucina al 5%. Seis semanas después, se obtuvieron las células de bazo y se trataron como se describió en la figura 8. Mucina/132/132 significa que las células efectoras se obtuvieron de ratones infectados con *Salmonella* en mucina, se re-estimularon con el péptido OmpC₁₃₂₋₁₃₉ y se evaluaron contra células RMA-S presentando el péptido OmpC₁₃₂₋₁₃₉.

VII. DISCUSIÓN

En este trabajo, se demuestra la actividad de dos clones de LTC específicos contra la proteína de membrana externa OmpC durante infecciones con *Salmonella*. La infección con *S. enterica* (en este caso se analizaron los serotipos Typhi y Typhimurium) induce la activación *in vivo* de LTC restringidos por la molécula MHC de clase I H2-K^b. Estas células son específicas y reconocen dos péptidos de la porina OmpC (OmpC₇₃₋₈₀ [73-TRVAFAGL] y OmpC₁₃₂₋₁₃₉ [132-RNTDFFGL]). Lo anterior significa que durante las infecciones con *Salmonella*, OmpC —y muy probablemente otras proteínas de la membrana de la bacteria— es procesada, aparentemente por el sistema proteasoma, hasta generar péptidos capaces de unirse a moléculas MHC-I clásicas. Los epítopes generados son presentados a linfocitos T citotóxicos que podrían tener alguna participación en la protección observada.

7.1. El modelo de *Salmonella* para estudiar inmunidad celular y respuestas de LTC

Desde hace algunos años el modelo de infección con *Salmonella* ha sido mucho más interesante que cualquier otro modelo bacteriano para estudiar la respuesta inmune (en particular el procesamiento y la presentación de antígenos bacterianos en moléculas MHC) por varias razones: Primero, porque *Salmonella* puede sobrevivir y replicarse en macrófagos y células dendríticas (13, 283, 284), las células que inician la inmunidad específica y que restringen la replicación de la bacteria. Esto quiere decir que la bacteria puede modificar la capacidad de las

APCs infectadas para presentar antígenos y activar a las células T. Segundo, *Salmonella* permanece en compartimentos celulares endocíticos, donde se lleva a cabo la degradación y el procesamiento de los antígenos bacterianos en las APCs. Además, *Salmonella* puede modificar la fisiología de estos compartimentos (72, 73, 285). El modelo de infección por *Salmonella* y la respuesta inmune celular contra la bacteria es tan interesante que se han escrito muchas revisiones recientes al respecto (286-290).

Para el estudio de la inmunidad celular en el modelo de *Salmonella* los ratones sensibles a la infección (Ity^s) son más útiles que los ratones resistentes (Ity^r). Los animales Ity^r pueden controlar dosis bajas de *Salmonella* virulenta, y logran mantener a la bacteria en un estado estacionario por periodos de tiempo cortos sin participación de las células T (291). En esta combinación de huésped - bacteria, la transferencia pasiva de anticuerpos puede proteger (292). En contraste, los ratones Ity^s no pueden controlar la infección con *Salmonella* virulenta, donde incluso las dosis muy bajas (menos de 10 bacterias, figura 9) son letales. Los ratones Ity^s infectados con cepas de *Salmonella* atenuadas representan el mejor modelo, debido a que utilizan la respuesta inmune innata y todo el espectro de mecanismos efectores de la respuesta inmune adquirida, incluyendo a las células T. Aunque *S. typhimurium* es una bacteria intracelular facultativa limitada a compartimentos vacuolares, después de varios días de la infección se inducen LTCs restringidos por moléculas MHC clásicas y no clásicas (142, 254). Por lo tanto, resulta interesante el análisis de actividad de LTC y la búsqueda de antígenos de *Salmonella* que se presentan por moléculas MHC-Ia, ya que la

principal fuente de los antígenos presentados por las moléculas MHC-I son las proteínas citosólicas (268).

7.2. Implicaciones de la presencia de LTC durante infecciones con *Salmonella*

¿Cuál podría ser la importancia de la presencia de LTC en infecciones por *Salmonella*? La respuesta no parece sencilla, porque muchos participantes de la inmunidad innata y de la inmunidad específica se traslapan con la respuesta de LTC durante la infección. Existe suficiente evidencia de que los antígenos de *Salmonella* pueden ser procesados y presentados a LTC, y que la actividad de estas células puede constituir un mecanismo de defensa importante contra la bacteria. Sin embargo, los mecanismos de la función efectora de los LTC durante infecciones con *Salmonella* no están bien documentados. Debido a que *Salmonella* es un patógeno intracelular, la presentación de los péptidos por MHC-I puede inducir citotoxicidad directa *in vivo* de las células infectada a través de perforina, granzima B y Fas-L acumulados en los gránulos citotóxicos (293). La lisis de células infectadas puede ser uno de los mecanismos principales para eliminar las infecciones, permitiendo la salida de las bacterias de las células, dejándolas accesibles a la acción de los macrófagos activados y de los anticuerpos específicos. Los gránulos de los LTC también contienen granulinsina, una proteína que posee actividad microbicida y actúa de manera directa contra un amplio rango de bacterias, entre las que se incluye a *Salmonella* (294, 295). Por lo tanto, los LTC pueden destruir células y liberar a las bacterias, además de participar en la muerte bacteriana de manera directa. También es posible que los

LTC lleven a cabo otras funciones efectoras como la producción de $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IFN}\gamma$ que participan de manera importante en las infecciones bacterianas. Los LTC activados por *Salmonella* también podrían expresar quimiocinas para atraer células inflamatorias al sitio de la infección (296).

7.3. Diferentes especies y diferentes porinas comparten secuencias similares con residuos de anclaje para la molécula H2-K^b

La especificidad de las células citotóxicas activadas durante la infección con *Salmonella* se desconocía hasta hace poco. En un artículo de 1999, Lo y colaboradores demostraron que algunas células T_{CD8^+} son específicas para un péptido derivado de la proteína bacteriana de shock térmico GroEL en el contexto de la molécula no clásica (MHC Ib), Qa-1^b (142). Este dato es interesante porque el péptido GroEL es conservado entre diversas especies de bacterias Gram-negativas. El péptido de GroEL es tan similar a una secuencia de la proteína HSP-60 de los mamíferos que las células T_{CD8^+} específicas contra GroEL reconocen péptidos propios de manera cruzada cuando son presentados por la molécula Qa-1^b (151).

En este mismo sentido, un hallazgo muy interesante del presente trabajo es que dos secuencias de una misma proteína son reconocidos como inmunogénicos en el contexto de moléculas MHC-I clásicas (MHC Ia). Esta es la primera descripción de un antígeno de *Salmonella* que es presentado por moléculas MHC-Ia y reconocido por LTC, durante infecciones *in vivo*. OmpC es una molécula muy abundante en la membrana externa de *Salmonella*, y los epítopes descritos son

altamente conservados, ya que todos los serotipos de *Salmonella* analizados son idénticos en las secuencias de los péptidos OmpC₇₃₋₈₀ [TRVAFAGL] y OmpC₁₃₂₋₁₃₉ [RNTDFFG] en la proteína (Tabla VI). De manera interesante, otras especies diferentes a *Salmonella* (como *E. coli*, *Shigella flexneri*, *Yersinia pestis*, *Klebsiella pneumoniae*) y diferentes porinas (OmpF, Omp1b, OmpS, OmpN, OmpD, OmpK36) comparten secuencias similares y los mismos residuos de anclaje para la molécula H2-K^b. Resultaría interesante sintetizar los péptidos y evaluar la capacidad de estas secuencias para unirse y estabilizar a la molécula H2-K^b, así como evidenciar una respuesta citotóxica contra estos epítipes durante las infecciones bacterianas *in vivo*.

A más de 200 años del descubrimiento de la vacunación, el desarrollo de vacunas para prevenir enfermedades infecciosas sigue siendo una prioridad en el mundo. Uno de los retos más grandes de la vacunación es inducir CTLs capaces de proteger los tejidos de las mucosas contra patógenos intracelulares (297). En el futuro, utilizando la metodología descrita en este trabajo, se podrían utilizar cocteles de péptidos bacterianos, restringidos por moléculas MHC (tanto moléculas MHC-Ia como moléculas MHC-Ib) como vacunas contra *Salmonella*. Durante la realización de este trabajo con la proteína OmpC, se logró la clonación de la proteína OmpF en nuestro laboratorio (298). Se sintetizaron también las secuencias de OmpF con los residuos de anclaje a la molécula H2-K^b. Estos péptidos se podrán analizar también como blanco de respuesta citotóxica, y los resultados permitirán evaluar la participación conjunta de OmpC y OmpF (las dos proteínas involucradas en la protección originalmente descrita contra *Salmonella* en nuestro modelo).

Tabla VI. Homología en las secuencias OmpC de *Salmonella* y Omp's de otras bacterias Gram-negativas.

Número de Acceso ^ψ	Proteína	Bacteria de origen	OmpC ₇₃₋₈₀ [TRVAFAGL]	OmpC ₁₃₂₋₁₃₉ [RNTDFFGL]
A59139	OmpC	<i>S. typhimurium</i>	+ [‡]	+
CAA30688	OmpC	<i>S. typhi</i>	+	+
CAB96613	OmpC	<i>S. minnesota</i>	+	+
AAL92500	OmpC	<i>S. dublin</i>	+	+
AAL92499	OmpC	<i>S. gallinarum</i>	+	+
NP_754644	OmpC	<i>Escherichia coli</i>	+	+
NP_708110	Omp1b	<i>Shigella flexneri</i>	+	RNSDFFGL
NP_456059	OmpS	<i>S. typhi</i>	TRLAFAGL	+
AAC38644	OmpN	<i>Escherichia coli</i>	TRLAFAGL	+
NP_460531	OmpD	<i>S. typhimurium</i>	TRLAFAGL	+
AH0147	OmpC2	<i>Yersinia pestis</i>	TRLGAFAGL	+
Q48473	OmpK36	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	TRLAFAGL	RNSDFFGL
P37432	OmpF	<i>S. typhimurium</i>	VRLAFAGL	RNSDFFGL
Q56113	OmpF	<i>S. typhi</i>	VRLAFAGL	RNSDFFGL
Q9K3E7	OmpF	<i>S. minnesota</i>	VRLAFAGL	RNSDFFGL
P02931	OmpF	<i>E. coli</i>	TRLAFAGL	RNSNFFGL
Q74UK2	OmpC3	<i>Yersinia pestis</i>	TRLAFAGL	RNDNFFGL
O87753	OmpK35	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	TRLAFAGL	RNSDFFGL

^ψ Referencia a la versión GenBank.

[‡] El signo + indica homología del 100% con los péptidos OmpC de *S. typhimurium*.

VIII. Conclusiones del trabajo

Las secuencias OmpC₇₃₋₈₀ [73-TRVAFAGL] y OmpC₁₃₂₋₁₃₉ [132-RNTDFFGL], presentan los residuos aminoácidos de anclaje, se unen a la molécula de clase I H2-K^b, y la estabilizan.

Unidos a H2-K^b ambos péptidos convierten a la línea celular RMA-S en blanco de una respuesta citotóxica específica.

La infección de ratones con *S. typhimurium* y con *S. typhi* induce una respuesta de LTC específica, dirigida contra los péptidos OmpC₇₃₋₈₀ y OmpC₁₃₂₋₁₃₉.

Todas las cepas de *Salmonella* analizadas comparten la secuencia exacta para los epítopes OmpC₇₃₋₈₀ y OmpC₁₃₂₋₁₃₉ en la porina OmpC. Otras especies y diferentes porinas comparten secuencias similares con los residuos de anclaje descritos para unirse a la molécula H2-K^b.

Los péptidos OmpC₇₃₋₈₀ y OmpC₁₃₂₋₁₃₉ representan los primeros epítopes de *Salmonella* reconocidos por LTC que son restringidos por moléculas MHC-I clásicas.

IX. Perspectivas

Es probable que las células citotóxicas descritas en este trabajo tengan una participación en la protección contra *Salmonella*. Sería muy interesante evaluar la frecuencia y evaluar otras funciones efectoras. Además, la generación de células T contra los péptidos descritos en este trabajo permitiría evaluar la capacidad protectora real de las células citotóxicas utilizando modelos de letalidad con bacteria viva.

Otro aspecto interesante es la caracterización de las células. Se debe evaluar el estado de activación de las células citotóxicas por medio de marcadores de superficie; la participación de las diferentes funciones efectoras de estos linfocitos durante la infección (Fas vs exocitosis de gránulos); así como el patrón de citocinas producidas por las mismas.

El análisis de la secuencia de la proteína OmpC en diferentes serotipos de *Salmonella* y otras bacterias gram-negativas demuestra que los epítopes que se pueden unir a la molécula H2-K^b son muy conservados. Un experimento interesante podría utilizar los péptidos de todas las variantes para evaluar si son blanco de una respuesta citotóxica, y demostrar en que grado participan en la protección.

El uso de los péptidos sintéticos de la OmpF, con los residuos de anclaje a la molécula H2-K^b, permitirá evaluar a la proteína como blanco de respuesta citotóxica. Los resultados permitirán evaluar la participación conjunta de OmpC y OmpF en la protección inicialmente descrita contra *Salmonella*.

