



Universidad Austral de Chile

Escuela de Bioquímica

Profesor Patrocinante

Dr. Alexis Kalergis.

Departamento de Genética

Molecular y Microbiología.

Facultad de Ciencias Biológicas

P. Universidad Católica de Chile.

Profesor Co-Patrocinante

Dr. Hugo Folch

Instituto de Inmunología

Facultad de Medicina

Universidad Austral de Chile.

PRODUCCIÓN DE TETRÁMEROS DE pMHC Y SU UTILIZACIÓN EN LA DETECCIÓN DE LINFOCITOS T CD8⁺ ESPECÍFICOS PARA ANTÍGENOS EXPRESADOS POR *Salmonella*.

Tesis de Grado presentada
como parte de los requisitos para
optar al grado de
Licenciado en Bioquímica y título
profesional de *Bioquímico*.

JORGE EUGENIO MORA ALARCÓN

VALDIVIA-CHILE

2005

A mis compañeros del laboratorio del Dr. Kalergis

AGRADECIMIENTOS.

La siguiente tesis fue realizada en el Laboratorio de Inmunogenética Molecular, unidad de Microbiología de la Pontificia Universidad Católica de Chile bajo la dirección del Doctor **Alexis Kalergis**. Quiero agradecer de manera muy afectuosamente a las personas quienes hicieron posible este trabajo. De manera especial van mis agradecimientos al Dr. **Alexis Kalergis** por su apoyo y guía en el difícil camino de la ciencia. También quisiera agradecer sus innumerables oportunidades para insertarnos activamente en el campo científico, ya sea en manuscritos y participación a congresos.

Quisiera agradecer también a **Jaime Tobar, Pablo Gonzalez y Claudio Figueroa** por su excelente disposición en el laboratorio, compañerismo y sincera amistad.

Debo agradecer también a mis compañeros y amigos de laboratorio, **Mirentxu Iruretagoyena, Leandro Carreño, Alex Sanhueza, Sofía Sepúlveda, Susan Bueno, Andres Herrada y Eric Riquelme** con los cuales he tenido el agrado de conocer y compartir en esta etapa de mi vida. A todos ellos mis mejores deseos de felicidad y éxito.

Agradezco también a la Dra. **María Rosa Bono** por el generoso préstamo de su citómetro de flujo sin el cual realizar esta tesis habría sido prácticamente imposible.

Así mismo le doy las gracias a **Edith Palmieri** y al laboratorio del Dr. **Stanley Nathenson** por sus generosos aportes en reactivos de laboratorio que nos facilitaron desde los E.E.U.U.

No puedo dejar de agradecer a los profesores Dr. **Alejandro Reyes** y al Dr. **Hugo Folch** por sus criterios científicos y gran disposición.

La siguiente tesis no hubiese sido posible sin el financiamiento del proyecto FONDECYT N° 1030557 cuyo título es “Estudio de las interacciones moleculares

necesarias para la sinapsis inmunológica entre la célula dendrítica y el linfocito T: Implicaciones en la inmunidad anti-bacteriana”, y del proyecto FONDAP N° 13980001 y del proyecto DIPUC N°XXXX.

En el transcurso de ésta tesis de pregrado el alumno tesista participó en las siguientes publicaciones científicas:

1. Pablo A. González, Leandro J. Carreño, Jorge E. Mora, Edith Palmieri, Stanley G. Nathenson and Alexis M. Kalergis. 2004. Optimal TCR:pMHC dwell time for T cell activation depends on antigen density. *Proceedings of the national academy of sciences*.
2. Jaime A. Tobar, Leandro J Carreño, Jorge E. Mora Susan M. Bueno, Pablo A. González, Sergio A. Quezada and Alexis M. Kalergis. 2005 Salmonella Pathogenicity Island-2 is required to evade presentation of bacterial antigens by dendritic cells. *Manuscrito en preparación*.

INDICE DE CONTENIDOS	pág.
ACTA DEL COMITÉ DE EVALUACIÓN.	
DEDICATORIA.	
AGRADECIMIENTOS.	
FINANCIAMIENTO Y PUBLICACIONES	
ÍNDICE DE MATERIAS	
ÍNDICE DE FIGURAS	
ABREVIATURAS.	
1. RESUMEN.	1
1.1. ABSTRACT.	2
2. INTRODUCCIÓN.	3
2.1. Interacción TCR:pMHC.	6
2.2. Activación del linfocito T.	8
2.3. Células dendríticas y su rol en el sistema inmune.	9
2.4. Detección de linfocitos antígeno-específicos mediante tetrameros de pMHC.	11
2.5. Hipótesis de trabajo.	16
3. MATERIALES Y MÉTODOS	17
3.1. Equipos.	17
3.2. Líneas celulares.	18
3.3. Soluciones y reactivos de cultivo celular.	19
3.4. Anticuerpos.	19
3.5. <i>Kits</i> comerciales.	19

3.6. Tampones y soluciones.	19
3.7. Animales.	21
3.8. Material plástico, péptidos, químicos, enzimas y otros.	21
3.9. Líneas celulares T y condiciones de cultivo.	22
3.10. Análisis de expresión de proteínas de superficie por citometría de flujo.	23
3.11. Obtención de complejos Cys-K ^b /SIINFEKL solubles.	23
3.12. Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).	25
3.13. Evaluación de la conformación de los complejos Cys-H-2K ^b /SIINFEKL solubles biotinilados.	25
3.14. Inmunoprecipitación de los complejos Cys-H-2K ^b /SIINFEKL.	25
3.15. Tetramerización de los complejos Cys-H-2K ^b /SIINFEKL.	27
3.16. Análisis funcional de los tetrámeros de pMHC con péptido antigénico derivado de OVA mediante TCR expresado en hibridomas.	27
3.17. Análisis funcional de los tetrámeros de H-2K ^b /SIINFEKL mediante TCRs en linfocitos T de ratón transgénico OT-I.	28
3.18. Determinación de concentración proteica en soluciones mediante <i>kit BCA</i> .	28
3.19. Crecimiento de cepas atenuadas de <i>S. Typhimurium aroA</i> y generación de complejos inmunes.	28
3.20. Western blot para determinar la expresión proteína recombinante ovalbúmina en cepas atenuadas de <i>Salmonella typhimurium</i> .	29
3.21. Infección con bacteria atenuada libre y bacteria atenuada en forma de complejos inmunes en ratones C57/BL6.	29
3.22. Medición del título de anticuerpo IgG específico para ovalbúmina.	30

3.23. Extracción de ganglios linfáticos de ratones OT-I y tinción de células con CFSE para experimentos de transferencia adoptiva.	30
3.24. Transferencia adoptiva de linfocitos T OT-I e inoculación de <i>S. Typhimurium aroA</i> .	31
3.25. Proliferación de linfocitos T OT-I en ratones tratados con <i>S. Typhimurium aroA</i>	31
3.26. Software de análisis.	32
4. RESULTADOS.	33
4.1. Obtención de proteínas Cys-H-2K ^b y β 2m recombinantes para la producción de complejos Cys-H-2K ^b /SIINFEKL solubles.	33
4.2. Obtención de complejos Cys-H-2K ^b /OVA solubles.	33
4.3. Confirmación de la formación de los complejos Cys-H-2K ^b /SIINFEKL por inmunoprecipitación.	34
4.4. Evaluación de la conformación y biotilación de los complejos Cys-H-2K ^b /SIINFEKL solubles obtenidos.	37
4.5. Tetrámerización de los complejos Cys-H-2K ^b /OVA.	39
4.6. Tetrámeros de complejos Cys-H-2K ^b /OVA reconocen específicamente linfocitos T CD8 ⁺ .	43
4.7. Detección de la expresión de proteína recombinante ovoalbúmina por Western blot en cepas atenuadas de <i>Salmonella typhimurium</i> .	45
4.8. Activación de linfocitos T CD8 ⁺ antígeno-específico en respuesta a infección por cepas atenuadas de <i>S. typhimurium</i> que expresa ovoalbúmina recombinante.	48
4.9. Respuesta humoral ante infección por <i>Salmonella typhimurium aroA</i> .	50
4.10. Proliferación de linfocitos T CD8 ⁺ por Transferencia adoptiva.	53

5. DISCUSIÓN.	59
5.1. La tetramerización de los complejos Cys-H-2K ^b /SIINFEKL depende del residuo de cisteína libre en el extremo carboxilo terminal de la molécula de Cys- H-2K ^b .	59
5.2. Tetrámeros de Cys-H-2K ^b /SIINFEKL y su unión a TCRs específicos.	61
5.3. Detección de linfocitos T antígeno-específicos tras infección con cepas atenuadas de <i>Salmonella Typhimurium</i> mediante tetrámeros de pMHC.	62
5.4. Detección de la proliferación de linfocitos T <i>in vivo</i> , inducida por cepas atenuadas de <i>Salmonella typhimurium</i> .	66
5.5. Aplicaciones clínicas de los tetrámeros de pMHC.	67
6. CONCLUSIONES.	71
7. BIBLIOGRAFÍA.	72

INDICE DE FIGURAS.

Figura 1	Interacción molecular entre el receptor del linfocito T y el complejo pMHC	4
Figura 2	Estructura y función del receptor del linfocito T.....	7
Figura 3	Representación esquemática de la formación de una molécula de tetramero de pMHC.	12
Figura 4	Detección de linfocitos T antígeno-específico mediante tetrameros de pMHC.	15
Figura 5	Obtención de Cuerpos de inclusión de H-2K ^b y β2m para la formación de complejos Cys-H-2K ^b /SIINFEKL.....	35
Figura 6	Purificación de los complejos Cys-H-2K ^b por cromatografía de exclusión molecular.	36
Figura 7	Análisis conformacional de los complejos péptido/MHC por inmunoprecipitación.	38
Figura 8	Diseño de tetrameros pMHC	40
Figura 9	Determinación de biotinización y estado conformacional de los Complejos biot-Cys-H-2K ^b	41
Figura 10	Purificación de tetrameros de complejos Cys-H-2K ^b /SIINFEKL.	44
Figura 11	Reconocimiento específico de linfocitos T CD8 ⁺ por tetrameros de pMHC/SIINFEKL.....	46

Figura 12	Expresión de ovoalbúmina recombinante en cepas de <i>Salmonella Typhimurium</i>	49
Figura 13	Detección de linfocitos T citotóxicos específicos para péptido OVA después de cuatro días de inmunización con <i>S. Typhimurium</i> AroA que expresa ovalbúmina recombinante.	51
Figura 14	Respuesta humoral contra ova en ratones inmunizados con <i>Salmonella Typhimurium aroA</i> recombinante para ovalbúmina.	54
Figura 15	Ensayo de proliferación de linfocitos T OT-I por transferencia adoptiva.	56
Figura 16	Análisis de linfocitos T teñidos con CFSE por citometría de flujo.	57
Figura 17	Proliferación de linfocitos T OT-I tras infección con <i>Salmonella Typhimurium</i>	58
Figura 18	Unión de tetrámeros de pMHC al receptor del linfocito T.	69

ABREVIATURAS.

APC	:	Célula presentadora de antígeno
DC	:	Célula dendrítica
TCR	:	Receptor de linfocito T
MHC	:	Complejo mayor de histocompatibilidad
OVA_p	:	péptido correspondiente a los residuos aminoácidos 257-264 (SIINFEKL) de la proteína del huevo de pollo ovoalbúmina.
VSV_p	:	péptido correspondiente a los residuos 52-59 de la nucleocápside del virus de de la estomatitis vesicular (secuencia aminoácidica: RGYVYQGL)
pMHC	:	Complejo entre un péptido y una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad
TCR:pMHC	:	Interacción entre el TCR en el linfocito T y el complejo pMHC en la célula presentadora de antígeno
CDR	:	Región determinante de la complementaridad
β2m	:	β2 microglobulina
Cys-H-2K^b/OVA soluble	:	Trímero Cys-H-2K ^b /β2m/SIINFEKL (complejo pMHC recombinante)
FBS	:	Suero fetal de bovino
SDS-PAGE	:	Gel de poliacrilamida para electroforesis-SDS

HAT	:	Medio selectivo para células eucariontes con hipoxantina, aminopterina y timidina
PE	:	Ficoeritrina
FITC	:	Isotiocianato de fluoresceína
CTLs	:	Linfocitos T citolíticos

1. RESUMEN

La generación de una respuesta inmune eficiente contra patógenos bacterianos requiere la activación de linfocitos T específicos contra antígenos bacterianos. Los linfocitos T citotóxicos reconocen péptidos de 8-10 aminoácidos presentados en las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (complejos pMHC) en la superficie de células presentadoras de antígeno (APC). Esta interacción, de ser específica, conduce a la activación y proliferación de linfocitos T, los cuales pueden ser capaces de eliminar al patógeno. Por ello, la detección de estas células antígeno-específicas resulta relevante pues permite cuantificar la respuesta inmune inducida por un antígeno. Sin embargo, las técnicas convencionales de análisis no son apropiadas para la detección de los linfocitos T y por ello resulta necesario el uso de técnicas específicas como lo son los tetrámeros de pMHC. Los tetrámeros de pMHC corresponden a moléculas solubles formadas por la unión de cuatro moléculas recombinantes de pMHC a una molécula de estreptoavidina. Estas moléculas permiten la detección con alta sensibilidad de múltiples clones de linfocitos T capaces de reconocer un mismo antígeno. En el presente trabajo evaluamos mediante tetrámeros de pMHC, la capacidad que poseen las APCs de inducir la expansión de linfocitos T específicos para antígenos peptídicos derivados de un patógeno bacteriano a linfocitos T. Además, hemos evaluado si la internalización de antígenos bacterianos en forma de complejos inmunes vía receptores Fc γ en la superficie de las APCs puede mejorar la eficiencia de activación de linfocitos T citotóxicos.

1.1. ABSTRACT

An appropriate immune response against bacterial pathogens requires an efficient presentation of bacteria-derived antigens to T cells. Cytotoxic T cells recognize antigens as 8-10 aminoacid long peptides bound to Major Histocompatibility Complex (MHC) class I molecules on the surface of antigen presenting cells (APC). When encountering bacteria-specific antigens, T cells proliferate and activate, which usually correlates with an adequate immune response and pathogen eradication. This is why detection of these antigen-specific T cells is fundamental. However conventional antigen-specific T cell detection techniques are not appropriate, and the development of antigen-specific detection techniques, such as pMHC tetramers are critical to study T cells. Soluble pMHC tetrameric molecules are composed of four soluble recombinant pMHC molecules, bound to one streptavidin molecule. These molecules provide an excellent tool for sensitive recognition of multiple T cell clones that recognize the same pMHC antigen. In this work we use pMHC tetramers to evaluate the capacity of APCs to present bacteria-derived antigenic peptides and induce the expansion of bacteria-specific T cells. In addition we assessed whether internalization of bacterial antigens as immune complexes by Fc γ R_s expressed by APCs can enhance expansion of bacteria-specific T cells.

2. INTRODUCCION

El sistema inmune posee la extraordinaria capacidad de reconocer y eliminar una enorme diversidad de microorganismos que potencialmente podrían ser deletéreos para el organismo. El reconocimiento de estas moléculas ajenas al organismo (antígenos) es realizado de manera altamente sensible y específica, y constituye un mecanismo activo de vigilancia para proteger los tejidos del hospedero.

El sistema inmune puede ser dividido en dos componentes principales. El primero es la inmunidad innata (inespecífica), que consiste en una respuesta inmune inmediata y está dirigida hacia una gran diversidad de agentes patógenos reconociendo moléculas antigénicas altamente conservadas entre estos organismos, denominadas como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPS) (Carroll, 1998, Beutler, 2003, Beutler 2004, Netea y cols., 2004). Por otro lado, la respuesta inmune adquirida (adaptativa o específica), suministra una respuesta específica frente a cada agente infeccioso y tiene la capacidad de generar una memoria inmunológica específica, necesaria para enfrentar de forma mas rápida y efectiva una segunda infección por el mismo agente infeccioso.

Para la activación de la respuesta inmune mediada por linfocitos T es necesario que los antígenos sean presentados en un contexto adecuado. Para esta función existe en el sistema inmune células que poseen la capacidad de procesar antígenos y activar a linfocitos T, denominadas células presentadoras de antígeno (APC). Dentro del grupo de APC, las que poseen la mejor capacidad de activar linfocitos T son las células dendríticas (DC). Estas células están en la interfase de la respuesta inmune innata y adquirida, y poseen una alta capacidad de capturar, procesar y presentar antígenos. Las células dendríticas (DCs) presentan antígenos foráneos en su superficie en forma de complejos péptidos-MHC (pMHC) con péptidos de 8-20 aminoácido

Figura 1

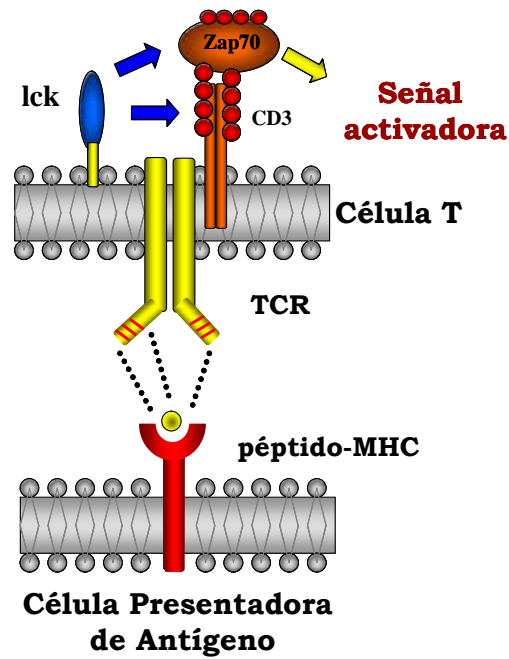


Figura 1. Interacción molecular entre el receptor del linfocito T y el complejo pMHC.

La figura representa la estructura cristalina del complejo molecular TCR-pMHC en la interfase entre el linfocito T y la célula presentadora de antígeno.

anclados en el surco de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). El MHC es un locus de genes presente en todos los mamíferos y resulta poligénico, codominante y polimórfico. Las moléculas codificadas por estos genes juegan un rol central en el reconocimiento de antígenos peptídicos por parte de linfocitos T, ya que constituye el ligando del receptor de la célula T (TCR) (Figura 1). En el humano, los genes que codifican para el sistema del MHC se encuentran localizados en el cromosoma 6 y reciben en su conjunto el nombre de HLA. En el ratón estos genes se encuentran ubicados en el cromosoma 17 y se denominan H-2 .

En una respuesta inmune adquirida contra patógenos intracelulares y/o células tumorales los linfocitos T juegan un rol fundamental en la orquestación y ejecución final para la eliminación del patógeno, así como en la prevención de tumores (Svane y cols.,1999, Mc Sorley y Jenkins., 2000). Esto queda demostrado por la alta susceptibilidad a infección y de crecimiento tumoral en personas o animales deficientes en linfocitos T (Svane y cols.,1999, Mc Sorley y Jenkins., 2000). La especificidad entre el TCR y el complejo pMHC presente en la superficie de la DC es fundamental para asegurar una respuesta dirigida contra antígenos exógenos y no contra antígenos propios. Una vez reconocido un ligando por el TCR, el linfocito T es activado y prolifera generando una población de linfocitos T derivados de un clon antígeno-específico. Esta interacción inicial específica entre el TCR y el pMHC gatilla una compleja cascada de señalización intracelular, en la que tienen esencial participación una serie de fosfatasas y quinasas, como Lck y ZAP 70, las que mediante su actividad tirosinaquinásica, activan mediante fosforilación secuencial a la fosfolipasa C (PLC γ 1), que conlleva a un aumento intracelular en el Ca²⁺, que culmina finalmente con la activación de diversos genes, generando la activación y subsecuente proliferación del linfocito T (Figura 1). La detección de linfocitos T antígeno-específicos resulta interesante pues permite evaluar la generación de una población lifocitaria que

responde específicamente ante un determinado antígeno, lo que puede ser reflejo de una respuesta inmune de tipo celular. Sin embargo la detección de estos linfocitos T no resulta factible mediante el uso de anticuerpos monoclonales y es necesario el uso de tetrámeros de pMHC. Los tetrámeros son moléculas solubles formadas por la unión de cuatro pMHC idénticos a una molécula de estreptavidina. Este reactivo permite la detección específica de linfocitos T para un péptido antigénico en particular anclado en el surco de moléculas del MHC, aportando valiosa información tanto cualitativa como cuantitativa de linfocitos T antígeno-específico *in vivo*.

