

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**INFLUENCIA DE LA ORGANIZACIÓN Y
REPETITIVIDAD ANTIGÉNICAS EN LA
INDUCCIÓN DE ANTICUERPOS
PROTECTORES**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA

Q. F. B. ELIZABETH CRISTINA ACOSTA RAMIREZ

MÉXICO, D. F.

2008



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.


ING. LEOPOLDO SILVA GUTIÉRREZ
DIRECTOR GENERAL DE ADMINISTRACIÓN
ESCOLAR, UNAM
Presente.

Nos permitimos informarle que con base al Artículo 31 del RGEPE el Comité Académico de DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS, en su reunión 210 del 07 de noviembre de 2007, designó el siguiente jurado para examen grado de DOCTORA EN CIENCIAS de ACOSTA RAMÍREZ ELIZABETH CRISTINA, con número de cuenta 9501992-5, con la tesis titulada "INFLUENCIA DE LA ORGANIZACIÓN Y REPETITIVIDAD ANTIGÉNICAS EN LA INDUCCIÓN DE ANTICUERPOS PROTECTORES", dirigida por el Dr. Constantino III Roberto López Macías.

Presidente: Dr. Enrique Ortega Soto
Vocal: Dr. Edmundo de Ibis Lamoyi Velázquez
Vocal: Dra. Yvonne Rosenstein Azoulay
Vocal: Dra. Beatriz Gómez García
Secretario: Dr. Constantino III Roberto López Macías

Atentamente
"Por mi raza hablará el espíritu"
Cd. Universitaria, a 08 de noviembre de 2007


DRA. YOLANDA LÓPEZ VIDAL
RESPONSABLE
FACULTAD DE MEDICINA


DR. FEDERICO MARTÍNEZ MONTES
COORDINADOR DEL PROGRAMA

DOCTORADO EN CIENCIAS
BIOMÉDICAS
COORDINACIÓN

C.c.p Lic. Balfred Santaella Hinojosa, Coordinador de la Unidad de Administración Escolar del Posgrado, UNAM
Tutor (a) Dr. Constantino III Roberto López Macías.
Coordinación de PDCB

Teléfono 56-23-01-71 y fax: 56-23-01-70 <http://www.pdcb.unam.mx>. E-mail: pdcbb@servidor.unam.mx

La libertad, es uno de los más preciosos dones que a los hombres dieron los cielos;
con ella no pueden igualarse los tesoros que encierra la tierra ni el mar encubre; por
la libertad así como por la honra se puede y debe aventurar la vida, y, por el contrario,
el cautiverio es el mayor mal que puede venir a los hombres.

Miguel de Cervantes Saavedra

Este proyecto de investigación fue desarrollado en:

Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica
Hospital de Especialidades
Centro Médico Nacional siglo XXI
México, D. F.
Tutoría: Dr. Constantino III Roberto López Macías.

En colaboración:

Centre de Recherche en Infectiologie
Université Laval
Québec, Canadá
Supervisión: Dr. Denis Leclerc.

Financiamiento:

Beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) para estudios de Doctorado.

Beca de la Coordinación de Investigación en Salud. División de Promoción y Desarrollo. Residentes y Becarios de Investigación. Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).

Instituto Mexicano del Seguro Social. Fondo de Apoyo para programas institucionales de Investigación en Salud (FOFOI): FP-0038/ 1235.
FP/2001/037. FP/2001/377. FP 2004-403. FP 2006/1 A) /022.

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT): SEP-CONACyT 45261- M. SALUD-CONACyT 2004-01-132.

National Science and Engineer Research Council (INSERC). Canadá. No. De la demande 241661-00. Comité de evaluación del fondo de la iniciativa internacional NIP du CRSNG: 100917.

Folia Biothec. Canadá.

AGRADECIMIENTOS

Al Doctor Constantino López por haber creído en mi, haber sido mi guía durante este lapso y permitirme ser parte de su grupo de investigación.

Al Doctor Armando Isibasi, por darme cobijo en su laboratorio y permitirme ser parte de la historia de su grupo de investigación.

A mis compañeros de la UIMIQ, por su apoyo en la realización de los titánicos experimentos contenidos en este trabajo.

A mis compañeros del CRI, por enseñarme que en nuestro medio no existen diferencias de raza o religión.

A los Doctores Rodolfo Pastelin, Leopoldo Flores, Laura Bonifaz, César González, Denis Leclerc, Pierre Savard, Eduardo García por sus aportaciones y consejos durante la realización de este proyecto.

A la Dra. Ingeborg Becker de la Unidad de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina, UNAM.

Al Sr. Ricardo Vargas Orozco y al MVZ Daniel Sánchez Almaraz del Bioterio el Departamento de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM.

A Marie Duval y al personal del Bioterio del Centre de Recherche en Infectiologie, Université Laval.

A la UNAM. Por la formación académica que recibí en sus aulas.

DEDICATORIAS

A mi mamá. Mujer guerrera. Imposible escribir en este pequeño espacio todas las razones por las cuales te admiro. La realización de este sueño está dedicado a quien ha sabido ser mujer, madre y padre con coraje y un amor infinito.

A Beto. Mi hermano, amigo, confidente, conciencia y ejemplo. La persona que siempre camina a mi lado.

A mis hermanos: Tani, Ili, Alex, Viri, Diego y Jorge. Siempre juntos a pesar del tiempo, la distancia y las tormentas. Los llevo siempre en mi corazón.

A mis ángeles guardianes. Jorjón y Abue Cris.

A mis tíos Arturín, Yola, Maru, Lourdes, Ricardo y Lety. Gracias por su apoyo incondicional en cada nuevo reto emprendido.

A Nuno. Mi pareja en libertad. La ilusión de que todo puede ser mío para siempre.

A mis amigos Luisa, Cris, Ady, Victor M, Diana, Fer, Jérôme, Maribel, Dominic, Wilfried, Katia, Ma-Astrid, Marie-Eve, Christine, Marilene, Fabijoux, Christian, Amin, Nadia y Jérôme por la alegría que han traído a mi vida.

INDICE

1. Abstract
2. Resumen
3. Lista de abreviaturas
4. Introducción
5. Marco teórico
 - 5.1 ¿Por qué los anticuerpos son importantes en la respuesta inmune protectora?
 - 5.2 ¿Cómo se establece la respuesta inmune de memoria mediada por linfocitos B?
 - 5.3 ¿Cómo se mantiene la respuesta de memoria mediada por linfocitos B?
 - 5.4 ¿Qué función biológica tienen los anticuerpos?
 - 5.5 ¿Bajo qué mecanismos los anticuerpos regulan la inmunidad?
 - 5.6 ¿Cuál es la relevancia biológica de la memoria inmunológica?
 - 5.7 ¿Qué características le confieren inmunogenicidad a los antígenos?
 - 5.7.1 Geografía de la respuesta inmune
 - 5.7.2 Características de los inmunógenos
 - 5.7.2.1 Carga eléctrica
 - 5.7.2.2 Configuración
 - 5.7.2.3 Metabolismo y repetitividad de los determinantes antigénicos
 - 5.8 ¿Qué mecanismos regulan la activación de los linfocitos B por antígenos con un arreglo organizado y repetitivo?
 - 5.8.1 Distribución del antígeno en órganos linfoides secundarios

- 5.8.2 Activación de los linfocitos B a través del BCR
- 5.8.3 Reconocimiento a través de PRR
 - 5.8.3.1 Regulación de la respuesta de anticuerpos por TLR
- 5.9 ¿De qué manera los agentes adyuvantes incrementan la inmunogenicidad de las vacunas?
- 5.10 Los VLPs como alternativa las vacunas a base de subunidades
- 6. Planteamiento del problema
- 7. Hipótesis
- 8. Objetivo
 - 8.1 Objetivo general
 - 8.2 Objetivos particulares
- 9. Modelos experimentales
 - 9.1 Virus del mosaico de la papaya (PapMV)
 - 9.2 Porinas de *Salmonella enterica* serovar Typhi
- 10. Materiales y métodos
- 11. Resultados
- 12. Discusión
- 13. Conclusiones
- 14. Referencias

1. ABSTRACT

The role of the antibodies in protection against infectious diseases was postulated since the observation at the end of the XIX century of their capacity to neutralize toxins.

Activated B lymphocytes are the responsible of antibody production and together with T lymphocytes are the cells that mediate the effector mechanisms of the adaptive immune system. The main property of the adaptive response is the establishment of immunological memory. The memory response, is what confers protection against reinfection and it is related to high antibody titers as well as the presence of higher frequencies of antigen specific T and B lymphocytes

Antibodies are involved in the protection against infectious diseases, in particular those with neutralizing activity, these antibodies are the main effector mechanism against virus and bacteria. The presence of long lasting protective antibody titers in one of the objectives aimed in vaccine development.

Many studies pointed out that the antigen structure impacts on B lymphocytes activation, the antigens with a rigid and highly organized array are able to activate efficiently B lymphocytes because they cross-link the BCR properly. Another set of studies suggests that the repetitive molecular array also could be detected by cells from the innate immune system, p.e mannose binding protein (MBP). However, the role of this kind of antigens in the induction of the long-lasting protective immune response mediated by antibodies had not been studied.

The experimental data obtained using papaya mosaic virus (PapMV) as system, make us able to propose that the antigens with a highly organized and repetitive molecular array are recognized as pathogen associated molecular patterns (PAMP) and also they are excellent immunogens (Pamptigens) able to induce a long-lasting antibody response.

Those properties make Pamptigens able to activate of the mechanisms involved in the establishment of the long-lasting protective immune response because they activate efficiently both the innate and the adaptive arms of the immune system.

The subunit expression system based on VLP from PapMV is the first heterologous expression system of whole subunits in a highly organized and repetitive array which is able to induce long-lasting immunity combined with the advantages that it is inocuos, stable and could be produced at low cost.

2. RESUMEN

La participación de los anticuerpos en la protección contra infecciones se postuló a partir de las observaciones realizadas hacia finales del siglo XIX de su capacidad de neutralizar toxinas.

Los linfocitos B activados son las células responsables de la producción de los anticuerpos y junto con los linfocitos T son los encargados de mediar los mecanismos efectoros de lo que se denomina respuesta inmune adaptativa. La principal propiedad de dicha respuesta es el establecimiento de la memoria inmunológica. La respuesta de memoria, es la que confiere protección a la reinfección y se ha relacionado con la presencia de altos títulos de anticuerpos, así como por la presencia de linfocitos T y B específicos.

Los anticuerpos participan de manera importante en la protección contra las enfermedades infecciosas. En particular, los anticuerpos neutralizantes constituyen el mecanismo efector de la respuesta inmune contra virus y bacterias. La presencia de altos títulos de anticuerpos protectores de larga duración es uno de los objetivos buscados en el desarrollo de vacunas contra patógenos controlados principalmente por mecanismos efectoros dependientes de anticuerpos.

Diversos estudios señalan que la estructura antigénica influye de manera importante en la activación de los linfocitos B, ya que los antígenos que presentan un arreglo rígido y altamente organizado activan eficientemente a los linfocitos B a través de un eficiente entrecruzamiento del receptor del linfocito B (BCR). Otros trabajos, sugieren que el arreglo molecular repetitivo también puede ser detectado por las células del sistema inmune innato como lo es el caso de la proteína que une manosa. Sin embargo, la participación de estos antígenos en la inducción de la respuesta de anticuerpos protectores de larga duración no ha sido evaluada.

Los resultados obtenidos empleando como sistema experimental el virus de mosaico de la papaya (PapMV) nos permiten proponer que los antígenos altamente organizados y repetitivos al ser reconocidos como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) y ser excelentes inmunógenos (Pamptigen) son capaces de inducir la respuesta de anticuerpos de larga duración. Estas propiedades les permiten favorecer la activación de los mecanismos involucrados en el establecimiento de la respuesta inmune protectora de larga duración debido a que activan eficientemente tanto a la respuesta inmune innata como a la adaptativa.

El sistema de expresión de subunidades de patógenos de interés para vacunación basado en partículas semejantes a virus (VLP) PapMV representa el primer sistema de expresión de proteínas heterólogas completas en este tipo de plataformas con un arreglo molecular altamente organizado y repetitivo y ha demostrado ser un sistema eficiente capaz de inducir la respuesta inmune protectora de larga duración además de ser inocuo, estable y producido a bajo costo.

3. LISTA DE ABREVIATURAS

AID	Desaminasa inducida por activación
APC	Célula presentadora de antígeno
BCR	Receptor de linfocito B
CFA	Adyuvante completo de Freund
DC	Célula dendrítica
DL	Dosis Letal
GC	Centro germinal
HEL	Lisozima de huevo de gallina
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular
IFA	Adyuvante incompleto de Freund
IFN-a	Interferón a
IL	Interleucina
LPS	Lipopolisacárido
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
Omp	Proteína de membrana externa
OVA	ovoalbúmina
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
Pamptigen	Patrón molecular asociado a patógenos-antígeno
PapMV	Virus de mosaico de la papaya
PRR	Receptor de reconocimiento de patrón
SHM	Hipermutación somática
TLR	Receptor tipo Toll
TNF-a	Factor de necrosis tumoral a
TNP, NP	4-hidroxi-3-nitrofenol
VCAM-1	Molécula de adhesión celular vascular
VLP	Partícula semejante a virus

4. INTRODUCCIÓN

La participación de los anticuerpos en la protección contra las infecciones se postuló a partir de las observaciones, realizadas hacia finales del siglo XIX, de su capacidad de neutralizar la acción de toxinas.

Los linfocitos B activados o células plasmáticas son las células responsables de la producción de los anticuerpos y junto con los linfocitos T son las encargadas de mediar los mecanismos efectores de lo que se ha denominado respuesta inmune adaptativa. La principal propiedad de dicha respuesta es el establecimiento de lo que se conoce como memoria inmunológica. La respuesta de memoria, se caracteriza por la protección ante la reinfección y se ha relacionado con la presencia de altos títulos de anticuerpos así como de linfocitos T y B específicos.

Para explicar el estado inmune se propone la presencia de un mayor número de linfocitos antígeno-específicos que provienen de la expansión clonal ocurrida en la primera exposición al antígeno y que se mantienen en un estado “preactivado” permitiéndoles tener un menor umbral de activación con respecto a las células *naïve* dando lugar a una respuesta mas rápida en las exposiciones antigénicas subsecuentes. También se ha propuesto que los altos títulos de anticuerpos son mantenidos por células plasmáticas de larga vida alojadas en la médula ósea o que estímulos a través de receptores tipo Toll mantengan a las células de memoria. Finalmente se ha propuesto también que la persistencia del antígeno en el sistema sería la responsable de la activación constante de las células B específicas que ya rearreglaron el receptor permitiendo su activación y diferenciación.

Los anticuerpos participan de manera importante en la protección contra las enfermedades infecciosas, en particular, los anticuerpos neutralizantes constituyen el mecanismo efector de la respuesta inmune contra virus y bacterias. La presencia de altos títulos de anticuerpos protectores de larga duración es uno de los objetivos buscados durante el desarrollo de vacunas contra patógenos controlados principalmente por anticuerpos.

Diferentes estudios señalan que la estructura antigénica influye directamente en la activación de los linfocitos B, ya que los antígenos que presentan un arreglo rígido y altamente organizado en una estructura paracristalina activan eficientemente a los linfocitos B directamente a través del entrecruzamiento del receptor de linfocito B (BCR), lo cual ha sido evaluado en diferentes sistemas como la flagelina de *Salmonella*, polímeros haptenados y antígenos particulados como el virus de la estomatitis vesicular y el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B. Sin embargo, la capacidad de los antígenos altamente organizados y repetitivos para inducir la respuesta inmune de anticuerpos protectores de larga duración no ha sido estudiada.

Para evaluarla, nosotros empleamos como modelo antigénico al virus de mosaico de la papaya (PapMV). El PapMV pertenece al grupo de los *Potexvirus*, tiene unas dimensiones de 500nm de largo y un diámetro de 15nm. Las partículas virales están compuestas por una cadena de (+)ssRNA de 6656 nucleótidos y por 1400 copias de una única proteína dispuestas en un arreglo organizado y repetitivo conformando su cápside.

El presente trabajo propone que el PapMV es un antígeno tipo independiente tipo 2 (TI-2) y que es reconocido por el sistema inmune innato como patrón molecular asociado a patógeno (PAMP). Estas características de antígeno y PAMP le confieren propiedades adyuvantes que le permiten inducir la respuesta inmune protectora cuando se coadministra con subunidades de patógenos de interés en vacunación, efecto que se potencia si la subunidad de interés se encuentra unida a la partícula viral.

Los resultados obtenidos sugieren que los antígenos altamente organizados y repetitivos son reconocidos como PAMP y además son excelentes inmunógenos capaces de inducir la respuesta de anticuerpos de larga duración, propiedades que les permiten favorecer el establecimiento de la respuesta inmune protectora de larga duración debido a que activan eficientemente tanto a la respuesta inmune innata como a la adaptativa. La aplicación de estos hallazgos resulta interesante para el desarrollo de adjuvantes para el mejoramiento de las vacunas a base de subunidades que confieran inmunidad de larga duración.

5. MARCO TEORICO

5.1 ¿Por qué los anticuerpos son importantes en la respuesta inmune protectora?

Las primeras descripciones acerca de la capacidad del organismo para protegerse ante las reinfecciones fueron registradas por Tucídides en el año 429 AC (1).

A dicha protección se le denominó inmunidad, que proviene del latín *immunitas*, que definía la excepción que aplicaba a algunos funcionarios romanos de pagar impuestos o de algunas obligaciones civiles y este término fue utilizado por primera vez en el siglo XIV para referirse a la protección contra la plaga (2).

No fue, sino hasta los siglos XVIII y XIX de nuestra era, a través de las experiencias de Edward Jenner (3) quien inoculaba en humanos el virus vaccinia, agente causal de la viruela en las vacas, así como las de Louis Pasteur (4) quien administraba *Pasteurella multocida* atenuada, que se puso de manifiesto que mediante la exposición a los patógenos era como se adquiría la protección a las reinfecciones.

Hacia finales del siglo XIX, Emil von Behring y Shibasaburo Kitasato, transfiriendo sueros inmunes, demostraron que a través de esta práctica se podía conferir protección a la acción de toxinas (5). Posteriormente, Paul Erlich (6) empleando suero anti-toxina diftérica, propuso que existía algún componente en éste que, según sus observaciones reaccionaba estequiométricamente con la toxina. Esto, dio como resultado que postulara la teoría de la cadena lateral, en la que establecía que el antígeno seleccionaba cadenas laterales que las células liberaban a manera de anticuerpos.

A partir de este punto, y con el desarrollo de la inmunoquímica, se generaron algunas otras teorías como la del templado, desarrollada por

Felix Haurowitz y Friedrich Breini (7) para tratar de explicar la reacción antígeno-anticuerpo. No fue sino hasta 1938, que Tiselius y Kabat, a través del fraccionamiento de sueros inmunes, asociaron los anticuerpos a la fracción gamma de las globulinas presentes en el suero (8).

Finalmente, en 1957, Burnet (9) propuso la teoría de la selección clonal para explicar la generación de los anticuerpos. En ella, propone que los anticuerpos están codificados en el genoma y que el repertorio se amplía a través de mutaciones somáticas, que los anticuerpos producidos por cada célula tienen una única especificidad y asocia la presencia de receptores de los antígenos en la superficie de las células que generan los anticuerpos y finalmente, propone que el antígeno induce la formación de los anticuerpos así como la proliferación de las células que los generan y que las células hijas heredan la especificidad.

Así, la evolución en el conocimiento del sistema inmune y el desarrollo de estrategias de vacunación apoyados en la inmunología han generado el conocimiento que constituye en la actualidad el fundamento para el estudio de los mecanismos que favorecen la respuesta inmune protectora mediada por anticuerpos.

La comprensión de los mecanismos que llevan al establecimiento y mantenimiento del estado inmune es un punto crucial en el desarrollo de vacunas que confieran protección de larga duración.

5.2 ¿Cómo se establece la respuesta inmune de memoria mediada por linfocitos B?

Los anticuerpos de alta afinidad son los efectores de la rama humoral de la respuesta inmune adaptativa. Éstos son producto de la diferenciación de los linfocitos B, dirigida por los linfocitos T, en el proceso denominado reacción de centro germinal (GC). Los GC son estructuras que se forman en los folículos de los órganos linfoides secundarios, y es donde se lleva a cabo la expansión clonal de los linfocitos B, la hipermutación somática

(SHM), el cambio de isotipo de las inmunoglobulinas, la maduración de la afinidad, apoptosis, y la diferenciación de las células plasmáticas y el compromiso de los linfocitos B a células de memoria (10).

La formación y el mantenimiento de los GC dependen de las interacciones entre los linfocitos B, linfocitos T y células dendríticas foliculares (FDC) (11, 12, 13). Las FDC participan en la proliferación, selección y diferenciación de los linfocitos B a través de mecanismos dependientes e independientes de antígeno (14, 15), mientras que los linfocitos T activados inducen la diferenciación de los linfocitos B de GC a través de interacciones célula-célula tipo CD40/CD40L y a través de citocinas (16).

Cuando los anticuerpos son producidos durante la respuesta primaria, los complejos inmunes (IC) son retenidos por largos lapsos en las FDC, debido a su alta expresión de receptores Fc y receptores de complemento (CR), siendo CR1 y CR2 los más abundantes en los folículos primarios (17, 18).

Las FDC proporcionan antígeno para su reconocimiento por el linfocito B, se cree que esta interacción es crucial para el desarrollo de anticuerpos de alta afinidad y que han llevado a cabo cambio de isotipo, así como para el establecimiento de la respuesta de memoria mediada por linfocitos B (19, 20, 21, 22). Además del aporte de antígeno, las FDC ofrecen numerosos estímulos no específicos durante la reacción de centro germinal que contribuyen a la óptima respuesta de B (23). Las FDC expresan moléculas de adhesión ICAM-1, VCAM-1, MadCAM-1, que proveen a los linfocitos B de GC de señales para prevenir la apoptosis y ayudan a la selección de los linfocitos B durante la maduración del BCR (24, 25, 26, 27, 28) .

La expansión clonal de los linfocitos B activados (centroblastos), ocurre en el contexto de las FDC (29). Posteriormente, se da inicio al proceso de SHM (30). Los centroblastos se diferencian a centrocitos, dejando de proliferar y expresan una nueva inmunoglobulina en su superficie. Histológicamente, las zonas oscura y clara se hacen evidentes (31).

La zona oscura, está conformada por centroblastos que proliferan y llevan a cabo SHM y una pequeña población de FDC (32). La zona clara, está

conformada principalmente por la red de FDC, centrocitos y linfocitos T. La diferenciación de células pre-plasmáticas y de memoria comienza alrededor del segundo día después de que ha iniciado la SHM, este retraso garantiza la alta afinidad de las inmunoglobulinas (33).

Se ha propuesto que la maduración de la afinidad se lleva a cabo en diferentes etapas (34):

- 1) existe una moderada maduración de la afinidad cuando las zonas clara y oscura están presentes
- 2) hay un incremento en la maduración de la afinidad durante la depleción de la zona oscura
- 3) se llega a un máximo de afinidad durante las últimas etapas de la reacción de centro germinal

Se ha observado que las quimiocinas son centrales en el desarrollo, organización y mantenimiento de la arquitectura de los órganos linfoides secundarios, incluyendo la de los folículos. Para que el GC se desarrolle, es esencial que la estructura del folículo esté intacta. Particularmente, la quimiocina CXCL13 y su receptor CXCR5 son los responsables de la organización del folículo así como de la migración de las células B y T en los GC primarios (35, 36).

En este sentido, la organización del GC está regulada tanto por CXCL12 y su receptor CXCR4 como por CXCL13 y su receptor CXCR5 (37). Las quimiocinas, además de ser importantes para el tráfico y organización de los linfocitos B en el GC, también lo son para reclutar a los linfocitos T. Los linfocitos T CD4⁺ CXCR5⁺ migran a los folículos y a los GC en respuesta a CXCL13 (38, 39, 40). La presencia de células T en el GC es importante para dar señales de diferenciación de los linfocitos B.

Se reconoce que CD28/B7 y CD40/CD40L son necesarios para la óptima activación de linfocitos B y T CD4⁺ en la formación de los GC (41, 42). Recientemente, se ha demostrado que también ICOS, un homólogo de CD28, es importante para el desarrollo de GC y que su señalización regula la diferenciación Th1/Th2 (43, 44).

Se ha reportado que algunas citocinas regulan la diferenciación de los linfocitos B en el GC. IL-4 es producida por los linfocitos T y se asocia con la diferenciación de los linfocitos B (45). Tanto IL-2 como IL-4 promueven *in vitro* la diferenciación a células B de memoria (46). IL-6 que es secretada por FDC promueve la proliferación de linfocitos B (47). IL-10 se requiere para la diferenciación a célula plasmática (48, 49). CD40L promueve la proliferación de linfocitos B, regula la apoptosis mediada por Fas (50) y favorece la diferenciación a células de memoria (51). Tanto las FDC como los linfocitos T expresan el ligando de Fas (FasL) y en este modo promueven la selección negativa a través de la apoptosis inducida por Fas (52).

Se considera que los IC en las FDC juegan un papel importante en la selección de linfocitos B con alta afinidad, debido a que las células B que expresan receptores con alta afinidad están en ventaja de reconocer los epítopos de los antígenos secuestrados por las FDC. Las células B que tienen éxito en reconocer al antígeno se seleccionan, proliferan y se diferencian a células plasmáticas productoras de anticuerpos de alta afinidad. Se ha reportado que la maduración de la afinidad se puede detectar en presencia de FDC que han unido IC, observándose que existe mínima o nula maduración de la afinidad en ausencia de FDC. La maduración de las células B es seguida por la expresión de la desaminasa inducida por activación (AID), seguida del cambio de isotipo de las inmunoglobulinas y la producción de anticuerpos. El bloqueo de la interacción FDC-CD21L y CD21 en los linfocitos B inhibe la expresión de AID y el cambio de isotipo. Las FDC pulsadas con antígeno soluble también promueven el cambio de isotipo y la producción de IgG de baja afinidad.

5.3 ¿Cómo se mantiene la respuesta de memoria mediada por linfocitos B?

En cuanto al mantenimiento de la respuesta de memoria mediada por linfocitos B se han postulado los siguientes mecanismos:

1. Generación de linfocitos B con fenotipo de memoria(53,54)
2. Generación de células plasmáticas productoras de anticuerpos de larga vida(55,56,57,58)
3. Mantenimiento de la respuesta de memoria a través de la formación de depósitos de antígeno en células dendríticas foliculares, favoreciendo el constante estímulo antigénico(59,60,61,62,63).
4. Mantenimiento de la respuesta de memoria a través de la infección crónica o recurrente con el agente patógeno(64,65)

Recientemente, se ha propuesto un quinto mecanismo de mantenimiento de la respuesta de memoria de linfocitos B que sugiere que es mediado por activadores policlonales, por ejemplo el agonista de TLR9 CpG(66).

Se ha descrito en modelos de infecciones virales e incluso después de la administración de antígenos inertes que las células plasmáticas pueden migrar hacia la médula ósea en donde mantienen su capacidad de producción de anticuerpos(67,68,69,70,71,72,73). En contraste, se ha identificado que las células B de memoria residen de manera preferente en bazo y ganglios y que también se encuentran recirculando en sangre periférica(58,74).

En ausencia de linfocitos B de memoria, la transferencia de células plasmáticas da lugar a una prolongada y sostenida producción de anticuerpos, lo que sugiere que las células plasmáticas pueden producir anticuerpos por periodos prolongados en ausencia de antígeno(58).

Se ha propuesto también, que el mantenimiento de los títulos de anticuerpos en suero requiere de la continua proliferación y diferenciación

de los linfocitos B de memoria a células plasmáticas productoras de anticuerpos(59,75,76,60,65).

Sin embargo, no se ha definido si el mantenimiento de la respuesta de memoria se debe a la participación de sólo uno de estos mecanismos o si es a consecuencia de la cooperación entre ellos.

5.4 ¿Qué función biológica tienen los anticuerpos?

Los anticuerpos representan junto con la respuesta inmune innata la primera línea de defensa contra los agentes patógenos así como contra toxinas. Se han descrito algunos efectos biológicos mediados por anticuerpos entre los que se encuentran: la opsonización, neutralización de virus, bacterias y toxinas, fijación de complemento y la citotoxicidad mediada por anticuerpos.

Así, la actividad biológica de los anticuerpos puede o no depender de la presencia de otras células o factores solubles que participan en la respuesta inmune. Por ejemplo, la neutralización de toxinas y de virus depende exclusivamente de la presencia de anticuerpos. En ambos casos la neutralización se debe a que se bloquea el sitio de unión al receptor celular específico para la toxina o el virus (77). En el segundo caso, cuando se requiere de células o factores solubles presentes en el suero para mediar la protección por anticuerpos encontramos la participación de células fagocíticas y el sistema del complemento, mecanismos que tienen relevancia en el control de la infección por virus (78) y bacterias (79, 80). Otros mecanismos descritos que median la protección por anticuerpos son la inhibición de la liberación de viriones por las células infectadas (81), así como la neutralización a nivel intracelular tanto de virus como bacterias mediada por la participación de IgM o IgA poliméricas (82). Se ha visto que este último es importante para conferir inmunidad a nivel de mucosas dado a que las células epiteliales

pueden transportar a estos anticuerpos después de la unión a su receptor PIGR (receptor de inmunoglobulinas poliméricas).

Se ha descrito otro mecanismo de protección mediada por anticuerpos, en el que participan los anticuerpos naturales, se ha demostrado que son importantes para concentrar al antígeno en los órganos linfoides secundarios. Esta protección está mediada principalmente por anticuerpos de la clase IgM, sin embargo se ha reportado la participación de anticuerpos naturales de las clases IgG e IgA(83).

5.5 ¿Bajo qué mecanismos los anticuerpos median la inmunidad?

La respuesta de memoria depende de la existencia de un mayor número de linfocitos B y T que tienen un umbral de activación más bajo que las poblaciones naive y esta característica favorece la protección ante la reinfección, así mismo, se ha observado que la presencia de anticuerpos de alta afinidad participan de manera importante en la protección ante la reinfección(84,85).

De los mecanismos efectores de la respuesta inmune adaptativa, los anticuerpos han demostrado tener un papel importante en mediar la protección conferida por las vacunas de las que se dispone, por ejemplo, viruela, sarampión, hepatitis B, influenza, rabia, varicela (86,87,64).

Se han descrito diferentes propiedades de los anticuerpos que determinan la capacidad protectora de éstos, entre estas características se encuentran: el isotipo, afinidad por el antígeno, su capacidad para neutralizar u opsonizar (88).

Los estudios clásicos que evalúan la participación de los anticuerpos en la respuesta inmune protectora incluyen transferencias pasivas de suero o de anticuerpos monoclonales a animales sin inmunizar, posteriormente se reata con el antígeno observándose correlación entre la protección y la neutralización evaluada *in vitro* (89).

En modelos animales, se ha demostrado que la protección mediada por anticuerpos puede estar regulada sólo por el fragmento F(ab)₂ e incluso el efecto protector se ve influenciado por la subclase de IgG que sea transferida, por ejemplo, con la infección del virus de la fiebre amarilla los anticuerpos IgG_{2a} son efectivos a diferencia de los anticuerpos neutralizantes de la subclase IgG₁ (90).

Los anticuerpos neutralizantes son importantes para la respuesta protectora contra virus. La neutralización se define como la pérdida de la capacidad infectiva del virus debido a la unión de los anticuerpos a éste. Se ha propuesto que la neutralización en el medio extracelular se debe a que los anticuerpos generan un cambio conformacional en la envoltura o la cápside, lo que interfiere con la unión del virus al receptor, otro mecanismo que se ha propuesto es que la unión de los anticuerpos al virus impide que éste se replique en la célula debido a que no se puede liberar su material genético (77).

La participación de los anticuerpos naturales en la respuesta protectora se ha evidenciado a través de la protección contra *Streptococcus pneumoniae* (91), además que participan también favoreciendo la captura del antígeno, procesamiento y presentación del mismo por linfocitos B a través de la unión a receptores Fc (92).

También, se ha visto que los anticuerpos naturales favorecen la concentración del antígeno en los órganos linfoides secundarios e incluso pueden neutralizar a las bacterias y virus en la circulación(93).

De manera tal que, independientemente del mecanismo a través del cual los anticuerpos median la protección, éstos son importantes ya que favorecen la concentración del antígeno en los órganos linfoides secundarios favoreciendo la inducción de la respuesta inmune adaptativa. Este fenómeno se observa cuando la función de los anticuerpos es la opsonización o cuando los IC son reconocidos por las FDC residentes en los órganos linfoides secundarios.

5.6 ¿Cuál es la relevancia biológica de la memoria inmunológica?

A través de la evolución, el sistema inmune ha desarrollado la propiedad llamada memoria inmunológica, que se ha definido como la capacidad del organismo de responder de manera más rápida y eficiente durante la segunda exposición al antígeno (94).

La respuesta de memoria es lo que confiere inmunidad a los organismos, entendiéndose como inmunidad la capacidad del sistema inmune de proteger al organismo contra la reinfección y es el desarrollo de ésta la consecuencia más importante de la memoria inmunológica.

Se ha observado en algunos sistemas, que se puede mantener el estado inmune por varios años después del primer estímulo antigénico(1,95,96,97,98,99,100), siendo precisamente la inducción de la respuesta inmune protectora de larga duración el objetivo principal de la vacunas.

A consecuencia de que el ser humano observó que la exposición a los microorganismos favorecía la protección a la reinfección, éste se ha dado a la tarea de diseñar estrategias de vacunación que le ayuden a protegerse de infecciones letales.

Los primeros prototipos de vacunas que se emplearon eran a base de microorganismos atenuados, representando este tipo de vacunas la vacuna contra la viruela y la vacuna contra el cólera.

El procedimiento de atenuación fue utilizado por Pasteur también en el desarrollo de la vacuna contra la rabia y el ántrax (101), posteriormente, Calmette y Guérin (102) y Theiler (103) retomaron esta práctica para el desarrollo de vacunas contra la tuberculosis y la fiebre amarilla, respectivamente.

Con el avance en las técnicas experimentales, se llegó a la atenuación de algunos otros virus, haciéndose factible el desarrollo de vacunas contra la polio (Sabin), sarampión y varicela.

De manera casi paralela, se tomó como estrategia en el desarrollo de vacunas el empleo de microorganismos inactivados, siendo de los primeros ejemplos la vacuna contra la tifoidea, el cólera y la vacuna inactivada contra la polio, la cual se empleó junto con la Sabin en la campaña de vacunación que llevó a la erradicación de la polio (104).

Con el transcurso del tiempo, en un esfuerzo por disminuir los efectos secundarios asociados a algunos componentes de los microorganismos, o bien al riesgo de recuperación de virulencia cuando se emplean microorganismos atenuados, para el desarrollo de vacunas se ha optado por la detección, purificación y uso de subunidades de microorganismos. Sin embargo, debido a la pérdida de inmunogenicidad de estas formulaciones se ha hecho evidente el empleo de adyuvantes con el fin de favorecer la respuesta inmune.

A través de la transferencia pasiva de suero, se ha evidenciado que los anticuerpos son mediadores de la respuesta inmune protectora conferida por las vacunas dirigidas a la neutralización de toxinas (tétanos (105), difteria (106)), así como para la prevención de enfermedades de origen viral (sarampión (107), rabia (108), viruela (109), varicela (110)) u ocasionadas por bacterias capsuladas (influenza (111)).

Se han reportado estudios que evalúan los lapsos a los cuales aún se mantiene el estado inmune después de la administración de algunas de las vacunas disponibles, observándose de manera importante la participación de los anticuerpos (Tabla 1).

Vacuna	Lapso de persistencia del estado inmune	Tipo de vacuna
Rubeola (112)	Al menos 27 años	Virus vivo atenuado
Influenza (113)	Al menos 10 años	Subunidad
Hepatitis B (114,115)	Al menos 15 años	Subunidad
Rabia (116)	Al menos 14 años	Virus vivo atenuado
Varicela (117)	Al menos 6 años	Virus vivo atenuado
Tétanos (118)	Al menos 3 años	Subunidad
Pertussis (118)	Al menos 3 años	Subunidad
Difteria (118)	Al menos 3 años	Subunidad
Tuberculosis (119)	50 a 60 años	Microorganismo vivo atenuado
Poliomielitis (120)	Al menos 25 años	Virus inactivado (Salk) Virus activo (Sabin)
Viruela (99)	75 años	Virus atenuado

TABLA 1. Comparación de la duración de la respuesta inmune protectora conferida por algunas de las vacunas disponibles.

Así, podemos observar que la capacidad protectora de las vacunas disponibles se basa en su capacidad de inducir la respuesta de anticuerpos de larga duración.

La persistencia en la producción de anticuerpos es una de las características de la respuesta inmune de memoria mediada por linfocitos B. Ésta, junto con la respuesta de memoria de linfocitos T son las características más importantes de la respuesta inmune adaptativa.

5.7 ¿Qué características le confieren inmunogenicidad a los antígenos?

Se han descrito diferentes factores que contribuyen a la inmunogenicidad de los antígenos. Dentro de los factores intrínsecos al antígeno se considera que la naturaleza química, peso molecular, la conformación, la relación filogenética así como la organización y repetitividad de los antígenos contribuyen a la inmunogenicidad. Además, se ha observado

que existen algunos otros factores extrínsecos que participan en la inducción de la respuesta inmune, entre ellos se encuentran: la vía de entrada del antígeno, la dosis así como la presencia y permanencia del antígeno en los órganos linfoides secundarios.

5.7.1 Geografía de la respuesta inmune

Las células que conforman el sistema inmune equivalen a más de un kilogramo del peso de un humano adulto y se encuentran ampliamente distribuidas en el organismo (121). A través de su continuo movimiento, migrando pasivamente a través de la sangre y linfa, localizándose en tejidos linfoides y no linfoides, las células del sistema inmune pueden detectar rápidamente a los patógenos lo que asegura su control en los diferentes tejidos. La migración y la activación incorrecta de las células del sistema inmune es lo que puede dar origen a autoinmunidad, por lo que su migración y activación debe estar regulada.

Las primeras observaciones de células en la linfa y en los órganos linfoides fueron registradas hace más de 200 años. El proceso de recirculación de los linfocitos entre la sangre y linfa a través de las venas del endotelio alto en los ganglios linfáticos fue descrito por Sir James Gowans, quien fue capaz de marcar células con timidina radiactiva que posteriormente detectó en secciones de tejido por autoradiografía o por microscopía óptica convencional (122, 123). No mucho tiempo después, las diferentes regiones de los tejidos linfoides donde se localizan los linfocitos T y linfocitos B fueron identificadas por autoradiografía (124) e inmunofluorescencia (125). En 1976, Stamper y Woodruff (126) describieron *in vitro* la unión específica de los linfocitos a las venas del endotelio alto. Posteriormente, se describió el anticuerpo monoclonal MEL-14 (127), con el que se hizo posible la identificación del primer miembro de la familia de las selectinas y adresinas, moléculas responsables de la regulación de la entrada de células linfoides a los tejidos.

Se han definido como órganos linfoides primarios (médula ósea, timo e hígado), a los encargados de producir células competentes y los órganos linfoides secundarios (ganglios, bazo, placas de Peyer) a los tejidos donde se lleva a cabo la respuesta inmune y donde se generan los efectores de la respuesta inmune adaptativa.

El tejido linfoide secundario está ampliamente distribuido en el organismo lo que permite la rápida detección y respuesta a antígenos externos independientemente de cómo ingresen al organismo, y su organización es especializada facilita las interacciones celulares necesarias para la inducción de la respuesta inmune adaptativa.

La mayoría de los linfocitos T y B entran a los tejidos linfoides secundarios provenientes de la sangre, residen en este sitio alrededor de un día y salen pasando primero a los senos linfáticos que comunican con los vasos linfáticos eferentes.

La presencia de antígeno modifica de manera importante la actividad de los linfocitos B y T en los órganos linfoides secundarios. Durante la respuesta inflamatoria y la respuesta a antígenos, se inhibe el egreso de células ocasionando un incremento en el tamaño de los órganos linfoides secundarios lo que permite a las células efectoras adquirir funciones especializadas antes de que sean liberadas *en masse* algunos días posteriores a la infección (128).

De qué forma el sistema inmune reacciona con los antígenos, depende de las frecuencias relativas de linfocitos B y T específicos contra ese antígeno, así como por su umbral de activación. También son importantes la cantidad de antígeno disponible y el periodo durante el cual el antígeno permanece en los órganos linfoides secundarios, donde la respuesta primaria da inicio (129). Además, se ha observado que los antígenos que no se localizan en los tejidos linfoides, independientemente si son derivados de proteínas propias o de agentes infecciosos no inducen la respuesta inmune.

En 1997, Rolf Zinkernagel propuso el modelo de la geografía de la respuesta inmune (130) para explicar los diferentes patrones de inmunogenicidad. Este modelo, considera que la dosis, el tiempo y particularmente la localización del antígeno en los órganos linfoides secundarios, así como la estructura del antígeno, son claves para la activación de linfocitos T y B (131, 132, 133).

Esta propuesta, se basa en las siguientes observaciones: 1) la activación convencional de linfocitos T y B sólo puede ser inducida en órganos linfoides (134,135), 2) los linfocitos T son activados por antígenos asociados a las células presentadoras de antígeno (APC) que se localizan en los órganos linfoides secundarios (136,137), 3) los linfocitos B dan origen a una respuesta de IgM independiente de la colaboración de los linfocitos T contra determinantes antigénicos altamente organizados y repetitivos (138), o contra determinantes repetitivos y no altamente organizados en presencia de activadores policlonales como LPS (139) siempre y cuando estos antígenos se localicen en los órganos linfoides secundarios en suficiente cantidad.

Además, este modelo considera de igual importancia la cantidad de antígeno presente así como el periodo durante el cual éste permanece en los órganos linfoides secundarios (134).

Se ha sabe que los antígenos que no se localizan en los órganos linfoides secundarios, independientemente si son derivados de proteínas propias o de agentes infecciosos no inducen la respuesta inmune (136,140). Además, experimentalmente se ha observado que para la activación de las clonas de linfocitos B autoreactivas la estructura del antígeno es importante, ya que los linfocitos B autoreactivos pueden ser activados después de reconocer al autoantígeno dispuesto de manera repetitiva (estructuras comunes reconocidas por auto-anticuerpos incluyen DNA, colágeno, receptor de acetilcolina) y si hay disponibles linfocitos T CD4⁺ específicos para un epítipo relacionado (141,142).

5.7.2 Características de los inmunógenos

5.7.2.1 Carga eléctrica

En el proceso de purificación de los anticuerpos utilizando DEAE Sephadex, se había observado que los anticuerpos IgG se distribuían en dos fracciones cromatográficas (143).

Posteriormente, cuando se analizaron anticuerpos anti-lisozima de conejo obtenidos bajo diferentes condiciones, se concluyó que la distribución de los anticuerpos en esas dos diferentes fracciones estaba controlada por diferentes propiedades químicas del antígeno, más que por el protocolo de la inmunización o el fondo genético de los animales (144, 145, 146).

Análisis posteriores de los anticuerpos dirigidos contra diferentes antígenos naturales y sintéticos, llevó a la conclusión de que había una relación inversa entre la carga eléctrica neta del antígeno y la del anticuerpo que lo reconoce. Además, esta regla se cumplía incluso si se inmunizaba simultáneamente con antígenos de carga opuesta (144,146).

Así, los antígenos de naturaleza ácida se detectaban de manera predominante en la primera fracción cromatográfica, mientras que los anticuerpos dirigidos a antígenos básicos se concentraban en la segunda fracción. Igualmente, cuando se administraban haptenos, se observó que los anticuerpos anti-hapteno se distribuían en cualquiera de las dos fracciones dependiendo de la carga eléctrica neta del acarreador al que el hapteno estaba acoplado.

Estas experiencias llevaron a la conclusión de que la biosíntesis de los anticuerpos está controlada tanto por el determinante que reconocen como por otras regiones de la molécula antigénica.

Para determinar de qué manera el comportamiento cromatográfico de los anticuerpos dependía de la carga eléctrica neta del inmunógeno o si era función de la carga eléctrica del determinante antigénico, se generó una

ribonucleasa pancreática bovina con un exceso de cargas positivas, en forma de cadenas de poly-L-lisilil en el exterior de la molécula, así como varios determinantes p-azobencenarsonato unidos a residuos de tirosina o histidina al interior de la molécula.

La mayoría de los anticuerpos anti-p-azobencenarsonato se localizaron en la segunda fracción después de las cromatografías por DEAE Sephadex bajo condiciones en las cuales los anticuerpos se separan de acuerdo a su carga eléctrica neta. En contraste, los anticuerpos con la misma especificidad pero utilizando como acarreador albúmina sérica de conejo y hexa-L-tirosina se seleccionaban principalmente en la primera fracción. Entonces, los anticuerpos formados eran reflejo de la carga neta de la molécula más que de la carga del área cercana al determinante p-aminobencenarsonato en el inmunógeno.

De esta manera, se pudo concluir que el control del tipo de anticuerpo que se genera ocurre a nivel de la molécula antigénica completa y parecería ser que la carga eléctrica neta del antígeno intacto juega un papel en la selección del anticuerpo, a nivel celular o subcelular del loci a partir del cual el anticuerpo es sintetizado (146)

En contraste, se ha observado una relación inversa ha sido demostrada entre la carga eléctrica neta del inmunógeno y la carga neta del anticuerpo que induce (144,147-150). Este fenómeno se registra en diferentes especies animales y es general para los anticuerpos de las diferentes clases (144,150).

5.7.2.2 Configuración

Durante mucho tiempo se había observado que la reacción antígeno-anticuerpos era estereoespecífica (151) y además se había demostrado la contribución de la configuración óptica en la especificidad de los anticuerpos (152,153) a través de la observación de que la unión de D-

tirosina a gelatina resultaba en un incremento de la inmunogenicidad comparando con la de la gelatina nativa o cuando se adicionaba L-tirosina. Para evaluar la contribución de la configuración óptica de los aminoácidos en una macromolécula en la inmunogenicidad, se generaron cadenas de multiprolinas con diferentes configuraciones ópticas a partir de polilisina y anhídrido de N-carboxiprolina en DMSO. Así, se sintetizó una serie de polímeros con las fórmulas generales: poly(Tyr,Glu)-poly(Pro)-poly(Lys) y poly(Phe,Glu)-poly(Pro)-poly(Lys) los cuales diferían en la configuración óptica de los aminoácidos (154). Se encontró que, mientras los antígenos que contenían L-péptidos en el exterior daban lugar a anticuerpos con especificidad a esos péptidos, y los antígenos que contenían D-péptidos en el exterior inducían la producción de anticuerpos estereoespecíficos contra el esqueleto de poliprolinas (154).

5.7.2.3 Metabolismo y repetitividad de los determinantes antigénicos

Algunos inmunógenos tienen la propiedad de inducir la respuesta humoral en ratones irradiados sin la presencia de números detectables de linfocitos T. En este grupo de inmunógenos denominados “timo independientes” se incluyen la flagelina polimerizada (155,156), el polisacárido de pneumococo (157), LPS de *E. coli* y polivinilpirrolidona (158).

Estructuralmente, estos antígenos consisten de largas cadenas hechas de determinantes antigénicas repetidas, lo que sugería era un requerimiento estructural necesario de un antígeno para inducir este tipo de respuesta (159).

Se sabía que esta característica era necesaria pero insuficiente para inducir la respuesta inmune, debido a que varios polipéptidos (multicadenas) sintéticos, todos con determinantes antigénicos repetitivos requerían tanto de linfocitos T como de células derivadas de médula ósea para inducir una eficiente respuesta humoral en ratones (160,161).

Además, se había sugerido que la presencia de determinantes antigénicos repetitivos y de lento metabolismo podría ser óptima para la inducción de una respuesta de anticuerpos eficiente en ausencia de células T.

Para analizar esto, se investigó una familia de cuatro inmunógenos que tenían tamaño, forma, composición en aminoácidos similar, pero que diferían uno del otro exclusivamente en la configuración óptica de los aminoácidos que componían sus diferentes porciones: un polipéptido compuesto exclusivamente de L-aa (el cual podía ser metabolizado), dos polímeros, uno compuesto exclusivamente de D-aa y otro en 93% de L-aa pero que contiene D-aa en su esqueleto exterior (que eran lentamente metabolizados) y un polipéptido que contenía 93% D-aa en el interior y L-aa en el exterior (que podía ser degradado sólo si el esqueleto de L-aa era degradado).

Utilizando este sistema se encontró que la independencia del timo de los inmunógenos con tamaño, forma y composición en aminoácidos similares estaba relacionada con la configuración óptica de algunos o todos los aminoácidos que componían su estructura y esto se podía relacionar con el metabolismo del inmunógeno. Los resultados obtenidos sugirieron que la categoría de antígeno timo independiente corresponde a aquellos con determinantes antigénicos repetitivos y lento metabolismo (162).

Para que los antígenos puedan ser reconocidos por los linfocitos T, éstos deben ser presentados por las APC en contexto de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), por lo que la capacidad de las APC de generar complejos MHC:péptido es esencial para la inducción de la respuesta inmune (163, 164). Los péptidos antigénicos son generados en los lisosomas, por lo que se consideraba que la susceptibilidad de los antígenos a la degradación proteolítica en los lisosomas es importante para la inmunogenicidad.

Para analizar esta posibilidad se comparó la inmunogenicidad de la ribonucleasa pancreática bovina A (RNasa-A) y de su variante RNasa-S, ambas proteínas además de compartir la actividad enzimática son

estructuralmente idénticas (165), pero diferían en que RNasa-A es más susceptible a la degradación proteolítica cuando es internalizada por células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDC) y mantiene su sensibilidad a la proteólisis aún en presencia de adyuvante (hidróxido de aluminio).

