



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA

BO 1256/96

Ej. 3

LIBERACION DE PEPTIDOS AL MEDIO
EXTRACELULAR POR MACROFAGOS INFECTADOS
CON Salmonella typhimurium CAPACES DE UNIRSE
A MOLECULAS DE CLASE I DEL COMPLEJO
PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD

400282

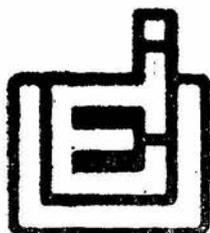


61060

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G A
P R E S E N T A :

LUIA IVONNE OCHOA REYES



TLALNEPANTLA, ESTADO DE MEXICO

JUNIO 1996



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Revisores:

Q.F.B. Gloria Luz Paniagua Contreras

M. en C. Eduardo Barrera Escorcía

M. en C. Martha O. Salcedo Alvarez

Dr. Vianney Ortiz Navarrete

M. en C. David Gonzalez



ÍNDICE

	Página
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
ANTECEDENTES.....	8
OBJETIVOS.....	11
MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	15
DISCUSIÓN.....	23
CONCLUSIONES.....	26
REFERENCIAS.....	27

RESUMEN

El TcR de los linfocitos T CD8⁺ reconocen péptidos antigénicos unidos a moléculas clase I del MHC. La gran mayoría de los péptidos que estimulan a los linfocitos CD8⁺ provienen de proteínas sintetizadas endógenamente que son degradadas dentro del citosol. Sin embargo hay algunas evidencias de que los linfocitos CD8⁺ también pueden ser inducidos por proteínas solubles o por microorganismos intracelulares, sin alcanzar la ruta de procesamiento de antígenos endógena; por lo que se planteó la posibilidad de dilucidar los mecanismos que pudieran estar involucrados en la generación de péptidos de origen exógeno, que se unan a moléculas clase I del MHC.

Se observó que macrófagos infectados con *Salmonella typhimurium* secretan péptidos capaces de unirse a moléculas clase I del MHC. En estos experimentos, el timoma RMA-S, deficiente en TAP-2 y por lo tanto con moléculas clase I inestables en la membrana citoplásmica, fué co-cultivado durante 18 horas a 37 ° C con macrófagos infectados con *Salmonella* o con macrófagos no infectados. Consecutivamente la cantidad de moléculas D^b y K^b, que son alelos de clase I, sobre las células RMA-S se midió por citometría de flujo. La cantidad de moléculas de clase I del MHC estables se vió incrementada cuando se cocultivaron con macrófagos infectados al comparar con el co-cultivo con macrófagos no infectados, las moléculas clase I de las células RMA-S también aumentaron su estabilidad al ser cocultivadas con los macrófagos peritoneales aún sin infectar por lo que es probable que se estén procesando otros péptidos de origen exógeno. El experimento de cocultivo con *Salmonella typhimurium* marcada radiactivamente mostró que el origen de los péptidos acoplados a las moléculas clase I de las RMA-S es de la bacteria procesada por el macrófago.

La capacidad de los macrófagos para secretar péptidos al medio no fué influenciada por inhibidores de la actividad endosomal pero sí requiere de células metabólicamente activas y con fenotipo fagocítico.

Las observaciones sugieren que los antígenos exógenos son capaces de inducir respuesta inmune mediada por clase I del MHC al cargar moléculas vacías con péptidos antigénicos secretados.

INTRODUCCIÓN

Generalidades sobre el procesamiento de antígenos.

El receptor del linfocito T (TCR) reconoce a los antígenos en el contexto de las moléculas de clase I o de clase II del sistema principal de histocompatibilidad (MHC). Los antígenos presentados en el contexto de moléculas clase I son péptidos que provienen de proteínas endógenas degradadas en el citosol de la célula presentadora de antígeno (APC); a este fenómeno se le denomina procesamiento de antígenos. El complejo péptido-molécula de clase I es reconocido por los linfocitos T citotóxicos CD8⁺ los cuales tienen como función lisis a la APC; esta citotoxicidad representa un mecanismo de defensa contra la replicación viral, la producción de células tumorales y los parásitos o bacterias de residencia intracelular citosólica prolongada(1,2).

Debido a que los péptidos que se presentan por moléculas de clase I provienen de proteínas sintetizadas por la APC, a esta forma de procesamiento se le conoce como vía endógena (Fig 1). Se ha propuesto que el complejo multienzimático proteasoma es el encargado de degradar a los antígenos del citosol; los péptidos que ahí se generan son translocados al lumen del retículo endoplásmico mediante la bomba formada por las subunidades proteicas transportadoras de péptidos antigénicos Tap 1 y Tap 2. Dentro del lumen del retículo endoplásmico se ensamblan los tres elementos (cadena pesada, péptido y β 2-microglobulina) que constituyen a las moléculas de clase I. Inicialmente los péptidos antigénicos se unen a la cadena pesada, posteriormente al complejo cadena pesada-péptido se le asocia la β 2-microglobulina y finalmente este complejo trimolecular es transportado a la superficie celular a través del complejo de golgi. Es importante señalar que el mecanismo descrito anteriormente es la principal fuente de péptidos de la vía endógena, sin embargo, otro sitio de generación de péptidos antigénicos lo constituye el mismo lumen del retículo endoplásmico, ya que dentro de este se lleva a cabo la degradación de proteínas con conformaciones defectuosas, así como la eliminación de los péptidos señal de las proteínas que deben seguir la vía clásica de exocitosis, por lo tanto algunos de estos péptidos también son presentados en el contexto de moléculas de clase I (1,2).

Las principales características de los péptidos que se presentan por moléculas de clase I son las siguientes: 1) los péptidos son de 8 o 9 aminoácidos, 2) dentro de sus secuencias tienen aminoácidos que les permiten anclarse al nicho de unión para péptidos de la molécula de clase I y por lo general son dos aminoácidos diferentes, 3) los aminoácidos de anclaje, también conocidos como aminoácidos concenso, se presentan en posiciones conservadas 4) los aminoácidos concenso varían según los alelos; (tabla I). Aquellos péptidos que reúnan todas las características descritas anteriormente son capaces de unirse con alta afinidad a las moléculas de clase I, por lo tanto su vida media en la superficie celular es de aproximadamente 72 horas; en cambio los péptidos que se unen con baja afinidad a las moléculas de clase I, debido a que solamente cumplen con alguna de las características mencionadas, tienen una vida media en la superficie celular de aproximadamente 15 minutos.

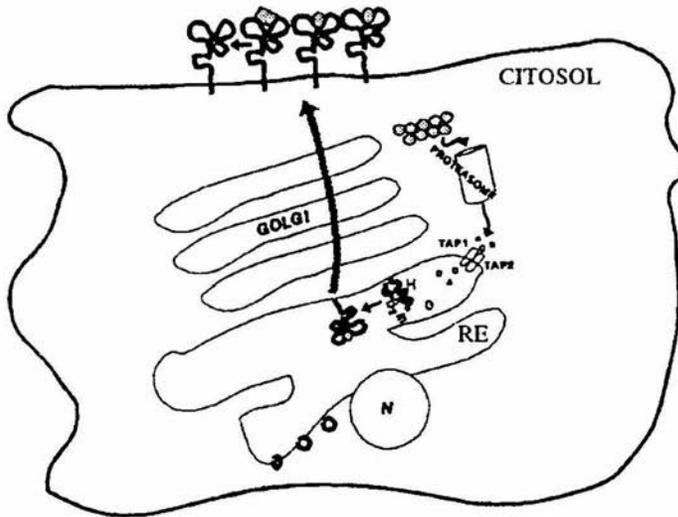


Fig. I: Representación esquemática de la vía endógena de procesamiento y presentación de antígenos por moléculas clase I del MHC. RE: retículo endoplásmico, N: núcleo celular.

ya que existen moléculas de clase I que pierden al péptido dando a las conocidas moléculas vacías que son capaces de empre y cuando estos se encuentran en altas concentraciones características de unión de alta afinidad (1).