2.1. Interacción TCR:pMHC.

El TCR es una proteína de membrana heterodimérica formada por dos cadenas polipeptídicas distintas pertenecientes a la superfamilia de inmunoglobulinas. Posee una cadena α y una cadena β unidas entre sí por puentes disulfuros (Figura 2). Cada cadena consta de un dominio amino-terminal variable ($V\alpha$, $V\beta$) que contiene el sitio de unión al ligando pMHC y un dominio carboxilo-terminal constante ($C\alpha$, $C\beta$). Así como los genes $V\alpha$ $J\alpha$ recombinan para generar la cadena variable α , los genes $V\beta$, $D\beta$ y $J\beta$ recombinan para la cadena variable β (Sebzda y cols.,1999, van der Merwe and Davis.,2003). En cada dominio variable existen tres regiones hipervariables que también reciben el nombre de regiones determinantes de complementaridad (CDR1, 2 y 3). Mientras la diversidad de las regiones CDR1 y CDR2 está limitado por el número de genes para $V\alpha$ o $V\beta$, la diversidad de las regiones CDR3 procede de procesos de recombinación somática que ocurren durante el desarrollo de cada linfocito T (Davis y Bjorkman 1988). Según estas reorganizaciones se ha calculado que el número de posibles combinaciones en la estructura del TCR, podría alcanzar a ser alrededor de 10^{15} , lo que proporcionaría un repertorio suficientemente amplio de receptores para reconocer un vasto

Figura 2

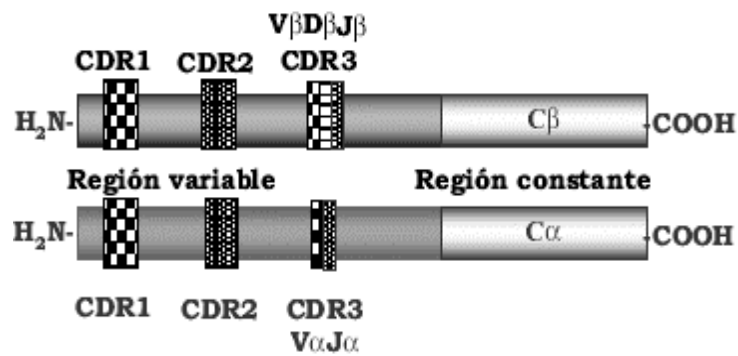


Figura 2. Estructura y función del receptor del linfocito T (TCR). El TCR es una proteína heterodimérica compuesta por una cadena α y β , dividida en una región constante y una región variable, siendo esta última la que contiene las tres regiones hipervariables y que definen el sitio de unión al ligando.

universo de antígenos presentes en la naturaleza. El TCR se asocia de forma no covalente con moléculas accesorias especializadas en la transducción de señales intracelulares necesarias para la activación del linfocito T. El complejo CD3 del linfocito T está compuesto de cuatro tipos de cadenas polipeptídicas que se asocian de dos en dos, formando tres clases de dímeros ($\gamma\xi$, $\delta\xi$, $\xi\xi$) (Chen y Davis.,1993, Eisen y cols.,1996 .,Kalergis y Nathenson 2000). Si bien estas moléculas participan en la transducción de señales del TCR hacia el intracelular, estas moléculas no interactúan con el ligando pMHC.

2.2. Activación del linfocito T.

Para que un linfocito T reconozca un antígeno a través de su TCR y por tanto se active, es necesario que un complejo pMHC antigénico sea presentado en la superficie de la célula blanco a un TCR. Existen dos tipos de moléculas “clásicas” del complejo mayor de histocompatibilidad involucradas en la activación de linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ respectivamente. Las moléculas MHC clase I constan de dos cadenas polipeptídicas, una pesada polimórfica de aproximadamente 45 kDa, y una cadena liviana de unos 12 kDa beta-2-microglobulina ($\beta 2m$), codificada por un gen que no pertenece al locus MHC. Las moléculas de MHC clase I se presentan en la superficie de todas las células nucleadas del organismo y unen péptidos de 8-10 aminoácidos que provienen en general de proteínas intracelulares provenientes del metabolismo propio, péptidos derivados de patógenos o parásitos intracelulares, así como antígenos tumorales. De forma específica, los complejos pMHC de clase I son generalmente reconocidos por linfocitos T que presentan el marcador CD8⁺ en su superficie. Por otro lado, las moléculas de MHC clase II se presentan sólo en la superficie de APCs, y a diferencia del MHC de clase I unen péptidos de aproximadamente

20 aminoácidos derivados generalmente de antígenos exógenos. Estas moléculas están formadas por dos cadenas polipeptídicas, una cadena α y otra cadena β , que se asocian entre sí de forma no covalente. Los complejos pMHC de clase II son normalmente reconocidos por linfocitos T que presentan el marcador $CD4^+$ en su superficie denominados ayudadores.

El reconocimiento del complejo peptido-MHC por parte del TCR del linfocito T, genera el proceso de activación, en donde se induce la proliferación del linfocito T y la expresión de funciones efectoras como secreción de citoquinas (linfocitos T $CD4^+$) o actividad citotóxica (linfocitos T $CD8^+$).

Recientemente se ha demostrado que para la activación de un linfocito T la interacción entre el complejo TCR:pMHC debe estar dentro de un rango específico de vidas medias. La vida media de estas interacciones han sido determinadas mediante el uso de tetrámeros marcados fluorescentemente (Kersh y cols.,1998, Grakoui y cols.,1999, Kalergis y col.,2001) y por resonancia de plasmón superficial (Holler y cols, 2001). Se ha determinado que interacciones de afinidad muy baja o muy altas no permiten la activación del linfocito T. Esta característica permite al sistema inmune seleccionar una población T tanto por su especificidad como por sus propiedades de unión al antígeno, presentado en el contexto de moléculas de MHC.

2.3. Células dendríticas y su rol en el sistema inmune.

Un elemento clave en la iniciación de la respuesta inmune es el reconocimiento de antígenos peptídicos asociados a moléculas de MHC en la superficie de células presentadoras de antígeno (APC) por parte de linfocitos T. Sin embargo la presentación antigénica por sí misma no es suficiente para la estimulación y subsecuente activación del linfocito T vírgen (Steinman y cols 1978, 1980, 1983). Para que ésto ocurra es necesario una segunda señal proveniente de

moléculas coestimuladoras, la cual es independiente de antígeno. La expresión de estas moléculas coestimuladoras está notablemente aumentada en un tipo especial de célula presentadora de antígeno, denominadas células dendríticas (DC), razón por la cual son consideradas como las células más potentes del sistema inmune y únicas con la capacidad de activar linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ vírgenes. Las DC pueden encontrarse en dos estados fisiológicos y que son diametralmente opuestos. En el estado inmaduro estas células presentan una gran capacidad fagocítica, pero baja densidad de moléculas coestimuladoras en su superficie. Sin embargo cuando la DC reconoce a un agente patogénico, como puede ser una bacteria a través de receptores específicos en su membrana celular, ésta sufre un proceso denominado maduración, en el cual disminuye su capacidad fagocítica, aumentando significativamente la densidad de moléculas coestimuladoras, con la cual aumenta notablemente su capacidad para activar linfocitos T. Sin embargo muchos patógenos desarrollan mecanismos para evadir la respuesta inmune evitando que sus antígenos sean presentados sobre la superficie de células dendríticas, interfiriendo de este modo con la captura, procesamiento o la presentación de sus antígenos, favoreciendo la patogenicidad de los agentes infecciosos (van Kooyk y Geijtenbeek, 2003). No obstante es posible potenciar la eficiencia de la presentación de antígenos en moléculas de MHC en la célula dendrítica. Esto se consigue direccionando antígenos en forma de complejos inmunes (IC) a receptores Fcγ sobre la superficie de las DC, aumentando de este modo la captura de antígenos (Mellman y Steinman., 2003, Bonifaz y cols., 2002, Kalergis y Ravetch., 2002).

En nuestro laboratorio, recientemente hemos demostrado que *Salmonella enterica* serovar typhimurium 14028s posee la capacidad de evadir la presentación de sus antígenos *in vitro* en células dendríticas de ratón, evitando que sus antígenos sean presentados en MHC I y MHC II. Sin embargo cuando este patógeno es cubierto con IgG anti- *Salmonella* y dirigida a receptores

Fc γ sobre la DC, sus antígenos son efectivamente presentados en moléculas de MHC, desencadenando una poderosa activación de hibridomas T antígeno específicos (Tobar y cols., 2004).

2.4. Detección de linfocitos antígeno-específicos mediante tetrámeros de pMHC.

Debido a la baja afinidad intrínseca que existe para la interacción entre el TCR y el pMHC ($K_d \sim 10^{-5}$ - 10^{-6} M), resulta muy difícil el estudio y análisis de linfocitos T específicos para un antígeno en particular utilizando complejos pMHC monoméricos (Eisen y cols.,1996, Davis y cols.,1998 y Kalergis y cols.,1999). Esta baja afinidad trae consigo cinéticas rápidas de asociación y disociación entre estos ligandos monoméricos para un TCR específico, haciendo muy dificultoso su análisis, puesto que el tiempo de unión TCR:pMHC es demasiado corto como para ser detectado (Mc Michael y O'Calaghan.,1998,y Kalergis Nathenson.,2000). Con el fin de superar el problema de la rápida disociación de la interacción TCR:pMHC, se ha desarrollado una técnica que consiste en la multimerización de estas moléculas de pMHC monoméricos, resultando de este modo un aumento en la avidéz de la interacción TCR:pMHC y aumentando por tanto su estabilidad; permitiendo una unión más prolongada entre el complejo pMHC y el TCR en la superficie del linfocito T. La multimerización de los pMHC monoméricos utiliza como soporte a la molécula de estreptoavidina, una proteína de aproximadamente 60 kDa derivada de *Streptomyces avidini* compuesta de cuatro subunidades idénticas, cada una con una afinidad muy alta ($K_d \sim 10^{-13}$ M) por una molécula de biotina, una vitamina bicíclica de bajo peso molecular. Esta extraordinaria afinidad de biotina y estreptoavidina es ampliamente utilizada en biología molecular debido a su notable versatilidad y poca reacción cruzada. La unión de los complejos pMHC a la molécula de estreptoavidina se logra a través de esta molécula de biotina

Figura 3

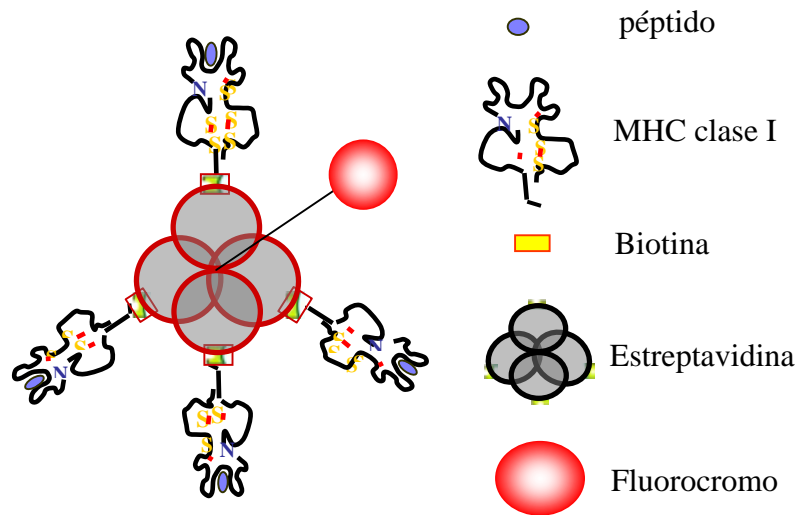


Figura 3. Representación esquemática de la formación de una molécula de tetrámero de pMHC. Los complejos pMHC son obtenidos mediante expresión en bacterias recombinantes, su ensamblaje se realiza por medio de diálisis y su purificación por cromatografía de exclusión molecular. Los complejos pMHC son ensamblados a una molécula de estreptavidina a través de un brazo de biotina en el extremo C-terminal de la cadena pesada del MHC. Las moléculas de estreptavidina pueden ser conjugadas con algún fluoróforo permitiendo que la unión de los tetrámeros pMHC puedan ser monitoriados por citometría de flujo.

incorporada enzimática o químicamente en el extremo carboxilo-terminal de la molécula de MHC (Altman y cols.,1996, Kalergis y cols.,2000). Al estar localizada en el extremo C-terminal de la molécula de MHC, la biotina no interfiere con el sitio de unión al TCR, el cual se encuentra en la región amino – terminal, y tampoco presenta una interferencia estérica, por su bajo peso molecular. Por otra parte, la ubicación de la biotina permite orientar a cada monómero de pMHC en la posición correcta para unirse al TCR. Finalmente los pMHC biotinilados al ser combinados con una molécula de estreptoavidina forman un tetrámero de pMHC. Este tetrámero de pMHC con un péptido antigénico determinado permite una unión más estable con un linfocito T específico para este péptido (Figura 3). Debido a que la molécula de estreptoavidina puede ser conjugada con un fluoróforo, la unión de los tetrámeros pMHC a los linfocitos T puede ser monitoreada por técnicas de citometría de flujo, convirtiendo de esta manera a los tetrámeros pMHC en una herramienta altamente sensible y valiosa para el estudio de las interacciones moleculares entre el linfocito T y células presentadoras de antígeno (Figura 4). Los tetrámeros de pMHC son también una herramienta de última generación en el área del diagnóstico clínico, permitiendo evaluar el comportamiento de linfocitos T en pacientes con patologías infecciosas y autoinmunes, así como en el seguimiento de pacientes en respuesta a vacunas tumorales, donde un aumento en la población de linfocitos T, puede relacionarse un pronóstico positivo para el paciente.

En el presente trabajo de tesis describiremos los pasos para la generación de las moléculas de pMHC tetraméricas de clase I, desde la obtención de las proteínas recombinantes que la conforman, así como su posterior ensamblaje con el péptido antigénico derivado de la proteína del huevo de pollo ovoalbúmina (SIINFEKL), hasta su multimerización en un molécula de estreptoavidina. Luego con esta técnica estudiaremos el comportamiento de poblaciones de

linfocitos T antígeno-específicos (CTL) de ratones en respuesta a una infección con bacteria intracelular recombinante que expresa la proteína del huevo de pollo ovoalbúmina como neo-antígeno. Los avances obtenidos de estos estudios aportarán valiosa información para el entendimiento de la respuesta inmune celular, ya que los conocimientos obtenidos nos permitirían modular una inmunidad anti bacteriana vía linfocitos T.

Figura 4

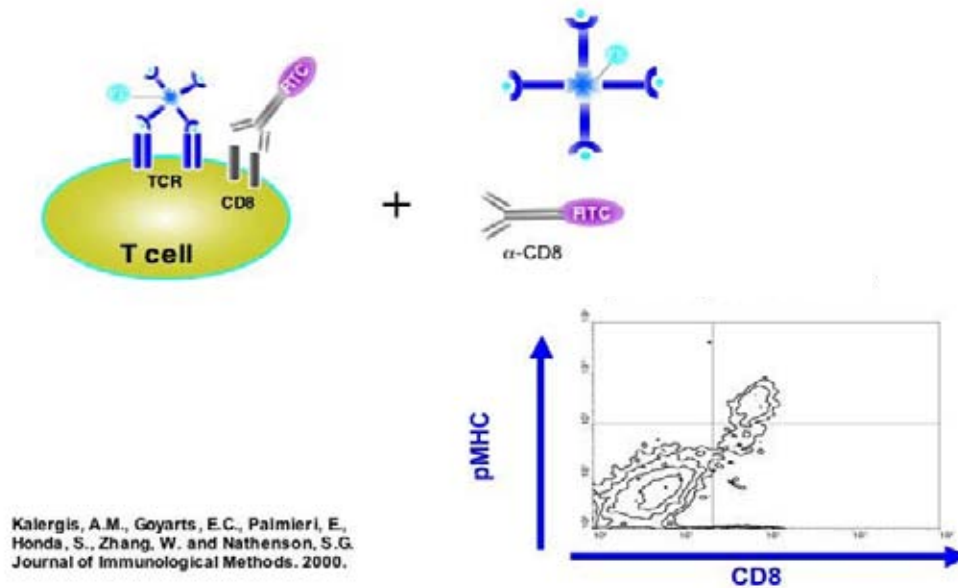


Figura 4. Detección de linfocitos T CD8⁺ antígeno-específicos mediante tetrámeros de pMHC. Para que los tetrámeros de pMHC reconzcan específicamente a linfocitos T, estos necesariamente tiene que presentar en su superficie TCRs específicos para los complejos pMHC presentes en la molécula de tetrámeros. Cuando exista un reconocimiento simultáneo entre un marcador de superficie del linfocito, generalmente un anticuerpo y tetrámeros de pMHC, el análisis citofluorimétrico mostrará una población doble positiva para ambos marcadores en el cuadrante superior derecho, como muestra la figura.

2.5. Hipótesis de trabajo.

Hipótesis. En este trabajo se propone que **la internalización de antígenos bacterianos en forma de complejos inmunes vía receptores Fc γ potencia la respuesta celular anti-bacteriana, la que puede ser monitoreada con tetrámeros de pMHC específicos.**

Objetivo general

Determinar la magnitud de la respuesta específica anti-*Salmonella* en un modelo animal de infección vía receptores Fc γ , evaluando la expansión de la población de linfocitos T CD8⁺ específicos por medio de tetrámeros de MHC.

Objetivos específicos

1. Generación de tetrámeros de pMHC.

- Clonamiento y expresión de recombinantes para H-2K^b y β 2m en *E. coli*.
- Ensamblaje *in vitro* de H-2K^b, β 2m y péptido para la producción de los complejos pMHC y posterior producción de tetrámeros de pMHC.

2. Ensayos *in vivo* para la detección de linfocitos T específicos para antígenos expresados por *Salmonella*.

- Inmunización de ratones con cepas atenuadas de *Salmonella Typhimurium* que expresarán la proteína ovoalbúmina recombinante como neo antígeno bacteriano.
- Detección de linfocitos T CD8⁺ que reconocen específicamente antígenos bacteriano mediante tetrámeros de pMHC como parámetro de la magnitud de la respuesta inmune.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Equipos

- Estufa de cultivo celular Forma Scientific modelo 3110
- Gabinete de bioseguridad SterilGard Hood de The Baker Company
- Microcentrifuga Hereus Christ modelo Biofuge A
- Centrifuga Beckman modelo J2-21
- Microscopio invertido Carl Zeiss modelo ID 02
- Lector de ELISA Thermo Labsystems modelo Multiskan Ex
- Tanque de nitrógeno líquido 35 litros Taylor-Wharton
- Refrigerador -80°C REVCO modelo Ultima II
- Citómetro de flujo BD modelo FACScan
- Agitador Thermo regulado Orbit
- Cámara de electroforesis y electrotransferencia geles marca Bio-Rad modelo Mini Protean II
- Fuente de poder Bio-Rad modelo 200/2.0
- Calentador Lab-Line Instruments
- Baño termorregulado LP/BX
- Medidor de pH Hanna HI 9321PH con electrodo Corning 476086
- Sonicador modelo Vibra Cell de Sonics & Materials
- FPLC Millipore Waters 600
- Columna de cromatografía Tricorn de Pharmacia con resina Superdex G-200 Pharmacia
- Bolsas de diálisis Ester de celulosa poro 500 Da de Fischer
- Concentrador de proteína Millipore Ultrafree-15 10.000 MW

3.2. Líneas celulares.

En este trabajo se utilizaron los hibridomas T, N30.7 y B3Z. La primera línea celular T deriva de la línea celular 58 α - β -, hibridoma T, aislado a partir de un timoma de ratón C3H/An (haplotipo H-2K^k), que no expresa cadenas de TCR funcionales en su superficie (Letourner, 1989). El hibridoma T N30.7 fue transfectado con los genes de las cadenas α y β del TCR N30.7, específico para complejos H-2K^b/VSV asociado al gen de resistencia higromicina (Imarai y cols., 1995). Estas células expresan TCRs en sus linfocitos que reconocen de manera específica el péptido derivado de la nucleocápside del virus de la estomatitis vesicular (VSV₅₂₋₅₉), de secuencia aminoacídica RGYVYQGL. La segunda línea celular posee TCR específico para el péptido derivado de ovoalbúmina, SIINFEKL que reconoce específicamente complejos H-2K^b/OVA.

Para generar complejos Cys-H-2K^b/OVA y Cys-H2K^b/VSV solubles se utilizó la cepa bacteriana *Escherichia coli* BL21(DE3) pLysS transformada con el vector pET3b, que contiene clonado ya sea el cDNA del gen H-2K^b (*E. coli*-cys-K^b) o beta-2-microglobulina (*E. coli*- β 2m) murinos bajo el promotor de la RNA polimerasa T7, enzima cuya expresión es inducible por IPTG en la cepa bacteriana BL21 (DE3) (Zhang y cols., 1992, Kalergis y cols., 2000).

Se utilizó la cepa bacteriana atenuada *Salmonella enterica* Serovar typhimurium *aroA* (*S. typhimurium*). Así mismo se utilizaron las variantes *Salmonella typhimurium aroaA* recombinante para la proteína ovoalbúmina del huevo de pollo clonado en el plásmido pKK233-2 (pKKOVA)(Tobar y cols., 2004),

3.3. Soluciones y reactivos de cultivo celular.

- Azul tripan 0,4 % (Gibco).
- Medio RPMI 1640 (Gibco).
- Suero fetal de bovino-FBS(Hyclone).
- Antibióticos eucariontes: geneticina (G418) (Gibco), higromicina y puromicina (Sigma).
- HAT 50X. (Hipoxantina 0.910 g/L, aminopterina 8.81 mg/L, timidina 193.8 mg/L)
- Medio Luria Bertani (LB) (Mo-bio).
- Antibiótico procarionte: Carbenicilina (Sigma).

3.4. Anticuerpos.

- Monoclonal purificado anti-CD3 ϵ (Pharmlingen, clon 145-2C11)
- Monoclonal anti-TCR β -FITC (Pharmlingen, clon H57)
- Monoclonal anti-CD8 α -FITC (Pharmlingen, clon 53-6.7)
- Monoclonal de conejo anti-H-2K^b (Y3) (ATCC: HB-176)
- Policlonal de cabra anti-IgG de conejo conjugado a fosfatasa alcalina (FisherBiotech)
- Policlonal de conejo anti-*S.typhimurium* Denka-Seiken, Japón.

3.5. Kits comerciales.

- Determinación de concentración de proteínas en solución: BCA Protein Assay de Pierce.

3.6. Tampones y soluciones.

- Solución salina tampón fosfato (PBS) (NaCl 0,14 M, KH₂PO₄ 1,47 mM, Na₂HPO₄ 7,81 mM, KCl 2,68 mM). PH 7.4.