Otra diferencia encontrada fue que la forma estable de RNasa (RNasa-A) era capaz de inducir títulos de anticuerpos IgG mucho más altos (>10 000 veces) que RNasa-S cuando se administró en alúmina a ratones, y además estas observaciones también eran válidas cuando se acoplaron los haptenos FITC y DNP a RNasa-A y RNasa-S, lo que sugería que la diferencia en la inmunogenicidad de ambas proteínas estaba relacionada con su presentación en contexto de moléculas MHCII.

Esta hipótesis se confirmó cuando se evaluó la respuesta celular inducida por ambas proteínas, encontrándose que la forma estable inducía una mejor respuesta celular tanto en la respuesta primaria como en la secundaria, evaluada por DTH. Este fenómeno se observó independiente del haplotipo de moléculas de clase II e independientemente de la vía de entrada del antígeno, con lo cual se descartaba una posible influencia de la población de APC responsable de la detección del antígeno.

Las diferencias de inmunogenicidad de RNasa-A y RNasa-S, sugieren que uno de los efectos del decremento en la susceptibilidad a la proteólisis es que se facilita la permanencia del antígeno en la DC, lo que puede incrementar el número de complejos péptido-MHCII. A pesar de que este fenómeno puede variar entre antígenos, el hecho de que se observó lo mismo con dos antígenos no relacionados sugiere que esto podría ser un principio general (166).

Los linfocitos B reconocen patrones y son activados por determinantes repetitivos y ordenados, que por definición se consideran extraños, debido a que los antígenos propios (colágeno, DNA) generalmente no se encuentran accesibles para su reconocimiento además que los antígenos repetitivos se encuentran en los agentes infecciosos y se ha demostrado

que la organización del antígeno (propio o extraño) determina su inmunogenicidad.

Los antígenos que son expresados de manera poco organizada en la superficie celular induce una respuesta IgM sin embargo esta respuesta es menos eficiente que la inducida por antígenos expresados de manera repetitiva y altamente organizada como la glicoproteína del virus de estomatitis vesicular Indiana (VSV-IND).

In vivo, empleando ratones transgénicos como modelo, se puede observar que la diferencia de inmunogenicidad de los antígenos dependiendo de su organización es absoluta: los ratones son tolerantes a antígenos poco organizados mientras que responden al mismo antígeno si éste está presente de manera altamente organizada y repetitiva (141).

Otros antígenos multiméricos, inducen una respuesta de tipo IgM junto con una cooperación indirecta de los linfocitos T (antígenos TI 2). Los linfocitos B son activados por antígenos monoméricos u oligoméricos dando origen a una respuesta IgM así como a la respuesta de larga duración de IgG, IgA, IgE sólo en presencia de cooperación de linfocitos T.

5.8 ¿Qué mecanismos regulan la activación de los linfocitos B por antígenos con un arreglo organizado y repetitivo?

La activación de los linfocitos B por antígenos que tienen determinantes organizados en un contexto organizado y repetitivo se ha visto regulada a tres niveles: 1) la localización del antígeno en los órganos linfoides secundarios, 2) la activación de los linfocitos B de manera T independiente debido a un eficiente entrecruzamiento del BCR y 3) activación de los linfocitos B a través de señales mediadas por PRR, particularmente TLR.

5.8.1 Distribución del antígeno en órganos linfoides secundarios

Ada et. al., habían observado que cuando se administraba a ratas flagelina de *Salmonella adelaide* en forma de flagelo, la cantidad de antígeno

detectado en ganglios era alrededor de 10 veces mayor comparando con la cantidad de antígeno localizado en tejido linfoide cuando se administraba la flagelina sin polimerizar (167).

Posteriormente, Loor, marcando con ^{14}C al virus del mosaico del tabaco (TMV) encontró que las partículas virales podían localizarse en mayor concentración en comparación de discos o de monómeros de la proteína de cápside (CP). Además encontró que el contenido de antígeno presente en los órganos linfoides disminuye con mayor velocidad cuando se administran ^{14}C monómeros de CP TMV o ^{14}C CP formando discos en comparación del ^{14}C TMV intacto (168).

Las diferentes velocidades de degradación de estructuras menos rígidas (como los monómeros y los discos) y de TMV pueden deberse a diferencias en su estabilidad, debido a que Caspar, en 1963, describió que la interacción entre el RNA y las subunidades de proteína estabilizan el ensamblaje del virus (168).

5.8.2 Activación de los linfocitos B a través del BCR

Se han descrito tres mecanismos para la inducción de la respuesta de anticuerpos, la natural o espontánea, la T independiente y la T dependiente.

Los anticuerpos naturales son secretados de manera constitutiva por los linfocitos B-1 residentes en la cavidad peritoneal (169, 170).

Se reconoce que para la activación de los linfocitos de manera antígeno-específica, se requiere del entrecruzamiento del BCR por el antígeno. Ciertos antígenos que tienen un arreglo repetitivo, como las glicoproteínas de algunos viriones o el lipopolisacárido de las bacterias Gram negativas se comportan como antígenos T independientes (171, 172) debido a que pueden entrecruzar eficientemente el BCR, a diferencia de los antígenos monoméricos que requieren de la participación de linfocitos T para inducir la respuesta de anticuerpos.

Se han hecho estudios con polímeros haptenados que mimetizan la distribución repetitiva de los determinantes de antígenos T independientes, en los que se ha demostrado que arreglos de 20 a 30 haptenos con un espacio de entre 5 a 10 nm pueden activar eficientemente a los linfocitos B en ausencia de linfocitos T (173, 174), lo que correlaciona con la respuesta humoral inducida por algunos virus (141, 175, 176).

Además, recientemente se ha demostrado que la dependencia de la respuesta de anticuerpos IgG es una relación de la densidad de los epitopos (177) y además se ha observado que la presencia de un epitopo expresado en alta densidad induce la respuesta inmune protectora (178).

Esto concuerda con observaciones realizadas después de la administración de vacunas a base de virus vivos o atenuados, las cuales inducen inmunidad y generalmente se administran en ausencia de adyuvantes, como por ejemplo, la vacuna contra viruela, rubéola y polio (179, 136). En contraste, las vacunas a base de subunidades monoméricas requieren de la administración de adyuvantes para inducir una respuesta eficiente de anticuerpos (136,179).

Recientemente, se ha demostrado que la expresión de determinantes antigénicos de manera repetitiva favorece la inducción de anticuerpos con una mayor constante de afinidad (180), lo que soporta la teoría de que la densidad de epitopos es un marcador de los antígenos exógenos (136,179). A través de evidencia experimental, Zinkernagel y Bachmann (179, 171, 181, 182), han puesto de manifiesto que los anticuerpos neutralizantes poseen algunas características especiales cuando se comparan con los anticuerpos que no son neutralizantes dirigidos contra el mismo epitopo: los anticuerpos neutralizantes deben tener una K_a de $10^{-8}M^{-1}$ o mayor, mientras que los anticuerpos que tienen una K_a de $10^{-7}M^{-1}$ o menor no son protectores.

A partir de estos datos se sugiere que el incremento de la densidad de epitopos en cada molécula (proteína) amplifica la avidez promedio de la interacción con anticuerpos monoclonales, esto puede incrementa el

reconocimiento de proteínas con alta densidad de epitopos, así como la interacción con los CDR de la Ig de superficie en los linfocitos B inmaduros (180) .

Se sabe que la activación de los linfocitos B involucra dos señales (183): una señal antígeno específica a través del entrecruzamiento de BCR y una segunda señal que generalmente la aportan los linfocitos Th. Sin embargo, algunos antígenos pueden activar a los linfocitos B independientemente de T entre los cuales se pueden distinguir dos grupos (184): 1) antígenos TI-1 que pueden activar los linfocitos B sin necesidad de segunda señal, de manera policlonal, por ejemplo el lipopolisacárido (LPS) o bien de manera antígeno específica, por ejemplo VSV (176) o poliovirus y 2) antígenos TI-2 necesitan de la ayuda de T para activar a los linfocitos B (polisacáridos poliméricos)(185).

El entrecruzamiento del BCR lleva a la agregación de los BCR posterior a la cual ocurre una compleja cascada de señalización (186, 187) lo que lleva a la movilización del Ca^{2+} intracelular dependiente de la cinasa de tirosina de Bruton (Btk) (188) y es a través de este mecanismo que se explica la independencia de T en la activación de los linfocitos B por antígenos multivalentes. Sin embargo, los antígenos TI-2 requieren de una segunda señal para la inducción de la producción de anticuerpos (189).

Para explicar el requerimiento de esta segunda señal se han propuesto dos sistemas: uno a través de la modulación a través del complejo CD19/CD21 y otro a través la activación de TLR expresados en los linfocitos B.

CD21 participa en el complejo que forma el BCR, en el que se incluye CD19, CD81 y Leu-13 (190, 191). Se ha observado que la unión a CD21 junto con el entrecruzamiento de mIgM reduce el umbral de afinidad requerido para la activación de los linfocitos B (192), además de que incrementa la activación de fosfo lipasa C γ (PLC γ) inducida por Btk, lo que incrementa el flujo de calcio, favoreciendo la activación del linfocito B.

La participación de los TLR en la activación de los linfocitos B se discute posteriormente.

5.8.3 Reconocimiento a través de PRR

La primera línea de defensa contra los antígenos está conformada por la respuesta inmune innata. En la actualidad, además de esta función se le ha reconocido al sistema inmune innato como el principal mediador en la activación del sistema inmune adaptativo.

Las células del sistema inmune innato presentan en su superficie moléculas que reconocen los arreglos moleculares presentes en los microorganismos. A este sistema ligando-receptor se le ha denominado PAMP-PRR (patrones moleculares asociados a microorganismos – receptores de reconocimiento de patrón) (193, 194).

En la clasificación de PRR, además de los receptores anclados a la membrana de las células del sistema inmune innato (receptores scavenger –SR-, receptores tipo Toll –TLR-, receptores tipo NOD –NLR-, receptores tipo RIG-I –RLR-, receptores tipo lectinas tipo C –CLR-, etc), se encuentran componentes del sistema del complemento, las colectinas y los péptidos con actividad antimicrobiana.

Los diferentes PRR, colaboran en la activación de las células del sistema inmune innato a través del reconocimiento de diferentes PAMP. Por ejemplo, se ha descrito que los TLR participan en el reconocimiento de moléculas tan diversas en su naturaleza química como flagelina (195), ácidos nucleicos (196, 197), lipopolisacárido (LPS) (198), péptidoglicano (PGN) (199), lipopéptidos etc. Los NLR por su parte pueden reconocer muramildipéptido (MDP) (200), la toxina de *B. anthracis* (201), flagelina (202), etc y por su parte, los RLR se han visto involucrados en el reconocimiento de dsRNA (203).

Las colectinas tienen un dominio de colágeno y un dominio de lectina y pueden reconocer virus y bacterias (204). En la familia de las colectinas se encuentran clasificados la proteína surfactante A (SP-A) y la proteína que une manosa (MBP). El estudio del reconocimiento de los patrones de

azúcares por la MBP ha derivado en el conocimiento de algunas de las bases del reconocimiento de los patrones moleculares a nivel micro y macromolecular por parte del sistema inmune innato.

MBP reconoce de manera selectiva patrones de carbohidratos presentes en bacterias, levaduras, parásitos, micobacterias y algunos virus (205) y no se ha observado unión a glicoproteínas endógenas.

MBP puede reconocer patrones determinados por la orientación ecuatorial de los grupos hidroxilos en los carbonos 3 y 4 (206, 207). Esta configuración se encuentra en las hexosas N-acetilglucosmina, glucosa y fucosa así como en la manosa. La característica común de diferentes estructuras como LPS, ácido lipoteicoico y mananas es la combinación de estos azúcares y este patrón es ampliamente representado en los microorganismos. En contraste, este micropatrón molecular no se encuentra en glicoproteínas endógenas.

La capacidad de los sitios de unión de la MBP (y otros PRR) de reconocer las estructuras presentes en los microorganismos podría depender de la repetitividad de las estructuras presentes en los microorganismos, lo que facilita la unión al receptor, en contraste las glicoproteínas de animales superiores no tienen arreglos repetitivos en la membrana.

Como resultado de la cooperación de los diferentes PRR expresados en las células del sistema inmune innato, éstas pueden activar las cascadas de señalización hacia el núcleo que tienen como consecuencia la expresión de citocinas pro-inflamatorias así como moléculas de coestimulación necesarios para la óptima activación del sistema inmune adaptativo (208).

La enzima lumazina sintasa de *Brucella spp* (BLS) es altamente inmunogénica (209). BLS es un dímero estable de pentámeros (180kDa) y es resistente a la degradación por urea y es más estable a la desnaturalización por calor que la toxina del cólera y la proteína sensible a calor de *E. coli* (210, 211). Se ha observado que este antígeno estimula BMDC de ratón *in vitro* favoreciendo la expresión de CD40, CD80, CD86 y

MHCII, además induce la producción de IL-6, IL-12p70 y TNF- α vía activación de TLR4 (209).

La participación de antígenos multiméricos en la activación de la respuesta inmune innata, también ha sido estudiada empleando partículas semejantes a virus (VLP).

La proteína de cápside L1 del virus de papiloma humano (HPV) se puede autoensamblar en VLP cuando se produce de manera recombinante (212), los cuales representan un antígeno multimérico altamente ordenado. Se ha observado que cuando se administran en humanos, son capaces de inducir la respuesta de anticuerpos neutralizantes además de inducir una respuesta Th1 protectora (213, 214).

En cuanto a la capacidad de los VLP de HPV de activar la respuesta inmune innata, se ha demostrado que estos VLP inducen la activación de células dendríticas derivadas de médula ósea, favoreciendo la producción de IFN γ , IFN α e IL-12 bajo un mecanismo dependiente de MyD88 (215, 216) y que la respuesta de anticuerpos TI inducida por estos VLP también es dependiente de MyD88 (217).

Recientemente, en el modelo de ratón, se reportó que el baculovirus (BV), un virus no patógeno en mamíferos, es capaz de inducir tanto la maduración de células dendríticas *in vivo* como la producción de citocinas proinflamatorias IL-12p40, IL-12p70, IL-6, IFN- γ , MIG e IP-10. Además, también se observó que BV es capaz de inducir un efecto adyuvante en la respuesta de anticuerpos y en la respuesta celular con antígenos co-administrados con BV, este efecto inmunomodulador es dependiente de la viabilidad del virus, ya que cuando éste se inactiva, el efecto adyuvante así como su capacidad de activar al sistema inmune innato se ve disminuida (218). El efecto adyuvante de BV probablemente esté mediado por la señalización a través de TLR9 debido a que el DNA de BV tiene un gran contenido de CpG (219).

5.8.3.1 Regulación de la respuesta de anticuerpos por TLR

Los TLR pueden detectar a los microorganismos y tienen un papel esencial en la inducción de la respuesta inmune (193, 220, 221). MyD88 es una molécula adaptadora de la señalización por TLR crítica para la inducción de la respuesta inmune adaptativa dependiente de TLR (222, 223). Se ha observado que la activación de linfocitos T CD4⁺ y la producción de IFN γ son deficientes en ratones knockout de MyD88 (221, 222, 223) . Además, la respuesta de IgM e IgG1 antígeno específicas a antígeno T dependientes está considerablemente reducida mientras que la respuesta IgG2 está completamente abatida en estos ratones.

También se ha reportado que la respuesta de IgM es deficiente en ratones con células B knockout de TLR4 y MyD88, pero no en ratones con células B knockout de CD40 lo que indica que los TLR y CD40 tienen distintos papeles en la activación de linfocitos B y en el cambio de isotipo. Entonces, al menos para la activación primaria de los linfocitos B, los TLR y la cooperación de T tienen papeles diferentes pero complementarios (224).

La señalización por TLR en linfocitos B afecta diferentes estadios de la activación. El incremento en la presentación de antígeno por linfocitos B después de la activación por TLR probablemente contribuye al desarrollo de la reacción de centro germinal y la subsecuente inducción de Blimp-1 y la expresión concomitante de Bcl-6 (225, 226) en linfocitos B de centro germinal permitiendo la eficiente diferenciación a células plasmáticas.

Los TLR están entonces involucrados en el control de respuesta de anticuerpos a antígenos T dependientes en al menos dos maneras. Una, la señal por TLR induce la maduración de DC y la activación de Th que es requerida para la cooperación a linfocitos B, principalmente a través de la interacción CD40/CD40L y citocinas. Segundo, los TLR expresados en linfocitos B tienen un papel directo en la activación de linfocito B y la producción de anticuerpos. Esta función de los TLR en linfocitos B puede ayudar a determinar el origen microbiano de los antígenos reconocidos por el BCR y ayudar la respuesta contra agentes infecciosos. La unión de TLR

en linfocitos B autoreactivos no promueve la activación de linfocitos B debido a la señal de tolerancia que se transduce por el BCR autoreactivo (227). El reconocimiento conjunto BCR-TLR es requerido para la óptima respuesta humoral (228).

La respuesta de anticuerpos anti-LPS es importante para el control de las infecciones por bacterias Gram-negativas. Se había observado que la estimulación de los linfocitos B con LPS favorecía su capacidad de presentación de antígeno así como la proliferación y la producción de anticuerpos anti-LPS con actividad neutralizante (229, 230). Los linfocitos B, además de expresar TLR-4, que es el receptor de LPS, expresa otro miembro de la familia de los TLR, RP105, cuya expresión está restringida a los linfocitos B maduros (231, 232, 233). Se había observado que la unión de un ligando a RP105 en los linfocitos B promueve la expresión de moléculas de clase II así como de moléculas coestimuladoras, lo que sugería su participación en la activación de los linfocitos B (231, 234).

Cuando se analizó la respuesta de anticuerpos en ratones deficientes de RP105 en ratones inmunizados con TNP-LPS se observó que se producían menores títulos de anticuerpos IgM e IgG3 en comparación con los ratones control. Sin embargo, cuando los ratones fueron inmunizados con antígenos TI (NP-Ficoll) y TD (NP-CG) se inducían títulos semejantes de anticuerpos que los ratones control. Estos datos sugieren una colaboración de TLR4 y RP105 en la activación de los linfocitos B después de la estimulación (235).

Cuando se analizaron los requerimientos de la señalización por TLR en los linfocitos B en la respuesta a antígenos TI-2, se observó que la flagelina puede funcionar tanto como antígeno T dependiente como T independiente debido a su capacidad de polimerizar. Además, la flagelina es ligando de TLR5, (195) que es expresado por linfocitos B.

La inmunización con flagelina de ratones μ MT que han recibido linfocitos B wt responden una fuerte respuesta IgM, IgG1 (T dependiente) e IgG3 (T independiente) anti-flagelina. μ MT que han recibido linfocitos B knockout

MyD88 tienen respuesta IgM e IgG1 deficiente. Sin embargo, estos ratones tienen IgG3 normal comparando con los ratones que recibieron linfocitos B wt. Luego entonces, la señalización por TLR en los linfocitos B no es necesaria para la inducción de la respuesta IgG3.

La inmunización con flagelina de ratones knockout MyD88 no sólo se caracteriza por una producción deficiente de IgM e IgG1 sino que también tienen una respuesta IgG3 deficiente en comparación con los ratones normales, sugiriendo que la señalización por TLR en otros tipos celulares (posiblemente DCs y macrófagos) pero no en linfocitos B se requiere para la generación de una respuesta óptima de IgG3 (224).

Recientemente, se reportó que la inmunización con la proteína de fusión OVA-flagelina resulta en el incremento en la respuesta humoral y celular contra OVA. El efecto adyuvante observado es dependiente de la unión de OVA con flagelina, ya que la co-administración de ambos no impacta en la respuesta humoral y celular. Estas observaciones sugieren que el uso de proteínas de fusión que puedan ser reconocidas por TLR pueden ser una adecuada estrategia de vacunación que no requiera el uso de los adyuvantes convencionales (236).

5.9 ¿De qué manera la adición de agentes adyuvantes incrementan la inmunogenicidad de las vacunas?

Los adyuvantes se definen por su capacidad de incrementar la inmunogenicidad *in vivo* de los antígenos con los que son coadministrados. Los adyuvantes representan un componente importante de muchas de las vacunas exitosas, particularmente las basadas en subunidades de patógenos, incluyendo subunidades purificadas de los patógenos y antígenos recombinantes (237).

De manera general, se espera que la administración de adyuvantes promueva el establecimiento de inmunidad de larga duración (238). Recientemente, se ha considerado dentro de los mecanismos a través de

los cuales funcionan los adyuvantes su capacidad de activar la respuesta inmune innata, lo que tiene como consecuencia una mejor activación de los linfocitos T y B (239, 240).

Las estrategias de defensa innata están enfocadas al reconocimiento de patrones conservados. Esta estrategia esta mediada por diversas familias de receptores de patrones (PRRs) (193) que se han conservado a través de la evolución. Estos patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) que son reconocidos son compuestos estructuralmente y químicamente diversos, pero que comparten en común la característica de estar altamente conservados en los patógenos y ausentes en los organismos multicelulares (221, 240).

Es importante tomar en cuenta que los agentes infecciosos y la mayoría de las vacunas disponibles, contienen todos los componentes necesarios para la activación de una respuesta inmune integral. Esto es porque los patógenos empleados en las vacunas poseen todos los antígenos relevantes en forma particulada y también contienen PAMP.

Sin embargo, el objetivo del diseño de vacunas es remover productos bacterianos tóxicos y se ha purificado los antígenos y/o producido de manera recombinante (237) sin afectar la inmunogenicidad del antígeno de interés.

Así, el reto en el desarrollo de vacunas a base de subunidades (que generalmente al ser purificadas carecen de su actividad inmunoreguladora intrínseca), es reintroducir selectivamente las señales de activación de la respuesta inmune innata.

En el desarrollo de vacunas, la elección del adyuvante es tan importante como la selección del antígeno.

El término adyuvante se deriva del latín *adyuvare* que significa ayudar. Recientemente, su desarrollo está enfocado a la activación de la inmunidad innata para así regular una fuerte respuesta inmune adaptativa y la memoria de larga duración (241).

El control de los TLR en la interfase del sistema inmune innato y el adaptativo es un instrumento eficaz en el desarrollo de vacunas que contengan ligandos de TLR. Algunos ejemplos se presentan en la tabla 2.

TLR	Ligando	Adyuvante	Referencia
1 + 2	Triacil lipopéptidos	Pam3Cys	242
2 + 6	Diacil lipopéptidos	MALP-2	243
		Pam2Cys	244
2	PGN	Porinas de Neisseria	245
		BCG	246
		CFA	223
3	dsRNA	Poly I:C	247
4	LPS	MPL A	248
		RC-529	248
		MDF2 β	249
		BCG	246
		CFA	223
	Otros análogos de LPS	250	
5	Flagelina	Flagelina	251
7/8	SsRNA	Imiquimod	252
		Resiquimod	253
		3M-012	254
9	Bacterial or viral DNA	CpG ODN	255

TABLA 2. Ejemplos de vacunas que señalizan por TLR.

Para la mayoría de las vacunas disponibles, el grado de unión a TLR no ha sido estudiado. Algunas excepciones incluyen BCG y la vacuna HiB conjugada con la porina de *Neisseria* (256).

La activación a través de TLR es probablemente un importante mecanismo a través del cual las vacunas vivas atenuadas confieren inmunidad protectora. Para otros tipos de vacunas, el papel de los TLR no se ha evaluado y podría variar en las diferentes vacunas.

Las vacunas compuestas por elementos de patógenos muertos probablemente contengan ligandos de TLR, pero no hay evidencia hasta la fecha de que la inmunogenicidad de estas vacunas este influenciada por la unión a TLR. A continuación se describe la participación de la señalización por TLR en la inmunogenicidad de las vacunas dirigidas contra *Borrelia burgdorferi*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Haemophilus influenzae* b.

La vacunación con la lipoproteína de superficie externa (OsPA) de *Borrelia burgdorferi* ha sido utilizada para prevenir efectivamente la enfermedad de Lyme (257). La respuesta a OsPA en ratones involucra la señalización por TLR2, mediada por MyD88, IRAK y TRAF6 (258). De manera notable, las células mononucleares de individuos que son respondedores bajos a la vacuna tienen baja expresión de TLR1 pero no tienen la expresión de TLR2 alterada (259). Los ratones TLR1 y TLR2 -/- son incapaces de montar la respuesta protectora después de la vacunación con OspA.

Mycobacterium bovis vivo BCG, es la única vacuna actualmente disponible para la prevención de tuberculosis. Los componentes de BCG incluyen el esqueleto de la pared celular y peptidoglicano que activa TLR2 y TLR4 de manera MyD88 dependiente (260, 261). La influencia de MyD88 en el efecto protector de BCG contra la infección con *M. tuberculosis* se ha evaluado en el modelo de ratón. La inmunización con BCG protege inicialmente a ratones MyD88-/- contra el reto, sin embargo los ratones vacunados eventualmente sucumben a la infección (262).

Tres diferentes preparaciones vacunales contra *H. influenzae* b han sido aprobadas para su uso en Estados Unidos: conjugado con proteína de meningococo (OMPC) (HiB-OMPC), toxina diftérica (HiB-CRM) y toxoide tetánico (HiB-TT).

Cuando se analizó la dependencia de estas vacunas en la señalización por TLR se encontró que los ratones TLR2-/- tuvieron una respuesta de anticuerpos alterada después de la vacunación con HiB-OMPC (263).

De manera general, las vacunas a base de subunidades, principalmente aquellas en las que se incluyen proteínas recombinantes, tienen baja

inmunogenicidad debido a que pueden ocurrir defectos en el plegamiento de la proteína lo que afecta su reconocimiento por el sistema inmune.

Las partículas semejantes a virus (VLP) representan una alternativa para este tipo de vacunas, ya que son eficientemente reconocidas por el sistema inmune debido a que presentan a las moléculas en una conformación mas cercana a la que presentan en el patógeno (264). Además, el empleo de VLP como estrategia de vacunación implica la administración de menores dosis de antígeno para inducir la eficiente activación de linfocitos B y T (CD4⁺ y CD8⁺) necesarias para inducir la respuesta inmune protectora (265, 266, 267).

5.10 Los VLP como alternativa a las vacunas a base de subunidades

Las proteínas estructurales de diferentes virus tienen la capacidad de ensamblarse en arreglos repetitivos o partículas semejantes a virus (VLP), cuando se expresan de manera recombinante utilizando diferentes sistemas de expresión. Los VLP, tienen en promedio un tamaño similar al de los virus (22-150nm), y tienen las mismas características morfológicas dependiendo de la proteína viral que se trate. Además, los VLP no son infecciosos debido a que se ensamblan sin incorporar el material genético de virus.

En algunos casos, los VLP generados tienen la misma morfología que las partículas virales de las que provienen, por ejemplo, la expresión de la proteína de superficie del virus de hepatitis B (HBV) en levaduras o en células de mamífero, da lugar a la formación de VLP de 22nm que son idénticos a HBV. De manera similar, la expresión de la proteína L1 del virus del papiloma humano (HPV) lleva a la formación de VLP similares a los viriones generados durante la replicación de HPV.

Debido a que existen virus envueltos y no envueltos, se cuenta con diferentes alternativas para la generación de VLP. En el caso de virus no envueltos (HPV) o antígenos de superficie de virus envueltos (HBcAg), una

o más proteínas de cápside deben ser expresadas para lograr el ensamblaje (HPV). En el caso de virus envueltos, los VLP pueden ensamblarse a partir de proteínas de envoltura con o sin proteínas de la matriz o de la cápside. Algunos ejemplos de VLP se presentan en la Tabla3.

Virus	Composición	Sistema de expresión	Tamaño (nm)	Referencia
HBV	Proteína pequeña de envoltura (HBsAg)	levadura	22	268, 269
HPV	Proteína L1	Células mamífero Baculovirus levadura	40-50	270, 212, 271, 272
HEV	Proteína principal de cápside (truncada)	baculovirus	23.7	273, 274, 275, 276
Influenza	Hemaglutinina Neuroaminidasa matriz	baculovirus	80-120	277, 278, 279
HCV	E1 E2	baculovirus	40-60	280, 281, 282, 283
Virus de polio	Proteínas de cápside VP0,1,3	baculovirus	27	284
HIV	Pr55gag, envoltura	Baculovirus Células mamífero levadura	100-120	285, 286, 287, 288, 289
Rotavirus	VP2, VP6, VP7	baculovirus	70-75	290, 291, 292

TABLA 3. Ejemplo de VLP generados a partir de proteínas estructurales derivadas de virus que infecten mamíferos.

Los VLP se han considerado como plataformas para la presentación de epitopos o moléculas de interés en vacunación a través de la generación de VLP quiméricos. Esto se logra a través de la inserción de la secuencia que codifica para el antígeno de interés en la secuencia de la proteína viral con la que genera el VLP. De manera alterna, las proteínas externas se pueden conjugar químicamente a VLP preformados. En el desarrollo de esta estrategia se han considerado VLP derivados de virus que infectan mamíferos y recientemente se han incluido como herramienta VLP

derivados de virus vegetales. Algunos ejemplos de estos VLP quiméricos se presentan en las Tablas 4A y 4B.

VLP derivados de virus que infectan mamíferos

Plataformas	Antígeno	Sistema de Expresión	Referencia
HBc	GFP, epitopos de malaria, HBV preS1, epitopos inmunodominantes de bacterias y protozoarios	E. coli	293, 294, 295, 296, 297, 298
HBs	HCV HVR1, proteína de envoltura del virus de dengue, epitopo 2F5 de HIV gp41	Células de Mamífero, plantas de tabaco, levaduras	299, 300, 301, 302, 303
HPV	SHIV, HPV E6/E7	Baculovirus	304, 304, 305
HIV, SHIV gag	Diferentes epitopos de envoltura de HIV	Baculovirus, células de mamífero	288, 289
Phage Q β	Nicotina	E. coli	306

TABLA 4A. Ejemplos de VLP derivados de virus que infectan a mamíferos que se han empleado como sistemas de expresión de péptidos heterólogos de interés en el desarrollo de vacunas.

VLP derivados de virus de plantas

Plataformas	Antígeno	Referencia
Virus de mosaico del tabaco (TMV)	Péptido de HIV-I	307
	Péptido de la hemaglutinina del virus de influenza	307 308
	Péptido del parásito de malaria	309
	Péptido de zona pelucida ZP3 murina	
Potato virus X	Péptido de gp41 de HIV-I	310
	Péptido de FnBP de Staphylococcus aureus	311
Plum pox virus	Péptido VP2 de parvovirus canino	312
Cowpea mosaic virus (CPM)	Péptido de HIV-I	313
	Péptido de OmpF de P. aureginosa	314
	Péptido de FnBP de S. aureus	311
	Epitopo de VP2 de FMDV	315
	Epitopo VP2 de parvovirus canino	316
Tomato bushy stunt virus	Péptido de gp120 de HIV-I	317

TABLA 4B. Ejemplos de VLP derivados de virus que infectan a vegetales que se han empleado como sistemas de expresión de péptidos heterólogos de interés en el desarrollo de vacunas.

Debido a la gran flexibilidad que presentan los VLP de virus vegetales para la expresión de secuencias de interés en vacunación tanto en el extremo C-terminal (309, 307, 308), N-terminal (318, 319) como en las asas (320, 308) de la proteína de cápside, estos sistemas se consideran como atractivas herramientas en el desarrollo de vacunas a base de subunidades.

Los VLP derivados de virus vegetales han demostrado ser inmunógenos capaces de inducir tanto la respuesta humoral como celular (321) además de tener propiedades adyuvantes (322).

Además de las ventajas biotecnológicas y fisicoquímicas de los VLP de virus vegetales, sus propiedades inmunogénicas los convierten en herramientas atractivas en el desarrollo de vacunas a base de subunidades que confieran protección de larga duración.

6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El objetivo de las diferentes estrategias de vacunación es la inducción de la respuesta inmune protectora de larga duración. Se ha observado que las vacunas capaces de establecer este estado son aquellas a base de microorganismos atenuados o a base de subunidades administradas con adyuvantes. En el desarrollo de vacunas el punto crucial es la elección del antígeno, sin embargo, hasta la fecha no se han caracterizado las propiedades de los antígenos capaces de inducir la respuesta inmune protectora de larga duración.

7. HIPÓTESIS

Los antígenos con un arreglo molecular organizado y repetitivo podrán ser reconocidos de manera eficiente tanto por el sistema inmune innato (PAMP) como por el sistema inmune adaptativo (antígeno) traduciendo la respuesta inmune innata en una respuesta inmune adaptativa protectora de larga duración.

8. OBJETIVO

8.1 Objetivo general

Estudiar la contribución de la organización y repetitividad antigénica en la inducción de la respuesta inmune de anticuerpos protectores de larga duración.

8.2 Objetivos particulares

- 1) Determinar si el PapMV es reconocido por el sistema inmune innato como PAMP.
- 2) Determinar si el PapMV tiene propiedades adyuvantes.
- 3) Generar VLP PapMV con afinidad a las porinas OmpC y OmpF de *S. typhi* para comparar la capacidad de diferentes niveles de organización de las porinas OmpC y OmpF de *S. typhi* de inducir la respuesta de anticuerpos de larga duración.
- 4) Evaluar la capacidad de diferentes niveles de organización de las porinas OmpC y OmpF de *S. typhi* para inducir la respuesta inmune protectora.
- 5) Evaluar la capacidad de diferentes niveles de organización de la porina OmpC de *S. typhi* para inducir la respuesta inmune protectora de larga duración.

9. MODELOS EXPERIMENTALES

9.1 Virus de mosaico de la papaya (PapMV)

El virus de mosaico de la papaya (PapMV) es miembro de la familia de los Potexvirus. Es un virus filamentoso de 500nm de longitud y 15nm de diámetro, compuesto por 1400 subunidades de la proteína de cápside (CP) (323) ensambladas alrededor de una molécula (+)RNA de 6656 nucleótidos (324).

La capacidad inmunogénica de PapMV ha sido evaluada en ratones, y se ha observado que es capaz de inducir la respuesta de anticuerpos de larga duración caracterizada por la producción y mantenimiento de altos títulos de todos los isotipos de IgG (IgG2b>IgG3>IgG2a>IgG1). Esta respuesta de anticuerpos de larga duración se observó en ausencia de adyuvantes externos, es independiente de la vía de administración y del fondo genético.

Además de inducir la respuesta de anticuerpos de larga duración, PapMV induce la producción de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-6) por macrófagos derivados de médula ósea así como la expresión de marcadores de activación en células dendríticas (CD80, CD40).

Cuando PapMV se coadministra con antígenos modelo, por ejemplo OVA, ejerce un efecto adyuvante en la producción de anticuerpos favoreciendo incluso el cambio de isotipo.

La CP de PapMV tiene dos residuos de metionina (posiciones 1 y 6), para generar la construcción para la producción de VLP se deletaron los primeros cinco residuos de aminoácido al extremo N-terminal (CP Δ N5). Además, se adicionó un tag 6xHis en el extremo C-terminal de CP para facilitar la purificación de la proteína recombinante (325).

Empleando como sistema de expresión *E. coli* BL21 se observó que CPΔN5 es capaz de autoensamblarse en forma de VLP de una décima parte de longitud con respecto al virus nativo.

Se estima que la estructura secundaria de CPΔN5 consiste en 49% de α-hélices, porcentaje similar al que presenta el virus del mosaico del tabaco (TMV) (326).

Los VLP de PapMV son igualmente resistentes a la desnaturalización por calor que el virus silvestre, sin embargo son más sensibles a la degradación por tripsina (325).

Los VLP de PapMV han sido probados como acarreadores de péptidos heterólogos de interés en vacunación, observándose que es capaz de inducir la respuesta de anticuerpos anti-péptido de larga duración (327) caracterizada por un perfil Th1/Th2, además se observó que la capacidad adyuvante de la proteína de cápside de PapMV es dependiente de su multimerización en forma de VLP (327).

Adicionalmente, los VLP PapMV también son capaces de inducir la presentación cruzada de antígeno, favoreciendo así la activación de linfocitos T CD8⁺ (328).

Recientemente se ha propuesto a los virus vegetales como plataformas acarreadoras de proteínas completas (329) observándose también un efecto adyuvante en la respuesta de anticuerpos, lo que abre una nueva ventana de posibilidades para el mejoramiento de vacunas a base de subunidades.

9.2 Porinas de *Salmonella enterica* serovar Typhi

Debido a su gran infectividad y distribución geográfica, la fiebre tifoidea representa un problema de salud mundial. El agente etiológico de esta enfermedad es *Salmonella enterica* serovar Typhi, la ingestión de 10⁵ bacterias resulta en el desarrollo de la enfermedad (330).

Esta enfermedad está asociada a una pobre infraestructura sanitaria y la ingestión de la bacteria se relaciona con el consumo de agua y alimentos contaminados y se estima que anualmente se presentan alrededor de 16 000 000 casos que resultan en 600 000 muertes (331, 332).

La vacunación contra la fiebre tifoidea es considerada como una herramienta efectiva para la prevención de la enfermedad. En el mercado actualmente se dispone de dos tipos de vacunas 1) la vacuna a base de bacteria viva atenuada –Vivotif- (de administración oral) y 2) la vacuna basada en la subunidad Vi (de administración im o sc).

A pesar de la efectividad de estas vacunas, su empleo se encuentra restringido a adultos debido a los efectos secundarios asociados a su administración. Además, ninguna de estas vacunas es práctica para su uso en programas ampliados de vacunación en las zonas endémicas, por lo tanto, es necesario el desarrollo de nuevas vacunas que sean baratas, que no requieran cadena fría y que induzcan inmunidad protectora de larga duración.

En el diseño de vacunas a base de subunidades contra la fiebre tifoidea que confieran protección de larga duración, se han considerado a las proteínas de membrana externa o porinas. Las porinas son las proteínas más abundantes en la membrana externa de las bacterias Gram-negativas. Las porinas de *Neisseria*, *Shigella* y *Haemofilus* son agonistas de TLR2 e inducen la expresión de moléculas coestimuladoras y producción de citocinas en las APC además de la activación de los linfocitos B (245, 333, 334).

Se ha observado que los pacientes en fase aguda y convaleciente, así como las personas que han recibido Vivotif producen altos títulos de anticuerpos anti-porinas (335, 336).

Nuestro grupo ha desarrollado un candidato a vacuna contra la fiebre tifoidea base de porinas de *Salmonella typhi*.

La preparación consiste en 20µg porinas (mezcla de las porinas OmpC y OmpF) en 1 mL de buffer Nikaido diluido (0.8µg SDS/mL) como vehículo,

con una posología recomendada de 10µg porinas por vía sc. En un ensayo preclínico este candidato a vacuna demostró ser seguro observándose reacciones adversas sistémicas (dolor de cabeza, fatiga) y locales mínimas (dolor, enrojecimiento, induración) que se resuelven en pocas horas después de la administración.

La inmunización con porinas de *Salmonella typhi* resulta en la producción de anticuerpos IgM e IgG (IgG1 e IgG2) anti-porinas, los cuales no tienen reactividad cruzada con las porinas de *E. coli* e induce la respuesta celular caracterizada por la producción de IFNγ en ausencia de IL-4 (337).

Cuando se evaluó la capacidad protectora de las porinas de *Salmonella typhi* en ratones se observó que confieren una protección de 90% ante el reto con 500DL₅₀ de *Salmonella typhi* resuspendida en mucina gástrica (338, 339).

En ratones, la respuesta anti-porinas de *Salmonella typhi* es de larga duración con actividad bactericida y no tiene reactividad cruzada con las porinas de *Salmonella typhimurium*. La respuesta de anticuerpos con actividad bactericida de larga duración está dirigida principalmente contra la porina OmpC (79).

10. MATERIALES Y MÉTODOS

Antígenos

PapMV.

Para purificar el PapMV de hojas de *C. papaya* se emplea el método modificado de Ericsson y Bancroft.

150 gr. del tejido infectado se macera con 300 mL solución reguladora de fosfatos 0.05M pH 7,0, 0.01 M EDTA y 0.5% de sulfito de sodio (w/v). Se adiciona β -mercaptoetanol a una concentración final de 0.1% (v/v). El homogenizado se pasa por fibra de algodón y se agrega Tritón X-100 a una concentración final de 1% (v/v). Se agrega $\frac{1}{4}$ del volumen de cloroformo agitando constantemente. La emulsión se centrifuga a 5800 g/10 min/ 4°C. La fase acuosa se colecta y se precipitan las partículas virales adicionando 1% (w/v) de polietilenglicol (PEG 8000) y se incuba 1.5 hr a 4°C.

Las partículas virales se centrifugan a 7600 g/10min/4°C y se resuspende el botón en 40 mL de solución amortiguadora de fosfatos pH 7.0. Se repite la centrifugación y se resuspende el último botón en 9 mL de solución amortiguadora de fosfatos pH 7.0 y se adiciona a una solución 30% de sacarosa (10mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1 mM EDTA) y se centrifuga a 86 500 g durante 3,5 hr a 4°C.

El botón se solubiliza en 1 mL de solución amortiguadora de fosfatos pH 7.0 y se incuba 12 horas a 4°C. Se centrifuga a 7600 g/10min/4°C.

Se determina la pureza del virus determinando la densidad óptica 260 y 280 nm. El ϵ de PapMV es 2.3 a 260 nm.

HEL (Research Organics Inc., Cleveland, OH, USA). LPS de *E. coli* O111:B4 (Sigma-Aldrich).

Las porinas de *Salmonella typhi* (OmpC y OmpF) se purificaron de acuerdo al método descrito en (337). Las cepas *Salmonella typhi* STYF302 (OmpF-) y *Salmonella typhi* STYC171 (OmpC-) se emplearon como fuente de las porinas OmpC y OmpF respectivamente.

Cepas bacterianas

Salmonella typhi (wt) ATCC 9993.

Animales de experimentación

Ratones BALB/c (Harlan, Mexico y Charles River, Canadá) de 6–8 semanas de edad, se mantuvieron en condiciones libres de patógenos específicos (SFP) en las instalaciones del Bioterio de la Unidad de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina, UNAM o en las instalaciones del Bioterio del Centre de Recherche en Infectiologie, Université Laval, Quebec, Canadá. Los estudios fueron aprobados por el Comité Nacional de Investigación Científica del IMSS (Project No. 2005-785-016).

Activación y proliferación de linfocitos B.

Para los ensayos de activación, un millón de linfocitos B de bazo se incubaron con PapMV (1µg/mL) durante 18 horas y durante 80 horas para el análisis de la diferenciación a células plasmáticas y la capacidad de proliferación. LPS (10µg/mL) de *E. coli* 0111:B4 (Sigma-Aldrich) se empleó como control positivo. El análisis por citometría de flujo se realizó incubando las células con los anticuerpos: CD44-FITC, MHC II-PE, CD86-FITC, CD22-PE, CD138-PE y B220-APC (BD Pharmingen). Para el análisis de la capacidad de proliferación 50 millones de células se resuspendieron en 1 mL PBS con 1µL de CFSE (1mM) (Molecular Probes, Eugene, OR,

USA). Los eventos fueron adquiridos en el equipo FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose California USA) y analizados con el software CellQuest (Becton Dickinson).

DTH

Ratones BALB/c se inmunizaron sc en el cojinete plantar con 30 μ g PapMV wt, 30 μ g PapMV inactivado con luz UV. Los ratones control recibieron solución Tris-HCl pH 6.8 o solución salina inyectable. Al día 7 todos los ratones se retaron con 3 μ g PapMV por vía sc en la oreja. El incremento del grosor de la oreja se determinó 24 horas posteriores al reto empleando un micrometro digital (Mituyoto, Tokyo, Japón).

Activación in vivo de DC, M ϕ y linfocitos B

Ratones BALB/c (7 semanas de edad) fueron inmunizados ip con 30 μ g PapMV o 50 μ g Poly I:C en un volumen final de 500 μ L de solución salina. 24 horas posteriores, el bazo y los ganglios se disectaron y se preparó la suspensión celular para su análisis por citometría de flujo empleando los siguientes anticuerpos: PE-CD11c, APC-CD11b, B220-PerCP, FITC-CD80, FITC-CD86, FITC-CD40, FITC-CD69 y FITC-MHCII (Todos los anticuerpos fueron obtenidos de BD Pharmingen)

Generación de BMDM

Los monocitos se obtuvieron de medula ósea de ratones BALB/c (de 6 a 8 semanas de edad). Los monocitos se cultivaron en DMEM suplementado con 30% medio condicionado de la línea celular L-929, 20% FBS inactivado y 50% DMEM como se describe en (340).

Generación de BMDC

Los monocitos se obtuvieron de médula ósea de ratones BALB/c (de 6 a 8 semanas de edad). Los monocitos se cultivaron durante 6 días en presencia de factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF) producido por la línea celular X63-GM-CSF (obsequio del Dr. Antonius Rolink, Universidad de Basel). Las DC fueron purificadas por densidad. La pureza de la población fue mayor al 95% (CD11c⁺B220⁻) cuando se analizó a la población por citometría de flujo.

Purificación de macrófagos peritoneales

Los macrófagos peritoneales fueron inducidos con tioglicolato. 1×10^6 células de peritoneo se cultivaron en DMEM (10% FCS, L-glutamina, penicilina/estreptomicina) y se incubaron toda la noche a 37°C. Las células no adherentes se removieron lavando con PBS frío.

Cuantificación de TNF α , IL-6 e IFN- α

1×10^6 BMDM, macrófagos de peritoneo o BMDC se estimularon con $1 \mu\text{g}$ PapMV/mL o 100ng LPS *E. coli* O111:B4/mL (Sigma-Aldrich). Como control se emplearon células sin estimular. A los tiempos indicados en las gráficas, se recuperó el sobrenadante de cultivo y se almacenó a -70°C hasta su análisis. Las citocinas TNF- α , IL-6 e IFN- α se cuantificaron por ELISA (OptEIA sets; BD Pharmingen, San Diego California, USA. PBL Biomedical Laboratories, NJ, USA) de acuerdo a las instrucciones del proveedor.

Inmunizaciones

Grupos de ratones BALB/c fueron inmunizados ip con 2mg de OVA o HEL en ausencia o presencia de adyuvante (30 μg PapMV, CFA 1:1 (v/v) o 5 μg LPS de *E. coli* O111:B4). Los ratones control recibieron solución salina

isotónica. Muestras de sangre se colectaron a diferentes tiempos según se indica en las gráficas. Las muestras individuales de suero se congelaron a -20°C hasta su análisis.

Por vía i.p y ausencia de adyuvante se inmunizaron grupos de 5 ratones (día 0) con los siguientes antígenos: 10µg OmpC, 10µg OmpC + 10µg PapOmpC, 10µg PapOmpC, 10µg OmpF, 10µg OmpF + 10µg PapOmpF, 10µg PapOmpF o solución salina isotónica (SSI). Al día 15, se administró i.p un refuerzo con 10µg OmpC sin adyuvante. A los tiempos señalados en las gráficas, de la vena yugular se tomaron muestras de sangre. La sangre se centrifugó a 3000rpm/5 minutos/4°C. Las muestras se almacenaron a -20°C hasta su análisis.

ELISA

Se fijaron placas de 96 pozos (Nunc) con 100µL de solución de antígeno (100µg/mL de OmpC, 100µg/mL de OmpF, 1 µg/mL PapMV, 100 µg/mL HEL o 150 µg/mL OVA) en solución amortiguadora de carbonatos pH 9,5, incubando 1 hora a 37°C y posteriormente toda la noche a 4°C. Se realizaron 4 lavados con solución H₂O destilada-Tween20 0.1%. Los sitios de unión inespecífica se bloquearon con solución PBS pH 7.4-BSA 2%, incubando 1 hora a 37°C, seguido de 4 lavados con solución H₂O destilada-Tween20 0.1%. Se adicionaron diluciones seriadas en factor de 2, iniciando con dilución 1/40 de los sueros inmunes (100µl/pozo), incubando 1.5 horas a 37°C. Después de 4 lavados con solución H₂O destilada-Tween20 0.1% se adicionó a cada pozo 100µL de una dilución 1:10 000 en solución de bloqueo del anticuerpo secundario (HRP anti-IgM, HRP anti-IgG, HRP anti-IgG1, HRP anti-IgG2a, HRP anti-IgG2b (Jackson Immunochemicals o Zymed (1:1000)), HRP anti-IgG3 (Rockland)), incubando 1 hora a 37°C se realizó una última serie de lavados con solución H₂O destilada-Tween20 0.1%. Para la detección se agregó a cada

pozo 100µL de solución de revelado (TMB peroxidase substrate, Fitzgerald, USA) incubando 10 minutos a 37°C, la reacción se detuvo agregando 100µL H₂SO₄ 2.5N. Se determinó la absorbancia a 450nm en un lector automático de ELISA. El título de anticuerpos se interpreta como 3 veces el promedio de la absorbancia de los controles negativos

Reto

Por vía ip y en ausencia de adyuvante se inmunizaron grupos de 10 ó 5 ratones (día 0) con los siguientes antígenos: 10µg OmpC, 10µg OmpC + 10µg PapOmpC, 10µg OmpF, 10µg OmpF + 10µg PapOmpF, 10µg PapOmpC, 10µg PapOmpF, 10µg OmpC+30µg PapMV wt, 10µg OmpF+30µg PapMV wt o solución salina isotónica (SSI). Al día 15, se administró i.p un refuerzo con 10µg OmpC ó 10µg OmpF respectivamente en ausencia de adyuvante. Al día 21 ó 140 los ratones fueron retados i.p con 100 ó 500 LD₅₀ de *Salmonella typhi* (ATCC 9993) resuspendida en 500µL buffer TE (50mM Tris, pH 7,2, 5mM EDTA) 5% mucina gástrica (Sigma). La protección se definió como el porcentaje de sobrevivientes durante los 10 días posteriores al reto. En nuestras manos 1LD₅₀ = 90 000 UFC.

Selección de los péptidos con afinidad a las porinas OmpC y OmpF

Los péptidos con afinidad a las porinas OmpC y OmpF fueron seleccionados por la técnica de phage display utilizando la librería *Ph.D7 phage display peptide library* de New England Biolabs. El desarrollo de la técnica se llevó a cabo de acuerdo a las instrucciones del proveedor.