A
-
I

		UNIÓN RELATIVA DEL RESIDUO						
		3	4	5	6	7	8	9
A2		x	x	F	x	x	M	
				Y			I	
							L	
		x	x	N	x	x	x	I
								L
								M
B27		x	x	x	x	x	x	I
								L
		x	x	x	x	x	x	V
		x	R	x	x	x	x	K

Tabla I. Características de los péptidos que se unen a moléculas de clase I del MHC, los alelos A2 y B27 son de humano, K y D son alelos de ratón (3).

En este trabajo se empleó la línea celular RMA-S la cual es un timoma murino con la peculiaridad de no poseer transporte de péptidos endógenos del citosol al lumen del retículo endoplásmico, esto se debe a una mutación en el gene que codifica para la molécula Tap 1, de manera que las moléculas clase I que logren ensamblarse habrán adquirido péptidos subóptimos que se generan dentro del lumen del retículo endoplásmico por lo que al arribar a la superficie pierden el péptido y quedan como moléculas vacías, estas son capaces de unir péptidos óptimos lo que devuelve su funcionalidad, (Fig. 2).

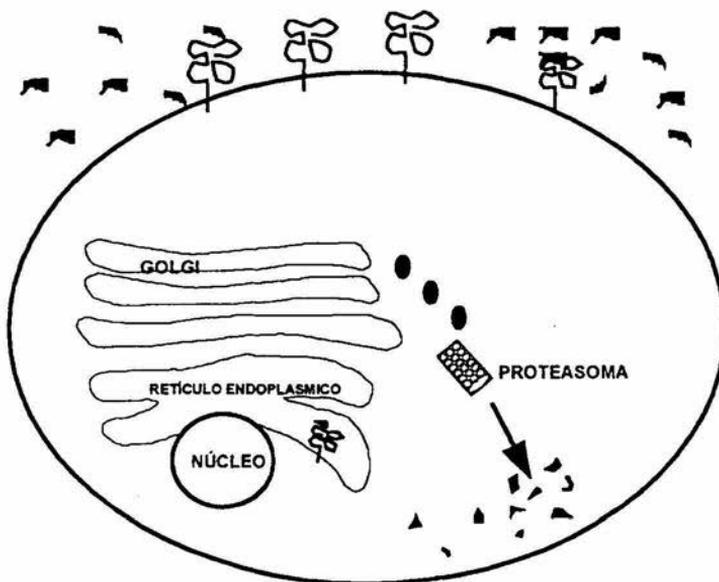


Fig. 2. Representación esquemática de la generación de moléculas de clase I del MHC ensambladas con péptidos subóptimos en la línea celular RMA-S que no posee transporte de péptidos citosólicos hacia el lumen del retículo endoplásmico.

Las moléculas de clase II presentan péptidos antigénicos a los linfocitos T cooperadores CD4+. La función de estos linfocitos es la producción de diferentes linfocinas tales como: IL-2, necesaria para la proliferación de los linfocitos T; IL-4, IL-5 e IL-10, indispensables para la diferenciación del linfocito B a célula plasmática; INF γ necesario para la activación de macrófagos (1,2).

Los determinantes antigénicos presentados por moléculas de clase II provienen de proteínas exógenas internalizadas por las APC ya sea por pinocitosis o endocitosis mediada por receptores para el caso de proteínas solubles y por fagocitosis para el caso de parásitos y bacterias, por lo tanto a los mecanismos de procesamiento de estos antígenos se le conoce como vía exógena (Fig. 3) (1,2). El procesamiento de los antígenos exógenos se lleva a cabo dentro de los endosomas y/o lisosomas, donde las proteasas catepsina D y E se encargan de generar péptidos que se unen a un sitio exclusivo formado

por la cadena α y la cadena β de las moléculas de clase II, este complejo trimolecular ya ensamblado es transportado a la superficie celular. Debido a que las moléculas de clase II son proteínas transmembranales deben ser translocadas al lumen del retículo endoplásmico por lo que algunos de los péptidos allí presentes pueden unirse a las moléculas de clase II, aunque este evento ocurre de manera muy ineficiente, ya que dentro del lumen del retículo endoplásmico la cadena α y la cadena β se asocian con la cadena invariante, la cual es una proteína que tiene dos funciones, una de ellas es conferida por su extremo carboxilo terminal evitando que los péptidos presentes en el lumen del retículo endoplásmico se unan a las moléculas de clase II y la otra reside en su extremo amino terminal donde se localiza la secuencia de tráfico responsable de guiar a las moléculas de clase II hacia los compartimentos endosomales vía el complejo de golgi. Dentro de los endosomas las moléculas de clase II se disocian de la cadena invariante la cual es degradada allí mismo, dejando así a las moléculas de clase II en condición de unir a los péptidos exógenos presentes abundantemente en los compartimentos endosomales (1).

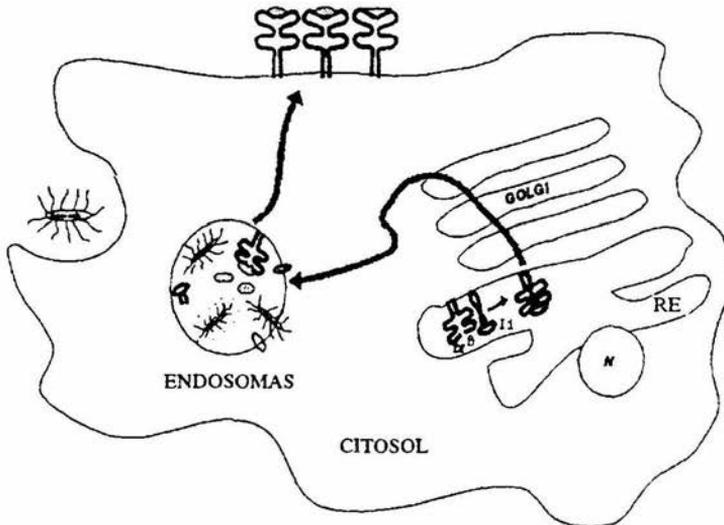


Fig.3: Representación esquemática de la vía exógena para el procesamiento y la presentación de antígenos por moléculas de clase II del MHC.

Los péptidos que se unen con alta afinidad a las moléculas de clase II son de 12 a 24 aminoácidos de longitud y dentro de sus secuencias también se presentan aminoácidos de anclaje que por lo general son tres y sus posiciones varían de acuerdo al alelo (tabla 2), (1,4).

ALELO	POSICION RELATIVA DEL RESIDUO								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
DR 1	Y	x	x	M	x	A	x	x	L
	F			L		G			M
DR 3	I	x	x	D	x	x	x	x	x
	L			E					
DR 4	Y	x	x	*	x	T	*		*
	F					S			
	W					V			
DQ 7	F	x	x	x	V	x	Y	x	x
	Y				L		F		
	I						M		
	M								
DPw2	F	x	x	x	F	x	x	I	x
	L				L			A	
	M								

Tabla 2. Características de los péptidos que se unen a las moléculas de clase II del MHC, (*) residuos sin carga positiva (4).