- Tampones para anticuerpos, células y proteínas: PBS, PBS-BSA 1 %, PBS-FBS 1 %, PBS-Tween 20 0.02 %, PBS-azida 0.02 %, PBS-leche descremada 1 %, PBS-Formaldehído 1 %.
- Revelado ELISA-HRP: sustrato de la enzima *Horse Radish Peroxidase* (HRP, peroxidasa de rábano): 3,3',5,5'-tetramethyl-benzidina 0.1 mg/ml en solución tampón citrato 35 mM-fosfato 67 mM pH 5.0 y 10 % DMSO (TMB). La reacción es detenida con 50 μ l H₂SO₄ 2 M y leída en lector de ELISA a 450 nm.
- Revelado quimioluminiscente de Western blot: sustrato para la enzima *peroxidasa* (HRP): Acido cumárico 90mM, 3-aminophtalhydrazide Luminol 250mM, Tris 100mM pH 8,5, H₂O₂ 30% (3 μ l en 10 ml solución).
- Tampón para resolver geles SDS-PAGE: Tris 125 mM, glicina 50 mM, SDS 0.1 %, pH 8.3.
- Tampón para transferencia de proteínas: Tris 125 mM, glicina 50 mM, SDS 0.1 %, metanol 20 %, pH 8.3.
- Solución activadora de placa de ELISA: tampón bicarbonato H₂CO₃ 0.1 M pH 8.4.
- Solución de diálisis 20 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, pH 8.0.
- Solución de lisis de bacterias (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 23 % sucrosa, 1 mM EDTA).

- Solución de tñido de geles de poliacrilamida 50 % metanol, 10 % ácido acético, 40 % H₂O, 0.1 % azul de Coomassie.
- Solución de desteñido de geles 50 % metanol, 10 % ácido acético, 40 % H₂O.
- Solución ACK de Lisis de Glóbulos Rojos (Cloruro de amonio 0.17 M, Bicarbonato de potasio 10 mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.2).

3.7. Animales.

Los ratones C57BL/6 y C57BL/6 OT-I (este último transgénico), utilizados en los experimentos con *S. typhimurium* fueron obtenidos del bioterio del Departamento de Inmunología a través de la colaboración con el laboratorio del Dr. Jeffrey Ravetch de la Universidad de Rockefeller, Nueva-York, USA . Ratones transgénicos OT-I poseen sólo linfocitos T CD8⁺ que expresan las cadenas del TCR (V α 2-V β 5) capaz de reconocer de manera específica el péptido de secuencia aminoacídica SIINFEKL derivado de la proteína ovoalbúmina de pollo presentado en el contexto de MHC clase I H-2K^b (Clarke y cols., 2000)

3.8. Material plástico, péptidos, químicos, enzimas y otros.

Placas de ELISA (BD, Falcon), péptido OVA (secuencia amonoácídica SIINFEKL) obtenido mediante química Fmoc en un sintetizador automatizado de péptidos 433A (Applied Biosystems, Foster City, CA) en las instalaciones de síntesis peptídica del Albert Einstein College of Medicine, Nueva York, USA. Los péptidos fueron purificados hasta > 98 % homogeneidad por HPLC de fase reversa en una columna Vydac C-18 (2.1 or 4.6 mm x 25 cm,

300 Å) utilizando un HP-1090M HPLC (Hewlett Packard). La identidad del péptido purificado fue determinada por espectroscopía de masa cuadruple (TSQ700, Finnigan MAT, San Jose, CA). Otros reactivos, estreptavidina-peroxidasa de rábano (SAv-HRP, Pharmingen, cat N° 554066), estreptavidina (ImmunoPure, Pierce, cat N° 21125), tampón de carga de proteínas (BioRad, cat N° 161-0737), N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (Temed, Winkler Ltda, cat N° BM-1970), persulfato de amonio (SIGMA, cat N° A-3678), membrana de nitrocelulosa (BioRad, cat N° 1620112), estándar de peso molecular pre-teñido para proteínas (Winkler Ltda., cat N° SM-0431.), estándar de peso molucular teñido (Winkler Ltda., cat N° BM-1110), isopropyl β-D-tiogalactopiranosido (IPTG, SIGMA, cat N° I-9003), DNAsa (Roche, cat N° 104159), RNAsa (Boehringer, cat N° 109169), urea (Merck, cat N° K-31077287), BMCC-biotina (Pierce, cat N° 21900), carboxi-fluoresceína diacetato, succinimidil ester (CFSE, Molecular Probes, cat N° C-34554), Heparina (Bestpharma, cat N° B-1392/01), Proteína A insolubilizada a sefarosa (SIGMA, cat N° P-9424), Triton X-100 (SIGMA, cat N° T-6878).

3.9. Líneas celulares T y condiciones de cultivo.

Los hibridomas T que expresan uno de los siguientes TCRs: N30.7 y B3Z fueron cultivados en placas de Petri de 6 cm de diámetro, en medio RPMI 5 % FBS, glutamina 2 mM. A la línea celular N30.7 se agregó además la combinación de antibióticos G418 50 µg/ml e higromicina 500 µg/ml. Las células fueron mantenidas en crecimiento exponencial, aproximadamente 5×10^5 células/ml, en estufa de cultivo celular 37 °C con atmósfera 5 % CO₂ y 100 % humedad.

3.10. Análisis de expresión de proteínas de superficie por citometría de flujo.

Aproximadamente 3×10^5 células fueron teñidas con 200 ng de anticuerpo monoclonal específico para la proteína de superficie de interés y conjugado a un fluorocromo en medio RPMI 5 % FBS por 45 min. en hielo. Posteriormente las muestras fueron lavadas 2 veces con PBS-FBS 1 % y centrifugadas en micro-centrífuga a 1600 rpm por 6 min. Finalmente las células fueron resuspendidas en 200 μ l de PBS-formaldehído 1 % y analizadas en un citómetro de flujo.

3.11. Obtención de complejos Cys-K^b/SIINFEKL solubles.

Para la obtención de complejos Cys-K^b/OVA solubles se procedió según el protocolo establecido por Kalergis y cols. (2000). Para ello se cultivaron, en botellas separadas, inóculos de *E. coli*-Cys-H-2K^b y *E. coli*- β 2m en medio LB con 50 μ g/ml de carbenicilina hasta alcanzar OD_{600nm} 0,8 para H-2K^b y OD_{600nm} 1,2 para β 2m en agitador a 200 rpm. Enseguida se agregó el inductor de expresión génica IPTG a una concentración final igual a 0,5 mM. Las bacterias fueron recolectadas 3 h. después de la inducción y centrifugadas a 10.000 rpm por 15 minutos a 4 °C. Los precipitados bacterianos recuperados fueron resuspendidos en tampón de lisis (1 ml de tampón de lisis por cada 1 g de pellet bacteriano) y posteriormente sonicados 10 veces en ciclos de 10 segundos a potencia máxima, para liberar el contenido intracelular. La muestra fue tratada posteriormente con DNAsa 0.4 mg/10ml y RNAsa 1.3×10^3 Unidades/10ml por 25 min. a 25 °C. El lisado resultante fue lavado una vez con tampón de lisis más 0.5 % Triton X-100, otra vez con tampón de lisis y luego con Tris 10 mM pH 8.0, siempre a centrifugación de 10.000 rpm por 15 min., a 4 °C cada una. El pellet finalmente obtenido fue lavado cinco veces con agua destilada estéril hasta lograr un sedimento de apariencia blanca y consistencia arenosa donde se encuentra la fracción rica en cuerpos de inclusión (CI), que son depósitos de proteínas insolubles producto de su sobreexpresión. Posteriormente, los pellets que contiene a los CI fueron disueltos en Tris-

HCl 20 mM, urea 8M pH 8.0, un poderoso agente desnaturante que solubiliza a las proteínas. 4,5 miligramos de proteína recombinante Cys-H-2K^b fueron mezclados con 1,5 mg de β 2m y 0.5 mg de péptido de secuencia aminoacídica SIINFEKL, lo que resulta en una proporción molar de 1:1:4. La mezcla enseguida fue llevada a una concentración final de 0.25 mg/ml de proteína en urea 6 M mediante la adición de urea 4 M. La muestra, en un volumen final de 26 ml, fue dispuesta dentro de una bolsa de diálisis de 20 cm y 500 Da de poro y dializada contra 200 ml de Tris-HCl 10 mM pH 8.0 a 4°C. La solución de diálisis fue cambiada a las 24, 36, 48, 60 y 72 hrs. Al tercer día el contenido de la bolsa de diálisis fue extraído y purificado por cromatografía de exclusión molecular por una columna con resina Superdex G-200, de límite de exclusión 600 kDa, en tampón PBS-azida 0.02 % a pH 7.4. La fracción 2 (F2), que posee los complejos Cys-H-2K^b/SIINFEKL solubles (monómeros) de interés, fue recolectada y concentrada en unidades de concentración con poro 10.000 Da según indicaciones del fabricante. El concentrado de complejos Cys-H-2K^b/SIINFEKL solubles obtenidos fue enseguida biotinilado con BMCC-biotina (1-biotinamido-4-[4'-(maleimidometil)cyclohexanecarboxamido] butano) en PBS pH 7.0 por 2 h. a 4°C en una relación molar BMCC-biotina/pMHC igual a 1.5 (20 μ g de biotina-BMCC con 1 mg de pMHC). La reacción de biotinilación es altamente específica a pH neutro, favoreciendo la unión covalente del grupo maleimido reactivo de la biotina por el grupo SH presente en extremo C-terminal de la molécula recombinante H-2K^b. Los monómeros biotinilados fueron posteriormente purificados por cromatografía de exclusión molecular mediante el uso de la resina Superdex G-200 como fue señalado anteriormente a una razón de flujo de 0.75ml/min. En el paso siguiente los complejos Cys-H-2K^b/SIINFEKL solubles biotinilados fueron concentrados mediante unidades de concentración con poro 10.000 Da.

3.12. Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Para evaluar la expresión de las proteínas recombinantes Cys-H-2K^b y β 2m, dentro de los cuerpos de inclusión purificados de bacteria, se realizaron geles de poliacrilamida al 15 %. Para ello se procedió a mezclar según proporciones descritas acrilamida-bisacrilamida 30:0.8 %, persulfato de amonio 10 %, temed, agua y soluciones tampones tanto para el gel resolutivo como concentrador. La concentración proteica de los cuerpos de inclusión se determinó mediante el *kit* BCA. 50 μ l de cuerpos de inclusión fueron mezclados con igual volumen de tampón de carga 2X y calentados a 100 °C por 10 min. Las muestras fueron enseguida cargadas en el gel de poliacrilamida 15 % y resueltas en tampón SDS-PAGE por 3 h. a 90 V. Finalmente el gel fue extraído y teñido con una solución de azul de Coomassie. El desteñido del gel se realizó mediante solución de desteñido.

3.13. Evaluación de la conformación de los complejos Cys-H-2K^b/SIINFEKL solubles biotinilados.

Para evaluar la biotinylación de los monómeros, así como su conformación, placas de ELISA fueron activadas con 500 ng/pocillo de anticuerpo anti-H-2K^b conformacional (Y3) en tampón de activación de placa de ELISA por 10 h. a 4 °C. Este anticuerpo Y3 reconoce a H-2K^b sólo si la molécula se encuentra en su conformación correcta. Posteriormente los pocillos fueron bloqueados con PBS-BSA 1 % por 1 h. a temperatura ambiente y enseguida lavados, una vez con PBS-Tween 20 0,02 % y dos veces con PBS. Luego se determinó, mediante el uso del *kit* BCA, la concentración proteica de los concentrados biot-Cys-H-2K^b/SIINFEKL preparados. Con este dato se agregó 0,5 μ g/pocillo de monómero biotinilado y se incubó por 1 h. a temperatura ambiente. Los pocillos fueron luego lavados, una vez con PBS-Tween 20 0,02 % y dos veces con PBS.

Posteriormente se agregó 50 µl de SAv-HRP, dilución 1/2000 en PBS-BSA 1 %, por 1 h. a temperatura ambiente. Los pocillos fueron nuevamente lavados, una vez con PBS-Tween 20 0,02 % y dos veces con PBS. Finalmente se agregaron 50 µl/pocillo de solución de revelado para la enzima HRP y la reacción se detuvo con H₂SO₄ 2 M para la lectura de los pocillos en un lector de ELISA a 450 nm.

3.14. Inmunoprecipitación de los complejos Cys-H-2K^b/SIINFEKL.

Una muestra de concentración 100 µg/ml de la muestra dializado se incubó por 2 horas con 3 µl de anticuerpo anti-H-2K^b (Y3) conformacional ascítico a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 50 µl de proteína A inmovilizada a sefarosa y se dejó incubar por 40 min. en hielo y con agitación lenta. Luego la muestra fue centrifugada a 8000 rpm por 5 min y lavado dos veces con 500 µl de solución de PBS frío y resuspendida en 50 µl de PBS. Finalmente se agregó a la muestra 50 µl de buffer de carga 2X y se hirvieron por 10 min a 100°C, para luego resolver en un gel de poliacrilamida-SDS al 15%, teñido con azul de coomasie.

3.15. Tetramerización de los complejos Cys-H-2K^b/SIINFEKL.

Los complejos Cys-H-2K^b/SIINFEKL concentrados son posteriormente incubados con estreptavidina-PE, la cual posee cuatro sitios de unión para la molécula de biotina. La reacción fue llevada a cabo en PBS por 2 h. a 4°C y la relación molar de complejos Cys-H-2K^b-SIINFEKL/estreptavidina fue 16:1, de modo de asegurar la unión de todos los sitios de la molécula de estreptavidina (42 µg de estreptavidina-PE con 100 µg de Cys-H-2K^b/β2m/SIINFEKL). Posteriormente los tetrámeros de pMHC/OVA solubles son purificados por columna de cromatografía de exclusión molecular (Superdex G-200) a un flujo constante de

0,75ml/min, para finalmente ser concentrados en unidades de concentración citados anteriormente.

3.16. Análisis funcional de los tetrámeros de pMHC con péptido antigénico derivado de OVA mediante TCR expresado en hibridomas.

200 mil células de la línea celular B3, que poseen un TCR para el péptido antigénico derivado de OVA₂₅₇₋₂₆₄ que reconoce específicamente complejos H-2K^b/SIINFEKL, fueron incubadas con 500 ng de estreptavidina purificada (no conjugada) por 30 min. en hielo para evitar la unión inespecífica de los tetrámeros de pMHC/OVA sobre la superficie celular. Luego las muestras fueron centrifugadas a 1600 rpm por 6 min y resuspendidas en 250 µl de PBS-FBS 1% para posteriormente ser incubadas con 500 ng de tetrámeros de pMHC/OVA y 0,25 µg de anti-TCRβ-FITC a 4°C por 1h. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 1600 rpm por 6 min y lavada con 600 µl de solución PBS-FBS 1%. Finalmente las muestras fueron centrifugadas y resuspendidas en 250 µl de PBS-formaldehído 1% y analizadas por citometría de flujo.

3.17. Análisis funcional de los tetrámeros de H-2K^b/SIINFEKL mediante TCRs en linfocitos T de ratón transgénico OT-I.

A partir de ratón OT-I se extrajo sangre desde la cola con 6 µl de heparina, posteriormente se trató dos veces con 600 µl de solución ACK para eliminar glóbulos rojos interferentes, Inmediatamente se procedió a centrifugar durante 6 minutos a 1600 rpm. Luego las muestras fueron lavados dos veces con 500 µl de PBS-FBS 1% y centrifugadas a 1600 rpm por 6 minutos. Posteriormente las muestras fueron resuspendidas en 250 µl de PBS-FBS 1% y teñidas con 500 ng de estreptavidina para bloquear los sitios de unión inespecífica de los tetrámeros pMHC/OVA

solubles sobre la superficie del linfocito T. Este bloqueo se llevó a cabo en hielo por 30 minutos, se lava una vez con PBS-FBS 1% y se resuspende en 250 μ l de la misma solución. Finalmente se agregó a la muestra 500 ng de tetrámeros de pMHC/OVA y con 0,25 μ g de anticuerpo anti-CD8 α conjugado con FITC y se dejó incubar durante una hora en hielo en ausencia de luz. Posteriormente se lavo tres veces con 600 μ l de PBS-FBS 1%, luego las muestras fueron fijadas con PBS-formaldehido 1% para luego ser analizadas por citometría de flujo.

3.18. Determinación de concentración proteica en soluciones mediante *kit* BCA (método del ácido bicinconínico).

El *kit* BCA (Pierce) fue utilizado para determinar la concentración de proteínas en solución según instrucciones del fabricante. Mediante este *kit* se determinó, dentro de otros, la concentración proteica de soluciones stock de péptido OVA, concentraciones proteicas de muestras de cuerpos de inclusión previamente a la resolución por geles SDS-PAGE, concentración proteica de complejos H-2K^b/SIINFEKL biotinilados y concentración proteica de tetrámeros pMHC/SIINFEKL.

3.19. Crecimiento de cepas atenuadas de *S. typhimurium aroA* y generación de complejos inmunes.

Se cultivaron en un agitador de cultivo bacteriano a 37 °C, inóculos de *S. typhimurium*-OVA 14028 *aroA* en 5 ml de LB con 50 μ g/ml de carbenicilina hasta alcanzar una O.D._{600nm} = 0,6. A esta OD, *S. typhimurium* se encuentra en una fase de crecimiento exponencial lo que se asocia a un estado de mayor desarrollo metabólico de la bacteria (Hopkins, y cols., 2000, Jantsch y cols., 2003, Kirby y cols., 2002.). Para la generación de complejos inmunes se agregaron 5 μ l

(0,5 mg/ml) de IgG de conejo anti-*Salmonella* a 5×10^8 bacterias por 2 h a 4 °C, tal como se describe en el protocolo establecido por Tobar y cols (2004).

3.20. Western blot para determinar la expresión proteínica recombinante ovalbúmina en cepas atenuadas de *Salmonella typhimurium*.

De un cultivo bacteriano saturado se tomó una muestra de 100 µl de *Salmonella typhimurium* (*aroA*) recombinante para ovoalbúmina, se centrifugó por 6 minutos a 6000 rpm. Posteriormente el pellet fue resuspendido en 100 µl de una solución Tris 10 mM pH 8.0, se determinó la concentración de proteínas y se hirvió a 100°C por 10 min. 100 µg de muestra se resolvieron en un gel de poliacrilamida al 12% por 3 horas a 90 V para luego ser transferidas a una membrana de nitrocelulosa por electroforesis a 150 mA por 1 h. Paso siguiente la membrana fue bloqueada con solución PBS-leche descremada 1% por 1 h. a temperatura ambiente, seguido la incubación anticuerpo IgG de conejo anti-OVA, en una dilución 1/1500 en PBS- leche descremada 1%, por 12 h. a 4°C. Enseguida se lava 3 veces con PBS-Tween 0,02% y luego dos veces con PBS. Posteriormente la membrana se incubó con PBS-leche descremada con anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con enzima peroxidasa (HRP), a una dilución de 1/3000 por 1h a temperatura ambiente. Finalmente la membrana se lavó dos veces con PBS-Tween 0,02%, seguido de dos lavados de PBS y se agregó la solución de revelado para la enzima peroxidasa.

3.21. Infección con bacteria atenuada libre y bacteria atenuada en forma de complejos inmunes en ratones C57/BL6.

Ratones C57BL/6 fueron infectados oralmente con 5×10^8 bacterias en forma libre y con bacterias en forma de complejos inmune de *Salmonella typhimurium aroA* que expresa

ovalbúmina recombinante. Los ratones fueron mantenidos 24 h antes del experimento y durante toda la experiencia con 40mg/Kg de peso de ampicilina cada 12 h, a modo de forzar la mantención del plasmido que contiene el gen de ovoalbúmina. Posteriormente se procedió a extraer sangre periférica al cuarto día y analizar la presencia de linfocitos T periféricos citotóxicos específicos para ovoalbúmina con tinción tetrameros de H-2K^b/SIINFEKL.

3.22. Medición del título de anticuerpo IgG específico para ovalbúmina.

Placas de ELISA fueron activadas con 50 µl/pocillo con ovoalbúmina a una concentración de 10 µg/ml por 12 h a 4°C; Luego los pocillos fueron bloqueados con PBS-BSA 1% por 1 h. a temperatura ambiente y posteriormente lavados una vez con PBS-Tween 0,02% y dos veces con PBS. Posteriormente se agregaron 3 µl de suero de ratón C57BL/6 inmunizado con *Salmonella typhimurium aroA* que expresa OVA recombinante y se diluyeron en 100 µl PBS-BSA 1%, posteriormente de ésta se realizaron diluciones decrecientes de suero (1/100) en la misma placa y dejó incubar por 2 h. a temperatura ambiente. Luego los pocillos fueron lavados una vez con PBS-Tween y dos veces con PBS. Enseguida se agregó un segundo anticuerpo anti IgG de ratón conjugado con peroxidasa a una dilución 1/5000. Posteriormente los pocillos fueron nuevamente lavados con PBS-Tween 0,02% y con PBS. Finalmente se reveló con sustrato TMB para la enzima peroxidasa (HRP). La reacción se llevó a cabo por 10 min a temperatura ambiente y detenida posteriormente con 50 ul de H₂SO₄ 2M. El resultado colorimétrico fue leído en un lector de placas de ELISA a 450 nm.

3.23. Extracción de ganglios linfáticos de ratones OT-I y tinción de células con CFSE para experimentos de transferencia adoptiva.

Se removieron asépticamente ganglios linfáticos cervicales, axilares, retroperitoneales e inguinales de ratones OT-I. Estos fueron homogeneizados mediante una malla de 70 μm de enrejado en PBS 1% FBS. Las células fueron lavadas dos veces con PBS. Posteriormente, una alícuota fue teñida con los anticuerpos anti-V α 2-PE y anti-V β 5-FITC. El resto de la preparación fue teñida con 10 μM del fluorocromo intracelular CFSE por 10 min. a 37 °C con agitación. La tinción se detuvo con un lavado con PBS-FBS 2 % seguido de dos lavados de las células con PBS. La tinción fue posteriormente evaluada por citometría de flujo previo a la transferencia de las células teñidas en ratones C57BL/6.

3.24. Transferencia adoptiva de linfocitos T OT-I e inoculación de *S. typhimurium aroA*.

Se inocularon 1×10^6 linfocitos T OT-I efectivos teñidos con CFSE a cada ratón C57BL/6 en 500 μl PBS por vía intravenosa a través de la vena de la cola. 24 horas después los ratones fueron inmunizados con 1×10^5 bacterias por la misma vía. Tres días después se removió asépticamente el bazo y ganglios linfáticos para posteriormente ser analizados por citometría de flujo evaluando la dilución de la marca de CFSE en la población CD8⁺.

