



112617
2EJ

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

"GENERACION DE PEPTIDOS QUE SON PRESENTADOS EN EL
CONTEXTO DE MOLECULAS DE CLASE I DEL SISTEMA
PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD A PARTIR
DE ANTIGENOS EXOGENOS"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MAESTRIA EN CIENCIAS BIOMEDICAS
— INMUNOLOGIA —

P R E S E N T A
NATALIA MARTIN OROZCO

ASESOR DE TESIS: DR. VIANNEY ORTIZ NAVARRETE



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 está 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.

A Marita,

con mucho cariño, por tu gran esfuerzo y dedicación.

**Con un profundo agradecimiento, respeto y admiración para mis compañeros y amigos
de la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica.**

CONTENIDO

RESUMEN

I. ANTECEDENTES

- 1.1. Infección por *Salmonella*.
- 1.2. Resistencia a la infección por *Salmonella*
- 1.3. Procesamiento y presentación de antígenos
 - 1.3.1. Vía endógena
 - 1.3.2. Degradación en el lumen del RE y moléculas vacías de clase I
 - 1.3.3. Vía exógena
 - 1.3.4. Otros mecanismos de procesamiento de antígeno

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

III. MATERIAL

- 3.1. Ratones
- 3.2. Líneas celulares
- 3.3. Cepas bacterianas

IV. METODOS

- 4.1. Obtención y activación de macrófagos
- 4.2. Infección de macrófagos y cocultivo con RMA-S
- 4.3. Inmunofluorescencia
- 4.4. Precipitación de proteínas con ácido trifluoroacético (TCA)
- 4.5. Preparación de antígeno; hidrolizado de proteínas de *Salmonella typhimurium*
- 4.6. Ensayo de citotoxicidad
- 4.7. Ensayo de presentación y cuantificación de IL-2

V. ANALISIS DE RESULTADOS

- 5.1. Macrófagos peritoneales secretan péptidos que se unen a moléculas de clase I K^b
- 5.2. La permanencia de *Salmonella* dentro de los macrófagos aumenta la secreción de péptidos
- 5.3. Macrófagos infectados con *Salmonella* secretan péptidos de *Salmonella* que se unen a moléculas de clase I
- 5.4. Macrófagos secretan péptidos óptimos que estabilizan moléculas de clase I vacías.
- 5.5. La secreción de péptidos es exclusiva de células fagocíticas.
- 5.6. El proceso de secreción de péptidos por los macrófagos no involucra la vía endógena ni la vía exógena de procesamiento de antígeno.

5.7. Péptidos de *Salmonella* secretados por macrófagos infectados son reconocidos por linfocitos citotóxicos

5.8. Macrófagos secretan péptidos inmunogénicos de proteínas solubles.

VI. DISCUSION

VII. BIBLIOGRAFIA

RESUMEN

Los péptidos antigénicos que son presentados en el contexto de moléculas de clase I del complejo principal de histocompatibilidad (CPH), habitualmente provienen de proteínas endógenas procesadas en el citosol de la célula presentadora de antígeno; sin embargo antígenos exógenos, como *Salmonella typhimurium*, que reside dentro de vacuolas fagocíticas induce respuesta de linfocitos T CD8⁺. Este trabajo tiene como objetivo estudiar los mecanismos de procesamiento de antígeno involucrados en la generación de péptidos provenientes de antígenos exógenos, que son presentados por moléculas de clase I del CPH.

Los macrófagos infectados con *Salmonella typhimurium* LT2 se cocultivaron durante 18 horas a 37°C con el timoma deficiente en TAP2, RMA-S. Posteriormente se cuantificaron las moléculas D^b y K^b presentes en la superficie de las células RMA-S por inmunofluorescencia indirecta. La cantidad de moléculas de clase I en la superficie celular de RMA-S se incrementó cuando se cocultivó con macrófagos infectados en comparación con el cocultivo de macrófagos no infectados. Lo anterior fué el primer indicio de que los macrófagos son capaces de secretar péptidos que se unen a moléculas de clase I. La capacidad de los macrófagos de liberar péptidos al medio requiere de la actividad metabólica celular y no se ve afectada cuando los macrófagos se cultivaron con inhibidores de la actividad endosómica, ni con inhibidores de la exocitosis. Además las células cocultivadas con macrófagos infectados fueron reconocidas por linfocitos T citotóxicos provenientes de ratones infectados subletalmente con la bacteria; así mismo RMA-S cocultivadas con macrófagos en presencia de ovoalbúmina fueron reconocidas por el hibridoma RF3370 que reconoce al péptido 257-264 en el contexto de moléculas K^b.

Los resultados sugieren que los macrófagos son capaces de secretar péptidos antigénicos que pueden unirse a moléculas de clase I vacías y de esta manera inducir una respuesta inmune, mediada por linfocitos T CD8⁺, dirigida contra antígenos exógenos. La liberación de péptidos al medio es un evento exclusivo de células fagocíticas, que requiere grandes concentraciones de antígeno para que se lleve a cabo y el sitio de procesamiento de los antígenos probablemente sea una vacuola fagocítica de pH neutro o con ambiente similar al del citosol.

La secreción de péptidos al medio provenientes de antígenos que son endocitados permitiría la activación de linfocitos CD8⁺ por antígenos que no tienen acceso al citosol como sería el caso de proteínas solubles, varios parásitos y bacterias intracelulares como *Toxoplasma*, *Plasmodium* y *Mycobacterium*.

Esta nueva vía de procesamiento y presentación de antígenos exógenos por moléculas de clase I contribuiría con péptidos al conjunto de antígenos que se presentan durante la ontogenia y que determinan el repertorio de linfocitos T CD8⁺.

I. ANTECEDENTES

1.1. Infección por *Salmonella*.

Salmonella typhimurium es una bacteria gram negativa, patógeno intracelular causante de una enfermedad similar a fiebre tifoidea en su hospedero específico, el ratón (1). La infección natural comienza por la ingestión de agua o alimentos contaminados con la bacteria. En la parte distal del intestino delgado entra en contacto con las células epiteliales desencadenando una cascada de señales similares a las generadas por el factor de crecimiento epidérmico (EGF = epidermal growth factor), las cuales involucran fosforilación de tirosinas cinasas y flujo de calcio. Así provoca que las células epiteliales reorganicen su citoesqueleto y formen prolongaciones de membrana celular denominadas "ruffles" las cuales ayudan a la fagocitosis de *Salmonella typhimurium* (2). Posteriormente se internaliza y transporta por trastositos hasta el extremo baso-lateral de la célula epitelial para llegar a la lámina propia. Ahí recluta a macrófagos y los induce a formar "ruffles" así como macropinocitosis generalizada de manera que los macrófagos endocitan gran cantidad de líquido y a *Salmonella*. Dentro de los macrófagos se localiza en fagosomas gigantes o macropinosomas donde activa sus genes de virulencia, retarda y controla la disminución del pH endosómico y crea un ambiente propicio para multiplicarse (3). La fusión del fagosoma gigante que contiene a *Salmonella* con los lisosomas no está bien definida, existen evidencias de la inhibición de la fusión (4), así como otras que apoyan la fusión fago-lisosómica desde los primeros 30 minutos de infección. Las cepas de *Salmonella* con características virulentas poseen mecanismos de resistencia a la acción de superóxidos o radicales libres de oxígeno (5), óxido nítrico, enzimas lisosómicas y péptidos (6); y cuando se desarrolla la enfermedad los macrófagos transportan a la bacteria a ganglios linfáticos regionales, bazo e hígado donde continúa multiplicándose hasta provocar bacteremia (7).

1.2. Resistencia a la infección por *Salmonella*

Existen dos fases en las que se puede contrarrestar la infección: la temprana y la tardía. La fase temprana depende de la respuesta innata mediada por la capacidad de los macrófagos para eliminar a la bacteria, esta propiedad es controlada por el gene *Ity* localizado en el cromosoma 1 del ratón (8,9). Recientemente se clonó y secuenció el gene de resistencia a *Mycobacterium denominado Bcg* (que se propone equivalente al *Ity*), este codifica para una proteína integral de membrana exclusiva de macrófagos (Nramp: proteína de macrófagos asociada a la resistencia natural) la cual posee 10 dominios transmembranales, dos sitios de glucosilación, dos de fosforilación, un sitio de unión a ATP y es similar a una permeasa de nitrato de *Aspergillus nidulans*, *crnA*, lo cual sugiere que pudiera estar involucrada en el transporte de nitritos y nitratos del citosol hacia los fagolisosomas; donde el ambiente ácido convertiría a los nitritos en óxido nítrico de alta capacidad bactericida. Las cepas de ratón sensibles, *Bcg*⁻,

posiblemente posean defectos en Nramp lo cual disminuiría su capacidad bactericida (10).

En la fase tardía, la resistencia depende de la respuesta inmune específica mediada por anticuerpos y linfocitos T, éste tipo de respuesta confiere protección contra retos subsecuentes. Los anticuerpos participan en la eliminación de la bacteria por bacteriolisis como consecuencia de fijar complemento, así como también favorecen la fagocitosis de la bacteria (11). Esta participación en los eventos de protección está fundamentada en el hecho de que la transferencia de anticuerpos contra proteínas de membrana externa de *Salmonella typhi* protege contra el reto de la bacteria homóloga en ratones no inmunes (12). La generación de la respuesta de anticuerpos requiere de la participación de linfocitos CD4⁺, Th2, productores de interleucinas como la IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10. En la eliminación de la bacteria en retos posteriores es de gran importancia la participación de linfocitos Th1 productores de interferón gamma (IFN- γ), citocina que activa macrófagos y aumenta su capacidad bactericida promoviendo las siguientes funciones celulares: fagocitosis, la actividad de la óxido nítrico sintasa, la actividad de Nramp, la producción de superóxidos y la fusión fagolisosómica. Se ha reportado que los macrófagos de peritoneo de ratón activados con IFN- γ y recombinante controlan mejor la multiplicación de *Salmonella* a diferencia de los no tratados (13). La importancia de los linfocitos T CD4⁺ en el control de la infección quedó de manifiesto por el hecho de que la transferencia de linfocitos CD4⁺ provenientes de ratones infectados con *Salmonella* controlan y disminuyen la multiplicación bacteriana en ratones no inmunes retados con dosis altas de la bacteria, así como también por el hecho de que ratones a los que se les eliminan linfocitos CD4⁺ presentan una disminución de la resistencia a la reinfección en la fase tardía (14). Se ha descrito que los ratones que se recuperan de una infección subletal por *Salmonella typhimurium* adquieren resistencia a la reinfección pues pueden controlar y eliminar el inóculo bacteriano primario y retos subsecuentes con la bacteria homóloga, independientemente de su *Ity*. Por otro lado la participación de la población de linfocitos CD8⁺ no ha sido estudiada en detalle.