Generalidades sobre la infección por *Salmonella typhimurium*.

Salmonella typhimurium es un patógeno intracelular que provoca en los ratones una infección similar a la fiebre tifoidea. El mecanismo básico de patogenicidad de todas las *Salmonellas* es su capacidad de penetrar e invadir (sobrevivir y multiplicarse) en diferentes tipos de células del hospedero tales como células epiteliales y macrófagos (5).

Las infecciones con *Salmonella* se inician con la ingestión de agua o alimentos contaminados; las bacterias ingeridas se dirigen al intestino delgado distal donde atraviesan el epitelio intestinal asociándose posteriormente a las células M de las placas de Peyer. Después de penetrar las barreras del epitelio intestinal, las *Salmonellas* son fagocitadas por los macrófagos sobreviviendo dentro de ellos siendo transportados hacia los ganglios linfáticos regionales, al bazo y al hígado, donde la bacteria continúa multiplicándose para finalmente diseminarse por el torrente circulatorio (6).

Los mecanismos moleculares de virulencia involucrados en la fase de invasión y multiplicación intracelular se conocen parcialmente; inicialmente la bacteria es fagocitada por el macrófago alcanzando con ello la vía endocítica, es decir que intracelularmente la bacteria se localiza dentro de vacuolas endosomales genéricamente denominadas fagosomas. Posteriormente el fagosoma se fusiona con los lisosomas para formar la estructura conocida como fagolisosoma y es dentro de éste donde las bacterias son destruidas por la acción de diversos mecanismos oxidativos y no oxidativos (como la acción de proteasas) (7).

Se ha demostrado que en la mitad de los fagosomas donde *Salmonella* es capaz de multiplicarse, no se efectúa la fusión con los lisosomas, por lo tanto la inhibición de la formación del fagolisosoma es el mecanismo fundamental de virulencia que le permite a esta bacteria sobrevivir dentro del macrófago (8).

En la respuesta inmune inicialmente se genera una respuesta independiente de células T, en etapas tardías se da inmunidad mediada por células; en el establecimiento de esta inmunidad protectora la participación de linfocitos T CD4+ ha quedado de manifiesto dado que a ratones a los que se les ha eliminado sus linfocitos T CD4+, pierden tanto la capacidad de controlar la multiplicación de la bacteria como la resistencia a la infección; además, ratones no inmunes transferidos con linfocitos T CD4+ provenientes de ratones infectados subletalmente, se les confiere inmunidad protectora. Por otro lado, la participación de linfocitos T CD8+ en los mecanismos de protección contra *Salmonella* no han sido estudiados en detalle a pesar de que su participación podría ser de gran utilidad para liberar a las bacterias que residen dentro de los macrófagos infectados (9).

ANTECEDENTES

En ratones inmunizados con proteínas solubles se observa una respuesta inmune por la producción de anticuerpos y de linfocitos T CD4⁺, pero en estos casos no es posible obtener respuesta de linfocitos T citotóxicos. Para inducir respuesta de LT CD8⁺ con antígenos solubles se han descrito tres procedimientos diferentes: 1) inmunización con células que fueron sometidas a choque hipotónico e hipertónico en presencia de altas concentraciones de la proteína soluble (10,11), 2) inmunización con células transfectadas con el gene de la proteína (10) y 3) inmunización con macrófagos de bazo o peritoneales, los cuales fueron previamente cultivados *in vitro* con el antígeno (11,12). De los procedimientos descritos anteriormente, el primero y el segundo tienen como objetivo introducir a la proteína en el citosol, lo que significa que los mecanismos de procesamiento de antígeno que participan son los de la vía endógena. Para el tercer caso no están definidos los mecanismos de procesamiento de antígeno que pudieran estar participando, ya que la vía endógena no está involucrada puesto que las proteínas internalizadas por pinocitosis o por endocitosis no son liberadas de los endosomas al citosol; por otro lado, la vía exógena tampoco está involucrada debido a que las moléculas de clase I no tiene acceso a los compartimientos endosomales. La participación de proteasas séricas también ha sido excluida ya que la incubación del antígeno soluble con suero no genera los péptidos que se presentan por moléculas de clase I vacías; por lo tanto la hipótesis propuesta señala que particularmente los macrófagos posean mecanismos de tráfico intracelular de endosomas/lisosomas que promuevan el acceso del antígeno con la vía de exocitosis de las moléculas de clase I, o bien, que en los macrófagos exista un mecanismo que permita el paso de proteínas de los endosomas hacia el citosol (11, 12, 13, 14 y 15).

Otras evidencias de que existen mecanismos alternativos que permiten la presentación de antígenos exógenos en el contexto de moléculas de clase I son los siguientes: 1) La generación de respuesta de linfocitos T citotóxicos en ratones infectados con *Toxoplasma gondii*, un parásito intracelular que infecta todo tipo de células de mamíferos y que no migra al citosol. Estos linfocitos CD8⁺ lisan a las células infectadas y liberan INF- γ , participando en el establecimiento de un estado de protección específica (16); 2) la generación de respuesta de linfocitos T citotóxicos en ratones inmunizados con esporozoitos irradiados específicamente en contra de la proteína circunsporozoítica de *Plasmodium berghei* y *Plasmodium yoelii*. En ambos casos se ha demostrado que los linfocitos CD8⁺ participan en los mecanismos de protección mediante la destrucción intrahepática del parásito (17); 3) la generación de linfocitos T citotóxicos en ratones inmunizados con cepas atenuadas de *Salmonella typhimurium*, las cuales son empleadas como vectores para clonar y expresar de manera estable genes extraños. Con este sistema ha sido posible generar respuesta de linfocitos T CD8⁺, en contra de la proteína circunsporozoítica de *Plasmodium yoelii* (18) y de *Plasmodium berghei* (19), así como contra la nucleoproteína del virus de influenza A (20); 4) de moléculas HLA-B53 aisladas de habitantes del oeste de África, quienes son resistentes a la malaria, se obtuvo un péptido que proviene de antígeno LSA-1, el cual se expresa en el estadio hepático del parásito, más aún, solamente esa secuencia fue reconocida por

clonas de linfocitos T restringidas por B53 (21). Es importante enfatizar que en los casos señalados anteriormente no se ha documentado que los antígenos entren en el citosol o en el lumen del retículo endoplásmico de la APC.

Empiezan a ser investigados los mecanismos que emplean los fagocitos para que, a partir de parásitos intracelulares que no migran al citosol, sean capaces de generar los péptidos del parásito adecuados para ser presentados por moléculas de clase I. Recientemente se describió que los macrófagos peritoneales infectados con *Escherichia coli* o con *Salmonella typhimurium*, las cuales expresan un epitopo para linfocitos T CD8+, fueron capaces de activar a la clona específica; en este caso, la presentación del antígeno no fué bloqueada por los inhibidores clásicos de la vía endógena: cicloheximida y brefeldina A; lo que llevó a concluir que el procesamiento se pudiera estar llevando a cabo en vacuolas intracelulares y que los péptidos allí generados pudieran ser rejurgitados y reinternalizados nuevamente, lo que les permitiría incorporarse a la vía de exocitosis de las moléculas de clase I (22).

De acuerdo a los antecedentes aquí mencionados, se planteó la hipótesis de que los macrófagos infectados con *Salmonella typhimurium*, secretan péptidos bacterianos capaces de unirse a moléculas de clase I vacías expresadas sobre la superficie celular de los mismos macrófagos o de células vecinas (Fig. 4).