3.25. Proliferación de linfocitos T OT-I en ratones tratados con *S. typhimurium aroA*.

Los bazos y ganglios linfáticos de estos ratones fueron homogenizados. Posteriormente las células fueron teñidas con anti-CD8-PE por 45 min. en hielo. Finalmente las células fueron lavadas 2 veces con PBS-FBS 1% y analizadas en un citómetro de flujo. Para el análisis de células CFSE⁺ se evaluó la fluorescencia verde (FL-1) de aquellas células comprendidas en el cuadrante superior derecho de los gráficos de análisis de citometría (células CD8⁺). Los histogramas que

indican fluorescencia verde para los distintos tratamientos fueron normalizados y grafican igual número de linfocitos T CD8⁺.

3.26. Software de análisis.

- Para dar formato y realizar análisis estadístico a gráficos y tablas se utilizó el programa Prism 4 de GraphPad software.
- El análisis estadístico de los resultados de citometría de flujo fue realizado mediante el programa WinMDI 2.8, 1993-1998, diseñado por el Dr. Joseph Trotter.
- La adquisición de los datos por citometría de flujo se realizó mediante el programa Cell-quest-pro.

4. RESULTADOS.

4.1. Obtención de proteínas Cys-H-2K^b y β 2m recombinantes para la producción de complejos Cys-H-2K^b/SIINFEKL solubles.

Una vez cultivadas en medio LB con antibiótico, inducidas con IPTG y sedimentadas por centrifugación, bacterias *E. coli* que expresan ya sea Cys-H-2K^b o β 2m recombinante, fueron lisadas en forma independiente con solución de lisis bacteriana y posteriormente sonicadas. Enseguida los cuerpos de inclusión fueron separados de restos celulares, DNA y RNA para ser purificados según se indica en *Metodología*. Luego de determinar la concentración de proteínas de las preparaciones mediante el *kit BCA*, 30 μ g de cuerpos de inclusión aislados de Cys-H-2K^b o β 2m fueron cargados en un gel de poliacrilamida al 15 %. En la figura 5A, es posible observar que las preparaciones de cuerpo de inclusión Cys-H-2K^b y β 2m contienen mayormente las proteínas de interés Cys-H-2K^b (33 kDa) y β 2m (11 kDa), respectivamente.

4.2. Obtención de complejos Cys-H-2K^b/OVA solubles.

Como los cuerpos de inclusión se componen de agregados proteicos insolubles, es necesario solubilizar las proteínas Cys-H-2K^b y β 2m antes de ensamblar el trímero β 2m/Cys-H-2K^b/OVA de manera no covalente. Para ello se denaturaron las proteínas incluidas en los cuerpos de inclusión con urea 8 M (Figura 5B). Este compuesto, a altas concentraciones, permite cubrir y extender zonas proteicas hidrofóbicas expuestas al solvente acuoso que se encuentran por lo general replegadas sobre sí mismas en el núcleo proteico por interacciones hidrofóbicas y que insolubilizan las proteínas formando aglomerados (Itri, 2004). Una vez solubilizadas con urea, las proteínas Cys-H-2K^b y β 2m fueron mezcladas con SIINFEKL (péptido derivado de OVA) en una

relación molar 1:1:4. La mezcla enseguida fue dializada contra una solución tampón para remover gradualmente la urea de la preparación. De esta forma se permitió que las moléculas $\beta 2m$ y Cys-H-2K^b se ensamblasen lentamente, junto al péptido OVA, para formar el trímero $\beta 2m$ /Cys-H-2K^b/SIINFEKL. Una vez finalizada la diálisis, luego de cambios sucesivos de la solución tampón externa, el contenido de la bolsa de diálisis fue concentrado en unidades concentradoras para proteínas (10kDa), para luego ser purificado por cromatografía de exclusión molecular. La fracción de interés, que contiene el trímero(complejo pMHC), fue separada de los demás compuestos. El complejo formado por Cys-H-2K^b (33 kDa), $\beta 2m$ (11 kDa) y el péptido OVA(1 kDa) tiene un peso molecular aproximado de 45 kDa y aparece en nuestro perfil de elución de cromatografía de exclusión molecular, columna Superdex G200 y lectura de absorbancia a 280 nm, como un pico a los 21 min. (Figura 6). Esta fracción (F2), que contiene los complejos Cys-H-2K^b/OVA solubles, eluye entre agregados de Cys-H-2K^b (F1: 12 min., peso molecular > 600 kDa) y $\beta 2m$ libre (F3: tiempo elución 29 min., peso molecular 11 kDa). Nótese que estos valores de tiempo de elución están determinados por la razón de flujo dado por el aparato de elución por presión, que correspondió a 0,75ml/min y que además los pesos moleculares corresponden a los obtenidos en curvas estándares de PM.

4.3. Confirmación de la formación de los complejos Cys-H-2K^b/SIINFEKL por inmunoprecipitación.

Antes de biotinilar los complejos Cys-H-2K^b/SIINFEKL fue necesario analizar la presencia y correcta conformación de los mismos. Para ello una muestra obtenida del dializado (D1) fue incubada con anticuerpo anti H-2K^b (Y3), que solamente reconoce a éste cuando se encuentra en su conformación correcta.

Figura 5

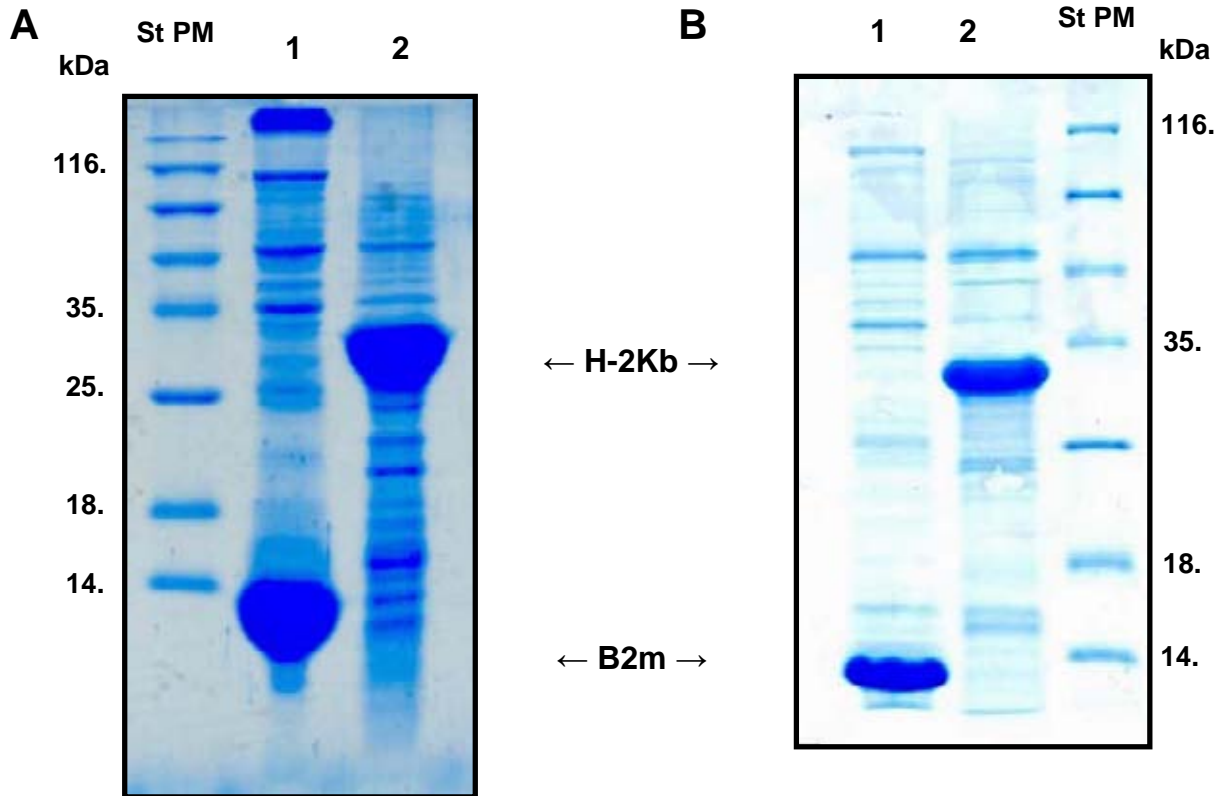


Figura 5. Obtención de Cuerpos de inclusión de H-2Kb y β 2m para la formación de complejos Cys-H-2Kb/SIINFEKL. Tras la inducción con IPTG de las proteínas recombinantes H-2K^b y β 2m transformadas en *E. coli*, el producto resultante, los cuerpos de inclusión (C.I.) fueron lisados y lavados, para finalmente ser solubilizados en una solución de urea 8M. **A.** corresponde a C.I. sin solubilizar. **B.** a C.I. solubilizados en agente denaturante. Los carriles 1 y 2 corresponden a C.I. H-2K^b y β 2m respectivamente. En cada carril se cargaron 10 μ g de proteínas y fueron resueltos en un gel de poliacrilamida al 15%.

Figura 6

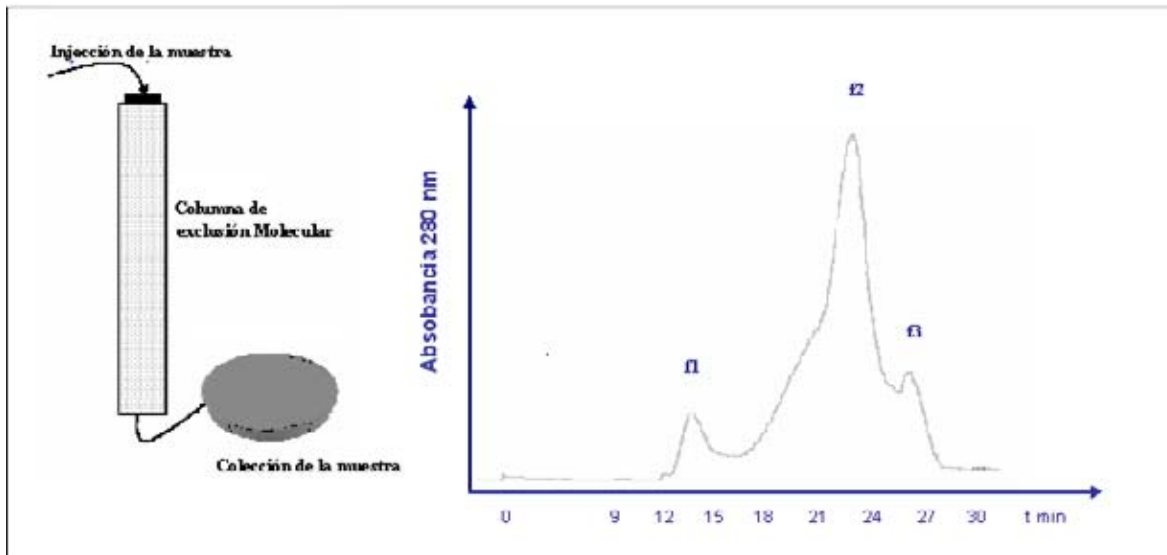


Figura 6. Purificación de los complejos Cys-H-2K^b por cromatografía de exclusión molecular. Se realizó una diálisis en condiciones denaturantes en la cual las proteínas de interés H-2K^b, β 2m y péptido ova fueron mezclados en una razón molar de 1:1:4. Luego de 72 h de diálisis los complejos pMHC/péptido fueron purificados en una columna de exclusión molecular (superdex G-200). Se muestra las distintas fracciones recolectadas, las cuales corresponden a; **f1** agregados proteicos, **f2** complejos Cys-H-2K^b/ β 2m/SIINFEKL y **f3** β 2m.

La incubación de complejos Cys-H-2K^b/β2m/SIINFEKL con Y3 y la subsecuente adición de proteína A inmovilizada a sefarosa y posterior resolución en un gel de poliacrilamida, dará como resultado la presencia de ambas cadenas polipeptídicas, la cadena pesada Cys-H-2K^b y la cadena liviana β2m del complejo pMHC, así como las dos cadenas que conforman a la inmunoglobulina, las dos cadenas pesada (50 kDa) y las dos cadenas liviana (25 kDa). (Figura 7). En aquellas muestras donde no se encuentra la presencia de complejos pMHC, sólo se apreciará las bandas de ambas cadenas de la inmunoglobulina.

4.4. Evaluación de la conformación y biotilación de los complejos Cys-H-2K^b/SIINFEKL solubles obtenidos.

Con el fin de ser tetramerizados, los monómeros Cys-H-2K^b/SIINFEKL fueron biotilados mediante una reacción química (Kalergis y cols., 2000). Esta es llevada a cabo mediante la unión covalente de una molécula de biotina por un complejo Cys-H-2K^b/SIINFEKL soluble mediante el reactivo BMCC-biotina. Esta molécula contiene biotina asociada a un grupo maleidimida, el cual reacciona a pH neutro específicamente con grupos SH-libres para formar un enlace covalente. Dado que en el extremo carboxilo-terminal de la molécula Cys-H-2K^b recombinante fue incorporado un residuo libre de cisteína, la molécula de biotina es incorporada distal a la región de unión al TCR. De este modo, además nos aseguramos que la unión de los complejos biot-Cys-H-2K^b a la molécula de estreptavidina ocurra por la región carboxilo terminal, dejando expedita la región amino terminal (región de unión al TCR) de la molécula de pMHC (Figura 8A). Para ello la reacción de biotilación fue realizada en PBS a pH neutro por 2 h. a 4°C, a una relación de 20 ug de BMCC-biotina por cada 1mg de complejo pMHC. La purificación de estos complejos pMHC-biotina, se realizó mediante columna de exclusión molecular (Superdex-200),

Figura 7

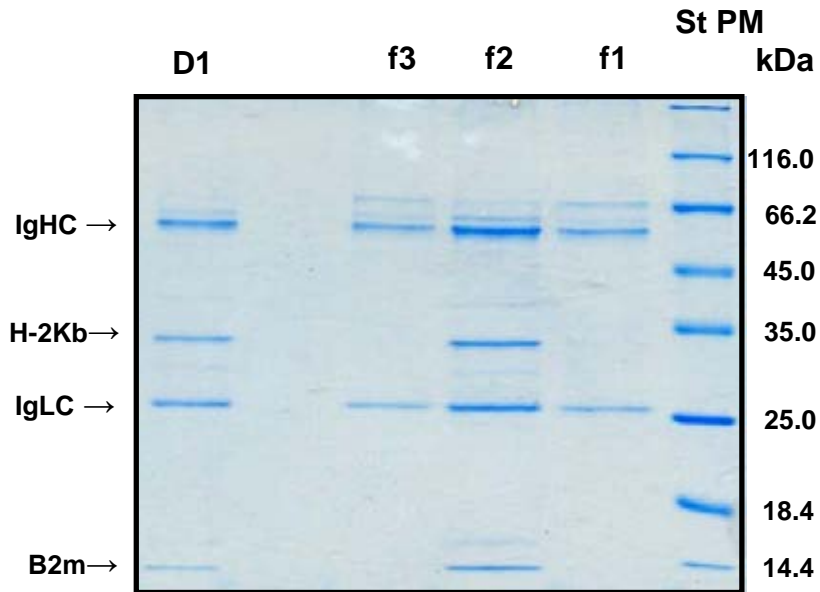


Figura 7. Análisis conformacional de los complejos péptido/MHC por inmunoprecipitación.

La inmunoprecipitación fue realizada con un anticuerpo monoclonal Anti-H-2K^b (Y3), el cuál es dependiente de su conformación junto con proteína A inmovilizada a perlas de sefarosa. Posteriormente fueron resueltas en un gel PAGE-SDS al 15%. El carril **f1** corresponde a agregados Cys-H-2Kb, **f2** Complejos péptido/MHC, **f3** a β 2m, **D1** a muestra obtenido del dializado total. Las abreviaciones IgHC y IgLC, corresponden a las cadenas pesadas y livianas de la inmunoglobulina del anticuerpo Y3 respectivamente.

Para evaluar la biotinylación de las moléculas biot-Cys-H-2K^b/SIINFEKL/β2m y su correcta conformación, lo cual está estrechamente relacionado con su funcionalidad, muestras de estos complejos pMHC biotinylados (0,5 μg) fueron añadidas sobre placas de ELISA previamente activadas con el anticuerpo Y3. Este anticuerpo monoclonal reconoce un epítipo conformacional de la molécula H-2K^b que es independiente del péptido antigénico que ésta posea (Jones and Janeway, 1981). Ya que estreptavidina une biotina, se utilizó estreptavidina conjugada a HRP como reactivo de revelado. La aparición de un compuesto de color luego de agregar sustrato a la enzima HRP indica que los complejos biot-Cys-H-2K^b/SIINFEKL preparados se encuentran biotinylados y poseen una conformación funcional (Figura 9A). Se observan valores de absorbancia mayores obtenidos por nuestros complejos biot-Cys-H-2K^b en comparación con los respectivos controles, superando incluso por más del doble a valor del control positivo, que corresponde a complejos biot-pMHC con péptido distinto del derivado de OVA. El control negativo corresponde a complejos pMHC sin biotinylar. (Figura 9B).

4.5. Tetrámerización de los complejos Cys-H-2K^b/SIINFEKL.

Luego de analizar la correcta orientación y conformación de los complejos Cys-H-2K^b/SIINFEKL a través del anticuerpo Y3, el cual solo reconoce a H-2K^b con la conformación correcta. Para la formación de tetrámeros de pMHC es necesario la unión de complejos pMHC idénticos a una molécula de estreptavidina. Esta molécula derivada de *Streptomyces avidini* presenta cuatro sitios de unión de alta afinidad por una molécula de biotina (Kd ≈10⁻¹³ M). Para este ensayo se utilizó la molécula ternaria biot-Cys-H-2K^b/SIINFEKL/β2m en exceso, de modo de saturar los cuatro sitios de la molécula de estreptavidina a través de su brazo de biotina en el extremo

Figura 8

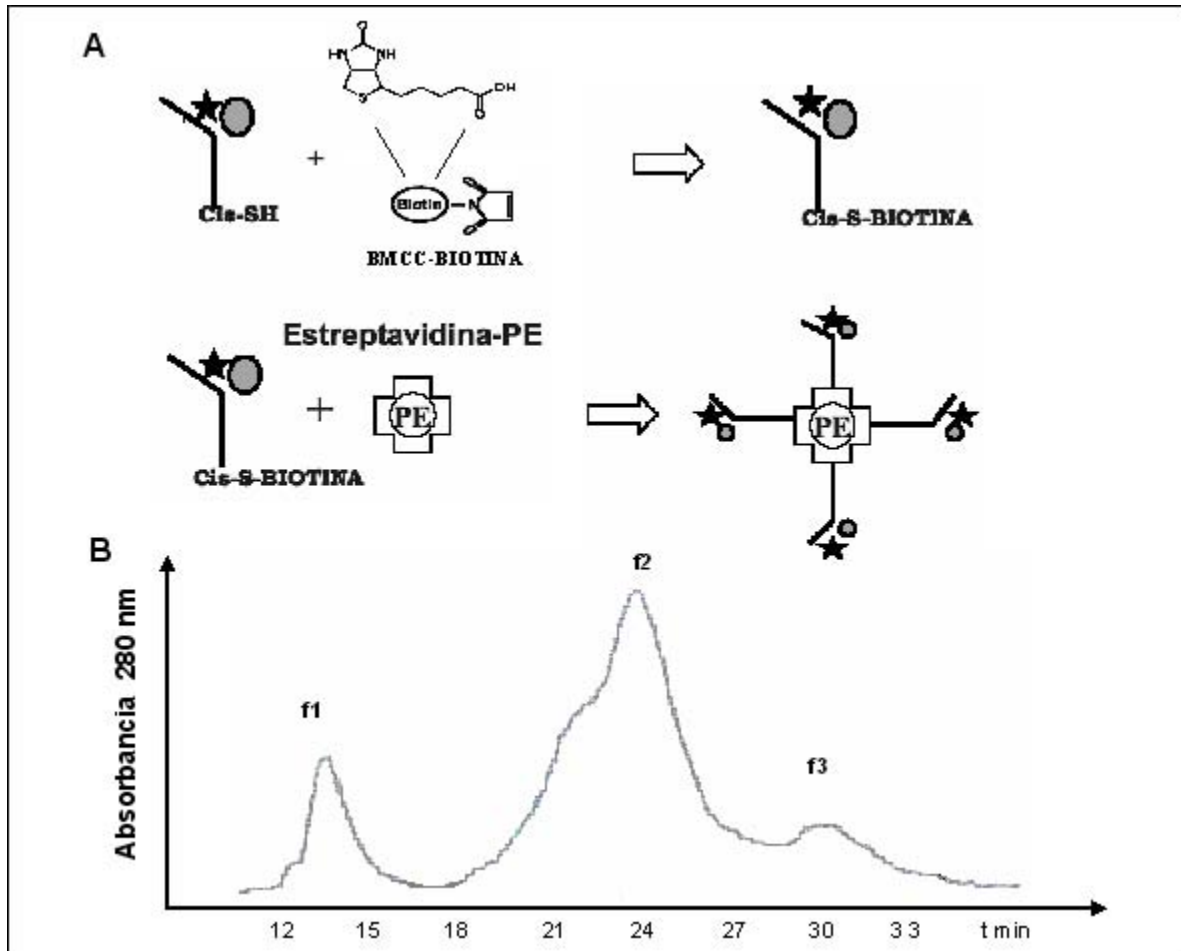


Figura 8. Diseño de tetrámeros pMHC. Esquema de la generación de tetrámeros pMHC. **A.** Cuatro complejos pMHC se unen a una molécula de estreptavidina a través de un residuo de biotina en el extremo carboxilo-terminal de la molécula proteica H-2K^b. **B.** Perfil de elución para la purificación de complejos biot-Cys-H-2K^b/OVA en un acolumna de exclusión molecular. La fracción **f1** corresponde a agregados proteicos, **f2** corresponde a complejos biot-pMHC/OVA y **f3** a proteínas de bajo peso molecular, péptido y BMCC-biotina respectivamente.