X. Bibliografía

1. Hook EW. 1990. Salmonella species (including typhoid fever). In *Principles and Practice of Infectious Diseases*, ed. JE Bennett, pp. 1700-15. New York: Churchill Livingstone
2. Pang T, Levine MM, Ivanoff B, Wain J, Finlay BB. 1998. Typhoid fever--important issues still remain. *Trends Microbiol* 6: 131-3
3. Mittrucker HW, Kaufmann SH. 2000. Immune response to infection with Salmonella typhimurium in mice. *J Leukoc Biol* 67: 457-63
4. Kohbata S, Yokoyama H, Yabuuchi E. 1986. Cytopathogenic effect of Salmonella typhi GIFU 10007 on M cells of murine ileal Peyer's patches in ligated ileal loops: an ultrastructural study. *Microbiol Immunol* 30: 1225-37
5. Pascopella L, Raupach B, Ghori N, Monack D, Falkow S, Small PL. 1995. Host restriction phenotypes of Salmonella typhi and Salmonella gallinarum. *Infect Immun* 63: 4329-35
6. Clark MA, Jepson MA, Simmons NL, Hirst BH. 1994. Preferential interaction of Salmonella typhimurium with mouse Peyer's patch M cells. *Res Microbiol* 145: 543-52
7. Jones BD, Ghori N, Falkow S. 1994. Salmonella typhimurium initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. *J Exp Med* 180: 15-23
8. Takeuchi A. 1967. Electron microscope studies of experimental Salmonella infection. I. Penetration into the intestinal epithelium by Salmonella typhimurium. *Am J Pathol* 50: 109-36
9. Jepson MA, Clark MA. 2001. The role of M cells in Salmonella infection. *Microbes Infect* 3: 1183-90
10. Penheiter KL, Mathur N, Giles D, Fahlen T, Jones BD. 1997. Non-invasive Salmonella typhimurium mutants are avirulent because of an inability to enter and destroy M cells of ileal Peyer's patches. *Mol Microbiol* 24: 697-709
11. Dunlap NE, Benjamin WH, Jr., Berry AK, Eldridge JH, Briles DE. 1992. A 'safe-site' for Salmonella typhimurium is within splenic polymorphonuclear cells. *Microb Pathog* 13: 181-90
12. Dunlap NE, Benjamin WH, Jr., McCall RD, Jr., Tilden AB, Briles DE. 1991. A 'safe-site' for Salmonella typhimurium is within splenic cells during the early phase of infection in mice. *Microb Pathog* 10: 297-310
13. Richter-Dahlfors A, Buchan AM, Finlay BB. 1997. Murine salmonellosis studied by confocal microscopy: Salmonella typhimurium resides intracellularly inside macrophages and exerts a cytotoxic effect on phagocytes in vivo. *J Exp Med* 186: 569-80
14. Popoff MY, Bockemuhl J, Gheesling LL. 2004. Supplement 2002 (no. 46) to the Kauffmann-White scheme. *Res Microbiol* 155: 568-70
15. Wood MW, Jones MA, Watson PR, Hedges S, Wallis TS, Galyov EE. 1998. Identification of a pathogenicity island required for Salmonella enteropathogenicity. *Mol Microbiol* 29: 883-91
16. Blanc-Potard AB, Groisman EA. 1997. The Salmonella selC locus contains a pathogenicity island mediating intramacrophage survival. *Embo J* 16: 5376-85
17. Hensel M, Shea JE, Baumler AJ, Gleeson C, Blattner F, Holden DW. 1997. Analysis of the boundaries of Salmonella pathogenicity island 2 and the corresponding chromosomal region of Escherichia coli K-12. *J Bacteriol* 179: 1105-11
18. Baumler AJ. 1997. The record of horizontal gene transfer in Salmonella. *Trends Microbiol* 5: 318-22
19. Hardt WD, Urlaub H, Galan JE. 1998. A substrate of the centisome 63 type III protein secretion system of Salmonella typhimurium is encoded by a cryptic bacteriophage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 2574-9
20. Hueck CJ. 1998. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 379-433
21. Galan JE. 1996. Molecular and cellular bases of Salmonella entry into host cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 209: 43-60

22. Galan JE, Curtiss R, 3rd. 1989. Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *Salmonella typhimurium* to penetrate tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 6383-7
23. Groisman EA, Ochman H. 1996. Pathogenicity islands: bacterial evolution in quantum leaps. *Cell* 87: 791-4
24. Finlay BB, Ruschkowski S, Dedhar S. 1991. Cytoskeletal rearrangements accompanying salmonella entry into epithelial cells. *J Cell Sci* 99 (Pt 2): 283-96
25. Collazo CM, Galan JE. 1996. Requirement for exported proteins in secretion through the invasion-associated type III system of *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* 64: 3524-31
26. Norris FA, Wilson MP, Wallis TS, Galyov EE, Majerus PW. 1998. SopB, a protein required for virulence of *Salmonella dublin*, is an inositol phosphate phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 14057-9
27. Zhou D, Mooseker MS, Galan JE. 1999. Role of the *S. typhimurium* actin-binding protein SipA in bacterial internalization. *Science* 283: 2092-5
28. Shea JE, Hensel M, Gleeson C, Holden DW. 1996. Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 2593-7
29. Cirillo DM, Valdivia RH, Monack DM, Falkow S. 1998. Macrophage-dependent induction of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system and its role in intracellular survival. *Mol Microbiol* 30: 175-88
30. Hensel M, Shea JE, Waterman SR, Mundy R, Nikolaus T, Banks G, Vazquez-Torres A, Gleeson C, Fang FC, Holden DW. 1998. Genes encoding putative effector proteins of the type III secretion system of *Salmonella* pathogenicity island 2 are required for bacterial virulence and proliferation in macrophages. *Mol Microbiol* 30: 163-74
31. Blanc-Potard AB, Solomon F, Kayser J, Groisman EA. 1999. The SPI-3 pathogenicity island of *Salmonella enterica*. *J Bacteriol* 181: 998-1004
32. Wong KK, McClelland M, Stillwell LC, Sisk EC, Thurston SJ, Saffer JD. 1998. Identification and sequence analysis of a 27-kilobase chromosomal fragment containing a *Salmonella* pathogenicity island located at 92 minutes on the chromosome map of *Salmonella enterica* serovar typhimurium LT2. *Infect Immun* 66: 3365-71
33. Hong KH, Miller VL. 1998. Identification of a novel *Salmonella* invasion locus homologous to *Shigella* ipgDE. *J Bacteriol* 180: 1793-802
34. Mekalanos JJ. 1992. Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. *J Bacteriol* 174: 1-7
35. Cotter PA, Miller JF. 1998. In vivo and ex vivo regulation of bacterial virulence gene expression. *Curr Opin Microbiol* 1: 17-26
36. Soncini FC, Groisman EA. 1996. Two-component regulatory systems can interact to process multiple environmental signals. *J Bacteriol* 178: 6796-801
37. Gunn JS, Miller SI. 1996. PhoP-PhoQ activates transcription of pmrAB, encoding a two-component regulatory system involved in *Salmonella typhimurium* antimicrobial peptide resistance. *J Bacteriol* 178: 6857-64
38. Johnston C, Pegues DA, Hueck CJ, Lee A, Miller SI. 1996. Transcriptional activation of *Salmonella typhimurium* invasion genes by a member of the phosphorylated response-regulator superfamily. *Mol Microbiol* 22: 715-27
39. Lindgren SW, Stojiljkovic I, Heffron F. 1996. Macrophage killing is an essential virulence mechanism of *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 4197-201
40. Mills SD, Ruschkowski SR, Stein MA, Finlay BB. 1998. Trafficking of porin-deficient *Salmonella typhimurium* mutants inside HeLa cells: ompR and envZ mutants are defective for the formation of *Salmonella*-induced filaments. *Infect Immun* 66: 1806-11
41. Ahmer BM, van Reeuwijk J, Watson PR, Wallis TS, Heffron F. 1999. *Salmonella* SirA is a global regulator of genes mediating enteropathogenesis. *Mol Microbiol* 31: 971-82
42. Bajaj V, Lucas RL, Hwang C, Lee CA. 1996. Co-ordinate regulation of *Salmonella typhimurium* invasion genes by environmental and regulatory factors is mediated by control of hilA expression. *Mol Microbiol* 22: 703-14
43. Garcia Vescovi E, Soncini FC, Groisman EA. 1996. Mg²⁺ as an extracellular signal: environmental regulation of *Salmonella* virulence. *Cell* 84: 165-74

44. Baumler AJ, Tsolis RM, Heffron F. 1996. The *lpf* fimbrial operon mediates adhesion of *Salmonella typhimurium* to murine Peyer's patches. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 279-83
45. Baumler AJ, Tsolis RM, Bowe FA, Kusters JG, Hoffmann S, Heffron F. 1996. The *pef* fimbrial operon of *Salmonella typhimurium* mediates adhesion to murine small intestine and is necessary for fluid accumulation in the infant mouse. *Infect Immun* 64: 61-8
46. van der Velden AW, Baumler AJ, Tsolis RM, Heffron F. 1998. Multiple fimbrial adhesins are required for full virulence of *Salmonella typhimurium* in mice. *Infect Immun* 66: 2803-8
47. Frost AJ, Bland AP, Wallis TS. 1997. The early dynamic response of the calf ileal epithelium to *Salmonella typhimurium*. *Vet Pathol* 34: 369-86
48. Haigler HT, McKanna JA, Cohen S. 1979. Rapid stimulation of pinocytosis in human carcinoma cells A-431 by epidermal growth factor. *J Cell Biol* 83: 82-90
49. Hardt WD, Chen LM, Schuebel KE, Bustelo XR, Galan JE. 1998. *S. typhimurium* encodes an activator of Rho GTPases that induces membrane ruffling and nuclear responses in host cells. *Cell* 93: 815-26
50. Clark MA, Hirst BH, Jepson MA. 1998. Inoculum composition and *Salmonella* pathogenicity island 1 regulate M-cell invasion and epithelial destruction by *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* 66: 724-31
51. Galyov EE, Wood MW, Rosqvist R, Mullan PB, Watson PR, Hedges S, Wallis TS. 1997. A secreted effector protein of *Salmonella dublin* is translocated into eukaryotic cells and mediates inflammation and fluid secretion in infected ileal mucosa. *Mol Microbiol* 25: 903-12
52. Kaniga K, Trollinger D, Galan JE. 1995. Identification of two targets of the type III protein secretion system encoded by the *inv* and *spa* loci of *Salmonella typhimurium* that have homology to the *Shigella* IpaD and IpaA proteins. *J Bacteriol* 177: 7078-85
53. Garcia-del Portillo F, Pucciarelli MG, Jefferies WA, Finlay BB. 1994. *Salmonella typhimurium* induces selective aggregation and internalization of host cell surface proteins during invasion of epithelial cells. *J Cell Sci* 107 (Pt 7): 2005-20
54. Garcia-del Portillo F, Foster JW, Maguire ME, Finlay BB. 1992. Characterization of the micro-environment of *Salmonella typhimurium*-containing vacuoles within MDCK epithelial cells. *Mol Microbiol* 6: 3289-97
55. Garcia-del Portillo F, Zwick MB, Leung KY, Finlay BB. 1993. *Salmonella* induces the formation of filamentous structures containing lysosomal membrane glycoproteins in epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 10544-8
56. Garcia-del Portillo F, Finlay BB. 1995. Targeting of *Salmonella typhimurium* to vesicles containing lysosomal membrane glycoproteins bypasses compartments with mannose 6-phosphate receptors. *J Cell Biol* 129: 81-97
57. Gorvel JP, Meresse S. 2001. Maturation steps of the *Salmonella*-containing vacuole. *Microbes Infect* 3: 1299-303
58. Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta G, Bonasio R, Granucci F, Kraehenbuhl JP, Ricciardi-Castagnoli P. 2001. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol* 2: 361-7
59. Vazquez-Torres A, Jones-Carson J, Baumler AJ, Falkow S, Valdivia R, Brown W, Le M, Berggren R, Parks WT, Fang FC. 1999. Extraintestinal dissemination of *Salmonella* by CD18-expressing phagocytes. *Nature* 401: 804-8
60. Maskell DJ, Hormaeche CE, Harrington KA, Joysey HS, Liew FY. 1987. The initial suppression of bacterial growth in a salmonella infection is mediated by a localized rather than a systemic response. *Microb Pathog* 2: 295-305
61. Swanson RN, O'Brien AD. 1983. Genetic control of the innate resistance of mice to *Salmonella typhimurium*: *Ity* gene is expressed in vivo by 24 hours after infection. *J Immunol* 131: 3014-20
62. Kelsall BL, Strober W. 1996. Distinct populations of dendritic cells are present in the subepithelial dome and T cell regions of the murine Peyer's patch. *J Exp Med* 183: 237-47
63. Ruedl C, Rieser C, Bock G, Wick G, Wolf H. 1996. Phenotypic and functional characterization of CD11c⁺ dendritic cell population in mouse Peyer's patches. *Eur J Immunol* 26: 1801-6
64. Iwasaki A, Kelsall BL. 2000. Localization of distinct Peyer's patch dendritic cell subsets and their recruitment by chemokines macrophage inflammatory protein (MIP)-3alpha, MIP-3beta, and secondary lymphoid organ chemokine. *J Exp Med* 191: 1381-94