OBJETIVO GENERAL

Determinar que los péptidos secretados por macrófagos infectados con *Salmonella typhimurium* son capaces de unirse a moléculas de clase I.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar que los macrófagos infectados liberan proteínas y/o péptidos al medio extracelular.
- Determinar la capacidad de los péptidos bacterianos de unirse a moléculas de clase I.
- Analizar si la capacidad de liberar productos al medio extracelular es una característica exclusiva de fagocitos.
- Determinar la importancia del metabolismo en la capacidad de los macrófagos infectados de liberar productos al medio extracelular.
- Analizar la importancia de la actividad endosomal sobre la capacidad de liberar péptidos al medio extracelular.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ratones: La cepa de ratón BALB/c (H-2^d) fué proporcionada por el bioterio del Instituto Nacional de Higiene y por el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Cepa bacteriana: Para el estudio se utilizó la cepa bacteriana *Salmonella typhimurium* LT2 con fenotipo avirulento, proveniente del cepario de la unidad de investigación médica en inmunoquímica.

Anticuerpos monoclonales: Se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales:

- 11.4.1 que reconoce moléculas de clase I K^k.
- K10.56 que reconoce moléculas de clase I K^b.
- B22 que reconoce moléculas de clase I D^b.
- 28 1485 que reconoce moléculas clase I D^d.
- Y3 que reconoce moléculas clase I K^b

Lineas celulares: Se utilizaron: el timoma murino RMA-S (H-2^b) que es deficiente en Tap 2, el timoma murino RMA, el fibroblasto murino L929 (H-2^k), y la línea de monocitos-macrófagos de ratón J774 (H-2^d).

Macrófagos peritoneales: Los macrófagos peritoneales se indujeron de ambas cepas de ratones por administración intraperitoneal (i.p.) de 500 µl de peptona al 10%; tres días después se extrajeron las células del exudado peritoneal con 5ml de solución HANKS a 4°C con 100 U/ml de Heparina, después de un lavado, las células se determinó el número de células y se cultivaron en placas de plástico de 12 pozos, en medio RPMI 1640 complementado con un 20% de suero fetal bovino (RPMI-20); después de 2 horas se retiraron las células no adherentes y se procedió al conteo, de manera que se obtiene el número aproximado de células adherentes por pozo. Los macrófagos así obtenidos se emplearon para los ensayos de infección.

Cultivo de la bacteria: Para los ensayos de infección con *Salmonella typhimurium* la cepa LT2 se cultivó en medio BHI (infusión cerebro-corazón) durante 3 horas a 37°C y 175 rpm de agitación, en seguida el cultivo se lavó con solución salina isotónica y se centrifugó a 2000 rpm durante 15 minutos, por espectrofotometría, la suspensión bacteriana se ajustó a una densidad óptica de 0.6 de absorbancia midiendo a una longitud de onda de 540 nm; esto nos aproxima a una concentración de 1×10^9

bacterias por ml, (en base a un ensayo Mac Farland realizado en el laboratorio). La suspensión bacteriana se mantuvo en frío hasta su utilización para la infección de las células.

Marcaje de la bacteria: La cepa LT2 se cultivó en medio mínimo A durante toda la noche, el ajuste a una concentración de 1×10^9 bacterias por ml se efectuó por espectrofotometría al ajustar la suspensión a 0.4 de absorbancia midiendo a una longitud de onda de 600 nm, para marcarla radiactivamente al cultivo ya ajustado se le agregó 100 μ Ci de cada uno de los siguientes aminoácidos tritiados: alanina, leucina, isoleucina y valina, después de 20 minutos de cultivo, la bacteria se lavó dos veces con solución salina isotónica y se mantuvo en frío hasta su utilización para la infección de las células.

Ensayo de infección con *S. typhimurium*: Al cultivo de macrófagos ya adheridos se les adicionó una alícuota de la bacteria cultivada, procurando una proporción mínima de 1:10, la infección se dejó progresar a lo largo de 20 minutos al término de los cuales el medio se retiró de cada uno de los pozos y se lavó 5 veces con HANKS que contenía 10 mg/ml de gentamicina y se dejaron en reposo hasta el cocultivo con 1ml de RPMI-20 con 50 μ g/ml de gentamicina.

Cocultivo: De una suspensión de 1×10^6 por ml de medio de la línea celular RMA-S, se tomó 600 ml para agregarse a cada uno de los pozos con los macrófagos recientemente infectados, se procedió a incubarlos durante 18 horas a 37°C, en RPMI-20.

Determinación de la expresión de moléculas de clase I: La cuantificación de la cantidad de moléculas K^b y D^b sobre la superficie de la línea RMA-S (cocultivadas con macrófagos), se llevó a cabo por inmunofluorescencia indirecta, para lo cual las células una vez extraídas del cocultivo y lavadas, se incubaron durante 30 minutos a 4°C con los anticuerpos monoclonales 11.4.1, K1056 y B22 ó 281485, se efectuaron dos lavados con el amortiguador salino de fosfatos (PBS) con 2% de suero fetal bovino y se les agregó anticuerpos conjugados con isotiocianato de fluoresceína (Ig-G de cabra anti-Ig-G de ratón) y nuevamente se incubaron durante 30 minutos a 4°C, después de 2 lavados se resuspendieron en una solución de yoduro de propidio en PBS a una concentración de 100 mg/ml; éste se incorpora al DNA de manera que únicamente las células con membrana permeable ó muertas se tiñen posibilitando su eliminación en las mediciones de la fluorescencia. De igual manera se prepararon los controles positivos para los anticuerpos con el timoma RMA y los niveles basales de fluorescencia en la línea RMA-S con cada uno de los anticuerpos, el anticuerpo 11.4.1 se utilizó como control negativo. Finalmente la intensidad de fluorescencia se cuantificó en un citómetro de flujo (FACScan) y los datos se analizaron con el software LYSIS II (Beckton and Dickson).

Inmunoprecipitación de moléculas clase I de la células RMA-S: A partir de RMA-S provenientes de un ensayo de infección y cocultivo, empleando bacteria marcada radiactivamente, se procedió a

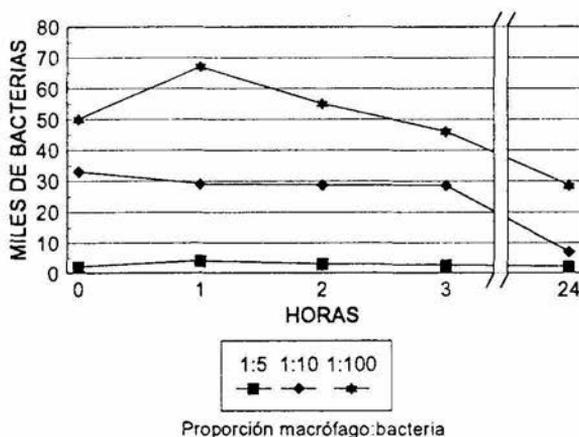
inmunoprecipitar a las moléculas de clase I expresadas en la superficie; para ello las células se resuspendieron e incubaron en hielo durante 30 minutos con amortiguador de lisis (nonidet 40 al 1%, NaCl 0.15 M, EDTA 5 mM, fenil-metil-sulfonil (PSFM) 1 mM; leupeptina y aprotinina 1 mM en Tris 50 mM, pH 7.8). Posteriormente se centrifugaron 15 minutos a 10 000 rpm y el sobrenadante se transfirió a un microtubo y se incubó 2 horas a 4 °C con el anticuerpo Y3 (anti K^b), posteriormente se adicionó 200 µl de una suspensión de *Staphylococcus cowan* al 10% (que posee receptor para la fracción constante del anticuerpo Y3), y se incubó otras 2 horas, al término del tratamiento se recuperó el paquete bacteriano y se lavó 4 veces con el amortiguador de lisis y una vez con Tris 50 mM pH 7.8. La radioactividad presente en el inmunoprecipitado se determinó en un contador de centelleo líquido.