Figura 9

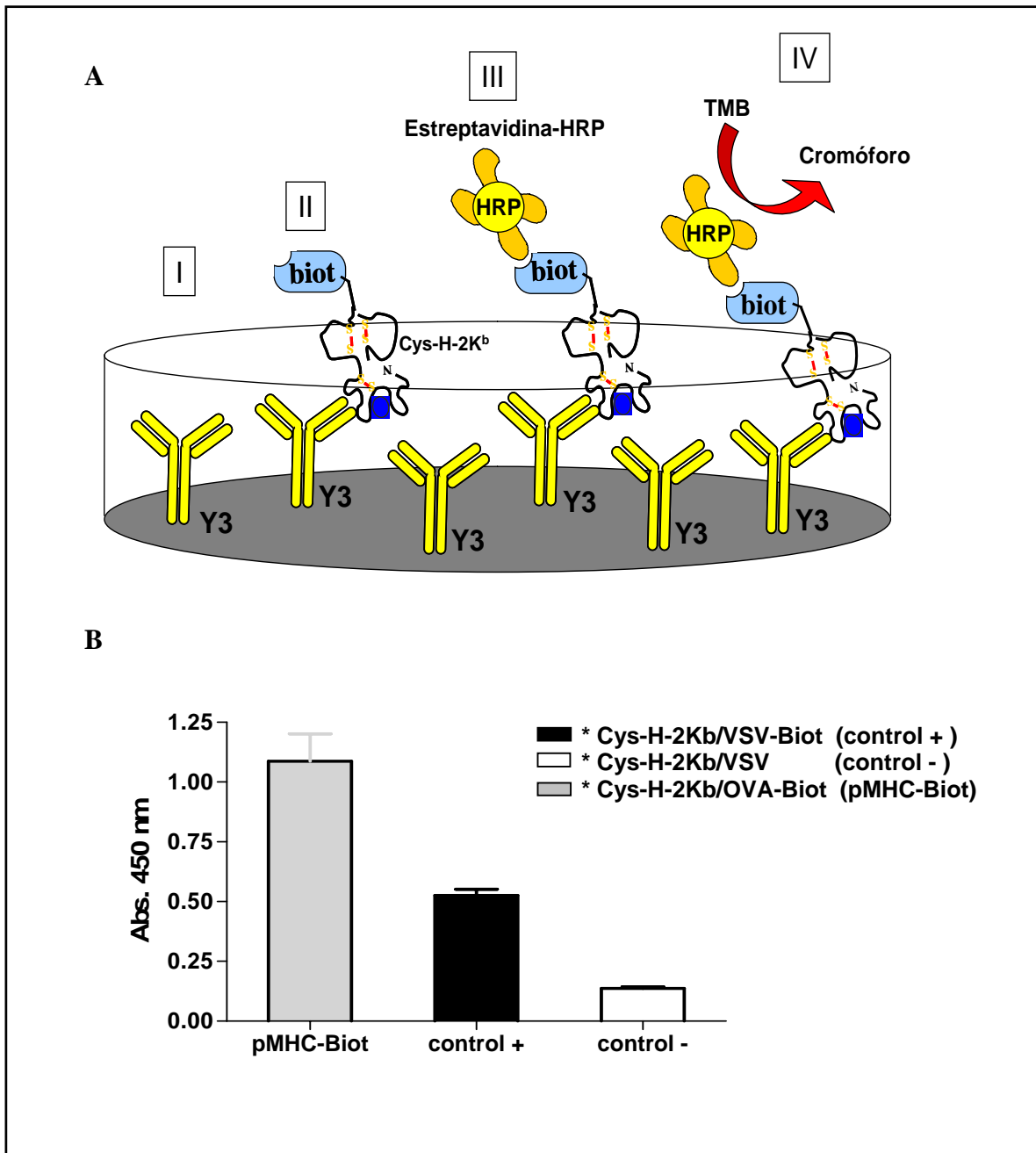


Figura 9. Determinación de biotinización y estado conformacional de los Complejos biot-Cys-H-2K^b. **A.** Esquema del ensayo de ELISA. **I.** Activación de microplacas de Elisa con anticuerpo anti-H-2K^b. **II.** Posteriormente se agregaron 0,5 ug de monómeros de biot-Cys-H-2K^b/OVA y 0,5 ug de cada control, biot-Cys-H-2K^b/VSV y Cys-H-2K^b sin biotinar. **III.** Por último se agregó estreptavidina-HRP. **IV.** Finalmente la reacción se reveló con sustrato para HRP. **B.** Microplacas de Elisa fueron activadas con anticuerpo conformacional anti-H-2K^b. Se cargaron 0,5 ug de muestra, así como, para cada uno de los controles indicados. Los datos representan el promedio de a lo menos tres experimentos independientes y las correspondientes desviación estándar.

carboxilo-terminal de la molécula de H-2K^b. Luego de dos horas de incubación a 4°C y pH neutro, los tetrámeros de Cys-H-2K^b/SIINFEKL fueron separados del exceso de pMHC/SIINFEKL por una columna de exclusión molecular; puesto que el tetrámero posee un peso molecular de aproximadamente 400 kDa, éste no representa una mayor dificultad en la purificación y reconocimiento de su perfil de elusión como lo muestra la figura 10. Finalmente la fracción correspondiente a tetrámeros pMHC/SIINFEKL es concentrado en unidades concentradoras para proteínas, ya mencionadas anteriormente y cuantificado por *kit* BCA para detección de proteínas.

4.6. Tetrámeros de complejos Cys-H-2K^b/SIINFEKL reconocen específicamente linfocitos T CD8⁺.

Como un acercamiento para analizar el estado funcional de nuestros tetrámeros de pMHC/OVA, utilizamos en paralelo dos estrategias distintas. El primero consistió en el uso de ratones transgénicos OT-I modificados genéticamente, los cuales poseen linfocitos T CD8⁺ con TCRs específicos, capaces de reconocer al péptido antigénico SIINFEKL derivado de la proteína ovalbúmina presentado en el contexto MHC clase I H-2K^b. Para la segunda estrategia utilizamos líneas celulares que expresan TCRs específicos para el péptido SIINFEKL (B3z). Es por esto que la tinción con tetrámeros de pMHC/SIINFEKL con cualquiera de estas dos estrategias, será un buen indicador de la funcionalidad de este reactivo. Recordemos que la molécula de estreptavidina en los tetrámeros se encuentra conjugado con un fluoróforo (ficoeritrina), un compuesto químico de alto peso molecular que posee la capacidad de absorber luz a una determinada longitud de onda y emite luz a otra de menor energía. La ficoeritrina (PE) emite luz

Figura 10

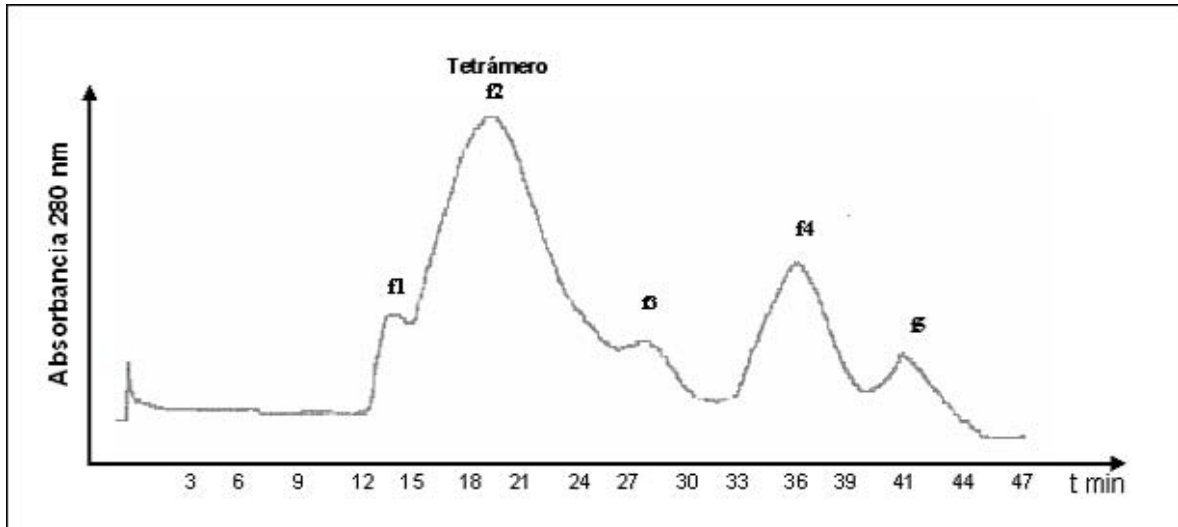


Figura 10. Purificación de tetrámeros de complejos Cys-H-2K^b/SIINFEKL. Perfil de elución de los complejos Cys-H-2K^b/OVA tetraméricos. Los complejos biot-Cys-H-2K^b fueron incubados por 2 h. a 4°C con estreptavidina-PE a una proporción molar de 16:1. El exceso de complejos biot- Cys-H-2K^b fue separado de las muestras tetramerizadas en una columna de exclusión molecular, Superdex G-200. **f1** corresponde a agregados proteicos. **f2** fracción tetrámeros, **f3** estreptavidina-PE, **f4** complejos Cys-H-2K^b/OVA y **f5** proteínas de bajo peso molecular, biotina y péptido.

específicamente en la zona del rojo, por ende la unión de los tetrámeros de pMHC/OVA a los linfocitos T puede ser monitoreada utilizando citometría de flujo.

La figura 11 muestra el perfil de citometría de linfocitos T específicos para SIINFEKL. En sangre periférica de ratón OT-I se ve claramente una población de linfocitos T CD8⁺ reconocidos por las moléculas de tetrámeros pMHC/OVA, a diferencia de lo que ocurre con sangre periférica de ratón C57BL/6 silvestre el cual posee linfocitos T CD8⁺ que no reconoce de manera específica el péptido antigénico derivado de la proteína ovalbúmina (SIINFEKL). Observese que la población doble positiva para tetrámeros pMHC/OVA y CD8⁺ corresponde al 28 % de la población total analizada sangre de ratones OT-I, además del hecho que la población aparece claramente definida. Por otro lado es interesante apreciar que la tinción de líneas celulares B3Z con tetrámeros de pMHC/OVA no produjo el efecto esperado (figura 11A cuadro inferior), a pesar de que es posible observar en la figura 11B, poblaciones positivas que expresan TCRs en estas células (cuadrante inferior derecho). Aunque es significativo destacar que el porcentaje de TCRs positivos es menor al de las células *in vivo*. Sin embargo este punto se discutirá en extenso más adelante.

4.7. Detección de la expresión de proteína recombinante ovoalbúmina por Western blot en cepas atenuadas de *Salmonella typhimurium*.

Con el objeto de iniciar estudios *in vivo* de linfocitos T específicos para un antígeno determinado, se realizó un ensayo de western blot para analizar la expresión de proteína recombinante de ovoalbúmina en cepas de *Salmonella typhimurium aroA*. Para ésto, se transformaron bacterias mediante electroporación con el plásmido pOVA, que codifica para la proteína ovoalbúmina bajo el promotor *lac* (REF). Las colonias obtenidas en medio de selección

Figura 11

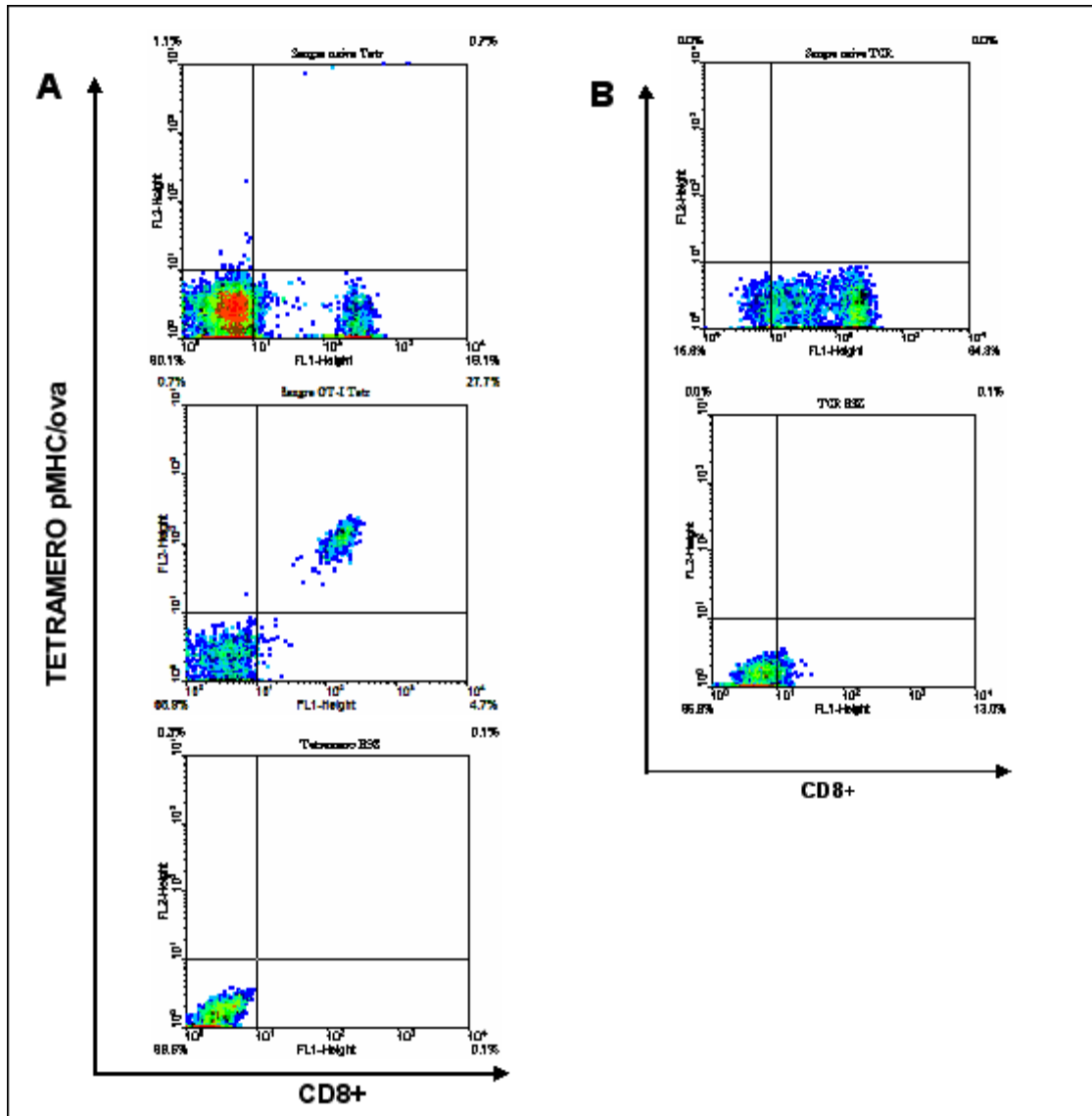


Figura 11. Reconocimiento específico de linfocitos T CD8+ por tetrámeros de pMHC/SIINFEKL. **A.** Linfocitos T de ratones transgénicos OT-I, de ratones C57BL/6 y células B3z fueron incubados con 500 ng de tetrámeros de pMHC. La figura muestra la tinción de linfocitos T específicos por citometría de flujo, en el eje vertical, la fluorescencia asociada a células tetrámeros positivas, y el eje horizontal la tinción para TCR. En ratones OT-I se observa una población definida de tetrámero y TCR positiva, correspondiente al 28% de la población total comparado con raton C57BL/6 naive y células B3z. **B.** Control de la expresión de TCR en las células analizadas.

con ampicilina se crecieron a saturación y se evaluó la expresión de OVA. Esta expresión del gen de ovalbúmina es fuerte y constitutiva en *Salmonella*, puesto que esta bacteria carece del operón *lac*. Al carecer de este operón, la expresión de ovoalbúmina es constitutiva, puesto que no puede ser regulada por moléculas represoras codificadas por este operón. La figura 12 muestra el western blot para esta cepa, donde se aprecia que sólo en las cepas transformadas con el plásmido recombinante, se visualiza la presencia de una única banda de aproximadamente 42 kDa, correspondiente a OVA. Es importante notar que OVA purificada del huevo de pollo tiene un peso molecular de aproximadamente 46 kDa, puesto que en esta especie, la proteína está altamente glicosilada, a diferencia de la OVA expresada en *Salmonella*, la que, se detecta como una banda de tamaño levemente inferior.

4.8. Activación de linfocitos T CD8⁺ antígeno-específico en respuesta a infección por cepas atenuadas de *S. typhimurium* que expresa ovoalbúmina recombinante.

Ratones C57BL/6 fueron inoculados oralmente ya sea con 5×10^8 cfu/ml de bacteria *aroA* en forma libre y opsonizadas con anticuerpo anti-*Salmonella*, para de este modo estudiar la respuesta citotóxica del sistema inmune del ratón a una infección con *Salmonella typhimurium* (Figura 13A). Para mantener la presencia *in vivo* del plásmido en las bacterias inoculadas, los ratones se trataron 24 h. antes, y durante todo el experimento con ampicilina, en una dosis de 40 mg/ kg de peso cada 12 h. Cuatro días después de la infección se analizó la población de linfocitos T CD8⁺ en sangre periférica con tinción tetrameros (Figura 13B). Según los resultados existe un aumento significativo de linfocitos T CD8⁺ específicos para péptido antigénico derivado de ovoalbúmina tras cuatro días post infección en todos los ratones inoculados, si se compara con ratones que no recibieron *Salmonella Typhimurium aroA* (PBS), como muestra la figura 13C.

Figura 12

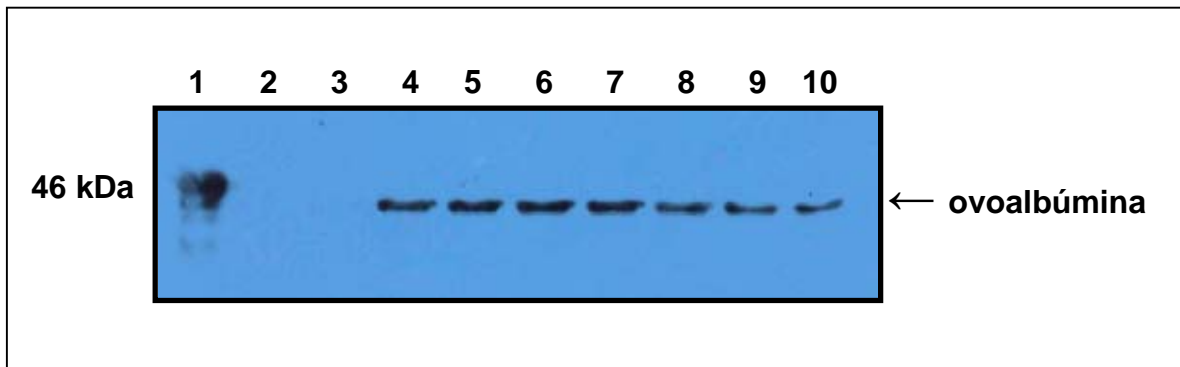


Figura 12. Expresión de ovoalbúmina recombinante en cepas de *Salmonella Typhimurium*.

100 ug de proteína fueron cargados en un gel de poliacrilamida al 12% y luego transferidas a una membrana de nitrocelulosa para ser posteriormente incubadas con IgG anti-ova de conejo. El **carril 1** corresponde a proteína ova purificada de pollo. **2.** st de PM. **3.** *Salmonella typhimurium* sin tranformar con pOVA. **4.** *Salmonella Typhimurium* 14028s pOVA Y carriles **5-10.** *Salmonella typhimurium aroA* transformada con pOVA. Ovoalbúmina de pollo posee un peso molecular levemente mayor que la de ratón, lo que queda de manifiesto en el western blot.

Es importante destacar que la proliferación celular es interpretada como un desplazamiento en el eje logarítmico donde se observa claramente un aumento de linfocitos T CD8+, cuando son analizadas por tetrámeros de MHC/SIINFEKL. Sin embargo la inoculación de bacterias en forma de complejos inmunes no arrojó un aumento significativo con respecto a la activación de linfocitos T CD8⁺ producidos por bacteria libre (sin opsonizar), aunque ambos tratamientos fueron capaces de provocar una respuesta citotóxica en el ratón en similar magnitud. Probablemente el sistema inmune no necesite la inoculación de bacterias cubiertas con anticuerpos cuando se trate de cepas bacterianas atenuadas, o simplemente la inoculación vía oral puede tener influencia en la integridad de los anticuerpos. Sin embargo estas inferencias se discutirán más adelante.