Clonación de los péptidos con afinidad a las porinas OmpC y OmpF en el extremo C-terminal de la proteína de la cápside del virus de mosaico de la papaya (PapMV CP)

La secuencia que codifica los heptapéptidos seleccionados fue insertada por PCR en el extremo C-terminal de la proteína de la cápside del virus de mosaico de la papaya (PapMV CP) utilizando la clona $\Delta N5$ CP descrita en (341). Los primers utilizados se muestran en la Tabla 5. La correcta inserción de los heptapéptidos fue confirmada por secuenciación.

Construcción	Primer
PapOmpC1	
Forward	5'CCAATTCCTTCCACCCCCCGAATCTTTGTCGCTTATTCAGACGCACCATCACC ATCACCATTAGTAAGGATCCACTG 3'
Reverse	3'GGTTAAGGAAGGTGGGGGGCTTAGAAACAGCGAATAAGTCTGCGTAGTGGTA GTGGTAATCATTCTAGGTGAC5'
PapOmpC2	
Forward	5'CCAATTCCTTCCACCCCCCGAAGAGGCGAAGGGTTGATTCGTCACCATCAC CAT CACCATTAGTAAGGATCCACTG 3'
Reverse	3'GGTTAAGGAAGGTGGGGGGCTTCTCCGCTTCCCCAACTAAGCATGGTAGTGG TAGTGGTAATCATTCTAGGTGAC5'
PapOmpC3	
Forward	5'CCAATTCCTTCCACCCCCCGAAACTGCGACTTATTTGCTTGATCACCATCACCA TCACCATTAGTAAGGATCCACTG3'
Reverse	3'GGTTAAGGAAGGTGGGGGGCTTTGACGCTGAATAAACGAACTAGTGGTAGTG GTAGTGGTAATCATTCTAGGTGAC5'
PapOmpF1	
Forward	5'CCAATTCCTTCCACCCCCCGAATTCATGAGAATTGGCCTTCGCACCATCACC ATCACCATTAGTAAGGATCCACTG3'
Reverse	3'GGTTAAGGAAGGTGGGGGGCTTAAAGTACTCTTAACCGGAAGCGTGGTAGTG GTAGTGGTAATCATTCTAGGTGAC5'
PapOmpF2	
Forward	5'CCAATTCCTTCCACCCCCCGAATTCATGAGTTTTGGCCGACTCACCATCACC ATCACCATTAGTAAGGATCCACTG3'
Reverse	3'GGTTAAGGAAGTGGGGGGCTTAAAGTACTCAAACCGGCTGAGTGGTAGTGG TAGTGGTAATCATTCTAGGTGAC5'

Tabla 5. Primers utilizados para la inserción de los heptapéptidos con afinidad a las porinas OmpC y OmpF en el extremo C-terminal de PapMV CP.

Expresión y purificación de las proteínas recombinantes.

Como sistema de expresión se utilizó *E. coli* BL21 transformada con el plásmido que codifica para cada una de las diferentes construcciones. La bacteria se mantuvo en el medio selectivo 2XYT-ampicilina (50µg/mL).

Se creció la bacteria a 200rpm/37°C hasta alcanzar una densidad óptica a 600nm aproximada a 0.6. La expresión de la proteína se indujo añadiendo IPTG a una concentración final 1mM, incubando 16 horas a 22°C con agitación. La bacteria fue cosechada centrifugando a 6000rpm/30 minutos/4°C. El botón se resuspendió en buffer de lisis frío y se añadió PMSF, lisozima y cocktail de proteasas 25X. Después de 30 minutos de incubación en hielo, la bacteria se lisó utilizando la prensa de French (750psi). El lisado se centrifugó 13000rpm/30 minutos/4°C. Se recuperó el sobrenadante y se añadió DNasa y MgCl₂, incubando 15 minutos a temperatura ambiente con agitación. Posteriormente se centrifugó nuevamente a 13000rpm/30 minutos/4°C. Se recuperó el sobrenadante y se filtró (0.45µm) y se incubó con 3 mL de agarosa Ni-NTA (Quiagen) durante 16 horas a 4°C con agitación. Para purificar la proteína, se empacó una columna y la agarosa se lavó agregando en orden consecutivo 1 volumen de las siguientes soluciones: 1) 50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 20mM imidazol, 2) 50mMNaH₂PO₄, 300mM NaCl, 50mM imidazol, 3) 10mM Tris-HCl pH 8, 50mM imidazol, 0,5% Triton X-100, 4) 10mM Tris-HCl pH 8, 50mM imidazol, 5) 10mM Tris-HCl pH 8, 50mM imidazol, 1% zwitterget, 6) 10mM Tris-HCl pH 8, 50mM imidazol. La proteína se eluyó con 4 mL de buffer de elución (Tris-HCl 10mM pH 8, 400mM imidazol). La fracción eluida se dialisó contra PBS pH 7.4. Las partículas semejantes a virus (VLPs) se recuperaron por ultracentrifugación. La pureza de la proteína se verificó por electroforesis en condiciones reductoras y el ensamblaje de los VLPs se confirmó por microscopía electrónica.

Determinación de signos clínicos asociados a la infección por *S. typhi* en ratones. Determinación del punto de corte.

Anterior al desarrollo del protocolo para evaluar la capacidad protectora de los diferentes antígenos se llevo a cabo la evaluación de signos clínicos y síntomas asociados a la infección por *S. typhi* en nuestro modelo experimental. Este estudio piloto se llevo a cabo en las instalaciones del bioterio del Centre Hospitalaire de l'Université Laval.

A grupos de 4 ratones BALB/c naïve de 8 semanas de edad se les administró por vía intraperitoneal 20, 100 ó 500 DL₅₀ de *Salmonella typhi* (ATCC 9993) resuspendida en 500 µL buffer TE (50mM Tris, pH 7,2, 5mM EDTA) 5% mucina gástrica (Sigma) y se incluyó como control un grupo adicional que no recibió tratamiento.

Cada hora después de la infección se llevó a cabo el registro del cambio de las diferentes variables descritas en la Tabla 6, esto nos permitió determinar el momento óptimo para ejecutar la eutanasia durante el desarrollo del protocolo de protección.

NIVEL 1

SIGNO CLINICO	ANTES INFECCIÓN	t ____	t ____	t ____	t ____
PELAJE ERIZADO					
PESO					
OJOS EXORBITADOS					

PARÁMETROS CRÍTICOS

- PERDIDA DE PESO <20%

NIVEL 2

SIGNO CLÍNICO	ANTES INFECCION	t ____	t ____	t ____	t ____
LETARGIA					
CURVATURA DE COLUMNA VERTEBRAL					

NIVEL 3

SIGNO CLÍNICO	ANTES INFECCIÓN	t____	t____	t____	t____
PÉRDIDA COORDINACIÓN MUSCULAR					
TEMPERATURA (°C)					
PESO					
CIANOSIS					

PARÁMETROS CRÍTICOS

- PÉRDIDA DE PESO >20%
- TEMPERATURA <34.5°C

Tabla 6. Tabla de registro de diferentes síntomas y signos clínicos asociados a la infección por *Salmonella enterica* serovar typhi en el modelo de ratón.

Descripción de los códigos de evaluación:

Nivel 1

Signo clínico: Pelaje erizado

+ El pelaje está ligeramente erizado

++ El pelaje está severamente erizado, si se observa al ratón a corta distancia el pelaje parece como eléctricamente cargado.

Signo clínico: Peso

Registro del peso de cada ratón justo antes de la infección y cada hora después de t=2 horas hasta la muerte del ratón o la ejecución de la eutanasia.

Signo clínico: Ojos exorbitados

Nota: Una hora posterior a la infección se observó que los ratones tenían los ojos cerrados. El signo + indica si el ratón tenía los ojos cerrados y - si los ojos estaban abiertos.

Nivel 2

Signo clínico: Letargia

+ El ratón está activo, pero tiene una leve dificultad para desplazarse. Responde a estímulos externos.

++ El ratón comienza a perder actividad debido a que tiene una gran dificultad para caminar, sin embargo responde a estímulos externos.

+++ El ratón pierde actividad y tiende a agruparse con los demás ratones, pero es capaz de responder a estímulos externos.

++++/- El ratón pierde actividad y es capaz de responder a estímulos externos. El ratón puede estar o no agrupado con los demás ratones.

++++ El ratón pierde actividad y es incapaz de responder a estímulos externos. Permanece agrupado con los demás ratones.

Signo clínico: Curvatura de la columna vertebral

+ El ratón está ligeramente encorvado, cuando camina es casi indetectable.

++ El ratón está jorobado, la curvatura es detectable cuando el ratón está en movimiento.

+++ La columna está curvada, la cabeza no está cerca de la base del contenedor.

++++ El ratón está severamente jorobado, la posición de la cabeza es cercana a la base del contenedor.

Nivel 3

Signo clínico: Pérdida de coordinación muscular

+ Parálisis parcial o total

Signo clínico: Temperatura

Registro de la temperatura de cada ratón justo antes de la infección y cada hora posterior hasta muerte o ejecución de la eutanasia.

Signo clínico: Pérdida de peso

Registro del peso de cada ratón justo antes de la infección y cada hora después de t=2 horas hasta la muerte del ratón o la ejecución de la eutanasia.

Signo clínico: Cianosis

+ Coloración azul evidente en la cola o en las patas.

11.RESULTADOS

El PapMV no induce la proliferación de linfocitos B in vitro, pero induce una discreta expresión de marcadores de activación así como la respuesta celular

Debido a que el PapMV es un antígeno altamente organizado y repetitivo que induce la respuesta de anticuerpos de larga duración, analizamos su capacidad para inducir *in vitro* la proliferación de linfocitos B de ratones naïve así como su diferenciación a célula plasmática. Observamos que el PapMV no induce la proliferación de linfocitos B de manera policlonal como es el caso de LPS (Fig 1c) y que tampoco induce la diferenciación de los linfocitos B naïve a célula plasmática (Fig 1b), sin embargo, induce una discreta expresión de marcadores de activación como CD44, CD86, CD22 y MHCII (Fig 1a). Estos resultados nos sugieren que el PapMV no es un antígeno T-independiente tipo I.

En estudios previos, hemos observado que el PapMV la respuesta de anticuerpos de larga duración inducida por PapMV tiene un perfil Th1/Th2, lo que sugiere la colaboración de los linfocitos T en la respuesta de anticuerpos anti-PapMV. Así, al evaluar la capacidad del virus de inducir la respuesta celular por DTH encontramos que el PapMV induce la activación sistémica de la respuesta de linfocitos T (Fig 1d) y que esta propiedad es independiente de la viabilidad de la partícula viral, ya que cuando el virus se inactiva por luz UV se observa el mismo fenómeno.

En conjunto estos resultados nos muestran que la respuesta de anticuerpos de larga duración inducida por el PapMV no es resultado de una activación policlonal de los linfocitos B y que además el PapMV es un antígeno capaz de inducir de manera eficiente la respuesta celular.

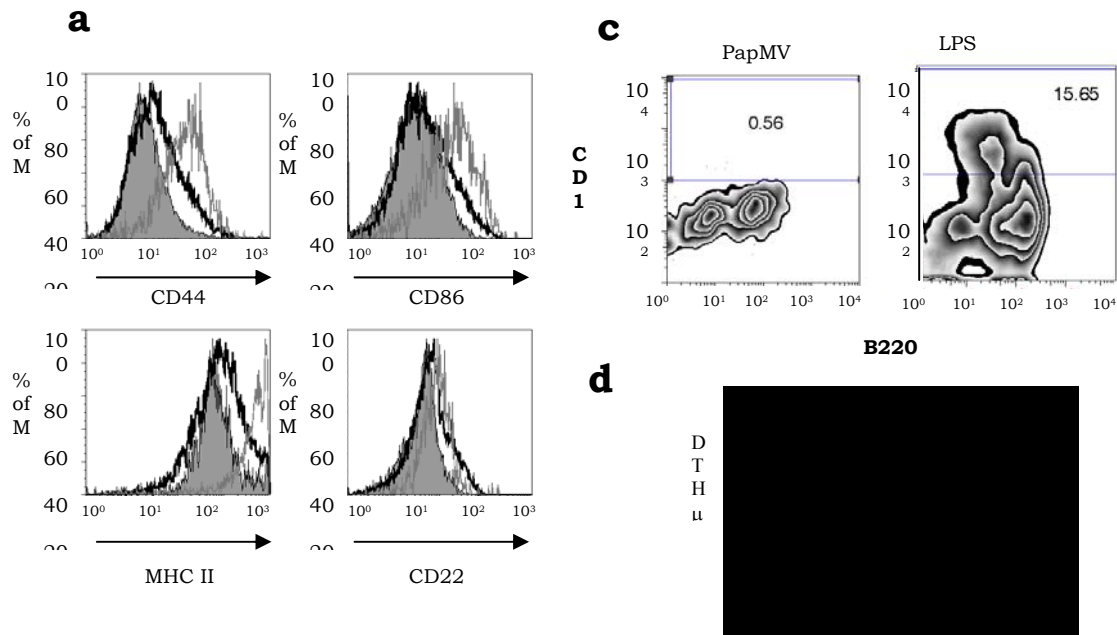


FIGURA 1. El PapMV no induce la proliferación de linfocitos B *in vitro*, pero induce una discreta expresión de marcadores de activación así como la respuesta celular (a) Linfocitos B de ratones naïve fueron estimulados con PapMV (1 µg/mL) durante 18 horas, posteriormente por citometría de flujo se analizó la expresión de los marcadores de activación. (b) Linfocitos B naïve se estimularon *in vitro* con PapMV durante 80 horas. La diferenciación a células plasmáticas se analizó por citometría de flujo. (c) Ensayo de proliferación de linfocitos B después de la estimulación con 100 µg/mL LPS o 1 µg/mL PapMV. (d) Respuesta celular inducida por PapMV determinada por DTH. Ratones BALB/c fueron inmunizados con 30 µg PapMV por via sc (día 0). Al día 7 se retó con 3 µg PapMV sc en la oreja. 24 horas después del reto, se midió el grosor de la oreja. La diferencia estadística de acuerdo con la prueba t Student se señala por asteriscos. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$.

PapMV induce la expresión de marcadores de activación en DC, MØ y linfocitos B así como la producción de citocinas pro-inflamatorias

Análisis previos acerca de la capacidad de PapMV de activar la respuesta inmune innata mostraron que la estimulación de BMDM induce la producción de citocina proinflamatorias (TNF α e IL-6), lo que sugiere que el PapMV estaría siendo reconocido como un PAMP. Una característica de los PAMP es su propiedad de inducir la expresión de moléculas coestimuladoras en las APC (Fig 2a). Se observó que PapMV es capaz de inducir *in vivo* la expresión de marcadores de activación en las APC profesionales. 24 horas después de la administración de PapMV por vía sc a ratones BALB/c es posible detectar el aumento en la expresión de los marcadores CD80 y CD69 en DC (CD11c⁺ CD11b⁻) residentes en la ganglios, así como la expresión de CD40 y CD69 en DC de bazo. En cuanto a MØ (CD11c⁻ CD11b⁺) residentes en ganglios se observó un incremento en la expresión de CD80 y CD69 mientras para los residentes en bazo hubo un incremento de los marcadores CD40 y CD69. Finalmente, los linfocitos B (CD11c⁻ B220⁺) en ganglios expresaron CD69 y los de bazo CD40 y CD69. Como control positivo se utilizó el agonista de TLR3 poly I:C el cual indujo la expresión de los marcadores analizados con un patrón marcadamente diferente al inducido por PapMV (Fig 2a).

Al igual que en los macrófagos, la activación de las células dendríticas se caracteriza además del cambio en la expresión de los marcadores analizados así como la secreción de citocinas proinflamatorias. Se observó que PapMV induce en esta población celular la secreción de TNF- α , IL-6 e INF- α (Fig 2c) a diferencia de los macrófagos que sólo producen TNF- α e IL-6 (Fig 2b) después de la estimulación con PapMV, lo que sugiere que ambos tipos celulares estarían reconociendo a PapMV de manera diferente que el LPS.

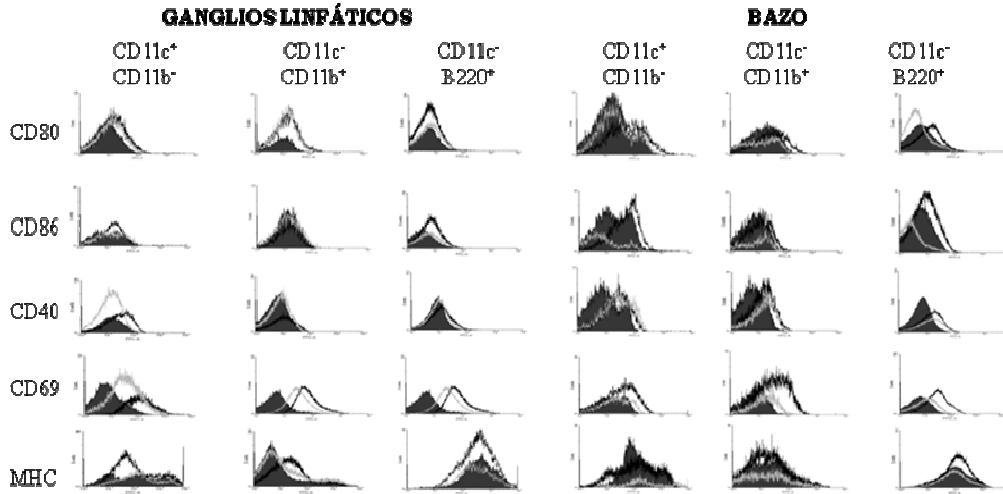
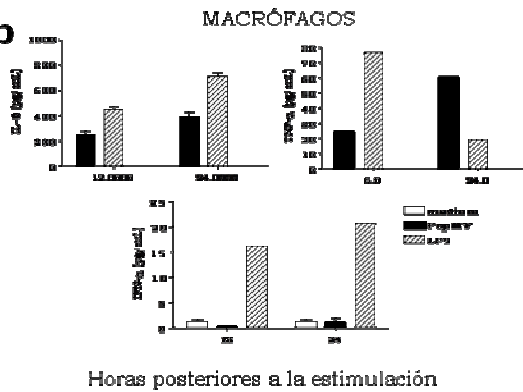
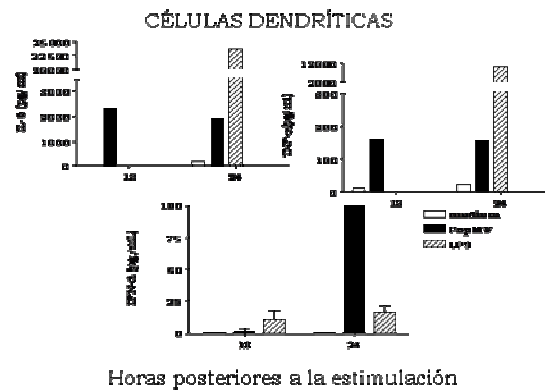
a**b****c**

FIGURA 2. PapMV induce *in vivo* la expresión de marcadores de activación en la células presentadoras de antígeno profesionales, así como la secreción de citocinas pro-inflamatorias. (a) Ratones BALB/c fueron inmunizados ip con 30 μ g PapMV (línea gris) o 50 μ g poly I:C (línea negra). Transcurridas 24 horas ganglios y bazo fueron disectados para el análisis de la expresión de marcadores de la expresión de marcadores de la expresión de marcadores de activación en DC, M \emptyset y linfocitos B por citometría de flujo. Las poblaciones fueron definidas como: CD11c⁺ CD11b⁻ (DC), CD11c⁻ CD11b⁺ (M \emptyset) y CD11c⁻ B220⁺ (linfocitos B). Macrófagos (derivados de médula ósea o peritoneales) **(b)** y células dendríticas derivadas de médula ósea **(c)** se estimularon con PapMV (1 μ g/mL) durante los tiempos señalados en las gráficas. Al término de cada lapso de cuantificó la producción de TNF- α , IL-6 e IFN- α en el sobrenadante de cultivo por ELISA.

El PapMV induce efecto adyuvante en la respuesta de anticuerpos contra antígenos modelo.

Recientemente se ha puesto de manifiesto que uno de los posibles mecanismos a través de los cuales funcionan los adyuvantes es mediante la activación del sistema inmune innata vía los PRR, particularmente los TLR (342).

Cuando el PapMV se coadministró con antígenos modelo a ratones BALB/C se observó que es capaz de favorecer la respuesta inmune humoral de larga duración contra OVA y HEL, incluso induce el cambio de isotipo (Fig 3a). Tanto en la respuesta anti-OVA como anti-HEL el efecto es marcado hasta el día 120 posterior a la inmunización (Fig 3b). En comparación el efecto adyuvante inducido por LPS se observa hasta el día 30 después de la inmunización y en el caso de CFA, el efecto se mantiene hasta el día 400. El análisis de las diferentes subclases de IgG mostró que PapMV es capaz de inducir la producción de IgG2a e IgG2b (Fig 3b) anti-OVA al igual que LPS y CFA, mientras que la inmunización con OVA en ausencia de adyuvantes solo indujo la producción de anticuerpos de IgG1 en los ratones BALB/c. Los títulos de IgG1 no se vieron modificados en presencia de ninguno de los adyuvantes administrados en comparación de la OVA en ausencia de adyuvante. Estos resultados sugieren que el PapMV tiene propiedades adyuvantes intrínsecas lo que le permite traducir la eficiente activación del sistema inmune innato observada en la respuesta de anticuerpos de larga duración.

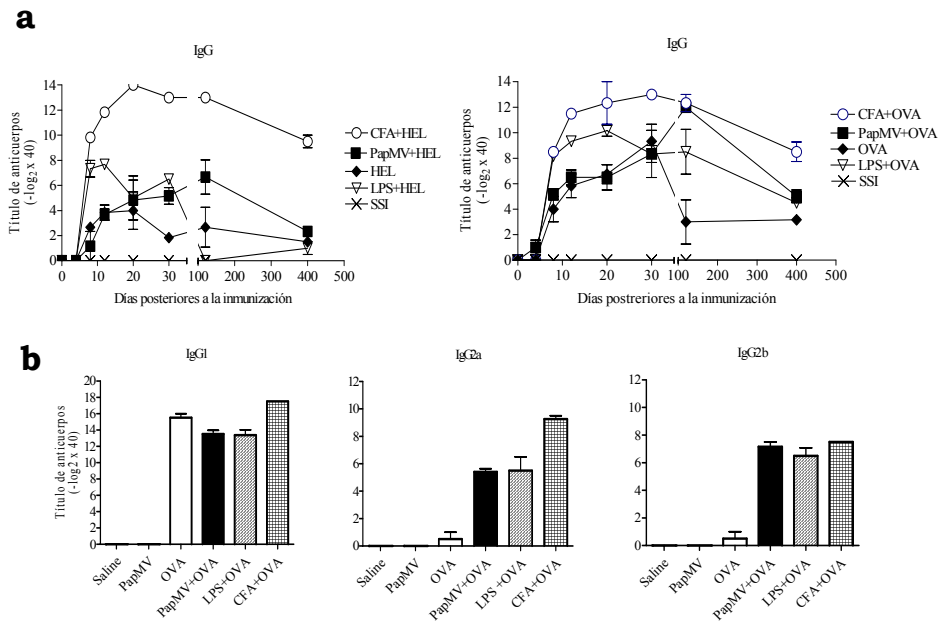


FIGURA 3. El PapMV induce efecto adyuvante en la respuesta de anticuerpos contra antígenos modelo. (a) PapMV favorece la respuesta de anticuerpos contra antígenos modelo. Grupos de tres ratones BALB/c fueron inmunizados ip con 2mg OVA o HEL en presencia y ausencia de adyuvante (CFA, LPS o PapMV). El título de anticuerpos anti-OVA o anti-HEL en suero se determinaron en los tiempos señalados en la gráfica. **(b)** El efecto adyuvante de PapMV en la respuesta de anticuerpos anti-OVA en ratones BALB/c se caracteriza por la producción de IgG1, IgG2a e IgG3. El análisis de las diferentes subclases de IgG se realizó en los sueros de día 120 de ratones BALB/c inmunizados con 2mg OVA en presencia o ausencia de adyuvante (CFA, LPS o PapMV) por el método de ELISA.

Determinación de signos clínicos asociados a la infección por S. typhi en ratones.

Debido a la observación de que la co-administración de PapMV con OVA, HEL incrementa la respuesta de anticuerpos, evaluamos la capacidad de nuestro adyuvante de incrementar la capacidad protectora de OmpC en el modelo experimental de infección por *S. typhi* en el ratón. Para poder determinar el punto de corte para proceder a la eutanasia de los ratones después de la infección, se procedió a administrar ip el equivalente a 20, 100 y 500 DL₅₀ de *S. typhi* resuspendida en mucina gástrica porcina y después de una hora de la infección hasta la muerte o la presencia de alguno de los signos clínicos del nivel 3 se calificaron diferentes signos clínicos, como la apariencia del pelaje, letargia, cambio de temperatura corporal del ratón, encorvamiento, pérdida de coordinación muscular o cianosis tomando como referencia la calificación de un grupo de ratones que no recibieron tratamiento.

Se observó que después de la infección los primeros signos clínicos como el pelaje erizado y el hecho de que los ratones cierran los ojos, letargia y encorvamiento del ratón se manifestaron desde la primera hora posterior a la infección, y que la severidad de estos signos clínicos se iba asociando con respecto a la dosis de bacteria administrada en función del tiempo transcurrido.

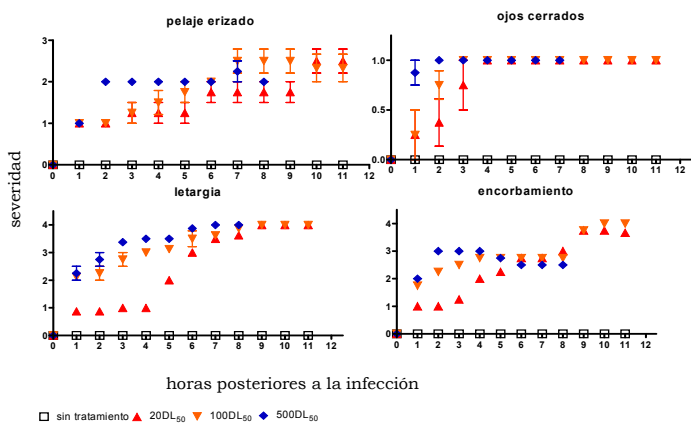
El decremento de la temperatura corporal sensible al momento de manipular al ratón se hizo evidente desde las 6 horas posteriores a la administración de 100 y 500 DL₅₀ y a partir de las 9 horas en el caso de los ratones a los que se administraron 20 DL₅₀.

En el lapso analizado no se registró pérdida de peso corporal en ninguno de los casos, por lo que este síntoma quedó descartado.

En cuanto a la pérdida de coordinación muscular, solo se presentó en los ratones que recibieron 100 y 500 DL₅₀ manifestándose como pérdida de movimiento de las patas posteriores o convulsiones.

En ninguno de los grupos se observó cianosis, sin embargo se consideró como punto de corte cuando se realizaron los retos infecciosos en ratones vacunados (Fig 4 y tabla 7).

Así, se determinó como punto de corte la presencia de pérdida de coordinación muscular o cianosis sería signos clínicos que determinantes para la eutanasia de los ratones cuando el reto infeccioso se llevara a cabo.



SIGNO CLÍNICO	CONTROL	20DL ₅₀	100DL ₅₀	500DL ₅₀
Pérdida coordinación muscular	NEGATIVO	NEGATIVO	11HRS (1/4)	7 HRS (3/4)
Temperatura	ESTABLE	DECREMENTO DESDE 9HRS	DECREMENTO DESDE 6 HRS	DECREMENTO DESDE 6HRS
Pérdida peso	-----	-----	-----	-----
Cianosis	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO

Figura 4. Determinación de signos clínicos asociados a la infección por *S. typhi* en ratones. Grupos de 4 ratones hembras BALB/c fueron infectados ip con 20, 100 ó 500 DL₅₀ de *S. typhi* utilizando como vehículo mucina gástrica en TE. Después de una hora y hasta la muerte del ratón o la presencia de alguno de los signos del nivel 3 se calificaron diferentes signos clínicos para determinar el punto de corte y proceder a la eutanasia del ratón.

NIVEL 1

SIGNO CLÍNICO	CONTROL	20DL ₅₀	100DL ₅₀	500DL ₅₀
PELAJE ERIZADO	0/4	4/4	4/4	4/4
PESO	0/4	0/4	0/4	0/4
OJOS CERRADOS	0/4	4/4	4/4	4/4

NIVEL 2

SIGNO CLÍNICO	CONTROL	20DL ₅₀	100DL ₅₀	500DL ₅₀
LETARGIA	0/4	4/4	4/4	4/4
CURVATURA COLUMNA VERTEBRAL	0/4	4/4	4/4	4/4

NIVEL 3

SIGNO CLÍNICO	CONTROL	20DL ₅₀	100DL ₅₀	500DL ₅₀
PÉRDIDA COORDINACIÓN MUSCULAR	0/4	4/4	3 / 4	4/4
DISMUNICIÓN DE TEMPERATURA	0/4	4/4	4/4	4/4
PÉRDIDA DE PESO	0/4	0/4	0/4	0/4
CIANOSIS	0/4	0/4	0/4	0/4

Tabla 7. Signos clínicos asociados a la infección por *Salmonella typhi* en ratones BALB/c. La presencia de cualquier signos clínico agrupado en el nivel 3 (pérdida de coordinación muscular, disminución de la temperatura, pérdida de peso o cianosis) durante los 10 días posteriores al reto con *Salmonella typhi* se consideró como punto final y se procedió a la eutanasia.

El PapMV incrementa la inmunogenicidad y capacidad protectora de la vacuna experimental contra fiebre tifoidea basada en la porina OmpC de S. typhi.

El objetivo de los adyuvantes no se limita a incrementar los títulos de anticuerpos sino también favorecer la capacidad protectora de los antígenos con los que se administra. Para comprobar las propiedades adyuvantes de PapMV con un antígeno derivado de un microorganismo, éste se coadministró con la porina OmpC de *S. typhi* a ratones BALB/c, los cuales posteriormente fueron retados con diferentes dosis de *S. typhi* resuspendida en mucina. En comparación con OmpC, el PapMV incremento 30% su capacidad protectora contra el reto con 100 DL₅₀ y 500 DL₅₀ de *S. typhi* (Fig 5b). Un posible mecanismo del incremento en la capacidad protectora de OmpC cuando se coadministró con PapMV es el incremento en el título de anticuerpos anti-OmpC (IgG2a e IgG2b). Resulta interesante que el adyuvante incompleto de Freund (IFA) induce un efecto diferente en la respuesta de anticuerpos anti-OmpC, ya que a diferencia de PapMV, IFA favoreció la producción de IgG1, IgG2b e IgG3, lo que sugiere que el mecanismo involucrado en el efecto adyuvante observado por PapMV no se lleva a cabo por la misma vía (Fig 5a).

Estos resultados nos comprueban las propiedades adyuvantes de PapMV en la activación tanto de la respuesta inmune innata como adaptativa, que se ven traducidas en el incremento de la capacidad protectora de una vacuna experimental.

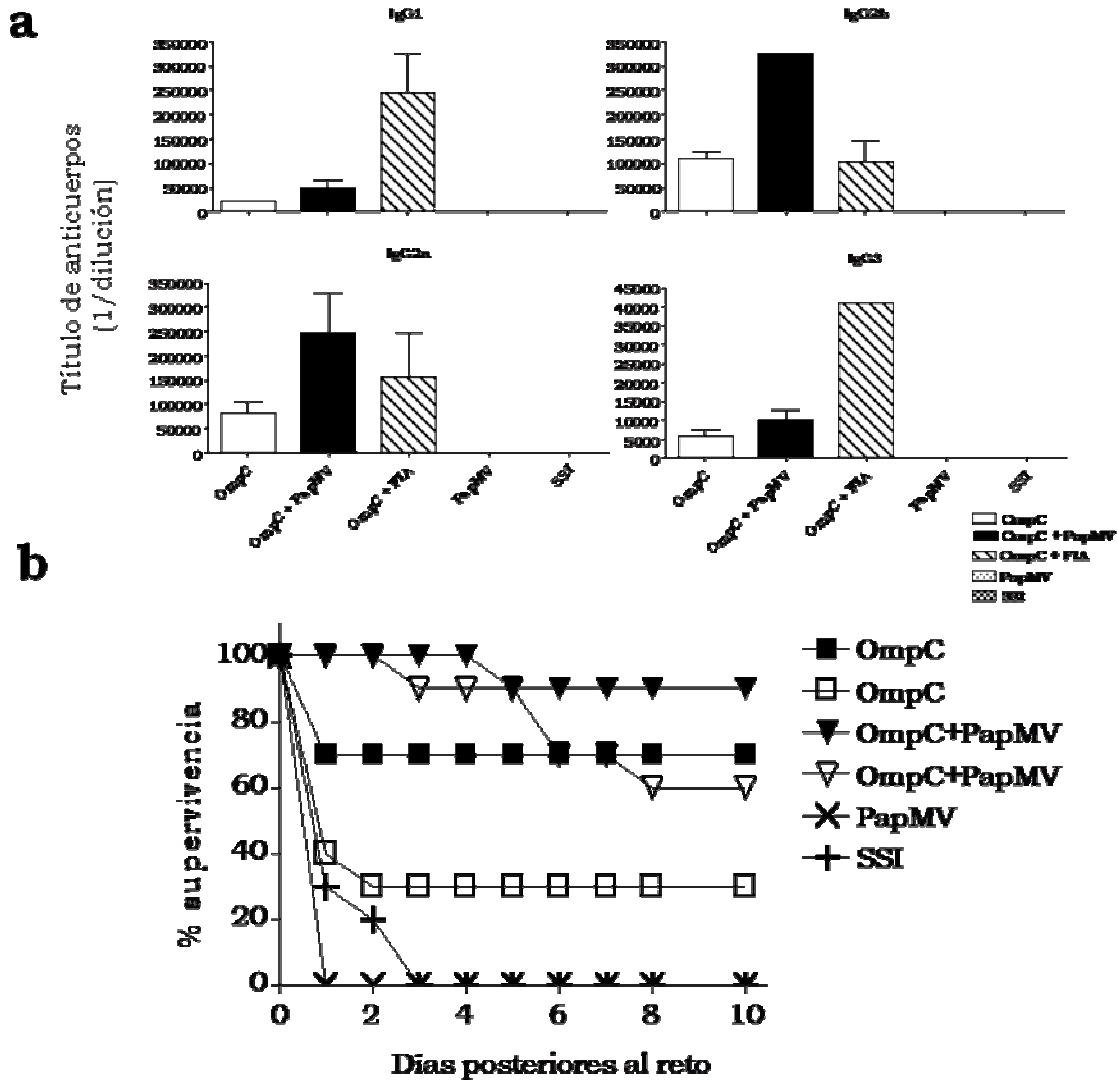


Figura 5. El PapMV incrementa la capacidad protectora de la vacuna experimental contra fiebre tifoidea basada en la porina OmpC. (a) Grupos de 5 ratones hembras BALB/c fueron inmunizados por vía ip con 10µg OmpC en presencia o en ausencia de adyuvante (PapMV (30µg), IFA (1:1v/v)). Un grupo control fue tratado solamente con SSI. Al día 15 se aplicó un refuerzo solamente con 10µg OmpC en todos los grupos experimentales. Al día 21 se analizó el título de anticuerpos anti-OmpC por el método de ELISA. **(b)** Grupos de 10 ratones BALB/c fueron inmunizados con 10µg OmpC con o sin PapMV (30µg). Al día 15 se aplicó un refuerzo solamente con 10µg OmpC en todos los grupos. Al día 21 los ratones fueron retados ip con 100 (símbolos negros) o 500 DL₅₀ (símbolos abiertos) de *S. typhi* resuspendida en mucina, la supervivencia de los ratones se registró durante los 10 días posteriores al reto.

Selección y clonación de péptidos con afinidad a las proteínas de membrana externa C y F de Salmonella enterica serovar Typhi.

Recientemente, se han considerado a los virus vegetales como sistemas acarreadores de subunidades de patógenos de interés en vacunación. Estos sistemas tienen la propiedad de presentar al antígeno de interés en un contexto altamente organizado y repetitivo, arreglo molecular que se reconoce es favorable para la inducción de la respuesta de anticuerpos (343), lo que sugeriría favorecería la inducción de la respuesta inmune protectora de larga duración. A través de la técnica phage display se seleccionaron heptapéptidos con afinidad a las porinas C y F de *Salmonella typhi* (Fig 6a). Los péptidos que se seleccionaron con mayor frecuencia se clonaron por PCR en el extremo C-terminal de la proteína de la cápside (CP 6-215) de PapMV seguidos de un tag de 6 histidinas para facilitar la purificación (PapOmpC y PapOmpF) (Fig 6b). La correcta inserción de los heptapéptidos se verificó por secuenciación.

a

LIGANDO	HEPTAPÉPTIDO	FRECUENCIA	CONSTRUCCIÓN
OmpC	Ser Leu Ser Leu Ile Gln Thr	1/8	PapOmpC1
OmpC	Glu Ala Lys Gly Leu Ile Arg	6/8	PapOmpC2
OmpC	Thr Ala Thr Tyr Leu Leu Asp	1/8	PapOmpC3
OmpF	Phe His Glu Asn Trp Pro Ser	3/5	PapOmpF1
OmpF	Phe His Glu Phe Trp Pro Thr	2/5	PapOmpF2

b

Δ N5 PapMV CP	heptapéptido	6X His tag
----------------------	--------------	------------

FIGURA 6. Selección y clonación de péptidos con afinidad a las porinas OmpC y OmpF de Salmonella typhi en el extremo C-terminal de la proteína de cápside de PapMV (PapMV CP). Los péptidos con afinidad a OmpC y OmpF fueron seleccionados por phage display **(a)** y clonados en el extremo C-terminal de la proteína de la cápside de PapMV (Δ N5 PapMV CP) seguidos de un tag de 6 histidinas para facilitar la purificación de la proteína recombinante **(b)**.

La correcta inserción de los heptapéptidos se verificó por secuenciación.

CONSTRUCCIÓN: PapOmpC1

Secuencia en nucleótidos

deltaN5Ompc11_T7promoteur_H01_001.ab1

```
NNNNNNNNNNNNNTANNNNNNNTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGCATCCAC
ACCCAACaTAGCCTTCCCCGCCATCACCCAGGAACAAATGAGCTCGATTAAGGTTCGATCCA
ACGTCCAATCTTCTGCCCTCCCAAGAGCAGTTAAAGTCAGTGTCCACCCTCATGGTAGCTG
CTAAGGTTCCAGCAGCCAGTGTTACAACGTGGCATTGGAGTTGGTAACTTCTGCTATGA
CAATGGGTCCAGCGCGTACACCACAGTGACTGGCCCATCATCAATACCGGAGATATCACTG
GCACAATTGGCCAGCATTTGTCAAAGCTTCCGGCACTTCCCTTAGGAAATTCTGCCGGTACT
TCGCGCCAATAATCTGGAATCTGAGGACGGACAAAATGGCTCCTGCCAATTGGGAGGCCTC
AGGATACAAGCCAAGCGCCAAATTTGCCGCGTTCGACTTCTTCGACGGGGTGGAGAATCCG
GCGGCCATGCAACCCCTTTCGGGACTAACCAGGTCCGCCGACCCAGGAAGAGCGGATTGCCA
ATGCCACCAACAAACAGGTGCATCTCTTCCAAGCCGCGGCACAGGACAACAACCTTTGCCAG
CAACTCCGCCTTCATCACCAAAGGTCAAATTTCTGGGTCAACCCCAACCATCCAATTCCTT
CCACCCCCCGAATCTTTGTGCTTATTTCAGACGCACCATCACCATCACCATTAGTAAGGAT
CCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGANCAATAAC
TAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTGCTGAAAGGAGGAAC
TATATCCGGATATCCACAGGACGGGTGTGGTCGCCATGATCGCGTANTCGATAGTGGCTCC
AAGTAGCGAAGCGAGCAGGACTGGGCG
```

Secuencia en aminoácidos

```
MASTPNIAFPAITQEQMSSIKVDPTSNLLPSQEQ LKS
VSTLMVAAKVPAASVTTVALELV  NFCYDNGSSAYTT
VTGPSSIPEISLAQLASIVKASGTS LRKFCRYFAPIIW
NLRTDKMAP  ANWEASGYKPSAKFAAFDFF D G V E
NPAAMQPPSGLTRSPTQEERIANATNKQVHLFQAAA
QDNNFASNSAFITKGQISGSTPTIQFLPPPE SL SLIQT
HH  HHHH Stop Stop
```

CONSTRUCCIÓN: PapOmpC2

Secuencia en nucleótidos

deltaN5OmpC21_T7promoteur_G10_068.ab1

```
CNNNNNTNNNCNCAGAAATNNNTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGCATCCAC
ACCCAACaTAGCCTTCCCCGCCATCACCCAGGAACAAATGAGCTCGATTGAGGTTCGATCCA
ACGTCCAATCTTCTGCCCTCCCAAGAGCAGTTAAAGTCAGTGTCCACCCTCATGGTAGCTG
CTAAGGTTCAGCAGCCAGTGTACAACTGTGGCATTGGAGTTGGTTAACTTCTGCTATGA
CAATGGGTCCAGCGCGTACACCACAGTGACTGGCCCATCATCAATACCGGAGATATCACTG
GCACAATTGGCCAGCATTGTCAAAGCTTCCGGCACTTCCCTTAGGAAATTCTGCCGGTACT
TCGCGCCAATAATCTGGAATCTGAGGACGGACAAAATGGCTCCTGCCAATTGGGAGGCCTC
AGGATAACAAGCCAAGCGCCAAATTTGCCGCGTTCGACTTCTTCGACGGGGTGGAGAATCCG
GCGGCCATGCAACCCCTTTCGGGACTAACCAGGTCCGCCGACCCAGGAAGAGCGGATTGCCA
ATGCCACCAACAACAGGTGCATCTCTTCCAAGCCGCGGCACAGGGCAACAACCTTTGCCAG
CAACTCCGCCTTCATCACCAAGGCCAAATTTCTGGGTCAACCCCAACCATCCAATTCCTT
CCACCCCCGAAGAGGCGAAGGGGTTGATTCGTACCATCATCATCACCATTAGTAAGGAT
CCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAAC
TAGCGTAACCCCTTGGGGCCTCTAACCGGGTCTTGAGGGGTTTTTTGCTGAAAGGAGGAAC
TATATCCGGATATCCACAGGACGGGTGTGGTCGCCATGATCGCGTAGTCGATAGTGGCTCC
AAGTAGCGAAGCGAGC
```

Secuencia en aminoácidos

```
M A S T P N I A F P A I T Q E Q M S S I E V D P T S N L L P S Q E Q L K S
V S T L M V A A K V P A A S V T T V A L E L V   N F C Y D N G S S A Y T T
V T G P S S I   P E I S L A Q L A S I V K A S G T S L R K F C R Y F A P I
I W N L R T D K M A P A N W E A S G Y K P   S A K F A A F D F F D G V
E N P A A M Q P P S G L T R S P T Q E E R I A N A T N   K Q V H L F Q
A A A Q G N N F A S N S A   F I T K G Q I S G S T P T I Q F L P P P E E A
K G L I R H H H H H H
```


CONSTRUCCIÓN: PapOmpC3

Secuencia en nucleótidos

deltaN5OmpC211_T7promoteur_B11_093.ab1

```
NNNNNNNTTCCCTCNANANAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGCATCC
ACACCCAACATAGCCTTCCCCGCCATCACCCAGGAACAAATGAGCTCGATTAAGGTCGATC
CAACGTCCAATCTTCTGCCCTCCCAAGGGCAGTTAAAGTCAGTGTCCACCCTCATGGTAGC
TGCTAAGGTTCCAGCAGCCAGTGTTACAACGTGGCATTGGAGTTGGTTAACTTCTGCTAT
GACAATGGGTCCAGCGCGTACACCACAGTACTGGCCCATCATCAATACCGGAGATATCAC
TGGCACAAATTGGCCAGCATTGTCAAAGCTTCCGGCACTTCCCTTAGGAAATTCTGCCGGTA
CTTCGCGCCAATAATCTGGAATCTGAGGACGGACAAAATGGCTCCTGCCAATTGGGAGGCC
TCAGGATACAAGCCAAGCGCCAAATTTGCCGCGTTCGACTTCTTCGACGGGGTGGAGAATC
CGGCGGCCATGCAACCCCTTCGGGACTAACCCAGGTGCGCCGACCCAGGAAGAGCGGATTGC
CAATGCCACCAACAACAGGTGCATCTCTTCCAAGCCGCGGCACAGGACAACAACCTTTGCC
AGCAACTCCGCCTTCATCACCAAAGGCCAAATTTCTGGGTCAACCCCAACCATCCAATTCC
TTCCACCCCCGAAACTGCGACTTATTTGCTTGATCACCATCACCATCACCATTAGTAAGG
ATCCGGCTGCTAACAAAGCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATA
ACTAGCGTAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTGCTGAAAGGAGGA
ACTATATCCGGATATCCACAGGACGGGTGTGGTCGCCATGATCGCGTAGTCGA
```

Secuencia en aminoácidos

```
MASTPNIAFPAITQEQMSSIKVDPTSNLLPSQGQLKS
VSTLMVAAKVPAASVTTVALELVNFCYDNGSSAYTTV
TGPSSIPEISLAQLASIVKASGTS LRKFCRYFAPII W
NLRTDKMAPANWEASGYKPSAKFAAFDFFDGVENPA
AMQPPSGLTRSPTQEERIANATN KQVHLFQAAAQD
NMFASNSAFITKGQISGSTPTIQFLPPPETATYLLDHH
HHHH
```

CONSTRUCCIÓN: PapOmpF1

Secuencia en nucleótidos

deltaN5OmpF13_T7promoteur_G11_083.ab1

```
NNNNNNNNNTTCCTCNAGAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATAACCATGGCATC
CACACCCAACATAGCCTTCCCCGCCATCACCCAGGAACAAATGAGCTCGATTAAGGTCGAT
CCAACGTCCAATCTTCTGCCCTCCCAAGAGCAGTTAAAGTCAGTGTCCACCCTCATGGTAG
CTGCTAAGGTTCCAGCAGCCAGTGTTACAACCTGTGGCATTGGAGTTGGTTAACTTCTGCTA
TGACAATGGGTCCAGCGCGTACACCACAGTGACTGGCCCATCATCAATACCGGAGATATCA
CTGGCACAATTGGCCAGCATTGTCAAAGCTTCCGGCACTTCCCTTAGGAAATTCTGCCGGT
ACTTCGCGCCAATAATCTGGAATCTGAGGACGGACAAAATGGCTCCTGCCAATTGGGAGGC
CTCAGGATACAAGCCAAGCGCCAAATTTGCCGCGTTCGACTTCTTCGACGGGGTGGAGAAT
CCGGCGGCCATGCAACCCCTTCGGGACTAACCAGGTCGCCGACCCAGGAAGAGCGGATTG
CCAATGCCACCAACAACAGGTGCATCTCTTCCAAGCCGCGGCACAGGACAACAACCTTTGC
CAGCAACTCCGCCTTCATCACCAAAGGCCAAATTTCTGGGTCAACCCCAACCATCCAATTC
CTTCCACCCCCCGAATTTTCATGAGAATTGGCCTTCGCACCATCACCATCACCATTAGTAAG
GATCCGGCTGCTAACAAAGCCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAAT
AACTAGCGTAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTGCTGAAAGGAGG
AACTATATCCGGATATCCACAGGACGGGTGTGGTCCGCATGATCGCGTAGTCGATAGTGG
```

Secuencia en aminoácidos

```
MASTPNIAFPAITQEQMSSIKVDPTSNLLPSQEQ LKS
VSTLMVAAKVPAASVTTVALELVNFCYDNGSSAYTTV
```

TGPSSIPEISLAQLASIVKASGTSLRKFCRYFAPIIWN
LRTDKMAPANWEASGYKPSAKFAAFDFFDGVENPAA
MQPPSGLTRSPTQEERIANATNKQVHLFQAAAQDNN
FASNSAFITKGQISGSTPTIQFLPPPEFHENWPSHHH
HHH

CONSTRUCCIÓN: PapOmpF2

Secuencia en nucleótidos

deltaN5OmpF21_T7promoteur_H11_081.ab1

CNNNNNNNNNNNTCCNNNNNNGAANNATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGG
CATCCACACCCAACATAGCCTTCCCCGCCATCACCCAGGAACAAATGAGCTCGATTAAGGT
CGATCCAACGTCCAATCTTCTGCCCTCCAAGGGCAGTTAAAGTCAGTGTCCACCCTCATG
GTAGCTGCTAAGGTTCCAGCAGCCAGTGTTACAACGTGGCATTGGAGTTGGTTAACTTCT
GCTATGACAATGGGTCCAGCGCGTACACCACAGTGACTGGCCCATCATCAATACCGGAGAT
ATCACTGGCACAATTGGCCAGCATTGTCAAAGCTTCCGGCACTTCCCTTAGGAAATTCTGC
CGGTACTTCGCGCCAATAATCTGGAATCTGGGGACGGACAAAATGGCTCCTGCCAATTGGG
AGGCCTCAGGATACAAGCCAAGCGCCAATTTGCCGCGTTCGACTTCTTCGACGGGGTGGA
GAATCCGGCGGCCATGCAACCCCTTCGGGACTAACCAGGTCCCGACCCAGGAAGAGCGG
ATTGCCAATGCCACCAACAACAGGTGCATCTTCCAAGCCGCGGCACAGGACAACAAC
TTGCCAGCAACTCCGCTTCATACCAAAGGCCAAATTTCTGGGTCAACCCCAACCATCCA
ATTCCTTCCACCCCCGAATTTTCATGAGTTTGGCCGACTCACCATCACCATCACCATTAG
TAAGGATCCGGCTGCTAACAAGCCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAG

CAATAACTAGCGTAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTGCTGAAAG
GAGGA ACTATATCCGGATATCCACAGGACGGGTGTGGTCGCCANGATCGCGTA

Secuencia en aminoácidos

M A S T P N I A F P A I T Q E Q M S S I K V D P T S N L L P S Q G Q L K S
V S T L M V A A K V P A A S V T T V A L E L V N F C Y D N G S S A Y T T V
T G P S S I P E I S L A Q L A S I V K A S G T S L R K F C R Y F A P I I W N
L G T D K M A P A N W E A S G Y K P S A K F A A F D F F D G V E N P A A
M Q P P S G L T R S P T Q E E R I A N A T N K Q V H L F Q A A A Q D N N
F A S N S A F I T K G Q I S G S T P T I Q F L P P P E F H E F W P T H H H
H H H

Expresión y purificación de partículas semejantes a virus de PapMV con afinidad a las porinas C y F de Salmonella typhi.