1.3. Procesamiento y presentación de antígenos

El procesamiento de antígeno se define como el mecanismo intracelular de degradación de antígenos proteicos que genera péptidos capaces de unirse a moléculas de histocompatibilidad (proteínas codificadas dentro del CPH). La presentación de antígeno es la expresión en la superficie celular del complejo péptido-molécula de histocompatibilidad, de tal forma que el péptido antigénico pueda ser reconocido por el receptor de los linfocitos T y así se pueda inducir una respuesta inmune específica. Se han descrito dos vías para procesar y presentar antígenos, la vía endógena y la vía exógena; así mismo existen dos tipos de moléculas de histocompatibilidad que llevan a cabo la función de presentación de antígeno, las moléculas clase I y las clase II. En la vía endógena, la hidrólisis proteica habitualmente sucede en el citosol y los péptidos generados son presentados por moléculas clase I, mientras que en la vía exógena los péptidos se generan dentro de vesículas

endosómicas y son presentados por moléculas clase II (15,16).

1.3.1 Vía endógena

Los antígenos que se encuentran en el citosol accesibles a la vía endógena pueden provenir de proteínas constitutivas de la célula (endógenas), o bien de antígenos virales, bacterianos o parasitarios; estos últimos como resultado de una multiplicación citosólica del agente infeccioso. El procesamiento se inicia con la conjugación covalente del antígeno a la ubiquitina, lo que le confiere una etiqueta indicativa de hidrólisis (17,18); la degradación proteolítica la lleva a cabo un complejo multienzimático formado de entre 20 a 30 diferentes subunidades, que se le conoce con el nombre de proteasoma; el cual tiene actividad de tripsina, quimiotripsina y de glutamilpeptidasa. Dos de las subunidades que forman a los proteasomas, las denominadas LMP2 y LMP7 están codificadas en el CPH (19,20,21), son polimórficas y su expresión es inducibles por IFN- γ (22,23). La función de estas dos subunidades dentro de los proteasomas no esta totalmente definida, unas evidencias indican que ambas proteínas son indispensables para el procesamiento de antígeno (24,25) mientras que otras señalan lo contrario (26).

Los péptidos generados en el citosol son translocados al lúmen del retículo endoplásmico (RE) (27) por un proceso dependiente de ATP (28,29) en el que participa una proteína formada por las subunidades TAP1 y TAP2 (proteínas transportadoras de péptidos antigénicos) (30). Ambas subunidades pertenecen a la familia de ABC transportadores (31,32), están codificadas dentro del CPH (33,34), son polimórficas y su expresión es inducible por IFN- γ . En células de rata se ha demostrado que el polimorfismo de TAP1 y TAP2 interviene en la selectividad de los péptidos que estos transportadores translocan al lúmen del RE (35), aunque este fenómeno no se ha observado en los transportadores de células humanas o de ratón (36).

La molécula clase I es un dímero formado por la asociación no covalente entre la cadena pesada α y la beta 2 microglobulina (β -2m). La cadena pesada es una glicoproteína transmembranal codificada dentro del CPH, es polimórfica e inducible por IFN- γ ; consta de tres dominios extracelulares (α_1 , α_2 , α_3), un segmento transmembranal y un segmento citoplásmico. Los dominios extracelulares son los mas importantes para llevar a cabo la función de presentación de antígeno, así por ejemplo el dominio α_3 interacciona con la molécula correceptora CDB, mientras que los dominios α_1 y α_2 forman un sitio o nicho donde se une el péptido antigénico y es en donde radica el polimorfismo de la cadena pesada. De acuerdo a la estructura tridimensional de la molécula de clase I, el nicho consiste en una base de hoja β formada por 8 filamentos β antiparalelos rodeados por dos paredes de hélices α . La base presenta seis hendiduras donde se acomodan los residuos de inserción del péptido, debido a que los aminoácidos polimórficos conforman estas hendiduras explica el que los residuos de inserción del péptido deban ser alelo específicos (37).

La secuencia de ensamble de las moléculas de clase I ocurre de la siguiente manera, durante su biosíntesis la cadena pesada se va trasladando al lúmen del RE donde rápidamente se asocia a calnexina (38), posteriormente se asocia con β 2-m y

el dímero formado va a interactuar con los TAP's para que se le provea de péptidos (39). La unión del péptido origina cambios conformacionales en la molécula de clase I permitiendo con ello que el complejo trimolecular: cadena α -péptido- β 2-m sea transportado a la superficie celular mediante la vía exocítica constitutiva (40). El ensamble y transporte de moléculas de clase I requiere de la unión del péptido ya que células deficientes en los TAP's expresan cantidades mínimas de moléculas clase I en la superficie. Los péptidos que llegan al lumen del RE y que se unen fuertemente a las moléculas de clase I son de 8 ó 9 aminoácidos y poseen dentro de su secuencia residuos de inserción con la molécula clase I; dichos residuos son característicos para cada alelo (41).

1.3.2. Degradación en el lumen del RE y moléculas vacías clase I

En el retículo endoplásmico se elimina la secuencia señal de translocación que tienen todas las proteínas que son transportadas por la vía exocítica clásica, también allí se procesan todas aquellas proteínas que por alguna razón no adoptaron su conformación correcta. No se conoce que tipo de proteasas llevan a cabo dicha función, pero se ha descrito que los péptidos generados en ese proceso, también pueden unirse y ser presentados por moléculas de clase I. Sin embargo, algunos de estos péptidos son subóptimos, es decir solamente permiten la salida de moléculas de clase I, y cuando éstas arriban a la superficie sin el péptido óptimo pierden estabilidad, como consecuencia se disocian la cadena α y la β 2-m, entonces la cadena pesada pierde su conformación y se acumula en la superficie celular. Es importante señalar que si se adicionan en forma externa altas concentraciones de péptido óptimo a las células en cultivo, las moléculas vacías pueden nuevamente adquirir su conformación tridimensional y ser funcionales. Se considera que en células normales existe por lo menos un 5% de moléculas vacías y se ha propuesto que la razón de que existan se debe a que el suministro de péptidos endógenos es limitado aunque se desconoce el significado biológico de este tipo de moléculas (42).

1.3.3. Vía exógena

El tipo de células que realizan la función de procesar y presentar antígenos exógenos son los fagocitos mononucleares, los linfocitos B, las células dendríticas y las células de Langerhans. Estas endocitan al antígeno por varios mecanismos y lo transportan dentro de vesículas endosomales hacia los lisosomas (43), en donde se lleva a cabo el procesamiento por proteasas que poseen actividad de serinproteasas, cisteinproteasas, metaloproteasas y proteasas ácidas. A la fecha solo se han identificado como proteasas involucradas la generación de péptidos antigénicos a la cathepsina B, D y E (44,45).

Las moléculas de clase II están formadas por la asociación no covalente de dos proteínas transmembranales, las cadenas α y β , ambas codificadas dentro del CPH, polimórficas e inducibles por IFN- γ . Cada una de estas cadenas posee dos dominios extracelulares (α_1 , α_2 y β_1 , β_2), un segmento transmembranal y un segmento

citoplásmico. El nicho de unión al péptido del dímero α - β esta formado por la asociación de los dominios α_1 y β_2 , estructuralmente es similar al de la molécula de clase I, pues posee una base de hoja β con ocho filamentos β antiparalelos altamente hidrofóbicos rodeada de dos paredes de α hélice, con extremos abiertos lo que permite la unión de péptidos de 10 a 25 aminoácidos cuyos extremos amino y carboxilo cuelgan del nicho de la molécula (46). Al igual que en las moléculas de clase I en el centro de la base se localiza el polimorfismo. Se ha reportado que los péptidos que se unen a moléculas de clase II en el sitio de unión adquieren la conformación tridimensional de hélice de poliprolina tipo II (47).

Durante su biosíntesis las cadenas α y β se translocan al lumen del RE donde se asocian entre sí y con una proteína llamada cadena invariable, forman complejos moleculares de nueve subunidades asociadas en una relación estequiométrica de tres dímeros α - β por tres cadenas invariables. Se ha propuesto que esta asociación evita la unión de péptidos al nicho de la molécula de clase II durante su estancia en el RE y además la cadena invariable posee secuencias senales para dirigir al complejo al compartimento llamado de clase II, MIIC ó CPL (48).

El compartimento CPL se fusiona con el lisosoma donde proteasas hidrolizan la cadena invariable y el ambiente ácido de la vesícula (pH 5) favorece la unión de los péptidos, provenientes del material endocitado, al dímero α - β (49). El complejo péptido-molécula de clase II viaja a la superficie celular por vesículas exocíticas.

Recientemente, se reportó que moléculas de histocompatibilidad no convencionales llamadas DM (cadena α , DMA y cadena β DMB) optimizan la unión de los péptidos al dímero α - β en el compartimento CPL, se propone que éstas inducen cambios conformacionales en la molécula de clase II que disminuyen la afinidad por la cadena invariable y la aumentan por los péptidos. Las moléculas DM están codificadas en el MHC, no se encuentran en la superficie celular y se acumulan en el compartimento CPL. Son homólogas en un 30% con las moléculas de clase I y II, no poseen el sitio de unión a CD4 pero el modelaje molecular con las coordenadas de DR indica que pueden adquirir la estructura de los dominios α_1 - β_1 (50).

1.3.4. Otros mecanismos de procesamiento de antígeno.

La mayoría de los péptidos presentados por moléculas de clase I provienen de proteínas endógenas que fueron degradadas en el citosol. Sin embargo existen evidencias de que proteínas solubles o microorganismos intracelulares residentes en vesículas endocíticas, inducen la respuesta de linfocitos CD8⁺.

En el modelo mas estudiado, se ha utilizado como antígeno soluble a la ovoalbúmina (OVA) para inducir respuesta citotóxica en ratones. Se observó por primera vez que la inmunización de ratones con OVA por vía intravenosa induce una respuesta de linfocitos citotóxicos específicos (51). Sin embargo este evento no fué reproducible y solamente se ha podido inducir este tipo de respuesta cuando se ha inmunizado con esplenocitos previamente cultivados con OVA; de estos experimentos se concluyó que algunas células de bazo eran las responsables de procesar y presentar los péptidos de OVA en el contexto de moléculas de clase I (52). Posteriormente se

describió que esplenocitos cultivados con OVA generaron, de manera dosis dependiente, el péptido 257-264 de OVA que se presenta en el contexto de moléculas K^b (53) y se identificó que los macrófagos eran los responsables de llevar a cabo el fenómeno. La capacidad de los macrófagos para generar el péptido no se alteró por el tratamiento con inhibidores de proteasas lisosomales como leupeptina y antipapaína, por lo cual se propuso que la degradación de OVA debe suceder en compartimentos diferentes a lisosomas (54).

Se han planteado tres posibles mecanismos por los cuales el macrófago procesaría antígenos exógenos para presentarlos por moléculas de clase I:

1) Regurgitación de péptidos al medio.

Los macrófagos degradan al antígeno dentro de la vesícula endocítica y posteriormente regurgitan los péptidos al medio extracelular, en este proceso la fagocitosis es primordial y es una vía independiente de la vía endocítica. Esta propuesta se fundamenta en experimentos con macrófagos infectados con una *Salmonella typhimurium* recombinante que expresa la proteína citosólica de fusión *crf*-epitopo 257-264 OVA, donde éstos presentan el péptido 257-264 de OVA en el contexto de moléculas K^b y activan de manera específica a hibridomas de T CD8⁺. Así mismo macrófagos fijados previamente cocultivados con macrófagos vivos infectados son reconocidos por el hibridoma citotóxico. Este evento sucede 20 minutos después de la infección y no se ve afectada cuando se realiza en presencia de brefeldina A (bfA) ni cicloheximida. Además macrófagos tratados con citocalasina D y células no fagocíticas como la EL-4 no presentan el péptido (55). Trabajos posteriores muestran que existe una mejor inducción de respuesta citotóxica *in vivo* contra OVA cuando se encuentra como antígeno particulado por ejemplo asociada a latex (56).