65. Valdivia RH, Falkow S. 1997. Fluorescence-based isolation of bacterial genes expressed within host cells. *Science* 277: 2007-11
66. Hopkins SA, Kraehenbuhl JP. 1997. Dendritic cells of the murine Peyer's patches colocalize with *Salmonella typhimurium* avirulent mutants in the subepithelial dome. *Adv Exp Med Biol* 417: 105-9
67. Paglia P, Medina E, Arioli I, Guzman CA, Colombo MP. 1998. Gene transfer in dendritic cells, induced by oral DNA vaccination with *Salmonella typhimurium*, results in protective immunity against a murine fibrosarcoma. *Blood* 92: 3172-6
68. Yrlid U, Svensson M, Kirby A, Wick MJ. 2001. Antigen-presenting cells and anti-*Salmonella* immunity. *Microbes Infect* 3: 1239-48
69. Wick MJ. 2002. The role of dendritic cells during *Salmonella* infection. *Curr Opin Immunol* 14: 437-43
70. Fields PI, Swanson RV, Haidaris CG, Heffron F. 1986. Mutants of *Salmonella typhimurium* that cannot survive within the macrophage are avirulent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 5189-93
71. Buchmeier NA, Heffron F. 1991. Inhibition of macrophage phagosome-lysosome fusion by *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* 59: 2232-8
72. Oh YK, Alpuche-Aranda C, Berthiaume E, Jinks T, Miller SI, Swanson JA. 1996. Rapid and complete fusion of macrophage lysosomes with phagosomes containing *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* 64: 3877-83
73. Rathman M, Barker LP, Falkow S. 1997. The unique trafficking pattern of *Salmonella typhimurium*-containing phagosomes in murine macrophages is independent of the mechanism of bacterial entry. *Infect Immun* 65: 1475-85
74. Mills SD, Finlay BB. 1998. Isolation and characterization of *Salmonella typhimurium* and *Yersinia pseudotuberculosis*-containing phagosomes from infected mouse macrophages: *Y. pseudotuberculosis* traffics to terminal lysosomes where they are degraded. *Eur J Cell Biol* 77: 35-47
75. Wallis TS, Paulin SM, Plested JS, Watson PR, Jones PW. 1995. The *Salmonella dublin* virulence plasmid mediates systemic but not enteric phases of salmonellosis in cattle. *Infect Immun* 63: 2755-61
76. Jones BD, Falkow S. 1996. Salmonellosis: host immune responses and bacterial virulence determinants. *Annu Rev Immunol* 14: 533-61
77. Gohin I, Olivier M, Lantier I, Pepin M, Lantier F. 1997. Analysis of the immune response in sheep efferent lymph during *Salmonella abortusovis* infection. *Vet Immunol Immunopathol* 60: 111-30
78. Lalmanach AC, Lantier F. 1999. Host cytokine response and resistance to *Salmonella* infection. *Microbes Infect* 1: 719-26
79. Mastroeni P, Villarreal-Ramos B, Hormaeche CE. 1993. Adoptive transfer of immunity to oral challenge with virulent salmonellae in innately susceptible BALB/c mice requires both immune serum and T cells. *Infect Immun* 61: 3981-4
80. Lantier F, Pardon P, Marly J. 1983. Immunogenicity of a low-virulence vaccinal strain against *Salmonella abortus-ovis* infection in mice. *Infect Immun* 40: 601-7
81. Eisenstein TK, Killar LM, Sultzzer BM. 1984. Immunity to infection with *Salmonella typhimurium*: mouse-strain differences in vaccine- and serum-mediated protection. *J Infect Dis* 150: 425-35
82. Malo D, Skamene E. 1994. Genetic control of host resistance to infection. *Trends Genet* 10: 365-71
83. Vassiloyanakopoulos AP, Okamoto S, Fierer J. 1998. The crucial role of polymorphonuclear leukocytes in resistance to *Salmonella dublin* infections in genetically susceptible and resistant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 7676-81
84. Searle S, Bright NA, Roach TI, Atkinson PG, Barton CH, Meloen RH, Blackwell JM. 1998. Localisation of Nramp1 in macrophages: modulation with activation and infection. *J Cell Sci* 111 (Pt 19): 2855-66
85. Vidal SM, Pinner E, Lepage P, Gauthier S, Gros P. 1996. Natural resistance to intracellular infections: Nramp1 encodes a membrane phosphoglycoprotein absent in macrophages from susceptible (Nramp1 D169) mouse strains. *J Immunol* 157: 3559-68

86. Govoni G, Canonne-Hergaux F, Pfeifer CG, Marcus SL, Mills SD, Hackam DJ, Grinstein S, Malo D, Finlay BB, Gros P. 1999. Functional expression of Nramp1 in vitro in the murine macrophage line RAW264.7. *Infect Immun* 67: 2225-32
87. Lang T, Prina E, Sibthorpe D, Blackwell JM. 1997. Nramp1 transfection transfers Ity/Lsh/Bcg-related pleiotropic effects on macrophage activation: influence on antigen processing and presentation. *Infect Immun* 65: 380-6
88. Soo SS, Villarreal-Ramos B, Anjam Khan CM, Hormaeche CE, Blackwell JM. 1998. Genetic control of immune response to recombinant antigens carried by an attenuated Salmonella typhimurium vaccine strain: Nramp1 influences T-helper subset responses and protection against leishmanial challenge. *Infect Immun* 66: 1910-7
89. Fierer J. 2001. Polymorphonuclear leukocytes and innate immunity to Salmonella infections in mice. *Microbes Infect* 3: 1233-7
90. Ramarathinam L, Niesel DW, Klimpel GR. 1993. Salmonella typhimurium induces IFN-gamma production in murine splenocytes. Role of natural killer cells and macrophages. *J Immunol* 150: 3973-81
91. Schafer R, Eisenstein TK. 1992. Natural killer cells mediate protection induced by a Salmonella aroA mutant. *Infect Immun* 60: 791-7
92. Darveau RP. 1998. Lipid A diversity and the innate host response to bacterial infection. *Curr Opin Microbiol* 1: 36-42
93. Tite JP, Dougan G, Chatfield SN. 1991. The involvement of tumor necrosis factor in immunity to Salmonella infection. *J Immunol* 147: 3161-4
94. Nauciel C, Espinasse-Maes F. 1992. Role of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha in resistance to Salmonella typhimurium infection. *Infect Immun* 60: 450-4
95. Klimpel GR, Asuncion M, Haithcoat J, Niesel DW. 1995. Cholera toxin and Salmonella typhimurium induce different cytokine profiles in the gastrointestinal tract. *Infect Immun* 63: 1134-7
96. Eckmann L, Fierer J, Kagnoff MF. 1996. Genetically resistant (Ityr) and susceptible (Itys) congenic mouse strains show similar cytokine responses following infection with Salmonella dublin. *J Immunol* 156: 2894-900
97. Morrissey PJ, Charrier K, Vogel SN. 1995. Exogenous tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 alpha increase resistance to Salmonella typhimurium: efficacy is influenced by the Ity and Lps loci. *Infect Immun* 63: 3196-8
98. Muotiala A, Makela PH. 1990. The role of IFN-gamma in murine Salmonella typhimurium infection. *Microb Pathog* 8: 135-41
99. Pie S, Matsiota-Bernard P, Truffa-Bachi P, Nauciel C. 1996. Gamma interferon and interleukin-10 gene expression in innately susceptible and resistant mice during the early phase of Salmonella typhimurium infection. *Infect Immun* 64: 849-54
100. Ramarathinam L, Shaban RA, Niesel DW, Klimpel GR. 1991. Interferon gamma (IFN-gamma) production by gut-associated lymphoid tissue and spleen following oral Salmonella typhimurium challenge. *Microb Pathog* 11: 347-56
101. Kincy-Cain T, Clements JD, Bost KL. 1996. Endogenous and exogenous interleukin-12 augment the protective immune response in mice orally challenged with Salmonella dublin. *Infect Immun* 64: 1437-40
102. Chong C, Bost KL, Clements JD. 1996. Differential production of interleukin-12 mRNA by murine macrophages in response to viable or killed Salmonella spp. *Infect Immun* 64: 1154-60
103. Mastroeni P, Harrison JA, Chabalgoity JA, Hormaeche CE. 1996. Effect of interleukin 12 neutralization on host resistance and gamma interferon production in mouse typhoid. *Infect Immun* 64: 189-96
104. Zhang S, Adams LG, Nunes J, Khare S, Tsolis RM, Baumler AJ. 2003. Secreted effector proteins of Salmonella enterica serotype typhimurium elicit host-specific chemokine profiles in animal models of typhoid fever and enterocolitis. *Infect Immun* 71: 4795-803
105. Eckmann L, Kagnoff MF. 2001. Cytokines in host defense against Salmonella. *Microbes Infect* 3: 1191-200
106. Eisenstein TK. 2001. Implications of Salmonella-induced nitric oxide (NO) for host defense and vaccines: NO, an antimicrobial, antitumor, immunosuppressive and immunoregulatory molecule. *Microbes Infect* 3: 1223-31

107. Tacket CO, Sztein MB, Losonsky GA, Wasserman SS, Nataro JP, Edelman R, Pickard D, Dougan G, Chatfield SN, Levine MM. 1997. Safety of live oral *Salmonella typhi* vaccine strains with deletions in *htrA* and *aroC aroD* and immune response in humans. *Infect Immun* 65: 452-6
108. Wang JY, Noriega FR, Galen JE, Barry E, Levine MM. 2000. Constitutive expression of the Vi polysaccharide capsular antigen in attenuated *Salmonella enterica* serovar typhi oral vaccine strain CVD 909. *Infect Immun* 68: 4647-52
109. Villarreal-Ramos B, Manser J, Collins RA, Dougan G, Chatfield SN, Howard CJ. 1998. Immune responses in calves immunised orally or subcutaneously with a live *Salmonella typhimurium aro* vaccine. *Vaccine* 16: 45-54
110. Brown A, Hormaeche CE. 1989. The antibody response to salmonellae in mice and humans studied by immunoblots and ELISA. *Microb Pathog* 6: 445-54
111. Ornellas EP, Roantree RJ, Steward JP. 1970. The specificity and importance of humoral antibody in the protection of mice against intraperitoneal challenge with complement-sensitive and complement-resistant *Salmonella*. *J Infect Dis* 121: 113-23
112. Angerman CR, Eisenstein TK. 1978. Comparative efficacy and toxicity of a ribosomal vaccine, acetone-killed cells, lipopolysaccharide, and a live cell vaccine prepared from *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* 19: 575-82
113. Killar LM, Eisenstein TK. 1985. Immunity to *Salmonella typhimurium* infection in C3H/HeJ and C3H/HeNCrIBR mice: studies with an aromatic-dependent live *S. typhimurium* strain as a vaccine. *Infect Immun* 47: 605-12
114. Mittrucker HW, Raupach B, Kohler A, Kaufmann SH. 2000. Cutting edge: role of B lymphocytes in protective immunity against *Salmonella typhimurium* infection. *J Immunol* 164: 1648-52
115. Nauciel C. 1990. Role of CD4+ T cells and T-independent mechanisms in acquired resistance to *Salmonella typhimurium* infection. *J Immunol* 145: 1265-9
116. Pie S, Truffa-Bachi P, Pla M, Nauciel C. 1997. Th1 response in *Salmonella typhimurium*-infected mice with a high or low rate of bacterial clearance. *Infect Immun* 65: 4509-14
117. Hess J, Ladel C, Miko D, Kaufmann SH. 1996. *Salmonella typhimurium aroA*- infection in gene-targeted immunodeficient mice: major role of CD4+ TCR-alpha beta cells and IFN-gamma in bacterial clearance independent of intracellular location. *J Immunol* 156: 3321-6
118. Mastroeni P, Villarreal-Ramos B, Hormaeche CE. 1992. Role of T cells, TNF alpha and IFN gamma in recall of immunity to oral challenge with virulent salmonellae in mice vaccinated with live attenuated *aro*- *Salmonella* vaccines. *Microb Pathog* 13: 477-91
119. Mittrucker HW, Kohler A, Kaufmann SH. 2002. Characterization of the murine T-lymphocyte response to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. *Infect Immun* 70: 199-203
120. Gulig PA, Doyle TJ, Clare-Salzler MJ, Maiese RL, Matsui H. 1997. Systemic infection of mice by wild-type but not Spv- *Salmonella typhimurium* is enhanced by neutralization of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha. *Infect Immun* 65: 5191-7
121. McSorley SJ, Cookson BT, Jenkins MK. 2000. Characterization of CD4+ T cell responses during natural infection with *Salmonella typhimurium*. *J Immunol* 164: 986-93
122. Aggarwal A, Kumar S, Jaffe R, Hone D, Gross M, Sadoff J. 1990. Oral *Salmonella*: malaria circumsporozoite recombinants induce specific CD8+ cytotoxic T cells. *J Exp Med* 172: 1083-90
123. Flynn JL, Weiss WR, Norris KA, Seifert HS, Kumar S, So M. 1990. Generation of a cytotoxic T-lymphocyte response using a *Salmonella* antigen-delivery system. *Mol Microbiol* 4: 2111-8
124. Pope M, Kotlarski I. 1994. Detection of *Salmonella*-specific L3T4+ and Lyt-2+ T cells which can proliferate in vitro and mediate delayed-type hypersensitivity reactivity. *Immunology* 81: 183-91
125. Pope M, Kotlarski I, Doherty K. 1994. Induction of Lyt-2+ cytotoxic T lymphocytes following primary and secondary *Salmonella* infection. *Immunology* 81: 177-82
126. Sztein MB, Tanner MK, Polotsky Y, Orenstein JM, Levine MM. 1995. Cytotoxic T lymphocytes after oral immunization with attenuated vaccine strains of *Salmonella typhi* in humans. *J Immunol* 155: 3987-93
127. Salerno-Goncalves R, Wyant TL, Pasetti MF, Fernandez-Vina M, Tacket CO, Levine MM, Sztein MB. 2003. Concomitant induction of CD4+ and CD8+ T cell responses in volunteers