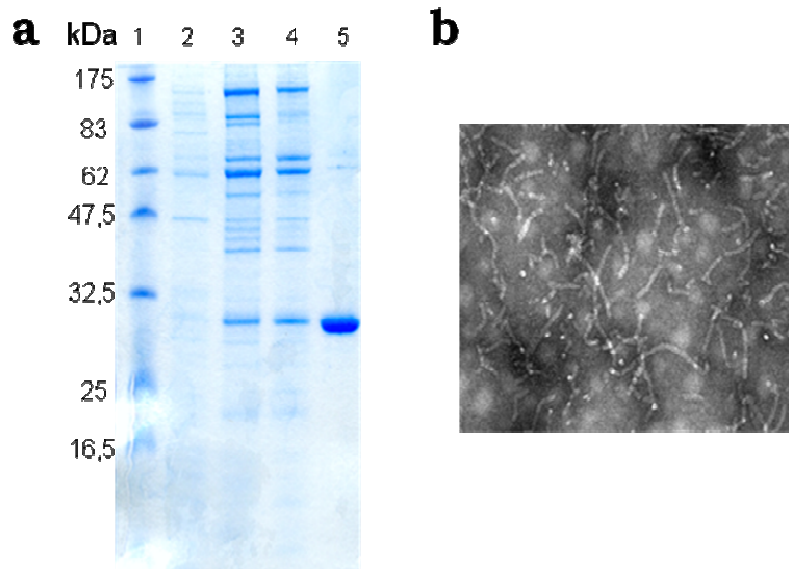
Empleando como sistema de expresión *E. coli* BL21 (RIL) se obtuvieron partículas semejantes a virus con afinidad a las porinas OmpC y OmpF (PapOmpC y PapOmpF respectivamente). Los patrones electroforéticos de las construcciones PapOmpC2 y PapOmpF3 observados durante el proceso de purificación muestran que las proteínas recombinantes tienen un peso molecular de 29kDa aproximadamente (Fig 7a y Fig 8a). El autoensamblaje de partículas semejantes a virus se confirmó por microscopia electrónica (Fig 7b y Fig 8b).

Las construcciones PapOmpC1, PapOmpC3, PapOmpF1 y PapOmpF también fueron expresadas. Los patrones electroforéticos observados durante la purificación se muestran en la Fig 7c y Fig 8c. Se observó que la cantidad de proteína obtenida y así como la cantidad de VLPs recuperados es similar en el caso de las construcciones PapOmpC1 y PapOmpC2, el rendimiento de la construcción PapOmpC3 es mayor, sin embargo la eficiencia de ensamblaje de los VLPs nos es buena, por lo que se identificó gran cantidad de discos (que oscilan entre 22 y 30

subunidades de CP). En cuanto a la construcción PapOmpF2 no se observó expresión de la proteína (Fig 8c).

Al igual que en el caso de PapOmpC2 y PapOmpF1 el autoensamblaje de partículas semejantes a virus se verificó por microscopía electrónica (Fig 7d). En el caso de PapOmpC1 y PapOmpC3 los VLPs observados son de menor tamaño que PapOmpC2 y con una morfología menos uniforme.

Por la morfología observada en la microscopía electrónica se seleccionaron las construcciones PapOmpC2 y PapOmpF1 para realizar los ensayos de inmunogenicidad.



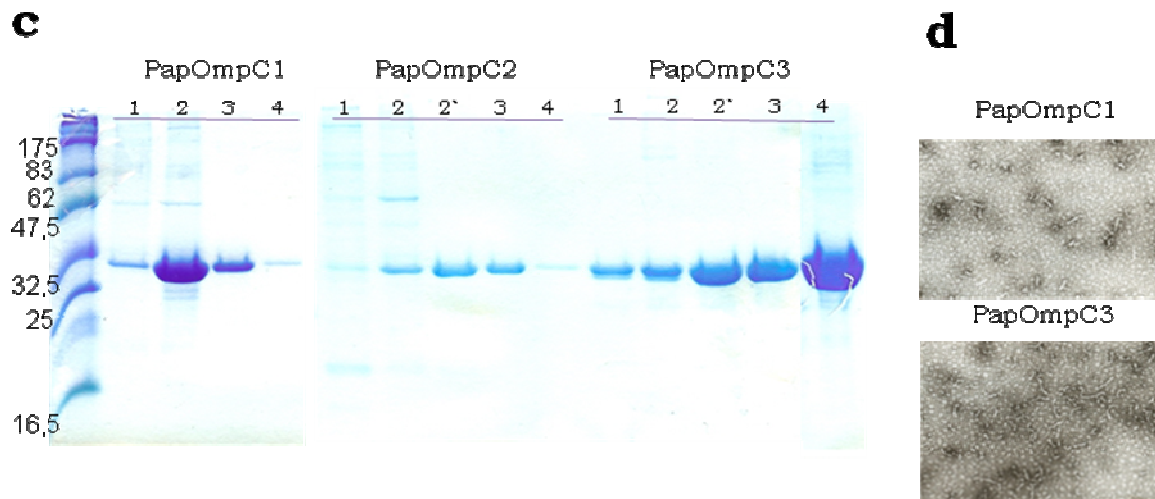


FIGURA 7. Expresión y purificación de PapMV VLPs con afinidad a OmpC (PapOmpC). (a) Perfil electroforético (SDS-PAGE) de la purificación de PapOmpC. Línea 1: marcadores de peso molecular, línea 2: lisado de *E. coli* BL21 expresando PapOmpC antes de la inducción con IPTG, línea 3: fracción después del lavado con Tritón X-100 durante el proceso de purificación, línea 4: fracción después del lavado con zwittergent durante el proceso de purificación, línea 5: VLPs recuperados por ultracentrifugación. (b) Microscopía electrónica de PapOmpC (x100 000). (c) Perfil electroforético (SDS-PAGE) de la purificación de PapOmpC1, PapOmpC2 y PapOmpC3. Línea 1: fracción después del lavado con Tritón X-100 durante el proceso de purificación, línea 2: fracción después del lavado con zwittergent durante el proceso de purificación, Línea 2': fracción eluída, Línea 3: proteína recuperada en sobrenadante, línea 4: VLPs recuperados por ultracentrifugación. (d) Microscopía electrónica de PapOmpC1 y PapOmpC3 (x100 000).

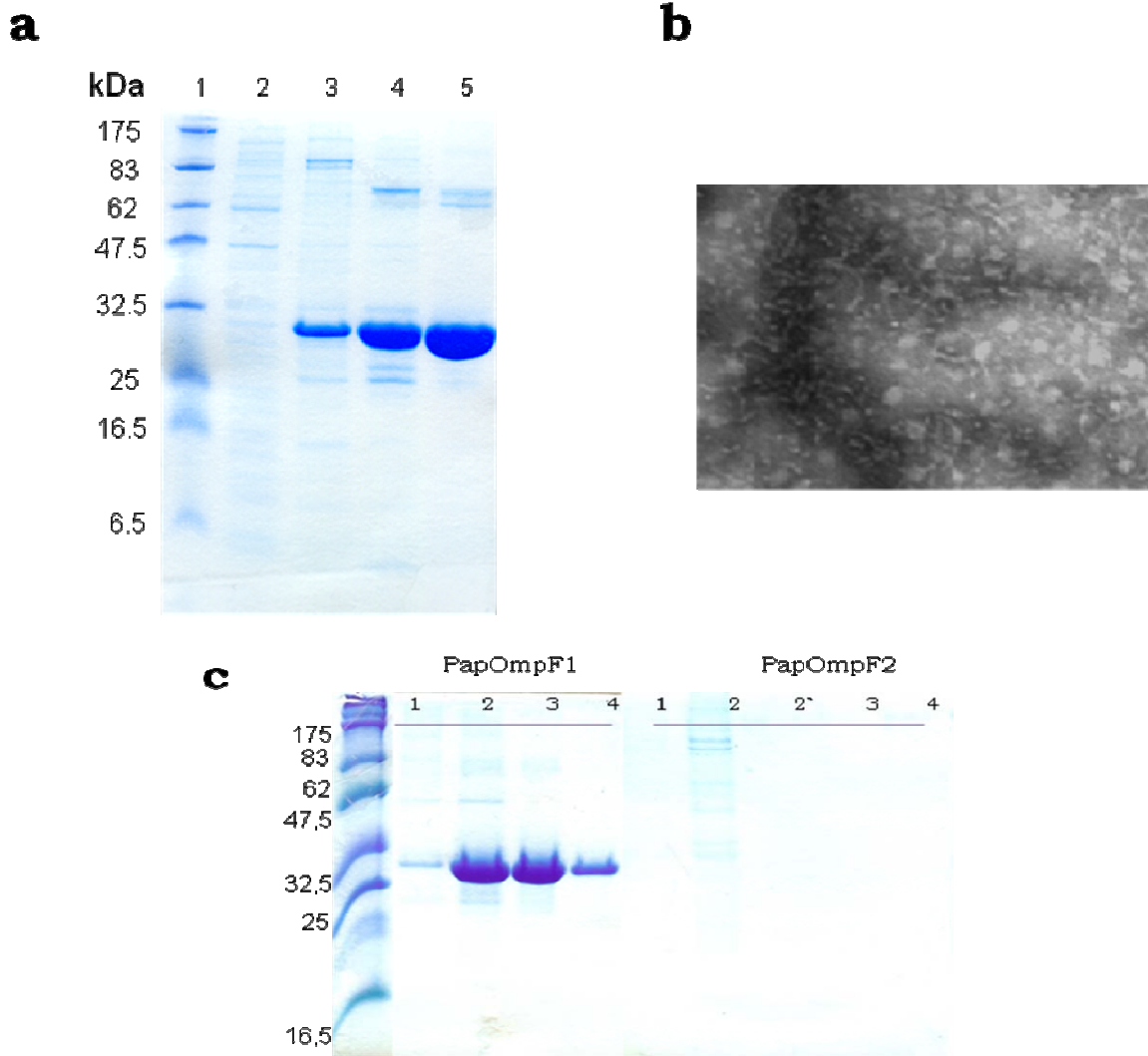
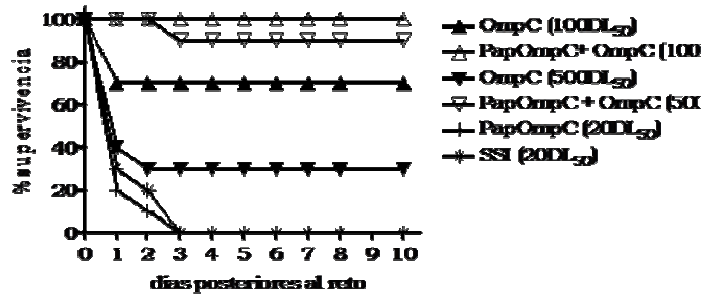


FIGURA 8. Expresión y purificación de PapMV VLPs con afinidad a OmpF (PapOmpF). (a) Perfil electroforético (SDS-PAGE) de la purificación de PapOmpF. Línea 1: marcadores de peso molecular, línea 2: lisado de *E. coli* BL21 expresando PapOmpF antes de la inducción con IPTG, línea 3: fracción después del lavado con Tritón X-100 durante el proceso de purificación, línea 4: fracción después del lavado con zwittergent durante el proceso de purificación, línea 5: VLPs recuperados por ultracentrifugación. (b) Microscopía electrónica de PapOmpF (x100 000). (c) Perfil electroforético (SDS-PAGE) de la purificación de PapOmpC1, PapOmpC2 y PapOmpC3. Línea 1: fracción después del lavado con Tritón X-100 durante el proceso de purificación, línea 2: fracción después del lavado con zwittergent durante el proceso de purificación, Línea 2': fracción eluída, Línea 3: proteína recuperada en sobrenadante, línea 4: VLPs recuperados por ultracentrifugación.

PapOmpC y PapOmpF incrementan la inmunogenicidad de las porinas OmpC y OmpF

Para evaluar la capacidad de los VLPs con afinidad a las porinas OmpC y OmpF de incrementar la inmunogenicidad de las porinas, se inmunizaron grupos de 10 ratones hembras de 6-8 semanas de edad administrando (día 0) via intraperitoneal 10 μ g OmpC, 10 μ gOmpF, 10 μ gOmpC + 10 μ g PapOmpC, 10 μ g OmpF + 10 μ g PapOmpF, ó 10 μ g PapOmpC, 10 μ g OmpF, solución salina isotónica como controles. Todos los antígenos se administraron en ausencia de adyuvante externo. Al día 15 todos los grupos experimentales recibieron 10 μ g OmpC o 10 μ g OmpF respectivamente, en ausencia de adyuvante externo. Al día 25 los ratones fueron retados administrando por via intraperitoneal 100 y 500 dosis letales medias (DL₅₀) de *Salmonella enterica* serovar Thyphi (ATCC 9993) resuspendida en solución Tris-EDTA pH 7.8 - 5% mucina gástrica porcina. Se llevo a cabo el registro de sobrevida durante 10 días posteriores al reto. Se observó que el conjugado PapOmpC-OmpC es capaz de conferir 100 y 90% de protección ante el reto con 100 y 500 DL₅₀ de *Salmonella typhi* respectivamente, comparando con el 70 y 30% de protección que confieren los trómeros de porina cuando se administran en ausencia de adyuvante (Fig 9a). En contraste, el conjugado PapOmpF-OmpF es capaz de conferir 90 y 30% de protección contra el reto con 100 y 500 DL₅₀ de *Salmonella typhi* respectivamente, comparando con el 60 y 20% de protección que confieren los trómeros de OmpF cuando se administran en ausencia de adyuvante (Fig 9b). Estos resultados nos indican que los complejos moleculares PapOmpC-OmpC y PapOmpF-OmpF son capaces de favorecer la inmunogenicidad de las porinas incrementando su capacidad protectora, y además nos confirman que la porina OmpC es la proteína que participa en mayor grado en la inducción de la respuesta inmune protectora contra la infección por *Salmonella typhi*.

a



b

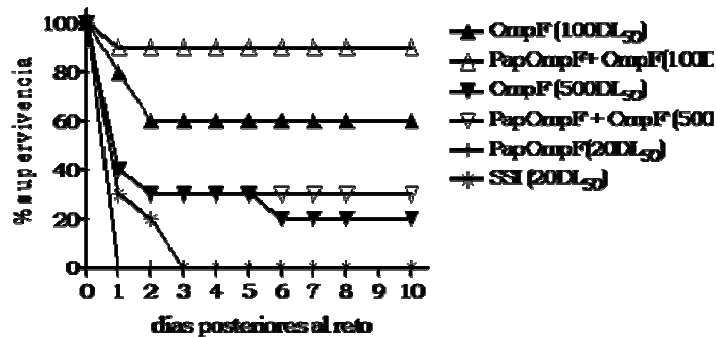


FIGURA 9. PapOmpC y PapOmpF inducen efecto adyuvante en la capacidad protectora de OmpC y OmpF respectivamente. Grupos de 10 ratones hembras BALB/c de 8 semanas de edad fueron inmunizados (día 0) vía intraperitoneal en ausencia de adyuvante con 10µg OmpC, 10µg OmpC + 10µg PapOmpC, 10µg OmpF, 10µg OmpF + 10µg PapOmpF, 10µg PapOmpC, 10µg PapOmpF, o solución salina isotónica (SSI), al día 15 se administró 10µg OmpC o 10µg OmpF en ausencia de adyuvante. Al día 21 se administraron por vía intraperitoneal 100 ó 500 DL50 de *Salmonella typhi* resuspendida en mucina gástrica. La capacidad protectora de los diferentes antígenos se definió como el porcentaje de supervivientes durante los 10 días posteriores al reto.

La conjugación de la porina OmpC al VLP PapMV con afinidad induce un efecto adyuvante en la respuesta de anticuerpos anti-OmpC de larga duración.

Observaciones previas en nuestro grupo, sugieren que los anticuerpos anti-porinas son importantes en la respuesta inmune protectora contra *Salmonella typhi* en el modelo de ratón utilizado (338). La administración de la porina OmpC conjugada a PapOmpC resulta en un incremento en el título de anticuerpos IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG anti-OmpC en la respuesta primaria. Durante la respuesta secundaria, hacia el día 23 (periodo alrededor del cual se realizó el reto (Fig9a) el efecto adyuvante es observable en el título de anticuerpos IgG1, IgG2a e IgG3 anti-OmpC (Fig10A).

Una propiedad deseable cuando se administra una vacuna en cuya formulación se ha incluido un adyuvante, es que éste favorezca la respuesta inmune de larga duración. Se ha observado que la administración del conjugado OmpC-PapOmpC incrementa la respuesta de anticuerpos anti-OmpC de larga duración, manteniendo alto el título de anticuerpos IgG2a e IgG32b anti-OmpC a 97 días posteriores a la inmunización (Fig10A).

Estas observaciones sugieren que este incremento en la respuesta humoral anti-OmpC es uno de los mecanismos involucrados en el incremento en la capacidad protectora de la porina OmpC cuando se administra con PapOmpC y que además los anticuerpos anti-OmpC generados en presencia del conjugado tienen propiedades diferentes a los inducidos cuando la porina se administró en presencia de PapMV wt (Fig5b).

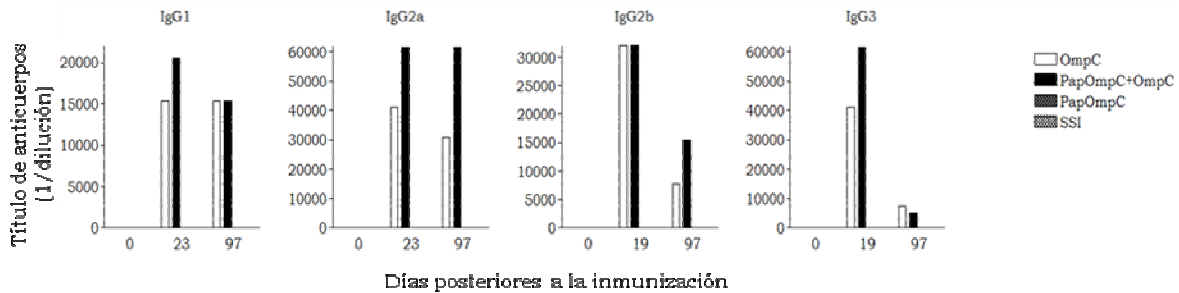
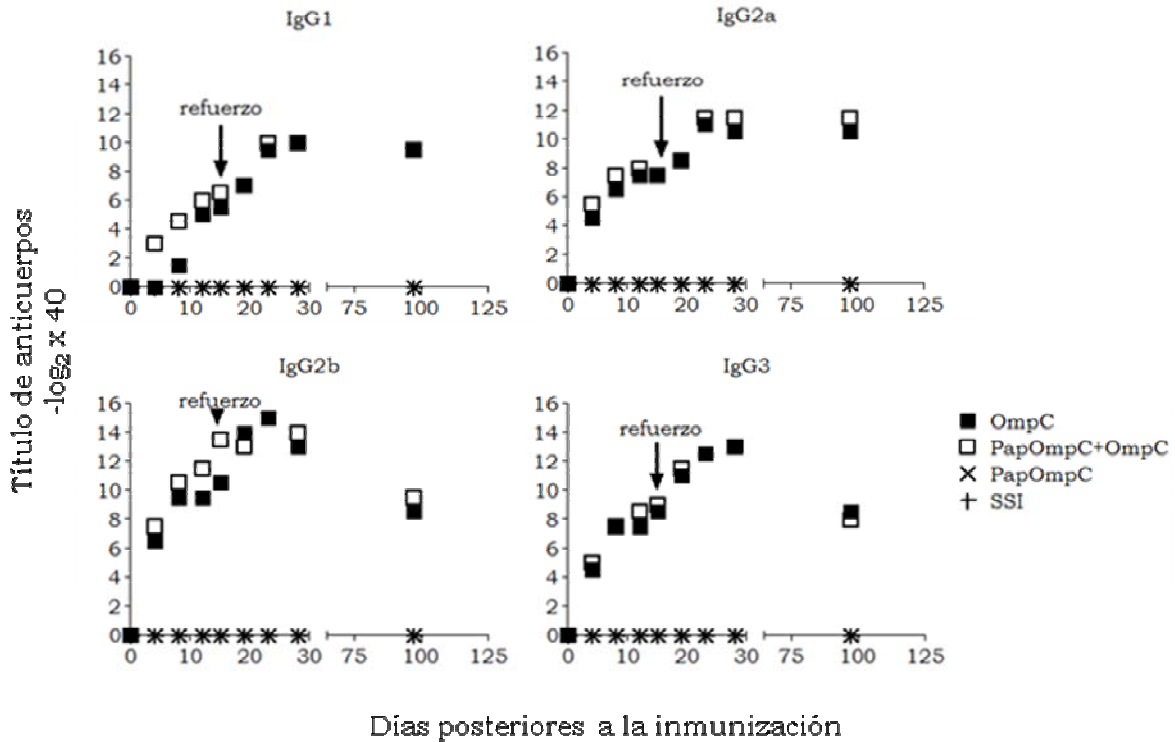


Figura 10A. La conjugación de la porina OmpC al VLP PapMV con afinidad induce un efecto adyuvante en la respuesta de anticuerpos anti-OmpC de larga duración. Grupos de 10 ratones hembras BALB/c de 8 semanas de edad fueron inmunizados (día 0) vía intraperitoneal en ausencia de adyuvante con 10 μ g OmpC, 10 μ g OmpC + 10 μ g PapOmpC o administrados con solución salina isotónica (SSI), al día 15 se administraron 10 μ g OmpC en ausencia de adyuvante. En los tiempos señalados en las gráficas, se obtuvieron muestras de sangre para determinar el título de anticuerpos anti-OmpC en suero por la técnica de ELISA.

La conjugación de la porina OmpF a los VLP PapMV con afinidad induce un efecto adyuvante en la respuesta de anticuerpos OmpF de larga duración.

Los anticuerpos anti-OmpC no son los únicos involucrados en la capacidad protectora contra *S. typhi*, también los anticuerpos anti-OmpF participan, aunque menor magnitud en la respuesta bactericida (79). La conjugación de OmpF con PapOmpF incrementa de manera importante la capacidad protectora de OmpF ante el reto con *S. typhi* en nuestro modelo experimental (Tabla 8).

DL ₅₀	OmpF	OmpF PapMV wt	OmpF PapOmpF	PapMV	PapOmpF	SSI
100	60	50	90			
500	20	10	30			
20				0	0	0

Tabla 8. Comparación de la capacidad protectora de la porina OmpC cuando se coadministra con PapMV wt o conjugada a PapOmpC contra el reto con *S. typhi* en el modelo de ratón.

Cuando se evaluó el efecto adyuvante en la respuesta de anticuerpos contra OmpF conjugada a PapOmpF, observamos que el conjugado favorece la producción de anticuerpos IgG2a, IgG2a e IgG3 anti-OmpF en la respuesta primaria. Hacia el día 23 (periodo alrededor del cual se realizó el reto (Fig9b) se detectó un incremento en el título de anticuerpos de las subclases IgG2a e IgG3. En lo que respecta a la respuesta de anticuerpos de larga duración se observó un efecto adyuvante tanto la respuesta de IgG2a como de IgG3 aunque a títulos mucho menores que los observados en el día 23 (Fig10B). Con estos datos, confirmamos que el hecho de presentar a un antígeno que a pesar de ser inmunogénico pero que no es capaz de inducir de manera eficiente la respuesta inmune protectora, como la porina OmpF, en un arreglo molecular complejo conjugado al VLP PapMV favorece la activación de los mecanismos involucrados en el establecimiento de la respuesta inmune protectora.

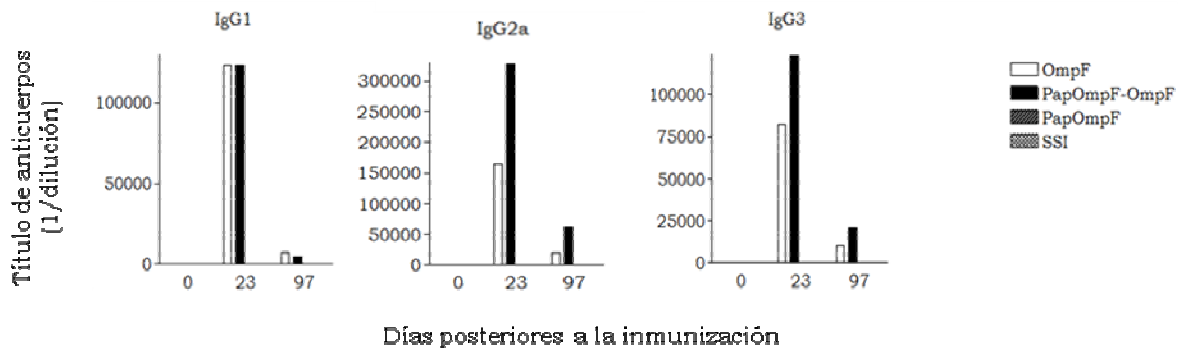
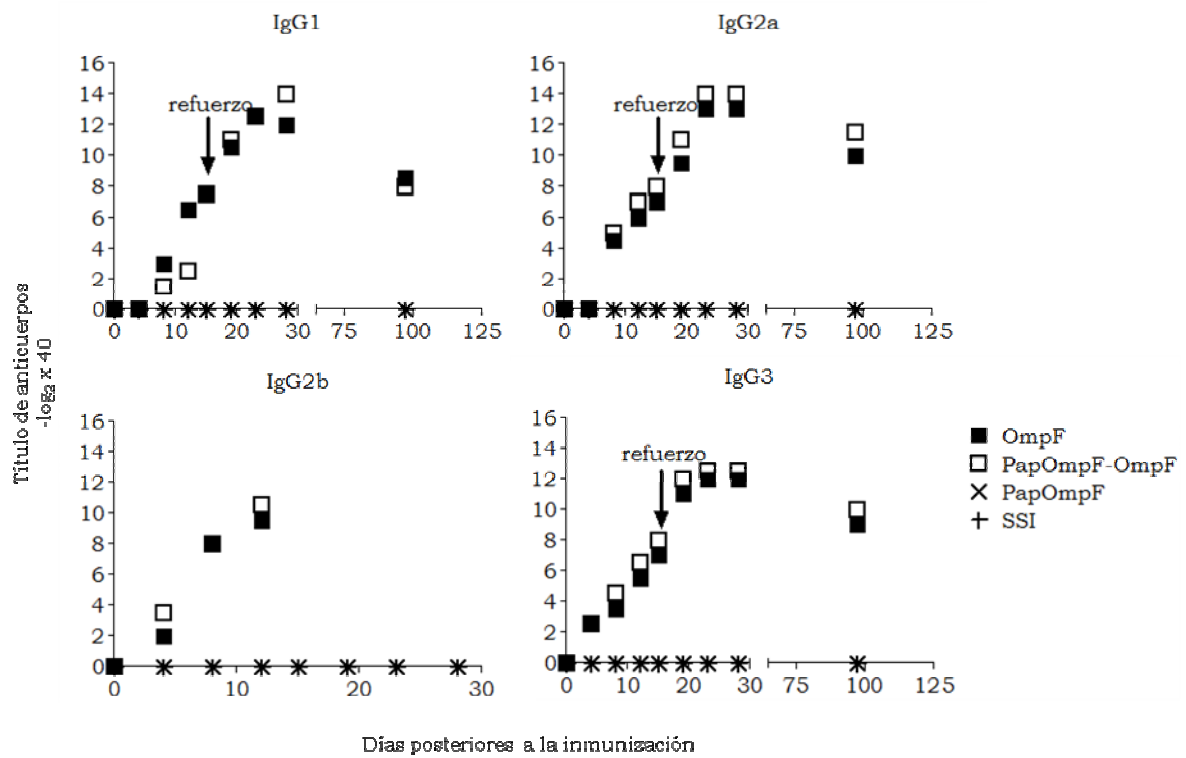


Figura 10B. La conjugación de la porina OmpF a los VLP PapMV con afinidad induce un efecto adyuvante en la respuesta de anticuerpos OmpF de larga duración. Grupos de 10 ratones hembras BALB/c de 8 semanas de edad fueron inmunizados (día 0) vía intraperitoneal en ausencia de adyuvante con 10 μ g OmpF, 10 μ g OmpF + 10 μ g PapOmpF, 10 μ g PapOmpC, 10 μ g PapOmpF o administrados con solución salina isotónica (SSI), al día 15 se administraron 10 μ g OmpF en ausencia de adyuvante. En los tiempos señalados en las gráficas, se obtuvieron muestras de sangre para determinar el título de anticuerpos anti-OmpF en suero por la técnica de ELISA.

La inmunización con el complejo PapOmpC-OmpC favorece la respuesta inmune protectora de larga duración.

El establecimiento del estado inmune es la consecuencia más importante de la respuesta inmune de memoria. La inducción de inmunidad de larga duración es el objetivo de las diferentes estrategias de vacunación. En nuestro modelo, observamos que a pesar de que la conjugación tanto de la porina OmpC como de la porina OmpF a los VLP PapMV resulta en una ganancia de inmuogenicidad traducida en un incremento de la capacidad protectora de ambos antígenos, la porina OmpC continúa siendo la proteína más importante en el establecimiento de la respuesta inmune protectora contra la infección por *S. typhi* en nuestro modelo infeccioso. Para evaluar si nuestro sistema era capaz de inducir inmunidad de larga duración, grupos de 5 ratones hembras BALB/c de 6-8 semanas de edad fueron inmunizados (día 0) por vía intraperitoneal con 10µg OmpC, 10µg PapOmC + 10µg OmpC, ó 10µg PapOmpC o solución salina isotónica como controles. Al día 15 los grupos experimentales recibieron un refuerzo por la misma vía con 10µg OmpC y fueron retados intraperitonealmente al día 140 con 100DL₅₀ de *Salmonella typhi* resuspendida en solución Tris-EDTA pH7.8 – 5% mucina gástrica porcina. El índice de sobrevida se registro durante los 10 días posteriores al reto. Se observó que la inmunización con el complejo PapOmpC-OmpC es capaz de conferir 60% de protección comparado con 20% de protección conferida por los trímeros de OmpC cuando se administran en ausencia de adyuvante (Fig 11). Estos datos sugieren que los antígenos presentes en un arreglo altamente organizado y repetitivo son capaces de inducir un mayor efecto protector que cuando se encuentran formando pequeños complejos moleculares.

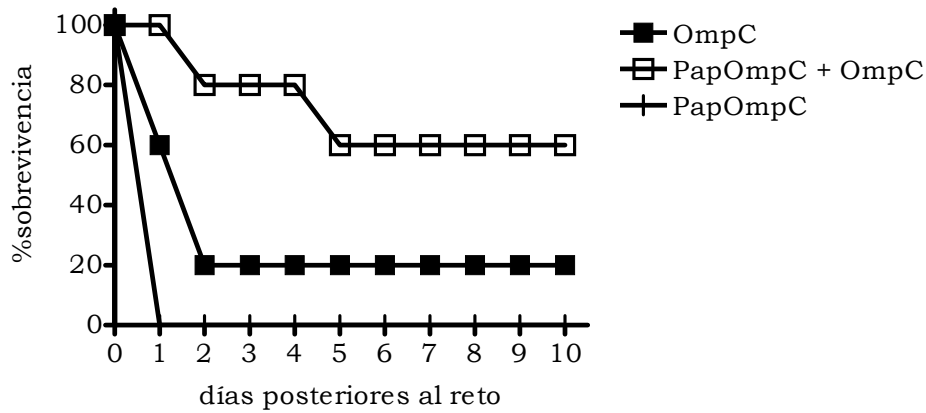


FIGURA 11. La inmunización con PapOmpC y OmpC favorece la protección de larga duración contra el reto con *Salmonella typhi*. Grupos de 5 ratones hembras BALB/c de 8 semanas de edad fueron inmunizados (día 0) vía intraperitoneal (i.p) en ausencia de adyuvante con 10 μ g OmpC, 10 μ g OmpC + 10 μ g PapOmpC, 10 μ g PapOmpC o solución salina isotónica (SSI), al día 15 se administró i.p 10 μ g OmpC en ausencia de adyuvante. Al día 140 se administraron por vía intraperitoneal 100 DL50 de *Salmonella typhi* resuspendida en mucina gástrica. La capacidad protectora de los diferentes antígenos se definió como el porcentaje de supervivientes durante los 10 días posteriores al reto.

12. DISCUSIÓN

Se considera que la función principal del sistema inmune es el reconocimiento de los patógenos y montar una respuesta que permita su control y erradicación.

Históricamente, se le ha dado a la inmunidad adaptativa un papel crucial en el control de los patógenos debido a la especificidad de respuesta, debido a esto, diversos grupos se han enfocado al estudio de las características de las moléculas que son reconocidas por los receptores de la inmunidad adaptativa, así como al entendimiento de las reglas que rigen estas interacciones ligando-receptor (137,138,141,156,166,173,344,345).

La eficiente activación de la respuesta inmune adaptativa está supeditada a las señales coordinadas proporcionadas por el sistema inmune innato, las cuales están mediadas tanto por factores solubles como por interacciones célula-célula (208).

En lo que respecta a la detección del universo molecular microbiano por las células del sistema inmune innato, recientemente se han identificado diversos receptores encargados de este reconocimiento, todos ellos agrupados como receptores de reconocimiento de patrón (PRR) (193), los cuales pueden reconocer moléculas de diferente naturaleza química de manera específica.

El gran avance que ha tenido el conocimiento de la regulación de la activación de la inmunidad innata en los últimos años debido a la caracterización de los diferentes miembros de la familia de los PRR (receptores tipo Toll –TLR-, receptores tipo Nod –NLR-, receptores tipo RIG-I –RLR-, receptores tipo lectina C –CLR-) ha puesto de manifiesto la importancia de las células del sistema inmune innato, principalmente las células dendríticas, en la activación de la respuesta inmune adaptativa.

Además de la erradicación de los patógenos otra consecuencia relevante de la activación del sistema inmune es el establecimiento del estado inmune durante el resto de la vida del individuo. A pesar de que se han estudiado

algunas de las características de los antígenos que son capaces de inducir la activación del sistema inmune, es decir las propiedades que les confieren inmunogenicidad, poco se sabe acerca de las características que tienen aquellos inmunogénos que inducen la respuesta inmune protectora. La caracterización y el estudio de antígenos capaces de inducir la respuesta inmune de larga duración así como su reconocimiento por parte del sistema inmune son cruciales para la comprensión de los mecanismos que llevan a la inducción del estado inmune de larga duración.

Se ha observado que el arreglo organizado y repetitivo de la estructura cuaternaria de la glicoproteína del virus de la estomatitis vesicular (VSV) favorece la activación de los linfocitos B en ausencia de cooperación de los linfocitos T, comportándose como un antígeno TI-2, además se ha observado que esta disposición tridimensional de los antígenos puede ser considerado por los linfocitos B como un marcador de lo propio y de lo no propio (141,176). Por otra parte, la MBP reconoce de manera selectiva patrones de carbohidratos presentes en bacterias, levaduras, parásitos, micobacterias y algunos virus (205) y no se ha observado unión a glicoproteínas endógenas.

Estos datos muestran que la organización y repetitividad de las moléculas son factores importantes para su reconocimiento y la posterior activación de la respuesta inmune, y debido a que este arreglo molecular se encuentra representado principalmente en los microorganismos (virus, bacterias, hongos y parásitos) éste podría ser determinante en la discriminación de lo propio y lo extraño por parte del sistema inmune.

Nuestro modelo, el PapMV representa un sistema con un arreglo altamente organizado y repetitivo capaz de inducir la respuesta de anticuerpos de memoria de larga duración y se ha observado que la capacidad inmunogénica de la proteína de cápside de PapMV es dependiente de su polimerización (327).

Los datos obtenidos en el presente trabajo sugieren que el PapMV se comporta como un antígeno TI-2 y que es capaz de inducir la respuesta

celular (Fig1), debido a que no es un activador policlonal de los linfocitos B como es el caso del LPS e induce la activación específica de los linfocitos B y T.

El reconocimiento de patrones moleculares es importante no sólo para la activación de los linfocitos B debido a un mejor entrecruzamiento del BCR sino que también es importante para el reconocimiento por las células del sistema immune innato, como el caso de la lectina que une a manosa como se mencionó anteriormente (346), esto también se ha observado en el reconocimiento de antígenos poliméricos por parte de TLR4 (209) así como el reconocimiento de flagelina por TLR5 (195).

En la búsqueda del mecanismo a través del cual el PapMV induce la respuesta de anticuerpos de larga duración, encontramos que la excelente capacidad inmunogénica del PapMV podría deberse al reconocimiento de PapMV como PAMP debido a su capacidad de inducir la expresión de moléculas co-estimuladoras en las APC profesionales, así como la inducción de un ambiente pro-inflamatorio caracterizado por las citocinas TNF- α , IL-6 e IFN- α . (Fig 2).

A través de transferencias pasivas de DC estimuladas *in vitro*, se ha puesto de manifiesto la participación de esta población del sistema immune innato en la inducción de la respuesta de anticuerpos (347). Con nuestro sistema, se ha observado que al igual que las DC, los macrófagos también son capaces de inducir la respuesta de anticuerpos, este mecanismo podría ser el involucrado en la traducción de la respuesta immune innata observada en la respuesta de anticuerpos de larga duración. A su vez estos resultados sugirieron que el PapMV podría tener capacidad adyuvante intrínseca ya que es un PAMP capaz de activar eficientemente tanto la respuesta immune innata como la respuesta immune humoral

Los adyuvantes son componentes importantes de las vacunas, particularmente aquellos que contienen componentes bacterianos. Recientemente, se ha propuesto el reconocimiento a través de los

receptores de la inmunidad innata como un posible mecanismo de acción de los agentes adyuvantes (342).

Con los resultados de la figura 3 pudimos comprobar el efecto adyuvante ejercido por el PapMV en la respuesta de anticuerpos anti-OVA y anti-HEL. Además de promover la producción de anticuerpos, la coadministración de PapMV con antígenos de interés en vacunación incrementa la capacidad protectora de éstos (Fig5). Estos datos corroboran que el PapMV es reconocido como PAMP y que al igual que otros PAMP tiene capacidad adyuvante, esta capacidad adyuvante traduce la respuesta innata inducida por el PapMV en una respuesta de anticuerpos de memoria de larga duración.

En los últimos años se ha propuesto a los VLP derivados de virus vegetales como sistemas acarreadores de subunidades de interés en vacunación (329) y así generar vacunas que induzcan el estado immune larga duración. En un intento de incrementar aún más la capacidad protectora de la vacuna experimental basada en porinas de *S. typhi*, se generaron VLP con afinidad a las porinas OmpC y OmpF (Fig6, Fig7, Fig8), componentes principales de esta vacuna experimental.

Las observaciones experimentales demuestran que la conjugación de las porinas OmpC y OmpF a la superficie de PapMV incrementa aún más su capacidad protectora (Fig9) y que este arreglo molecular les permite inducir la respuesta immune protectora de larga duración (Fig10A, Fig10B, Fig11).

Los resultados obtenidos nos permiten proponer que los antígenos altamente organizados y repetitivos al ser reconocidos como PAMP y por otro lado como antígenos (Pamptigen) son altamente inmunogénicos y tienen la propiedad de inducir la respuesta de anticuerpos de larga duración. Estas características, les permite favorecer la activación de los mecanismos involucrados en el establecimiento de la respuesta immune protectora de larga duración debido a que activan eficientemente tanto a la respuesta immune innata como a la adaptativa (Fig12). Estos hallazgos

son de suma utilidad para el desarrollo de adyuvantes para el mejoramiento de las vacunas a base de subunidades que confieran inmunidad de larga duración, esto es sumamente merelevante, ya que a pesar de que desde hace mucho tiempo se conoce la utilidad del uso de componentes microbianos como adyuvantes por un lado, y por otro que la expresión de antígenos en VLPs incrementa su inmunogenicidad, sin embargo no se había conceptualizado que la expresión molecular organizada y repetitiva podría tener propiedades adyuvantes intrínsecas activando de manera eficiente la respuesta inmune innata y traduciendo esta respuesta en memoria inmunológica protectora de larga duración.

El sistema de expresión de subunidades de patógenos de interés en vacunación basado en VLP PapMV representa el primer sistema de expresión de proteínas heterólogas completas en este tipo de plataformas y ha demostrado ser un sistema eficiente capaz de inducir la respuesta inmune protectora de larga duración además de ser inocuo, estable y producido a bajo costo.

Modelo de activación del sistema inmune mediada por Pamptigens

Con los datos obtenidos en el presente trabajo, en conjunto con datos experimentales de otros grupos de investigación, nos han permitido proponer un modelo de activación por los que en este trabajo denominamos Pamptigens, el cual se detalla a continuación.

Los antígenos con un arreglo altamente organizado y repetitivo son reconocidos como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), propiedad que también se ha observado con subunidades de patógenos las cuales tienen estructura cuaternaria. Estas características les permiten entrecruzar eficientemente el BCR favoreciendo la activación de los linfocitos B y la producción de anticuerpos. Por otro lado, este tipo de antígenos también pueden activar a las células del sistema inmune innato a través de PRR, lo que puede favorecer aún más la activación de los

linfocitos B debido a que estas células además del BCR también expresan PRR en su superficie, generando así un sistema de doble señal, esto tiene como consecuencia la inducción de un ambiente óptimo de citocinas y coestimulación para la activación de la respuesta celular y probablemente contribuye a dirigir la denominada tercera señal necesaria para respuesta humoral. En consecuencia se propone denominar a este tipo de moléculas “Pamptigens”, debido a que son reconocidos tanto como antígenos y como PAMP.

A través de este mecanismo los Pamptigens inducirían la respuesta inmune protectora de larga duración óptima en el desarrollo de vacunas.

En contraste los antígenos que solamente pueden ser reconocidos a través del BCR pero que no son ligandos de PRR (por ejemplo OVA, HEL, haptenos) no pueden activar al sistema inmune innato lo que se ve reflejado en su capacidad de inducir una respuesta de anticuerpos de corta duración. Sin embargo, a través de su polimerización (en el caso de los haptenos conjugados un acarreador) o bien a su coadministración con adyuvantes o ligandos de PRR, este tipo de antígenos incrementan su inmunogenicidad lo que impacta en la duración en el mantenimiento de altos títulos de anticuerpos en suero.

Los Pamptigens pueden ser empleados como acarreadores de subunidades de patógenos de interés en vacunación, lo que permitiría incrementar la capacidad protectora de dichas subunidades debido a sus propiedades adyuvantes intrínsecas.

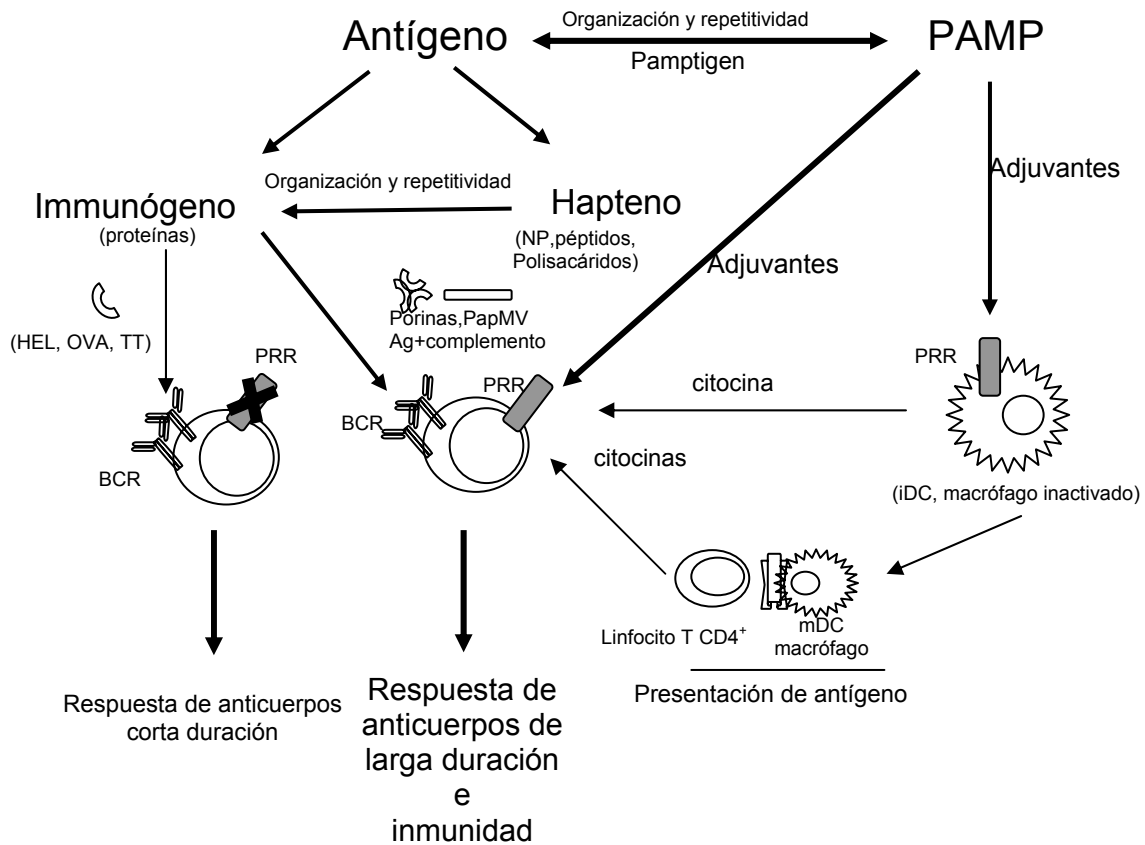


Figura 12. Modelo de la activación del sistema inmune por Pamptigens y su papel en la inducción de la respuesta inmune protectora mediada por anticuerpos.

13. CONCLUSIONES

El arreglo molecular altamente organizado y repetitivo de los antígenos es reconocido por las células del sistema inmune como patrón molecular asociado a patógeno (PAMP) y como antígeno (Pamptigen).

Los inmunógenos con propiedades de Pamptigen tienen la capacidad de activar los mecanismos que dirigen el mantenimiento de la respuesta de anticuerpos de larga duración.

Debido a su dualidad antígeno-PAMP, los Pamptigen tienen propiedades adyuvantes intrínsecas.

Los acarreadores de subunidades de patógenos con un arreglo altamente organizado y repetitivo basado en el VLP PapMV, induce la respuesta protectora de larga duración.

El sistema de expresión de subunidades de patógenos de interés en vacunación basado en VLP PapMV representa el primer sistema de expresión de proteínas heterólogas completas en este tipo de plataformas y ha demostrado ser un sistema eficiente capaz de inducir la respuesta inmune protectora de larga duración además de ser inocuo, estable y producido a bajo costo.

14. Referencias

1. Finley JH. The complete writings of Thucydides. The Peloponnesian War. 1951. New York, Modern Library.
2. Nossal, G. 2003. Vaccines. In *Fundamental Immunology*. Paul W, ed. Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia, pp. 1319-1369.
3. Jenner E. An inquiry into the causes and effects of the variolae vaccinae, a disease discovered in some of the western counties of England. Edward Jenner . 1778. London.
4. Pasteur, L. 1881. De l'attenuation du virus du cholera des poules. *C.R.Acad.Sci.Paris* 92:1378-1383.
5. Von Behring E and Kitasato S. 1890. Ueber das Zustandekommen der Diphtherieimmunität und der Tetanusimmunität bei Thieren. *Deutsche medizinische Wochenschrift* 16:1113.
6. Ehrlich P. 1897. The assay of the diphtheria-curative serum and its theoretical basis. *Collected papers of Paul Ehrlich* 2:107-125.
7. Mazumdar PMH. The template theory of antibody formation and the chemical synthesis of the twenties. 13-32. 1989. Toronto, Wall&Thompson. 1930-1980:essays on the history of immunology.
8. Kabat EA. 1939. An electrophoretic study of immune sera and purified antibody preparations. *J.Exp.Med.* 69:119-131.
9. Burnet FM. The clonal selection theory of acquired immunity. 1959. London, Cambridge University Press.
10. Cozine, C. L., K. L. Wolniak, and T. J. Waldschmidt. 2005. The primary germinal center response in mice. *Curr Opin Immunol* 17:298-302.
11. Fu, Y. X. and D. D. Chaplin. 1999. Development and maturation of secondary lymphoid tissues. *Annu.Rev Immunol* 17:399-433.
12. Kosco-Vilbois, M. H., J. Y. Bonnefoy, and Y. Chvatchko. 1997. The physiology of murine germinal center reactions. *Immunol Rev* 156:127-136.
13. MacLennan, I. C. 1994. Germinal centers. *Annu.Rev Immunol* 12:117-139.