2) Unión de péptidos a moléculas de clase I dentro de la vesícula endocítica sin involucrar a la vía endógena.

La evidencia experimental en la que se apoya esta propuesta es que la línea de macrófagos humanos U2-OS cultivada con la proteína de fusión, exotoxina A de *Pseudomonas*-epitopo de la proteína matriz de influenza, presenta el epitopo de la matriz del virus de la influenza en el contexto de moléculas HLA-A2.1 (Esta proteína de fusión no penetra al citosol como la exotoxina A nativa). La presentación del péptido no se inhibe con bfA ni con cloroquina. Así mismo células T2, deficientes en TAP's, presentan el péptido cuando se cultivan con la proteína completa. Sin embargo T2 cocultivada con macrófagos en presencia de la proteína no presentan el péptido de la influenza, lo que excluye la regurgitación de suficientes péptidos al medio (57).

3) El material endocitado ingresa al citosol y los antígenos se procesan por la vía endógena.

Este hecho se apoya en que macrófagos peritoneales de ratones deficientes en

TAPS cultivados con partículas de latex recubiertas de OVA no presentan el péptido 257-264 OVA, a diferencia de clones de macrófagos normales BMA3.1A7 que si lo hacen. Estos macrófagos normales tratados con BfA e inhibidores de proteasomas no presentan el péptido 257-264 OVA cuando se cultivan con partículas de latex recubiertas con OVA. Además cuando se cultivan macrófagos normales con partículas de latex recubiertas con OVA y con gelonina, éstos frenan su síntesis de proteínas; la posible explicación para esta inhibición es que la gelonina endocitada ingresara al citosol para ejercer su acción a nivel de los ribosomas (58). Por otra parte se ha reportado que el IFN- γ y la IL4 favorecen la presentación del péptidos 257-264 OVA en este sistema (59).

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Salmonella typhimurium reside dentro de vacuolas fagocíticas de macrófagos infectados y hasta la fecha no se ha demostrado que la bacteria, productos de la misma o péptidos ingresen al citosol. A pesar de ello, la infección por *Salmonella* induce respuesta de linfocitos T citotóxicos $CD8^+$ contra antígenos expresados en ella. En la figura 1 se ilustran los posibles mecanismos involucrados en el procesamiento de antígenos de *Salmonella* y la presentación de éstos por moléculas de clase I que permitirían la activación de linfocitos T $CD8^+$:

- a) Paso de proteínas del fagosoma al citosol que serían procesadas por la vía endógena convencional.
- b) Paso de péptidos del fagosoma al citosol que serían transportados vía TAPs.
- c) Degradación dentro del fagosoma y fusión de éste con vesículas exocíticas transportadoras de moléculas clase I ó con vesículas endocíticas de reciclaje donde los péptidos generados se unirían a las moléculas clase I.
- d) Degradación dentro del fagosoma y secreción de péptidos al medio donde pueden unirse a moléculas clase I vacías de la superficie de la célula secretora y de células vecinas.

Este trabajo tiene como objetivo estudiar los mecanismos de procesamiento de antígenos de *Salmonella* y la presentación de éstos en el contexto de moléculas clase I, para lo cual se evaluará el mecanismo descrito en el inciso "d", sin descartar que los otros mecanismos también pueden participar.

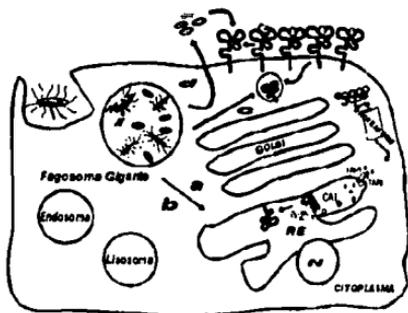


Figura 1. Posibles mecanismos involucrados en el procesamiento de antígenos de *Salmonella* y la presentación de éstos por moléculas de clase I. RE: retículo endoplásmico, N: núcleo, CAL: calnexina.

III. MATERIAL

3.1. Ratones

Ratones, Balb/c, hembras de seis a diez semanas de edad donadas por el Bioterio del Hospital Infantil de México.

3.2. Líneas celulares

El timoma RMA-S de haplotipo H-2^b obtenido por del Dr. Klas Kerre (Karolinska Institutet, Estocolmo, Suecia) (60). El hibridoma de células T (C57BL/6-BW.CDS.7) que reconoce al péptido 257-264 de la ovalbúmina en el contexto de moléculas K^b, obsequio del Dr. Kenneth L. Rock (Division of Lymphocyte Biology, Dana Faber Cancer Institute, Department of Pathology, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts) (61). Las siguientes líneas de macrófagos: IC21 de haplotipo H-2^b ATCC TIB-186 (62), P388D, de haplotipo H-2^d ATCC TIB-63 (63) y J774A.1 de haplotipo H-2^d ATCC TIB-67 (64). El mastocitoma P815 de haplotipo H-2^d ATCC TIB-64 (65). El fibroblasto L929 ATCC CCL-1. Las células dependientes de IL-2, CTL-2 ATCC TIB-214 (66) y el fibroblasto C63 productor de IL-2 obsequio del Dr. Peter Krammer (Tumorimmunology Program, German Cancer Research Center, Heidelberg, Alemania). Todas las líneas celulares se cultivaron en RPMI-1640 complementado con 10% de suero fetal bovino, L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM, 2-mercapto-etanol 50 μ M.

3.3. Cepas bacterianas

Salmonella typhimurium LT2, *Salmonella typhimurium* pho^r (67) obsequio de la Dra. Celia Alpuche (Laboratorio de Inmunoquímica, Hospital Infantil de México), *Salmonella typhi* CVD 908 donado por el Dr. Myron Levine de Center for Vaccine Development, Baltimore USA (68). En los experimentos donde se empleó bacteria muerta, ésta se obtuvo por calentamiento a 90°C durante 20 minutos. El esquema de infección con *Salmonella* fué: tres inoculaciones con espacios de diez días con 1 x 10¹ de *Salmonella typhimurium* LT2, por vía intraperitoneal.

IV. METODOS

4.1. Obtención y activación de macrófagos

Se inocularon ratones Balb/c por vía intraperitoneal con 1 ml de peptona al 10% y al tercer día se obtuvieron células del exudado peritoneal. Los macrófagos se dejaron adherir al plástico por 3 hrs a 37°C y las las otras células de peritonéo se eliminaron con cuatro lavados con HBSS (solución de sales balanceadas de Hank's). Las líneas de macrófagos se activaron con 20 u/ml de IFN- γ de ratón 48 horas antes de la infección.

4.2. Infección de macrófagos y cocultivo con RMA-S

Macrófagos peritoneales o las líneas de macrófagos, adheridos a placas de 12 pozos o a botellas de 25 cm², se infectaron con *Salmonella* en una relación macrófago:bacteria de 1:100 por 30 minutos a 37°C. La bacteria no fagocitada se eliminó con cuatro lavados con HBSS y se cultivó en RPMI-20% SFB complementado con 20 µg de gentamicina/ml (69). Los macrófagos infectados se cocultivaron durante 18 horas a 37°C con RMA-S en relación 1:1.

4.3. Inmunofluorescencia

Las moléculas de clase I K^b y D^b expresadas sobre la superficie de las RMA-S se cuantificaron por inmunofluorescencia indirecta empleando los anticuerpos K10.56 y/o Y3, como segundo anticuerpo se utilizaron gamas de cabra anti-IgG de ratón conjugado a isotiocianato de fluoresceína. La intensidad de la fluorescencia se determinó en un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, C.A.) analizando 10 000 células de cada una de las muestras. En algunos experimentos se realizó una doble tinción para eliminar a la población de los macrófagos en el análisis de FACS, en esos casos las RMA-S se tñieron con Y3 conjugado a biotina y con estreptavidina conjugada a ficoeritrina; y los macrófagos se tñieron con el anticuerpo M1 (anti-Mac1) y con el anticuerpo de cabra anti-IgG de rata conjugado a isotiocianato de fluoresceína.

4.4. Precipitación de proteínas con ácido tricloroacético (TCA)

Los lisados celulares se mezclaron 1:1 con albúmina sérica bovina al 10%. 20 µl de la mezcla se colocaron en papel de fibra de nylon. Los papeles se sumergieron en ácido tricloroacético al 10% a 4°C durante 30 minutos. Se lavaron tres veces con TCA al 10% y una vez con metanol al 95%. A los papeles secos se les cuantificó la radioactividad en un contador beta Beckman.

4.5. Preparación de antígeno: hidrolizado de proteínas de *Salmonella typhimurium*

La biomasa bacteriana se rompió por presión con una prensa francesa. Se separaron los fragmentos de membrana por ultracentrifugación a 45 000 rpm durante 45 minutos a 4°C. Se realizó una extracción de proteínas de membrana empleando un amortiguador de alta fuerza iónica que contenía NaCl 0.4M, SDS 1%, EDTA 5mM, 2-mercaptoetanol 0.05% y Tris-HCl 50 mM pH de 7.7. Las proteínas de membrana y las de la fracción citosólica se desnaturalizaron con 2-mercaptoetanol 0.2M y urea 8 M por 12 horas, posteriormente se alquilaron con ácido iodoacético 0.25 M por dos horas. Se dializaron exhaustivamente contra agua y se trataron con tripsina al 1% en un amortiguador de carbonato de amonio de pH 8, 50 mM por 24 horas. Del hidrolizado se separaron las proteínas mayores de 10 000 Da por ultrafiltración con

centriprep-10 y los péptidos se esterilizaron por filtración con membranas de $0.22 \mu\text{m}$ (70).

4.6. Ensayo de citotoxicidad

Los esplenocitos de los ratones Balb/c inmunizados con *Salmonella* se reestimularon *in vitro* con el hidrolizado de proteínas de *Salmonella*, al quinto día las células vivas se utilizaron en diluciones seriadas para el ensayo de citotoxicidad. Las células blanco utilizadas fueron P815 marcadas con Cr^{51} durante dos horas, las cuales previamente fueron cocultivadas 18 horas con la línea de macrófagos IC21 infectada con *Salmonella*. Los resultados se expresaron en % lisis = $(\text{cpm problema}) - (\text{liberación espontánea}) / (\text{liberación máxima}) - (\text{liberación espontánea}) \times 100$.

4.7. Ensayo de presentación y cuantificación de IL-2

Las células RMA-S se cocultivaron con macrófagos de exudado peritoneal de ratones Balb/c en RPMI-10% con concentraciones crecientes de ovoalbúmina (Calbiochem) desde 1 a 10 mg/ml durante 18 horas. Posteriormente estas células se utilizaron para estimular a 1×10^5 células del hibridoma RF3370. A las 24 horas se colectaron $100 \mu\text{l}$ del sobrenadante de cultivo y se cuantificó su contenido de IL2 por bioensayo con CTL2-2 (71).