4.9. Respuesta humoral ante infección por *Salmonella Typhimurium aroA*.

Para caracterizar la respuesta inmune humoral de ratones C57BL/6 ante infección con *Salmonella typhimurium aroA-OVA*, así como también estudiar la magnitud de la respuesta primaria y secundaria, a los ratones anteriormente citados se procedió a extraer suero y medir el título de anticuerpo IgG anti-OVA a tres semanas post infección con *Salmonella typhimurium*, Luego se les realizó una reinmunización 1×10^5 cfu/ml de bacterias bajo las mismas condiciones de tratamiento expuestas en el punto anterior, es decir, con bacteria libre y en complejos inmunes por la misma vía de inoculación. Posteriormente a los siete días se midió nuevamente el título de IgG anti-OVA. Se muestra claramente que el título de anticuerpo para el antígeno ovoalbúmina aumentó notablemente con respecto al título de anticuerpo obtenido en la respuesta inmune primaria (Figura 14). Es interesante señalar que al igual que en la respuesta celular no se observaron diferencias significativas con respecto a los diferentes tratamientos (bacteria libre v/s

Figura 13

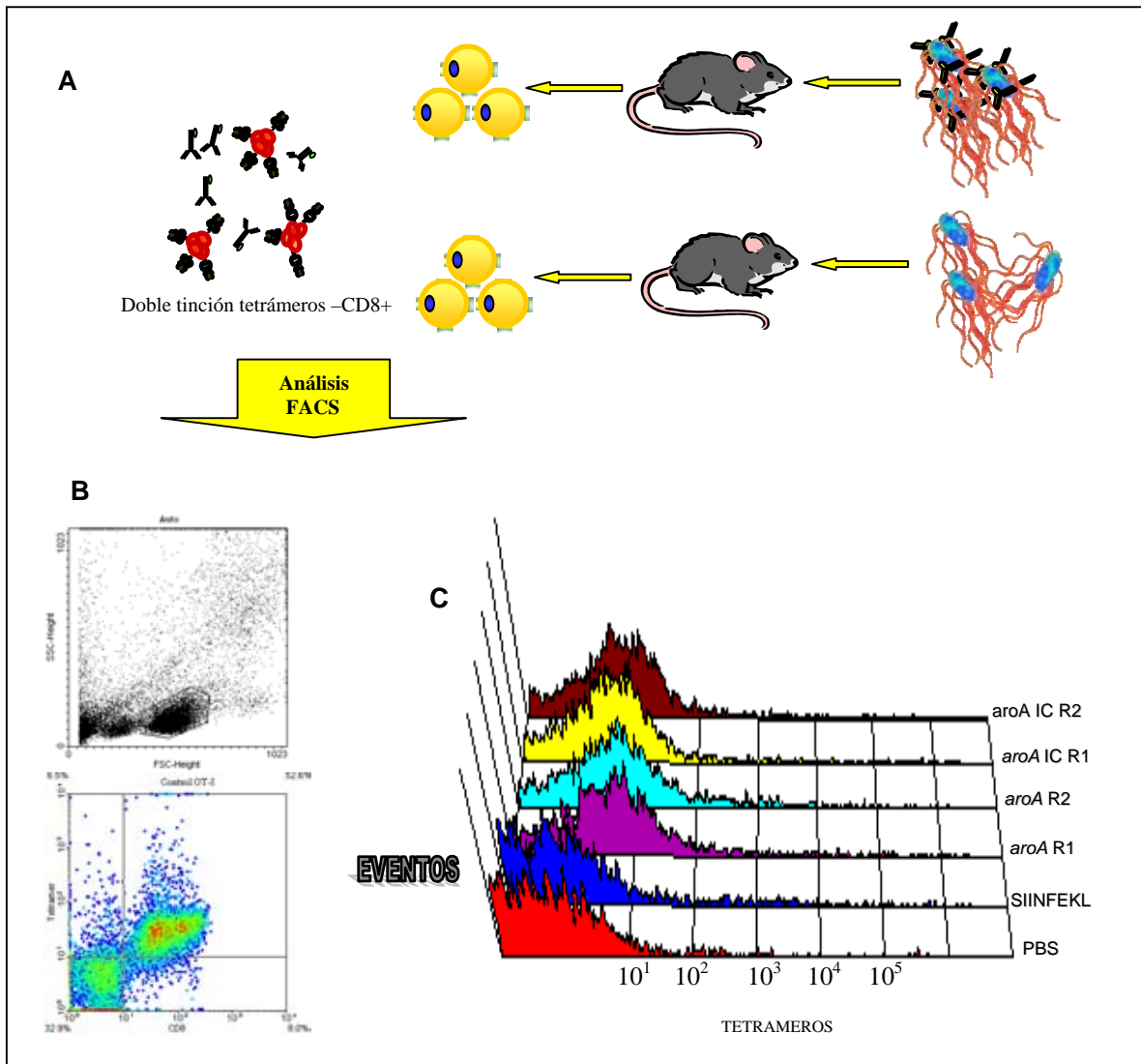


Figura 13. Detección de linfocitos T CD8 específicos para péptido ova después de 4 días de inmunización con *Salmonella Typhimurium AroA* que expresa ova. Determinación de la respuesta de linfocitos T CD8 antígeno-específico en sangre periférica a infección oral con *Salmonella Typhimurium aroA* recombinante para ovoalbúmina. **A.** Esquema del experimento. Ratones C57BL/6 fueron infectados con bacteria libre y con bacteria opsonizada. Tras cuatro la infección con bacteria se extrajo sangre periférica y se analizó con tinción tetrámeros pMHC/SIINFEKL para posteriormente ser analizados por citometría de flujo. **B.** Perfil citométrico donde se muestra la población determinada para tinción tetrámeros (cuadro superior), y con su respectivo control de tetrámeros (cuadro inferior) indicando el porcentaje de tetrámeros positivos en la población total. **C.** Histogramas linfocitos T en sangre periférica, donde se muestra células CD8+ positivas para tetrámeros. Los histogramas fueron normalizados para número fijo de células analizadas.

bacteria ICs) en los ratones inmunizado, ya que bacterias cubiertas con anticuerpos no muestran valores sustancialmente mayores que bacterias libres.

4.10. Proliferación de linfocitos T CD8+ por Transferencia adoptiva.

Como una estrategia para analizar la activación y proliferación de linfocitos T *in vivo* para un antígeno bacteriano recombinante, ratones C57BL/6 fueron inoculados intravenosamente con 1×10^5 cfu/ml de *Salmonella typhimurium aroA* libre. 24 h. antes se transfirieron 1×10^6 linfocitos T OT-I teñidos con CFSE (Figura 15A), un fluorocromo inocuo para la función celular. La transferencia de esta manera de linfocitos T teñidos con CFSE introducidos intravenosamente permitirá evaluar la capacidad de las células dendríticas (APC) del ratón receptor de procesar antígeno bacteriano, presentar y posteriormente activar *in vivo* linfocitos T CD8⁺ antígeno-específico. Para evaluar la proliferación de los linfocitos T OT-I transferidos a ratones C57BL/6 que posteriormente recibieron *Salmonella typhimurium aroA* que expresa de manera recombinante ovoalbúmina, los linfocitos T fueron teñidos con CFSE (carboxifluorosceína succinimidil ester), previa determinación del porcentaje de linfocitos T OT-I (Figura 15B), un fluorocromo que no altera la función celular y que puede ser escindido por esterasas no específicas originando un compuesto verde fácilmente monitoreado por citometría de flujo. Una vez en el interior de la célula el compuesto puede permanecer en el citoplasma por varias semanas. De este modo cuando el linfocito T comienza a sufrir división, la cantidad de CFSE presente en cada célula hija será la mitad del de la célula parental (Lyons y Parish.,1994) (Figura 16). En la figura 17A se observa un perfil de citometría con la población celular total de la muestra. La figura 17B corresponde a células de ganglio linfático donde se selecciona solamente población con células CD8⁺.

Figura 14

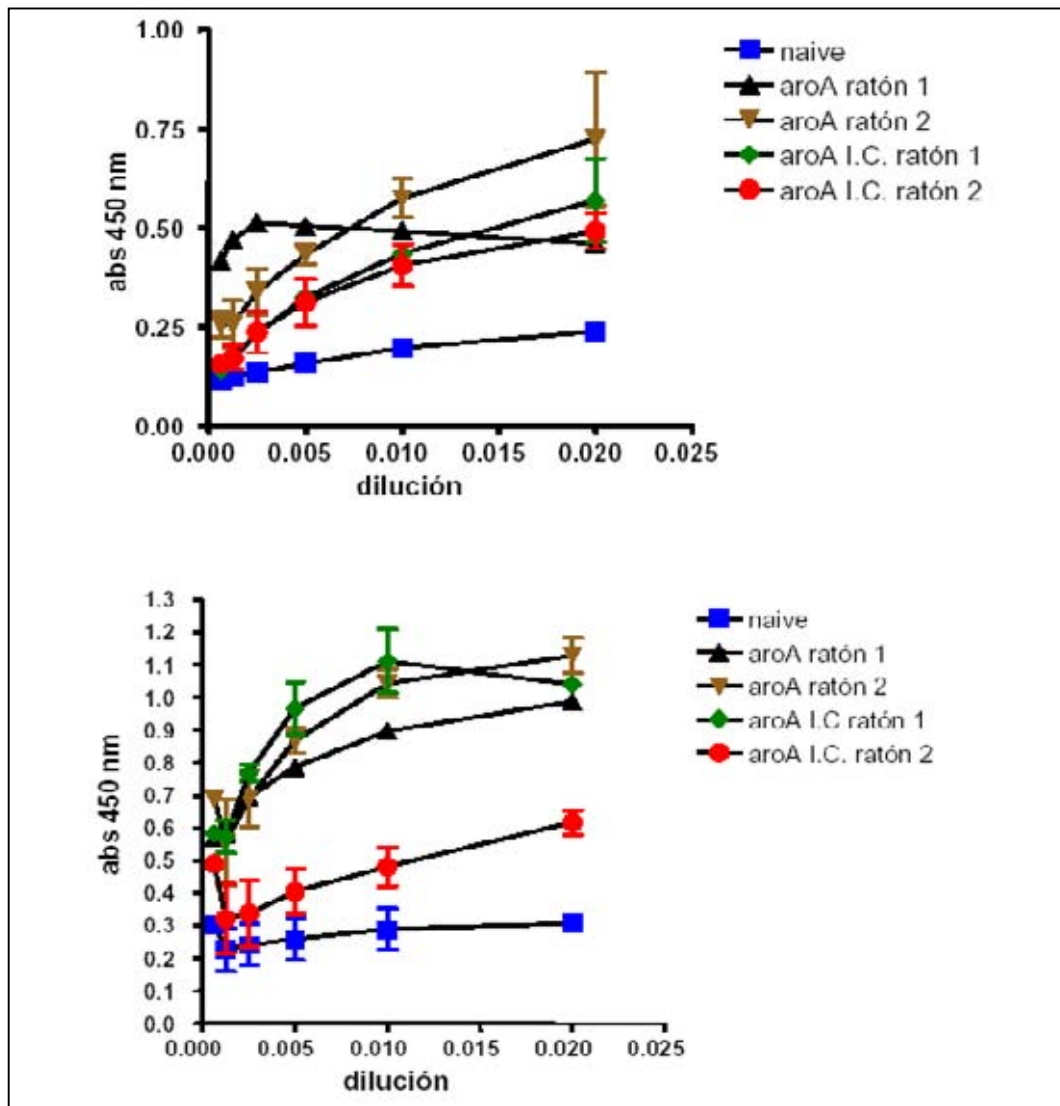


Figura 14. Respuesta humoral contra ova en ratones inmunizados con *Salmonella Typhimurium aroA* recombinante para ovalbúmina. A. Título de anticuerpo anti-ova en ratones inmunizados oralmente con aroA libre y en forma de complejos Inmunes. B. Medición del título de IgG anti-ova luego de una reinoculación a una semana bajo las mismas condiciones de tratamiento. Obsérvese el aumento de anticuerpo para ovoalbúmina en ratones reinmunizados comparados con la respuesta humoral primaria.

72 horas después de la inmunización los ratones C57BL/6 fueron sacrificados, se le extrajo asépticamente bazo y ganglios linfáticos, Finalmente las muestras fueron teñidas con un anticuerpo marcado con un fluorocromo que reconoce específicamente linfocitos T CD8+. Para esta experiencia debiera esperarse que a medida que los linfocitos T OT-I proliferen en respuesta a un estímulo antigénico debería disminuir progresivamente la tinción. En el perfil citométrico de la figura 17C es posible observar una activa proliferación de linfocitos T OT-I en ganglios linfáticos de ratones tratados con *Salmonella typhimurium aroA* que expresa ovoalbúmina comparable incluso con el control de ovoalbúmina. Lo contrario se observó con el control negativo, ratones sin infectar (PBS), que prácticamente no mostraron cambios en la fluorescencia. El desplazamiento hacia la izquierda en el histograma indica disminución en la intensidad de la fluorescencia, lo que se considera proliferación celular.

Figura 15

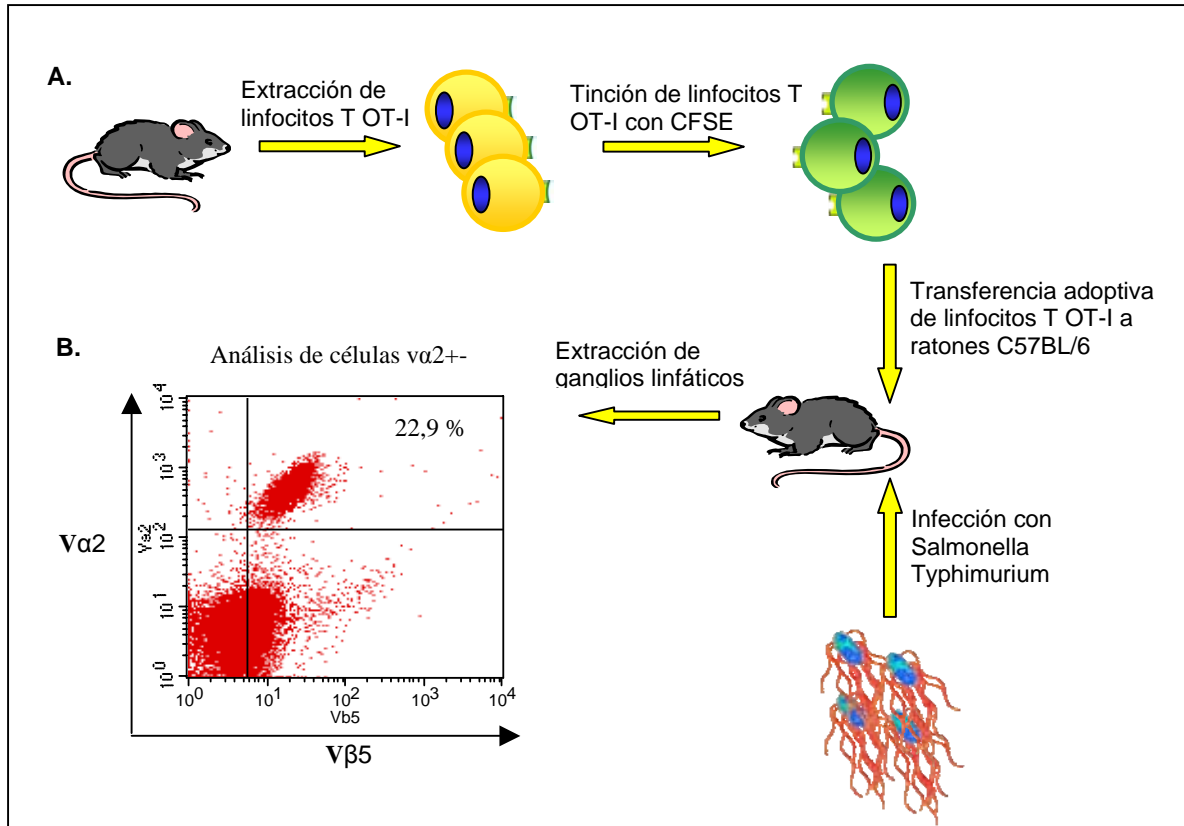


Figura 15. Ensayo de proliferación de linfocitos T OT-I por transferencia adoptiva.

A. Esquema del experimento. Linfocitos T OT-I son extraídos desde un ratón transgénico OT-I y son teñidos con CFSE, para luego ser transferidos intravenosamente a un ratón receptor silvestre. Posteriormente estos últimos fueron inoculados con dosis de *Salmonella typhimurium*. Finalmente son analizados sus ganglios linfáticos por citometría de flujo. **B.** Porcentaje de linfocitos T OT-I en la preparación de ganglio linfático.

Figura 16

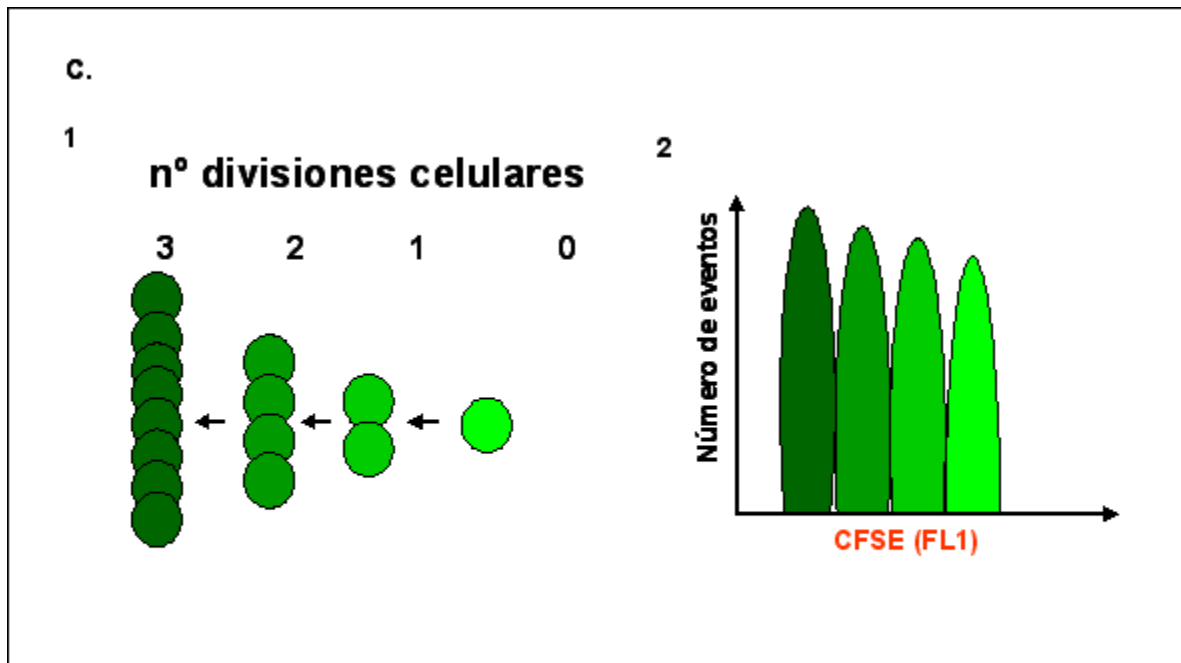


Figura 16. Análisis de linfocitos T teñidos con CFSE por citometría de flujo. Esquema representativo de linfocitos T teñidos con cfse. **C1.** A medida que cada célula comienza a sufrir división la intensidad de fluorescencia disminuye. Cada célula hija tendrá en definitiva la mitad de fluorescencia de la célula parental. **C2.** Por lo tanto en una representación esquemática de un histograma se observará una desplazamiento hacia la izquierda (disminución de la intensidad), y una aumento en el tamaño del pico, que corresponde a un aumento en el número celular.

Figura 17

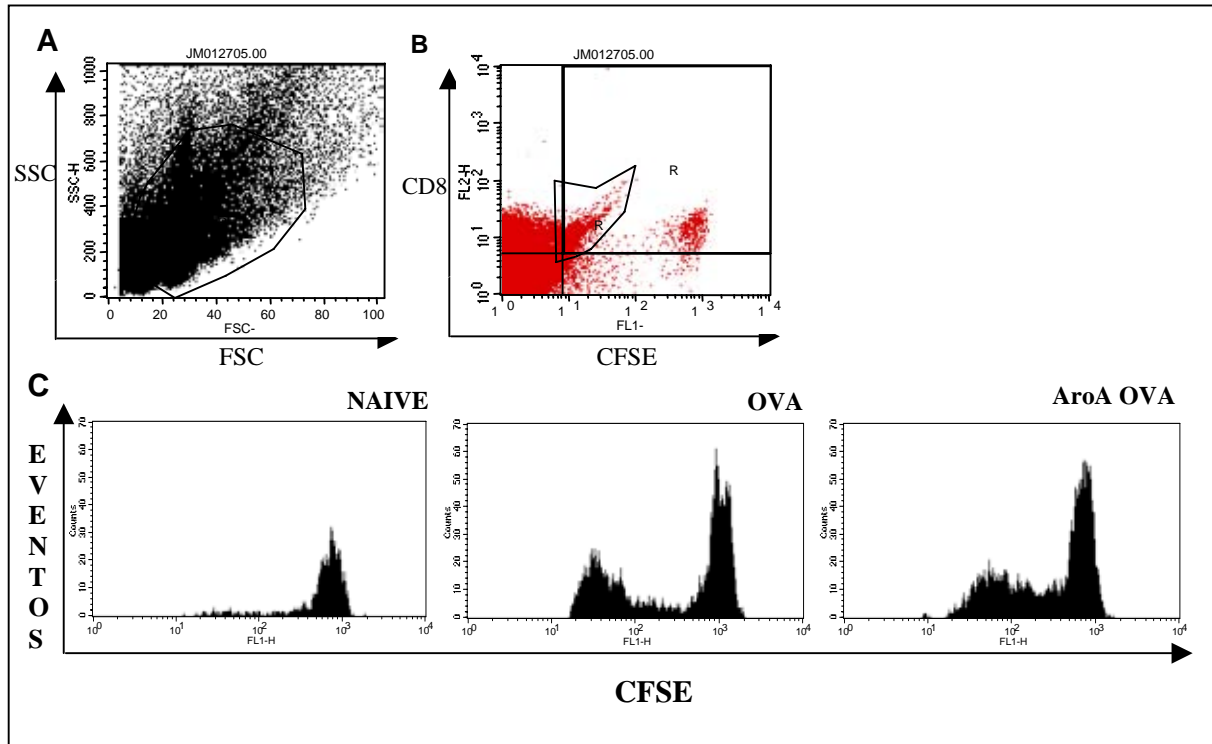


Figura 17. Proliferación de linfocitos T OT-I tras infección con *salmonella Typhimurium*.