14. Burton, G. F., D. H. Conrad, A. K. Szakal, and J. G. Tew. 1993. Follicular dendritic cells and B cell costimulation. *J Immunol* 150:31-38.
15. Tew, J. G., J. Wu, D. Qin, S. Helm, G. F. Burton, and A. K. Szakal. 1997. Follicular dendritic cells and presentation of antigen and costimulatory signals to B cells. *Immunol Rev* 156:39-52.
16. Li, L. and Y. S. Choi. 2002. Follicular dendritic cell-signaling molecules required for proliferation and differentiation of GC-B cells. *Semin.Immunol* 14:259-266.
17. Kosco-Vilbois, M. H., J. Y. Bonnefoy, and Y. Chvatchko. 1997. The physiology of murine germinal center reactions. *Immunol Rev* 156:127-136.
18. Yoshida, K., T. K. van den Berg, and C. D. Dijkstra. 1993. Two functionally different follicular dendritic cells in secondary lymphoid follicles of mouse spleen, as revealed by CR1/2 and FcR gamma II-mediated immune-complex trapping. *Immunology* 80:34-39.
19. Burton, G. F., D. H. Conrad, A. K. Szakal, and J. G. Tew. 1993. Follicular dendritic cells and B cell costimulation. *J Immunol* 150:31-38.
20. Tew, J. G., J. Wu, D. Qin, S. Helm, G. F. Burton, and A. K. Szakal. 1997. Follicular dendritic cells and presentation of antigen and costimulatory signals to B cells. *Immunol Rev* 156:39-52.
21. Kapasi, Z. F., D. Qin, W. G. Kerr, M. H. Kosco-Vilbois, L. D. Shultz, J. G. Tew, and A. K. Szakal. 1998. Follicular dendritic cell (FDC) precursors in primary lymphoid tissues. *J Immunol* 160:1078-1084.
22. Liu, Y. J., J. Xu, O. de Bouteiller, C. L. Parham, G. Grouard, O. Djossou, B. Saint-Vis, S. Lebecque, J. Banchereau, and K. W. Moore. 1997. Follicular dendritic cells specifically express the long CR2/CD21 isoform. *J Exp.Med.* 185:165-170.
23. Kosco-Vilbois, M. H. 2003. Are follicular dendritic cells really good for nothing? *Nat Rev Immunol* 3:764-769.
24. Imal, Y. and M. Yamakawa. 1996. Morphology, function and pathology of follicular dendritic cells. *Pathol.Int.* 46:807-833.
25. Szabo, M. C., E. C. Butcher, and L. M. McEvoy. 1997. Specialization of mucosal follicular dendritic cells revealed by

- mucosal addressin-cell adhesion molecule-1 display. *J Immunol* 158:5584-5588.
26. Liu, Y. J., D. E. Joshua, G. T. Williams, C. A. Smith, J. Gordon, and I. C. MacLennan. 1989. Mechanism of antigen-driven selection in germinal centres. *Nature* 342:929-931.
 27. Koopman, G., R. M. Keehnen, E. Lindhout, W. Newman, Y. Shimizu, G. A. van Seventer, C. de Groot, and S. T. Pals. 1994. Adhesion through the LFA-1 (CD11a/CD18)-ICAM-1 (CD54) and the VLA-4 (CD49d)-VCAM-1 (CD106) pathways prevents apoptosis of germinal center B cells. *J Immunol* 152:3760-3767.
 28. Kosco, M. H., E. Pflugfelder, and D. Gray. 1992. Follicular dendritic cell-dependent adhesion and proliferation of B cells in vitro. *J Immunol* 148:2331-2339.
 29. Camacho, S. A., M. H. Kosco-Vilbois, and C. Berek. 1998. The dynamic structure of the germinal center. *Immunol Today* 19:511-514.
 30. Jacob, J., J. Przylepa, C. Miller, and G. Kelsoe. 1993. In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. III. The kinetics of V region mutation and selection in germinal center B cells. *J Exp.Med.* 178:1293-1307.
 31. Nossal, G. J. 1992. The molecular and cellular basis of affinity maturation in the antibody response. *Cell* 68:1-2.
 32. Camacho, S. A., M. H. Kosco-Vilbois, and C. Berek. 1998. The dynamic structure of the germinal center. *Immunol Today* 19:511-514.
 33. Meyer-Hermann, M., A. Deutsch, and M. Or-Guil. 2001. Recycling probability and dynamical properties of germinal center reactions. *J Theor.Biol* 210:265-285.
 34. Meyer-Hermann, M. E. and P. K. Maini. 2005. Cutting edge: back to "one-way" germinal centers. *J Immunol* 174:2489-2493.
 35. Campbell, D. J., C. H. Kim, and E. C. Butcher. 2003. Chemokines in the systemic organization of immunity. *Immunol Rev* 195:58-71.
 36. Cyster, J. G., K. M. Ansel, V. N. Ngo, D. C. Hargreaves, and T. T. Lu. 2002. Traffic patterns of B cells and plasma cells. *Adv.Exp.Med.Biol* 512:35-41.
 37. Allen, C. D., K. M. Ansel, C. Low, R. Lesley, H. Tamamura, N. Fujii, and J. G. Cyster. 2004. Germinal center dark and light zone

organization is mediated by CXCR4 and CXCR5. *Nat Immunol* 5:943-952.

38. Ansel, K. M., L. J. McHeyzer-Williams, V. N. Ngo, M. G. McHeyzer-Williams, and J. G. Cyster. 1999. In vivo-activated CD4 T cells upregulate CXC chemokine receptor 5 and reprogram their response to lymphoid chemokines. *J Exp.Med.* 190:1123-1134.
39. Kim, C. H., L. S. Rott, I. Clark-Lewis, D. J. Campbell, L. Wu, and E. C. Butcher. 2001. Subspecialization of CXCR5+ T cells: B helper activity is focused in a germinal center-localized subset of CXCR5+ T cells. *J Exp.Med.* 193:1373-1381.
40. Moser, B. and L. Ebert. 2003. Lymphocyte traffic control by chemokines: follicular B helper T cells. *Immunol Lett.* 85:105-112.
41. Lenschow, D. J., T. L. Walunas, and J. A. Bluestone. 1996. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu.Rev Immunol* 14:233-258.
42. Grewal, I. S. and R. A. Flavell. 1998. CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annu.Rev Immunol* 16:111-135.
43. Sharpe, A. H. and G. J. Freeman. 2002. The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol* 2:116-126.
44. Carreno, B. M. and M. Collins. 2002. The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses. *Annu.Rev Immunol* 20:29-53.
45. Choe, J., L. Li, X. Zhang, C. D. Gregory, and Y. S. Choi. 2000. Distinct role of follicular dendritic cells and T cells in the proliferation, differentiation, and apoptosis of a centroblast cell line, L3055. *J Immunol* 164:56-63.
46. Choi, Y. S. 1997. Differentiation and apoptosis of human germinal center B-lymphocytes. *Immunol Res.* 16:161-174.
47. Kopf, M., S. Herren, M. V. Wiles, M. B. Pepys, and M. H. Kosco-Vilbois. 1998. Interleukin 6 influences germinal center development and antibody production via a contribution of C3 complement component. *J Exp.Med.* 188:1895-1906.
48. Choe, J., L. Li, X. Zhang, C. D. Gregory, and Y. S. Choi. 2000. Distinct role of follicular dendritic cells and T cells in the proliferation, differentiation, and apoptosis of a centroblast cell line, L3055. *J Immunol* 164:56-63.
49. Choi, Y. S. 1997. Differentiation and apoptosis of human germinal center B-lymphocytes. *Immunol Res.* 16:161-174.

50. Choe, J. and Y. S. Choi. 1998. IL-10 interrupts memory B cell expansion in the germinal center by inducing differentiation into plasma cells. *Eur.J.Immunol.* 28:508-515.
51. Liu, Y. J. and C. Arpin. 1997. Germinal center development. *Immunol.Rev.* 156:111-126.
52. Hur, D. Y., D. J. Kim, S. Kim, Y. I. Kim, D. Cho, D. S. Lee, Y. Hwang, K. Bae, K. Y. Chang, and W. J. Lee. 2000. Role of follicular dendritic cells in the apoptosis of germinal center B cells. *Immunol.Lett.* 72:107-111.
53. Schitteck, B. and K. Rajewsky. 1990. Maintenance of B-cell memory by long-lived cells generated from proliferating precursors. *Nature* 346:749-751.
54. Sprent, J. and D. F. Tough. 1994. Lymphocyte life-span and memory. *Science* 265:1395-1400.
55. Okudaira, H. and K. Ishizaka. 1981. Reaginic antibody formation in the mouse. XI. Participation of long-lived antibody-forming cells in persistent antibody formation. *Cell Immunol.* 58:188-201.
56. Ho, F., J. E. Lortan, I. C. MacLennan, and M. Khan. 1986. Distinct short-lived and long-lived antibody-producing cell populations. *Eur.J.Immunol.* 16:1297-1301.
57. Manz, R. A., A. Thiel, and A. Radbruch. 1997. Lifetime of plasma cells in the bone marrow. *Nature* 388:133-134.
58. Slifka, M. K., R. Antia, J. K. Whitmire, and R. Ahmed. 1998. Humoral immunity due to long-lived plasma cells. *Immunity.* 8:363-372.
59. Szakal, A. K., M. H. Kosco, and J. G. Tew. 1989. Microanatomy of lymphoid tissue during humoral immune responses: structure function relationships. *Annu.Rev.Immunol.* 7:91-109.
60. Gray, D. 1993. Immunological memory: a function of antigen persistence. *Trends Microbiol.* 1:39-41.
61. Bachmann, M. F., B. Odermatt, H. Hengartner, and R. M. Zinkernagel. 1996. Induction of long-lived germinal centers associated with persisting antigen after viral infection. *J.Exp.Med.* 183:2259-2269.
62. Mandel, T. E., R. P. Phipps, A. Abbot, and J. G. Tew. 1980. The follicular dendritic cell: long term antigen retention during immunity. *Immunol.Rev.* 53:29-59.

63. Tew, J. G., R. P. Phipps, and T. E. Mandel. 1980. The maintenance and regulation of the humoral immune response: persisting antigen and the role of follicular antigen-binding dendritic cells as accessory cells. *Immunol.Rev.* 53:175-201.
64. Slifka, M. K. and R. Ahmed. 1996. Long-term humoral immunity against viruses: revisiting the issue of plasma cell longevity. *Trends Microbiol.* 4:394-400.
65. Zinkernagel, R. M., M. F. Bachmann, T. M. Kundig, S. Oehen, H. Pirchet, and H. Hengartner. 1996. On immunological memory. *Annu.Rev.Immunol.* 14:333-367.
66. Bernasconi, N. L., E. Traggiai, and A. Lanzavecchia. 2002. Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. *Science* 298:2199-2202.
67. GOTTLIEB, S., F. X. MCLAUGHLIN, L. LEVINE, W. C. LATHAM, and G. EDSALL. 1964. LONG-TERM IMMUNITY TO TETANUS--A STATISTICAL EVALUATION AND ITS CLINICAL IMPLICATIONS. *Am.J.Public Health Nations.Health* 54:961-971.
68. Kjeldsen, K., O. Simonsen, and I. Heron. 1985. Immunity against diphtheria 25-30 years after primary vaccination in childhood. *Lancet* 1:900-902.
69. Slifka, M. K., M. Matloubian, and R. Ahmed. 1995. Bone marrow is a major site of long-term antibody production after acute viral infection. *J.Virol.* 69:1895-1902.
70. Bachmann, M. F., T. M. Kundig, C. P. Kalberer, H. Hengartner, and R. M. Zinkernagel. 1994. How many specific B cells are needed to protect against a virus? *J.Immunol.* 152:4235-4241.
71. Hyland, L., M. Sangster, R. Sealy, and C. Coleclough. 1994. Respiratory virus infection of mice provokes a permanent humoral immune response. *J.Virol.* 68:6083-6086.
72. Benner, R., W. Hijmans, and J. J. Haaijman. 1981. The bone marrow: the major source of serum immunoglobulins, but still a neglected site of antibody formation. *Clin.Exp.Immunol.* 46:1-8.
73. Dilosa, R. M., K. Maeda, A. Masuda, A. K. Szakal, and J. G. Tew. 1991. Germinal center B cells and antibody production in the bone marrow. *J.Immunol.* 146:4071-4077.
74. Ochsenbein, A. F., D. D. Pinschewer, S. Sierro, E. Horvath, H. Hengartner, and R. M. Zinkernagel. 2000. Protective long-term antibody memory by antigen-driven and T help-dependent differentiation of long-lived memory B cells to short-lived plasma

cells independent of secondary lymphoid organs. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97:13263-13268.

75. Burton, G. F., A. Masuda, S. L. Heath, B. A. Smith, J. G. Tew, and A. K. Szakal. 1997. Follicular dendritic cells (FDC) in retroviral infection: host/pathogen perspectives. *Immunol.Rev.* 156:185-197.
76. MacLennan, I. C., Y. J. Liu, and G. D. Johnson. 1992. Maturation and dispersal of B-cell clones during T cell-dependent antibody responses. *Immunol.Rev.* 126:143-161.
77. Dimmock NJ. 1995. Update on the neutralization of animal viruses. *Rev.Med.Virol.* 5:165-179.
78. Spear GT, Hart M, Olinger GG, Hashemi FB, and Saifuddin M. 2001. The role of the complement system in virus infections. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 260:229-245.
79. Secundino, I., C. Lopez-Macias, L. Cervantes-Barragan, C. Gil-Cruz, N. Rios-Sarabia, R. Pastelin-Palacios, M. A. Villasis-Keever, I. Becker, J. L. Puente, E. Calva, and A. Isibasi. 2006. Salmonella porins induce a sustained, lifelong specific bactericidal antibody memory response. *Immunology* 117:59-70.
80. Senn, B. M., C. Lopez-Macias, U. Kalinke, A. Lamarre, A. Isibasi, R. M. Zinkernagel, and H. Hengartner. 2003. Combinatorial immunoglobulin light chain variability creates sufficient B cell diversity to mount protective antibody responses against pathogen infections. *Eur.J.Immunol.* 33:950-961.
81. Gerhard W. 2001. The role of the antibody response in influenza virus infection. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 269:171-190.
82. Mazanec MB, Kaetzel SC, Lamm ME, Fletcher D, and Nedrud JG. 1992. Intracellular neutralization of virus by immunoglobulin A antibodies. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89:6901-6905.
83. Avrameas, S. 1991. Natural autoantibodies: from 'horror autotoxicus' to 'gnothi seauton'. *Immunol.Today* 12:154-159.
84. Steinhoff, U., U. Muller, A. Schertler, H. Hengartner, M. Aguet, and R. M. Zinkernagel. 1995. Antiviral protection by vesicular stomatitis virus-specific antibodies in alpha/beta interferon receptor-deficient mice. *J.Virol.* 69:2153-2158.
85. Zinkernagel, R. M., A. LaMarre, A. Ciurea, L. Hunziker, A. F. Ochsenbein, K. D. McCoy, T. Fehr, M. F. Bachmann, U. Kalinke, and H. Hengartner. 2001. Neutralizing antiviral antibody responses. *Adv.Immunol.* 79:1-53.

86. Plotkin SA and Mortimer EA. *Vaccines*. WB Saunders, Philadelphia.
87. Ahmed, R. and D. Gray. 1996. Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science* 272:54-60.
88. Bachmann MF, Kalinke U, Althage A, Freer G, Burkhardt C, Roost H, Aguet M, Hengartner H, and Zinkernagel RM. 1997. The role of antibody concentration and avidity in antiviral protection. *Science* 276:2024-2027.
89. Pamen PWH and Burton DR. 2001. The anti-viral activity of antibodies in vitro and in vivo. *Adv.Immunol.* 77:195-262.
90. Schlesinger JJ and Chapman S. 1995. Neutralizing F(ab')₂ fragments of protective monoclonal antibodies to yellow fever virus (YF) envelope protein fails to protect mice against lethal YF encephalitis. *J.Gen.Virol.* 76:217-220.
91. Briles DE, Nahm M, Schoer K, Davie J, Baker P, Kearney J, and Barletta R. 1981. Antiphosphocholine antibodies found in normal mouse serum are protective against intravenous infection with type 3 streptococcus pneumoniae. *J.Exp.Med.* 153:694-705.
92. Carroll MC. 1998. The role of complement and complement receptors in induction and regulation of immunity. *Annu.Rev.Immunol.* 16:545-568.
93. Ochsenbein AF, Fehr T, Lutz C, Suter M, Brombacher F, Hengartner H, and Zinkernagel RM. 1999. Control of early viral and bacterial distribution and disease by natural antibodies. *Science* 286:2156-2159.
94. Gray, D. 1993. Immunological memory. *Annu.Rev.Immunol.* 11:49-77.
95. Sawyer WA. Persistence of yellow fever immunity. 5, 413-428. 1930. *J Prevent Med.*
96. Paul JR, Riordan JT, and Melnick JL. Antibodies to three different types of polyomyelitis virus in sera from north Alaskan Eskimos. 54, 275-285. 1951. *Am J Hyg.*
97. Bottiger, M., O. Gustavsson, and A. Svensson. 1998. Immunity to tetanus, diphtheria and poliomyelitis in the adult population of Sweden in 1991. *Int.J.Epidemiol.* 27:916-925.
98. Crotty, S., P. Felgner, H. Davies, J. Glidewell, L. Villarreal, and R. Ahmed. 2003. Cutting edge: long-term B cell memory in humans after smallpox vaccination. *J.Immunol.* 171:4969-4973.

99. Hammarlund, E., M. W. Lewis, S. G. Hansen, L. I. Strelow, J. A. Nelson, G. J. Sexton, J. M. Hanifin, and M. K. Slifka. 2003. Duration of antiviral immunity after smallpox vaccination. *Nat.Med.* 9:1131-1137.
100. Combadiere, B., A. Boissonnas, G. Carcelain, E. Lefranc, A. Samri, F. Bricaire, P. Debre, and B. Autran. 2004. Distinct time effects of vaccination on long-term proliferative and IFN-gamma-producing T cell memory to smallpox in humans. *J.Exp.Med.* 199:1585-1593.
101. Pasteur, L. and Chamberland CE. 1881. Sur la vaccination charbonneuse. *CR Acad.Sci.Paris* 92:1378-1383.
102. Calmette A, Guérin C, and Breton M. 1907. Contribution a l'étude de la tuberculose experimental du cobaye (infection et essais de vaccination par la voie digestive). *Ann.Inst.Pasteur* 21:401-416.
103. Theiler M and Smith HH. 1937. The use of yellow fever virus by in vitro cultivation for human immunization. *J.Exp.Med.* 65:787-800.
104. Plotkin SA. 2005. Vaccines: past, present and future. *Nature Medicine* 11:S5-S11.
105. Gupta PS, Kapoor R, Goyal S, Batra VK, and Jain BK. 1980. Intrathecal human tetanus immunoglobulin in early tetanus. *Lancet* 2:439-440.
106. American Academy of Pediatrics. 2003. Diphtheria. *Red book 2003.Report of the Committee in Infectious Diseases*263-266.
107. Gershon AA. 1995. Measles virus. In *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Mandel GL, Bennett JL, and Dolin R, eds. Churchill Livingstone, New York.
108. Hankins DG and Rosekrans JA. 2004. Overview, prevention and treatment of rabies. *Mayo Clin.Proc* 79:671-676.
109. Kempe CH. 1961. The use of vaccinia hypereimmune gamma-globulin in the prophylaxis of smallpox. *Bull.World Helath Org* 25:41-48.
110. Fhiser RG and Edwards RG. 1998. Varicella-zoster. *Pediatr.Rev.* 19:62-67.
111. Siber GR. 1992. Evaluation of bacterial polysaccharide immunoglobulin for the treatment or prevention of Haemophilus influenzae type b and pneumococcal disease. *J.Infect.Dis* 165:S129-S133.

112. McCready G, Watson JC, Atkinson WL, Heath JL, Bellini WJ, and Polloi A. 1996. Measles vaccine effectiveness and duration of vaccine-induced immunity in the absence of boosting from exposure to measles virus. *Pediatr.Infect.Dis.* 15:1082-1086.
113. Mäkela PH, Käyhty H, Leino T, Auranen K, Peltola H, Ekström N, and Eskola J. 2003. Long-persistence of immunity after immunisation with Haemophilus influenzae type b conjugate vaccine. *Vaccine* 22:287-292.
114. McMahon BJ, Bruden DL, Petersen, Bulkow LR, Parkinson AL, Nalnan O, Khristova M, Zanis C, Peters H, and Margolis HS. 2005. Antibody levels and protection after Hepatitis B vaccination: results of a 15-year follow-up. *Ann.Intern.Med.* 142:333-341.
115. Banatvala J, Van Damme P, and Oehen S. 2001. Life long protection against hepatitis B: the role of vaccine immunogenicity in immune memory. *Vaccine* 19:877-885.
116. Thraenhardt O, Kreuzfelder E, Hillebrandt M, Marcus I, Ramakrishnan K, Fu ZF, and Dietzschold B. 1994. Long-term humoral and cellular immunity after vaccination with cell culture rabies vaccine in man. *Clinical Immunology and Immunopathology* 71:287-292.
117. Shinefield HR, Black SB, Staehle B, Matthews H, Adelman T, Ensor K, Li S, Chan I, Heyse J, Waters M, Chan C, Vessey R, Kaplan KM, and Kuter BJ. 2002. Vaccination with measles, mumps and rubella vaccine and varicella vaccine: safety, tolerability, immunogenicity, persistence of antibody and duration of protection against varicella in healthy children. *Pediatr.Infect.Dis.* 21:555-561.
118. McIntyre PB, Turnbull FM, Egan A, Burgess MA, Wolter JM, and Schuerman LM. 2004. High levels of antibody in adults three years after vaccination with a reduced antigen content diphtheria-tetanus-acellular pertussis vaccine. *Vaccine* 23:380-385.
119. Aronson NE, Santosham M, Comstock GW, Howard RS, Moulton LH, Rhoades ER, and Harrison LH. 2004. Long-term efficacy of BCG vaccine. *JAMA* 291:2086-2091.
120. Bottiger M. 1987. A study of the sero-immunity that as protected the Swedish population against poliomyelitis for 25 years. *Scand J Infect Dis* 19:595-601.
121. Cahalan, M. D. and G. A. Gutman. 2006. The sense of place in the immune system. *Nat.Immunol.* 7:329-332.

122. GOWANS, J. L. 1959. The recirculation of lymphocytes from blood to lymph in the rat. *J Physiol* 146:54-69.
123. GOWANS, J. L. and E. J. KNIGHT. 1964. THE ROUTE OF RE-CIRCULATION OF LYMPHOCYTES IN THE RAT. *Proc R.Soc.Lond B Biol Sci.* 159:257-282.
124. Howard, J. C., S. V. Hunt, and J. L. Gowans. 1972. Identification of marrow-derived and thymus-derived small lymphocytes in the lymphoid tissue and thoracic duct lymph of normal rats. *J Exp.Med.* 135:200-219.
125. Gutman, G. A. and I. L. Weissman. 1972. Lymphoid tissue architecture. Experimental analysis of the origin and distribution of T-cells and B-cells. *Immunology* 23:465-479.
126. Stamper, H. B., Jr. and J. J. Woodruff. 1976. Lymphocyte homing into lymph nodes: in vitro demonstration of the selective affinity of recirculating lymphocytes for high-endothelial venules. *J Exp.Med.* 144:828-833.
127. Gallatin, W. M., I. L. Weissman, and E. C. Butcher. 1983. A cell-surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes. *Nature* 304:30-34.
128. Cahalan, M. D. and G. A. Gutman. 2006. The sense of place in the immune system. *Nat Immunol* 7:329-332.
129. Karrer, U., A. Althage, B. Odermatt, C. W. Roberts, S. J. Korsmeyer, S. Miyawaki, H. Hengartner, and R. M. Zinkernagel. 1997. On the key role of secondary lymphoid organs in antiviral immune responses studied in alymphoplastic (aly/aly) and spleenless (Hox11(-)/-) mutant mice. *J Exp.Med.* 185:2157-2170.
130. Zinkernagel, R. M., S. Ehl, P. Aichele, S. Oehen, T. Kundig, and H. Hengartner. 1997. Antigen localisation regulates immune responses in a dose- and time-dependent fashion: a geographical view of immune reactivity. *Immunol Rev* 156:199-209.
131. Zinkernagel, R. M., S. Ehl, P. Aichele, S. Oehen, T. Kundig, and H. Hengartner. 1997. Antigen localisation regulates immune responses in a dose- and time-dependent fashion: a geographical view of immune reactivity. *Immunol Rev* 156:199-209.
132. Zinkernagel, R. M., H. P. Pircher, P. Ohashi, S. Oehen, B. Odermatt, T. Mak, H. Arnheiter, K. Burki, and H. Hengartner. 1991. T and B cell tolerance and responses to viral antigens in transgenic mice: implications for the pathogenesis of autoimmune versus immunopathological disease. *Immunol Rev* 122:133-171.

133. Zinkernagel, R. M. 1996. Immunology taught by viruses. *Science* 271:173-178.
134. Karrer, U., A. Althage, B. Odermatt, C. W. Roberts, S. J. Korsmeyer, S. Miyawaki, H. Hengartner, and R. M. Zinkernagel. 1997. On the key role of secondary lymphoid organs in antiviral immune responses studied in alymphoplastic (aly/aly) and spleenless (Hox11(-)/-) mutant mice. *J Exp.Med.* 185:2157-2170.
135. Ludewig, B., B. Odermatt, S. Landmann, H. Hengartner, and R. M. Zinkernagel. 1998. Dendritic cells induce autoimmune diabetes and maintain disease via de novo formation of local lymphoid tissue. *J.Exp.Med.* 188:1493-1501.
136. Zinkernagel, R. M. 1996. Immunology taught by viruses. *Science* 271:173-178.
137. Zinkernagel, R. M., S. Ehl, P. Aichele, S. Oehen, T. Kundig, and H. Hengartner. 1997. Antigen localisation regulates immune responses in a dose- and time-dependent fashion: a geographical view of immune reactivity. *Immunol.Rev.* 156:199-209.
138. Bachmann, M. F. and R. M. Zinkernagel. 1996. The influence of virus structure on antibody responses and virus serotype formation. *Immunol.Today* 17:553-558.
139. Moller, G., E. Gronowicz, U. Persson, A. Coutinho, E. Moller, L. Hammarstrom, and E. Smith. 1976. Spleen cells from animals tolerant to a thymus-dependent antigen can be activated by lipopolysaccharide to synthesize antibodies against the tolerogen. *J.Exp.Med.* 143:1429-1438.
140. Ohashi, P. S., S. Oehen, K. Buerki, H. Pircher, C. T. Ohashi, B. Odermatt, B. Malissen, R. M. Zinkernagel, and H. Hengartner. 1991. Ablation of "tolerance" and induction of diabetes by virus infection in viral antigen transgenic mice. *Cell* 65:305-317.
141. Bachmann, M. F., U. H. Rohrer, T. M. Kundig, K. Burki, H. Hengartner, and R. M. Zinkernagel. 1993. The influence of antigen organization on B cell responsiveness. *Science* 262:1448-1451.
142. Weigle, W. O. 1973. Immunological unresponsiveness. *Adv.Immunol.* 16:61-122.
143. SELA, M., D. GIVOL, and E. MOZES. 1963. RESOLUTION OF RABBIT GAMMA-GLOBULIN INTO TWO FRACTIONS BY CHROMATOGRAPHY ON DIETHYLAMINOETHYL-SEPHADEX. *Biochim.Biophys.Acta* 78:649-657.

144. SELA, M. and E. MOZES. 1966. Dependence of the chemical nature of antibodies on the net electrical charge of antigens. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 55:445-452.
145. SELA, M. 1966. Chemical studies of the combining sites of antibodies. *Proc.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* 166:188-206.
146. Rude, E., E. MOZES, and M. SELA. 1968. Role of the net electrical charge of the complete antigen in determining the chemical nature of anti-p-azobenzene arsonate antibodies. *Biochemistry* 7:2971-2975.
147. Benacerraf, B., V. Nussenzweig, P. H. Maurer, and W. Stylos. 1969. Relationship between the net electrical charge of antigens and specific antibodies. An example of selection by antigen of cells producing highest affinity antibody. *Isr.J.Med.Sci.* 5:171-176.
148. MOZES, E. and M. SELA. 1969. Resolution of mouse and human immunoglobulin G into two fractions by chromatography on diethylaminoethyl-sephadex. Relation of mouse antibody type to the antigen charge. *Isr.J.Med.Sci.* 5:267-270.
149. Strosberg AD and Kanarek L. 1970. Ratio of the Fab fragments I and II from goat antibodies normal gamma-globulins. *FEBS Lett.* 6:28-30.
150. Underdown, B. J. and L. Goodfriend. 1970. Correlation of charge properties of human reaginic antibodies with charge of the corresponding allergens. *J.Immunol.* 104:530-533.
151. Landsteiner K. *The specificity of serological reactions.* Cambridge, Massachussets.
152. SAGE, H. J., G. F. DEUTSCH, G. D. FASMAN, and L. LEVINE. 1964. THE SEROLOGICAL SPECIFICITY OF THE POLY-ALANINE IMMUNE SYSTEM. *Immunochemistry.* 1:133-144.
153. Schechter, I., B. Schechter, and M. SELA. 1966. Combining sites of antibodies with L-alanine and D-alanine peptide specificity and the effect of serum proteolytic activity on their estimation. *Biochim.Biophys.Acta* 127:438-456.
154. Jaton, J. C. and M. SELA. 1968. Role of optical configuration in the immunogenicity and specificity of synthetic antigens derived from multichain polyproline. *J.Biol.Chem.* 243:5616-5626.
155. Armstrong, W. D., E. Diener, and G. R. Shellam. 1969. Antigen-reactive cells in normal, immunized, and tolerant mice. *J.Exp.Med.* 129:393-410.

156. Feldmann, M. and A. Easten. 1971. The relationship between antigenic structure and the requirement for thymus-derived cells in the immune response. *J.Exp.Med.* 134:103-119.
157. Howard, J. G., G. H. Christie, B. M. Courtenay, E. Leuchars, and A. J. Davies. 1971. Studies on immunological paralysis. VI. Thymic-independence of tolerance and immunity to type 3 pneumococcal polysaccharide. *Cell Immunol.* 2:614-626.
158. Andersson, B. and H. Blomgren. 1971. Evidence for thymus-independent humoral antibody production in mice against polyvinylpyrrolidone and E. coli lipopolysaccharide. *Cell Immunol.* 2:411-424.
159. Moller, G. and G. Michael. 1971. Frequency of antigen-sensitive cells to thymus-independent antigens. *Cell Immunol.* 2:309-316.
160. MOZES, E. and G. M. Shearer. 1971. Contribution of bone marrow cells and lack of expression of thymocytes in genetic controls of immune responses for two immunopotent regions within poly-(Phe,Glu)-poly-Pro--poly-Lys in inbred mouse strains. *J.Exp.Med.* 134:141-161.
161. Shearer, G. M., E. MOZES, and M. SELA. 1972. Contribution of different cell types to the genetic control of immune responses as a function of the chemical nature of the polymeric side chains (poly-L-prolyl and poly-DL-alanyl) of synthetic immunogens. *J.Exp.Med.* 135:1009-1027.
162. SELA, M., E. MOZES, and G. M. Shearer. 1972. Thymus-independence of slowly metabolized immunogens. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 69:2696-2700.
163. Banchereau, J. and R. M. Steinman. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245-252.
164. Germain, R. N. 1994. MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* 76:287-299.
165. Kim, E. E., R. Varadarajan, H. W. Wyckoff, and F. M. Richards. 1992. Refinement of the crystal structure of ribonuclease S. Comparison with and between the various ribonuclease A structures. *Biochemistry* 31:12304-12314.
166. Delamarre, L., R. Couture, I. Mellman, and E. S. Trombetta. 2006. Enhancing immunogenicity by limiting susceptibility to lysosomal proteolysis. *J.Exp.Med.* 203:2049-2055.

167. Ada GL, Nossal GJV, and Pye J. 1964. Antigens in immunity. III. Distribution of iodinated antigens following injection into rats via the hind foot pats *Australian J.Exptl.Biol.Med.Sci.* 42:295-310.
168. Loor, F. 1967. Comparative immunogenicities of tobacco mosaic virus, protein subunits, and reaggregated protein subunits. *Virology* 33:215-220.
169. Herzenberg, L. A. and A. B. Kantor. 1993. B-cell lineages exist in the mouse. *Immunol.Today* 14:79-83.
170. Casali, P. and A. L. Notkins. 1989. CD5+ B lymphocytes, polyreactive antibodies and the human B-cell repertoire. *Immunol.Today* 10:364-368.
171. Bachmann, M. F. and R. M. Zinkernagel. 1997. Neutralizing antiviral B cell responses. *Annu.Rev.Immunol.* 15:235-270.
172. Dintzis, H. M., R. Z. Dintzis, and B. Vogelstein. 1976. Molecular determinants of immunogenicity: the immunon model of immune response. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 73:3671-3675.
173. Feldmann, M., J. G. Howard, and C. Desaymard. 1975. Role of antigen structure in the discrimination between tolerance and immunity by b cells. *Transplant.Rev.* 23:78-97.
174. Mond, J. J., K. E. Stein, B. Subbarao, and W. E. Paul. 1979. Analysis of B cell activation requirements with TNP-conjugated polyacrylamide beads. *J.Immunol.* 123:239-245.
175. Bachmann, M. F., T. M. Kundig, B. Odermatt, H. Hengartner, and R. M. Zinkernagel. 1994. Free recirculation of memory B cells versus antigen-dependent differentiation to antibody-forming cells. *J.Immunol.* 153:3386-3397.
176. Bachmann, M. F., H. Hengartner, and R. M. Zinkernagel. 1995. T helper cell-independent neutralizing B cell response against vesicular stomatitis virus: role of antigen patterns in B cell induction? *Eur.J Immunol* 25:3445-3451.
177. Jegerlehner, A., T. Storni, G. Lipowsky, M. Schmid, P. Pumpens, and M. F. Bachmann. 2002. Regulation of IgG antibody responses by epitope density and CD21-mediated costimulation. *Eur.J.Immunol.* 32:3305-3314.
178. Liu WL, Zou P, Liu ZQ, Lu Y, Ding J, and Chen YH. 2004. High epitope density in a single recombinant protein molecule of the extracellular domain of influenza A virus M2 protein significantly enhances protective immunity. *Vaccine* 23:366-371.

179. Zinkernagel, R. M. 2003. On natural and artificial vaccinations. *Annu.Rev.Immunol.* 21:515-546.
180. Liu, W. and Y. H. Chen. 2005. High epitope density in a single protein molecule significantly enhances antigenicity as well as immunogenicity: a novel strategy for modern vaccine development and a preliminary investigation about B cell discrimination of monomeric proteins. *Eur.J.Immunol.* 35:505-514.
181. Bachmann, M. F., T. M. Kundig, H. Hengartner, and R. M. Zinkernagel. 1997. Protection against immunopathological consequences of a viral infection by activated but not resting cytotoxic T cells: T cell memory without "memory T cells"? *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94:640-645.
182. Roost, H. P., M. F. Bachmann, A. Haag, U. Kalinke, V. Pliska, H. Hengartner, and R. M. Zinkernagel. 1995. Early high-affinity neutralizing anti-viral IgG responses without further overall improvements of affinity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92:1257-1261.
183. Bretscher, P. and M. Cohn. 1970. A theory of self-nonsel discrimination. *Science* 169:1042-1049.
184. Mond, J. J., Q. Vos, A. Lees, and C. M. Snapper. 1995. T cell independent antigens. *Curr.Opin.Immunol.* 7:349-354.
185. Mond, J. J., A. Lees, and C. M. Snapper. 1995. T cell-independent antigens type 2. *Annu.Rev.Immunol.* 13:655-692.
186. Kurosaki, T. 1999. Genetic analysis of B cell antigen receptor signaling. *Annu.Rev.Immunol.* 17:555-592.
187. Campbell, K. S. 1999. Signal transduction from the B cell antigen-receptor. *Curr.Opin.Immunol.* 11:256-264.
188. Fluckiger, A. C., Z. Li, R. M. Kato, M. I. Wahl, H. D. Ochs, R. Longnecker, J. P. Kinet, O. N. Witte, A. M. Scharenberg, and D. J. Rawlings. 1998. Btk/Tec kinases regulate sustained increases in intracellular Ca²⁺ following B-cell receptor activation. *EMBO J.* 17:1973-1985.
189. Pecanha, L. M., C. M. Snapper, F. D. Finkelman, and J. J. Mond. 1991. Dextran-conjugated anti-Ig antibodies as a model for T cell-independent type 2 antigen-mediated stimulation of Ig secretion in vitro. I. Lymphokine dependence. *J.Immunol.* 146:833-839.
190. Matsumoto, A. K., J. Kopicky-Burd, R. H. Carter, D. A. Tuveson, T. F. Tedder, and D. T. Fearon. 1991. Intersection of the complement and immune systems: a signal transduction complex of the B lymphocyte-containing complement receptor type 2 and CD19. *J.Exp.Med.* 173:55-64.

191. Bradbury, L. E., G. S. Kansas, S. Levy, R. L. Evans, and T. F. Tedder. 1992. The CD19/CD21 signal transducing complex of human B lymphocytes includes the target of antiproliferative antibody-1 and Leu-13 molecules. *J.Immunol.* 149:2841-2850.
192. Mongini, P. K., M. A. Vilensky, P. F. Highet, and J. K. Inman. 1997. The affinity threshold for human B cell activation via the antigen receptor complex is reduced upon co-ligation of the antigen receptor with CD21 (CR2). *J.Immunol.* 159:3782-3791.
193. Janeway, C. A. J. 1989. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 54 Pt 1:1-13.
194. Medzhitov, R. and C. A. Janeway, Jr. 1997. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 91:295-298.
195. Hayashi, F., K. D. Smith, A. Ozinsky, T. R. Hawn, E. C. Yi, D. R. Goodlett, J. K. Eng, S. Akira, D. M. Underhill, and A. Aderem. 2001. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410:1099-1103.
196. Alexopoulou, L., A. C. Holt, R. Medzhitov, and R. A. Flavell. 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413:732-738.
197. Lund, J. M., L. Alexopoulou, A. Sato, M. Karow, N. C. Adams, N. W. Gale, A. Iwasaki, and R. A. Flavell. 2004. Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 101:5598-5603.
198. Hoshino, K., O. Takeuchi, T. Kawai, H. Sanjo, T. Ogawa, Y. Takeda, K. Takeda, and S. Akira. 1999. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J.Immunol.* 162:3749-3752.
199. Takeuchi, O., K. Hoshino, T. Kawai, H. Sanjo, H. Takada, T. Ogawa, K. Takeda, and S. Akira. 1999. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity.* 11:443-451.
200. Girardin, S. E., I. G. Boneca, L. A. Carneiro, A. Antignac, M. Jehanno, J. Viala, K. Tedin, M. K. Taha, A. Labigne, U. Zahringer, A. J. Coyle, P. S. DiStefano, J. Bertin, P. J. Sansonetti, and D. J. Philpott. 2003. Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science* 300:1584-1587.
201. Boyden, E. D. and W. F. Dietrich. 2006. Nalp1b controls mouse macrophage susceptibility to anthrax lethal toxin. *Nat.Genet* 38:240-244.

202. Miao, E. A., C. M. Alpuche-Aranda, M. Dors, A. E. Clark, M. W. Bader, S. I. Miller, and A. Aderem. 2006. Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1beta via Ipaf. *Nat.Immunol.* 7:569-575.
203. Yoneyama, M., M. Kikuchi, T. Natsukawa, N. Shinobu, T. Imaizumi, M. Miyagishi, K. Taira, S. Akira, and T. Fujita. 2004. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat.Immunol.* 5:730-737.
204. Sastry, K. and R. A. Ezekowitz. 1993. Collectins: pattern recognition molecules involved in first line host defense. *Curr.Opin.Immunol.* 5:59-66.
205. Ezekowitz, R. A., J. Austyn, P. D. Stahl, and S. Gordon. 1981. Surface properties of bacillus Calmette-Guerin-activated mouse macrophages. Reduced expression of mannose-specific endocytosis, Fc receptors, and antigen F4/80 accompanies induction of Ia. *J.Exp.Med.* 154:60-76.
206. Weis, W. I., K. Drickamer, and W. A. Hendrickson. 1992. Structure of a C-type mannose-binding protein complexed with an oligosaccharide. *Nature* 360:127-134.
207. Weis, W. I., M. E. Taylor, and K. Drickamer. 1998. The C-type lectin superfamily in the immune system. *Immunol.Rev.* 163:19-34.
208. Padovan, E., R. M. Landmann, and G. De Libero. 2007. How pattern recognition receptor triggering influences T cell responses: a new look into the system. *Trends Immunol.* 28:308-314.
209. Berguer, P. M., J. Mundinano, I. Piazzon, and F. A. Goldbaum. 2006. A polymeric bacterial protein activates dendritic cells via TLR4. *J.Immunol.* 176:2366-2372.
210. Bhakuni, V., D. Xie, and E. Freire. 1991. Thermodynamic identification of stable folding intermediates in the B-subunit of cholera toxin. *Biochemistry* 30:5055-5060.
211. Ruddock, L. W., S. P. Ruston, S. M. Kelly, N. C. Price, R. B. Freedman, and T. R. Hirst. 1995. Kinetics of acid-mediated disassembly of the B subunit pentamer of Escherichia coli heat-labile enterotoxin. Molecular basis of pH stability. *J.Biol.Chem.* 270:29953-29958.
212. Kirnbauer, R., F. Booy, N. Cheng, D. R. Lowy, and J. T. Schiller. 1992. Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89:12180-12184.

213. Evans, T. G., W. Bonnez, R. C. Rose, S. Koenig, L. Demeter, J. A. Suzich, D. O'Brien, M. Campbell, W. I. White, J. Balsley, and R. C. Reichman. 2001. A Phase 1 study of a recombinant viruslike particle vaccine against human papillomavirus type 11 in healthy adult volunteers. *J.Infect.Dis.* 183:1485-1493.
214. Harro, C. D., Y. Y. Pang, R. B. Roden, A. Hildesheim, Z. Wang, M. J. Reynolds, T. C. Mast, R. Robinson, B. R. Murphy, R. A. Karron, J. Dillner, J. T. Schiller, and D. R. Lowy. 2001. Safety and immunogenicity trial in adult volunteers of a human papillomavirus 16 L1 virus-like particle vaccine. *J.Natl.Cancer Inst.* 93:284-292.
215. Akira, S., M. Yamamoto, and K. Takeda. 2003. Role of adapters in Toll-like receptor signalling. *Biochem.Soc.Trans.* 31:637-642.
216. Yang, R., F. M. Murillo, H. Cui, R. Blosser, S. Uematsu, K. Takeda, S. Akira, R. P. Viscidi, and R. B. Roden. 2004. Papillomavirus-like particles stimulate murine bone marrow-derived dendritic cells to produce alpha interferon and Th1 immune responses via MyD88. *J.Virol.* 78:11152-11160.
217. Yang, R., F. M. Murillo, M. J. Delannoy, R. L. Blosser, W. H. Yutzy, S. Uematsu, K. Takeda, S. Akira, R. P. Viscidi, and R. B. Roden. 2005. B lymphocyte activation by human papillomavirus-like particles directly induces Ig class switch recombination via TLR4-MyD88. *J.Immunol.* 174:7912-7919.
218. Hervas-Stubbs, S., P. Rueda, L. Lopez, and C. Leclerc. 2007. Insect baculoviruses strongly potentiate adaptive immune responses by inducing type I IFN. *J.Immunol.* 178:2361-2369.
219. Abe, T., H. Hemmi, H. Miyamoto, K. Moriishi, S. Tamura, H. Takaku, S. Akira, and Y. Matsuura. 2005. Involvement of the Toll-like receptor 9 signaling pathway in the induction of innate immunity by baculovirus. *J.Virol.* 79:2847-2858.
220. Janeway, C. A., Jr. and R. Medzhitov. 2002. Innate immune recognition. *Annu.Rev.Immunol.* 20:197-216.
221. Takeda, K., T. Kaisho, and S. Akira. 2003. Toll-like receptors. *Annu.Rev.Immunol.* 21:335-376.
222. Kawai, T., O. Adachi, T. Ogawa, K. Takeda, and S. Akira. 1999. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity.* 11:115-122.
223. Schnare, M., G. M. Barton, A. C. Holt, K. Takeda, S. Akira, and R. Medzhitov. 2001. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nat.Immunol.* 2:947-950.

224. Pasare, C. and R. Medzhitov. 2005. Control of B-cell responses by Toll-like receptors. *Nature* 438:364-368.
225. Shaffer, A. L., K. I. Lin, T. C. Kuo, X. Yu, E. M. Hurt, A. Rosenwald, J. M. Giltneane, L. Yang, H. Zhao, K. Calame, and L. M. Staudt. 2002. Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. *Immunity*. 17:51-62.
226. Shapiro-Shelef, M., K. I. Lin, L. J. McHeyzer-Williams, J. Liao, M. G. McHeyzer-Williams, and K. Calame. 2003. Blimp-1 is required for the formation of immunoglobulin secreting plasma cells and pre-plasma memory B cells. *Immunity*. 19:607-620.
227. Rui, L., C. G. Vinuesa, J. Blasioli, and C. C. Goodnow. 2003. Resistance to CpG DNA-induced autoimmunity through tolerogenic B cell antigen receptor ERK signaling. *Nat.Immunol.* 4:594-600.
228. Moller, G., J. Andersson, and O. Sjoberg. 1972. Lipopolysaccharides can convert heterologous red cells into thymus-independent antigens. *Cell Immunol.* 4:416-424.
229. Kearney, J. F. and A. R. Lawton. 1975. B lymphocyte differentiation induced by lipopolysaccharide. I. Generation of cells synthesizing four major immunoglobulin classes. *J.Immunol.* 115:671-676.
230. Oliver, A. M., F. Martin, and J. F. Kearney. 1999. IgM^{high}CD21^{high} lymphocytes enriched in the splenic marginal zone generate effector cells more rapidly than the bulk of follicular B cells. *J.Immunol.* 162:7198-7207.
231. Miyake, K., Y. Yamashita, Y. Hitoshi, K. Takatsu, and M. Kimoto. 1994. Murine B cell proliferation and protection from apoptosis with an antibody against a 105-kD molecule: unresponsiveness of X-linked immunodeficient B cells. *J.Exp.Med.* 180:1217-1224.
232. Miyake, K., Y. Yamashita, M. Ogata, T. Sudo, and M. Kimoto. 1995. RP105, a novel B cell surface molecule implicated in B cell activation, is a member of the leucine-rich repeat protein family. *J.Immunol.* 154:3333-3340.
233. Miura, Y., K. Miyake, Y. Yamashita, R. Shimazu, N. G. Copeland, D. J. Gilbert, N. A. Jenkins, J. Inazawa, T. Abe, and M. Kimoto. 1996. Molecular cloning of a human RP105 homologue and chromosomal localization of the mouse and human RP105 genes (Ly64 and LY64). *Genomics* 38:299-304.
234. Chan, V. W., I. Mecklenbrauker, I. Su, G. Texido, M. Leitges, R. Carsetti, C. A. Lowell, K. Rajewsky, K. Miyake, and A.

- Tarakhovsky. 1998. The molecular mechanism of B cell activation by toll-like receptor protein RP-105. *J.Exp.Med.* 188:93-101.
235. Ogata, H., I. Su, K. Miyake, Y. Nagai, S. Akashi, I. Mecklenbrauker, K. Rajewsky, M. Kimoto, and A. Tarakhovsky. 2000. The toll-like receptor protein RP105 regulates lipopolysaccharide signaling in B cells. *J.Exp.Med.* 192:23-29.
236. Huleatt, J. W., A. R. Jacobs, J. Tang, P. Desai, E. B. Kopp, Y. Huang, L. Song, V. Nakaar, and T. J. Powell. 2007. Vaccination with recombinant fusion proteins incorporating Toll-like receptor ligands induces rapid cellular and humoral immunity. *Vaccine* 25:763-775.
237. O'Hagan, D. T. and N. M. Valiante. 2003. Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants. *Nat.Rev.Drug Discov.* 2:727-735.
238. Audibert, F. 2003. Adjuvants for vaccines, a quest. *Int.Immunopharmacol.* 3:1187-1193.
239. Fearon, D. T. and R. M. Locksley. 1996. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* 272:50-53.
240. Medzhitov, R. and C. A. Janeway, Jr. 1997. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 91:295-298.
241. Lycke, N. 2004. From toxin to adjuvant: the rational design of a vaccine adjuvant vector, CTA1-DD/ISCOM. *Cell Microbiol.* 6:23-32.
242. Sieling, P. A., W. Chung, B. T. Duong, P. J. Godowski, and R. L. Modlin. 2003. Toll-like receptor 2 ligands as adjuvants for human Th1 responses. *J.Immunol.* 170:194-200.
243. Takeuchi, O., A. Kaufmann, K. Grote, T. Kawai, K. Hoshino, M. Morr, P. F. Muhlradt, and S. Akira. 2000. Cutting edge: preferentially the R-stereoisomer of the mycoplasmal lipopeptide macrophage-activating lipopeptide-2 activates immune cells through a toll-like receptor 2- and MyD88-dependent signaling pathway. *J.Immunol.* 164:554-557.
244. Jackson, D. C., Y. F. Lau, T. Le, A. Suhrbier, G. Deliyannis, C. Cheers, C. Smith, W. Zeng, and L. E. Brown. 2004. A totally synthetic vaccine of generic structure that targets Toll-like receptor 2 on dendritic cells and promotes antibody or cytotoxic T cell responses. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 101:15440-15445.
245. Massari, P., P. Henneke, Y. Ho, E. Latz, D. T. Golenbock, and L. M. Wetzler. 2002. Cutting edge: Immune stimulation by neisserial

- porins is toll-like receptor 2 and MyD88 dependent. *J.Immunol.* 168:1533-1537.
246. Akazawa, T., H. Masuda, Y. Saeki, M. Matsumoto, K. Takeda, K. Tsujimura, K. Kuzushima, T. Takahashi, I. Azuma, S. Akira, K. Toyoshima, and T. Seya. 2004. Adjuvant-mediated tumor regression and tumor-specific cytotoxic response are impaired in MyD88-deficient mice. *Cancer Res.* 64:757-764.
247. Schulz, O., S. S. Diebold, M. Chen, T. I. Naslund, M. A. Nolte, L. Alexopoulou, Y. T. Azuma, R. A. Flavell, P. Liljestrom, and Reis e Sousa. 2005. Toll-like receptor 3 promotes cross-priming to virus-infected cells. *Nature* 433:887-892.
248. Baldrige, J. R., P. McGowan, J. T. Evans, C. Cluff, S. Mossman, D. Johnson, and D. Persing. 2004. Taking a Toll on human disease: Toll-like receptor 4 agonists as vaccine adjuvants and monotherapeutic agents. *Expert.Opin.Biol.Ther.* 4:1129-1138.
249. Biragyn, A., P. A. Ruffini, C. A. Leifer, E. Klyushnenkova, A. Shakhov, O. Chertov, A. K. Shirakawa, J. M. Farber, D. M. Segal, J. J. Oppenheim, and L. W. Kwak. 2002. Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by beta-defensin 2. *Science* 298:1025-1029.
250. Przetak, M., J. Chow, H. Cheng, J. Rose, L. D. Hawkins, and S. T. Ishizaka. 2003. Novel synthetic LPS receptor agonists boost systemic and mucosal antibody responses in mice. *Vaccine* 21:961-970.
251. McSorley, S. J., B. D. Ehst, Y. Yu, and A. T. Gewirtz. 2002. Bacterial flagellin is an effective adjuvant for CD4+ T cells in vivo. *J.Immunol.* 169:3914-3919.
252. Zuber, A. K., A. Brave, G. Engstrom, B. Zuber, K. Ljungberg, M. Fredriksson, R. Benthin, M. G. Isagulians, E. Sandstrom, J. Hinkula, and B. Wahren. 2004. Topical delivery of imiquimod to a mouse model as a novel adjuvant for human immunodeficiency virus (HIV) DNA. *Vaccine* 22:1791-1798.
253. Otero, M., S. A. Calarota, B. Felber, D. Laddy, G. Pavlakis, J. D. Boyer, and D. B. Weiner. 2004. Resiquimod is a modest adjuvant for HIV-1 gag-based genetic immunization in a mouse model. *Vaccine* 22:1782-1790.
254. Wille-Reece, U., C. Y. Wu, B. J. Flynn, R. M. Kedl, and R. A. Seder. 2005. Immunization with HIV-1 Gag protein conjugated to a TLR7/8 agonist results in the generation of HIV-1 Gag-specific Th1 and CD8+ T cell responses. *J.Immunol.* 174:7676-7683.