V. ANALISIS DE RESULTADOS

5.1. Los macrófagos peritoneales secretan péptidos que se unen a moléculas clase I K^b

Después de 18 horas de cultivo con los macrófagos, se cuantificó la cantidad de moléculas clase I K^b presentes en la superficie de las RMA-S por inmunofluorescencia indirecta empleando un anticuerpo monoclonal (Y3) que reconocen el epítopo conformacional formado por los dominios K_{D1} y K_{D2} . El aumento en la intensidad de la fluorescencia de la población de RMA-S proveniente de los cocultivos con respecto a RMA-S permitió evaluar la unión de péptidos a las moléculas de K^b . Los resultados de la figura 2 muestran un aumento en la cantidad de moléculas K^b de RMA-S provenientes del cocultivo con macrófagos no infectados y el aumento es mas pronunciado en las RMA-S provenientes del cocultivo con macrófagos infectados. Este aumento en la media de fluorescencia de las RMA-S cocultivadas con macrófagos no infectados sugiere que los macrófagos peritoneales, de manera permanente, secretan péptidos que se unen a moléculas de clase I y esta secreción de péptidos aumenta conforme se incrementa la internalización de antígeno exógeno (fagocitosis de *Salmonella*).

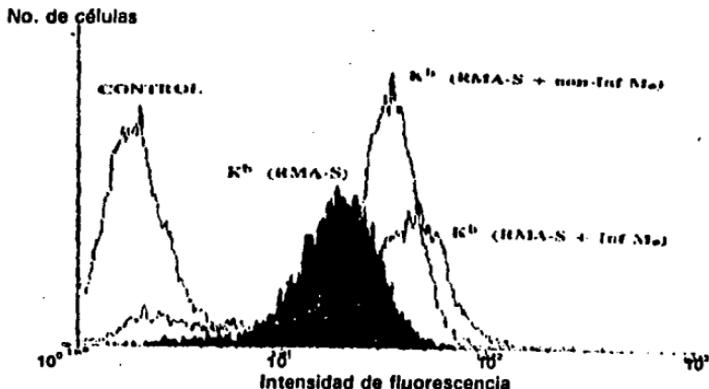


Figura 2. Los macrófagos secretan péptidos capaces de unirse a moléculas de clase I. Las células de timoma RMA-S se cocultivaron por 18 horas con macrófagos peritoneales (RMA-S + non Inf MO) o con macrófagos peritoneales infectados con *Salmonella typhimurium* LT2 (RMA-S + Inf MO). Después se cuantificó la cantidad de moléculas de clase I K^b presentes en la superficie de las RMA-S por inmunofluorescencia indirecta empleando el anticuerpo monoclonal Y3 y como segundo anticuerpo se utilizaron gamas de cabra anti-IgG de ratón conjugado a isotiocianato de fluoresceína.

5.2. La permanencia de *Salmonella* dentro de los macrófagos aumenta la secreción de péptidos

Se evaluó si la participación y permanencia de *Salmonella* dentro del macrófago (permanencia del antígeno) influía en el aumento de la secreción de péptidos, para lo cual se infectaron los macrófagos con la cepa *pho P* de *S. typhimurium* (que no sobrevive dentro de los fagosomas pues posee una mutación en el gene *pho P*); a su vez se realizaron cocultivos en presencia de la bacteria muerta por calor. Los resultados de la Tabla 1 indican que el aumento en moléculas de clase I de las RMA-S cocultivadas con macrófagos infectados con *pho P* es similar al aumento que presentan las RMA-S cocultivadas con macrófagos no infectados así como a las provenientes del cocultivo con la bacteria muerta, todas ellas presentan una media de fluorescencia (MFC) alrededor de 160; a diferencia de las RMA-S cocultivadas con macrófagos infectados con *S. typhimurium* LT2 que presenta una MCF de 173. La participación de la infección de *Salmonella* sobre las RMA-S y la participación de proteasas séricas se descartó ya que no se observó una modificación considerable en la expresión de moléculas de clase I de las RMA-S infectadas con *S. typhimurium* LT2 (relación 1:10) ni en las RMA-S cultivadas con la bacteria muerta por calor (Tabla 1). El incremento de moléculas de clase I mostrado en estos resultados se observó en varios experimentos independientes y aunque las diferencias son pequeñas el evento es reproducible.

Cocultivos	Control (MCF)	K ^b (MCF)
RMA-S	9.29	112.44
RMA-S + LT2 MUERTA	10.40	105.31
RMA-S + LT2 VIVA	10.86	120.48
RMA-S + IC21	15.66	163.0
RMA-S + IC21 + LT2 MUERTA	17.43	166.14
RMA-S + IC21 + <i>pho P</i> VIVA	20.68	150.0
RMA-S + IC21 + LT2 VIVA	15.83	173.93

Tabla 1. La permanencia de *Salmonella* viva dentro de macrófagos favorece la secreción de péptidos. Los cocultivos e inmunofluorescencia se realizaron como se indica en los métodos. LT2: *Salmonella typhimurium* LT2, virulenta. IC21: Línea de macrófagos de haplotipo-H-2^b. *pho P*: *Salmonella typhimurium* mutada en el gene *pho P*, avirulenta. MCF: media del canal de fluorescencia.

5.3. Los macrófagos infectados con *Salmonella* secretan péptidos de *Salmonella* que se unen a moléculas clase I

Para comprobar si los péptidos secretados por los macrófagos provienen de la *Salmonella* endocitada, la infección se llevó a cabo con *S. typhimurium* LT2 marcada metabólicamente, posteriormente se cuantificó la radioactividad presente en las proteínas precipitadas con TCA provenientes del sobrenadante de cultivo y del lisado de RMA-S cocultivadas con los macrófagos infectados. Se encontró radioactividad solamente en el medio de cultivo y en las RMA-S provenientes del cocultivo con macrófagos infectados, lo cual sugiere que los péptidos secretados provienen de *Salmonella* y que son capaces de unirse a moléculas de clase I K^b (Tabla 2).

PROTEINAS PRECIPITADAS DE:	Exp 1 (cpm)	Exp 2 (cpm)
Medio de Mφ	22	nd
Medio de Mφ infectados	34827	16100
RMA-S + Mφ	28	25
RMA-S + Mφ infectados	1361	1298

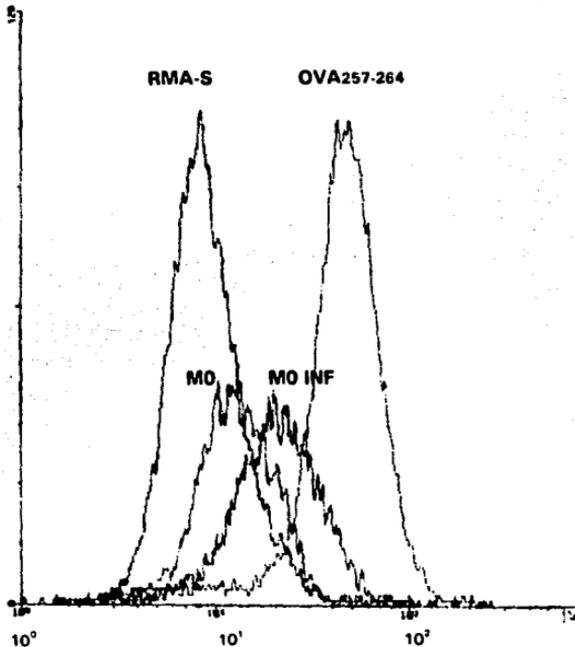
Tabla 2. Macrófagos peritoneales secretan péptidos de *Salmonella* que se unen a moléculas de clase I K^b. Macrófagos peritoneales de ratones Balb/c se infectaron con *Salmonella typhimurium* marcada con los siguientes aminoácidos trititados: ³H-Alanina, ³H-Leucina, ³H-Valina y ³H-Fenilalanina. Se realizó una precipitación ácida de las proteínas del medio de cultivo y del lisado de las células provenientes del cocultivo. Mφ: Macrófagos peritoneales de ratones Balb/c. cpm: cuentas por minuto. Exp: experimento.

5.4. Los macrófagos secretan péptidos óptimos que estabilizan moléculas de clase I vacías.

Para evaluar la capacidad de los péptidos secretados de estabilizar moléculas clase I vacías, se realizó el siguiente experimento: RMA-S provenientes del cocultivo con macrófagos infectados y no infectados (18 horas a 37°C), se lavaron dos veces para eliminar el exceso de péptido en el sobrenadante y se cultivaron nuevamente por tres horas a 37°C, al término de la incubación se midió el aumento de moléculas clase I de la superficie de las RMA-S. En la figura 3 se observa que después de este tratamiento permanecen en la superficie de RMA-S moléculas K^b conteniendo péptidos y el efecto es mas pronunciado en las RMA-S cocultivadas con macrófagos infectados. Para comparar el efecto inducido por un péptido óptimo se incluyó como testigo el péptido de OVA 257-264.

No. DE CELULAS

120



INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA

Figura 3. Los macrófagos secretan péptidos óptimos que estabilizan moléculas de clase I. RMA-S provenientes del cocultivo con macrófagos infectados y no infectados (18 horas a 37°C), se lavaron dos veces para eliminar el exceso de péptido en el sobrenadante y se cultivaron nuevamente por tres horas a 37°C , al término de la incubación se evaluaron las moléculas de clase I por inmunofluorescencia. MO: RMA-S provenientes del cocultivo con macrófagos. MO INF: RMA-S provenientes del cocultivo con macrófagos infectados con *S. typhimurium* LT2. OVA: RMA-S cultivadas con el péptido 257-264 de OVA.

5.5. La liberación de péptidos parece ser exclusiva de células fagocíticas.

Se realizaron cocultivos con diferentes líneas celulares y se observó un aumento en moléculas de clase I solamente en las RMA-S provenientes de los cocultivos con macrófagos peritoneales así como con la línea de macrófagos J774. Las RMA-S cocultivadas con la línea de fibroblastos, L929 infectada y no infectada, no presentaron ningún aumento de moléculas de clase con respecto a las RMA-S (Tabla 3).

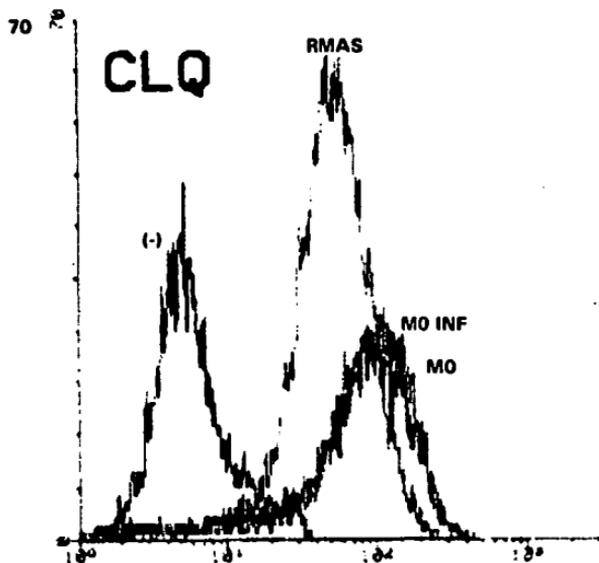
COCULTIVOS	Control (MCF)	K ^b (MCF)
RMA-S	2.28	18.04
RMA-S + L929	3.40	13.02
RMA-S + L929 Inf	3.05	14.14
RMA-S + Mφ	4.15	33.19
RMA-S + Mφ Inf	3.89	45.35
RMA-S + J774	2.95	48.20
RMA-S + J774 Inf	2.67	66.31

Tabla 3. Células no fagocíticas no secretan péptidos que se unan a moléculas de clase I K^b. Los cocultivos se realizaron con las siguientes células; Mφ: Macrófagos peritoneales de ratones Balb/c; L929: línea de fibroblastos y J774: línea de macrófagos de haplotipo H-2^d. Inf: células infectados con *S. typhimurium* LT2. MCF: media del canal de fluorescencia.