Salmonella Typhimurium aroA produce una fuerte proliferación de linfocitos T OT-I. Se extraen linfocitos T OT-I de ganglios linfáticos de ratones transgénicos, los cuales se tiñen con CFSE y se transfieren adoptivamente vía intravenosa a ratones C57BL/6. Al siguiente día son infectados por la misma vía con cepas de bacterias recombinantes. Al tercer día se extraen ganglios y bazo y se analizan por citometría de flujo. **A.** Población celular total de la muestra de ganglio linfático. **B.** Análisis de la población CD 8+. **C.** Histograma de linfocitos T OT-I teñidos con CFSE+ que proliferan luego de la inoculación con *Salmonella Typhimurium aroA*, con sus respectivos controles. Ratones C57BL/6 sin infectar, e inoculado con ovoalbúmina.

5. DISCUSION.

5.1. La tetramerización de los complejos Cys-H-2K^b/SIINFEKL depende del residuo de cisteína libre en el extremo carboxilo terminal de la molécula de Cys- H-2K^b.

Si bien existen métodos estandarizados de biotinylación de la cadena pesada del MHC para generar tetrámeros, que ocupan la enzima BirA de *E.coli* que cataliza la biotinylación de un residuo del aminoácido lisina (Altman y cols;1996, McMichael and O Callaghan,1998), en nuestro laboratorio generamos tetrámeros-pMHC por una técnica mejorada. Esta consiste en añadir el brazo de biotina al MHC mediante un grupo maleimidido reactivo (Kalergis y cols, 2000) en el carboxilo terminal de la molécula de MHC. A través de este método químico evitamos los inconvenientes generados por la utilización de una enzima para catalizar la reacción de biotinylación, así como la posterior eliminación de la enzima o también el hecho que la enzima necesite de una secuencia de aminoácidos específica y de cierta longitud, lo cual podría interferir con las propiedades de plegamiento del MHC (Altman y cols., 1996 y Busch y cols., 1998). A diferencia del procedimiento anterior, este grupo químico es altamente eficiente y específico para cisteína libre, sin afectar la unión de los enlaces disulfuros en la molécula de H-2K^b. Otra característica beneficiosa es la disminución de reacción cruzada con otros aminoácidos en condiciones óptimas de pH.

La técnica utilizada en este trabajo para obtener complejos Cys-H-2K^b/SIINFEKL tetraméricos ensamblados en la conformación correcta, fue la incorporación de un residuo de aminoácido cisteína libre en el extremo C-terminal de la molécula de H-2K^b (posición 276), generando de este modo la molécula Cys-H-2K^b. Por medio de este procedimiento logramos una biotinylación sitio-específica, a través de un grupo maleimidida reactivo que reconoce

covalentemente un grupo SH-libre de la cisteína, cuando la reacción es llevada a un pH 7.0 (Figura 8A). A este pH, el grupo maleimidado posee una elevada afinidad por grupos sulfhídrico libres, incluso su afinidad es 1000 veces mayor hacia este grupo-SH que por otros presentes en la molécula. Por lo tanto, el control del pH en este paso de la reacción es crucial, ya que a valores elevados de pH el grupo maleimidado puede ser susceptible a hidrólisis. Quizás la única limitante de esta técnica consiste en la rigurosidad en el tiempo de biotilación, puesto que un periodo demasiado largo de exposición de biotina con complejos Cys-H-2K^b podría producir uniones inespecíficas de biotina en sitios distintos al residuo de cisteína libre, lo que ocasionaría falsos positivos en su evaluación por ELISA.

Posteriormente los complejos Cys-H-2K^b/SIINFEKL se purificaron del exceso de BMCC en una columna de exclusión molecular y la incorporación de biotina en el extremo C-terminal fue determinada por ELISA. Para esto, se agregaron complejos Cys-H-2K^b/SIINFEKL-biotinilados a placas previamente activadas con Y3, un anticuerpo monoclonal anti-H-2K^b dependiente de su conformación. El hecho que solamente los complejos pMHC biotilados dieron un resultado positivo en el ensayo de ELISA, es indicativo de la unión específica de biotina al residuo de cisteína (Figura 9). Además, la unión del anticuerpo Y3 a los complejos Cys-H-2K^b/SIINFEKL indica que tales complejos fueron capaces de mantener su estado conformacional y por tanto no fueron afectados en la reacción de biotilación.

Los complejos Cys-H-2K^b/SIINFEKL tetraméricos se obtuvieron por medio de la incubación con estreptavidina-PE, una molécula compuesta de cuatro subunidades idénticas, donde cada una presenta alta afinidad ($k_d = 10^{-13}M$) por biotina (Altman y cols.,1996, Busch y cols., 1998, McMichael y O Callaghan,1998). Para asegurar que los cuatro sitios de la estreptavidina sean ocupados por los complejos Cys-H-2K^b/OVA, éstos fueron agregados en

exceso, a una razón molar de 16 complejos pMHC-biotina por cada una de las moléculas de estreptavidina.

5.2. Tetrámeros de Cys-H-2K^b/SIINFEKL y su unión a TCRs específicos.

Para evaluar la capacidad de los tetrámeros de Cys-H-2K^b/SIINFEKL de unirse específicamente a la superficie de células que poseen TCRs específicos para este complejo, el cual presenta la secuencia aminoacídica SIINFEKL derivado de la proteína ovoalbúmina de pollo, utilizamos la técnica de citometría de flujo. Como primer acercamiento utilizamos hibridomas B3Z, que expresan TCRs específicos que reconocen el péptido antigénico derivado de ovoalbúmina en el MHC-I H-2K^b y, por tanto, el único con capacidad de unirse a los tetrámeros de pMHC/OVA. Como control de especificidad utilizamos los hibridomas T N30.7, específico para la misma molécula de MHC, presentando un péptido diferente y la línea celular 58 α - β -, que no expresa cadenas de TCR en su superficie (Letourner, 1989). Ambos tipos celulares no tuvieron la capacidad de unir tetrámeros (Figura 11B). Sin embargo, el método más sensible y decidor para verificar si los complejos Cys-H-2K^b/OVA tetraméricos poseen la capacidad de reconocer el TCR específico, es aquel que utiliza linfocitos T de ratones transgénicos OT-I, los que sólo poseen linfocitos T CD8⁺ con un TCR (V α 2-V β 5) capaz de reconocer de manera específica a el péptido derivado de OVA (Clarke y cols., 2000).

Nuestros datos demuestran la unión de los tetrámeros de pMHC a los linfocitos T de ratones OT-I, hecho que avala la funcionalidad y correcta conformación de los tetrámeros de Cys-H-2K^b/SIINFEKL. La unión de los tetrámeros se evidencia por una población doble positiva para células CD8⁺ y tetrámeros pMHC, definidas claramente en el cuadrante superior derecho del gráfico del centro(Figura 11A). Esta población no se observa en linfocitos T de ratones C57BL/6

naive (no transgénicos). Nótese que el porcentaje de células que unen tetrámeros corresponde a casi la totalidad de las células CD8⁺, demostrando de este modo la total funcionalidad de nuestros tetrámeros pMHC. A diferencia de los hibridomas T y específicamente a los que poseen TCRs específicos para SIINFEKL (B3Z), los linfocitos OT-I tienen la capacidad de reconocer un péptido antigénico en un contexto más cercano al fisiológico, puesto que presenta todas las características propias de una célula T citotóxica *in vivo*. Estas características incluyen proliferación, síntesis de citoquinas e internalización de TCRs luego del encuentro con los complejos pMHC, junto con la modulación de la expresión de moléculas de superficie y la generación de perforinas. Los hibridomas T, en cambio, son menos sensibles al reconocimiento del complejo pMHC. Además, al ser células inmortalizadas no es posible determinar proliferación celular como patrón de activación. Finalmente, existe la constante preocupación de que los hibridomas puedan perder la expresión del TCR resultante de la transfección de estas células.

5.3. Detección de linfocitos T antígeno-específicos tras infección con cepas atenuadas de *Salmonella Typhimurium* mediante tetrámeros de pMHC.

En el último tiempo nuestros esfuerzos han estado destinados a comprender los mecanismos moleculares implicados en la virulencia del patógeno intracelular facultativo *Salmonella typhimurium* para utilizar estos conocimientos en el diseño de técnicas que permitan potenciar la inmunidad anti-bacteriana. Recientemente, nuestro laboratorio ha proporcionado evidencia que este patógeno poseería la capacidad de evadir la presentación de sus antígenos en células dendríticas (DCs) de ratón (Tobar y cols., 2004). Las DCs son un tipo de célula presentadora de antígenos profesional única, con la notable capacidad de activar linfocitos T vírgenes. Se ha demostrado que tales células juegan un rol fundamental en el desarrollo de la

respuesta inmune adaptativa (Banchereau y cols.,2000, Mellman y Steinman.,2001, Itano y Jenkins.,2003). A pesar de ésto, la eficiencia en la presentación de antígenos de cepas de *Salmonella* virulenta en moléculas MHC I y MHC II de la DC se encuentra apreciablemente disminuida, probablemente por un mecanismo especial de virulencia aún no comprendido (Tobar y cols, 2004). Sin embargo la virulencia de este patógeno intracelular no sería del todo ineludible, puesto que estudios *in vitro* realizados en nuestro laboratorio sugieren que cuando las DCs de ratón son pulsadas con *Salmonella* Typhimurium 14028s cubiertas con anticuerpos, es decir en forma de complejos inmunes (ICs), los antígenos bacterianos son eficientemente presentados a hibridomas T antígeno-específicos, activándolos. Estos descubrimientos nos hacen creer que el proceso de captura, procesamiento y presentación de antígenos a través del direccionamiento de antígenos en forma de complejos inmunes a receptores Fc γ R_s expresado en la superficie de la DC podría ser una estrategia apropiada para conferir inmunidad anti-bacteriana. Como las DCs son las células presentadoras de antígeno más potentes de sistema inmune y únicas en activar linfocitos T vírgenes, esperamos medir de manera indirecta el efecto que la internalización de antígenos vía Fc γ R tendrá en estas células y su subsecuente activación de linfocitos T. Para el monitoreo de las poblaciones de linfocitos T CD8⁺ utilizaremos la técnica de tetrámeros de pMHC que han potenciado notablemente el estudio de tales linfocitos en el último tiempo.

Con el fin de establecer un primer acercamiento que nos permita confirmar que la formación de complejos inmunes tendrían un efecto importante en la magnitud de la respuesta inmune y en su capacidad de activar linfocitos T antígeno-específicos *in vivo*, ratones C57BL/6 fueron inmunizados con una cepa atenuada de *Salmonella Typhimurium* libre y en forma de complejos inmunes. Esta cepa de *Salmonella Typhimurium* expresa la proteína OVA como neo-antígeno recombinante.

Si bien nuestros resultados preliminares muestran que ambos tratamientos causan una efectiva activación de linfocitos T citotóxicos, no se aprecia una diferencia significativa en la magnitud de la respuesta inmune cuando se inmuniza con complejos inmunes versus inmunización con bacteria libre detectada mediante tetrámeros Cys-H-2K^b/SIINFEKL (Figura 13C) al cuarto día de infección. Aunque en el último tiempo se ha reportado que puede existir un grado de promiscuidad para el ligando de pMHC clase I por parte del TCR, lo cual podría generar un grado de reacción cruzada usando tetrámeros de pMHC (Davis y cols, 1998, Mason y cols, 1998 y Collins y cols, 1999). Creemos que en nuestro caso la muy baja detección que se registra con el control negativo (PBS), hace despreciable el grado de reacción cruzada si la hubiere. Sin embargo este grado de promiscuidad del TCR por el ligando se ve significativamente disminuido a 37 ° C (Whelan y cols, 1999), por lo cual muchos investigadores llevan a cabo la tinción de CTLs con tetrámeros a esta temperatura. Sin embargo se ha demostrado que linfocitos T pueden internalizar rápidamente los tetrámeros de pMHC cuando son incubados a esta temperatura, provocando una pérdida significativa de la señal de fluorescencia (Whelan y cols, 1999).

Se ha demostrado mediante microscopia confocal que las cepas atenuadas de *Salmonella typhimurium* colocalizan con LAMP-1 en compartimientos lisosomales de la DC, demostrando de este modo su eficiente procesamiento y presentación de sus antígenos, aumentando significativamente la densidad de moléculas MHC en la DC, con este efecto se logra una activación más eficiente de linfocitos T, permitiendo una mejor detección por medio de moléculas de tetrámeros de pMHC específicos de antígeno (Figura 13C). En contraste, cepas virulentas de *Salmonella typhimurium* causan una muy pobre activación de linfocitos T, favoreciendo de esta manera su diseminación, causando la muerte en ratones infectados (Lo y cols, 1999, Wijburg y cols, 2002, Mc Sorley y cols 2000, 2002). Probablemente la bacteria

evitaría la degradación lisosomal y posterior presentación de sus antígenos en las DC (Tobar y cols 2004) evitando la posterior activación de linfocitos T CD8⁺. Por otro lado tampoco se aprecia una diferencia significativa entre ambos tratamientos cuando analizamos la respuesta tipo humoral comparando ambos tratamientos, aunque es importante destacar el significativo aumento de IgGs anti-OVA en la respuesta inmune secundaria. Esto reafirma que siempre que un organismo se enfrenta nuevamente al antígeno el sistema inmune reacciona más rápido y poderosamente en la eliminación del antígeno; recordemos que cuando el antígeno vuelve a entrar al organismo, parte de este antígeno es reconocido por linfocitos de memoria que montan una respuesta más potente que la primaria. Además, los anticuerpos circulantes generados durante la infección primaria aumentan la eficiencia de captura de los complejos inmunes por parte de la DC, lo que a su vez se traduce en una respuesta inmune más amplificada.

A pesar que *a priori* no se observa una diferencia significativa de linfocitos T citotóxicos, internalizados via FcγR en forma de IC *versus* bacteria libre, es importante recalcar el rol de estos receptores en la función de la DC y el sistema inmune. Esto es importante ya que se han observado que otros receptores expresados en la DC, también poseen la capacidad de aumentar la presentación de antígenos exógenos en moléculas de MHC, cuando antígenos son internalizados de esta manera. Entre estos receptores destacan DC-SIGN (Geijtenbeek y cols, 2000, Engering y cols 2002), receptores de manosa (Apostolopoulos y cols, 2001) y muchos otros. Por ende creemos que a tiempos mayores nuestro método de inoculación (bacteria cubierta con anticuerpo), tendrá un efecto más potente en la activación de linfocitos T CD8⁺. A cuatro días post infección la respuesta inmune tipo celular está en su etapa inicial, por lo que a mayores tiempos aumenta la población de linfocitos T citotóxicos alcanzando su máximo alrededor de los 8 días post infección (Pope y cols, 2001).

En conclusión, cepas atenuadas de *Salmonella typhimurium* podrían ser importantes para el desarrollo de una vacuna oral para cepas virulentas de *Salmonella*. En el último tiempo se han destinados múltiples esfuerzos en producir una vacuna eficaz para *Salmonella typhi* (Matsui, H y cols., 2003), agente etiológico de la fiebre tifoidea en humanos. Sin embargo estas no han sido adecuadas en países en los cuales esta enfermedad es endémica, como ha sido el caso de Chile. En nuestro laboratorio actualmente estamos destinando nuestros esfuerzos al diseño de cepas atenuadas de *Salmonella* en modelo de ratón. Nuestra finalidad es el desarrollo de vacunas contra este patógeno intracelular, dirigiéndonos a encontrar nuevos genes asociados a patogenicidad y anular su expresión de modo que tales mutantes pudiesen ser eficazmente presentados y eliminados por células del sistema inmune (Tobar y cols 2005). Para este fin los tetrámeros pMHC cumplen un rol fundamental en la detección de linfocitos T específicos para tales antígenos bacterianos, puesto que un aumento en la población CD8⁺, podría asociarse a una efectividad de la vacuna.

5.4. Detección de la proliferación de linfocitos T *in vivo*, inducida por cepas atenuadas de *Salmonella typhimurium*.

Para confirmar que la respuesta inmune celular producida con la cepa atenuada de *Salmonella typhimurium aroA* efectivamente activa linfocitos T antígeno-específico, realizamos un ensayo de proliferación de células T CD8⁺ *in vivo*. Para ello linfocitos T de ratones transgénicos OT-I, los cuales expresan TCRs que solo reconocen el péptido antigénico derivado de ovoalbúmina (SIINFEKL), fueron teñidos con CFSE⁺ y transferidos a ratones C57BL/6 por vía intravenosa; Al día siguiente a los ratones recipientes se les inyectó por medio de la misma vía 1×10^5 CFU de *Salmonella typhimurium aroA* recombinante para OVA. Tres días después se

analizó por citometría de flujo la presencia de los linfocitos T transferidos, que se observan como una población positiva tanto para CD8⁺-PE y CFSE. Al activarse los linfocitos T por medio de la correcta estimulación antígeno-específica se les induce proliferación celular. La proliferación de estos linfocitos T se evalúa al medir la dilución de la marca de CFSE en la población positiva para CD8⁺. Nuestros resultados arrojaron una proliferación significativa de linfocitos T OT-I, en respuesta a esta infección bacteriana, de manera similar al ratón inmunizado con ovoalbúmina (control positivo). La población CD8⁺CFSE⁺ del ratón naïve, por otro lado, se mantiene en una intensidad de fluorescencia alta para CFSE, evidenciando un baja activación de linfocitos T. Podemos deducir entonces que la bacteria fue efectivamente procesada y que sus antígenos bacterianos presentados en moléculas de MHC en la superficie de células presentadoras de antígeno del ratón activaron vigorosamente a los linfocitos T citotóxicos transgénicos que fueron transferidos.

5.5. Aplicaciones clínicas de los tetrámeros de pMHC.

Debido a sus múltiples características, los tetrámeros de pMHC son un reactivo muy útil para el estudio de las interacciones moleculares que tienen lugar entre el TCR del linfocito T y el complejo pMHC de la APC, puesto que tienen la notable capacidad de detectar, analizar y cuantificar linfocitos T antígeno-específicos. La estrategia de tetramerización de los complejos pMHC aumenta enormemente la estabilidad de la unión del TCR a su ligando. La tetramerización permite superar la baja afinidad intrínseca de la interacción TCR-pMHC, la que causaría una rápida velocidad de disociación en el caso que se utilizasen pMHC monoméricos (Figura 18). Otra ventaja que poseen los tetrámeros pMHC es la facilidad que representa su generación a través del método que describimos en esta tesis, puesto que a través de una biotinylación química

el proceso de obtención presenta un mayor grado de rendimiento y simpleza. Esto se debe a que no considera la introducción de una enzima, la cuál resulta más susceptible a múltiples factores externos como son concentración y especificidad de sustrato, pH, y cofactores enzimáticos. Sin embargo los tetrámeros de MHC no sólo son una herramienta importante en el área de la investigación en ciencia básica, si no que además poseen un enorme potencial en el campo de la biomedicina. Por ejemplo en el área diagnóstica se han utilizado en el último tiempo para evaluar la efectividad de vacunas tumorales (Rubio-Godoy y cols., 2001, Pitter y cols., 2001, Kalergis y cols,2004). Las células tumorales pueden exhibir antígenos distintos a los que se encuentran en células normales del organismo y son estos antígenos los que son reconocidos por linfocitos T $CD8^+$ citotóxicos. Por ende un aumento en la población de linfocitos $CD8^+$ para antígenos tumorales luego de una vacunación, puede ser detectada por el uso de tetrámeros pMHC, lo que a su vez es asociado a un pronóstico positivo de un paciente, ya que un aumento de células $CD8^+$, es una señal del sistema inmune para la eliminación de las células con antígenos anormales (Kalergis y cols, 2004).

Pero no solamente en ámbito de vacunas tumorales los tetrámeros han resultado ser útil, también en el estudio de las enfermedades infecciosas, especialmente de tipo viral pueden aportar información crucial para estudiar el comportamiento y evolución de estas patologías. En pacientes con VIH (Gea – Banacloche y cols., 2000), los tetrámeros MHC han permitido mediante muestras de sangre periférica estudiar el efecto que podrían tener ciertos tratamientos y drogas en el sistema inmune, puesto que al igual que en las vacunas tumorales un aumento en la población $CD8^+$ significaría un respuesta positiva del sistema inmune contra el agente viral.

Figura 18

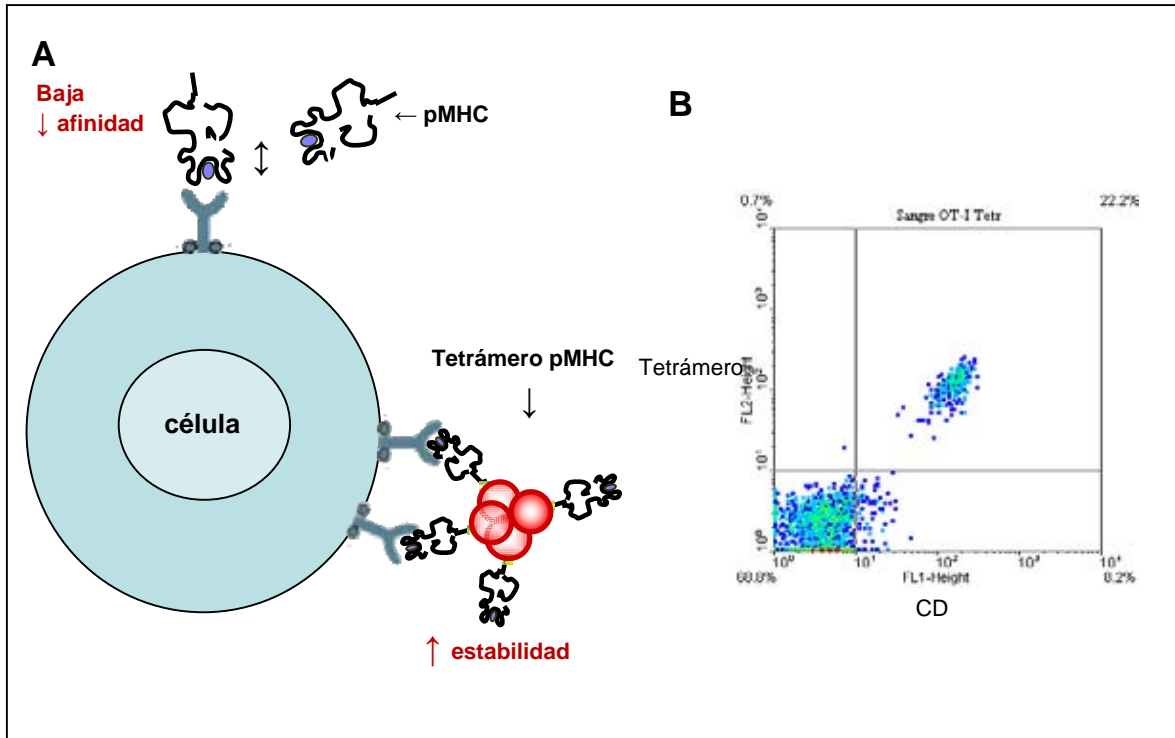


Figura 18. Unión de tetrámeros de pMHC al receptor del linfocito T. La baja afinidad entre el TCR/pMHC hace muy difícil la detección de linfocitos T, haciendo que la velocidad de disociación sea demasiado rápida como para ser monitoreada. Sin embargo la tetramerización de los complejos pMHC sobre una molécula de estreptavidina, aumenta el tiempo de unión entre el pMHC y el TCR del linfocito T, aumentando por tanto la estabilidad en la unión entre el pMHC y el TCR, lo cuál permite su detección por citometría de flujo. B. Análisis fluorimétrico evidenciando una población positiva para los complejos tetraméricos pMHC.