255. Klinman, D. M., D. Currie, I. Gursel, and D. Verthelyi. 2004. Use of CpG oligodeoxynucleotides as immune adjuvants. *Immunol.Rev.* 199:201-216.
256. van Duin, D., R. Medzhitov, and A. C. Shaw. 2006. Triggering TLR signaling in vaccination. *Trends Immunol.* 27:49-55.
257. Steere, A. C., V. K. Sikand, F. Meurice, D. L. Parenti, E. Fikrig, R. T. Schoen, J. Nowakowski, C. H. Schmid, S. Laukamp, C. Buscarino, and D. S. Krause. 1998. Vaccination against Lyme disease with recombinant *Borrelia burgdorferi* outer-surface lipoprotein A with adjuvant. Lyme Disease Vaccine Study Group. *N.Engl.J.Med.* 339:209-215.
258. Bulut, Y., E. Faure, L. Thomas, O. Equils, and M. Ardit. 2001. Cooperation of Toll-like receptor 2 and 6 for cellular activation by soluble tuberculosis factor and *Borrelia burgdorferi* outer surface protein A lipoprotein: role of Toll-interacting protein and IL-1 receptor signaling molecules in Toll-like receptor 2 signaling. *J.Immunol.* 167:987-994.
259. Alexopoulou, L., V. Thomas, M. Schnare, Y. Lobet, J. Anguita, R. T. Schoen, R. Medzhitov, E. Fikrig, and R. A. Flavell. 2002. Hyporesponsiveness to vaccination with *Borrelia burgdorferi* OspA in humans and in. *Nat.Med.* 8:878-884.
260. Tsuji, S., M. Matsumoto, O. Takeuchi, S. Akira, I. Azuma, A. Hayashi, K. Toyoshima, and T. Seya. 2000. Maturation of human dendritic cells by cell wall skeleton of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin: involvement of toll-like receptors. *Infect.Immun.* 68:6883-6890.
261. Means, T. K., S. Wang, E. Lien, A. Yoshimura, D. T. Golenbock, and M. J. Fenton. 1999. Human toll-like receptors mediate cellular activation by *Mycobacterium tuberculosis*. *J.Immunol.* 163:3920-3927.
262. Fremond, C. M., V. Yermeev, D. M. Nicolle, M. Jacobs, V. F. Quesniaux, and B. Ryffel. 2004. Fatal *Mycobacterium tuberculosis* infection despite adaptive immune response in the absence of MyD88. *J.Clin.Invest* 114:1790-1799.
263. Latz, E., J. Franko, D. T. Golenbock, and J. R. Schreiber. 2004. *Haemophilus influenzae* type b-outer membrane protein complex glycoconjugate vaccine induces cytokine production by engaging human toll-like receptor 2 (TLR2) and requires the presence of TLR2 for optimal immunogenicity. *J.Immunol.* 172:2431-2438.
264. Noad, R. and P. Roy. 2003. Virus-like particles as immunogens. *Trends Microbiol.* 11:438-444.

265. Schirmbeck, R., W. Bohm, and J. Reimann. 1996. Virus-like particles induce MHC class I-restricted T-cell responses. Lessons learned from the hepatitis B small surface antigen. *Intervirology* 39:111-119.
266. Paliard, X., Y. Liu, R. Wagner, H. Wolf, J. Baenziger, and C. M. Walker. 2000. Priming of strong, broad, and long-lived HIV type 1 p55gag-specific CD8+ cytotoxic T cells after administration of a virus-like particle vaccine in rhesus macaques. *AIDS Res.Hum.Retroviruses* 16:273-282.
267. Murata, K., M. Lechmann, M. Qiao, T. Gunji, H. J. Alter, and T. J. Liang. 2003. Immunization with hepatitis C virus-like particles protects mice from recombinant hepatitis C virus-vaccinia infection. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100:6753-6758.
268. McAleer, W. J., E. B. Buynak, R. Z. Maigetter, D. E. Wampler, W. J. Miller, and M. R. Hilleman. 1984. Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast. *Nature* 307:178-180.
269. Andre, F. E. and A. Safary. 1987. Summary of clinical findings on Engerix-B, a genetically engineered yeast derived hepatitis B vaccine. *Postgrad.Med.J.* 63 Suppl 2:169-177.
270. Zhou, J., X. Y. Sun, D. J. Stenzel, and I. H. Frazer. 1991. Expression of vaccinia recombinant HPV 16 L1 and L2 ORF proteins in epithelial cells is sufficient for assembly of HPV virion-like particles. *Virology* 185:251-257.
271. Koutsky, L. A., K. A. Ault, C. M. Wheeler, D. R. Brown, E. Barr, F. B. Alvarez, L. M. Chiacchierini, and K. U. Jansen. 2002. A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine. *N.Engl.J.Med.* 347:1645-1651.
272. Villa, L. L., R. L. Costa, C. A. Petta, R. P. Andrade, K. A. Ault, A. R. Giuliano, C. M. Wheeler, L. A. Koutsky, C. Malm, M. Lehtinen, F. E. Skjeldestad, S. E. Olsson, M. Steinwall, D. R. Brown, R. J. Kurman, B. M. Ronnett, M. H. Stoler, A. Ferenczy, D. M. Harper, G. M. Tamms, J. Yu, L. Lupinacci, R. Railkar, F. J. Taddeo, K. U. Jansen, M. T. Esser, H. L. Sings, A. J. Saah, and E. Barr. 2005. Prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine in young women: a randomised double-blind placebo-controlled multicentre phase II efficacy trial. *Lancet Oncol.* 6:271-278.
273. Li, T. C., Y. Yamakawa, K. Suzuki, M. Tatsumi, M. A. Razak, T. Uchida, N. Takeda, and T. Miyamura. 1997. Expression and self-assembly of empty virus-like particles of hepatitis E virus. *J.Virol.* 71:7207-7213.

274. Li, T. C., N. Takeda, T. Miyamura, Y. Matsuura, J. C. Wang, H. Engvall, L. Hammar, L. Xing, and R. H. Cheng. 2005. Essential elements of the capsid protein for self-assembly into empty virus-like particles of hepatitis E virus. *J.Virol.* 79:12999-13006.
275. Purcell, R. H., H. Nguyen, M. Shapiro, R. E. Engle, S. Govindarajan, W. C. Blackwelder, D. C. Wong, J. P. Prieels, and S. U. Emerson. 2003. Pre-clinical immunogenicity and efficacy trial of a recombinant hepatitis E vaccine. *Vaccine* 21:2607-2615.
276. Emerson, S. U. and R. H. Purcell. 2001. Recombinant vaccines for hepatitis E. *Trends Mol.Med.* 7:462-466.
277. Pushko, P., T. M. Tumpey, F. Bu, J. Knell, R. Robinson, and G. Smith. 2005. Influenza virus-like particles comprised of the HA, NA, and M1 proteins of H9N2 influenza virus induce protective immune responses in BALB/c mice. *Vaccine* 23:5751-5759.
278. Galarza, J. M., T. Latham, and A. Cupo. 2005. Virus-like particle (VLP) vaccine conferred complete protection against a lethal influenza virus challenge. *Viral Immunol.* 18:244-251.
279. Latham, T. and J. M. Galarza. 2001. Formation of wild-type and chimeric influenza virus-like particles following simultaneous expression of only four structural proteins. *J.Virol.* 75:6154-6165.
280. Baumert, T. F., S. Ito, D. T. Wong, and T. J. Liang. 1998. Hepatitis C virus structural proteins assemble into viruslike particles in insect cells. *J.Virol.* 72:3827-3836.
281. Jeong, S. H., M. Qiao, M. Nascimbeni, Z. Hu, B. Rehmann, K. Murthy, and T. J. Liang. 2004. Immunization with hepatitis C virus-like particles induces humoral and cellular immune responses in nonhuman primates. *J.Virol.* 78:6995-7003.
282. Lechmann, M., K. Murata, J. Satoi, J. Vergalla, T. F. Baumert, and T. J. Liang. 2001. Hepatitis C virus-like particles induce virus-specific humoral and cellular immune responses in mice. *Hepatology* 34:417-423.
283. Murata, K., M. Lechmann, M. Qiao, T. Gunji, H. J. Alter, and T. J. Liang. 2003. Immunization with hepatitis C virus-like particles protects mice from recombinant hepatitis C virus-vaccinia infection. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100:6753-6758.
284. Brautigam, S., E. Snezhkov, and D. H. Bishop. 1993. Formation of poliovirus-like particles by recombinant baculoviruses expressing the individual VP0, VP3, and VP1 proteins by comparison to particles derived from the expressed poliovirus polyprotein. *Virology* 192:512-524.

285. Sakuragi, S., T. Goto, K. Sano, and Y. Morikawa. 2002. HIV type 1 Gag virus-like particle budding from spheroplasts of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99:7956-7961.
286. Gheysen, D., E. Jacobs, F. de Foresta, C. Thiriart, M. Francotte, D. Thines, and M. De Wilde. 1989. Assembly and release of HIV-1 precursor Pr55gag virus-like particles from recombinant baculovirus-infected insect cells. *Cell* 59:103-112.
287. Shioda, T. and H. Shibuta. 1990. Production of human immunodeficiency virus (HIV)-like particles from cells infected with recombinant vaccinia viruses carrying the gag gene of HIV. *Virology* 175:139-148.
288. Deml, L., C. Speth, M. P. Dierich, H. Wolf, and R. Wagner. 2005. Recombinant HIV-1 Pr55gag virus-like particles: potent stimulators of innate and acquired immune responses. *Mol.Immunol.* 42:259-277.
289. Doan, L. X., M. Li, C. Chen, and Q. Yao. 2005. Virus-like particles as HIV-1 vaccines. *Rev.Med.Virol.* 15:75-88.
290. Vieira, H. L., C. Estevao, A. Roldao, C. C. Peixoto, M. F. Sousa, P. E. Cruz, M. J. Carrondo, and P. M. Alves. 2005. Triple layered rotavirus VLP production: kinetics of vector replication, mRNA stability and recombinant protein production. *J.Biotechnol.* 120:72-82.
291. Bertolotti-Ciarlet, A., M. Ciarlet, S. E. Crawford, M. E. Conner, and M. K. Estes. 2003. Immunogenicity and protective efficacy of rotavirus 2/6-virus-like particles produced by a dual baculovirus expression vector and administered intramuscularly, intranasally, or orally to mice. *Vaccine* 21:3885-3900.
292. Crawford, S. E., M. Labbe, J. Cohen, M. H. Burroughs, Y. J. Zhou, and M. K. Estes. 1994. Characterization of virus-like particles produced by the expression of rotavirus capsid proteins in insect cells. *J.Virol.* 68:5945-5952.
293. Pumpens, P. and E. Grens. 2001. HBV core particles as a carrier for B cell/T cell epitopes. *Intervirology* 44:98-114.
294. Stahl, S. J. and K. Murray. 1989. Immunogenicity of peptide fusions to hepatitis B virus core antigen. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 86:6283-6287.
295. Kratz, P. A., B. Bottcher, and M. Nassal. 1999. Native display of complete foreign protein domains on the surface of hepatitis B virus capsids. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96:1915-1920.

296. Birkett, A., K. Lyons, A. Schmidt, D. Boyd, G. A. Oliveira, A. Siddique, R. Nussenzweig, J. M. Calvo-Calle, and E. Nardin. 2002. A modified hepatitis B virus core particle containing multiple epitopes of the Plasmodium falciparum circumsporozoite protein provides a highly immunogenic malaria vaccine in preclinical analyses in rodent and primate hosts. *Infect.Immun.* 70:6860-6870.
297. Nardin, E. H., G. A. Oliveira, J. M. Calvo-Calle, K. Wetzel, C. Maier, A. J. Birkett, P. Sarpotdar, M. L. Corado, G. B. Thornton, and A. Schmidt. 2004. Phase I testing of a malaria vaccine composed of hepatitis B virus core particles expressing Plasmodium falciparum circumsporozoite epitopes. *Infect.Immun.* 72:6519-6527.
298. Chen, X., M. Li, X. Le, W. Ma, and B. Zhou. 2004. Recombinant hepatitis B core antigen carrying preS1 epitopes induce immune response against chronic HBV infection. *Vaccine* 22:439-446.
299. Netter, H. J., T. B. Macnaughton, W. P. Woo, R. Tindle, and E. J. Gowans. 2001. Antigenicity and immunogenicity of novel chimeric hepatitis B surface antigen particles with exposed hepatitis C virus epitopes. *J.Virol.* 75:2130-2141.
300. Sojikul, P., N. Buehner, and H. S. Mason. 2003. A plant signal peptide-hepatitis B surface antigen fusion protein with enhanced stability and immunogenicity expressed in plant cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100:2209-2214.
301. Bisht, H., D. A. Chugh, S. Swaminathan, and N. Khanna. 2001. Expression and purification of Dengue virus type 2 envelope protein as a fusion with hepatitis B surface antigen in Pichia pastoris. *Protein Expr.Purif.* 23:84-96.
302. Schlienger, K., M. Mancini, Y. Riviere, D. Dormont, P. Tiollais, and M. L. Michel. 1992. Human immunodeficiency virus type 1 major neutralizing determinant exposed on hepatitis B surface antigen particles is highly immunogenic in primates. *J.Virol.* 66:2570-2576.
303. Eckhart, L., W. Raffelsberger, B. Ferko, A. Klima, M. Purtscher, H. Katinger, and F. Ruker. 1996. Immunogenic presentation of a conserved gp41 epitope of human immunodeficiency virus type 1 on recombinant surface antigen of hepatitis B virus. *J.Gen.Virol.* 77 (Pt 9):2001-2008.
304. Frazer, I. H., M. Quinn, J. L. Nicklin, J. Tan, L. C. Perrin, P. Ng, V. M. O'Connor, O. White, N. Wendt, J. Martin, J. M. Crowley, S. J. Edwards, A. W. McKenzie, S. V. Mitchell, D. W. Maher, M. J. Pearse, and R. L. Bassler. 2004. Phase 1 study of HPV16-specific

immunotherapy with E6E7 fusion protein and ISCOMATRIX adjuvant in women with cervical intraepithelial neoplasia. *Vaccine* 23:172-181.

305. Dale, C. J., X. S. Liu, R. De Rose, D. F. Purcell, J. Anderson, Y. Xu, G. R. Leggatt, I. H. Frazer, and S. J. Kent. 2002. Chimeric human papilloma virus-simian/human immunodeficiency virus virus-like-particle vaccines: immunogenicity and protective efficacy in macaques. *Virology* 301:176-187.
306. Maurer, P., G. T. Jennings, J. Willers, F. Rohner, Y. Lindman, K. Roubicek, W. A. Renner, P. Muller, and M. F. Bachmann. 2005. A therapeutic vaccine for nicotine dependence: preclinical efficacy, and Phase I safety and immunogenicity. *Eur.J.Immunol.* 35:2031-2040.
307. Sugiyama, Y., H. Hamamoto, S. Takemoto, Y. Watanabe, and Y. Okada. 1995. Systemic production of foreign peptides on the particle surface of tobacco mosaic virus. *FEBS Lett.* 359:247-250.
308. Turpen, T. H., S. J. Reinl, Y. Charoenvit, S. L. Hoffman, V. Fallarme, and L. K. Grill. 1995. Malarial epitopes expressed on the surface of recombinant tobacco mosaic virus. *Biotechnology (N.Y.)* 13:53-57.
309. Fitchen, J., R. N. Beachy, and M. B. Hein. 1995. Plant virus expressing hybrid coat protein with added murine epitope elicits autoantibody response. *Vaccine* 13:1051-1057.
310. Marusic, C., P. Rizza, L. Lattanzi, C. Mancini, M. Spada, F. Belardelli, E. Benvenuto, and I. Capone. 2001. Chimeric plant virus particles as immunogens for inducing murine and human immune responses against human immunodeficiency virus type 1. *J.Virol.* 75:8434-8439.
311. Brennan, F. R., T. D. Jones, M. Longstaff, S. Chapman, T. Bellaby, H. Smith, F. Xu, W. D. Hamilton, and J. I. Flock. 1999. Immunogenicity of peptides derived from a fibronectin-binding protein of *S. aureus* expressed on two different plant viruses. *Vaccine* 17:1846-1857.
312. Fernandez-Fernandez, M. R., J. L. Martinez-Torrecuadrada, J. I. Casal, and J. A. Garcia. 1998. Development of an antigen presentation system based on plum pox potyvirus. *FEBS Lett.* 427:229-235.
313. Durrani, Z., T. L. McInerney, L. McLain, T. Jones, T. Bellaby, F. R. Brennan, and N. J. Dimmock. 1998. Intranasal immunization with a plant virus expressing a peptide from HIV-1 gp41 stimulates better mucosal and systemic HIV-1-specific IgA and IgG than oral immunization. *J.Immunol.Methods* 220:93-103.

314. Brennan, F. R., T. D. Jones, L. B. Gilleland, T. Bellaby, F. Xu, P. C. North, A. Thompson, J. Staczek, T. Lin, J. E. Johnson, W. D. Hamilton, and H. E. Gilleland, Jr. 1999. Pseudomonas aeruginosa outer-membrane protein F epitopes are highly immunogenic in mice when expressed on a plant virus. *Microbiology* 145 (Pt 1):211-220.
315. Usha, R., J. B. Rohll, V. E. Spall, M. Shanks, A. J. Maule, J. E. Johnson, and G. P. Lomonosoff. 1993. Expression of an animal virus antigenic site on the surface of a plant virus particle. *Virology* 197:366-374.
316. Langeveld, J. P., F. R. Brennan, J. L. Martinez-Torrecuadrada, T. D. Jones, R. S. Boshuizen, C. Vela, J. I. Casal, S. Kamstrup, K. Dalsgaard, R. H. Meloen, M. M. Bendig, and W. D. Hamilton. 2001. Inactivated recombinant plant virus protects dogs from a lethal challenge with canine parvovirus. *Vaccine* 19:3661-3670.
317. Joelson, T., L. Akerblom, P. Oxelfelt, B. Strandberg, K. Tomenius, and T. J. Morris. 1997. Presentation of a foreign peptide on the surface of tomato bushy stunt virus. *J.Gen.Virol.* 78 (Pt 6):1213-1217.
318. Turpen, T. H. 1999. Tobacco mosaic virus and the virescence of biotechnology. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* 354:665-673.
319. Yusibov, V., A. Modelska, K. Steplewski, M. Agadjanyan, D. Weiner, D. C. Hooper, and H. Koprowski. 1997. Antigens produced in plants by infection with chimeric plant viruses immunize against rabies virus and HIV-1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94:5784-5788.
320. Porta, C., V. E. Spall, J. Loveland, J. E. Johnson, P. J. Barker, and G. P. Lomonosoff. 1994. Development of cowpea mosaic virus as a high-yielding system for the presentation of foreign peptides. *Virology* 202:949-955.
321. Koprowski, H. and V. Yusibov. 2001. The green revolution: plants as heterologous expression vectors. *Vaccine* 19:2735-2741.
322. Savelyeva, N., R. Munday, M. B. Spellerberg, G. P. Lomonosoff, and F. K. Stevenson. 2001. Plant viral genes in DNA idiotypic vaccines activate linked CD4+ T-cell mediated immunity against B-cell malignancies. *Nat.Biotechnol.* 19:760-764.
323. Zhang, H., E. Todderud, and G. Stubbs. 1993. Crystallization and preliminary X-ray analysis of papaya mosaic virus coat protein. *J.Mol.Biol.* 234:885-887.

324. Sit, T. L., M. G. Abouhaidar, and S. Holy. 1989. Nucleotide sequence of papaya mosaic virus RNA. *J.Gen.Virol.* 70 (Pt 9):2325-2331.
325. Tremblay, M. H., N. Majeau, M. E. Gagne, K. Lecours, H. Morin, J. B. Duvignaud, M. Bolduc, N. Chouinard, C. Pare, S. Gagne, and D. Leclerc. 2006. Effect of mutations K97A and E128A on RNA binding and self assembly of papaya mosaic potexvirus coat protein. *FEBS J.* 273:14-25.
326. Blanch, E. W., L. Hecht, C. D. Syme, V. Volpetti, G. P. Lomonosoff, K. Nielsen, and L. D. Barron. 2002. Molecular structures of viruses from Raman optical activity. *J.Gen.Virol.* 83:2593-2600.
327. Denis, J., N. Majeau, E. Acosta-Ramirez, C. Savard, M. C. Bedard, S. Simard, K. Lecours, M. Bolduc, C. Pare, B. Willems, N. Shoukry, P. Tessier, P. Lacasse, A. Lamarre, R. Lapointe, M. C. Lopez, and D. Leclerc. 2007. Immunogenicity of papaya mosaic virus-like particles fused to a hepatitis C virus epitope: evidence for the critical function of multimerization. *Virology* 363:59-68.
328. Leclerc, D., D. Beauseigle, J. Denis, H. Morin, C. Pare, A. Lamarre, and R. Lapointe. 2007. Proteasome-independent major histocompatibility complex class I cross-presentation mediated by papaya mosaic virus-like particles leads to expansion of specific human T cells. *J.Virol.* 81:1319-1326.
329. Smith, M. L., J. A. Lindbo, S. Dillard-Telm, P. M. Brosio, A. B. Lasnik, A. A. McCormick, L. V. Nguyen, and K. E. Palmer. 2006. Modified tobacco mosaic virus particles as scaffolds for display of protein antigens for vaccine applications. *Virology* 348:475-488.
330. Levine MM. 1999. Typhoid fever vaccines. In *Vaccines*. Plotkin SA and Orenstein WA, eds. WB Saunders Co, Philadelphia, pp. 781-815.
331. Ivanoff B, Levine MM, and Lambert PH. Vaccination against typhoid fever: present status. *Bull World Health Organ* 72, 957-971. 1994.
Ref Type: Journal (Full)
332. Parry, C. M., T. T. Hien, G. Dougan, N. J. White, and J. J. Farrar. 2002. Typhoid fever. *N.Engl.J.Med.* 347:1770-1782.
333. Galdiero, M., M. Galdiero, E. Finamore, F. Rossano, M. Gambuzza, M. R. Catania, G. Teti, A. Midiri, and G. Mancuso. 2004. Haemophilus influenzae porin induces Toll-like receptor 2-mediated cytokine production in human monocytes and mouse macrophages. *Infect.Immun.* 72:1204-1209.

334. Ray, A. and T. Biswas. 2005. Porin of *Shigella dysenteriae* enhances Toll-like receptors 2 and 6 of mouse peritoneal B-2 cells and induces the expression of immunoglobulin M, immunoglobulin G2a and immunoglobulin A. *Immunology* 114:94-100.
335. Calderon, I., S. R. Lobos, H. A. Rojas, C. Palomino, L. H. Rodriguez, and G. C. Mora. 1986. Antibodies to porin antigens of *Salmonella typhi* induced during typhoid infection in humans. *Infect.Immun.* 52:209-212.
336. Ortiz, V., A. Isibasi, E. Garcia-Ortigoza, and J. Kumate. 1989. Immunoblot detection of class-specific humoral immune response to outer membrane proteins isolated from *Salmonella typhi* in humans with typhoid fever. *J.Clin.Microbiol.* 27:1640-1645.
337. Salazar-Gonzalez, R. M., C. Maldonado-Bernal, N. E. Ramirez-Cruz, N. Rios-Sarabia, J. Beltran-Nava, J. Castanon-Gonzalez, N. Castillo-Torres, J. A. Palma-Aguirre, M. Carrera-Camargo, C. Lopez-Macias, and A. Isibasi. 2004. Induction of cellular immune response and anti-*Salmonella enterica* serovar typhi bactericidal antibodies in healthy volunteers by immunization with a vaccine candidate against typhoid fever. *Immunol.Lett.* 93:115-122.
338. Isibasi, A., V. Ortiz, M. Vargas, J. Paniagua, C. Gonzalez, J. Moreno, and J. Kumate. 1988. Protection against *Salmonella typhi* infection in mice after immunization with outer membrane proteins isolated from *Salmonella typhi* 9,12,d, Vi. *Infect.Immun.* 56:2953-2959.
339. Isibasi, A., V. Ortiz-Navarrete, J. Paniagua, R. Pelayo, C. R. Gonzalez, J. A. Garcia, and J. Kumate. 1992. Active protection of mice against *Salmonella typhi* by immunization with strain-specific porins. *Vaccine* 10:811-813.
340. Alpuche-Aranda, C. M., E. L. Racoosin, J. A. Swanson, and S. I. Miller. 1994. *Salmonella* stimulate macrophage macropinocytosis and persist within spacious phagosomes. *J.Exp.Med.* 179:601-608.
341. Tremblay, M. H., N. Majeau, M. E. Gagne, K. Lecours, H. Morin, J. B. Duvignaud, M. Bolduc, N. Chouinard, C. Pare, S. Gagne, and D. Leclerc. 2006. Effect of mutations K97A and E128A on RNA binding and self assembly of papaya mosaic potexvirus coat protein. *FEBS J.* 273:14-25.
342. Kaisho, T. and S. Akira. 2002. Toll-like receptors as adjuvant receptors. *Biochim.Biophys.Acta* 1589:1-13.
343. Denis, J., N. Majeau, E. Acosta-Ramirez, C. Savard, M. C. Bedard, S. Simard, K. Lecours, M. Bolduc, C. Pare, B. Willems, N.

- Shoukry, P. Tessier, P. Lacasse, A. Lamarre, R. Lapointe, M. C. Lopez, and D. Leclerc. 2007. Immunogenicity of papaya mosaic virus-like particles fused to a hepatitis C virus epitope: Evidence for the critical function of multimerization. *Virology*.
344. Dintzis, R. Z., M. Okajima, M. H. Middleton, G. Greene, and H. M. Dintzis. 1989. The immunogenicity of soluble haptenated polymers is determined by molecular mass and hapten valence. *J.Immunol.* 143:1239-1244.
345. SELA, M. 1987. A peripatetic and personal view of molecular immunology for one third of the century. *Annu.Rev.Immunol.* 5:1-19.
346. Sheriff, S., C. Y. Chang, and R. A. Ezekowitz. 1994. Human mannose-binding protein carbohydrate recognition domain trimerizes through a triple alpha-helical coiled-coil. *Nat.Struct.Biol.* 1:789-794.
347. Wykes, M., A. Pombo, C. Jenkins, and G. G. MacPherson. 1998. Dendritic cells interact directly with naive B lymphocytes to transfer antigen and initiate class switching in a primary T-dependent response. *J.Immunol.* 161:1313-1319.

Translating innate response into long-lasting antibody response by the intrinsic antigen-adjuvant properties of papaya mosaic virus

Elizabeth Acosta-Ramírez,^{1,†} Rebeca Pérez-Flores,^{1,†} Nathalie Majeau,² Rodolfo Pastelin-Palacios,³ Cristina Gil-Cruz,^{1,‡} Maricela Ramírez-Saldaña,^{1,‡} Nataly Manjarrez-Orduño,⁴ Luisa Cervantes-Barragán,^{1,†} Leopoldo Santos-Argumedo,⁴ Leopoldo Flores-Romo,⁵ Ingeborg Becker,⁶ Armando Isibasi,¹ Denis Leclerc² and Constantino López-Macías¹

¹Medical Research Unit on Immunochemistry, Specialties Hospital, National Medical Centre 'Siglo XXI', Mexican Institute for Social Security (IMSS), Mexico City, ²Infectology Research Centre, Laval University, Quebec, Canada,

³Faculty of Chemistry, National Autonomous University of Mexico (UNAM), Mexico City,

⁴Molecular Biomedicine Department, Center for Advance Studies and Research (CINVESTAV) of the National Polytechnic Institute (IPN), Mexico City, ⁵Department of Cell Biology, CINVESTAV-IPN, Mexico City, and

⁶Department of Experimental Medicine, Faculty of Medicine, UNAM, Mexico City

Summary

Identifying the properties of a molecule involved in the efficient activation of the innate and adaptive immune responses that lead to long-lasting immunity is crucial for vaccine and adjuvant development. Here we show that the papaya mosaic virus (PapMV) is recognized by the immune system as a pathogen-associated molecular pattern (PAMP) and as an antigen in mice (Pamptigen). A single immunization of PapMV without added adjuvant efficiently induced both cellular and specific long-lasting antibody responses. PapMV also efficiently activated innate immune responses, as shown by the induction of lipid raft aggregation, secretion of pro-inflammatory cytokines, up-regulation of co-stimulatory molecules on dendritic cells and macrophages, and long-lasting adjuvant effects upon the specific antibody responses to model antigens. PapMV mixed with *Salmonella enterica* serovar Typhi (*S. typhi*) outer membrane protein C increased its protective capacity against challenge with *S. typhi*, revealing the intrinsic adjuvant properties of PapMV in the induction of immunity. Antigen-presenting cells loaded with PapMV efficiently induced antibody responses *in vivo*, which may link the innate and adaptive responses observed. PapMV recognition as a Pamptigen might be translated into long-lasting antibody responses and protection observed. These properties could be used in the development of new vaccine platforms.

Keywords: adjuvants; antigens; memory; papaya mosaic virus; vaccination

doi:10.1111/j.1365-2567.2007.02753.x

Received 6 June 2007; revised 11 October 2007; accepted 12 October 2007.

[†]PhD program on Biomedical Sciences, UNAM, Mexico City.

[‡]PhD program on Immunology, National School of Biological Sciences (ENCB) IPN, Mexico City.

Correspondence: Dr C. López-Macías, UIM en Inmunoquímica, Coordinación de Investigación en Salud, PO Box A047, C.P. 06703, México D.F.

Email: constantino@sminmunologia.org;

constantino.lopez@imss.gob.mx

Senior author: Constantino López-Macías

Abbreviations: APC, antigen-presenting cell; BCR, B-cell receptor; BMDC, bone marrow-derived dendritic cells; BMDM, bone marrow-derived macrophages; CFA, complete Freund's adjuvant; CFSE, 5(6)-carboxyfluorescein diacetate N-succinimidyl ester; CP, coat protein; CTB, cholera toxin B subunit; DC, dendritic cell; DMEM, Dubecco's modified Eagle's minimal essential medium; DTH, delayed-type hypersensitivity; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; FBS, fetal bovine serum; FCS, fetal calf serum; FITC, fluorescein isothiocyanate; HEL, hen egg-white lysozyme; i.p., intraperitoneal; IFA, incomplete Freund's adjuvant; IL, interleukin; LD₅₀, 50% lethal dose; LPS, lipopolysaccharide; MHC class II, major histocompatibility complex class II; OmpC, outer membrane protein C; OVA, ovalbumin; PAMP, pathogen-associated molecular pattern; Pamptigen, pathogen-associated molecular pattern and antigen; PapMV, papaya mosaic virus; PBS, phosphate-buffered saline; PE, phycoerythrin; PerCP, peridinin chlorophyll protein; PRR, pattern recognition receptor; s.c., subcutaneous; SD, standard deviation; TCR, T-cell receptor; TLR, Toll-like receptor; TNF- α , tumour necrosis factor- α .

Introduction

The onset of the immune response against a given pathogen depends on the recognition of microbial components by non-clonal (innate) and clonal (adaptive) receptors expressed on the appropriate cells. Innate receptors known as pattern-recognition receptors (PRR) allow the recognition of microbial products known as pathogen-associated molecular patterns (PAMP).¹ In contrast, the adaptive immune response is characterized by clonally expressed B-cell receptor (BCR) or T-cell receptor (TCR) recognition of molecules, which define the antigenicity of these molecules.² The outcome of the immune response activated through these receptors is that protection or immunity (which may last for many years or a lifetime) is generated against the infecting pathogen^{3,4} and this phenomenon is the basis of vaccination. However, the immunological mechanisms mediating the induction of long-term immunity remain obscure.

High, long-lasting protective antibody titres are induced mainly after pathogenic infection, or by vaccination with an attenuated pathogen or with purified antigens mixed with adjuvants.^{5,6} Two key factors achieve this response. First, antigen immunogenicity depends on the antigen molecular nature and structure.² Thus, viruses that infect mammals exhibit a quasicrystalline, highly organized surface with a regular array of epitopes that efficiently cross-link epitope-specific membrane immunoglobulins on B cells, inducing a T-cell-independent antibody response.⁷ Second, the presence of adjuvants increases the magnitude and duration of the immune response by activating the innate immune system.⁸ The adjuvant effect of most molecules depends on activation of the innate immune response through PRR.⁹ This opens the possibility that pattern recognition through the innate immune system could be responsible for shaping the long-lasting protective response induced by pathogens or vaccines.

Plant viruses are effective tools for antigen expression.¹⁰ Unlike conventional live attenuated or recombinant vaccines, plant viruses are considered non-pathogenic for mammals¹⁰ and fulfil the immunogenic properties described for mammal-infecting viruses. Thus, they represent an excellent non-infectious model for using to study immunogenicity and adjuvanticity. Our experimental model is the papaya mosaic virus (PapMV), a potexvirus that infects *Carica papaya* (papaya) leaves.^{11,12} The PapMV virion is a flexible rod, 500 nm long and 15 nm in diameter, composed of 1400 subunits of the viral coat protein (CP) assembled around the genomic positive single-stranded RNA.¹³ In this study, we show that a single immunization with PapMV in the absence of added adjuvant efficiently induced both cellular and specific long-lasting antibody responses. In addition, PapMV efficiently activated innate immune responses and, when

used as an adjuvant for model antigens or for an experimental vaccine, promoted a long-lasting specific antibody response and increased the protective capacity of the experimental vaccine. We propose that this strong immunogenicity shown by PapMV is the consequence of its recognition both as a PAMP and as an antigen [pathogen-associated molecular pattern and antigen (Pamptigen)] by the immune system, thus translating the innate immune recognition into long-lasting antibody responses and protection. These properties could be used in the development of new vaccine platforms to support the induction of long-lasting immunity.

Materials and methods

Bacterial strains

The wild-type *S. typhi* strain was obtained from the American Type Culture Collection 9993 (ATCC, Manassas, VA). Isogenic *Salmonella* mutant strain STYF302 ($\Delta ompF$, Kanamycin resistance (KmR)), expressing *OmpC*, has been described previously.^{14,15}

Antigens

PapMV was purified as described previously.¹⁶ Lipopolysaccharide (LPS)-free ovalbumin (OVA) grade VI was from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Hen egg-white lysozyme (HEL) was from Research Organics Inc. (Cleveland, OH, USA). LPS was from *Escherichia coli* O111:B4 (Sigma-Aldrich). Outer membrane protein C (*OmpC*) was purified from *S. typhi* STYC302 ($\Delta ompF$, KmR), as described previously.¹⁵

Mice

BALB/c (Harlan, Mexico City, Mexico) and C3H/HeJ¹⁷ mice, 6–8 weeks of age, were housed in the animal facilities of the Experimental Medicine Department, Faculty of Medicine, UNAM, and were cared for in conformity with good laboratory practice guidelines. These studies were reviewed and approved by the IMSS National Scientific Research Committee (project no. 2005-785-016).

Immunizations

Groups of mice were immunized intraperitoneally (i.p.) on day 0 with 30 μ g of PapMV diluted in sterile isotonic saline solution (saline) to a total volume of 0.5 ml. To study the effects of adjuvant, groups of mice were immunized i.p. on day 0 with 2 mg of OVA or HEL alone, or with 30 μ g of PapMV and 2 mg of OVA or HEL in complete Freund's adjuvant (CFA) 1:1 (v/v) or with 5 μ g of LPS from *E. coli* O111:B4 (Sigma-Aldrich). To study the adjuvant effect of PapMV in the anti-*OmpC* response,

mice were immunized i.p. on day 0 with 10 µg of OmpC alone or with 30 µg of PapMV and 10 µg of OmpC in incomplete Freund's adjuvant (IFA) 1:1 (v/v). On day 15, mice received 10 µg of OmpC i.p. without adjuvant. Control mice were injected with saline or with 30 µg of PapMV only. Blood samples were collected at various time-points, as indicated in each figure. Individual serum samples were stored at -20° until analysis. The number of mice used in the experiment is indicated in the figure legends.

Determination of antibody titres by enzyme-linked immunosorbent assay

High-binding 96-well polystyrene plates (Corning, New York, NY, USA) were coated with 1 µg/ml of PapMV, 10 µg/ml of OmpC, 100 µg/ml of HEL or 150 µg/ml of OVA in 0.1 M carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.5). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was performed as described previously.¹⁵ Antibody titres are given as $-\log_2$ dilution \times 40 or as the inverse of serum dilution. A positive titre was defined as three standard deviations (3 SD) above the mean value of the negative control.

Delayed-type hypersensitivity test

BALB/c mice were immunized subcutaneously (s.c.) in the footpad with 30 µg of wild-type PapMV, 30 µg of ultraviolet light-inactivated PapMV, buffer (Tris-HCl, pH 6.8) or sterile pyrogen-free saline solution. Seven days after immunization, mice were challenged by s.c. injection of 3 µg of PapMV into the right ear. Ear thickness was measured before the challenge and 24 hr after injection using a digital micrometer (Mituyoto, Tokyo, Japan).

Generation of bone marrow-derived macrophages

Bone marrow-derived macrophages (BMDM) were obtained from the femurs of BALB/c mice (6–8 weeks of age) and cultured in Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium (DMEM) with bone marrow medium [30% L cell-conditioned medium, 20% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) and 50% DMEM], as described previously.¹⁸

Generation of bone marrow-derived dendritic cells

Bone marrow-derived dendritic cells (BMDC) were generated by 6 days of culture of BALB/c bone marrow cells with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-containing supernatant from the cell line X63-GM-CSF (kindly provided by Dr Antonius Rolink, University of Basel, Basel, Switzerland). Dendritic cells (DC) were further purified using Optiprep density-gradi-

ent centrifugation (Sigma-Aldrich Co., Basel, Switzerland). CD11c⁺ B220⁻ cells were more than 95% pure when analysed by flow cytometry.

Peritoneal macrophage purification

Thioglycolate-elicited macrophages were collected from the peritoneal cavity of BALB/c mice, cultured at 1×10^6 cells per well in DMEM (containing 10% FCS, L-glutamine 2 mM, penicillin 100 U/ml, streptomycin 100 µg/ml) overnight at 37°. Non-adherent cells were removed by washing with cold phosphate-buffered saline (PBS).

Lipid raft aggregation

Ten-thousand BMDM were cultured on sterile circular slides and stimulated for 30 min with 1 µg/ml of PapMV in 100 µl of DMEM. After the stimulus was removed, the slides were washed twice with PBS containing 2% FBS and once with PBS alone. The cells were fixed using 3% p-formaldehyde and incubated at 4° for 20 min. Cells were washed as described above. Cholera toxin B subunit (CTB) coupled to fluorescein isothiocyanate (FITC) (CTB-FITC, 1:500; Sigma-Aldrich) was added and the slides were incubated in the dark at room temperature. Non-specific binding sites were blocked with goat serum (1:100 dilution) for 1 hr at room temperature. After incubation, the slides were washed three times with PBS and then rat anti-PapMV (1:100 dilution) was added. The slides were incubated overnight at 4°. As an isotype control, mouse anti-PapMV (1:100) was used. The slides were washed three times with PBS and incubated for 1 hr at room temperature with tetramethylrhodamine isothiocyanate-tagged anti-rat IgG (1:200). The slides were washed three times with PBS, mounted and assessed using a confocal microscope (Zeiss Axiovert 100 M microscope with LSM510 expert mode software; Carl Zeiss, Aalen, Germany).

BMDM, peritoneal macrophage and BMDC stimulation, and determination of cytokine production

One-million BMDM, peritoneal macrophages or BMDC were stimulated with 1 µg/ml of PapMV or with 100 ng/ml of LPS from *E. coli* O111:B4 (Sigma-Aldrich). Unstimulated cells were used as a control. At the time-points indicated in the graphs, the culture supernatant was harvested and stored at -70° until analysis. Tumour necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin (IL)-6 were quantified by ELISA (all OptEIA sets; BD Pharmingen, San Diego, CA, USA), following the manufacturer's instructions. The concentration of final reaction product was determined at 450 nm in an ELISA plate reader (Dyner Technologies MRLI, Chantilly, VA) with BIOLINX 2.22 software (Dyner

Technologies). The detection limit was 15.6 pg/ml for both cytokines. Mouse interferon- α (IFN- α) concentration in cell culture supernatants was measured using ELISA (PBL Biomedical Laboratories, NJ, USA) according to the manufacturer's instructions.

In vivo DC, macrophage and B-lymphocyte activation assay

BALB/c mice (7 weeks of age) were immunized *i.p.* with 30 μ g of PapMV and 50 μ g of Poly I:C suspended respectively in 500 μ l of saline. Saline (500 μ l) was used as a control, and 24 hr after immunization lymph nodes and spleens were obtained. Cell suspensions were prepared from these organs, and flow cytometry staining was performed using phycoerythrin (PE)-CD11c, allophycocyanin-CD11b, B220-peridinin chlorophyll protein (PerCP), FITC-CD80, FITC-CD86, FITC-CD40, FITC-CD69 and FITC-major histocompatibility complex class II (MHC class II) antibodies (all purchased from BD Pharmingen).

Transference of BMDM

BMDM were pulsed with 30 μ g/ml of PapMV in 5 ml of DMEM containing 10% FBS and incubated for 3 hr at 37°. The supernatant was removed, the cells were washed four times with PBS, and, before harvesting, the last cell wash was collected. Totals of 10⁴, 10⁵ and 10⁶ harvested cells were immediately transferred *i.v.* into BALB/c mice in a final volume of 300 μ l. Culture supernatant, the last cell wash supernatant, 10⁵ unstimulated BMDM and 30 μ g of PapMV were suspended in a final volume of 300 μ l and transferred *i.v.* into the control mice. The numbers of mice used are indicated in the figure legends.

Protection assay

BALB/c mice were immunized *i.p.* on day 0 with 10 μ g of OmpC or 10 μ g of OmpC that had been incubated previously for 1 hr with 30 μ g of PapMV at 4°. A boost on day 15 was performed using 10 μ g of OmpC only. Control mice were injected with saline or 30 μ g PapMV alone. The challenge was performed on day 21 with 100 and 500 lethal dose 50% (LD₅₀) of 5% mucin-suspended *S. typhi*, and the survival rate was registered for 10 days after the challenge, as described previously.¹⁹ The numbers of mice used are indicated in the figure legends.

B-cell activation and proliferation

One-million splenic B cells per well were incubated with PapMV (1 μ g/ml) and harvested after 18 hr to assess the activation markers, and were harvested again after 80 hr to assess cell differentiation into plasma

cells. LPS (10 μ g/ml) from *E. coli* O111:B4 (Sigma-Aldrich) was used as a positive control. Flow cytometry staining was performed with CD44-FITC, MHC class II-PE, CD86-FITC, CD22-PE, CD138-PE and B220-allophycocyanin antibodies (BD Pharmingen). One-million cells were incubated for 15 min with a mixture of fluorescein-, PE- and allophycocyanin-conjugated antibodies. Cell proliferation was tested using fifty-million splenic cells suspended in 1 ml of PBS containing 1 μ l of a 1 mM solution of 5(6)-carboxyfluorescein diacetate N-succinimidyl ester (CFSE) (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Cells were stimulated as described above. Data were acquired using a FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) and analysed using CELLQUEST software (Becton Dickinson).

Results

PapMV induces a long-lasting antibody immune response

B-cell activation is facilitated by antigenic organization and molecular repetitiveness (more than 20 subunits), as shown in a paracrystalline array.²⁰ PapMV virions contain about 1400 copies of a single CP arranged in a helical form.²¹ We immunized BALB/c mice *i.p.* with 30 μ g of PapMV and measured PapMV-specific antibody titres for 1 year. During the primary antibody response on day 8, we observed a 1024-fold increase in IgM titre and a 256-fold increase in IgG titre (Fig. 1a). In the absence of boosting, the IgM response decreased to the basal level on day 20 and remained there until day 365. In contrast, the IgG titre reached its maximum, a 1024-fold increase, around day 21 and remained at this level until the end of the experiment 1 year later. PapMV induced production of the four subclasses of IgG. The antibody titres of the IgG subclasses were observed first between days 4 and 12 and all reached their maximum values around day 20, where they remained until day 365 (Fig. 1a). Similar results were obtained when 50 μ g of PapMV was used for immunization (data not shown). In addition, *i.v.* and *s.c.* immunization with PapMV induced similar antibody kinetics (data not shown). This antibody response was observed for 1 year after a single immunization without adjuvants.

PapMV did not induce naïve B-lymphocyte proliferation *in vitro* (Fig. 2b); however, it induced minor up-regulation of activation markers such as CD44, CD86, CD22 and MHC class II (Fig. 2a). Additionally, PapMV induced *in vivo* up-regulation of CD69 and CD40 on B cells (Fig. 3). PapMV did not induce B-cell differentiation into plasma cells *in vitro* (Fig. 2c). The experiments were repeated by adding IL-4 to the PapMV stimulus or by using 30 or 50 μ g/ml of PapMV (data not shown), confirming that PapMV did not activate B cells from

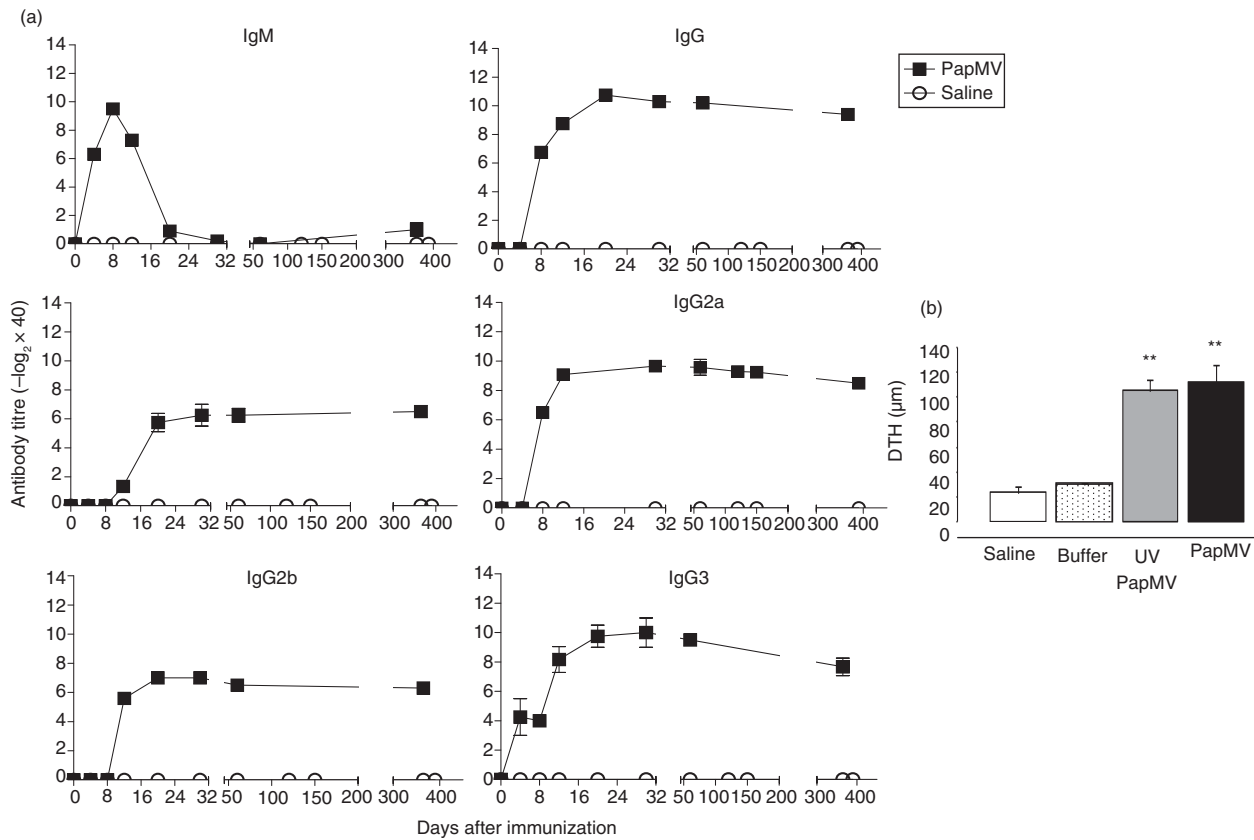


Figure 1. Papaya mosaic virus (PapMV) induces T-cell and long-lasting antibody immune responses. (a) Titres of anti-PapMV IgM and IgG, and of IgG subclasses IgG1, IgG2a, IgG2b and IgG3, were measured in female BALB/c mice immunized intraperitoneally (i.p.) with 30 μg of PapMV or with saline. Blood samples were collected at the time-points depicted. Results are expressed as the mean \pm standard deviation (SD) of five mice per group. Data correspond to one representative result from five independent experiments. (b) T-cell responses were assessed by the delayed-type hypersensitivity (DTH) test. Groups of five female BALB/c mice were immunized subcutaneously (s.c.) in the footpad with 30 μg of wild-type PapMV or with 30 μg of ultraviolet light (UV) light-inactivated PapMV. Buffer (Tris-HCl, pH 6.8) alone or saline was used as a control. On day 7, the mice were challenged with 3 μg of PapMV administered s.c. in the ear. Ear thickness was measured using a micrometer before and 24 hr after injection. Means were analysed by the Student's *t*-test. Significant differences are indicated by asterisks: ***P* < 0.001. One representative result from two independent experiments is shown.

naïve mice and did not prepare B cells for activation by IL-4. We conclude that PapMV is not a thymus-independent type 1 antigen. However, it induces some up-regulation of activation marker expression levels in B cells.