5.6. El proceso de secreción de péptidos por los macrófagos no involucra la vía endógena ni la vía exógena de procesamiento de antígeno.

Se realizaron cocultivos con macrófagos infectados fijados con formaldehído al 4% y no se observó un aumento de moléculas clase I de las RMA-S con respecto a las no cocultivadas, lo cual nos indicó que la secreción de péptidos requiere de la actividad metabólica de los macrófagos (Tabla 4) y corrobora que los péptidos no provienen del medio de cultivo. Al realizar el cocultivo con macrófagos tratados con cloroquina se observó que en las RMA-S provenientes de estos cocultivos aumentan sus moléculas de clase I de igual manera que las RMA-S cocultivadas con los macrófagos no tratados. Este evento nos indicó que la generación de los péptidos que se secretan no involucra la actividad de enzimas de los compartimientos endosómicos/ lisosómicos (Tabla 4 y Figura 4).

No. DE CELULAS



INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA

Figura 4. La secreción de péptidos no involucra la actividad de enzimas de los compartimientos endosomales/lisosomales. Las RMA-S se cocultivaron con macrófagos infectados y no infectados tratados con cloroquina 45 microM, 30 minutos antes de la infección y por 18 horas durante el cocultivo. MO: RMA-S provenientes del cocultivo con macrófagos IC21. MO INF: RMA-S provenientes del cocultivo con macrófagos IC21 infectados con *Salmonella typhimurium* LT2.

COCULTIVOS	Control (MCF)	K ^b (MCF)
RMA-S	2.28	18.04
RMA-S + M ϕ	3.40	27.98
RMA-S + M ϕ Inf	3.05	29.90
RMA-S + M ϕ + Fij	4.15	14.94
RMA-S + M ϕ Inf + Clq	3.89	32.70

Tabla 4. La secreción de los péptidos capaces de unirse a moléculas K^b requiere de la actividad metabólica de los macrófagos y los endosomas no participan en este proceso. M ϕ : macrófagos de peritoneo de ratones Balb/c. Inf: macrófagos infectados con *Salmonella typhimurium* LT2. Fij: los cocultivos se realizaron con macrófagos infectados y fijados con formaldehído al 4%. Clq: los macrófagos se trataron con cloroquina 45 μ M, 30 minutos antes de la infección y por 18 horas durante el cocultivo con RMA-S. MCF: media del canal de fluorescencia.

La participación de la vía endógena se puede descartar debido a que BFA (inhibidor de la exocitosis) no afecta el fenómeno de secreción de péptidos por macrófagos infectados o no infectados. Podemos ver en la figura 5 que la expresión de K^b en RMA-S es similar cuando estas provienen del cocultivo con macrófagos infectadas tratados o no con BFA (Figura 5 y Tabla 1).

La efectividad de la BFA se evaluó sobre células normales RMA e IC21, estas últimas activadas con IFN- γ , y en ambas líneas celulares la expresión de moléculas de clase I K^b disminuye cuando se tratan con BFA por 18 horas (Tabla 5).

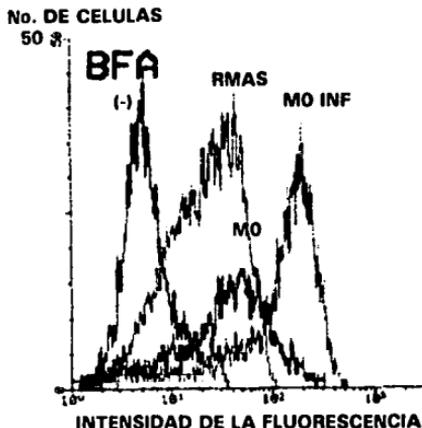


Figura 5. La secreción de péptidos por macrófagos infectados no involucra a la vía endógena. Macrófagos infectados y no infectados se cocultivaron por 18 horas con RMA-S en presencia de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de brefeldina A (BFA), posteriormente se cuantificaron por inmunofluorescencia indirecta las moléculas de clase I. RMA-S: Timoma de haplotipo H-2^d deficiente en TAP-2. MO: RMA-S cocultivadas con macrófagos IC21. MO INF: RMA-S cocultivadas con macrófagos infectados con *Salmonella typhimurium* LT2.

También se evaluó la expresión de moléculas de clase I K^b de los macrófagos IC21 utilizados en los cocultivos y se observó que la infección con *Salmonella* mantiene el nivel de expresión de moléculas K^b cuando el cultivo se realiza en presencia de BFA a diferencia de los macrófagos no infectados cuya expresión de moléculas de clase I disminuye (Tabla 6). Estos resultados sugieren que los péptidos secretados también estabilizan moléculas vacías de los macrófagos.

Célula	Control (MCF)	K ^b (MCF)
RMA	7.72	751.77
RMA + BFA	8.35	295.91
IC21	38.32	126.49
IC21 + BFA	25.52	111.75
IC21 + IFN	32.21	359.08
IC21 + IFN + BFA	27.55	248.00

Tabla 5. Efecto de la brefeldina A sobre la expresión de moléculas K^b en células normales. RMA: Timoma de haplotipo H-2^d. IC21: línea de macrófagos de haplotipo H-2^d. BFA: las células se cultivaron con 1 µg/ml de brefeldina A durante 18 horas. IFN: los macrófagos se trataron con 20 u/ml de IFN-γ, 48 horas antes del experimento. MCF: Media del canal de fluorescencia.

Célula	Control (MCF)	K ^b (MCF)
IC21	32.21	359.06
IC21 + LT2	39.17	324.80
IC21 + LT2 muerta*	30.81	336.10
IC21 + BFA	27.55	248.00
IC21 + LT2 + bfa	34.17	364.67

Tabla 6. Péptidos de *Salmonella* secretados por macrófagos infectados se unen a moléculas de clase I vacías de los macrófagos. IC21: línea de macrófagos de haplotipo H-2^d. LT2: *S. typhimurium* LT2 BFA: Los cocultivos realizaron en presencia de 1 µg/ml de brefeldina A * Bacteria muerta por calor (90°C, 20 minutos). MCF: media del canal de fluorescencia.

5.7. Los péptidos de *Salmonella* secretados por macrófagos infectados son reconocidos por linfocitos citotóxicos

Las células que provienen de los cocultivos con macrófagos infectados y no infectados se emplearon como células blanco en un ensayo de citotoxicidad, para lo cual se cocultivó el mastocitoma P815 con la línea de macrófagos IC21 infectada con

Salmonella typhimurium LT2. Los linfocitos provenientes de ratones Balb/c infectados con dosis subletales de *Salmonella typhimurium* LT2 lisaron de manera específica a las PB15 provenientes del cocultivo con los macrófagos IC21 infectados, en la figura 6 se observa un 27% de lisis máxima hacia las células cocultivadas con macrófagos infectados en comparación con un 2.3% hacia las células cocultivadas con macrófagos no infectados.

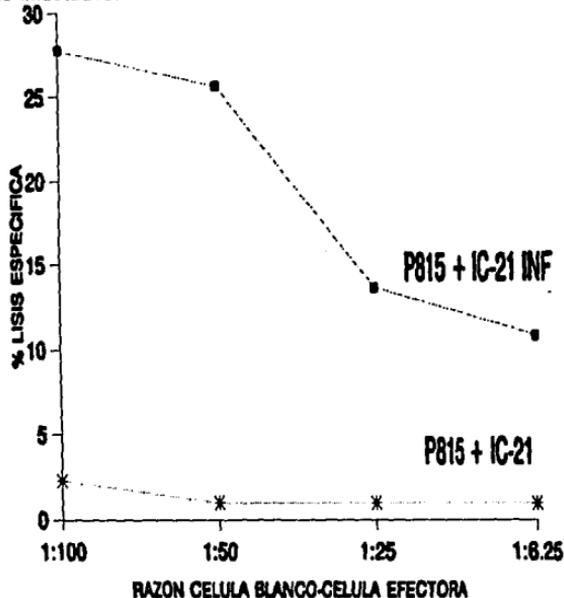


Figura 6. Los péptidos de *Salmonella* secretados por macrófagos infectados son reconocidos por linfocitos T citotóxicos. Esplenocitos de los ratones Balb/c inmunizados con *Salmonella* se reestimularon *in vitro* con el hidrolizado de proteínas de *Salmonella*, al quinto día las células vivas se utilizaron en diluciones seriadas para el ensayo de citotoxicidad. Las células blanco utilizadas fueron PB15 marcadas con Cr^{51} durante dos horas, las cuales previamente fueron cocultivadas 18 horas con la línea de macrófagos IC21 infectada con *Salmonella*. Los resultados se expresaron en % lisis = $(\text{liberación espontánea}) / (\text{liberación máxima}) \cdot (\text{liberación espontánea}) \times 100$. IC21: macrófagos no infectados, IC21 INF: macrófagos infectados con *Salmonella typhimurium* LT2.

5.8. Los macrófagos secretan péptidos inmunogénicos de proteínas solubles.

Para evaluar si los péptidos secretados provenientes de proteínas solubles son reconocidos por linfocitos T específicos, se realizaron cocultivos de macrófagos de peritoneo de ratón con RMA en presencia de diferentes concentraciones de OVA. Posteriormente las RMA se utilizaron para activar al hibridoma RF3370 que reconoce al péptido 257-264 OVA en el contexto de moléculas K^b . Se observó activación específica de RF3370 de manera dosis dependiente de la OVA presente en el cocultivo (Figura 7). Por otra parte la generación del péptido 257-264 OVA no es alelo específica ya que los macrófagos son de haplotipo "d" y las células RMA son de haplotipo "b".

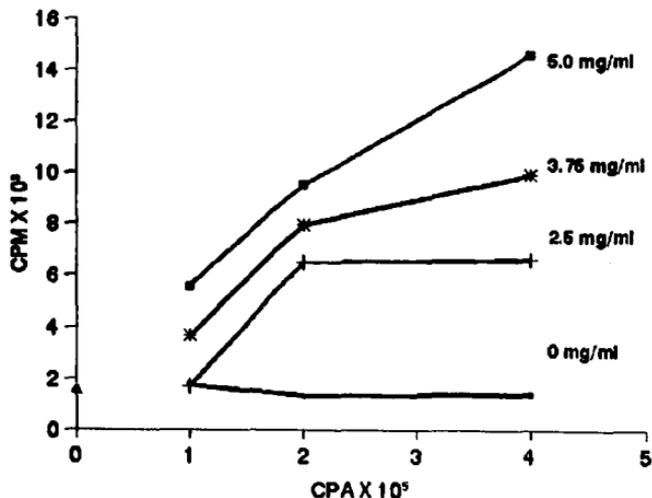


Figura 7. Generación del péptido 257-264 de OVA. RMA se cocultivaron con macrófagos de exudado peritoneal de ratones Balb/c en RPMI-10% con concentraciones crecientes de ovalbúmina (Calbiochem) durante 18 horas. Posteriormente estas células se utilizaron para estimular a 1×10^5 células del hibridoma RF3370. A las 24 horas se colectaron $100 \mu\text{l}$ del sobrenadante de cultivo y se cuantificó su contenido de IL2 por bioensayo con CTL2 (1). cpm: cuentas por minuto, cpa: células presentadoras de antígeno.