- immunized with *Salmonella enterica* serovar typhi strain CVD 908-htrA. *J Immunol* 170: 2734-41
128. Salerno-Goncalves R, Pasetti MF, Sztein MB. 2002. Characterization of CD8(+) effector T cell responses in volunteers immunized with *Salmonella enterica* serovar Typhi strain Ty21a typhoid vaccine. *J Immunol* 169: 2196-203
 129. Lundin BS, Johansson C, Svennerholm AM. 2002. Oral immunization with a *Salmonella enterica* serovar typhi vaccine induces specific circulating mucosa-homing CD4(+) and CD8(+) T cells in humans. *Infect Immun* 70: 5622-7
 130. Russmann H, Shams H, Poblete F, Fu Y, Galan JE, Donis RO. 1998. Delivery of epitopes by the *Salmonella* type III secretion system for vaccine development. *Science* 281: 565-8
 131. Shams H, Poblete F, Russmann H, Galan JE, Donis RO. 2001. Induction of specific CD8+ memory T cells and long lasting protection following immunization with *Salmonella typhimurium* expressing a lymphocytic choriomeningitis MHC class I-restricted epitope. *Vaccine* 20: 577-85
 132. Russmann H, Igwe EI, Sauer J, Hardt WD, Bubert A, Geginat G. 2001. Protection against murine listeriosis by oral vaccination with recombinant *Salmonella* expressing hybrid *Yersinia* type III proteins. *J Immunol* 167: 357-65
 133. Turner SJ, Carbone FR, Strugnell RA. 1993. *Salmonella typhimurium* delta aroA delta aroD mutants expressing a foreign recombinant protein induce specific major histocompatibility complex class I-restricted cytotoxic T lymphocytes in mice. *Infect Immun* 61: 5374-80
 134. Yrlid U, Svensson M, Hakansson A, Chambers BJ, Ljunggren HG, Wick MJ. 2001. In vivo activation of dendritic cells and T cells during *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. *Infect Immun* 69: 5726-35
 135. Catic A, Dietrich G, Gentschev I, Goebel W, Kaufmann SH, Hess J. 1999. Introduction of protein or DNA delivered via recombinant *Salmonella typhimurium* into the major histocompatibility complex class I presentation pathway of macrophages. *Microbes Infect* 1: 113-21
 136. Verma NK, Ziegler HK, Wilson M, Khan M, Safley S, Stocker BA, Schoolnik GK. 1995. Delivery of class I and class II MHC-restricted T-cell epitopes of listeriolysin of *Listeria monocytogenes* by attenuated *Salmonella*. *Vaccine* 13: 142-50
 137. Hess J, Dietrich G, Gentschev I, Miko D, Goebel W, Kaufmann SH. 1997. Protection against murine listeriosis by an attenuated recombinant *Salmonella typhimurium* vaccine strain that secretes the naturally somatic antigen superoxide dismutase. *Infect Immun* 65: 1286-92
 138. Hess J, Gentschev I, Miko D, Welzel M, Ladel C, Goebel W, Kaufmann SH. 1996. Superior efficacy of secreted over somatic antigen display in recombinant *Salmonella* vaccine induced protection against listeriosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 1458-63
 139. Gonzalez C, Hone D, Noriega FR, Tacket CO, Davis JR, Losonsky G, Nataro JP, Hoffman S, Malik A, Nardin E, 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: 927-31
 140. Gonzalez CR, Noriega FR, Huerta S, Santiago A, Vega M, Paniagua J, Ortiz-Navarrete V, Isibasi A, Levine MM. 1998. Immunogenicity of a *Salmonella typhi* CVD 908 candidate vaccine strain expressing the major surface protein gp63 of *Leishmania mexicana mexicana*. *Vaccine* 16: 1043-52
 141. Gao XM, Tite JP, Lipscombe M, Rowland-Jones S, Ferguson DJ, McMichael AJ. 1992. Recombinant *Salmonella typhimurium* strains that invade nonphagocytic cells are resistant to recognition by antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Infect Immun* 60: 3780-9
 142. Lo WF, Ong H, Metcalf ES, Soloski MJ. 1999. T cell responses to Gram-negative intracellular bacterial pathogens: a role for CD8+ T cells in immunity to *Salmonella* infection and the involvement of MHC class Ib molecules. *J Immunol* 162: 5398-406
 143. Martin-Orozco N, Isibasi A, Ortiz-Navarrete V. 2001. Macrophages present exogenous antigens by class I major histocompatibility complex molecules via a secretory pathway as a consequence of interferon-gamma activation. *Immunology* 103: 41-8
 144. Mastroeni P, Villarreal-Ramos B, Demarco de Hormaeche R, Hormaeche CE. 1993. Delayed (footpad) hypersensitivity and Arthus reactivity using protein-rich antigens and LPS in mice immunized with live attenuated aroA *Salmonella* vaccines. *Microb Pathog* 14: 369-79

145. Guilloteau L, Buzoni-Gatel D, Bernard F, Lantier I, Lantier F. 1993. Salmonella abortusovis infection in susceptible BALB/cby mice: importance of Lyt-2+ and L3T4+ T cells in acquired immunity and granuloma formation. *Microb Pathog* 14: 45-55
146. Davies R, Kotlarski I. 1976. The role of thymus-derived cells in immunity to salmonella infection. *Aust J Exp Biol Med Sci* 54: 221-36
147. Mittrucker HW, Kohler A, Mak TW, Kaufmann SH. 1999. Critical role of CD28 in protective immunity against Salmonella typhimurium. *J Immunol* 163: 6769-76
148. Tripp RA, Hou S, Doherty PC. 1995. Temporal loss of the activated L-selectin-low phenotype for virus-specific CD8+ memory T cells. *J Immunol* 154: 5870-5
149. Cookson BT, Bevan MJ. 1997. Identification of a natural T cell epitope presented by Salmonella-infected macrophages and recognized by T cells from orally immunized mice. *J Immunol* 158: 4310-9
150. McSorley SJ, Asch S, Costalonga M, Reinhardt RL, Jenkins MK. 2002. Tracking salmonella-specific CD4 T cells in vivo reveals a local mucosal response to a disseminated infection. *Immunity* 16: 365-77
151. Lo WF, Woods AS, DeCloux A, Cotter RJ, Metcalf ES, Soloski MJ. 2000. Molecular mimicry mediated by MHC class Ib molecules after infection with gram-negative pathogens. *Nat Med* 6: 215-8
152. Watts C. 1997. Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules. *Annu Rev Immunol* 15: 821-50
153. Baumeister W, Walz J, Zuhl F, Seemuller E. 1998. The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell* 92: 367-80
154. Coux O, Tanaka K, Goldberg AL. 1996. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu Rev Biochem* 65: 801-47
155. Ciechanover A. 1994. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell* 79: 13-21
156. Orłowski M. 1990. The multicatalytic proteinase complex, a major extralysosomal proteolytic system. *Biochemistry* 29: 10289-97
157. Groll M, Ditzel L, Lowe J, Stock D, Bochtler M, Bartunik HD, Huber R. 1997. Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* 386: 463-71
158. York IA, Goldberg AL, Mo XY, Rock KL. 1999. Proteolysis and class I major histocompatibility complex antigen presentation. *Immunol Rev* 172: 49-66
159. Kloetzel PM. 2001. Antigen processing by the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 179-87
160. Cerundolo V, Kelly A, Elliott T, Trowsdale J, Townsend A. 1995. Genes encoded in the major histocompatibility complex affecting the generation of peptides for TAP transport. *Eur J Immunol* 25: 554-62
161. Chen W, Norbury CC, Cho Y, Yewdell JW, Bennink JR. 2001. Immunoproteasomes shape immunodominance hierarchies of antiviral CD8(+) T cells at the levels of T cell repertoire and presentation of viral antigens. *J Exp Med* 193: 1319-26
162. Toes RE, Nussbaum AK, Degermann S, Schirle M, Emmerich NP, Kraft M, Laplace C, Zwinderman A, Dick TP, Muller J, Schonfisch B, Schmid C, Fehling HJ, Stevanovic S, Rammensee HG, Schild H. 2001. Discrete cleavage motifs of constitutive and immunoproteasomes revealed by quantitative analysis of cleavage products. *J Exp Med* 194: 1-12
163. Dick TP, Ruppert T, Groettrup M, Kloetzel PM, Kuehn L, Koszinowski UH, Stevanovic S, Schild H, Rammensee HG. 1996. Coordinated dual cleavages induced by the proteasome regulator PA28 lead to dominant MHC ligands. *Cell* 86: 253-62
164. Groettrup M, Soza A, Eggers M, Kuehn L, Dick TP, Schild H, Rammensee HG, Koszinowski UH, Kloetzel PM. 1996. A role for the proteasome regulator PA28alpha in antigen presentation. *Nature* 381: 166-8
165. Kloetzel PM, Ossendorp F. 2004. Proteasome and peptidase function in MHC-class-I-mediated antigen presentation. *Curr Opin Immunol* 16: 76-81
166. Tsai B, Ye Y, Rapoport TA. 2002. Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 246-55
167. Riese RJ, Chapman HA. 2000. Cathepsins and compartmentalization in antigen presentation. *Curr Opin Immunol* 12: 107-13

168. Watts C. 2001. Antigen processing in the endocytic compartment. *Curr Opin Immunol* 13: 26-31
169. Jensen PE. 1995. Antigen unfolding and disulfide reduction in antigen presenting cells. *Semin Immunol* 7: 347-53
170. Busch R, Doebele RC, Patil NS, Pashine A, Mellins ED. 2000. Accessory molecules for MHC class II peptide loading. *Curr Opin Immunol* 12: 99-106
171. Geuze HJ. 1998. The role of endosomes and lysosomes in MHC class II functioning. *Immunol Today* 19: 282-7
172. Neefjes J. 1999. CIIV, MIIC and other compartments for MHC class II loading. *Eur J Immunol* 29: 1421-5
173. Ramachandra L, Harding CV. 2000. Phagosomes acquire nascent and recycling class II MHC molecules but primarily use nascent molecules in phagocytic antigen processing. *J Immunol* 164: 5103-12
174. Vogt AB, Kropshofer H. 1999. HLA-DM - an endosomal and lysosomal chaperone for the immune system. *Trends Biochem Sci* 24: 150-4
175. Alfonso C, Liljedahl M, Winqvist O, Surh CD, Peterson PA, Fung-Leung WP, Karlsson L. 1999. The role of H2-O and HLA-DO in major histocompatibility complex class II-restricted antigen processing and presentation. *Immunol Rev* 172: 255-66
176. Kropshofer H, Hammerling GJ, Vogt AB. 1999. The impact of the non-classical MHC proteins HLA-DM and HLA-DO on loading of MHC class II molecules. *Immunol Rev* 172: 267-78
177. Thery C, Brachet V, Regnault A, Rescigno M, Ricciardi-Castagnoli P, Bonnerot C, Amigorena S. 1998. MHC class II transport from lysosomal compartments to the cell surface is determined by stable peptide binding, but not by the cytosolic domains of the alpha- and beta-chains. *J Immunol* 161: 2106-13
178. Antoniou AN, Powis SJ, Elliott T. 2003. Assembly and export of MHC class I peptide ligands. *Curr Opin Immunol* 15: 75-81
179. Villadangos JA, Bryant RA, Deussing J, Driessen C, Lennon-Dumenil AM, Riese RJ, Roth W, Saftig P, Shi GP, Chapman HA, Peters C, Ploegh HL. 1999. Proteases involved in MHC class II antigen presentation. *Immunol Rev* 172: 109-20
180. Staerz UD, Karasuyama H, Garner AM. 1987. Cytotoxic T lymphocytes against a soluble protein. *Nature* 329: 449-51
181. Carbone FR, Bevan MJ. 1990. Class I-restricted processing and presentation of exogenous cell-associated antigen in vivo. *J Exp Med* 171: 377-87
182. Jondal M, Schirmbeck R, Reimann J. 1996. MHC class I-restricted CTL responses to exogenous antigens. *Immunity* 5: 295-302
183. Bevan MJ. 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: 1283-8
184. Bevan MJ. 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* 117: 2233-8
185. Gooding LR, Edwards CB. 1980. H-2 antigen requirements in the in vitro induction of SV40-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* 124: 1258-62
186. Debrick JE, Campbell PA, Staerz UD. 1991. Macrophages as accessory cells for class I MHC-restricted immune responses. *J Immunol* 147: 2846-51
187. Collins DS, Findlay K, Harding CV. 1992. Processing of exogenous liposome-encapsulated antigens in vivo generates class I MHC-restricted T cell responses. *J Immunol* 148: 3336-41
188. Harding CV, Pfeifer JD. 1994. Antigen expressed by Salmonella typhimurium is processed for class I major histocompatibility complex presentation by macrophages but not infected epithelial cells. *Immunology* 83: 670-4
189. Pfeifer JD, Wick MJ, Roberts RL, Findlay K, Normark SJ, Harding CV. 1993. Phagocytic processing of bacterial antigens for class I MHC presentation to T cells. *Nature* 361: 359-62
190. Harding CV, Song R. 1994. Phagocytic processing of exogenous particulate antigens by macrophages for presentation by class I MHC molecules. *J Immunol* 153: 4925-33
191. Kovacsovics-Bankowski M, Clark K, Benacerraf B, Rock KL. 1993. Efficient major histocompatibility complex class I presentation of exogenous antigen upon phagocytosis by macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 4942-6