To determine whether the antibody response observed was influenced by the presence of undetected traces of LPS or polysaccharides,^{22,23} which could have contaminated the PapMV preparation during purification, C3H/HeJ mice [an LPS hyporesponsive Toll-like receptor 4 (TLR-4) mutant strain] were immunized with 30 μg of PapMV. IgM and IgG titre kinetics were similar to those observed in BALB/c mice (data not shown). Thus, undetected contamination with TLR-4 ligands that could be present in the PapMV did not contribute to the antibody response observed. These results show that the PapMV is a strong immunogenic particle able to induce a sustained

and specific long-lasting antibody response comprising all IgG subclasses.

PapMV-induced T-cell responses

The presence of all IgG subclasses revealed that T cells must help in the response induced by PapMV. A delayed-type hypersensitivity (DTH) test was performed to test the capacity of PapMV to induce systemic T-cell responses. Groups of five BALB/c mice were immunized s.c. with 30 μg of intact or UV-inactivated PapMV. UV-inactivated PapMV was used to control the influence of virus viability in the response observed, even though the plant virus replication machinery is not compatible with mammalian systems and plant viruses are non-pathogenic in mammals.¹⁰ PapMV and UV-inactivated PapMV induced a strong DTH response compared with

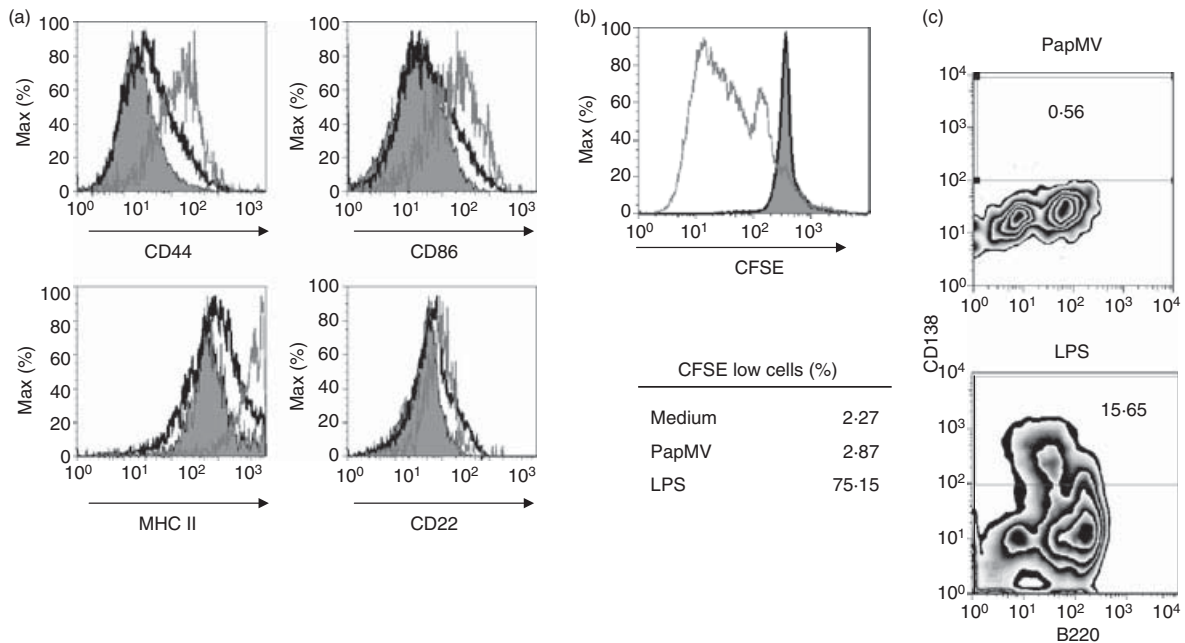


Figure 2. Papaya mosaic virus (PapMV) did not induce *in vitro* naïve B-lymphocyte proliferation; however, it induced a small shift in the expression of activation markers on these cells. Flow cytometric analysis of B cells was performed after stimulation with PapMV. (a) Induction of B-cell activation markers. (b) B-cell proliferation. Naïve B cells were pulsed after 18 hr with 100 µg/ml of lipopolysaccharide (LPS) (grey solid line) or with 1 µg/ml of PapMV (black solid line); non-pulsed cells are shown by shading. (c) To assess B-cell differentiation into plasma cells induced by PapMV, cells were stimulated with the virus for 80 hr and stained for B220 and CD138. One representative result from three experiments is shown. CFSE, 5(6)-carboxyfluorescein diacetate N-succinimidyl ester.

the control (Fig. 1b). Thus, PapMV induced a strong T-cell response in addition to the sustained long-lasting antibody response. Taken together, these results show that PapMV is a highly immunogenic antigen for both the humoral and cellular immune responses.

PapMV induces the aggregation of lipid rafts on BMDM

During the molecular recognition process on antigen-presenting cells (APC), a cluster of surface molecules present in lipid raft aggregates, allowing the induction of a signalling cascade to induce cell activation.²⁴ To determine whether PapMV induces lipid raft aggregation, murine BMDM were stimulated with 1 µg/ml of PapMV for 30 min. The cells were then stained with cholera toxin subunit B coupled with FITC to target the lipid raft-resident glycolipid, GM1. PapMV stimulated the BMDM, which showed an increased aggregation of lipid rafts. Moreover, on these cells, PapMV co-localized with these aggregated lipid rafts (Fig. 4a panel ii). By contrast, lipid raft aggregation was not observed in unstimulated cells (Fig. 4a panel i). Aggregation was manifested as the accumulation of lipid rafts in localized regions of the stimulated cells, whereas FITC staining in unstimulated cells was homogenous around the cell periphery. These results suggest that PapMV is recognized at the surface of BMDM.

PapMV induces pro-inflammatory cytokine secretion in APC

To determine whether the lipid raft aggregation induced by PapMV is associated with cell activation, we measured cytokine secretion after PapMV stimulation. BMDM were stimulated with 0.01, 0.1 (data not shown) or 1 µg/ml of PapMV, and the secretion of TNF-α and IL-6 was measured in the culture supernatants. As a control, 100 ng/ml of *E. coli* UHO111 LPS was used. Only stimulation with 1 µg/ml of PapMV induced IL-6 secretion in BMDM 12 hr after the initial stimulation. The maximum amount of IL-6 was detected at 50 hr, after which time IL-6 concentrations in the culture supernatants decreased (Fig. 4c). TNF-α secretion was detected in culture supernatants 4 hr after stimulation with 1 µg/ml of PapMV, and an increased amount of TNF-α was present in cell supernatants during the 24 hr of the experiment (Fig. 4c). Thus, in addition to lipid raft aggregation, PapMV induces the secretion of pro-inflammatory cytokines in BMDM. As DC are an important link between innate and adaptive immune responses, we evaluated the production of IL-6 and TNF-α by BMDC pulsed with PapMV. Both cytokines were observed in BMDC culture supernatants 18 and 24 hr after PapMV stimulation (Fig. 4d). Because type I IFN is suggested to contribute to the generation of a virus-specific adaptive immune response, we measured

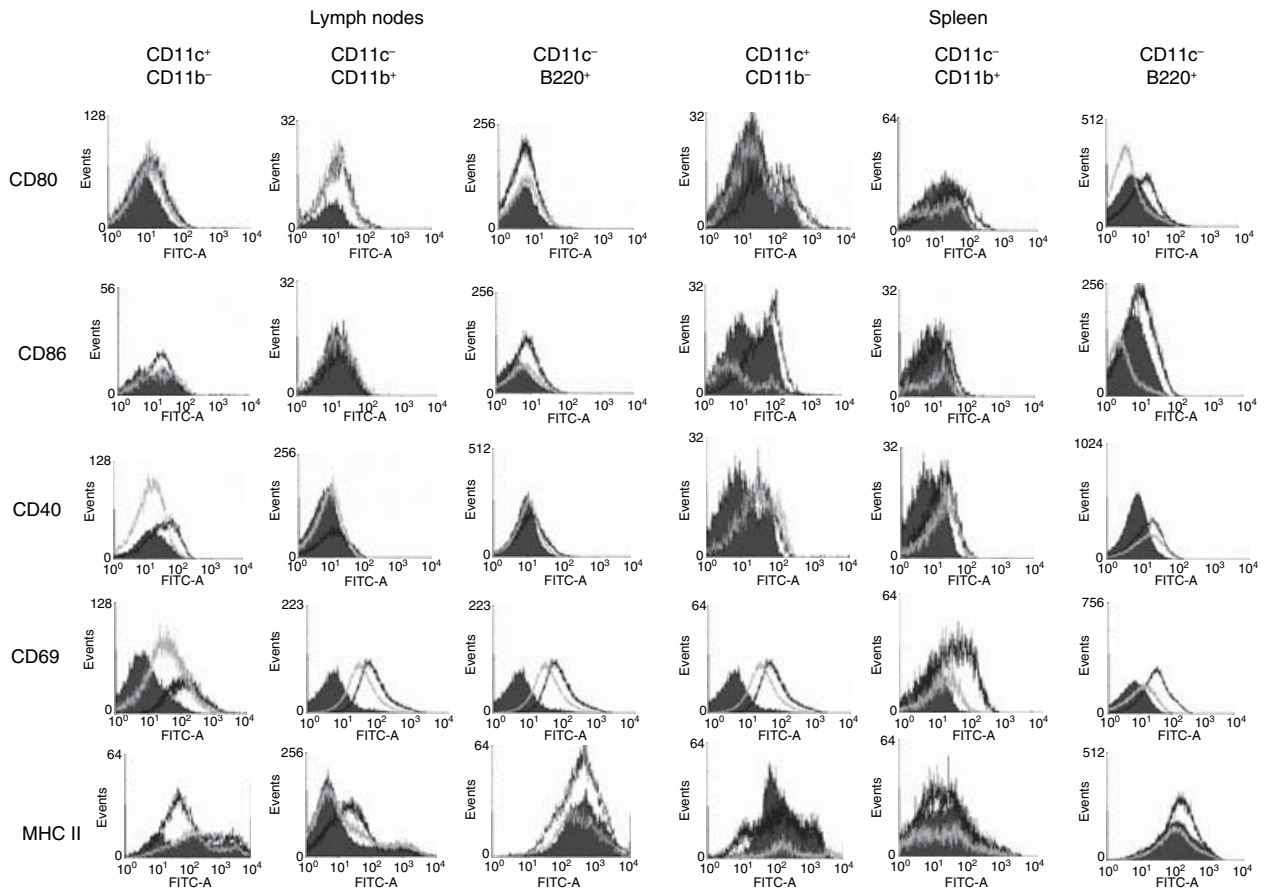


Figure 3. Papaya mosaic virus (PapMV) induces co-stimulatory molecule up-regulation in dendritic cells (DC), macrophages and B cells *in vivo*. BALB/c mice were immunized intraperitoneally (i.p.) with 30 µg of saline-diluted PapMV (grey line) or with 50 µg of Poly I:C (black line), and control mice were injected with saline (filled histogram). Twenty-four hours after immunization, lymph nodes and spleen cells were collected and stained. Flow cytometry was performed to analyse cell populations defined as: CD11c⁺ CD11b⁻ (DCs), CD11c⁻ CD11b⁺ (macrophages) and CD11c⁻ B220⁺ (B cells). A representative result of two experiments is shown. FITC, fluorescein isothiocyanate; MHC II, major histocompatibility complex class II.

IFN- α production by macrophages and DC after PapMV stimulation. Peritoneal macrophages and BMDC were pulsed with PapMV, and, after 24 hr of stimulation, IFN- α was measured in the cell supernatants. Peritoneal macrophages did not produce IFN- α after PapMV stimulation (Fig. 4c), whereas PapMV-stimulated BMDC produced this cytokine more efficiently than did BMDC stimulated with LPS (Fig. 4d).

BMDM bearing PapMV participate in the induction of the specific antibody response

APC can directly deliver antigen to B cells for the induction of the antibody response.^{25,26} To address the contribution of APC in the induction of the antibody responses against PapMV, BMDM were cultured with 30 µg/ml of PapMV for 3 hr. After incubation, cells were injected i.v. into BALB/c mice at one of three doses (10⁴, 10⁵ or 10⁶ cells). As the control for the free virus, the cell culture

supernatant from the PapMV-stimulated cells and the last wash supernatant of these cells were independently injected i.v. in mice. As a positive control, mice were injected i.v. with 30 µg of PapMV, and 10⁵ non-pulsed BMDM were transferred as a control (Fig. 4b). Neither 10⁴ nor 10⁵ PapMV-pulsed cells induced a specific IgG titre. By contrast, transfer of 10⁶ PapMV-stimulated cells induced a specific antibody titre on day 12 after transfer. The titre increased 16-fold around day 20 and remained at this level until the last day tested (day 30; Fig. 4b). Neither the last cell wash supernatant nor the 10⁵ unstimulated BMDM induced a PapMV-specific antibody titre, showing that transferred cells did not contain free virus and that the antibody response induced was specific. Moreover, both the culture supernatant from PapMV-stimulated BMDM, and PapMV injected i.v. induced specific antibody titres (Fig. 4b).

These results show that BMDM were able to provide PapMV to B cells efficiently, inducing a specific antibody

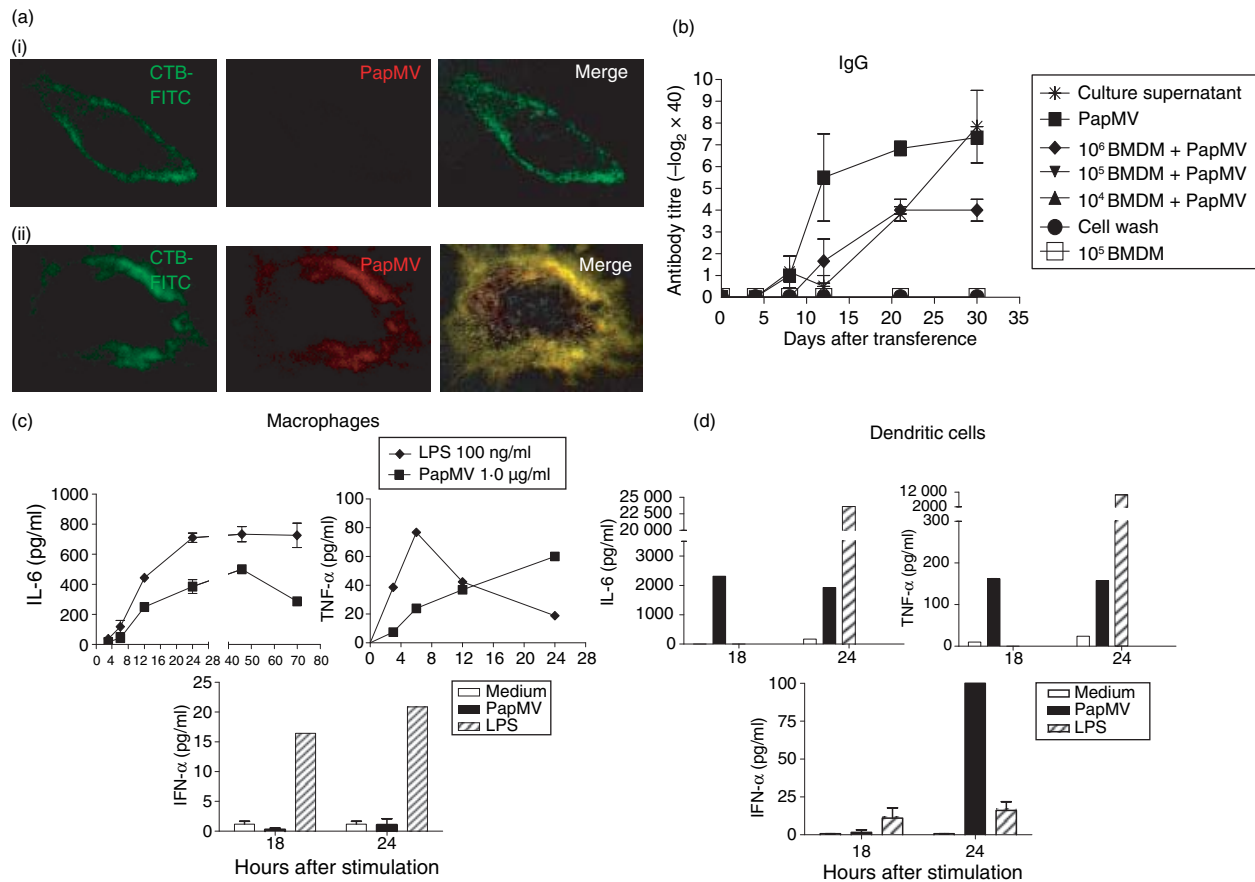


Figure 4. Papaya mosaic virus (PapMV) efficiently activates antigen-presenting cells (APC) and these cells participate in the induction of the specific antibody response. (a) Aggregation of lipid rafts induced by PapMV. (i) Unstimulated cells. (ii) Cells pulsed with 1 µg/ml of PapMV. Original magnification $\times 100$. (b) Bone marrow-derived macrophages (BMDM) pulsed with PapMV efficiently induced specific IgG titres. BMDM were stimulated with 30 µg/ml of PapMV and transferred intravenously (i.v.) to BALB/c mice. Non-pulsed cells, culture supernatant, final-wash supernatant and 30 µg of PapMV were injected i.v. as controls. The PapMV-specific IgG titres in mice sera were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) at the time-points depicted in the graph. Results are expressed as the mean \pm standard deviation (SD) of six mice per group. Data correspond to one representative result from three independent experiments. (c,d) Production of inflammatory cytokines in macrophages and dendritic cells induced by 1 µg/ml of PapMV or by 100 ng/ml of lipopolysaccharide (LPS) from *Escherichia coli* UHO111 (as a positive control). Results are expressed as the mean \pm SD of four wells per time chased. Data correspond to one representative result from three independent experiments. CTB, cholera toxin B subunit; FITC, fluorescein isothiocyanate; IFN- α , interferon- α ; IL-6, interleukin-6; TNF, tumour necrosis factor.

immune response. This mechanism could also be involved in translating the innate immune response induced by PapMV into a specific long-lasting antibody response.

PapMV induces the up-regulation of activation markers on DC, macrophages and B cells *in vivo*

If PapMV is indeed recognized by the immune system as a PAMP, it should drive the maturation of immature DC or activate APC, as do other PRR agonists. To characterize the capacity of PapMV to stimulate APC *in vivo*, we isolated lymph nodes and spleens of mice immunized with PapMV and analysed the up-regulation of co-stimulatory and activation molecules (CD80, CD86, CD40, CD69 and MHC class II). Mice were immunized i.p. with

30 µg of PapMV, 50 µg of Poly I:C (both in saline) or saline alone (control). Twenty-four hours after immunization, lymph nodes and spleen cells were harvested. As shown in Fig. 3, PapMV induced the up-regulation of CD80 and CD69 in lymph node (LN) DC ($CD11c^+ CD11b^-$) and CD40 and CD69 in spleen DC. For macrophages ($CD11c^- CD11b^+$), up-regulation of CD80 and CD69 was observed in LN, whereas CD40 and CD69 up-regulation was observed in the spleen. CD69 was up-regulated in LN B lymphocytes ($CD11c^- B220^+$), and CD40 and CD69 were up-regulated in splenic B cells. The TLR-3 agonist, Poly I:C, induced the up-regulation of the markers tested, although the profile observed was markedly different from that induced by PapMV (Fig. 3).

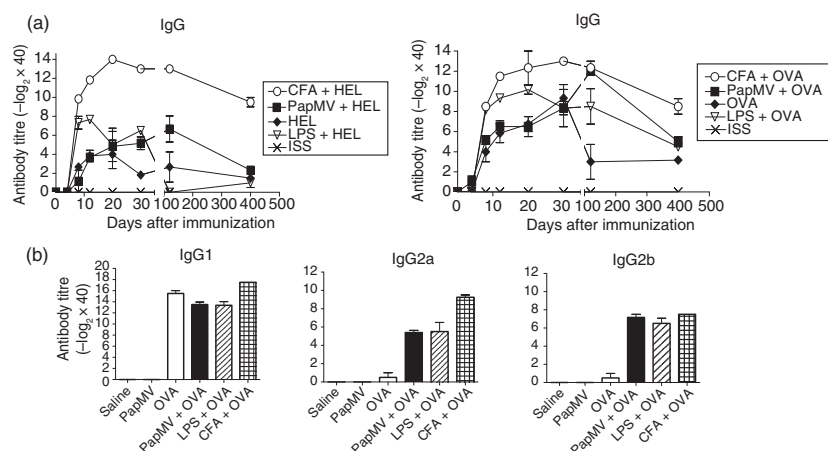


Figure 5. Papaya mosaic virus (PapMV) strengthens the antibody response to model antigens. (a) Groups of three female BALB/c mice were immunized with 2 mg of ovalbumin (OVA) or hen egg-white lysozyme (HEL), either alone or with the following adjuvants: 30 μ g of PapMV, complete Freund's adjuvant (CFA) (1:1, v/v) or 5 μ g of lipopolysaccharide (LPS) from *Escherichia coli* O111:B4. Control mice were injected with saline only (isotonic saline solution (ISS)). Serum was obtained from the immunized mice at the time-points depicted. A representative result from two experiments is shown. (b) The PapMV adjuvant effect is characterized by the induction of higher OVA-specific IgG2a and IgG2b titres. Analysis of IgG subclasses present on day 20 in serum from mice immunized with OVA, PapMV–OVA, LPS–OVA and CFA–OVA.

PapMV strengthens the antibody response to model antigens

Adjuvants are substances capable of augmenting the antibody response or the cellular immune response against poor immunogenic antigens.²⁷ Adjuvant effects are mediated by the activation of DC and macrophages through PRR such as TLR.²⁸ As mentioned above, PapMV induced the activation and maturation of APC, suggesting that it has intrinsic adjuvant properties. To determine whether PapMV is an adjuvant that can promote a long-lasting antibody response to other antigens, BALB/c mice were immunized i.p. on day 0 with 2 mg of OVA or HEL, either alone or together with the following adjuvants: PapMV, CFA or LPS. The IgG titre specific for OVA or HEL was measured by ELISA at the time-points indicated (Fig. 5a). The adjuvant effect of PapMV was observed on the total IgG response to OVA and HEL in immunized animals. An adjuvant effect induced by PapMV was observed for HEL on day 30 after immunization, when the antibody titre increased eightfold compared with the antibody titre induced by HEL alone. This difference in antibody titre was maintained until day 120, but not to day 400 (Fig. 5a). Although LPS induced an adjuvant effect only in the first 30 days after immunization, CFA showed the strongest adjuvant effect from day 8 to the end of the experiment on day 400 after immunization (Fig. 5a). For immunization with OVA, the adjuvant effect on total IgG titres was observed only until day 120 after the first immunization, after which the antibody titre decreased with time, but was still fourfold higher than for OVA on day 400 (Fig. 5a). Further analysis was performed on day 20 to identify which IgG subclasses

were induced by OVA and by OVA co-immunized with adjuvants (where PapMV did not show an adjuvant effect on the total IgG response). PapMV, LPS and CFA induced OVA-specific IgG2a and IgG2b titres, whereas OVA alone induced only IgG1-specific antibody titres (Fig. 5a). No adjuvant effect for IgG1 was observed when OVA was co-administered with any of the adjuvants used. Thus, PapMV, LPS and CFA induce an adjuvant effect on the IgG subclass responses to OVA. Moreover, PapMV exhibits adjuvant properties that induce a long-lasting increase in specific antibody titres to model antigens. Taken together, these data suggest that PapMV has intrinsic adjuvant properties that may have mediated the translation of the innate response into an antigen-specific long-lasting antibody response.²⁷

Co-administration of PapMV and *S. typhi* OmpC porin increases the OmpC protective capacity against *S. typhi* challenge

An adjuvant is also used to promote the antigen protective capacity.²⁷ To test whether the adjuvant properties of PapMV could increase the protection of a vaccine, we co-administered PapMV with an experimental vaccine to typhoid fever, composed of *S. typhi* OmpC porin, developed in our laboratory.^{15,29} Compared to mice immunized with the OmpC porin, mice immunized with OmpC mixed with PapMV showed a survival rate 30% higher after challenge with 100 and 500 LD₅₀ of *S. typhi* (Fig. 6b). No protection was observed in mice immunized only with PapMV on days 0 and 15 and challenged on day 21 (Fig. 6b) or in mice immunized with PapMV and challenged 24 hr later (data not shown). These data reject

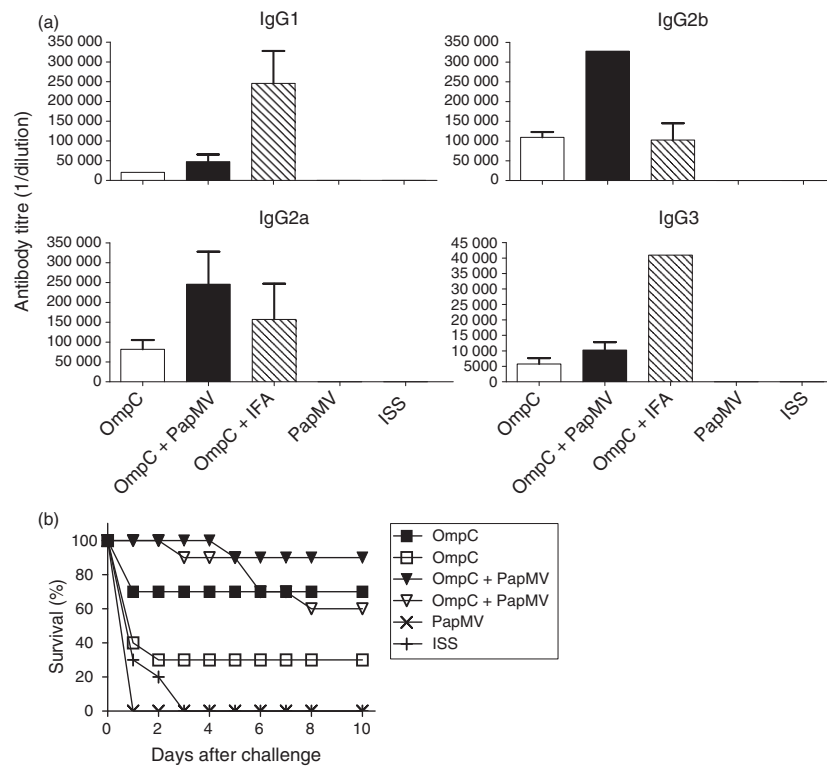


Figure 6. Papaya mosaic virus (PapMV) promotes the increase of antibody titres and potentiates the protection induced by an experimental vaccine. (a) Groups of five female BALB/c mice were immunized intraperitoneally (i.p.) on day 0 with 10 μ g of outer membrane protein C (OmpC) alone or together with 30 μ g of PapMV or Freund's incomplete adjuvant (IFA) (1:1, v/v). On day 15, all mice were boosted with 10 μ g of OmpC only. Control mice were injected with saline only (isotonic saline solution (ISS)). Antibody titres were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) on day 21 after the first immunization. (b) PapMV increased the protective capacity of OmpC porin. Groups of 10 female BALB/c mice were immunized i.p. with 10 μ g of OmpC either alone or with 30 μ g of PapMV. The booster was given on day 15 using OmpC alone. Control mice were injected with saline (ISS) or PapMV. The challenge of experimental groups was performed on day 21 with a 100 (filled symbols) or a 500 (open symbols) 50% lethal dose (LD_{50}) of *Salmonella enterica* serovar Typhi (*S. typhi*), and the survival rate was recorded for 10 days after the challenge. Control groups were challenged with 20 LD_{50} of *S. typhi*. A representative result of three experiments is shown.

the idea that the protection observed is the result of enhanced inflammation induced by PapMV. To test if increased protection correlates with an increase in the antibody titre specific for OmpC, we measured the PapMV adjuvant effect on the OmpC-specific antibody titres. PapMV co-immunization with OmpC induced an increase in the anti-OmpC IgG1, IgG2a, IgG2b and IgG3 titres (Fig. 6a). These results further corroborate that the adjuvant properties of PapMV potentiate both innate and adaptive immune responses elicited by OmpC to achieve protection against *S. typhi* challenge.

Discussion

The characterization and study of molecules able to induce long-lasting immune responses, and the mechanisms involved in their recognition, are important for understanding the generation of long-term immunity.^{15,30} We found, in this study, that PapMV is a strong immunogenic antigen able to induce a long-lasting antibody

response with a single dose and without added adjuvants (Fig. 1a). We also observed that PapMV induces a T-cell response (Fig. 1b). Because PapMV is not pathogenic in mammals,¹⁰ the mammalian immune system has had no evolutionary selective pressure to generate immunity against PapMV. Therefore, the highly immunogenic activity of this virus suggests that the molecular patterns recognized by PRR on cells from the innate immune system and by B and T cells – rather than pathogenicity of the virus – might be the driving force in the recognition of PapMV. The relationship between the distribution of epitopes within a molecule and the capacity to activate B lymphocytes independently of T cells has been described previously,³¹ suggesting that highly repetitive and organized antigens promote the establishment of a long-lasting B-cell response. Similarly to many vertebrate pathogenic viruses, PapMV repetitive-pattern epitopes may cross-link specific immunoglobulins efficiently on B-cell surfaces. The specificity of PapMV recognition by B cells is supported by the observation that PapMV is not a

type 1 thymus-independent antigen (Fig. 2). However, the small up-regulation of B-cell activation markers observed both *in vitro* and *in vivo* suggest that PapMV could also be recognized by non-BCR receptors on B cells. The contribution of non-BCR receptors, such as TLRs, expressed on B cells, to the humoral immune response is a topic of debate.^{32,33} TLR stimulation has been proposed as a third signal required for the activation of human naïve B cells³⁴ or as a signal to maintain B-cell memory compartments.³⁵ Thus, PapMV could stimulate B cells to favour processes such as antigen presentation, co-stimulation or as survival signal for some B cells.

Recognition of repetitive, organized molecular patterns is also important to activate the innate immune response. This has been studied for mannose-binding lectin,³⁶ for a polymeric bacterial protein that signals through TLR-4³⁷ and for highly ordered flagellin, a TLR-5 agonist, for which immunogenicity is dependent on its level of polymerization.³⁸ Accordingly, PapMV particles efficiently activated innate immune system cells, as shown in Figs 3 and 4. Although we did not identify the PRR involved in the innate immune activation, this response indicated that PapMV is recognized by the immune system similarly to PAMP. Because PAMP are important components of many adjuvants, we tested the adjuvant properties of PapMV. PapMV promoted long-lasting antibody responses to HEL and to OVA (Fig. 5a) and has been found to potentiate the protective capacity of an experimental vaccine^{19,29} (Fig. 6). Previously, we have reported a lack of adjuvanticity of the monomeric form of PapMV CP, indicating the critical function of multimerization in the induction of an antibody response to the expressed antigen.³⁹ These data confirm that PapMV activates immune responses similarly to PAMP.

Antigen presentation by APCs to T cells has shown the importance of the innate immune system to activate the adaptive immune system. APCs loaded with PapMV efficiently induced antibody responses (Fig. 4b), as previously observed for a mammalian infecting virus.²⁵ These data, and the effects elicited by PapMV on APCs (Figs 3 and 4), suggest that PapMV-stimulated APCs provide the antigen and the cytokine environment needed to promote an efficient T-cell-dependent antibody response, and this might be the mechanism involved in translating intrinsic adjuvant signals delivered by PapMV into the long-lasting antibody response observed. We propose that PapMV is sensed by the immune system both as PAMP and as antigen (Pamptigen), simultaneously activating innate and adaptive immune responses, which would favour the induction of a memory compartment. Pamptigens could also bind both BCRs and PRRs, such as TLRs, on specific B cells, leading to the differentiation of antibody-secreting cells or to the generation of memory B cells. A Pamptigen could reduce the antigen threshold required to activate the immune response. Therefore, small amounts of the

persistent antigen could maintain a high antibody titre. Most non-infectious antigens, such as OVA or HEL, or PAMP (such as LPS), do not induce long-lasting antibody titres on their own. Our results suggest that the innate immune response makes an important contribution to the development or to the maintenance of long-lasting antibody responses.

The strong immunogenicity and intrinsic adjuvant properties of PapMV translate into a specific long-lasting antibody response to both PapMV and to model co-immunized antigens. As PapMV can be produced using inexpensive procedures and is stable at room temperature, it offers biotechnology useful advantages to develop new adjuvant or vaccine platforms³⁹ to induce long-lasting immunity.

Acknowledgements

This study was funded by the Mexican National Science and Technology Council (CONACyT) Projects SEP-CONACyT 33137-M and 45261-M and by the Fund for Research Development (FOFOI) from IMSS Projects 2003-020, 2004-052 and 2006-022 awarded to C. López-Macías. R. Pastelin-Palacios acknowledge funding from Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), UNAM, Project: IN224907 and SEP-CONACyT 43911-M. The PhD students acknowledge scholarships received from CONACyT and IMSS. We acknowledge the excellent work on animal care performed by Mr Ricardo Vargas Orozco and Daniel Sánchez Almaraz, DVM. We thank Dr Edmundo Calva from the Biotechnology Institute, UNAM, for providing strain STYF302.

Conflict of interest

The authors have no financial conflict of interest.

N. Majeau, D. Leclerc and C. López-Macías are co-inventors on a patent pending for the use of PapMV as an adjuvant.

References

- 1 Janeway CAJ. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1989; **54**(Pt 1):1–13.
- 2 Sela M. Antigenicity: some molecular aspects. *Science* 1969; **166**:1365–74.
- 3 Zinkernagel RM, Bachmann MF, Kundig TM, Oehen S, Pirchet H, Hengartner H. On immunological memory. *Annu Rev Immunol* 1996; **14**:333–67.
- 4 Kaech SM, Wherry EJ, Ahmed R. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat Rev Immunol* 2002; **2**:251–62.
- 5 Hofer T, Muehlinghaus G, Moser K *et al.* Adaptation of humoral memory. *Immunol Rev* 2006; **211**:295–302.

- 6 Zinkernagel RM. On natural and artificial vaccinations. *Annu Rev Immunol* 2003; **21**:515–46.
- 7 Bachmann MF, Rohrer UH, Kundig TM, Burki K, Hengartner H, Zinkernagel RM. The influence of antigen organization on B cell responsiveness. *Science* 1993; **262**:1448–51.
- 8 Dougan G, Hormaeche C. How bacteria and their products provide clues to vaccine and adjuvant development. *Vaccine* 2006; **24**(Suppl. 2):S2–S9.
- 9 Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors as adjuvant receptors. *Biochim Biophys Acta* 2002; **1589**:1–13.
- 10 Pogue GP, Lindbo JA, Garger SJ, Fitzmaurice WP. Making an ally from an enemy: plant virology and the new agriculture. *Annu Rev Phytopathol* 2002; **40**:45–74.
- 11 Erickson JW, Abouhaidar M, Bancroft JB. The specificity of papaya mosaic virus assembly. *Virology* 1978; **90**:60–6.
- 12 Erickson JW, Bancroft JB. The kinetics of papaya mosaic virus assembly. *Virology* 1978; **90**:47–53.
- 13 Sit TL, Abouhaidar MG, Holy S. Nucleotide sequence of papaya mosaic virus RNA. *J Gen Virol* 1989; **70**(Pt 9):2325–31.
- 14 Martínez-Flores I, Cano R, Bustamante VH, Calva E, Puente JL. The ompB operon partially determines differential expression of OmpC in *Salmonella typhi* and *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1999; **181**:556–62.
- 15 Secundino I, Lopez-Macias C, Cervantes-Barragan L *et al.* *Salmonella* porins induce a sustained, lifelong specific bactericidal antibody memory response. *Immunology* 2006; **117**:59–70.
- 16 Tremblay MH, Majeau N, Gagne ME *et al.* Effect of mutations K97A and E128A on RNA binding and self assembly of papaya mosaic potexvirus coat protein. *FEBS J* 2006; **273**:14–25.
- 17 Poltorak A, He X, Smirnova I *et al.* Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 1998; **282**:2085–8.
- 18 Alpuche-Aranda CM, Racoosin EL, Swanson JA, Miller SI. *Salmonella* stimulate macrophage macropinocytosis and persist within spacious phagosomes. *J Exp Med* 1994; **179**:601–8.
- 19 Isibasi A, Ortiz-Navarrete V, Paniagua J, Pelayo R, Gonzalez CR, Garcia JA, Kumate J. Active protection of mice against *Salmonella typhi* by immunization with strain-specific porins. *Vaccine* 1992; **10**:811–3.
- 20 Mond JJ, Stein KE, Subbarao B, Paul WE. Analysis of B cell activation requirements with TNP-conjugated polyacrylamide beads. *J Immunol* 1979; **123**:239–45.
- 21 Zhang H, Todderud E, Stubbs G. Crystallization and preliminary X-ray analysis of papaya mosaic virus coat protein. *J Mol Biol* 1993; **234**:885–7.
- 22 Dauphinee SM, Karsan A. Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells. *Lab Invest* 2006; **86**:9–22.
- 23 Hsu HY, Hua KF, Lin CC, Lin CH, Hsu J, Wong CH. Extract of Reishi polysaccharides induces cytokine expression via TLR4-modulated protein kinase signaling pathways. *J Immunol* 2004; **173**:5989–99.
- 24 Simons K, Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000; **1**:31–9.
- 25 Ludewig B, Maloy KJ, Lopez-Macias C, Odermatt B, Hengartner H, Zinkernagel RM. Induction of optimal anti-viral neutralizing B cell responses by dendritic cells requires transport and release of virus particles in secondary lymphoid organs. *Eur J Immunol* 2000; **30**:185–96.
- 26 Wykes M, Pombo A, Jenkins C, MacPherson GG. Dendritic cells interact directly with naive B lymphocytes to transfer antigen and initiate class switching in a primary T-dependent response. *J Immunol* 1998; **161**:1313–9.
- 27 Pulendran B, Ahmed R. Translating innate immunity into immunological memory: implications for vaccine development. *Cell* 2006; **124**:849–63.
- 28 Krieg AM. CpG motifs: the active ingredient in bacterial extracts? *Nat Med* 2003; **9**:831–5.
- 29 Salazar-Gonzalez RM, Maldonado-Bernal C, Ramirez-Cruz NE *et al.* Induction of cellular immune response and anti-*Salmonella enterica* serovar typhi bactericidal antibodies in healthy volunteers by immunization with a vaccine candidate against typhoid fever. *Immunol Lett* 2004; **93**:115–22.
- 30 Zinkernagel RM, Hengartner H. Protective ‘immunity’ by pre-existent neutralizing antibody titers and preactivated T cells but not by so-called ‘immunological memory’. *Immunol Rev* 2006; **211**:310–9.
- 31 Fehr T, Bachmann MF, Bluethmann H, Kikutani H, Hengartner H, Zinkernagel RM. T-independent activation of B cells by vesicular stomatitis virus: no evidence for the need of a second signal. *Cell Immunol* 1996; **168**:184–92.
- 32 Pasare C, Medzhitov R. Control of B-cell responses by Toll-like receptors. *Nature* 2005; **438**:364–8.
- 33 Gavin AL, Hoebe K, Duong B, Ota T, Martin C, Beutler B, Nemazee D. Adjuvant-enhanced antibody responses in the absence of toll-like receptor signaling. *Science* 2006; **314**:1936–8.
- 34 Ruprecht CR, Lanzavecchia A. Toll-like receptor stimulation as a third signal required for activation of human naive B cells. *Eur J Immunol* 2006; **36**:810–6.
- 35 Bernasconi NL, Traggiai E, Lanzavecchia A. Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. *Science* 2002; **298**:2199–202.
- 36 Sheriff S, Chang CY, Ezekowitz RA. Human mannose-binding protein carbohydrate recognition domain trimerizes through a triple alpha-helical coiled-coil. *Nat Struct Biol* 1994; **1**:789–94.
- 37 Berguer PM, Mundinano J, Piazzon I, Goldbaum FA. A polymeric bacterial protein activates dendritic cells via TLR4. *J Immunol* 2006; **176**:2366–72.
- 38 Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A *et al.* The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 2001; **410**:1099–103.
- 39 Denis J, Majeau N, Acosta-Ramírez E *et al.* Immunogenicity of papaya mosaic virus-like particles fused to a hepatitis C virus epitope: evidence for the critical function of multimerization. *Virology* 2007; **363**:59–68.

Immunogenicity of papaya mosaic virus-like particles fused to a hepatitis C virus epitope: Evidence for the critical function of multimerization

Jérôme Denis^a, Nathalie Majeau^a, Elizabeth Acosta-Ramirez^{a,b}, Christian Savard^a, Marie-Claude Bedard^a, Sabrina Simard^a, Katia Lecours^c, Marilène Bolduc^a, Christine Pare^a, Bernard Willems^d, Naglaa Shoukry^d, Philippe Tessier^a, Patrick Lacasse^e, Alain Lamarre^e, Réjean Lapointe^f, Constantino Lopez Macias^b, Denis Leclerc^{a,*}

^a Centre de Recherche en Infectiologie, Pavillon CHUL, Université Laval, 2705 boul. Laurier, Québec, PQ, Canada

^b Unidad de Investigación Médica en Inmunología, 1er piso Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), México D.F., Mexico

^c Centre de Recherche sur la fonction, la structure et l'ingénierie des protéines CREPSIP, Department of Biochemistry and Microbiology, Laval University, Pavillon C-E Marchand, Québec, PQ, Canada

^d Centre de recherche du CHUM, Hôpital St-Luc, Montréal, P.Q., Canada

^e INRS-Institut Armand-Frappier, 531, boul. des Prairies, Laval, Québec, Canada

^f Research Centre, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Hôpital Notre Dame, Université de Montréal and Institut du Cancer de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Received 6 September 2006; returned to author for revision 22 September 2006; accepted 12 January 2007

Available online 22 February 2007

Abstract

Plant-virus-based vaccines have emerged as a promising avenue in vaccine development. This report describes the engineering of an innovative vaccine platform using the papaya mosaic virus (PapMV) capsid protein (CP) as a carrier protein and a C-terminal fused hepatitis C virus (HCV) E2 epitope as the immunogenic target. Two antigen organizations of the PapMV-based vaccines were tested: a virus-like-particle (VLP; PapMVCP-E2) and a monomeric form (PapMVCP_{27–215}-E2). While the two forms of the vaccine were both shown to be actively internalized *in vitro* in bone-marrow-derived antigen presenting cells (APCs), immunogenicity was demonstrated to be strongly dependent on antigen organization. Indeed, C3H/HeJ mice injected twice with the multimeric VLP vaccine showed a long-lasting humoral response (more than 120 days) against both the CP and the fused HCV E2 epitope. The antibody profile (production of IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3) suggests a Th1/Th2 response. Immunogenicity of the PapMV vaccine platform was not observed when the monomer PapMVCP-E2 was injected. These results demonstrate for the first time the potential of the PapMV vaccine platform and the critical function of multimerization in its immunogenicity. © 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Vaccination; Virus-like particles (VLPs); Chimeric plant virus; Epitope carrier

Introduction

In general, vaccines against viral diseases are based on attenuated or chemically inactivated live viruses (Ada, 2001). In the case of vaccine development against new emerging infectious diseases such as human immunodeficiency virus

(HIV), the application of this traditional approach raises obvious safety issues due to possible reversion, recombination or mutation. Therefore, the development of novel vaccine platforms is urgently needed and is considered a priority for global health improvement over the next 5–10 years, most notably in developing countries (Daar et al., 2002).

Among the numerous new approaches to vaccine development, virus-like particles (VLPs), made of viral nucleocapsids, have emerged as a promising strategy. VLPs are composed of viral structural proteins that retain the ability to self-assemble

* Corresponding author.

E-mail address: denis.leclerc@crchul.ulaval.ca (D. Leclerc).

without requiring the presence of the viral genome: they have been shown to be highly immunogenic and avoid the above-mentioned safety issues (Noad and Roy, 2003). The ability of VLPs to stimulate an adaptative immune response relies on several properties: the average diameter of VLPs ($<0.05 \mu\text{m}$), which is optimal for uptake of the VLPs by dendritic cells (Fifis et al., 2004); efficient activation of the antigen presenting cells (APCs) (Lenz et al., 2003); induction of CD8⁺ activation by a cross-priming mechanism (Ruedl et al., 2002); potent stimulation of a B-cell mediated response by direct cross-linking of the BCR on B cells. This latter property was first demonstrated in studies using organic polymers decorated with haptens, which proved that 20–25 haptens spaced by 5–10 nm were enough for T-cell-independent B-cell activation (Dintzis et al., 1976), (Mond et al., 1995). These results were subsequently illustrated using various viral models, for example by comparing the immunogenicity of a multimeric antigen versus the immuno-

genicity of its less organized or soluble counterparts (Bachmann et al., 1995; Baschong et al., 2003; Dintzis et al., 1976; Justewicz et al., 1995; Loor, 1967; Milich and McLachlan, 1986) or by showing the ability of VLPs exhibiting a self-epitope to break tolerance (Bachmann et al., 1993; Chackerian et al., 2001; Jegerlehner et al., 2002). Thus, the displayed array of antigens in a repetitive structure on viral, or VLP, surfaces was proposed to be important for the B-cell mediated response. It was suggested that the high immunogenicity of hepatitis B virus (HBV) VLPs comes from its ability to synergize both T-cell-independent activation of B cells by direct cross-linking of BCR and T-cell-dependent activation of B cells (Milich and McLachlan, 1986).

To date, two VLP vaccines, HBV and human papillomavirus (HPV), have been shown to function efficiently in humans (Fagan et al., 1987; Harper et al., 2004). VLPs derived from other viral pathogens, such as HIV-1 and hepatitis C virus

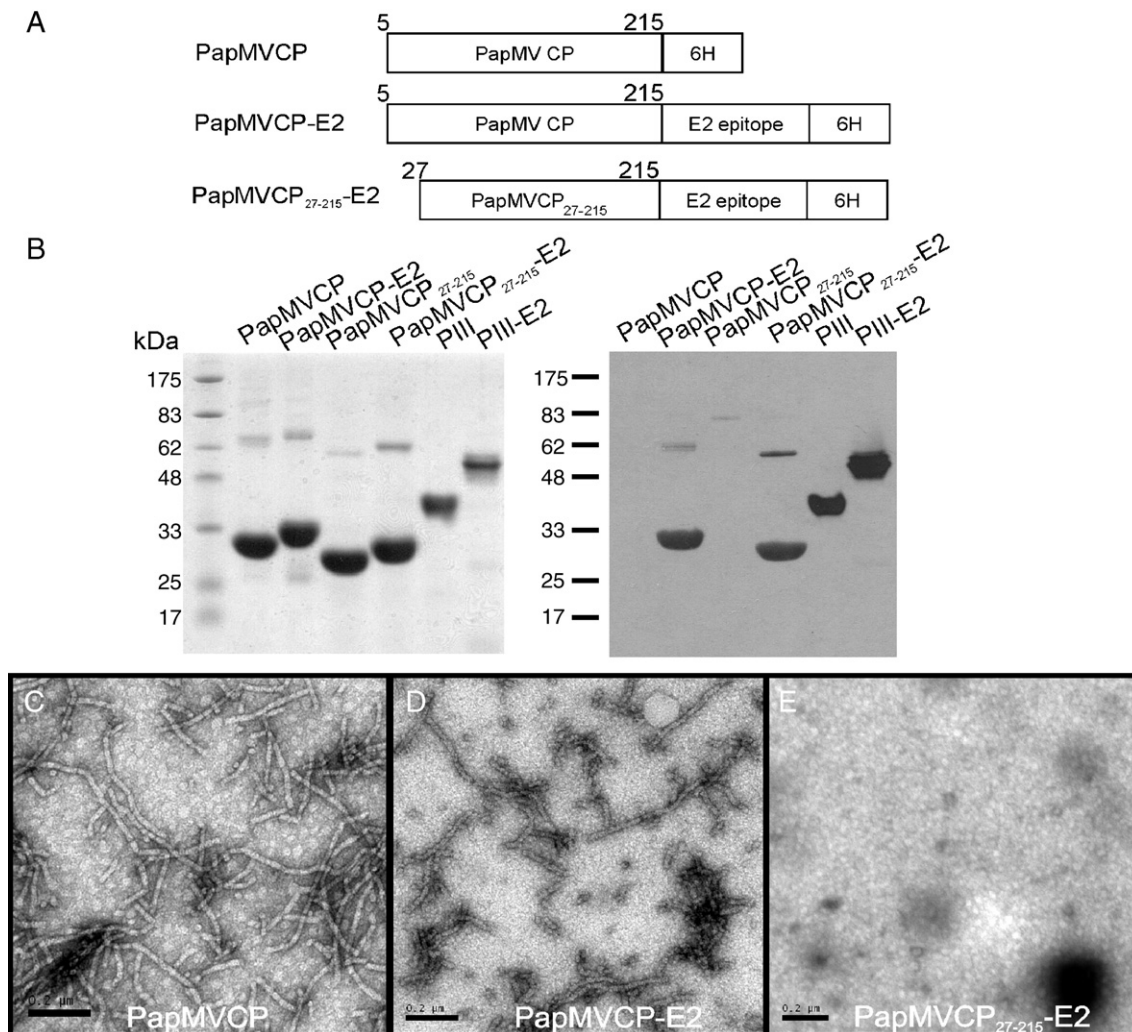


Fig. 1. Purification and characterization of recombinant proteins. (A) PapMVCP, the multimeric PapMVCP-E2 and the monomeric PapMVCP₂₇₋₂₁₅-E2 forms were fused to a 6xHis tag (6H) located at the C-terminus of the protein. The hepatitis C virus (HCV) peptide (E2₅₁₁₋₅₃₀) derived from envelope protein E2 is fused between the PapMVCP and the 6H tag in PapMVCP-E2 and PapMVCP₂₇₋₂₁₅-E2. (B) Purification of recombinant proteins by affinity chromatography using the 6H tag and a nickel column. The purity of the recombinant proteins was confirmed by SDS-PAGE (left), and the presence of the E2 epitope was confirmed by western blot using an anti-PIII-E2 antibody (right). (C) Electron microscopy of PapMVCP virus-like particles (VLPs), (D) PapMVCP-E2 VLPs and (E) PapMVCP₂₇₋₂₁₅-E2. Scale bars 200 nm.