VI. DISCUSION

La bacteria *Salmonella* permanece dentro de vesículas fagocíticas y no se ha reportado que la bacteria o productos de la misma ingresen al citosol de la célula infectada. Sin embargo existen evidencias de que ratones vacunados con cepas de *Salmonella* modificadas genéticamente que expresan antígenos de parásitos y otras bacterias, inducen respuesta citotóxica específica de linfocitos CDB⁺ contra los antígenos acarreados por esta cepa (72, 73, 74). El mecanismo por el cual se procesan y presentan estos antígenos se desconoce así como la participación de los linfocitos CDB⁺ en la protección contra la infección por *Salmonella*.

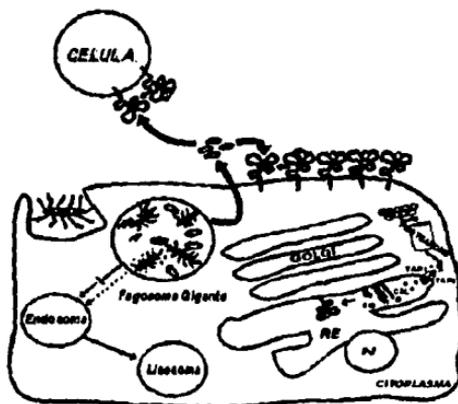


Figura 8. Modelo del procesamiento y la presentación de antígenos de *Salmonella* por moléculas de clase I del CPH. Macrófagos infectados secretan péptidos que se unen a moléculas vacías del macrófago y de células vecinas no infectadas. N: núcleo, RE:retículo endoplásmico, CAL: calnexina, M: cadena pesada.

La propuesta de este trabajo para explicar el mecanismo por el cual los macrófagos procesan y presentan antígenos de *Salmonella* consiste en que los macrófagos degraden a la bacteria dentro de fagosomas y secreten los péptidos

generados al exterior para que estos se unan a moléculas de clase I vacías de la superficie de la célula secretora y de células vecinas (Figura 8). Los resultados obtenidos sugieren que la secreción de péptidos es una actividad permanente y exclusiva de los macrófagos activados. Cuando han endocitado una gran cantidad de material, la secreción de péptidos aumenta. El mecanismo de la secreción también se observó cuando los macrófagos endocitan altas concentraciones de proteína soluble como la OVA. Se ha reportado que células ováricas de hamster chino (CHO), no fagocíticas, infectadas con *Salmonella aroA* recombinante acarreadora de la nucleoproteína del virus de la influenza tipo A, no son reconocidas por linfocitos T citotóxicos específicos contra epitopos de la nucleoproteína; lo cual sugiere que dentro de los macrófagos *Salmonella* es degradada y sensible a la acción de los linfocitos T citotóxicos, mientras que al infectar otro tipo celular evade el ataque de los linfocitos T citotóxicos.

Cabe mencionar que *Salmonella* provoca su entrada al macrófago, primero al contacto con éste induce la formación de "ruffles" así como macropinocitosis generalizada de manera que los macrófagos endocitan gran cantidad de líquido junto con *Salmonella*. Dentro de los macrófagos se localiza en fagosomas gigantes o macropinosomas donde activa sus genes de virulencia, provocando un retraso y control de la disminución del pH endosómico y creando con esto un ambiente propicio para multiplicarse (3). Las bacterias dentro de las vesículas endocíticas contubirían con gran cantidad de antígeno disponible a ser degradado dentro del compartimiento y de esta manera aumentarían los péptidos a secretar. Esto se ve reflejado en los resultados obtenidos al infectar a los macrófagos con la cepa *pho P* de *S. typhimurium* (que no sobrevive dentro de fagosomas pues posee una mutación en el gene *pho P*) así como en los cocultivos realizados en presencia de la bacteria muerta por calor; en los que no se observó un aumento en la secreción de péptidos a diferencia de cuando los macrófagos se infectaron con la cepa virulenta. Dentro del mismo contexto, la activación de macrófagos por el IFN- γ favorece el evento de la secreción de péptidos, lo cual tal vez se deba a un aumento en la fagocitosis que de igual manera favorecería la ingestión de altas concentraciones de antígeno.

En cuanto al procesamiento de *Salmonella*, se plantea que probablemente suceda en una vesícula de pH neutro o de ambiente similar al citosol que posea proteasas diferentes a las lisosomales ya que la secreción de péptidos por los macrófagos no se inhibe con el tratamiento con cloroquina. Debe tratarse de una vesícula terminal que posea enzimas preformadas cuyo movimiento al exterior no se ve afectado por BFA. Ello se ve reforzado por el hecho de que este mecanismo también genera el epitopo 257-264 de OVA, determinante antigénico que se produce cuando la OVA se encuentra en el citosol de la célula.

Por otra parte no se puede descartar la posibilidad de un proceso de proteólisis extracelular ya que los macrófagos secretan varias proteasas que actúan a pH neutro como la elastasa (75), la colagenasa (76), el activador del plasminógeno (77), la angiotensina convertasa, etc (78). Pero si se descarta el efecto de proteasas provenientes del suero (79) ya que RMA-S cultivada con la bacteria muerta por calor

no aumenta su expresión de moléculas de clase I.

Los péptidos secretados son reconocidos por linfocitos T citotóxicos provenientes de ratones infectados con *Salmonella typhimurium*, lo cual indica que estos péptidos se generan en la infección natural y activan clones de linfocitos T citotóxicos específicos contra la bacteria, de manera que son capaces de generar péptidos antigénicos que son reconocidos por linfocitos T CD8⁺.

El hecho de que el macrófago presente péptidos de *Salmonella* por moléculas de clase I y por clase II permitiría la activación de las dos poblaciones de linfocitos, los CD8⁺ y CD4⁺, para que participaran en la respuesta protectora contra la bacteria. Los linfocitos CD4⁺ Th1 activados producen IFN- γ , el cual al activar macrófagos favorecería la degradación de la bacteria dentro de los fagosomas, y de la misma manera los linfocitos CD4⁺ Th2 activados producen interleucinas que generarían la respuesta de anticuerpos específicos. Por su parte los linfocitos T CD8⁺ al lisar los macrófagos infectados dejarían accesible a la bacteria para la acción de los anticuerpos y el complemento.

La secreción de péptidos provenientes de antígenos que son endocitados permitiría la activación de linfocitos CD8⁺ por antígenos que no tienen acceso al citosol como sería el caso de proteínas solubles, varios parásitos y bacterias intracelulares como *Toxoplasma* (80), *Plasmodium* (81), *Chlamydia* (82) y *Mycobacterium*.

La función natural de las moléculas vacías se desconoce y el hecho de que puedan presentar péptidos de antígenos endocitados tendría relevancia en la generación del repertorio de linfocitos T CD8⁺, porque permitiría la presentación por moléculas de clase I de péptidos provenientes de proteínas de secreción como las proteínas del suero ó de matriz extracelular. En el timo durante la ontogenia de los linfocitos T, muchas células inmaduras mueren por apoptosis de manera que los antígenos celulares están presentes en altas concentraciones y accesibles a ser endocitados por los macrófagos y células dendríticas tímicas, las cuales podrían secretar péptidos capaces de unirse a moléculas de clase I vacías de células epiteliales, macrófagos y células dendríticas para participar en la selección de linfocitos T CD8⁺. En el futuro se pretende caracterizar los péptidos secretados para compararlos con los péptidos presentados por la vía endógena convencional.

VII. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Pegues DA, Miller SI. Salmonellosis, including typhoid fever. *Current Opinion in Infectious Diseases* 1994; 7:616-623.
- 2.- a) Pace J, Hayman MJ, Galán JE. Signal Transduction and Invasion of Epithelial cells by *Salmonella typhimurium*. *Cell* 1993; 72:505-514.
- b) Galán JE. Interactions of bacteria with non-phagoxytic cells. *Curr Op Immunol* 1994; 6:590-595.
- 3.- a) Alpuche-Aranda CM, Racoosin EL, Swanson JA, Miller SI. *Salmonella* stimulate macrophage macropinocytosis and persist within spacious phagosomes. *J Exp Med* 1994; 179:601-608.
- b) Alpuche-Aranda CM, Swanson JA, Loomis WP, Miller SI. *Salmonella typhimurium* activates virulence gene transcription within acidified macrophage phagosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:10079-10083.
- 4.- a) Buchmeier NA, Heffron F. Inhibition of macrophage-phagosome-lysosome fusion by *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* 1991, 59:2232-2238.
- 5.- Buchmeier NA, Lipps CJ, SO MYH, Heffron F. Recombination-deficient mutants of *Salmonella typhimurium* are avirulent and sensitive to the oxidative burst of macrophages. *Molecular Microbiology* 1993; 7(6):933-936.
- 6.- a) Boman HG. Antibacterial peptides: key components needed in immunity. *Cell* 1991; 65:205-207.
- b) Groisman EA, Parra-López C, Salcedo M, Lipps CJ, Heffron F. Resistance to host antimicrobial peptides is necessary for *Salmonella* virulence. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:11939-119343.
- 7.- Fields PI, Swanson RV, Haidaris CG, Heffron F. Mutants of *Salmonella typhimurium* that cannot survive within the macrophages are avirulent. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83:5189-5193.
- 8.- Swanson RN, O'Brien AD. Genetic control of the innate resistance of mice to *Salmonella typhimurium*: Ity gene is expressed in vivo by 24 hours after infection. *J Immunol* 1983; 131(6):3014-3020.

9.- a) Lissner C, Swanson RN, O'Brien AD. Genetic control of the innate resistance of mice to *Salmonella typhimurium*: expression of the I γ gene in peritoneal and splenic macrophages isolated in vitro. *J Immunol* 1983; 131(6):3006-30013.

b) Benjamin WH, Hall P, Roberts SJ, Briles DE. The primary effect of the I γ locus is on the rate of growth of *Salmonella typhimurium* that are relatively protected from killing. *J Immunol* 1990; 144:3143-3151.

c) Skamene E, Pietrangeli CE. Genetics of the immune response to infectious pathogens. *Curr Op Immunol* 1991; 3:511-517.

10.- Vidal SM, Mallo D, Vocan K, Skamene E, Gros P. Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for Bcg. *Cell* 1993; 73:469-485.

11.- a) Mäkelä PH, Hovi M, Saxén H, Valtonen M, Valtonen V. *Salmonella*, complement and mouse macrophages. *Immunol Letters* 1988; 19:217-222.