192. Albert ML, Pearce SF, Francisco LM, Sauter B, Roy P, Silverstein RL, Bhardwaj N. 1998. Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 188: 1359-68
193. Albert ML, Sauter B, Bhardwaj N. 1998. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 392: 86-9
194. Bellone M, Iezzi G, Rovere P, Galati G, Ronchetti A, Protti MP, Davoust J, Rugarli C, Manfredi AA. 1997. Processing of engulfed apoptotic bodies yields T cell epitopes. *J Immunol* 159: 5391-9
195. Schirmbeck R, Bohm W, Melber K, Reimann J. 1995. Processing of exogenous heat-aggregated (denatured) and particulate (native) hepatitis B surface antigen for class I-restricted epitope presentation. *J Immunol* 155: 4676-84
196. Schirmbeck R, Melber K, Reimann J. 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: 1063-70
197. Liu T, Zhou X, Orvell C, Lederer E, Ljunggren HG, Jondal M. 1995. Heat-inactivated Sendai virus can enter multiple MHC class I processing pathways and generate cytotoxic T lymphocyte responses in vivo. *J Immunol* 154: 3147-55
198. Song R, Harding CV. 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: 4182-90
199. Canaday DH, Ziebold C, Noss EH, Chervenak KA, Harding CV, Boom WH. 1999. Activation of human CD8+ alpha beta TCR+ cells by Mycobacterium tuberculosis via an alternate class I MHC antigen-processing pathway. *J Immunol* 162: 372-9
200. den Haan JM, Bevan MJ. 2001. Antigen presentation to CD8+ T cells: cross-priming in infectious diseases. *Curr Opin Immunol* 13: 437-41
201. Rodriguez A, Regnault A, Kleijmeer M, Ricciardi-Castagnoli P, Amigorena S. 1999. Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC class I presentation in dendritic cells. *Nat Cell Biol* 1: 362-8
202. Heit A, Huster KM, Schmitz F, Schiemann M, Busch DH, Wagner H. 2004. CpG-DNA aided cross-priming by cross-presenting B cells. *J Immunol* 172: 1501-7
203. Limmer A, Ohl J, Kurts C, Ljunggren HG, Reiss Y, Groettrup M, Momburg F, Arnold B, Knolle PA. 2000. Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8+ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance. *Nat Med* 6: 1348-54
204. Garin J, Diez R, Kieffer S, Dermine JF, Duclos S, Gagnon E, Sadoul R, Rondeau C, Desjardins M. 2001. The phagosome proteome: insight into phagosome functions. *J Cell Biol* 152: 165-80
205. Gagnon E, Duclos S, Rondeau C, Chevet E, Cameron PH, Steele-Mortimer O, Paiement J, Bergeron JJ, Desjardins M. 2002. Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages. *Cell* 110: 119-31
206. Dick TP, Bangia N, Peaper DR, Cresswell P. 2002. Disulfide bond isomerization and the assembly of MHC class I-peptide complexes. *Immunity* 16: 87-98
207. Houde M, Bertholet S, Gagnon E, Brunet S, Goyette G, Laplante A, Princiotta MF, Thibault P, Sacks D, Desjardins M. 2003. Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature* 425: 402-6
208. Guermonprez P, Saveanu L, Kleijmeer M, Davoust J, Van Endert P, Amigorena S. 2003. ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature* 425: 397-402
209. Ackerman AL, Kyritsis C, Tampe R, Cresswell P. 2003. Early phagosomes in dendritic cells form a cellular compartment sufficient for cross presentation of exogenous antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 12889-94
210. Serwold T, Gonzalez F, Kim J, Jacob R, Shastri N. 2002. ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Nature* 419: 480-3
211. Saric T, Chang SC, Hattori A, York IA, Markant S, Rock KL, Tsujimoto M, Goldberg AL. 2002. An IFN-gamma-induced aminopeptidase in the ER, ERAAP1, trims precursors to MHC class I-presented peptides. *Nat Immunol* 3: 1169-76
212. Nikaido H, Vaara M. 1985. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol Rev* 49: 1-32

213. Lugtenberg B, Van Alphen L. 1983. Molecular architecture and functioning of the outer membrane of *Escherichia coli* and other gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta* 737: 51-115
214. Nikaido H. 1994. Porins and specific diffusion channels in bacterial outer membranes. *J Biol Chem* 269: 3905-8
215. Jap BK, Walian PJ. 1996. Structure and functional mechanism of porins. *Physiol Rev* 76: 1073-88
216. Cowan SW, Rosenbusch JP. 1994. Folding pattern diversity of integral membrane proteins. *Science* 264: 914-6
217. Weiss MS, Kreuzsch A, Schiltz E, Nestel U, Welte W, Weckesser J, Schulz GE. 1991. The structure of porin from *Rhodobacter capsulatus* at 1.8 Å resolution. *FEBS Lett* 280: 379-82
218. Arockiasamy A, Krishnaswamy S. 1999. Crystallization of the immunodominant outer membrane protein OmpC; the first protein crystals from *Salmonella typhi*, a human pathogen. *FEBS Lett* 453: 380-2
219. Jap BK, Walian PJ, Gehring K. 1991. Structural architecture of an outer membrane channel as determined by electron crystallography. *Nature* 350: 167-70
220. Cowan SW, Schirmer T, Rummel G, Steiert M, Ghosh R, Pauptit RA, Jansonius JN, Rosenbusch JP. 1992. Crystal structures explain functional properties of two *E. coli* porins. *Nature* 358: 727-33
221. Schulz GE. 1993. Bacterial porins: structure and function. *Curr Opin Cell Biol* 5: 701-7
222. Gerbl-Rieger S, Peters J, Kellermann J, Lottspeich F, Baumeister W. 1991. Nucleotide and derived amino acid sequences of the major porin of *Comamonas acidovorans* and comparison of porin primary structures. *J Bacteriol* 173: 2196-205
223. Singh SP, Upshaw Y, Abdullah T, Singh SR, Klebba PE. 1992. Structural relatedness of enteric bacterial porins assessed with monoclonal antibodies to *Salmonella typhimurium* OmpD and OmpC. *J Bacteriol* 174: 1965-73
224. Puente JL, Alvarez-Scherer V, Gosset G, Calva E. 1989. Comparative analysis of the *Salmonella typhi* and *Escherichia coli* ompC genes. *Gene* 83: 197-206
225. Singh SP, Singh SR, Williams YU, Jones L, Abdullah T. 1995. Antigenic determinants of the OmpC porin from *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* 63: 4600-5
226. van der Ley P, Struyve M, Tommassen J. 1986. Topology of outer membrane pore protein PhoE of *Escherichia coli*. Identification of cell surface-exposed amino acids with the aid of monoclonal antibodies. *J Biol Chem* 261: 12222-5
227. Klebba PE, Benson SA, Bala S, Abdullah T, Reid J, Singh SP, Nikaido H. 1990. Determinants of OmpF porin antigenicity and structure. *J Biol Chem* 265: 6800-10
228. Lupi N, Bourgois A, Bernadac A, Laboucarie S, Pages JM. 1989. Immunological analysis of porin polymorphism in *Escherichia coli* B and K-12. *Mol Immunol* 26: 1027-36
229. Bentley AT, Klebba PE. 1988. Effect of lipopolysaccharide structure on reactivity of anti-porin monoclonal antibodies with the bacterial cell surface. *J Bacteriol* 170: 1063-8
230. Arockiasamy A, Krishnaswamy S. 2000. Homology model of surface antigen OmpC from *Salmonella typhi* and its functional implications. *J Biomol Struct Dyn* 18: 261-71
231. Wiertz EJ, Delvig A, Donders EM, Brugghe HF, van Unen LM, Timmermans HA, Achtman M, Hoogerhout P, Poolman JT. 1996. T-cell responses to outer membrane proteins of *Neisseria meningitidis*: comparative study of the Opa, Opc, and PorA proteins. *Infect Immun* 64: 298-304
232. Moe GR, Zuno-Mitchell P, Hammond SN, Granoff DM. 2002. Sequential immunization with vesicles prepared from heterologous *Neisseria meningitidis* strains elicits broadly protective serum antibodies to group B strains. *Infect Immun* 70: 6021-31
233. Buchanan TM, Arko RJ. 1977. Immunity to gonococcal infection induced by vaccination with isolated outer membranes of *Neisseria gonorrhoeae* in guinea pigs. *J Infect Dis* 135: 879-87
234. Wang LY, Frasch CE. 1984. Development of a *Neisseria meningitidis* group B serotype 2b protein vaccine and evaluation in a mouse model. *Infect Immun* 46: 408-14
235. Gulig PA, McCracken GH, Jr., Frisch CF, Johnston KH, Hansen EJ. 1982. Antibody response of infants to cell surface-exposed outer membrane proteins of *Haemophilus influenzae* type b after systemic *Haemophilus* disease. *Infect Immun* 37: 82-8

236. Adamus G, Mulezyk M, Witkowska D, Romanowska E. 1980. Protection against keratoconjunctivitis shigellosa induced by immunization with outer membrane proteins of *Shigella* spp. *Infect Immun* 30: 321-4
237. Gilleland HE, Jr., Parker MG, Matthews JM, Berg RD. 1984. Use of a purified outer membrane protein F (porin) preparation of *Pseudomonas aeruginosa* as a protective vaccine in mice. *Infect Immun* 44: 49-54
238. Isibasi A, Ortiz-Navarrete V, Paniagua J, Pelayo R, Gonzalez CR, Garcia JA, Kumate J. 1992. Active protection of mice against *Salmonella typhi* by immunization with strain-specific porins. *Vaccine* 10: 811-3
239. Isibasi A, Ortiz V, Vargas M, Paniagua J, Gonzalez C, Moreno J, Kumate J. 1988. Protection against *Salmonella typhi* infection in mice after immunization with outer membrane proteins isolated from *Salmonella typhi* 9,12,d, Vi. *Infect Immun* 56: 2953-9
240. Kuusi N, Nurminen M, Saxen H, Valtonen M, Makela PH. 1979. Immunization with major outer membrane proteins in experimental salmonellosis of mice. *Infect Immun* 25: 857-62
241. Singh M, Vohra H, Kumar L, Ganguly NK. 1999. Induction of systemic and mucosal immune response in mice immunised with porins of *Salmonella typhi*. *J Med Microbiol* 48: 79-88
242. Gonzalez CR, Mejia MV, Paniagua J, Ortiz-Navarrete V, Ramirez G, Isibasi A. 1995. Immune response to porins isolated from *Salmonella typhi* in different mouse strains. *Arch Med Res* 26 Spec No: S99-103
243. Gonzalez CR, Isibasi A, Ortiz-Navarrete V, Paniagua J, Garcia JA, Blanco F, Kumate J. 1993. Lymphocytic proliferative response to outer-membrane proteins isolated from *Salmonella*. *Microbiol Immunol* 37: 793-9
244. Ortiz V, Isibasi A, Garcia-Ortigoza E, Kumate J. 1989. Immunoblot detection of class-specific humoral immune response to outer membrane proteins isolated from *Salmonella typhi* in humans with typhoid fever. *J Clin Microbiol* 27: 1640-5
245. Blanco F, Isibasi A, Raul Gonzalez C, Ortiz V, Paniagua J, Arreguin C, Kumate J. 1993. Human cell mediated immunity to porins from *Salmonella typhi*. *Scand J Infect Dis* 25: 73-80
246. Salazar-Gonzalez RM, Maldonado-Bernal C, Ramirez-Cruz NE, Rios-Sarabia N, Beltran-Nava J, Castanon-Gonzalez J, Castillo-Torres N, Palma-Aguirre JA, Carrera-Camargo M, Lopez-Macias C, Isibasi A. 2004. Induction of cellular immune response and anti-*Salmonella enterica* serovar typhi bactericidal antibodies in healthy volunteers by immunization with a vaccine candidate against typhoid fever. *Immunol Lett* 93: 115-22
247. Aguero J, Mora G, Mroczenski-Wildy MJ, Fernandez-Beros ME, Aron L, Cabello FC. 1987. Cloning, expression and characterization of the 36 kDa *Salmonella typhi* porin gene in *Escherichia coli*. *Microb Pathog* 3: 399-407
248. Isibasi A, Paniagua J, Rojo MP, Martin N, Ramirez G, Gonzalez CR, Lopez-Macias C, Sanchez J, Kumate J, Ortiz-Navarrete V. 1994. Role of porins from *Salmonella typhi* in the induction of protective immunity. *Ann N Y Acad Sci* 730: 350-2
249. Vega MI, Santos-Argumedo L, Huerta-Yepez S, Luria-Perez R, Ortiz-Navarrete V, Isibasi A, Gonzalez-Bonilla CR. 2003. A *Salmonella typhi* OmpC fusion protein expressing the CD154 Trp140-Ser149 amino acid strand binds CD40 and activates a lymphoma B-cell line. *Immunology* 110: 206-16
250. Puente JL, Juarez D, Bobadilla M, Arias CF, Calva E. 1995. The *Salmonella ompC* gene: structure and use as a carrier for heterologous sequences. *Gene* 156: 1-9
251. Muthukkaruppan VR, Nandakumar KS, Palanivel V. 1992. Monoclonal antibodies against *Salmonella* porins: generation and characterization. *Immunol Lett* 33: 201-6
252. Paniagua-Solis J, Sanchez J, Ortiz-Navarrete V, Gonzalez CR, Isibasi A. 1996. Construction of CTB fusion proteins for screening of monoclonal antibodies against *Salmonella typhi* OmpC peptide loops. *FEMS Microbiol Lett* 141: 31-6
253. Arockiasamy A, Krishnaswamy S. 2000. Purification of integral outer-membrane protein OmpC, a surface antigen from *Salmonella typhi* for structure-function studies: a method applicable to enterobacterial major outer-membrane protein. *Anal Biochem* 283: 64-70
254. Pasetti MF, Salerno-Goncalves R, Sztein MB. 2002. *Salmonella enterica* serovar Typhi live vector vaccines delivered intranasally elicit regional and systemic specific CD8+ major histocompatibility class I-restricted cytotoxic T lymphocytes. *Infect Immun* 70: 4009-18