Determinación de marca radiactiva: Se efectuaron un ensayos adicionales de infección y cocultivo con bacteria marcada radiactivamente, se separaron los macrófagos infectados, las células RMA-S y el medio de cultivo sobrenadante, en cada fracción se efectuó la técnica de TCA para determinar residuos protéicos radiactivos, las cuentas por minuto se detectaron en un contador de centelleo líquido.

RESULTADOS Y ANÁLISIS

1) Cinética de infección de los macrófagos.

Se efectuó una cinética controlada durante 24 horas donde se manejaron tres relaciones macrófago:bacteria (gráfica 1), con el fin de establecer las condiciones ideales para la infección y el tiempo óptimo que requieren los macrófagos para controlarla.



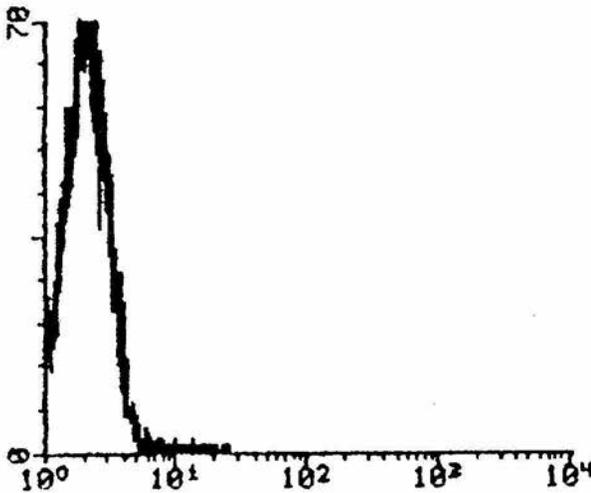
Gráfica 1. Cinética de infección de macrófagos peritoneales con *S. typhimurium*.

Como podemos observar en la gráfica 1, con las tres relaciones macrófago/bacteria fué posible detectar, una hora después de la infección, la presencia de *Salmonella* dentro de los macrófagos; sin embargo únicamente se observó multiplicación bacteriana con la relación 1:100. A las 24 h post-infección observamos una disminución del número de bacterias intracelulares para las tres relaciones empleadas, aunque el control de la infección fue mas eficiente en la relación 1:10, por lo que los subsecuentes experimentos se llevaron a cabo empleando dicha relación macrófago:bacteria.

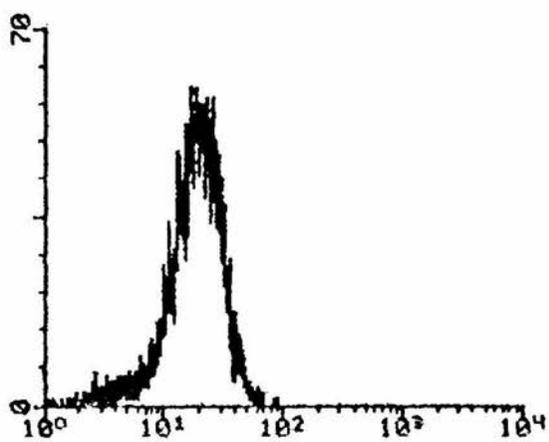
2) Expresión de moléculas de clase I en la línea celular RMA-S.

El análisis de la expresión de moléculas de clase I en la línea celular RMA-S se efectuó mediante la medición de la inmunofluorescencia indirecta en un citómetro de flujo.

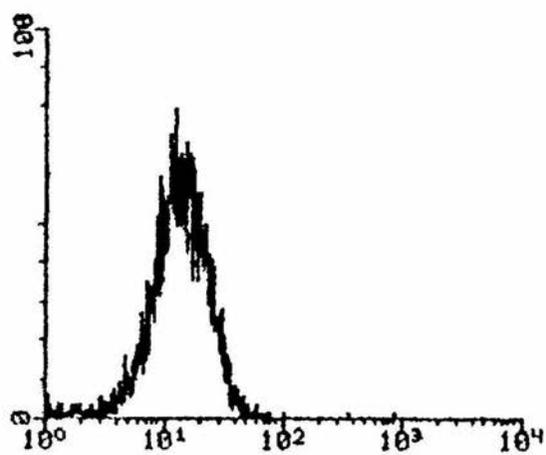
En las gráficas 2, 3, 4, 5 y 6, se muestra el nivel de expresión de moléculas de clase K^b y D^b en el timoma de ratón RMA-S. La gráfica 2 corresponde al histograma de fluorescencia cuando la tinción se realizó empleando un anticuerpo no específico (MFC 2.28). En la gráfica 3 se muestra el histograma de expresión de moléculas K^b al teñir con el anticuerpo K10.56 (MFC 20.21) el resultado se puede contrastar con la expresión de K^b sobre la línea celular RMA (control positivo) cuyo histograma se muestra en la gráfica 5 (MFC 217.4, aproximadamente 10 veces mayor a la fluorescencia emitida por la línea RMA-S). La gráfica 4 corresponde al histograma de fluorescencia emitida por la expresión de moléculas D^b al teñir con el anticuerpo 28.14.85 (MFC 13.53), este resultado también se puede comparar con el obtenido para la línea celular RMA (control positivo) cuyo histograma se muestra en la gráfica 6 (MFC 85.65, aproximadamente 6 veces mayor que la emitida por la línea RMA-S).



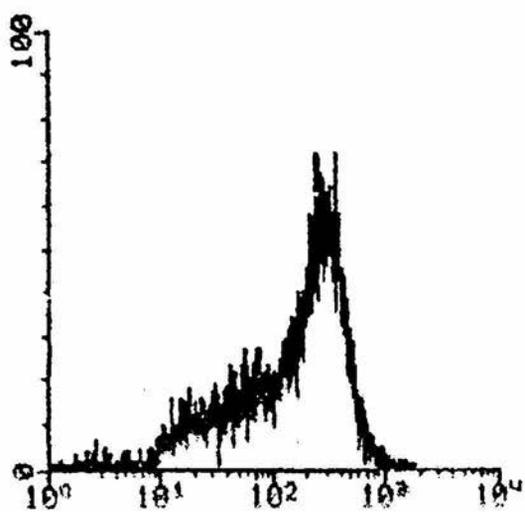
Gráfica 2: RMA-S testigo negativo, anticuerpo 11.4.1. Mediana: 2. 28



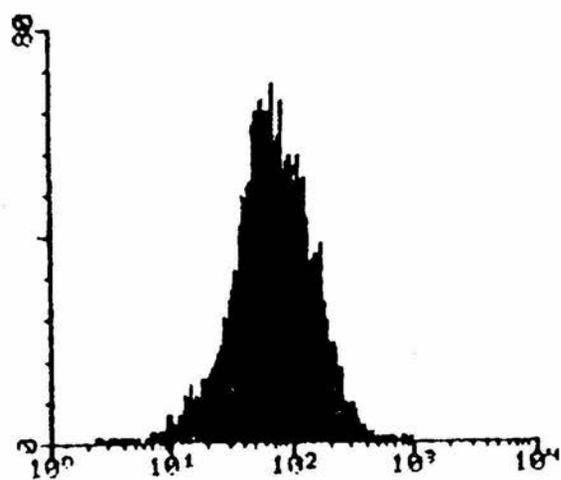
Gráfica 3: RMA-S tinción de moléculas clase I K^p. anticuerpo K10.56, Mediana: 18.94, Media: 20.21.