12.- Isibasi A, Ortiz V, Vargas M, Paniagua J, González C, Moreno J, Kumate J. Protection against *Salmonella typhi* infection in mice after immunization with outer membrane proteins isolated from *Salmonella typhi* 9,12,d,Vi. *Infec Immun* 1988; 56:2953-2959.

13.- a) Kagaya K, Watanabe K, Fukazawa Y. Capacity of recombinant gamma interferon to activate macrophages for *Salmonella*-killing activity. *Infect Immun* 1989; 57(2):609-615.

b) Bancroft GJ, Schreiber RD, Bosma GC, Bosma MJ, Unanue ER. A T cell-independent mechanism of macrophage activation by interferon

14.- a) Kaufmann SHE. Role of T-cell subsets in bacterial infections. *Curr Op Immunol* 1991; 3:465-470.

b) Nauciel C. Role of CD4+ and T-independent mechanisms in acquired resistance to *Salmonella typhimurium* infection. *J Immunol* 1990; 145:1265-1269.

15.- Morrison LA, Lukacher AE, Fraciale VL, Fan DP, Braciale TJ. Differences in antigen presentation to MHC class I- and class II-restricted influenza virus-specific cytolytic T lymphocyte clones. *J Exp Med* 1986; 163:903-921.

16.- Yewdell JW, Bennink, JR. The binary logic of antigen processing and presentation to T cells. *Cell* 1990; 62:203-206.

17.- Michalek MT, Grant EP, Gramm C, Goldberg AL, Rock KL. A role for the ubiquitin-dependent proteolytic pathway in MHC class I-restricted antigen presentation. *Nature* 1993; 363:552-554.

18.- Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system for protein degradation. *Annu Rev Biochem* 1992; 61:761-807.

19.- Ortiz-Navarrete V, Seelig A, Gernold M, Frentzel S, Kloetzel PM, Hämmerling GJ. Subunit of "20S" proteasome (multicatalytic proteinase) encoded by the major histocompatibility complex. *Nature* 1991; 353:662-664.

20.- Martinez CK, Monaco JJ. Homology of proteasome subunits to a major histocompatibility complex-linked LMP gene. *Nature* 1991; 353:664-667.

21.- Kelly A, Powis SH, Glynne RRE, Beck S, Trowsdale J. Second proteasome-related gene in the human MHC class II region. *Nature* 1991; 353:667-668.

22.- Gaczynska M, Rock KL, Goldberg AL. Gamma-interferon and expression of MHC genes regulate peptide hydrolysis by proteasomes. *Nature* 1993; 365:264-267.

23.- Akiyama K, Yokota K, Kagawa S, Shimbara N, Tamura T, Akioka H, Nothwang HG, Noda Chiseko, Tanaka K, Ichihara A. c-DNA cloning and interferon gamma down regulation of proteasomal subunits X and Y. *Science* 1994; 265:1231-1234.

24.- Driscoll J, Brown MG, Finlay D, Monaco JJ. MHC-linked LMP gene products specifically alter peptidase activities of proteasome. *Nature* 1993; 365:262-264.

25.- Fehling HJ, Swat W, Laplace C, Kühn R, Rajewsky K, Müller U, von Boehmer H. MHC Class I Expression in mice lacking the proteasome subunit LMP7. *Science* 1994; 265:1234-1237.

26.- Momburg F., Ortiz-Navarrete V., Neefjes J., Goulmy E., van de Wal Y., Spits H., Powis S.J., Butchers G.W., Howard J.C., Walden P., Hämmerling G.J. Proteasome subunits encoded by the major

histocompatibility complex are not essential for antigen presentation. *Nature* 1992; 360:174-177.

27.- Kleijmeer MJ, Kelly A, Geuze HJ, Slot JW, Townsend A, Trowsdale J. Location of MHC-encoded transporters in the endoplasmic reticulum and cis-Golgi. *Nature* 1992; 357:342-344.

28.- Lóvy F, Gabathuler R, Larsson R, Kvist S. ATP is required for *in vitro* assembly of MHC class I antigens but not for transfer of peptides across the ER membrane. *Cell* 1991; 67:265-274.

29.- Neffjes JJ, Momburg F, Hämmerling GJ. Selective and ATP-dependent translocation of peptides by the MHC-encoded transporter. *Science* 1993; 261:769-771.

30.- Monaco JJ, Cho S, Attaya M. Transport protein genes in the murine MHC: possible implications for antigen processing. *Science* 1990; 250:1723-1726.

31.- Deverson EV, Gow IR, Coadwell WJ, Monaco JJ, Butcher GW, Howard JC. MHC class II region encoding proteins related to the multidrug resistance family of transmembrane transporters. *Nature* 1990; 348:738-741.

32.- Trowsdale J, Hanson I, Mockridge I, Beck S, Townsend A, Kelly A. Sequences encoded in the class II region of the MHC related to the "ABC" superfamily of transporters. *Nature* 1990; 348:741-744.

33.- Spies T, Bresnahan M, Braham S, Arnold D, Blank G, Mellins E, Picus D, DeMars R. A gene in the human major histocompatibility complex class II region controlling the class I antigen presentation pathway. *Nature* 1990; 348:744-747.

34.- Powis SJ, Townsend AR, Deverson EV, Bastin J, Butcher GW, Howard JC. Restoration of antigen presentation to the mutant cell line RMA-S by an MHC-linked transporter. *Nature* 1991; 354:528-531.

35.- a) Parham P. Flying the first class flag. *Nature* 1992; 357:193-194.

b) Powis SJ, Deverson EV, Coadwell WJ, Ciruela A, Huskinsson NS, Smith H, Butcher GW, Howard JC. Effect of polymorphism of an MHC linked transporter on the peptides assembled in a class-I molecule. *Nature* 1992; 357:211-215.

36.- Colonna M, Bresnahan M, Bahram S, Strominger JL, Spies T. Allelic variants of the human putative peptide transporter involved

in antigen processing. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:3932-3936.

37.- a) Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennet WS, Strominger JL, Wiley D.C. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 1987; 329:506-512.

b) Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennet WS, Strominger JL, Wiley D.C. The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature* 1987; 329:512-518.

c) Garrett TPJ, Saper MA, Bjorkman PJ, Strominger JL, Wiley DC. Specificity Pockets for the side chains of peptide antigens in-HLA-Aw68. *Nature* 1989; 324:692-696.

d) Madden DR, Gorga JC, Strominger JL, Wiley DC. The structure of HLA-B27 reveals nonamer self-peptides bound in an extended conformation. *Nature* 1991; 353:321-325.

e) Madden DR, Gorga JC, Strominger JL, Wiley DC. The three-dimensional structure of HLA-B27 at 2.1 Å resolution suggests a general mechanism for tight peptide binding to MHC. *Cell* 1992; 70:1035-1048.

38.- a) Degen E, Williams DB. Participation of a novel 88-kD protein in the biogenesis of murine class I histocompatibility molecules. *J Cell Biol* 1991; 112:1099-1115.

b) Hochstenbach F, David V, Watkins S, Brenner MB. Endoplasmic reticulum resident protein of 90 kilodaltons associates with the T-cell and B-cell antigen receptors and major histocompatibility complex antigens during their assembly. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:4734-4738.

c) Degen E, Cohen-Doyle MF, Williams DB. Efficient Dissociation of the p88 chaperone from major histocompatibility complex class I molecules requires both beta₂-microglobulin and peptide. *J Exp Med* 1992; 175:1653-1661.

39.- a) Ortmann B, Androlewicz MJ, Cresswell P. MHC class I/beta₂-microglobulin complexes associate with TAP transporters before peptide binding. *Nature* 1994; 368:864-867.

b) Suh W-K, Cohen Doyle MF, Fruh K, Wang K, Peterson PA, Williams DB. Interaction of MHC class I molecules with the transporter associated with antigen processing. *Science* 1994; 264:1322-1326.

c) Androlewicz MJ, Ortmann B, van Endert PM., Spies T, Cresswell P. Characteristics of peptide and major histocompatibility complex

class I/beta₂ microglobulin binding to the transporters associated with antigen processing (TAP1 and TAP2). *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:12716-12720.

40.- a) Williams DB, Boriello F, Zeff RA, Nathenson SG. Intracellular transport of class I histocompatibility molecules. *J Biol Chem* 1988; 263:4549,4560.

b) Hsu VW, Yuan LC, Nuchtern JG, Lippincott-Schwartz, Hammerling GJ, Klausner RD. A recycling pathway between the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus for retention of unassembled MHC class I molecules. *Nature* 1991; 352:441-444.

41.- a) Falk K, Rötzschke O, Rammensee HG. Cellular peptide composition governed by major histocompatibility complex class I molecules. *Nature* 1990; 348:248-251.

b) Rötzschke O, Falk K, Deres K, Schild H, Norda M, Metzger J, Jung G, Rammensee. Isolation and analysis of naturally processed viral peptides as recognized by cytotoxic T cells. *Nature* 1990; 348:252-254.

c) Van Bleek GM, Nathenson SG. Isolation of an endogenously processed immunodominant viral peptide from the class I H-2K^b molecule. *Nature* 1990; 348:213-216.

d) Falk K, Rötzschke O, Stevanovic S, Jung G, Rammensee HG. -Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* 1991; 351:290-296.

e) Jardetzky TS, Lane WS, Robinson R, Madden DR, Wiley DC. Identification of self peptides bound to purified HLA-B27. *Nature* 1991; 353:326-329.

42.- a) Townsend A, Öhlén C, Bastin J, Ljunggren HG, Foster L, Kärre K. Association of class I major histocompatibility heavy and light chains induced by viral peptides. *Nature* 1989; 340:443-448.

b) Cerundolo V., Alejandro J, Anderson K, Lamb C, Cresswell P, McMichael A, Gotch F, Townsend A. Presentation of viral antigen controlled by a gene in the major histocompatibility complex. *Nature* 1990; 345:449-452.

c) Elliot T, Cerundolo V, Elvin J, Townsend A. Peptide-induced conformational change of the class I heavy chain. *Nature* 1991; 351:401-406.

d) Lie WR, Nyers NB, Gorka J, Rubocki RJ, Connolly JM, Hansens TH. Peptide ligand-induced conformational and surface expression of the I^d class I MHC molecule. *Nature* 1990; 344:439-441.

e) Townsend A., Elliot T, Cerundolo V, Foster L, Baber B, Tse A.

Assembly of MHC class I molecules analyzed in vitro. *Cell* 1990; 62:285-295.

f) Parham P. Peptide feeding and cellular cookery. *Nature* 1990; 346:793-795.

g) Kvist S, Hamann U. A nucleoprotein peptide of influenza A virus stimulates assembly of HLA-B27 class I heavy chains and beta₂-microglobulin translated in vitro. *Nature* 1990; 348:446-448.

h) Ljunggren H-G, Stam NJ, Öhlén C, Neefjes JJ, Höglund P, Heemels MT, Bastin J, Shumacher TNM, Townsend A, Kärre K, Ploegh HL. Empty MHC class I molecules come out in the cold. *Nature* 1990; 346:476-480.

i) Ortiz-Navarrete V, Hämmerling GJ. Surface appearance and instability of empty H-2 class I molecules under physiological conditions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:3594-3597.

j) Rock KL, Gamble S, Rothstein L, Gramm C, Benacerraf B. Dissociation of Beta₂-microglobulin leads to the accumulation of a substantial pool of inactive class I MHC heavy chains on the cell surface. *Cell* 1991; 65:511-520.

k) Benjamin RJ, Madrigal A, Parham P. Peptide binding to empty-HLA-B27 molecules of viable human cells. *Nature* 1991; 351:74-77.