255. Townsend A, Elliott T, Cerundolo V, Foster L, Barber B, Tse A. 1990. Assembly of MHC class I molecules analyzed in vitro. *Cell* 62: 285-95
256. Ozato K, Sachs DH. 1981. 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* 126: 317-21
257. Ozato K, Hansen TH, Sachs DH. 1980. Monoclonal antibodies to mouse MHC antigens. II. Antibodies to the H-2Ld antigen, the products of a third polymorphic locus of the mouse major histocompatibility complex. *J Immunol* 125: 2473-7
258. Karre K, Ljunggren HG, Piontek G, Kiessling R. 1986. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* 319: 675-8
259. Shen L, Kane KP. 1995. Differential ability of isolated H-2 Kb subsets to serve as TCR ligands for allo-specific CTL clones: potential role for N-linked glycosylation. *J Exp Med* 181: 1773-83
260. Brown A, Hormaeche CE, Demarco de Hormaeche R, Winther M, Dougan G, Maskell DJ, Stocker BA. 1987. An attenuated aroA Salmonella typhimurium vaccine elicits humoral and cellular immunity to cloned beta-galactosidase in mice. *J Infect Dis* 155: 86-92
261. Chalmers IM. 1971. Typhoid fever in an endemic area: a 'great imitator'. *S Afr Med J* 45: 470-2
262. Merrifield RB, Stewart JM. 1965. Automated peptide synthesis. *Nature* 207: 522-3
263. Posnett DN, McGrath H, Tam JP. 1988. A novel method for producing anti-peptide antibodies. Production of site-specific antibodies to the T cell antigen receptor beta-chain. *J Biol Chem* 263: 1719-25
264. Tam JP. 1988. Synthetic peptide vaccine design: synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 5409-13
265. Aichele P, Hengartner H, Zinkernagel RM, Schulz M. 1990. Antiviral cytotoxic T cell response induced by in vivo priming with a free synthetic peptide. *J Exp Med* 171: 1815-20
266. Wunderlich J, Shearer G. 2002. Chromium-release assay for measuring CTL activity. In *Current Protocols in Immunology*, ed. KA Coligan JE, Margulies DH, Shevach EM and Strober W, pp. 3.11.4 - 3.11.7. New York: Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience
267. Rammensee HG, Falk K, Rotzschke O. 1993. Peptides naturally presented by MHC class I molecules. *Annu Rev Immunol* 11: 213-44
268. Rock KL, York IA, Saric T, Goldberg AL. 2002. Protein degradation and the generation of MHC class I-presented peptides. *Adv Immunol* 80: 1-70
269. Yewdell JW, Bennink JR. 2001. Cut and trim: generating MHC class I peptide ligands. *Curr Opin Immunol* 13: 13-8
270. Nussbaum AK, Kuttler C, Tenzer S, Schild H. 2003. Using the World Wide Web for predicting CTL epitopes. *Curr Opin Immunol* 15: 69-74
271. Schirle M, Weinschenk T, Stevanovic S. 2001. Combining computer algorithms with experimental approaches permits the rapid and accurate identification of T cell epitopes from defined antigens. *J Immunol Methods* 257: 1-16
272. Parker KC, Shields M, DiBrino M, Brooks A, Coligan JE. 1995. Peptide binding to MHC class I molecules: implications for antigenic peptide prediction. *Immunol Res* 14: 34-57
273. Parker KC, Bednarek MA, Coligan JE. 1994. Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side-chains. *J Immunol* 152: 163-75
274. Singh H, Raghava GP. 2003. ProPred1: prediction of promiscuous MHC Class-I binding sites. *Bioinformatics* 19: 1009-14
275. Townsend A, Ohlen C, Bastin J, Ljunggren HG, Foster L, Karre K. 1989. Association of class I major histocompatibility heavy and light chains induced by viral peptides. *Nature* 340: 443-8
276. Ljunggren HG, Karre K. 1985. Host resistance directed selectively against H-2-deficient lymphoma variants. Analysis of the mechanism. *J Exp Med* 162: 1745-59
277. Ortiz-Navarrete V, Hammerling GJ. 1991. Surface appearance and instability of empty H-2 class I molecules under physiological conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 3594-7
278. VanCott JL, Chatfield SN, Roberts M, Hone DM, Hohmann EL, Pascual DW, Yamamoto M, Kiyono H, McGhee JR. 1998. Regulation of host immune responses by modification of Salmonella virulence genes. *Nat Med* 4: 1247-52

279. McClelland M, Sanderson KE, Spieth J, Clifton SW, Latreille P, Courtney L, Porwollik S, Ali J, Dante M, Du F, Hou S, Layman D, Leonard S, Nguyen C, Scott K, Holmes A, Grewal N, Mulvaney E, Ryan E, Sun H, Florea L, Miller W, Stoneking T, Nhan M, Waterston R, Wilson RK. 2001. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature* 413: 852-6
280. O'Brien AD. 1982. Innate resistance of mice to *Salmonella typhi* infection. *Infect Immun* 38: 948-52
281. Sein J, Cachicas V, Becker MI, De Ioannes AE. 1993. Mucin allows survival of *Salmonella typhi* within mouse peritoneal macrophages. *Biol Res* 26: 371-9
282. Yrlid U, Wick MJ. 2002. Antigen presentation capacity and cytokine production by murine splenic dendritic cell subsets upon *Salmonella* encounter. *J Immunol* 169: 108-16
283. Svensson M, Stockinger B, Wick MJ. 1997. Bone marrow-derived dendritic cells can process bacteria for MHC-I and MHC-II presentation to T cells. *J Immunol* 158: 4229-36
284. Buchmeier NA, Heffron F. 1989. Intracellular survival of wild-type *Salmonella typhimurium* and macrophage-sensitive mutants in diverse populations of macrophages. *Infect Immun* 57: 1-7
285. Alpuche-Aranda CM, Racoosin EL, Swanson JA, Miller SI. 1994. *Salmonella* stimulate macrophage macropinocytosis and persist within spacious phagosomes. *J Exp Med* 179: 601-8
286. Pasetti MF, Levine MM, Sztein MB. 2003. Animal models paving the way for clinical trials of attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhi live oral vaccines and live vectors. *Vaccine* 21: 401-18
287. Makela PH, Hormaeche CE. 1997. Immunity to *Salmonella*. In *Host Response to Intracellular Pathogens*, ed. SHE Kaufmann, pp. 143-66. Austin, Tx: R.G. Landes
288. Eisenstein TK. 1999. Mucosal immune defense: the *Salmonella typhimurium* model. In *Intracellular Bacterial Vaccine Vectors*, ed. Y Paterson, pp. 51-109. New York: Willey-Liss
289. Sirard JC, Niedergang F, Kraehenbuhl JP. 1999. Live attenuated *Salmonella*: a paradigm of mucosal vaccines. *Immunol Rev* 171: 5-26
290. Kaufmann SHE, Raupach B, Finlay BB. 2001. *Microbes Infect* 3: 1177-375
291. Hormaeche CE, Joysey HS, Desilva L, Izhar M, Stocker BA. 1991. Immunity conferred by Aro- *Salmonella* live vaccines. *Microb Pathog* 10: 149-58
292. Collins FM. 1974. Vaccines and cell-mediated immunity. *Bacteriol Rev* 38: 371-402
293. Raja SM, Metkar SS, Froelich CJ. 2003. Cytotoxic granule-mediated apoptosis: unraveling the complex mechanism. *Curr Opin Immunol* 15: 528-32
294. Stenger S, Hanson DA, Teitelbaum R, Dewan P, Niazi KR, Froelich CJ, Ganz T, Thoma-Uszynski S, Melian A, Bogdan C, Porcelli SA, Bloom BR, Krensky AM, Modlin RL. 1998. An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science* 282: 121-5
295. Stenger S, Rosat JP, Bloom BR, Krensky AM, Modlin RL. 1999. Granulysin: a lethal weapon of cytolytic T cells. *Immunol Today* 20: 390-4
296. Henkart PA, Catalfamo M. 2004. CD8+ effector cells. *Adv Immunol* 83: 233-52
297. Moron G, Dadaglio G, Leclerc C. 2004. New tools for antigen delivery to the MHC class I pathway. *Trends Immunol* 25: 92-7
298. Mata Gonzalez MT. 2004. *Clonación y caracterización del candidato a porina OmpF de Salmonella typhi 9,12 Vi:d (Tesis de Maestría)*. Universidad Autónoma Metropolitana, México DF

XI. APÉNDICES

APÉNDICE DE MEDIOS DE CULTIVO

Solo se utilizó agua desionizada (milliQ[®] Millipore, Carrigtwahill, Ireland) para la preparación de los medios de cultivo.

Suero Fetal Bovino descomplementado (SFB).

Se descomplementó por 1h, en un baño de agua a 56 °C. El porcentaje de suero utilizado en cualquier protocolo se indica por un número seguido al nombre del medio base. Por ejemplo, "RPMI-10" significa que se utilizó 10% de SFB, "DMEM-20" significa que se utilizó 20% de SFB.

Medio DMEM completo.

Medio DMEM (*Gibco, Grand Island, NY*), formulación con alta glucosa (4500 mg/l de D-Glucosa), suplementado con 5%, 10% o 20% de SFB; 1% aminoácidos no esenciales; 2 mM L-Glutamina; 1 mM piruvato de sodio; y 50 µM 2-ME.

Medio RPMI completo.

Medio RPMI (*Gibco*), suplementado con 5%, 10%, 15% o 20% de SFB (inactivado por 1h a 56 °C); 1% aminoácidos no esenciales; 2 mM L-Glutamina; 1 mM piruvato de sodio; y 50 µM 2-ME.

APÉNDICE DE AMORTIGUADORES Y SOLUCIONES

EDTA , 0.5 M (pH 8.0)

Se disolvieron 186.1 g de EDTA disódico (dihidrato) en 700 ml de H₂O. Se ajustó pH a 8.0 con 10 M NaOH. Se aforó con H₂O a 1 lt, y se esterilizó por filtración con filtros de 0.22 μ (MillexGP. Millipore, Carrigtwahill, Ireland).

HCl, 1M

Se mezclaron 913.8 ml de H₂O con 86.2 ml de HCl concentrado.

2-ME (2-mercaptoetanol), 50 mM

Preparación de 1M:

0.5 ml de 2-ME, 14.3M

6.6 ml de a H₂O

Preparación de 50 mM (1000X):

5 ml de 2-ME, 1M

95 ml de a H₂O

Se almacenó a 4 °C. Se diluyó a 50 μ M (concentración final) para usar en medios de cultivo.

NaOH, 10M

Se disolvieron 400 g de NaOH en 450 ml de H₂O y se ajustó a 1 lt

PBS (Amortiguador salino de fosfastos)

Se disolvieron 0.23 g de NaH₂PO₄ (anhidro; 1.9 mM), 1.15 g de Na₂HPO₄ (anhidro; 8.1 mM), 9.0 g NaCl (154 mM) a 900 ml de H₂O y se ajustó el pH a 7.2 - 7.4 con NaOH, 1M o HCl, 1M. Se aforó con H₂O a 1Lt.

SDS, 20% (p/v)

Se disolvieron 20 g de SDS (dodecilsulfato de sodio / lauril sulfato de sodio) en agua destilada a un volumen final de 100 ml, con agitación. Se filtró por 0.45- μ (MillexGP. Millipore, Carrigtwahill, Ireland).

Tris.Cl, 1 M

Se disolvieron 121 g de Tris base en 800 ml de H₂O. Se ajustó el pH con HCl concentrado, y se ajustó el volumen a 1 lt con H₂O.

Buffer de lisis ACK

Se disolvieron 8.29 g NH₄Cl (0.15 M), 1 g KHCO₃ (10 mM), y 37.2 mg Na₂EDTA (0.1 mM). Se agregaron 800 ml de agua y se ajustó el pH a 7.2-7.4 con HCl 1N. Se aforó a 1 Lt, se filtró por 0.22 μ (MillexGP. Millipore, Carrigtwahill, Ireland), y se mantuvo a temperatura ambiente.

XII. Anexos



Doctorado en Ciencias Biomédicas

FACULTAD DE MEDICINA


pdcb/grad/135Jur/2004


ING. LEOPOLDO SILVA
DIRECTOR GENERAL DE ADMINISTRACION
ESCOLAR DE LA UNAM.
PRESENTE.

Por medio del presente me permito informar a usted que en la reunión del Comité Académico de Doctorado en Ciencias Biomédicas que se llevó a cabo el día 10 de marzo del año en curso, **se acordó designar el siguiente jurado para examen de Doctorado en Ciencias Biomédicas del M. EN C. DIAZ QUIÑÓNEZ JOSE ALBERTO**, con número de cuenta 9681144-7 con la tesis titulada: **"RESPUESTA DE LINFOCITOS T CITOTÓXICOS CONTRA LA PROTEINA OmpC DURANTE INFECCIONES POR Salmonella"**, dirigida por el Dr. Vianney Francisco Ortiz Navarrete.

PRESIDENTE: DRA. KAETHE WILLMS MANNING
SECRETARIO: DR. VIANNEY FRANCISCO ORTIZ NAVARRETE
VOCAL: DR. ALEJANDRO CRAVIOTO QUINTANA
VOCAL: DRA. GLORIA SOLDEVILA MELGAREJO
VOCAL: DR. EDMUNDO DE IBIS LAMOYI VELAZQUEZ
SUPLENTE: DR. LEOPOLDO FLORES ROMO
SUPLENTE: DR. FERNANDO ESQUIVEL GUADARRAMA

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 1 de octubre de 2004.