Otro ámbito en que los tetrámeros de pMHC han contribuido enormemente, son las enfermedades autoinmunes. La detección de linfocitos T que presentan antígenos propios autoinmunes en enfermedades como esclerosis múltiples o artritis reumatoidea mediante tetrámeros pMHC podrían ser pronosticados en el diagnóstico de tales enfermedades.

Los tetrámeros pMHC podrían ser utilizados también como armas terapéuticas; tetrámeros pMHC cargados con péptidos que reconocen a linfocitos T autorreactivos pudiesen ser conjugados con moléculas capaces de eliminar a tales linfocitos, moléculas tales como factores del complemento o elementos radiactivos. De este modo se obtiene una terapia destinada a eliminar de modo específico a células perjudiciales del organismo, evitando los tratamientos sistémicos, como los corticoides que producen un efecto en todo el sistema inmune, sin considerar sus múltiples efectos colaterales (Kalergis y cols, 2003).

Recientemente se han utilizados tetrámeros pMHC para detectar linfocitos T autoreactivos en enfermedades como la diabetes tipo I (Kuwana y cols., 1997, Kotzin y cols.2000), tanto en humanos como en ratones. Gracias a esta técnica se han identificados antígenos, como la insulina o la descarboxilisa del ácido glutámico (Wong y cols., 1999., Mateller y Bluestone., 2001), los cuales son reconocidos como extraños por linfocitos T autoreactivos. También se ha demostrado que en personas consideradas en riesgo de desarrollar diabetes autoinmune se han detectados niveles elevados de estas células autorreactivas, cuando sus linfocitos son cuantificados por tetrámeros (Reijonen y cols., 2002). Por lo tanto la cuantificación de linfocitos T autorreactivos podrían en un futuro cercano aportar valiosa información para rastrear a la población susceptible de desarrollar diabetes autoinmune, así como una potencial y valiosa arma para prevenir el desarrollo de estas enfermedades.

6. CONCLUSIONES.

Hemos propuesto que *in vitro* *Salmonella* Typhimurium virulenta ve disminuida su capacidad de evadir la presentación de sus antígenos en DC, cuando son cubiertas con IgG-anti *Salmonella*. Por ello la opsonización de cepas atenuadas de *Salmonella* Typhimurum provocarían una mayor activación de linfocitos T CD8⁺ que bacteria libre. Sin embargo, y a pesar que el mutante metabólico *Salmonella aroA* provoca una vigorosa respuesta CD8⁺, no se aprecia diferencias significativa entre ambas estrategias, cuando son cuantificadas al inicio de la respuesta inmune celular por tetrámeros de pMHC específicos para el antígeno OVA expresado por la bacteria. Sin embargo, la fuerte estimulación de linfocitos T CD8⁺ generados por esta cepa bacteriana nos permiten pensar que estamos bien encaminados hacia el mejor entendimiento de la inmunidad antibacteriana, por ello creemos que es necesario optimizar estas estrategias experimentales. Para esto proponemos el uso de nuevas cepas bacterianas atenuadas, así como también la utilización de IgGs anti-salmonella. La opsonización con IgG permitiría destinarlas a FcγR en las DCs, lo que permitiría potenciar la respuesta inmune celular, evitando la diseminación en el hospedero de este patógeno intracelular. Los tetrámeros de pMHC resultan ser vitales para la detección y cuantificación de los linfocitos T citotóxicos que serán expandidos como resultado de estas estrategias.

7. BIBLIOGRAFÍA.

Altman JD, Moss PA, Goulder PJ, Baroucn DH, Mcheyzer-Williams MG, Bell JI et al. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* (1996); 274: 94-6.

Amrani, Serra P, Yamanouchi J, Trudeau JD, Tan R, Elliott JF et al. Expansion of the antigenic repertoire of a single T cell receptor upon T cell activation. *J Immunol* (2001); 167: 655-66.

Amrani A, Verdaguer J, Serra P, Tafuro S, Tan R, Santamaría P. Progression of autoimmune diabetes driven by avidity maturation of a T-cell population. *Nature* (2000); 406: 739-42.

Apostolopoul, V., y I. F. Mc Kenzie. Rol of the mannose receptor in the immune response. *Curr.Mol. Med* (2001);1:469

Banchereua J, Briere F, Caux C, Davoust J, lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka, K. Immunobiology of dendritic cells.. *Annu Rev Immunol.* (2000). 18: p. 767-811.

Beutler, B.. Innate immune responses to microbial poisons: discovery and function of the Toll-like receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* (2003);43:609-628.

Busch, D.H. Pilip, y E.G. Pamer. Evolution of a complex TCR repertoire during priming and recall bacterial infection. *J Exp Med* (1998); 188:61-70.

Carbone JE, Ohm DP. Immune dysfunction in cancer patients. *Oncology* (2002); 16:118

Carroll, M. C. The role of complement and complement receptors in induction and regulation of immunity. *Annu Rev Immunol* (1998); 16:545-568.

Casares S, Bona CA, Brumeanu TD. Modulation of CD4 T cell function by soluble MHC II-peptide chimeras. *Int Rev Immunol* (2001); 20: 547-73.

Casares S, Brumeanu TD. Insights into the pathogenesis of type 1 diabetes: a hint for novel immunospecific therapies. *Curr Mol Med* (2001); 1: 357-78.

Casares S, Hurtado A, Mcevoy RC, Sarukhan A, Von Boehmer H, Brumeanu TD. Down regulation of diabetogenic CD4+ T cells by a soluble dimeric peptide MHC class II chimera. *Nat Immunol* (2002); 3: 383-91.

Chien YH, Davis MM. How alpha beta T-cell receptors 'see' peptide/MHC complexes. *Immunol Today* (1993); 14: 597-602.

Constante Pope, Sung-Kwon Kim, Amanda Marzo, Kristina Williams, Jiu Jiang, Hao Shen, y Leo Lefrancois. Organo- Specific Regulation of the CD8 T cell Response to *Listeria monocytogenes* Infection. *J Immunol* (2001); 166: 3402-3409.

Davis MM, Bjorkman PJ. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* (1988); 334: 395-402.

Davis MM, Boniface JJ, Reich Z, Lyons D, Hampl J, Arden B et al. Ligand recognition by alpha beta T cell receptors. *Annu Rev Immunol* (1998); 16: 523-44.

Dilorenzo TP, Graser RT, Ono T, Christianson GJ, Chapman HD, Roopenian DC et al. Major histocompatibility complex class I restricted T cells are required for all but the end stage of diabetes development in nonobese diabetic mouse and use a prevalent T cell receptor alpha chain gene rearrangement. *Proc Natl Acad Sci USA* (1998); 95:12538-43

Echchakir H, Dorothee G, Vergnon I, Menez J, Chouaib S, Mami-Chouaib F. Cytotoxic T lymphocytes directed against a tumor-specific mutated antigen display similar HLA tetramer binding but distinct functional avidity and tissue distribution. *Proc Natl Acad Sci USA* (2002); 99: 9358-93.

Eisen HN, Sykulev Y, Tsomides TJ. Antigen-specific T-cell receptors and their reactions with complexes formed by peptides with major histocompatibility complex proteins. *Adv Protein Chem* (1996); 49: 1-56.

Engering, A., T. B. Geijtenbeek, S. J. Van Vliet, M. Wijers, E. Van Liempt, N. Demareux, A. Lanzavecchia, J. Fransen, C. G. Figdor, V. Piguet. The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells. *J. Immunol.* (2002);168: 2118.

Engstrand M, Tournay C, Peyrat MA, Eriksson BM, Wadstrom J, Wirgart BZ et al. Characterization of CMVpp65-specific CD8⁺ T lymphocytes using MHC tetramers in kidney transplant patients and healthy participants. *Transplantation* (2000); 69: 2243-50.

Garboczi DN, Ghosh P, Utz U, Fan QR, Biddison WE, Wiley DC. Structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide and HLA-A2. *Nature* (1996); 384: 134-41.

García KC, Degano M, Pease LR, Huang M, Peterson PA, Teyton L et al. Structural basis of plasticity in T cell receptor recognition of a self peptide MHC antigen. *Science* (1998); 279: 1166-72.

García KC, Degano M, Stanfield RL, Brunmark A, Jackson MR, Peterson PA et al. An alpha beta T cell receptor structure at 2.5 Å and its orientation in the TCR-MHC complex. *Science* (1996); 274: 209-19.

Gea-Banacloche JC, Migueles SA, Martino L, Shupert WL, Mcneil AC, Sabbaghian MS et al. Maintenance of large numbers of virus-specific CD8⁺ T cells in HIV infected progressors and long term nonprogressors. *J Immunol* (2000); 165: 1082-92.

Geijtenbeek, T. B., R. Torensma, S. J. Van Vliet, G. C. Van Duijnhoven, G. J. Adema, Y. Van Kooyk, y C. G. Figdor. Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune response. *Cell* (2000). 100:575.

Gewurz BE, Gaudet R, Tortorella D, Wang EW, Ploegh HL, Wiley DC. Antigen presentation subverted: Structure of the human cytomegalo virus protein US2 bound to the class I molecule HLA A2. *Proc Natl Acad Sci USA* (2001); 98: 6794-9.

Hayder H, Mullbacher A. Molecular basis of immune evasion strategies by adenoviruses. *Immunol Cell Biol* (1996); 74: 504-12.

He XS, Rehermann B, Boisvert J, Mumm J, Maecker HT, Roederer M et al. Direct functional analysis of epitope-specific CD8⁺ T cells in peripheral blood. *Viral Immunol* (2001); 14: 59-69.

He XS, Rehermann B, López-Labrador FX, Boisvert J, Cheung R, Mumm J et al. Quantitative analysis of hepatitis C virus-specific CD8⁺ T cells in peripheral blood and liver using peptide-MHC tetramers. *Proc Natl Acad Sci USA* (1999); 96: 5692-7.

Hidenori Matsui, Masato Suzuki, Yasunoki Isshiki, Chie Kodawa, Masshiro Eguchi, Yuji Kikuchi, Kenji Motokawa, Toshitomi Tomoyasu y Tomoko Yamamoto. Oral immunization with ATP-Dependent protease-deficient mutants protects mice against subsequent oral challenge with virulent *Salmonella enterica* serovar typhimurium. (2003)

Johnson WE, Desrosiers RC. Viral persistence: HIV's strategies of immune system evasion. *Annu Rev Med* (2002); 53: 499-518.

Joseph A. Whelan, P. Rod Dunbar, David A. Price, Marco A. Purbhoo, Franzisk Lecher, Graham S. Ogg, Gillian Griffiths, Rodney E. Phillips, Vincenzo Cerundolo, y Andrew K. Sewell. Specificity of CTL Interactions with Peptide-MHC-class I tetrameric complexes is temperature dependent. *J. Immunol.*(1999);163:4342-4348.

Kalergis AM, Boucheron N, Doucey MA, Palmieri E, Goyarts Ecvegh Z et al. Efficient T cell activation requires an optimal dwell-time of interaction between the TCR and the pMHC complex. *Nat Immunol* (2001); 2: 229-34.

Kalergis AM, Goyarts EC, Palmieri E, Honda S, Zhang W, Nathenson SG. A simplified procedure for the preparation of MHC/peptide tetramers: chemical biotinylation of an unpaired cysteine engineered at the C- terminus of MHC-I. *J Immunol Methods* (2000); 234: 61-70.

Kalergis AM, Nathenson SG. Altered peptide ligand-mediated TCR antagonism can be modulated by a change in a single amino acid residue within the CDR3 beta of an MHC I-restricted TCR. *J Immunol* (2000); 165: 280-5.

Kalergis AM, Nathenson SG. Antigen recognition by β T cells. *Einstein Q J Biol Med* (2000); 17: 56-68.

Kalergis AM, Ono T, Wang F, Dilorenzo TP, Hondas, Nathenson SG. Single amino acid replacements in an antigenic peptide are sufficient to alter the TCR V beta repertoire of the responding CD8+ cytotoxic lymphocyte population. *J Immunol* (1999); 162: 7263-70.

Kalergis AM, Ravetch JV. Inducing tumor immunity through the selective engagement of activating Fc γ receptors on dendritic cells. *J Exp Med* (2002); 195: 1653-9.

Kalergis AM. Modulation of T Cell Immunity by TCR/pMHC Dwell Time and Activating/Inhibitory Receptor Pairs on the Antigen-Presenting Cell. *Curr Pharm Des* (2003); 9: 233-44.

Kalergis AM, Alberto Fierro, Claudio Figueroa G., Pablo Gonzalez, Jaime Tobar. La detección antígeno-específica de linfocitos T y sus aplicaciones clínica, *Rev. Med. Chile*,(2004);132:371-380

Keilholz U, Weber J, Finke JH, Gabrilovich DI, Kast WM, Disis ML et al. Immunologic monitoring of cancer vaccine therapy: results of a workshop sponsored by the Society for Biological Therapy. *J Immunother* (2002); 25: 97-138.

Kersh, G. J., Kersh, E. N., Fremont, D. H., and Allen, P. M. High- and low-potency ligands with similar affinities for the TCR: the importance of kinetics in TCR signaling. *Immunity* (1998); 9:817-826.

Khong HT, Restifo NP. Natural selection of tumor variants in the generation of «tumor escape» phenotypes. *Nat Immunol* (2002); 3: 999-1005.

Kotzin BL, Falta MT, Crawford F, Rosloniec EF, Bill J, Murrack P et al. Use of soluble peptide DR4 tetramers to detect synovial T cells specific for cartilage antigens in patients with rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA* (2000); 97: 2916.

Kuwana M, Medsger TA JR, Wright TM. Highly restricted TCR-alpha beta usage by autoreactive human T cell clones specific for DNA topoisomerase I: recognition of an immunodominant epitope. *J Immunol* (1997); 158: 485-91.

Liu CP, Jiang K, Wu Ch, Lee WH, Lin WJ. Detection of glutamic acid decarboxylase activated T cells with I-Ag7 tetramers. *Proc Natl Acad Sci USA* (2000); 97: 14596-601.

Mami-Chouaib F, Echchakir H, Dorothee G, Vergnon I, Chouaib S. Antitumor cytotoxic T-lymphocyte response in human lung carcinoma: identification of a tumor-associated antigen. *Immunol Rev* (2002); 188: 114-21.

Mandrizzato S, Rossi e, Bernardi F, Tosello V, Macino B, Basso G et al. Large and dissimilar repertoire of Melan-A/MART-1-specific CTL in metastatic lesions and blood of a melanoma patient. *J Immunol* (2002); 169: 4017-24.

Masteller E, Bluestone J. Immunotherapy of insulin dependent diabetes mellitus. *Curr Opin Immunol* (2002); 14: 652-9.

Mc Michael AJ, O'Callaghan CA. A new look at T cells. *J Exp Med* (1998); 187: 1367-71.

Mc Sorley SJ, Cookson BT, Jenkins MK. Characterization of CD4+ T cell responses during natural infection with *Salmonella typhimurium*. *J Immunol* (2000); 164: 986-93.

Mc Sorley SJ, Jenkins MK. Antibody is required for protection against virulent but not attenuated *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Infect Immun* (2000); 68: 3344-8. *Nature* 2000; 406: 739-42.

Netea, M. G., Van Der Graaf, C., Van Der Meer, J. W., y Kullberg, B. J.. Toll-like receptors and the host defense against microbial pathogens: bringing specificity to the innate-immune system. *J Leukoc Biol* (2004); 75:749-55.

Palermo B, Campanelli R, Garbelli S, Mantovani S, Robustelli Della Cuna G, Necker A et al. Cytotoxic T-lymphocyte responses in melanoma through in vitro stimulation with the Melan-A peptide analogue A27L: a qualitative analysis. *Melanoma Res* (2002); 12: 491-8.

Palmowski M, Salio M, Dunbar RP, Cerundolo V. The use of hLA class I tetramers to design a vaccination strategy for melanoma patients. *Immunol Rev* (2002); 188: 155-63.

Pittet MJ, Speiser DE, Lienard D, Valmori D, Guillaume P, Dutoit V et al. Expansion and functional maturation of human tumor antigen-specific CD8+ T cells after vaccination with antigenic peptide. *Clin Cancer Res* (2001); 7: 796s-803s.

Reijonen H, Novak EJ, Kochik S, Heninger A, Liu AW, Kwok WW et al. Detection of GAD65-specific T-cells by major histocompatibility complex class II tetramers in type 1 diabetic patients and at risk subjects. *Diabetes* (2002); 51: 1375-82.

Rubio-Godoy V, Dutoit V, Rimoldi D, Lienard D, Lejeune F, Speiser D et al. Discrepancy between ELISPOT IFN-gamma secretion and binding of A2/peptide multimers to TCR reveals interclonal dissociation of CTL effector function from TCRpeptide/MHC complexes half-life. *Proc Natl Acad Sci USA* (2001); 98: 10302-7.

Sato Y, Nabeta Y, Tsukahara T, Hirohashi Y, Syunsui R, Maeda A et al. Detection and induction of CTLs specific for SYT-SSX-derived peptides in HLAA24(+) patients with synovial sarcoma. *J Immunol* (2002); 169: 1611-8.

Sato Y, Sahara H, Tsukahara T, Kondo M, Hirohashi Y, Nabeta Y et al. Improved generation of HLA class I/peptide tetramers. *J Immunol Methods* (2002);271:177-84

Sebzda, E., Mariathasan, S., Ohteki, T., Jones, R., Bachmann, M. F., y Ohashi, P. S. (1999). Selection of the T cell repertoire. *Annu Rev Immunol* 17:829-874.

Skinner PJ, Daniels MA, Schmidt CS, Jameson SC, Haase AT. Cutting edge: In situ tetramer staining of antigen-specific T cells in tissues. *J Immunol* (2000); 165: 613-7.

Sun D, Whitaker JN, Huang Z, Liu D, Coleclough C, Wekerle H et al. Myelin antigen specific CD8+ T cells are encephalitogenic and produce severe disease in C57BL/6 mice. *J Immunol* (2001); 166: 7579-87.

Svane IM, Boesen M, Engel AM. The role of cytotoxic T-lymphocytes in the prevention and immune surveillance of tumors lessons from normal and immunodeficient mice. *Med Oncol* (1999); 16: 223-38.

Tesselaar K, Arens R, Van Schijndel GM, Baars PA, Van Der Valk MA, Borst J et al. Lethal T cell immunodeficiency induced by chronic costimulation via CD27-CD70 interactions. *Nat Immunol* (2003); 4: 49-54.

Tobar J.A., Gonzalez P.A., Kalergis A.M.. Salmonella escape from antigen presentation can be overcome by targeting bacteria to Fc gamma receptors on dendritic cells. *J Immunol* (2004); 173:4058-4065.

Tobar J.A., Leandro J. Carreño, Susan M. bueno, gonzalez P.A., Jorge E Mora, Sergio A. Quezada and Alexis M. Kalergis. Salmonella Pathogenicity Island-2 is required to evade presentation of bacterial antigens by dendritic cells. *Pnas. manuscrito enviado*(2005).

Van Bleek GM, Nathenson SG. Peptide presentation by major histocompatibility class I molecules. *Chem Immunol* (1993); 57: 1-17.

Wedemeyer H, He Xs, Nascimbeni M, Davis AR, Greenberg HB, Hoofnagle JH et al. Impaired effector function of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells in chronic hepatitis C virus infection.

J Immunol (2002); 169: 3447-58.

Wei CH, Uhlin M, Masucci MG, Levitsky V. Tetramer binding and secretion of interferon-gamma in response to antigenic stimulation are compatible with a range of affinities of MHC:TCR interaction and distinct programs of cytotoxic T-lymphocyte activation. *Hum Immunol* (2002); 63: 821-33.

Immunol (2002); 63: 821-33.

Wong FS, Janeway CA JR. Insulin dependent diabetes mellitus and its animal models. *Curr Opin Immunol* (1999); 11: 643-7.

Immunol (1999); 11: 643-7.

Wong FS, Janeway CA JR. The role of CD4 vs CD8 T cells in IDDM. *J Autoimmun* (1999); 13: 290-5.

Wong FS, Karttunen J, Dumont C, Wen L, Visintin I, Pilip IM et al. Identification of an MHC class I-restricted autoantigen in type 1 diabetes by screening an organ specific cDNA library. *Nat Med* (1999); 5: 1026-31.

Wong FS, Moustakas AK, Wen L, Papadopoulos GK, Janeway CA JR. Analysis of structure and function relationships of an autoantigenic peptide of insulin bound to H-2K(d) that stimulates CD8 T cells in insulin dependent diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci USA* (2002); 99: 5551-6.