Gráfica 4: RMA-S tinción de moléculas clase I D^p. Media: 13.53.



Gráfica 5: RMA tinción de moléculas clase II^b, anticuerpo K10.56. Media: 217.4, Mediana:194.56.

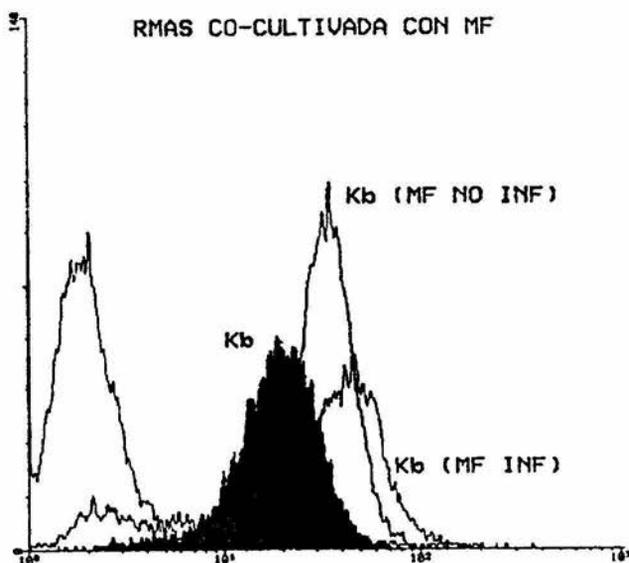


Gráfica 6: RMA tinción de moléculas clase I^b, anticuerpo 281485. Media: 85.65, Mediana: 69.16.

3) Expresión de moléculas de clase I en la línea celular RMA-S provenientes de los cocultivos.

La estrategia del cocultivo de macrófagos infectados y no infectados con células RMA-S, nos permitió reconocer en las mismas un incremento en la expresión de moléculas de clase I en la superficie.

Con la finalidad de visualizar los incrementos en la expresión de las moléculas de clase I en los diferentes tratamientos, en la gráfica 7 se conjuntan los análisis citométricos de las siguientes muestras: El control negativo, con una media de la intensidad de fluorescencia de 2.8; la expresión de moléculas K^b en RMA-S no cocultivadas con una media en la intensidad de fluorescencia de 20.21; la expresión de las moléculas K^b en RMA-S provenientes de cocultivo con macrófagos no infectados con una media de intensidad de fluorescencia de 32.49; y la expresión de moléculas K^b en RMA-S provenientes del cocultivo con macrófagos infectados con una media de 40.68. Tal incremento en la expresión de las moléculas clase I en las RMA-S cocultivadas con macrófagos previamente infectados o bien sin infectar nos hacen pensar que además de la aparente liberación de péptidos por parte de los macrófagos, estos provienen de proteínas ajenas *Salmonella*, y el ligero incremento encontrado en macrófagos infectados puede ser indicativo de péptidos provenientes de la bacteria.



Gráfica 7: Los macrófagos secretan péptidos capaces de unirse a moléculas H-2 de clase I. Las células de timoma RMA-S se cocultivaron por 24 horas con macrófagos peritoneales (RMA-S + Mf) ó con macrófagos peritoneales infectados con *Salmonella typhimurium* (RMA-S + Mf inf). Después del cocultivo se cuantificaron las moléculas K^b presentes en la superficie de las células RMA-S por inmunofluorescencia indirecta. Para la tinción se utilizaron los anticuerpos específicos K10.56 ó 11.4.1 y un anticuerpo conjugado a fluoresceína de cabra anti-IgG de ratón. El análisis de citometría de flujo se realizó con el FACScan.

Es probable que los péptidos que estabilizan las moléculas clase I en la superficie de RMA-S tengan un origen bacterino; el marcaje radiactivo del patógeno y su empleo en un ensayo de cocultivo, nos proporcionó información sobre el destino de tales péptidos una vez procesada la bacteria. Los niveles de radiactividad se determinaron tanto en el medio de cultivo de macrófagos infectados como en las RMA-S provenientes del cocultivo, en la tabla 3 se muestran las cpm obtenidas, en RMA-S cocultivadas con macrófagos infectados las cpm son aproximadamente 50 veces mayores que en las del cocultivo sin infección. Para cerciorarnos de que la unión de péptidos radiactivos se da en las moléculas de clase I de la situadas en la superficie celular de las RMA-S, se procedió a inmunoprecipitar tales moléculas con el anticuerpo Y3 y así se determinó el nivel de radiactividad, como se muestra en la tabla 4, donde la radiactividad de las moléculas provenientes del cocultivo con macrófagos infectados es dos veces mayor que el del cocultivo con macrófagos sin infectar.

	Experimento 1 (cpm)	Experimento 2 (cpm)
Medio de los Mf no infectados	22	nd
Medio de los Mf infectados	34827	16100
RMA-S + Mf no infectados	28	25
RMA-S + Mf infectados	1361	1298

Tabla 3. Los péptidos que se unen a moléculas K^b son productos de secreción de macrófagos. c.p.m: cuentas por minuto, *Salmonella typhimurium* fué marcada metabólicamente con Alanina-³H, Leucina-³H, Valina-³H y Fenilalanina-³H (100 mCi de cada uno).

Células	K22.203 (cpm)	Y3 (cpm)
RMA-S + Mf no infectados	40	52
RMA-S + Mf infectados	110	318
RMA-S + Mf infectados/ clq.	46	88

Tabla 4. A partir de los lisados de RMA-S de tres tratamientos diferentes, se inmunoprecipitaron las moléculas clase I y se determinó el nivel de radiactividad, la *Salmonella typhimurium* utilizada para infección fué marcada de la misma manera.

4) Expresión de moléculas de clase I en RMA-S provenientes del cocultivo con las líneas celulares L929 y J744.

Se considera que las células con mecanismo fagocítico tienen la capacidad de efectuar tanto los mecanismos de procesamiento antigénico ya conocidos como el fenómeno de presentación de

antígenos exógenos (observado en macrófagos peritoneales) (15); es probable que el fenómeno que nosotros encontramos también requiera del fenotipo fagocítico; para averiguarlo, se llevó a cabo la estrategia del cocultivo esta vez sustituyendo a los macrófagos peritoneales por dos líneas celulares distintas, la línea de fibroblastos L929 no fagocítica, y la línea de monocito-macrófago J774 con fenotipo fagocítico. En la tabla 5 se muestran los resultados obtenidos de dos ensayos, siendo evidente el incremento en la expresión de moléculas clase I K^b en las RMA-S provenientes de los cocultivos con macrófagos como con la línea J774 tanto infectados como sin infectar; en contraste, tanto en los cocultivos con la línea L929 no se presentó el incremento en la media de la intensidad de fluorescencia.

	Control (MFC)	K ^b (MFC)
RMA-S	2.28	18.04
RMA-S + L929 no infectadas	3.40	13.02
RMA-S + L929 infectadas	3.05	14.14
RMA-S + Mf no infectados	4.15	33.19
RMA-S + Mf infectados	3.89	45.35
RMA-S + J774 no infectadas	2.95	48.20
RMA-S + J774 infectadas	2.67	66.31

Tabla 5. Las células no fagocíticas no liberan péptidos que carguen moléculas K^b. MFC canal de fluorescencia media.