Dra. Yolanda López Vidal
Responsable
Facultad de Medicina


Dr. J. Javier Espinosa Aguirre
Coordinador
Doctorado en Ciencias Biomédicas.

C.c.p. Biol. Francisco Javier Incera, Jefe de la Unidad de Administración del Posgrado.
Tutor(a) Dr. Vianney Francisco Ortiz Navarrete.
Coordinación de Doctorado



Doctorado
en
Ciencias
Biomédicas
FACULTAD DE MEDICINA

pdcb/grad/135Dic/2004.

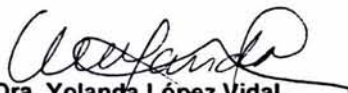
ING. LEOPOLDO SILVA
DIRECTOR GENERAL DE ADMINISTRACION
ESCOLAR DE LA UNAM
PRESENTE.


Por medio del presente le informamos que el candidato al grado de doctor (a) JOSE ALBERTO DIAZ QUIÑONEZ, con número de cuenta 9681144-7, inscrito en el Doctorado en Ciencias Biomédicas, ha cubierto satisfactoriamente todas las actividades académicas establecidas en el plan de estudios del programa.

En consecuencia y de acuerdo al artículo 7 de las normas operativas del programa y del artículo 33 del Reglamento General de Estudios de Posgrado, **se autoriza al candidato para solicitar su examen de grado Doctoral** haciendo defensa de la tesis **"RESPUESTA DE LINFOCITOS T CITOTÓXICOS CONTRA LA PROTEINA OmpC DURANTE INFECCIONES POR Salmonella"**, dirigida por el Dr. Vianney Francisco Ortiz Navarrete.

Agradeciendo de antemano la atención que se sirva prestar a la presente le reiteramos nuestra consideración más distinguida.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 1 de octubre de 2004.


Dra. Yolanda López Vidal
Responsable
Facultad de Medicina


Dr. J. Javier Espinosa Aguirre
Coordinador
Doctorado en Ciencias Biomédicas.

C.c.p. Biol. Francisco Javier Incera, Jefe de la Unidad de Administración del Posgrado.
Tutor(a) Dr. Vianney Francisco Ortiz Navarrete.
Coordinación de Doctorado

Two *Salmonella* OmpC K^b-Restricted Epitopes for CD8⁺-T-Cell Recognition

Alberto Diaz-Quiñonez,^{1†§} Natalia Martin-Orozco,^{2‡§} Armando Isibasi,² and Vianney Ortiz-Navarrete^{1*}

Departamento de Biomedicina Molecular, Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV),¹ and Unidad de Investigación Médica en Inmunología, Hospital de Especialidades, CMN Siglo XXI, IMSS,² Mexico City, Mexico

Received 29 July 2003/Returned for modification 4 November 2003/Accepted 26 January 2004

We report the identification of two peptides from *Salmonella* OmpC porin that can bind to major histocompatibility complex class I K^b molecules and are targets of cytotoxic T lymphocytes from *Salmonella*-infected mice. These peptides are conserved in gram-negative bacterial porins and are the first *Salmonella* porin-specific epitopes described for possible CD8⁺-T-cell elimination of infected cells.

Some of the most-studied protective immunogens of *Salmonella* are the outer membrane proteins (OMPs) called porins. Vaccination with purified porins can protect mice against the challenge of virulent *Salmonella* strains (4, 5, 6). In these protection processes, antiporin antibodies and T-cell-mediated immunity are required, and these T cells have been described as being Th2 type with predominant interleukin-4 and immunoglobulin G1 production (1, 2, 10, 11, 19). The role of CD8⁺ T cells during *Salmonella* infection is unclear but has gained interest because humans and mice immunized with attenuated *Salmonella* strains can generate a CD8⁺-T-cell response (3, 8, 15, 18). Also, the generation of major histocompatibility complex class I (MHC-I) molecule-restricted peptides from infected cells is not well characterized. We previously described that macrophages infected with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and activated with gamma interferon (IFN- γ) can secrete peptides that stabilize K^b molecules on the surface of RMA-S cells (9). Lo et al. have described an MHC class Ib-restricted response during infection with virulent *Salmonella* (7), and Pasetti et al. found an L^d-restricted response after intranasal administration with attenuated *Salmonella* strains (14).

In the present study, we searched for MHC-I epitopes from *Salmonella* OmpC porin, one of the two components of the porin preparation used in vaccine trials (5).

K^b binding peptide search and chemical synthesis. In order to identify CD8⁺-T-cell epitopes derived from *Salmonella* serovar Typhimurium OmpC porin, we searched the sequence for eight-amino-acid-long peptides with the anchor amino acid motif described for peptides that bind to K^b molecules. The first analysis of peptides was done with the ProPred-I program

(<http://www.imtech.res.in/raghava/propred1/index.html>), which screens for MHC-I binding peptides that can be generated by proteasome cleavage of the original protein (17). Four peptides from the serovar Typhimurium OmpC (gi 7428872) sequence were displayed by this analysis: 132-RNTDFFGL, 73-TRVAFAGL, 343-NTDDIVAL, and 159-ENTNGRSL. A second analysis of the OmpC sequence was done with the Parker HLA peptide motif search program (http://bimas.dcrt.nih.gov/molbio/hla_bind/), which estimates the half time of disassociation of an MHC molecule containing the predicted peptides (13). According to these two criteria, the peptides 132-RNTDFFGL (OmpC-132) and 73-TRVAFAGL (OmpC-73) had the highest chances to be natural K^b epitopes and so were chosen for further analysis. Peptides were synthesized by solid phase by using an ABI 430A automated synthesizer (Applied Biosystems Inc., Foster City, Calif.) and purified to >90% by reverse-phase high-performance liquid chromatography with a C₁₈ column (Millipore, Bedford, Mass.).

Peptide binding assays and flow cytometry. To test the binding of OmpC peptides to K^b molecules, the murine TAP 2 (transporter associated with antigen processing type 2)-deficient RMA-S cell line was cultured with 50 and 100 μ M concentrations of each peptide for 6 to 8 h at 37°C. K^b binding of ovalbumin amino acids 257 to 264 (SIINFEKL peptide; OVA₂₅₇₋₂₆₄) was used as a reference for positive peptide binding. Following extensive washes with phosphate-buffered saline (PBS), cells were independently surface stained with purified monoclonal antibodies (MAbs) against K^b (Y3 [12]), D^b (28-14-8S; ATCC HB-27), and K^d (SF1-1.1.1; ATCC HB-159) at 4°C. After two washes with PBS, counterstaining with fluorescein isothiocyanate-conjugated goat anti-mouse antibody (Sigma, St. Louis, Mo.) was performed under the same conditions. A total of 10⁴ RMA-S cells for each treatment was analyzed by flow cytometry on a FACSsort (Becton Dickinson, Mountain View, Calif.). Figure 1A shows the K^b profiles for RMA-S cells loaded with the predicted *Salmonella* OmpC peptides, and as expected OmpC-132 and OmpC-73 can bind to K^b molecules and stabilize alpha chains on the surfaces of RMA-S cells in a dose-dependent manner (a 3.8-fold increase in the mean fluorescence [mf] with 100 μ M OmpC-73 and a 2.1-fold

* Corresponding author. Mailing address: Av. Instituto Politécnico Nacional No. 2508, Col. San Pedro Zacatenco, 07360 Mexico City, Mexico. Phone: 52 (555) 5061-7134. Fax: 52 (555) 747-7134. E-mail: vortiz@mail.cinvestav.mx.

† Present address: Dirección de Investigación en Inmunotecnología, Laboratorios Silanes SA de CV, 03100 Mexico City, Mexico.

‡ Present address: Division of Cell Biology, The Hospital for Sick Children, Toronto, Ontario M5G 1X8, Canada.

§ A.D.-Q. and N.M.-O. contributed equally to this work.

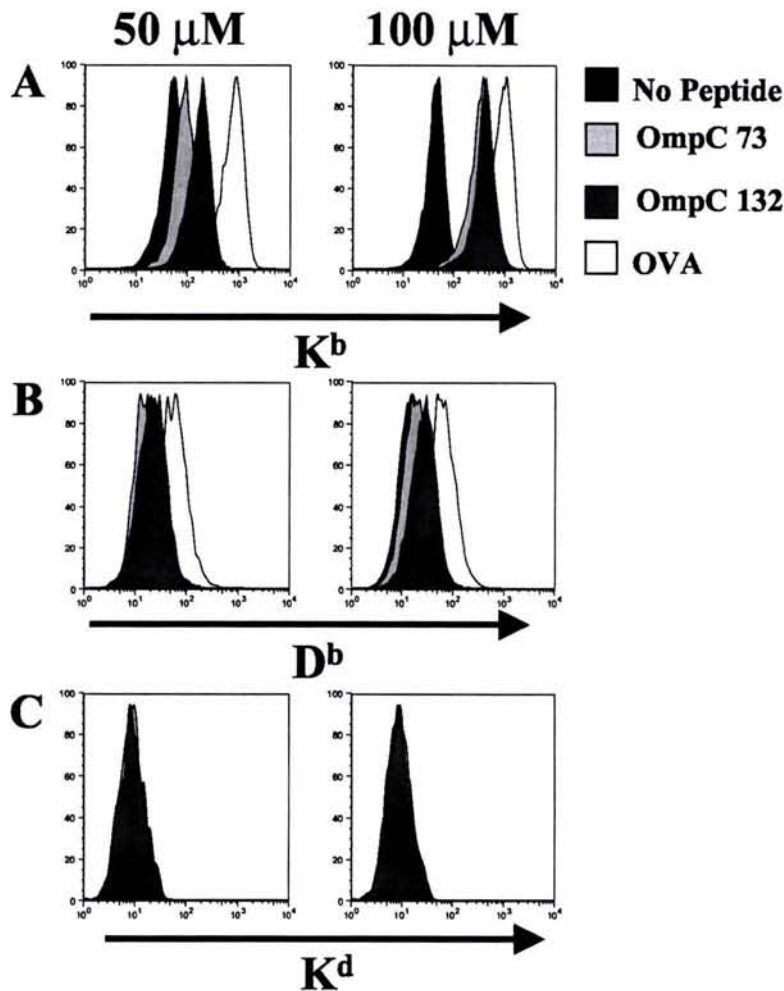


FIG. 1. *Salmonella* OmpC peptides bind specifically to K^b molecules. RMA-S cells were cultured with 50 and 100 μM concentrations of OmpC-73, OmpC-132, and OVA₂₅₇₋₂₆₄ (OVA) peptides for 6 h, and then MHC-I molecules were surface stained and analyzed with a fluorescence-activated cell sorter. The results for anti- K^b MAb (A), anti- D^b MAb (B), and anti- K^d MAb (C) are shown. Data shown are representative of three reproducible independent experiments.

increase in the mf with 100 μM OmpC-132). OmpC peptide binding was K^b specific because high-dose OmpC peptides did not stabilize D^b molecules (the mf values were 16.26 in the sample without peptide, 21.19 in the sample with OmpC-73, and 25.84 in the sample with OmpC-132). Although this result was clear for the OmpC peptides, the OVA₂₅₇₋₂₆₄ peptide showed some binding to D^b (mf, 62.73) when RMA-S cells were cultured with a 100 μM dose of peptide (Fig. 1B). In all cases, absence of staining was observed with the isotype control antibody against K^d (Fig. 1C).

Can these OmpC peptides elicit a CTL response after immunization? To test whether the OmpC peptides can elicit a cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response *in vivo*, we immunized C57BL/6J mice with an emulsion of incomplete Freund's adjuvant containing 100 μg of each peptide, which was applied subcutaneously at the base of the tail. This regimen was repeated three times at intervals of 1 week. At day 31, the mice were sacrificed for spleen removal and *in vitro* stimulation with the peptides. Briefly, splenocytes were cultured in 10% fetal calf serum-supplemented Dulbecco minimal essential medium

and a 50 μM concentration of the corresponding peptide. Cells surviving after 5 days of culture were tested for cytolytic activity against ^{51}Cr -labeled RMA-S cells loaded with peptide, as reported previously (20, 23). In Fig. 2A, a representative experiment is shown in which CTLs from OmpC-73- and OmpC-132-primed mice specifically kill RMA-S cells loaded with the corresponding peptide but not OVA₂₅₇₋₂₆₄-loaded cells, indicating that the CTL activity observed was not due to another type of cell such as NK cells. It is worthwhile to mention that OmpC peptides bind and stabilize primarily to K^b and not to D^b (Fig. 1A and B) molecules on RMA-S cells. Therefore, CTLs from *Salmonella*-infected mice recognize these epitopes only in a K^b -restricted manner on this cell line. In addition, OmpC-132 induced a stronger CTL response than the one derived from OmpC-73 immunization (P of <0.002 for effector-to-target cell ratios greater than 25:1), which correlates with their levels of peptide binding to RMA-S cells shown in Fig. 1. This finding confirms that C57BL/6J mice can generate a K^b -restricted CTL response against OmpC-73 and OmpC-132 peptides.