(HCV), have also been generated, but their efficacy remains to be proven in humans (Noad and Roy, 2003). Alternatively, the use of VLPs from plant viruses as epitope presentation systems has triggered much interest. Indeed, plant viruses combine three characteristics essential to triggering a humoral response and memory: (1) they are comprised mainly of proteins that are highly immunogenic, (2) they are phylogenetically distant from the mammalian immune system, and (3) they possess a complex and repetitive organization. Cowpea mosaic virus (CPMV), tobacco mosaic virus (TMV), alfalfa mosaic virus (AIMV) and potato virus X (PVX) have been successfully produced in plants as vaccine platforms presenting peptides of interest (Canizares et al., 2005), and some vaccines have been proven to be protective in various disease models (reviewed in Streatfield and Howard, 2003). Furthermore, the expression of Johnson grass mosaic virus coat protein (CP) in *E. coli* (Saini and Vrati, 2003) led to the formation of VLPs that were used as a recombinant vaccination platform conferring protection after challenge against Japanese encephalitis virus. Following the observation that expression of the papaya mosaic virus (PapMV) CP in *E. coli* also led to the self-assembly of VLPs composed of several hundred CP subunits organized in a repetitive manner (Tremblay et al., 2006), the potential of PapMV as a recombinant peptidic vaccine platform was tested. An epitope from the HCV E2 glycoprotein was fused to the PapMV CP, resulting in the production of a new recombinant VLP platform (PapMVCP-E2). The fused HCV peptide (511–530) belongs to a larger region (411–613) of the E2 glycoprotein containing three main antibody (Ab) determinants that can prevent the binding of HCV to its CD81 receptor on human cells (Lechner et al., 1998). Furthermore, the critical function of multimerization in triggering a humoral response, already demonstrated in mammalian virus models, was evaluated for the first time using a plant virus model, by comparing the immunogenicity of a recombinant plant VLP and its monomeric counterpart. A monomeric mutant was generated by deletion of the 26 first amino acids of the CP (PapMVCP_{27–215}); this protein (referred to as PapMVCP_{27–215}-E2 in this report) was used to express the same epitope as the multimeric protein and its performance as a vaccine platform was compared *in vivo* with the PapMV VLP-based vaccine platform. Importantly, this monomeric form of PapMV CP, which is unable to self-assemble in *E. coli*, has previously been reported as having the same secondary structure as native CP (Lecours et al., 2005).

In this report, we show that the recombinant multimeric PapMV vaccine platform is able to trigger a strong and long-lasting immune response against a C-terminal fused epitope. The antibody response profile directed against the epitope suggests a balanced Th1/Th2 response. Notably, the same platform lost its immunogenic properties when injected as a monomeric protein, validating the finding that a repetitive organization is one of the key properties of molecules triggering an immune response in the mammalian immune system. This is the first demonstration of the critical function of a multimeric structure for a plant-virus-based platform.

Results

Production of recombinant multimeric and monomeric forms of PapMV CP

Expression of PapMVCP in *E. coli* generates VLPs that are similar in appearance to the wild-type virus purified from the leaves of infected papaya plants (Tremblay et al., 2006). To examine the ability of PapMVCP fused to an epitope from the HCV E2 glycoprotein to assemble into VLPs, recombinant PapMVCP, PapMVCP-E2 and the monomeric form PapMVCP_{27–215}-E2 (Fig. 1A) were expressed in *E. coli* and purified using an easy procedure (see Materials and methods). SDS-PAGE analysis revealed that there were no significant differences in the yield of the various recombinant proteins (Fig. 1B, left panel), and immunoblotting directed against the E2 epitope indicated that no trimming of the peptide had occurred (Fig. 1B, right panel). Note that the apparent molecular weights of PapMVCP-derived proteins on SDS-PAGE are slightly higher than expected (Fig. 1B, left panel; observed 30–33 kDa vs predicted 23–26 kDa), as previously noted (Lecours et al., 2005; Tremblay et al., 2006). As expected, an immunoblot using antibody directed to the E2 peptide confirmed that both the monomeric (PapMVCP_{27–215}-E2) and the multimeric form (PapMVCP-E2) harbor the E2 fusion (Fig. 1B, right panel). Endotoxin levels were always below 0.005 EU/ μ g of protein. Electron microscopy (EM) confirmed that addition of the E2 peptide at the C-terminus of PapMVCP did not affect the ability of the protein to self-assemble into VLPs (Fig. 1D), although the particles were notably shorter than VLPs formed by recombinant PapMVCP (Fig. 1C). Confirming previous results (Lecours et al., 2005), the monomeric form PapMVCP_{27–215}-E2 was unable to form VLPs (Fig. 1E). PapMVCP-E2 VLPs were variable in length, with a size range of 201 ± 80 nm. A length of 201 nm would represent 560 copies of the CP presenting the E2 peptide in a repetitive fashion. The secondary structures of the purified proteins were determined using circular dichroism spectrophotometry and were shown to be very similar to those previously reported (data not shown) (Lecours et al., 2005).

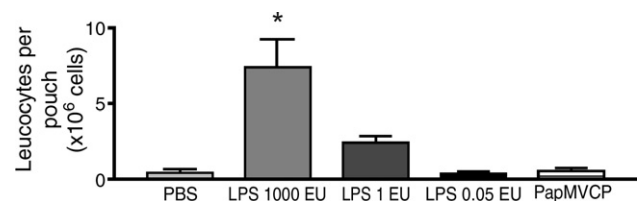


Fig. 2. Comparison of the pro-inflammatory response of PapMVCP and lipopolysaccharides (LPS). Dorsal air pouches were raised in 10- to 12-week-old CD1 mice. One milliliter of endotoxin-free PBS alone; PBS containing 0.05, 1 or 1000 EU/ml LPS; or recombinant PapMVCP (10 μ g/ml) were injected into the air pouches. Migrating leukocytes in pouch exudates were harvested and counted 6 h after treatment. Data represent the mean \pm SEM of 5 mice in each case. These results are representative of two identical and independent experiments. *Significant ($P < 0.05$) differences between cell recruitment levels as determined by Dunn's multiple comparison test.

Recombinant PapMV VLPs are weak inflammatory molecules

Some commonly used adjuvants, such as alum, have been described as mediating an inflammatory episode at the site of injection (Brewer, 2006). This characteristic can be very useful for the induction of a strong immune response. To test the pro-inflammatory properties of PapMVCP VLPs, we used the murine air pouch model. Injection of 10 μ g of PapMVCP VLPs failed to induce the recruitment of leukocytes into the pouch of CD1 mice 6 h after treatment. In contrast, injection of lipopolysaccharides (LPS) at doses of 1000 and 1 EU was very effective in inducing the recruitment of leukocytes (Fig. 2).

This result suggests that PapMVCP VLPs are not pro-inflammatory after 6 h and that the very low level of LPS in our proteins samples (<0.005 EU/ μ g) would not exert any notable immunogenic effects in subsequent experiments.

Comparative internalization of PapMVCP-E2 and PapMVCP₂₇₋₂₁₅-E2 in bone-marrow-derived dendritic cells

The uptake of VLPs by APCs was previously shown to be important for the induction of the immune response (Lenz et al., 2003; Gamvrellis et al., 2004). Therefore, we tested the capacity of the monomeric (PapMVCP₂₇₋₂₁₅-E2) and the multimeric

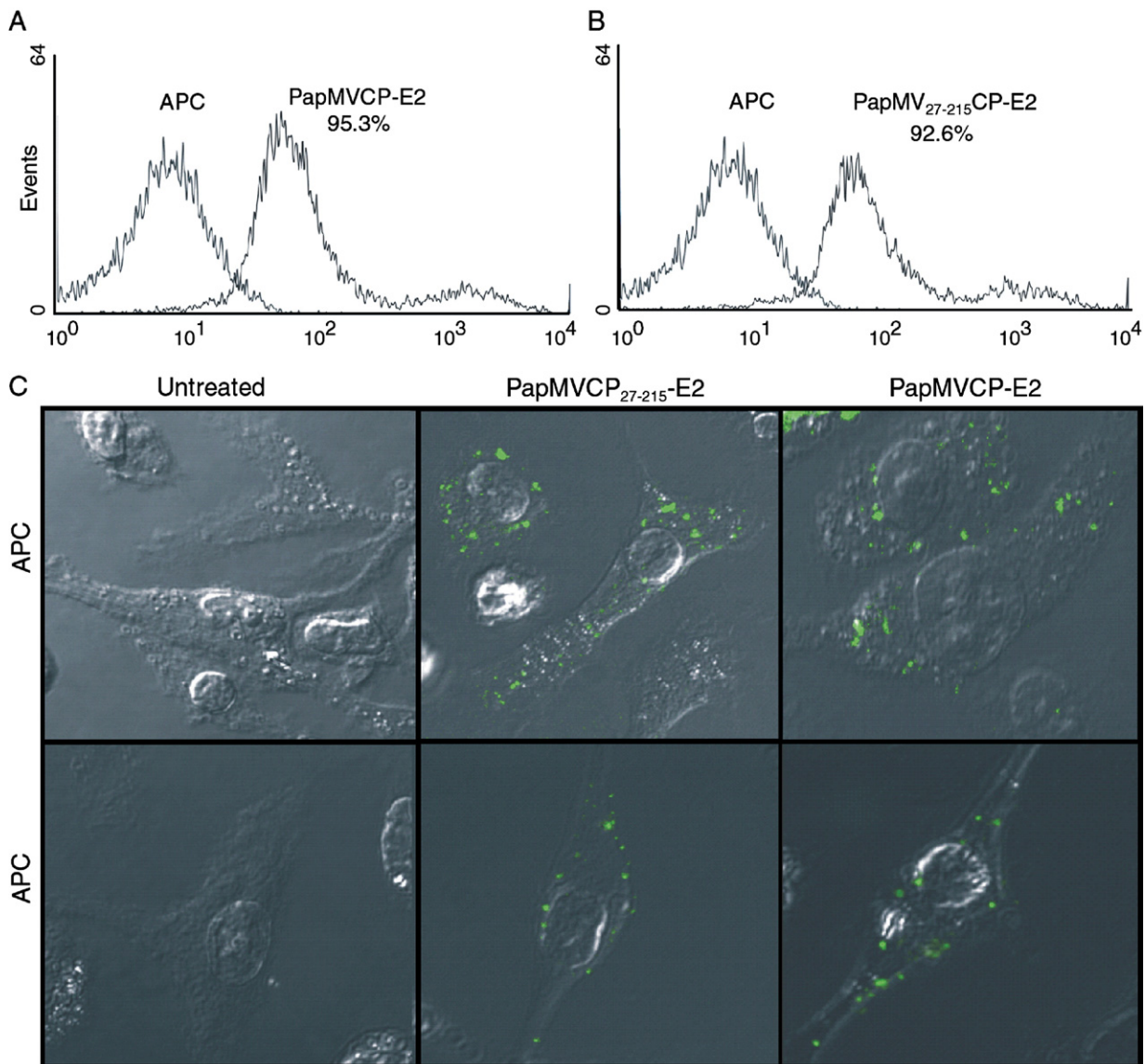


Fig. 3. Comparative internalization of PapMVCP-E2 and PapMVCP₂₇₋₂₁₅-E2 in antigen presentation cells (APCs) derived from bone marrow cells. 1×10^6 APCs were incubated for 2 h at 37 °C with 25 μ g of PapMVCP-E2 or PapMVCP₂₇₋₂₁₅-E2. Cells were fixed and processed for immunofluorescence as described in Materials and methods. The recombinant proteins were detected with a mouse anti-rabbit antibody conjugated to alexa 488 (green), which in turn detected the primary PapMVCP rabbit polyclonal antibodies. (A, B) Internalization of PapMVCP-E2 VLPs (A) and PapMVCP₂₇₋₂₁₅-E2 (B) in APCs as measured by flow cytometry. (C) Internalization of the monomeric (PapMVCP₂₇₋₂₁₅-E2) or multimeric (PapMVCP-E2) PapMV vaccine platform in APCs analyzed by laser scanning confocal microscopy. Two representative images of each treatment are shown. Slides were scanned sequentially with a 488-nm laser line. Optical slices from the middle of the scanned cells are shown. An overlay of the phase contrast and the green channel is presented. The images are representative of two identical and independent experiments. The control (Untreated) is unstimulated cells labeled with PapMVCP rabbit polyclonal antibodies and the secondary alexa 488 anti-rabbit antibody.

(PapMVCP-E2) forms to be internalized in bone-marrow-derived APCs enriched in bone-marrow-derived dendritic cells (BMDDC). Equivalent amounts (25 μg) of PapMVCP-E2 and PapMVCP_{27–215}-E2 were incubated with 1×10^6 cells for 2 h at 37 °C. Flow cytometry analysis showed that APCs become efficiently immunolabeled (>90%) by both the multimeric (Fig. 3A) and the monomeric forms (Fig. 3B). To visualize the interaction between the recombinant proteins and the APCs, treated cells were observed by confocal microscopy. For both proteins, the immunolabeled PapMVCP signal was clearly vesicular, intracytoplasmic and perinuclear (Fig. 3B). Both recombinant proteins were efficiently internalized in APCs.

The humoral response depends on multimerization of the plant-virus-based vaccine platform

To examine the capacity of PapMVCP VLPs to induce an immune response, C3H/HeJ mice were injected subcutaneously with 25 μg of the recombinant VLPs (PapMVCP-E2) or 25 μg of the monomeric form (PapMVCP_{27–215}-E2). The amount of E2 peptide present in each dose is estimated at 2 μg . A booster dose was given on day 15 after primary immunization. Mice sera were assayed for anti-PapMVCP, PapMVCP_{27–215} and anti-E2 peptide antibodies. Anti-CP IgG was clearly detected in mice immunized with PapMVCP-E2 on day 12, while only a low level of anti-CP was detected in the sera of mice vaccinated with PapMVCP_{27–215}-E2, even after the booster on day 15 (Fig. 4A). To detect anti-peptide antibodies, ELISA plates were coated with either the carrier protein alone (pIII) or carrier protein fused to the HCV E2 epitope (PIII-E2). The carrier protein fusion was used to detect anti-peptide IgG. The PIII carrier stabilizes the peptide and eases the purification because of its thermostability (Leclerc et al., 1998). Only sera of mice immunized with PapMV-E2 showed IgG antibodies against the carrier protein fused to the E2 peptide (PIII-E2), and the titer increased after the booster on day 15 (Fig. 4B). No antibody response was detectable against the carrier alone (PIII) for all sera (Fig. 4C). To examine the specificity of the antibody response elicited by the VLPs, sera from mice immunized with VLPs without the E2 peptide or with another peptide (derived from HCV E1 glycoprotein) were tested against PIII and PIII-E2. Antibodies to these latter proteins were not detected, confirming the specificity of the E2 antibodies (data not shown). The multimeric form was able to trigger a long-lasting response against both the CP and the E2 epitopes. Moreover, from day 23 to day 120, the antibody titer against the capsid decreased only on a 1 log₂ scale (Fig. 4A), while the antibody titer against the peptide decreased on a 4 log₂ scale (Fig. 4B). Isotyping of the anti-peptide antibodies revealed a Th1/Th2 balanced profile, with a prevalence of IgG1, IgG2a and IgG2b antibodies and a less pronounced production of IgG3 (Fig. 4D). A similar immunization protocol was performed in Balb/c mice with identical results: the same Th1/Th2 profile was observed with a similar IgG isotyping profile directed against both the PapMVCP and the E2 epitope (data not shown).

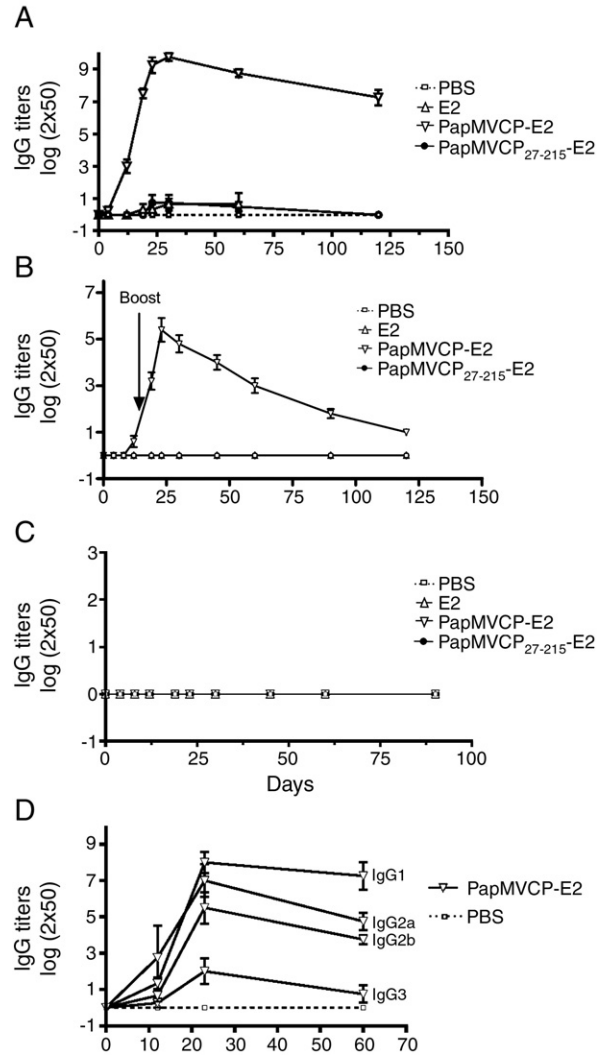


Fig. 4. Kinetics of the antibody response in C3H/HeJ mice injected subcutaneously twice (day 0 and day 15) with 25 μg of the multimeric PapMV vaccine platform (PapMVCP-E2), its monomeric counterpart (PapMVCP_{27–215}-E2), HCV E2 peptide (2 μg) alone or PBS. (A) IgG antibody response specific for the PapMV capsid protein. ELISA plates were coated with PapMVCP or PapMVCP_{27–215}. (B) IgG antibody response against the HCV E2 epitope. ELISA plates were coated with the HCV E2 peptide fused to the CaMV PIII carrier protein (see Materials and methods). (C) IgG antibody response to the CaMV PIII carrier protein alone. (D) IgG isotyping of the HCV E2 epitope antibody response, showing a balanced Th1/Th2 antibody isotyping profile. Only isotyping profiles of sera from mice injected with PapMVCP-E2 or PBS are presented in this figure. The results are expressed as antibody endpoint titer, defined as when the OD value is 3-fold higher than the background value obtained with a 1:50 dilution of serum from PBS-injected mice. Data represent the average of antibody titers from 4 (A) or 5 (B–D) mice. These results are representative of two identical and independent experiments. Black arrows on the graphs indicate the booster injections on day 15.

Reactivity of human sera against the HCV E2 peptide presented by the PapMV platform

An important issue in peptidic vaccination is good mimicry of the fused epitope. Consequently, to check if the peptide derived from the HCV surface glycoprotein E2 that is fused to the C-terminal of the PapMV CP can be recognized by serum from HCV-infected patients, sera from several healthy donors

Table 1
E2^{511–530}-specific antibody titres found in HCV-infected patients

Patient No/genotype	HD*	1/1a	2/1a	3/1a	4/1a	5/1a	6/1a	7/1a	8/3
PapMVCP VLPs	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PapMVCP-E2 VLPs	0	0	0	0	0	0	1/800	0	0
pIII	0	0	0	0	0	0	0	0	0
pIII-E2	0	0	0	0	0	1/25	1/200	0	0

* HD: healthy donors, the sera of 15 healthy donors were mixed in equal proportion.

and eight HCV-infected patients were tested for reaction against PapMVCP-E2 VLPs (Table 1). Of the eight sera from HCV patients tested, one (patient no. 6) reacted with E2 peptide at the surface of PapMVCP-E2 VLPs, while the same serum did not react against PapMVCP VLPs (Table 1). When the E2 peptide was fused in the context of the carrier protein PIII, the same serum was reactive to the peptide. A second serum (patient no. 5) also reacted very weakly, close to the background level, to the E2 peptide. Although the same sera (patient no. 6) were clearly reactive with two anti-E2 detection systems (PIII/PIII-E2 and PapMVCP_{27–215}/PapMVCP_{27–215}-E2), the differences between the antibody titers could not be satisfactorily explained.

Discussion

This is the first report to compare the immunogenicity of multimeric and monomeric forms of a plant virus vaccine platform expressing the same B-cell epitope. Clearly, PapMV VLPs are immunogenic in mice whereas the monomeric forms are not. The VLP differs from the monomeric form in only two features: the multimerization of the subunit into a repetitive structure, and the RNA from *E. coli* located inside the VLPs. Both of these features were previously shown to play a role in the activation of the immune response; their combination in VLPs is likely to play an important role in their immunogenicity.

The central function of multimerization in triggering a humoral response in the PapMV vaccine platform model is consistent with previous studies in this area. Multimerization has been proven to be important in the immunogenicity of human viral vaccine platforms (Milich and McLachlan, 1986) or murine viruses (Bachmann et al., 1995), (Bachmann et al., 1993). Efficient direct cross-linking of BCR (Bachmann et al., 1995), (Zinkernagel, 2003) and facilitation of antigen internalization in APCs such as dendritic cells have been proposed as largely explaining the ability of VLPs to trigger an efficient antibody response and class-switching via cooperation of CD4⁺ activated lymphocytes (Gamvrellis et al., 2004). Any model designed to test the influence of antigen organization on humoral response has to address the two main phenomena influencing the level of activation of naive B cells, i.e., antigen binding to BCR and cross-linking of BCRs (Brunswick et al., 1988), separately. In other words, it is necessary to ensure that the lack of immunogenicity of a monomeric antigen compared to a multimeric antigen is not due to alteration of its binding capacity to specific BCRs rather than a reduced BCR cross-linking ability. Consequently, the tertiary structure required for BCR recognition

must be similar for both the multimeric and monomeric forms of the antigen tested. As the monomeric form of PapMV CP was previously shown to have the same secondary structure as the multimeric CP, and was amenable to an extensive 3D NMR study (Lecours et al., 2005), our model allowed us to properly address the differential ability of the multimer and monomer to cross-link BCRs. This important structural control was not included in previous studies that generated monomeric antigen by denaturing VLPs by treating with SDS and 2-mercaptoethanol (Milich and McLachlan, 1986), treating flagellin with acid treatment (Feldmann and Easten, 1971) or by producing monomers in *E. coli* (Jegerlehner et al., 2002). None of these latter studies presented any evidence of secondary and tertiary structural conservation between the multimeric and monomeric forms. In our case, the monomeric form was unable to trigger a humoral response against the C-terminal presented peptide, while the multimeric form was able to induce a long-lasting response (120 days) against both the PapMVCP and the exposed epitope after two injections. This dramatic difference is unlikely to be due to degradation of the monomeric vaccine or trimming of the E2 fused peptide as our SDS-PAGE and immunoblotting analyses confirmed the integrity of the 2 vaccine forms and the uniform concentration of E2 peptides (Fig. 1). It is likely that the monomeric protein is unable to generate efficient activation of B cells, which could reasonably be attributed to a weak BCR cross-linking capacity. In contrast, injection of the multimer resulted in the creation of a pool of antibody-producing cells and memory B cells.

Since the class-switching (production of IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3) observed after injection of PapMVCP-E2 is a process that requires the contribution of CD4⁺ lymphocytes activated by APCs (Zinkernagel, 2003), internalization by bone-marrow-derived APCs was evaluated. As expected, the multimer was actively internalized by APCs. Interestingly, no difference in the magnitude of internalization into APCs was seen between the monomeric and the multimeric vaccine platform. In addition, differences between the monomeric and the multimeric vaccines in the *in vivo* capacity to activate DCs could not be demonstrated 6 h post-injection (data not shown). Therefore, the difference in immunogenicity could depend on the MHC class II processing of the antigen and subsequent activation of specific T cells, which, as previously demonstrated (Milich et al., 1997), may be more efficient with VLPs than with the monomeric form. The function of B cells as APCs could also be a key element; the same author also demonstrated that B cells could process HBV VLPs and activate a T-cell response 10⁵ times more efficiently than DCs and MOs.

PapMVCP VLPs also contain an RNA of bacterial origin that was used as a scaffold for PapMV CP self-assembly in the bacteria (Tremblay et al., 2006). As in the purified plant virus, the RNA represents 5% (w/w) of the mass of the VLP (Erickson et al., 1976). In contrast, the monomeric form of the CP is not associated with RNA because its RNA binding activity is lacking (Lecours et al., 2005). Although the bacterial RNA is only a minor component of the VLP, we cannot exclude that it contributes to adjuvanticity by, for example, activating APCs as established previously (Kariko et al., 2005; Sugiyama et al.,

2005). Any potential contribution to the immunogenicity of PapMV VLPs of other bacterial components with strong adjuvanticity, such as LPS, was shown to be negligible in two different ways. Firstly, immunization with PapMV VLPs in LPS-sensitive mice (Balb/c, data not shown) and LPS hypo-responsive mice C3H/HeJ (Fig. 4) led to the same humoral immune response against both the platform and the C-fused epitope. Secondly, PapMV VLPs with very low LPS content (<0.005 EU/ μ g) were unable to trigger the recruitment of innate immune cells in the air pouch model after 6 h, contrasting with the high recruitment capacity of LPS (Fig. 2). Taken together, our results confirm the conclusion that the immunogenic effect of recombinant PapMVCP VLPs does not derive from LPS-like pro-inflammatory properties. The only other reported case of use of VLPs from a plant virus produced in *E. coli* made no mention of determination of the LPS content of the proteins injected or the influence of LPS content on the observed results (Saini and Vрати, 2003).

The Th1/Th2 profile of antibodies triggered by the PapMV recombinant protein without the use of any adjuvants suggests that this newly described vaccine platform potentially triggers a broader immune response than other plant-virus-based platforms. Indeed, antibody isotyping has previously suggested plant virus vaccine platforms to be biased toward a Th1 response (Marusic et al., 2001; McInerney et al., 1999) and cytokine secretion (Piazzolla et al., 2005). Even the presence of a commercial adjuvant with VLPs did not modify the Th1 bias (Marusic et al., 2001). A balanced Th1/Th2 antibody profile could increase the immune effector mechanisms of the humoral response such as neutralization or antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) additional experiments would be necessary to investigate the potential of the PapMV platform to trigger these mechanisms in the HCV model. Moreover, the findings that the PapMV vaccine platform was able to trigger a pool of all antibody isotypes against the HCV E2 peptide and that serum from one HCV patient was clearly able to recognize the E2 peptide fused to the PapMV platform could indicate that this platform is suitable for triggering, for example, ADCC directed against hepatocytes exhibiting E2 protein on their surface as described in a clinical report by Nattermann et al. (2005), potentially helping to reduce the severity of the disease. In addition, a recent report (Leclerc et al., in press) demonstrated the capacity of the PapMV platform to activate human specific CD8⁺ lymphocytes *in vitro* by cross-priming. Taken together, these results suggest that the development of a vaccination platform based on PapMV VLPs against infectious diseases such as HCV, which requires both a protective CD8⁺ and a humoral response (Houghton and Abrignani, 2005), is a promising avenue of research.

Materials and methods

Cloning and engineering of the PapMV coat protein

The PapMV CP gene was amplified by RT/PCR from isolated viral RNA using primers 5'-AGTCCCATGGCACCACACCAACATAGCCTTC-3' and 5'-GATCGGATCCT-

TACTAATGGTGATGGTGATGGTGACGCGTGGTACTAGTTTCGGGGGGTGGGAAGGAATTGGATGGTTGG-3' and cloned as an *NcoI/BamHI* fragment in pET 3D (New England Biolabs). To generate the PapMVCP-E2 construct, CCACCGATCGTAGCGGTGCGCCGACCTACAGCTGGGGTGCGAACGATACGCGTCATG-3' and 5'-CATGACGCGTATCGTTTCGCACCCCAGCTGTAGGTCGGCGCACCCGTACGATCGGTGGTACCCACCACCACTAGTGATC-3' were annealed together and digested with *SpeI* and *MluI* before ligation into the *SpeI/MluI*-linearized PapMVCP clone. The expression vector for PapMVCP_{27–215}-E2 was constructed from the PapMVCP-E2 plasmid as follows: two oligonucleotides (including an *NcoI* restriction site) designed to delete the 26 first amino acids of the PapMV CP were used for PCR: forward 5'-AGTCCCATGGCCGATCCAACGTCCAATCTTCTG-3' and reverse 5'-ACGTCCATGGTATATCTCCTTCTTAAAG-3'. The PCR product was then self-ligated. The expression vector for PapMVCP_{27–215} was derived from the PapMVCP plasmid following the same procedure as for the construction of the PapMVCP_{27–215}-E2 clone. The sequences of all PapMV clones were confirmed by DNA sequencing.

Cloning and engineering of the carrier protein (PIII)

A plasmid designed to express the cauliflower mosaic virus (CaMV) pIII protein in *E. coli* has been previously described (Leclerc et al., 1998). A truncated version of CaMV pIII comprising the 74 N-terminal amino acids was generated using primers 5'-AAACCCGGGGAATTCACCATGGCTAACTTAATCAGATCCAAAAG 3' and 5'-GATCGGATCCTAACGCGTGGTACTAGTAGGTTGGGTACCTAAGGCTTC-3'. This truncated version harbored unique *SpeI* and *MluI* sites that are convenient for cloning a peptide in fusion with pIII. To generate a PIII-E2 construct, the oligonucleotides E2 5'-GATCACTAGTGTGGTGGTG-GGTACCACCGATCGTAGCGGTGCGCCGACCTACAGCTGGGGTGCGAACGATACGCGTCATG-3' and 5'-CATGACGCGTATCGTTTCGCACCCCAGCTGTAGGTCGGCGCACCCGTACGATCGGTGGTACCCACCACCACTAGTGATC-3' were annealed together and digested with *SpeI* and *MluI* before ligation into the PIII clone linearized with *SpeI* and *MluI*. The sequences of PIII clones were confirmed by DNA sequencing. The *E. coli* expression strain BL21(DE3) RIL (Stratagene) was transformed with PIII constructs, and protein expression was induced with 1 mM IPTG for 16 h at 25 °C. Cells were pelleted by centrifugation and resuspended in Tris-HCl pH 7.0, 20 mM NaCl, 1 mM EDTA and 0.02 mM PMSF before lysis by sonication. The protein extracts were then heated at 65 °C for 15 min and centrifuged at 15,000×g for 20 min at 4 °C. Incubation at 65 °C was repeated a second time. The samples were incubated at 80 °C for 15 min and centrifuged again for 20 min at 15,000×g. The chimeric pIII protein is resistant to heat and remains soluble in the supernatant after this treatment. The NaCl concentration was adjusted to 150 mM and protein extracts were separated on a Sephadex G-50 column to achieve 95% purity. The PIII protein is referred to as the carrier protein in the text.

Expression and purification of PapMVCP, PapMVCP-E2, PapMVCP_{27–215} and PapMVCP_{27–215}-E2

Expression and purification of PapMVCP constructs were performed as previously described with minor modifications (Tremblay et al., 2006). Briefly, the bacteria were lysed through a French press and then loaded onto a Ni²⁺ column, washed with 10 mM Tris–HCl/50 mM Imidazole/0.5% Triton X100 (pH 8), then with 10 mM Tris–HCl/50 mM Imidazole/1% Zwittergent (pH 8) to remove endotoxin contamination. For the PapMVCP and PapMVCP-E2 proteins, the eluate was subjected to high speed centrifugation (100,000×g) for 120 min in a Beckman 50.2 TI rotor. The VLP pellet was resuspended in endotoxin-free PBS (Sigma). Following elution of the PapMVCP_{27–215} and PapMVCP_{27–215}-E2 proteins, the solutions were dialyzed against PBS using a 6–8 kDa molecular weight cut-off membrane (Spectra). The E2 peptide was synthesized by GLBiochem (Shanghai) Ltd and resuspended in endotoxin-free PBS (Sigma). Protein solutions were filtered using 0.45 µm filters before use. The purity of the proteins was determined by SDS–PAGE and confirmed by western immunoblot analysis using mouse polyclonal antibodies generated against PIII-E2. The amount of protein was evaluated using a BCA protein kit (Pierce). The level of LPS in the purified protein was evaluated with the Limulus test according to the manufacturer's instructions (Cambrex) and was below 0.005 endotoxin units (EU)/µg of protein.

Electron microscopy

Proteins were diluted in PBS and were absorbed for 3 min on carbon-coated formvar grids. The grids were washed twice with deionized water and stained with 2% uranyl acetate for 10 min at room temperature. The grids were then observed on a Jeol JEM220FS transmission electron microscope. Average VLP length was evaluated by measuring 100 VLPs using Adobe Photoshop software.

Immunization

Five 4-to 8-week-old C3H/HeJ mice (Charles Rivers Laboratories) were injected subcutaneously with 25 µg of PapMVCP-E2, PapMVCP_{27–215}-E2 or the equivalent amount of the E2 peptide (2 µg) or endotoxin-free PBS (Sigma). Primary immunization was followed by one booster dose given 2 weeks later. Blood samples were obtained at different time points and stored at –20 °C until analysis. All the experimental protocols were approved by the Laval University animal protection committee.

ELISA quantification

Costar High Binding 96-well plates (Corning, NY, USA) were coated overnight at 4 °C with 100 µl/well of P3, P3E2, PapMVCP, PapMVCP_{27–215}, or PapMVCP-E2 diluted to a concentration of 1 µg/ml in 0.1 M NaHCO₃ buffer pH 9.6. The

plates were blocked with PBS/0.1% Tween-20/2% BSA (150 µl/well) for 1 h at 37 °C. After washing three times with PBS/0.1% Tween-20, sera were added in 2-fold serial dilution (beginning with 1:50) and incubated for 1 h at 37 °C. Following incubation, the plates were washed three times and incubated with 100 µl of peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG, IgG1, IgG2a, IgG2b (all from Jackson ImmunoResearch) or IgG3 (Rockland) at a dilution of 1:10,000 in PBS/0.1% Tween-20/2% BSA for 1 h at 37 °C. After three washes, the presence of IgG was detected with 100 µl of TMB-S according to the manufacturer's instructions; the reaction was stopped by adding 100 µl of 0.18 M H₂SO₄ and the OD was read at 450 nm. The results are expressed as antibody endpoint titer, determined when the OD value is 3-fold the background value obtained with a 1:50 dilution of serum from PBS-injected mice. For the determination of antibody levels in human sera, the same conditions were applied, except that the peroxidase-conjugated goat anti-human IgG as secondary antibodies were used at a dilution of 1:80,000. Sera from infected HCV patients were provided by B. Willems (Hopital Saint Luc, CHUM); the results are expressed as antibody endpoint titer, defined as the point at which the OD value is 3-fold the background value obtained with a 1:25 dilution of serum from a pool of sera from 15 non-infected patients.

Air pouches in mice

Air pouches were raised in 10- to 12-week-old CD1 mice (Charles River Laboratories). Experimental protocols were approved by the Laval University animal protection committee. Air pouches were raised on the dorsum by subcutaneous injection of 3 ml of sterile air on days 0 and 3. On day 7, 1 ml of recombinant PapMVCP (1 to 10 µg/ml), LPS (10 µg/ml) or PBS was injected into the air pouches. Six hours after treatment, the mice were killed by asphyxiation using CO₂. The air pouches were washed once with 1 ml PBS–5 mM EDTA and then twice with 2 ml of PBS–5 mM EDTA, and the exudates were centrifuged at 500×g for 5 min at room temperature. Cells were counted with a hemacytometer following acetic blue staining.

Bone marrow cell extraction and differentiation of APCs

Bone marrow progenitors cells were obtained from the femurs of Balb/c mice and cultured for 6 days in dendritic cells differentiation bone marrow medium (95% RPMI with 1% penicillin–streptomycin and supplemented with 5% X63-GM-CSF supernatant media culture; the X63-GM-CSF cell line was provided by B. Ludwig, Research Department, Cantonal Hospital, St. Gallen, Switzerland). Medium was partially replaced on days 2 and 4. On day 6, the medium was replaced by medium without LX63-conditioned medium. On day 7, enrichment of APCs was verified by flow cytometry using FITC anti-CD11c and PE-Cy5.5 anti-CD11b surface markers (BD Biosciences). The preparation contained 25% of CD11c⁺ CD11b⁺ cells, and more than 80% of CD11b⁺ cells. We refer to this preparation as APCs.

Flow cytometry

To evaluate internalization of the PapMVCP-E2 or PapMVCP_{27–215}-E2 in APCs, 1 million bone-marrow-derived APCs were incubated for 2 h at 37 °C with either 25 µg of PapMV-E2 or PapMVCP_{27–215}-E2. Briefly, cells were blocked with PBS containing 10% FBS and anti-CD16/CD32 (1 µg/1 million cells) for 15 min at 4 °C. After 2 washes with PBS, cells were fixed with PBS/2% paraformaldehyde for 10 min at room temperature. After 2 washes with permeabilization buffer (PBS 10%/FBS 0.2%/Triton X-100), cells were incubated for 45 min at 4 °C with rabbit polyclonal antibodies diluted 1:200 in permeabilization buffer. After 2 washes with permeabilization buffer, cells were incubated for 45 min at 4 °C with the secondary antibodies (anti-rabbit IgG alexa 488; Molecular Probes) diluted 1:5000 in permeabilization buffer. After washing with PBS, cells were immediately analyzed with an EPICS-XL cytofluorometer. Data analysis was performed using WINMDI2.8. The rabbit polyclonal Ab used for detection was produced in our own facilities: rabbit preimmune serum was used as a negative control.

Confocal microscopy

APCs were grown (200,000 cells/well) in 12-well plates (Corning, NY, USA) containing sterile slides in the bottom following the differentiation protocol described above. For antigen internalization studies, 5 µg of antigen/200,000 cells was used. The fixation, permeabilization and primary and secondary antibodies incubation steps were as described for flow cytometry. Slides were analyzed immediately with a Fluoview Fv300 confocal microscope fitted with a ×60 oil immersion objective. Fluorescence images were acquired sequentially to avoid non-specific channel interference and by *x-z* sectioning. Pictures were then digitally processed with Image J software. Optical slices from the middle of the scanned cells are shown in the figures.

Statistical analysis

Nonparametric Kruskal–Wallis and Dunn's multiple comparison tests were used for statistical analysis. A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant. Statistical analyses were performed with the program PRISM 3.03.

Acknowledgments

We would like to thank the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) for funding this research program, and Helen Rothnie for editing and critical reading of the manuscript.

References

- Ada, G., 2001. Vaccines and vaccination. *N. Engl. J. Med.* 345 (14), 1042–1053.
- Bachmann, M.F., Rohrer, U.H., Kundig, T.M., Burki, K., Hengartner, H., Zinkernagel, R.M., 1993. The influence of antigen organization on B cell responsiveness. *Science* 262 (5138), 1448–1451.
- Bachmann, M.F., Hengartner, H., Zinkernagel, R.M., 1995. T helper cell-independent neutralizing B cell response against vesicular stomatitis virus: role of antigen patterns in B cell induction? *Eur. J. Immunol.* 25 (12), 3445–3451.
- Baschong, W., Hasler, L., Haner, M., Kistler, J., Aebi, U., 2003. Repetitive versus monomeric antigen presentation: direct visualization of antibody affinity and specificity. *J. Struct. Biol.* 143 (3), 258–262.
- Brewer, J.M., 2006. (How) do aluminium adjuvants work? *Immunol. Lett.* 102 (1), 10–15.
- Brunswick, M., Finkelman, F.D., Highet, P.F., Inman, J.K., Dintzis, H.M., Mond, J.J., 1988. Picogram quantities of anti-Ig antibodies coupled to dextran induce B cell proliferation. *J. Immunol.* 140 (10), 3364–3372.
- Canizares, M.C., Nicholson, L., Lomonosoff, G.P., 2005. Use of viral vectors for vaccine production in plants. *Immunol. Cell Biol.* 83 (3), 263–270.
- Chackerian, B., Lowy, D.R., Schiller, J.T., 2001. Conjugation of a self-antigen to papillomavirus-like particles allows for efficient induction of protective autoantibodies. *J. Clin. Invest.* 108 (3), 415–423.
- Daar, A.S., Thorsteinsdottir, H., Martin, D.K., Smith, A.C., Nast, S., Singer, P.A., 2002. Top ten biotechnologies for improving health in developing countries. *Nat. Genet.* 32 (2), 229–232.
- Dintzis, H.M., Dintzis, R.Z., Vogelstein, B., 1976. Molecular determinants of immunogenicity: the immune model of immune response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73 (10), 3671–3675.
- Erickson, J.W., Bancroft, J.B., Horne, R.W., 1976. The assembly of papaya mosaic virus protein. *Virology* 72 (2), 514–517.
- Fagan, E.A., Tolley, P., Smith, H.M., Peters, M.P., Coleman, J., Elliott, P., Williams, R., Eddleston, A.L., 1987. Hepatitis B vaccine: immunogenicity and follow-up including two year booster doses in high-risk health care personnel in a London teaching hospital. *J. Med. Virol.* 21 (1), 49–56.
- Feldmann, M., Easten, A., 1971. The relationship between antigenic structure and the requirement for thymus-derived cells in the immune response. *J. Exp. Med.* 134 (1), 103–119.
- Fifis, T., Gamvrellis, A., Crimeen-Irwin, B., Pietersz, G.A., Li, J., Mottram, P.L., McKenzie, I.F., Plebanski, M., 2004. Size-dependent immunogenicity: therapeutic and protective properties of nano-vaccines against tumors. *J. Immunol.* 173 (5), 3148–3154.
- Gamvrellis, A., Leong, D., Hanley, J.C., Xiang, S.D., Mottram, P., Plebanski, M., 2004. Vaccines that facilitate antigen entry into dendritic cells. *Immunol. Cell Biol.* 82 (5), 506–516.
- Harper, D.M., Franco, E.L., Wheeler, C., Ferris, D.G., Jenkins, D., Schuid, A., Zahaf, T., Innis, B., Naud, P., De Carvalho, N.S., Roteli-Martins, C.M., Teixeira, J., Blatter, M.M., Korn, A.P., Quint, W., Dubin, G., 2004. Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomised controlled trial. *Lancet* 364 (9447), 1757–1765.
- Houghton, M., Abrignani, S., 2005. Prospects for a vaccine against the hepatitis C virus. *Nature* 436 (7053), 961–966.
- Jegerlehner, A., Tissot, A., Lechner, F., Sebbel, P., Erdmann, I., Kundig, T., Bachi, T., Storni, T., Jennings, G., Pumpens, P., Renner, W.A., Bachmann, M.F., 2002. A molecular assembly system that renders antigens of choice highly repetitive for induction of protective B cell responses. *Vaccine* 20 (25–26), 3104–3112.
- Justewicz, D.M., Doherty, P.C., Webster, R.G., 1995. The B-cell response in lymphoid tissue of mice immunized with various antigenic forms of the influenza virus hemagglutinin. *J. Virol.* 69 (9), 5414–5421.
- Kariko, K., Buckstein, M., Ni, H., Weissman, D., 2005. Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA. *Immunity* 23 (2), 165–175.
- Lechner, S., Rispeter, K., Meisel, H., Kraas, W., Jung, G., Roggendorf, M., Zibert, A., 1998. Antibodies directed to envelope proteins of hepatitis C virus outside of hypervariable region 1. *Virology* 243 (2), 313–321.
- Leclerc, D., Burri, L., Kajava, A.V., Mougéot, J.L., Hess, D., Lustig, A., Kleemann, G., Hohn, T., 1998. The open reading frame III product of cauliflower mosaic virus forms a tetramer through a N-terminal coiled-coil. *J. Biol. Chem.* 273 (44), 29015–29021.
- Leclerc, D., Beauseigle, D., Denis, J., Morin, H., Pare, C., Lamarre, A., Lapointe, R., in press. Proteasome-independent MHC class I cross-

- presentation mediated by papaya mosaic virus-like particles leads to the expansion of specific human T cells. *J Virol.* (in press online)
- Lecours, K., Tremblay, M.H., Gagne, M.E., Gagne, S.M., Leclerc, D., 2005. Purification and biochemical characterization of a monomeric form of papaya mosaic potexvirus coat protein. *Protein Expr. Purif.*
- Lenz, P., Thompson, C.D., Day, P.M., Bacot, S.M., Lowy, D.R., Schiller, J.T., 2003. Interaction of papillomavirus virus-like particles with human myeloid antigen-presenting cells. *Clin. Immunol.* 106 (3), 231–237.
- Loor, F., 1967. Comparative immunogenicities of tobacco mosaic virus, protein subunits, and reaggregated protein subunits. *Virology* 33 (2), 215–220.
- Marusic, C., Rizza, P., Lattanzi, L., Mancini, C., Spada, M., Belardelli, F., Benvenuto, E., Capone, I., 2001. Chimeric plant virus particles as immunogens for inducing murine and human immune responses against human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 75 (18), 8434–8439.
- McInerney, T.L., Brennan, F.R., Jones, T.D., Dimmock, N.J., 1999. Analysis of the ability of five adjuvants to enhance immune responses to a chimeric plant virus displaying an HIV-1 peptide. *Vaccine* 17 (11–12), 1359–1368.
- Milich, D.R., McLachlan, A., 1986. The nucleocapsid of hepatitis B virus is both a T-cell-independent and a T-cell-dependent antigen. *Science* 234 (4782), 1398–1401.
- Milich, D.R., Chen, M., Schodel, F., Peterson, D.L., Jones, J.E., Hughes, J.L., 1997. Role of B cells in antigen presentation of the hepatitis B core. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94 (26), 14648–14653.
- Mond, J.J., Lees, A., Snapper, C.M., 1995. T cell-independent antigens type 2. *Annu. Rev. Immunol.* 13, 655–692.
- Nattermann, J., Schneiders, A.M., Leifeld, L., Langhans, B., Schulz, M., Inchauspe, G., Matz, B., Brackmann, H.H., Houghton, M., Sauerbruch, T., Spengler, U., 2005. Serum antibodies against the hepatitis C virus E2 protein mediate antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC). *J. Hepatol.* 42 (4), 499–504.
- Noad, R., Roy, P., 2003. Virus-like particles as immunogens. *Trends Microbiol.* 11 (9), 438–444.
- Piazzolla, G., Nuzzaci, M., Tortorella, C., Panella, E., Natilla, A., Boscia, D., De Stradis, A., Piazzolla, P., Antonaci, S., 2005. Immunogenic properties of a chimeric plant virus expressing a hepatitis C virus (HCV)-derived epitope: new prospects for an HCV vaccine. *J. Clin. Immunol.* 25 (2), 142–152.
- Ruedl, C., Storni, T., Lechner, F., Bachi, T., Bachmann, M.F., 2002. Cross-presentation of virus-like particles by skin-derived CD8(–) dendritic cells: a dispensable role for TAP. *Eur. J. Immunol.* 32 (3), 818–825.
- Saini, M., Vrati, S., 2003. A Japanese encephalitis virus peptide present on Johnson grass mosaic virus-like particles induces virus-neutralizing antibodies and protects mice against lethal challenge. *J. Virol.* 77 (6), 3487–3494.
- Streatfield, S.J., Howard, J.A., 2003. Plant-based vaccines. *Int. J. Parasitol.* 33 (5–6), 479–493.
- Sugiyama, T., Gursel, M., Takeshita, F., Coban, C., Conover, J., Kaisho, T., Akira, S., Klinman, D.M., Ishii, K.J., 2005. CpG RNA: identification of novel single-stranded RNA that stimulates human CD14+CD11c+ monocytes. *J. Immunol.* 174 (4), 2273–2279.
- Tremblay, M.H., Majeau, N., Gagne, M.E., Lecours, K., Morin, H., Duvignaud, J.B., Bolduc, M., Chouinard, N., Pare, C., Gagne, S., Leclerc, D., 2006. Effect of mutations K97A and E128A on RNA binding and self assembly of papaya mosaic potexvirus coat protein. *FEBS J.* 273 (1), 14–25.
- Zinkernagel, R.M., 2003. On natural and artificial vaccinations. *Annu. Rev. Immunol.* 21, 515–546.