5) Expresión de moléculas de clase I en RMA-S provenientes de cocultivo con macrófagos fijados y con macrófagos tratados con cloroquina.

Con el fin de determinar la importancia de un metabolismo activo en la capacidad del macrófagos para liberar productos al medio extracelular, nuevamente se efectuó la estrategia del cocultivo esta vez bloqueando la actividad metabólica al fijar los macrófagos inmediatamente después de la infección. Así mismo, determinar la participación de endosomas en el fenómeno nos aportaría una información importante para sondearlo y caracterizarlo. Con la misma estrategia, en la tabla 6 se muestra el análisis citofluorométrico de un experimento donde el tratamiento con cloroquina no impidió un incremento en la intensidad de fluorescencia a los mismos niveles que sin tratamiento. En la tabla 6 también se muestra que el proceso de fijación efectuado en un experimento, sí afecta la liberación de péptidos que cargan moléculas K^b, ya que el valor de fluorescencia equivale al nivel basal.

	Control (MFC)	Kb (MFC)
RMA-S	2.28	18.04
RMA-S + Mf no infectados	3.40	27.98
RMA-S + Mf infectados	3.05	29.90
RMA-S + Mf infectados/Fij	4.15	14.94
RMA-S + Mf infectados/Clq	3.89	32.70

Tabla 6. La liberación de péptidos para cargar a las moléculas K^b requieren de la actividad metabólica de los macrófagos y los endosomas no participan. Fix: fijados. Clq: tratados con cloroquina. MFC: canal de fluorescencia media.

DISCUSION

En los antecedentes se plantea que dada la posibilidad de generar respuesta de LT CD8⁺ por proteínas solubles, es factible que las células posean mecanismos alternos a los conocidos para el procesamiento de estos antígenos; también se plantea que la posibilidad de la participación de estos mecanismos alternos en la generación de respuesta de LT CD8⁺ en hospederos infectados con microorganismos patógenos intracelulares que no residen en el citosol; aunque ambas situaciones podrían ser el resultado de dos mecanismos alternativos distintos entre sí, o bien podrían compartir algunas semejanzas ya que en ambos casos se generan y se presentan péptidos óptimos por moléculas de clase I a partir de antígenos exógenos.

En la figura 3 se plantean algunas hipótesis pertinentes para explicar cómo los péptidos que se generan de la degradación de parásitos intracelulares podrían unirse a moléculas de clase I en distintos niveles dentro de la célula e incluso a nivel de la membrana citoplasmática, para este último caso se plantea la posibilidad de que los péptidos generados intracelularmente sean secretados al medio extracelular donde serían capaces de cargar a las moléculas vacías de clase I presentes en la superficie de la célula infectada.

Esta hipótesis la hemos abordado utilizando células RMA-S que son abundantes en moléculas clase I vacías en su superficie cocultivadas con macrófagos peritoneales infectados con *Salmonella typhimurium* (con los cuales ya se había observado el fenómeno de presentación a LT CD8⁺ de proteínas solubles), esperando que los péptidos secretados al exterior de la célula tengan afinidad por las moléculas de clase I. La cuantificación de los péptidos liberados se llevó a cabo determinando el incremento en la estabilización de moléculas de clase I en la superficie de las RMA-S.

El análisis por citometría de flujo de los experimentos de cocultivo se resumen en los resultados de la figura 2 que muestran el incremento en la expresión de moléculas K^b de las células RMA-S que fueron cocultivadas tanto con macrófagos infectados como con macrófagos sin infectar; estos datos indican que lo propuesto en la hipótesis anteriormente descrita es correcto, así como también nos indica que el mecanismo de procesamiento y presentación alternativo está siendo empleado tanto para antígenos solubles como para antígenos particulados. Por otro lado también nos indica que los péptidos que presentan afinidad por clase I serían capaces de unirse no solamente a las moléculas vacías de la célula presentadora, sino también sobre las moléculas vacías de las células vecinas. La manera de comprobar que los péptidos que estabilizan a las moléculas de clase I provenían de la degradación intracelular de los antígenos exógenos fué inmunoprecipitando las moléculas K^b de las RMA-S que fueron cocultivadas con macrófagos infectados con *Salmonella typhimurium* previamente marcada con aminoácidos tritiados. El hecho de que para infectar los macrófagos con la bacteria se eliminan a aquellas que pudieran quedar en el espacio extracelular, así como la cuantificación de bacterias que

crecen intracelularmente, excluyen la posible participación de proteasas séricas en este mecanismo de procesamiento.

La caracterización del fenómeno como un evento intracelular sugiere la importancia de la actividad metabólica de las células presentadoras, lo cual se comprueba por el hecho de que aquellos macrófagos que fueron fijados posterior a la infección no indujeron el fenómeno (tabla 5). Los compartimentos intracelulares que presentan una alta actividad proteolítica son los endosomas tempranos y tardíos y los lisosomas, que es incluso el sitio de generación de los péptidos que se presentan por moléculas de clase II a los LT CD4⁺, por lo tanto, resultaba atractivo averiguar si este tipo de compartimentos ácidos participan en este mecanismo alternativo de procesamiento antigénico. Como se muestra en la tabla 4, un inhibidor característico de la actividad proteolítica endosomal fué incapaz de inhibir el fenómeno observado por lo que es muy probable que en las vacuolas fagocíticas se esté llevando a cabo la primera degradación de los antígenos proteicos internalizados por los macrófagos, por lo tanto las proteasas (distintas de las catepsinas) que estarían llevando a cabo esta actividad serían activas a pH no ácido.

Es importante considerar que el fenómeno es característico de células fagocíticas, lo cual está en concordancia con lo descrito por K. Rock *et al*, quienes describieron que los macrófagos esplénicos son las células responsables de procesar y presentar ovoalbúmina soluble (14 y 15). Así mismo los resultados obtenidos están de acuerdo a lo descrito por Harding y colaboradores (22), en el sentido de su propuesta de que péptidos de antígenos exógenos pudieron liberarse teniendo así acceso a las moléculas de clase I de la superficie celular. Por otro lado, estos resultados no apoyan la propuesta de K. Rock *et al* (14) quien describió que las membranas de los endosomas, bajo ciertas circunstancias son permeables, por lo tanto antígenos o péptidos exógenos pueden tener acceso al citosol donde serían procesados y presentados por el mecanismo clásico de moléculas clase I. Ninguno de los dos trabajos anteriores mostró evidencias experimentales de la funcionalidad del mecanismo *in vivo*.

Experimentos posteriores efectuados en la UIMI han demostrado que las RMA-S cocultivadas con macrófagos infectados con *Salmonella* son reconocidos por LT CD8⁺ citotóxicos provenientes de ratones infectados subletalmente con la bacteria, sugiriendo con ello que este novedoso mecanismo de procesamiento y presentación pudiera ser el involucrado en la generación de respuesta de LT CD8⁺ en infecciones por microorganismos intracelulares que no se multipliquen dentro del citosol; así mismo, este mecanismo pudiese participar en la selección negativa y positiva que se lleva a cabo en el timo durante la generación de repertorio inmunológico, ya que durante esos procesos ocurre un gran número de muerte celular por apoptosis y estas células son procesadas por los macrófagos tímicos por lo tanto existiría la posibilidad de tener una alta densidad de péptidos secretados por estos macrófagos que se unirían a moléculas de clase I.