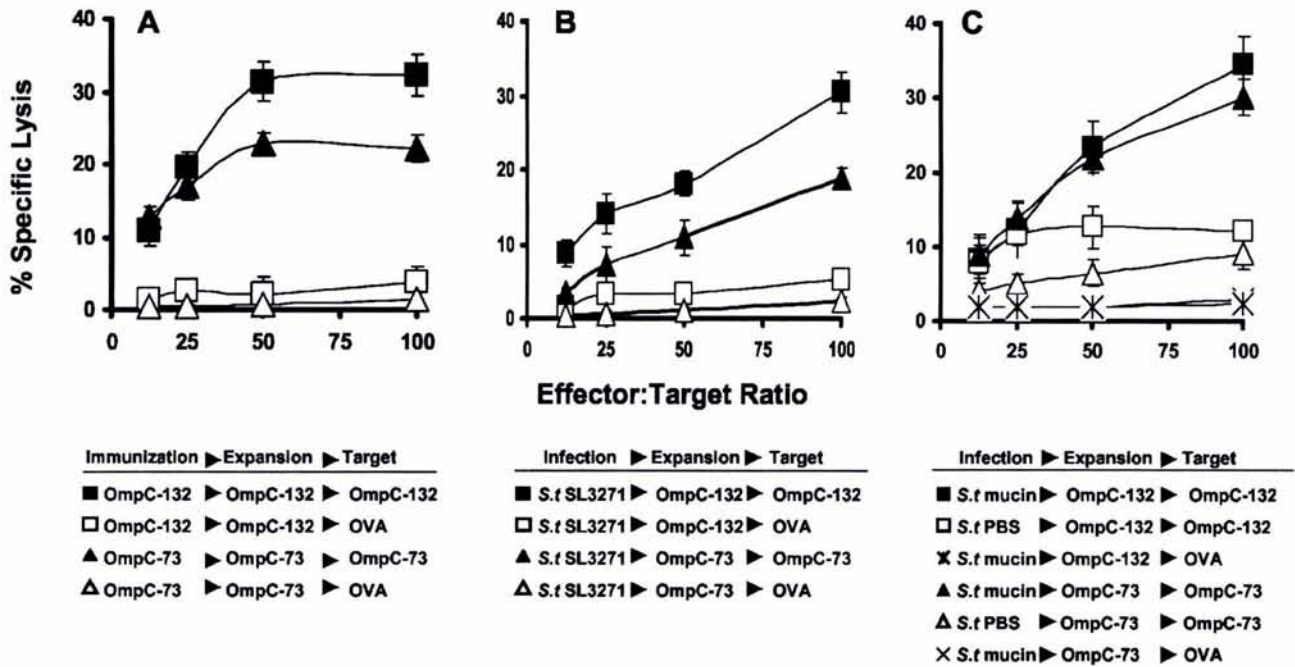


FIG. 2. Cytotoxic response against *Salmonella* OmpC peptides. (A) C57BL/6 mice were immunized with OmpC-73 or OmpC-132 peptides. After 4 weeks, splenocytes were stimulated in vitro with the indicated peptide (expansion), and an assay of cytotoxic activity against RMA-S cells loaded with peptide (target) was performed. (B) Mice were orally infected with serovar Typhimurium SL3261 (*S.t.* SL3261), and after 6 weeks splenocytes were tested as described for panel A. (C) Mice received an intraperitoneal load of serovar Typhi given in 5% mucin or in PBS (*S.t.* mucin or *S.t.* PBS), and splenocytes from both groups of mice were tested as described for panel A. All curves show the mean percentages of specific lysis at different effector-to-target cell ratios for triplicate wells; the bars indicate standard deviations. In all cases, results for a representative experiment out of three experiments with similar results are shown. Comparisons of cytotoxicity levels were performed by Student's *t* test with SigmaStat software (version 9.0; SPSS Science Software Products, Chicago, Ill.). *P* values of <0.05 were considered significant. OVA, OVA₂₅₇₋₂₆₄ peptide.

Is the OmpC-specific CTL response present after *Salmonella* invasion? C57BL/6J is an *Ity*^s mouse strain that cannot resist infection with virulent *Salmonella* serovar Typhimurium. To overcome this problem and evaluate the natural course of disease, we infected C57BL/6J mice orally with 10⁶ PFU of attenuated *aroA*^{-/-} *Salmonella* serovar Typhimurium SL3261. This protocol elicits a specific immune response for bacterial clearance in mice (21). After 6 weeks, mouse spleens were

harvested, stimulated with peptides, and evaluated for specific CTL activity as described above. Mice given a *Salmonella* serovar Typhimurium dose that self-limits its replications after invasion can generate specific CTLs against OmpC-132 and OmpC-73 (Fig. 2B).

Based on the known homology of the *Salmonella* serovar Typhimurium OmpC sequence with other OMPs of gram-negative bacteria, we searched for OmpC-132 and OmpC-73

TABLE 1. OmpC predicted epitopes in gram-negative bacterial OMPs

GenBank accession no. ^a	Protein	Bacterial origin of protein ^b	Similarity to ^c :	
			OmpC-73 (TRVAFAGL)	OmpC-132 (RNTDFFGL)
16761195	OmpC	Serovar Typhimurium	+	+
47797	OmpC	Serovar Typhi	+	+
8953564	OmpC	Serovar Minnesota	+	+
19743624	OmpC	Serovar Dublin	+	+
19743622	OmpC	Serovar Gallinarum	+	+
26248604	OmpC	<i>Escherichia coli</i>	+	+
24113600	Omp1b	<i>Shigella flexneri</i>	+	RNSDFFGL
16760442	OmpS	Serovar Typhi	TRLAFAAGL	+
3273514	OmpN	<i>Escherichia coli</i>	TRLAFAAGL	+
16764916	OmpD	Serovar Typhimurium	TRLAFAAGL	+
16764875	OmpC2	<i>Yersinia pestis</i>	TRLGFAAGL	+
151149831	OmpK36	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	TRLAFAAGL	RNSDFFGL

^a GenBank, National Center for Biotechnology Information.

^b All serovars are those of *Salmonella enterica*.

^c +, identity to OmpC peptide. Amino acids shown in bold type are those that differ from the sequence in parentheses at top of column.

epitopes in the protein family of porins (Table 1). All *Salmonella* strains share the exact sequence for OmpC-73 and OmpC-132 in the OmpC porin. Interestingly, other strains and different porins share similar peptides with the anchor residues for binding to K^b molecules. Normally, *S. enterica* serovar Typhi does not cause systemic disease in mice. Therefore, to further confirm that the invasion of *Salmonella* into macrophages was required to generate the CTL response, we used mucin to apply serovar Typhi to the peritoneum of C57BL/6J mice (16). For this reason, 5,000 PFU of serovar Typhi 9,12,Vi:d in 5% mucin was administered, and control mice received the same bacterial dose in PBS. Six weeks later, splenocytes were screened for peptide CTL activity as described above. As shown in Fig. 2C, only mice that received serovar Typhi and mucin were able to generate a CTL response against OmpC peptide-loaded RMA-S cells (*P* of <0.02 for effector-to-target cell ratios greater than 50:1). Thus, *Salmonella* needs to colonize macrophages in order to generate a CTL response against porin peptides. This result also suggests that infected macrophages contribute to the generation of MHC-I peptides; further investigation will clarify the contribution of other antigen-presenting cells (dendritic cells and B cells) to the presentation of *Salmonella* antigens (22, 24, 25).

Further analysis of a specific CTL response directed against OmpC peptides will clarify the participation of CD8⁺ T cells in the elimination of infected cells, as well as some unanswered questions on the processing and presentation of *Salmonella* antigens.

This work was supported by research grant 3595P-M9608 from the Mexican Council of Science and Technology (CONACYT). A.D.-Q. and N.M.-O. were recipients of a National Council of Science and Technology scholarship.

Y3 hybridoma was a kind gift of G. Hammerling, German Cancer Research Center, DKFZ, Heidelberg, Germany.

REFERENCES

- Cookson, B. T., and M. Bevan. 1997. Identification of a natural T cell epitope presented by *Salmonella*-infected macrophages and recognized by T cells from orally immunized mice. *J. Immunol.* **158**:4310-4319.
- Galdiero, M., L. De Martino, A. Marcatili, I. Nuzzo, M. Vitiello, and G. Cipollaro de l'Ero. 1998. Th1 and Th2 cell involvement in immune response to *Salmonella typhimurium* porins. *Immunology* **94**:5-13.
- Gonzalez, C. R., F. R. Noriega, S. Huerta, A. Santiago, M. Vega, J. Paniagua, V. Ortiz-Navarrete, A. Isibasi, and M. M. Levine. 1998. Immunogenicity of a *Salmonella typhi* CVD 908 candidate vaccine strain expressing the major surface protein gp63 of *Leishmania mexicana mexicana*. *Vaccine* **16**:1043-1052.
- Isibasi, A., V. Ortiz, M. Vargas, J. Paniagua, C. González, J. Moreno, and J. Kumate. 1988. Protection against *Salmonella typhi* infection in mice after immunization with outer membrane proteins isolated from *Salmonella typhi* 9,12,d,Vi. *Infect. Immun.* **56**:2953-2959.
- Isibasi, A., V. Ortiz-Navarrete, J. Paniagua, R. Pelayo, C. R. Gonzalez, J. A. Garcia, and J. Kumate. 1992. Active protection of mice against *Salmonella typhi* by immunization with strain-specific porins. *Vaccine* **10**:811-813.
- Kuusi, N., M. Nurminen, H. Saxen, M. Valtonen, and P. H. Mäkelä. 1979. Immunization with major outer membrane proteins in experimental salmonellosis of mice. *Infect. Immun.* **25**:857-862.
- Lo, W. F., H. Ong, E. S. Metcalf, and M. J. Soloski. 1999. T cell responses to gram-negative intracellular bacterial pathogens: a role for CD8⁺ T cells in immunity to *Salmonella* infection and the involvement of MHC class Ib molecules. *J. Immunol.* **162**:5398-5406.
- Lundin, B. S., C. Johansson, and A.-M. Svennerholm. 2002. Oral immunization with a *Salmonella enterica* serovar Typhi vaccine induces specific circulating mucosa-homing CD4⁺ and CD8⁺ T cells in humans. *Infect. Immun.* **70**:5622-5627.
- Martin-Orozco, N., A. Isibasi, and V. Ortiz-Navarrete. 2001. Macrophages present exogenous antigens by class I major histocompatibility complex molecules via a secretory pathway as a consequence of interferon-gamma activation. *Immunology* **103**:41-48.
- Matsui, K., and T. Arai. 1989. Protective immunity induced by porin in experimental mouse salmonellosis. *Microbiol. Immunol.* **33**:699-708.
- Matsui, K., and T. Arai. 1989. Specificity of *Salmonella* porin as an eliciting antigen for cell-mediated immunity (CMI) reaction in murine salmonellosis. *Microbiol. Immunol.* **33**:1063-1067.
- Ozato, K., and D. H. Sachs. 1981. 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.* **126**:317-321.
- Parker, K. C., M. A. Bednarek, and J. E. Coligan. 1994. Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side-chains. *J. Immunol.* **152**:163-175.
- Pasetti, M. F., R. Salerno-Goncalves, and M. B. Szein. 2002. *Salmonella enterica* serovar Typhi live vector vaccines delivered intranasally elicit regional and systemic specific CD8⁺ major histocompatibility class I-restricted cytotoxic T lymphocytes. *Infect. Immun.* **70**:4009-4018.
- Salerno-Goncalves, R., M. F. Pasetti, and M. B. Szein. 2002. Characterization of CD8(+) effector T cell responses in volunteers immunized with *Salmonella enterica* serovar Typhi strain Ty21a typhoid vaccine. *J. Immunol.* **169**:2196-2203.
- Sein, J., V. Cachicas, M. I. Becker, and A. E. De Ioannes. 1993. Mucin allows survival of *Salmonella typhi* within mouse peritoneal macrophages. *Biol. Res.* **26**:371-379.
- Singh, H., and G. P. Raghava. 2003. ProPred1: prediction of promiscuous MHC class-I binding sites. *Bioinformatics* **19**:1009-1014.
- Szein, M. B., M. K. Tanner, Y. Polotsky, J. M. Orenstein, and M. M. Levine. 1995. Cytotoxic T lymphocytes after oral immunization with attenuated vaccine strains of *Salmonella typhi* in humans. *J. Immunol.* **155**:3987-3993.
- Thatte, J., S. Rath, and V. Bal. 1993. Immunization with live versus killed *Salmonella typhimurium* leads to the generation of an IFN-gamma-dominant versus an IL-4-dominant immune response. *Int. Immunol.* **5**:1431-1436.
- Townsend, A., C. Ohlen, J. Bastin, H. G. Ljunggren, L. Foster, and K. Karre. 1989. Association of class I major histocompatibility heavy and light chains induced by viral peptides. *Nature* **340**:443-448.
- VanCott, J. L., S. N. Chatfield, M. Roberts, D. M. Hone, E. L. Hohmann, D. W. Pascual, M. Yamamoto, H. Kiyono, and J. R. McGhee. 1998. Regulation of host immune responses by modification of *Salmonella* virulence genes. *Nat. Med.* **4**:1247-1252.
- Wick, M. J. 2002. The role of dendritic cells during *Salmonella* infection. *Curr. Opin. Immunol.* **14**:437-443.
- Wunderlich, J., and G. Shearer. 1997. Chromium-release assay for measuring CTL activity, p. 3.11.4-3.11.7. In J. E. Coligan, A. M. Kruisbeck, D. H. Margulies, E. M. Shevach, and W. Strober (ed.), *Current protocols in immunology*, vol. 1. John Wiley and Sons, New York, N.Y.
- Yrliid, U., M. Svensson, A. Håkansson, B. J. Chambers, H.-G. Ljunggren, and M. J. Wick. 2001. In vivo activation of dendritic cells and T cells during *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. *Infect. Immun.* **69**:5726-5735.
- Yrliid, U., and M. J. Wick. 2002. Antigen presentation capacity and cytokine production by murine splenic dendritic cell subsets upon *Salmonella* encounter. *J. Immunol.* **169**:108-116.