43.- a) Neefjes JJ, Stollorz V, Peters PJ, Geuze HJ, Ploegh HL. The biosynthetic pathway of MHC class II but not class I molecules intersects the endocytic route. *Cell* 1990; 61:171-183.

b) Peters PJ, Neefjes JJ, Oorschot V, Ploegh HL, Geuze HJ. Segregation of MHC class II molecules from MHC class I molecules in the Golgi complex for transport to lysosomal compartments. *Nature* 1991; 349:669-676.

c) Harding CV, Unanue ER, Slot JW, Schwartz AL, Geuze HJ, Funtional and ultrastructural evidence for intracellular formation of major histocompatibility complex class II-peptide complex during antigen processing. *Proc Natl Acad Sci Usa* 1990; 87:5553-5557.

44.- Ludwig T, Griffiths G, Hoflack B. Distribution of newly synthesized lysosomal enzymes in the endocytic pathway of normal rat kidney cells. *J Cell Biol* 1991; 115:1561-1572.

45.- Neefjes JJ, Ploegh HL. Inhibition of endosomal proteolytic activity by leupeptin blocks surface expression of MHC class II molecules and their conversion to SDS resistance alpha beta heterodimers in endosomes. *EMBO J* 1992; 11:411-416.

46.- Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Strominger JL, Wiley DC. Three-dimensional structure of the human

class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* 1993; 364:33-39.

47.- Bjorkman PJ., Burmeister WP. Structures of two classes of MHC molecules elucidated: crucial differences and similarities; *Current Opinion in Structural Biology* 1994; 4:852-856.

48.- a) Koch N, Lipp J, Pessara U, Schenck K, Wraight Ch, Dobberstein B. MHC class II invariant chains in antigen processing and presentation. *TIBS* 1989; 14:383-386.

b) Hämmerling GJ, Moreno J. The function of the invariant chain in antigen presentation by MHC class II molecules. *Immunology Today* 1990; 11:337-340.

c) Bakke O, Dobberstein B. MHC class II-associated invariant chain contains a sorting signal for endosomal compartments. *Cell* 1990; 63:707-716.

d) Lotteau V, Teyton L, Pelerauz A, Nilsson T, Katlsson L, Schmid SL, Quaranta V, Peterson PA. Intracellular transport of class II MHC molecules directed by invariant chain. *Nature* 1990; 348:600-605.

e) Teyton L, O'Sullivan D, Dickson PW, Lotteau V, Sette A, Fink P, Peterson PA. Invariant chain distinguishes between the exogenous and endogenous antigen presentation pathways. *Nature* 1990; 348:39-44.

f) Romagnoli P, Layet C, Yewdell J, Bakke O, Germain RN. Relationship between invariant chain expression and MHC class II transport into early and late endocytic compartments. *J Exp Med* 1993; 177:583-596.

49.- a) Roche PA, Cresswell P. Invariant chain association with HLA-DR molecules inhibits immunogenic peptide binding. *Nature* 1990; 345:615-618.

b) Roche PA, Cresswell P. Proteolysis of the class II-associated invariant chain generates a peptide binding site in intracellular HLA-DR molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:3150-3154.

c) Sadegh-Nasseri S, Germain RN. A role for peptide in determining MHC class II structure. *Nature* 1991; 353:167-170.

d) Bonnerot Ch, Marks MS, Cosson P, Robertson EJ, Bikoff EK, Germain RN, Bonifacino JS. Association with BiP and aggregation of class II MHC molecules synthesized in the absence of invariant chain. *EMBO Journal* 1994; 13:934-944.

50.- a) Sanderson F, Kleijmeer MJ, Kelly A, Verwoerd D, Tulp A, Neefjes JJ, Geuze HJ, Trowsdale J. Accumulation of HLA-DM, a regulator of antigen presentation, in MHC class II compartments. *Science* 1994; 266:1566-1569.

b) Karlsson L, Pélérauz A, Lindstedt R, Lilljedahl M, Peterson PA. Reconstitution of an Operational MHC class II compartment in nonantigen-presenting cells. *Science* 1994; 266:1569-1573.

51.- Staerz UD, Karasuyama H, Garner AM. Cytotoxic T lymphocytes against a soluble protein. *Nature* 1987; 329:449-451.

52.- a) Carbone FR, Bevan MJ. Class I restricted processing and presentation of exogenous cell-associated antigen in vivo. *J Exp Med* 1990; 171:377-387.

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

53.- Rock KL, Gamble S, Rothstein L. Presentation of exogenous antigen with class I major histocompatibility complex molecules. *Science* 1990; 249:918-921.

54.- a) Grant EP, Rock K. MHC class I-restricted presentation of exogenous antigen by thymic antigen presenting cells in vitro and in vivo. *J Immunol* 1992; 143:13-18.

b) Rock KL, Rothstein L, Gamble S, Fleischacker C. Characterization of antigen-presenting cells that present exogenous antigens in association with class I MHC molecules. *J Immunol* 1993; 150:438-446.

55.- Pfeifer JD, Wick MJ, Roberts RL, Findlay K, Normark SJ, Harding CV. Phagocytic processing of bacterial antigens for class I MHC presentation to T cells. *Nature* 1993; 361:359-362.

56.- Harding CV, Song R. Phagocytic processing of exogenous particulate antigens by macrophages for presentation by class I MHC molecules. *J Immunol* 1994; 153:4925-4933.

57.- Ulmer JB, Donnelly JJ, Liu MA. Presentation of an exogenous antigen by major histocompatibility complex class I molecules. *Eur J Immunol* 1994; 24:1590-1596.

58.- a) Rock KL, Gramm C, Rothstein L, Clark K, Stein R, Dick L, Hwang D, Goldberg AL. Inhibitors of the proteasome block the

degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* 1994; 78:761-771.

b) Kovacsovics-Bankowski M, Rock KL. A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science* 1995; 267:243-246.

59.- Kovacsovics-Bankowski M, Rock KL. Presentation of exogenous antigens by macrophages: analysis of major histocompatibility complex class I and II presentation and regulation by cytokines. *Eur J Immunol* 1994; 24:2421-2428.

60.- Kärre K, Ljunggren HG, Piontek G, Kiessling R. Selective rejection of H-2 deficient lymphoma variants suggests alternative immune defense strategy. *Nature* 1986; 319:675-678.

61.- Rock KL, Rothstein L, Gamble S. Generation of class I MHC-restricted TT hybridomas. *J Immunol* 1990; 143:804-811.

62.- a) Walker WS, Demus A. Antibody-dependent cytolysis of chicken erythrocytes by an in vitro-established line of mouse peritoneal macrophages. *J Immunol* 1975; 114:765-769.

63.- Koren HS., Handwerker BS, Wunderlich JR. Identification of macrophage-like characteristics in a cultured murine tumor line. *J Immunol* 1975; 114:894-897.

64.- Ralf P, Prichard J, Cohn M. Reticulum cell sarcoma: an effector cell in antibody-dependent cell mediated immunity. *J Immunol* 1975; 114:898-905.

65.- Ralph P, Nakoinz I. Lipopolysaccharides inhibit lymphosarcoma cells of bone marrow origin. *Nature (London)* 1974; 249:49-51.

66.- Gillis S, Smith K.A. Long term culture of tumour-specific cytotoxic T cells. *Nature* 1975; 268:154-156.

68.- Miller SI., Kukral A.M., Mekalanos J.J. A two component regulatory system (*phoP phoQ*) controls *Salmonella typhimurium* virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989; 86:5054-5058.

68.- Hone D.M., Harris AM., Chatfield S., Dougan G., Levine MM., Construction of genetically defined double *aro* mutants of *Salmonella typhi*. *Vaccine* 1991; 9: 810-806.

69.- a) Tarter C, Metcalf ES. Osmolarity and growth phase overlap in regulation of *Salmonella typhimurium* adherence to an invasion of human intestinal cells. *Infect Immun* 1993; 61:3084-3089.

b) Lee CA, Falkow S. The ability of *Salmonella* to enter mammalian cells is affected by bacterial growth state. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:4304-4308.

c) Buchmeier NA, Heffron F. Intracellular survival of wild-type *Salmonella typhimurium* and macrophage-sensitive mutants in diverse populations of macrophages. *Infect Immun* 1989; 57:1-7.

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

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

72.- Sadoff JC, Ballou R, Baron LS, Majarian WR, Brey RN, Hockmeyer WT, Young JF, Cryz SJ, Ou J, Lowell GH, Chulay JD. Oral *Salmonella typhimurium* vaccine expressing circumsporozoite protein protects against malaria. *Science* 1988; 240:336-338.

73.- González C, Hone D, Noriega FR, Tacket CO, Davis JR, Losonsky G, Nataro JP, Hoffman S, Malik A, Nardin E, Szein MB, Heppner DG, Foust TR, Isibasi A, Levine MM. *Salmonella typhi* vaccine strain CVD 908 expressing the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum*: strain construction and safety and immunogenicity in humans. *J Infect Dis* 1994; 169:927-931.

74.- Aggarwal A, Kumar S, Jaffe R, Hone D, Gross M, Sadoff J. Oral *Salmonella*: malaria circumsporozoite recombinants induce specific CD8+ cytotoxic T cells. *J Exp Med* 1990; 172:1083-1090.

75.- Werb Z, Gordon S. Elastase secretion by stimulated macrophages. *J Exp Med* 1975; 142:361-377.

76.- Werb Z, Gordon S. Secretion of a specific collagenase by stimulated macrophages. *J Exp Med* 1975; 142:346-360.

77.- Stopepelli MP, Corti A, Soffientini A, Cassani G, Blasi F, Assouan RK. Differentiation-enhanced binding of the amino-terminal fragment of human urokinase plasminogen activator to a specific receptor on U937 monocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82:4939-4943.

receptor on U937 monocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82:4939-4943.

78.- Nathan CF. Secretory products of macrophages. *J Clin Invest* 1987; 79:319,326.

79.- Faló L.D., Colarusso L.J., Benacerraf B., Rock K.L. Serum proteases alter the antigenicity of peptides presented by class I major histocompatibility complex molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:8347-8350.

80.- Denkers, E.Y., Gazzinielli, R.T., Hieny S., Caspar P., Sher A. Bone marrow macrophages process exogenous *Toxoplasma gondii* polipeptides for recognition by parasite-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* 1993; 150:517-526.

81.- Romero P., Maryanski J.L., Corradin G., Nussenzweig R.S., Nussenzweig V., Zavala F. Cloned cytotoxic T cells recognize an epitope in the circumsporozoite protein and protect against malaria. *Nature* 1989; 341:323-325.

82.- Starnbach M.N., Bevan M.J., Lampe M.F. Protective Cytotoxic T lymphocytes are induced during murine infection with *Chlamydia trachomatis*. *J Immunol* 1994; 153:5183-5189.