En resumen, el mecanismo de procesamiento de antígeno es exclusivo de células fagocíticas e involucra la degradación intracelular del antígeno exógeno con la liberación al medio extracelular y la subsecuente unión de estos a moléculas vacías de clase I (Fig. 4).

En resumen, el mecanismo de procesamiento de antígeno es exclusivo de células fagocíticas e involucra la degradación intracelular del antígeno exógeno con la liberación al medio extracelular y la subsecuente unión de estos a moléculas vacías de clase I (Fig. 4).

Sin embargo a continuación se enumeran algunos puntos que requieren de ser abordados para una mayor expresión de este fenómeno:

-El hecho de que encontremos este fenómeno *in vitro*, no implica que *in vivo* ocurra, en niveles detectables considerables, esto significa que las implicaciones biológicas del fenómeno no las conocemos.

-El fenómeno requiere de una caracterización más completa con el fin de averiguar las interrogantes que se generan sobre la forma de procesamiento de los antígenos, dónde se lleva a cabo o cuáles son las proteínas involucradas.

-Es necesario encontrar las diferencias que pueden existir al procesar proteínas solubles exógenas y al procesar proteínas propias del parásito intracelular, por ejemplo el tamaño de los péptidos generados y la eficiencia del procesamiento.

-En términos de la economía del sistema inmune, resulta inútil que se generen respuestas citotóxicas en contra de células sanas que únicamente están presentando antígenos solubles, pero si estos antígenos son de naturaleza viral o provienen de parásitos intracelulares, es posible que esta forma de procesamiento sí resulte benéfica para el hospedero.

-El fenómeno no descarta la posibilidad de que existan otros mecanismos, por ejemplo de que exista a la vez una liberación de péptidos hacia el citoplasma y de ahí puedan incorporarse a la ruta para clase I.

-Es importante considerar que algunos de los péptidos que se unen a las moléculas de clase I en la superficie celular pueden tener características subóptimas de acoplamiento, esto puede determinarse midiendo la cantidad de moléculas estables con respecto al tiempo, (23).

Es posible que rutas alternativas de presentación de antígenos cierren la supuesta segregación entre las rutas de clase I y de clase II que limitan el entendimiento de que existe necesariamente una cooperación entre el linfocito T cooperador y el linfocito T citotóxico durante la respuesta inmune.

CONCLUSIONES

- Existe una vía de procesamiento de antígenos por medio de la cual antígenos exógenos son presentados a linfocitos T citotóxicos a través de moléculas de clase I del MHC.
- Ésta vía no se inhibe por brefeldina por lo tanto es diferente de la vía endógena.
- Esta vía es exclusiva de macrófagos y la degradación de antígenos no involucra a la vía endosomal - lisosomal.
- En esta vía, los péptidos presentados por moléculas de clase I son secretados al medio extracelular y se unen a moléculas vacías de clase I presentes en la superficie celular.

REFERENCIAS

1. Germain, R.N. **Antigen procesing and presentation.** Fundamental immunology. Paul, W.E. 3^o ed. Raven Press. pp 629-676. 1993.
2. Abbas, A.K.; Lichtman, A. K.; Pober, J.S. Cap. 6: **Antigen presentation and T cell antigen recognition.** Cap. 15: **Immunity to microbes.** Celular and molecular immunology. Edit. Saunders. 1991.
3. Rammensee, H.G. **Naturally procesed peptides from class I molecules.** Curr. Opin. Immunol. 5:35-39. 1993.
4. Falk, K. y Rötzschke, O. Curr. Opin. Immunol. 6:44-56.
5. Finlay, B. B. y Falkow, S. **Salmonella as an intracelular parasite.** Mol. Microbiol. 3:1833-1841. 1989.
6. Hormaeche, C. E. **Salmonella, infection and immunity.** En Encyclopedia of immunology. Ed (s), Roitt, I. M. y Delves, P. J. Academic Press. pág: 1350-1352. 1992.
7. Gallin, J. J. **Inflammation.** Fundamental immunology. Paul, W.E. 3^o ed. Raven Press. pp 105-1032. 1993.
8. Carroll, M. E. ; Jackett, P. S.; Aber, V. R. y Lowrie, d. B. **Phagolysosome formation cyclic denosine 3' 5' monophosphate and the fate of Salmonella typhimurium infection.** J. immunol. 145:1265-1269.
9. Nauciel, C. **Role of CD4⁺ T cell and T-independent mechanisms in adquired resistance to Salmonella typhimurium infection.** J. Immunol. 145:1265-1269.
10. Moore, M. W.; Carbone, F. R.; Bevan, M. J. **Introduction of soluble protein into the class I pathway of antigen processing and presentation.** Cell 54:777-785. 1988.
11. Carbone, F. R. y Bevan, M. J. **Class I-restricted processing and presentation of exogenous cell-associated antigen *in vivo*.** J. Exp. Med.171:377-387. 1990.
12. Staerz, U. D.; Karasuyama, H.; Gamer, A. M. **Cytotoxic T lymphocytes against a soluble protein.** Nature. 329:449-451. 1987.
13. Bevan, M. J. **Class discrimination in the world of immunology.** Nature. 325:192-194. 1987.
14. Rock, K. L.; Gamble, S.; Rothstein, I. **Presentation of exogenous antigen with class I major histocompatibility complex molecules.** Science. 249:918-921. 1990.
15. Rock, K. L.; Rothstein, L.; Gamble, S. y Fleischacker, C. **Characterization of antigen-presenting cells that present exogenous antigens in asociation with class I MHC molecules.** J. Immunol., 150:438-446.
16. Subauste, C.S. y Remington, J.S. **Immunity to toxoplasma gondii.** Curr opin. Immunol. 5:532-537. 1993.
17. Romero, P. **Malaria vaccines.** Curr. Opin. Immunol. 4:432-441. 1992.

18. Flynn, J. L.; Weiss, W. R.; Norris, K. A.; Seifert, H. S.; Kumar, S.; So, M. **Generation of a cytotoxic T-lymphocyte response using a Salmonella antigen delivering system.** Mol. Microbiol. 4:2111-2118. 1990.
19. Aggarwal, A.; Kumar, S.; Jaffe, R.; Hone, D; Gross, M.; Sadof, J. **Oral Salmonella: Malaria circumsporozoite Recombinants induce specific CD8⁺ cytotoxic T cells.** J. Exp. Med. 172:1083-1090. 1990.
20. Gao, X. M.; Tite, J.P.; Lipscombe, M.; Rowland, S.; Ferguson, D. J. P. y McMichael, A.J. **Recombinant Salmonella typhimurium strains that invade nonphagocitic cells are resistant to recognition by antigen-specific cytotoxic T lymphocytes.** Infect. Immun. 60:3780-3789. 1992.
21. Hill, A.; Elvin, J.; Wills, M; Aidoo, M.; Allsopp, C.; Gotch, F.; Gao, X.; Takiguchi, M.; Greenwood, B.; Townsed, A.; McMichael, A. y Whittle, H. **Molecular analysis of the association of HLA-B53 and resistance to severe malaria.** Nature. 360:434-439. 1992.
22. Pfeifer, J. D.; Wick, M. J.; Roberts, R. L.; Findlay, K.; Normark, S. J.; Harding, C. V. **Phagocytic processing of bacterial antigens for class I MHC presentation to T cells.** Nature. 361:359-362. 1993.
23. Ortiz-Navarrete Vianney and Hämmerling Günter J. **Surface appearance and instability of empty H-2 class I moléculas under physiological conditions.** Proc. Natl. Acad. Sci. 88:3594-3597. 1991.