



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

UM NOVO SISTEMA DE CLONAGEM BASEADO NA LIPOPROTEÍNA OPRI PARA
OBTENÇÃO DE FORMULAÇÕES IMUNOGÉNICAS DERIVADAS DA PAREDE
CELULAR BACTERIANA

Afonso Silva Pinto Basto

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Presidente:

Professor Doutor Rui Manuel de Vasconcelos e Horta Caldeira

Vogais:

Professor Doutor Luís Manuel Morgado Tavares

Professor Doutor Carlos Manuel Lopes Vieira Martins

Doutor Robert Michael Evans Parkhouse

Professor Doutor João Mário Brás da Piedade

Doutor José Alexandre da Costa Perdigão e Cameira Leitão

ORIENTADOR

Doutor José Alexandre da Costa

Perdigão e Cameira Leitão

CO-ORIENTADOR

Professor Doutor Carlos Manuel

Lopes Vieira Martins



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

UM NOVO SISTEMA DE CLONAGEM BASEADO NA LIPOPROTEÍNA OPRI PARA
OBTENÇÃO DE FORMULAÇÕES IMUNOGÉNICAS DERIVADAS DA PAREDE
CELULAR BACTERIANA

Afonso Silva Pinto Basto

TESE DE DOUTORAMENTO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
ESPECIALIDADE DE SANIDADE ANIMAL

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Presidente:

Professor Doutor Rui Manuel de Vasconcelos e Horta Caldeira

Vogais:

Professor Doutor Luís Manuel Morgado Tavares

Professor Doutor Carlos Manuel Lopes Vieira Martins

Doutor Robert Michael Evans Parkhouse

Professor Doutor João Mário Brás da Piedade

Doutor José Alexandre da Costa Perdigão e Cameira Leitão

ORIENTADOR

Doutor José Alexandre da Costa

Perdigão e Cameira Leitão

CO-ORIENTADOR

Professor Doutor Carlos Manuel

Lopes Vieira Martins

*Aos meus filhos,
Margarida e Manel,
e à Joana*

Agradecimentos

O trabalho agora apresentado resultou da colaboração de diversas pessoas e instituições e teve o apoio de muitos colegas e amigos a quem devo o meu agradecimento.

Em primeiro lugar, aos meus orientadores, com quem tenho tido o grato prazer de aprender e trabalhar desde que terminei o curso de Medicina Veterinária.

Ao Doutor Alexandre Leitão (IICT/CIISA), de quem recebi os mais importantes ensinamentos ao longo destes anos e a quem devo a sugestão do tema da tese, agradeço a permanente disponibilidade e o empenho com que sempre me ajudou a ultrapassar todas as dificuldades. Sem o seu sentido crítico e as suas valiosas opiniões não teria sido possível dar rumo certo a este trabalho.

Ao Professor Doutor Carlos Martins (FMV/CIISA), a quem devo a oportunidade de ter iniciado, há uns anos, o meu percurso na investigação, agradeço todo o saber que me transmitiu, a confiança que em mim sempre depositou e a constante preocupação em me garantir as condições e o apoio necessários para a realização dos meus estudos.

Espero, no futuro, poder continuar a trabalhar com ambos, sedimentando uma amizade que, estou certo, perdurará por muitos anos.

Ao Professor Doutor Pierre Cornelis (VUB), pioneiro no desenvolvimento dos sistemas de expressão baseados na lipoproteína OprI, pelo interesse que sempre mostrou em saber dos avanços e recuos do meu trabalho e pela disponibilidade para os discutir.

Ao Professor Doutor João Piedade (IHMT), pela partilha dos seus vastos conhecimentos sobre o tema da tese, que se revelaram absolutamente decisivos para o desenvolvimento de todo o trabalho.

À Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa (FMV) e ao Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA), na pessoa do Professor Doutor Luís Tavares, por todo o apoio que me tem sido prestado desde que aqui iniciei a minha actividade de investigação.

A todos os que partilharam comigo o seu saber e se disponibilizaram para colaborar na execução de ensaios essenciais para este trabalho: à Professora Doutora Helena Soares (IGC/FCUL/ESTeSL) e ao Rúben Ramalho (IGC/IST) pelos ensaios de microscopia de força atómica; ao Professor Doutor Rui Bessa (FMV/CIISA) e à Susana Alves (INRB/ICBAS) pelos ensaios de caracterização da componente lipídica da lipoproteína; ao Professor Doutor António Duarte (FMV/CIISA), à Marina Badenes (FMV/CIISA) e à Liliana Silva (FMV/CIISA) pela colaboração nos ensaios de imunização; à Doutora Ana Varela Coelho (ITQB), à Doutora Deborah Penque (INSA) e à Doutora Fátima Vaz (INSA) pelos ensaios de espectrometria de massa.

Ao Doutor Michael Parkhouse (IGC), por nos ter cedido o plasmídeo com a sequência da proteína A104R do vírus da peste suína africana e pela colaboração nos ensaios de citometria de fluxo. E também à Ana Luísa Reis (IGC) e à Sofia Nolasco (IICT/CIISA), por nos terem facultado reagentes fundamentais para a realização de alguns ensaios.

A todos os colegas e amigos do Laboratório de Doenças Infecciosas da FMV, Solange Gil, Clara Cartaxeiro, Maria de Jesus Silva, Sílvia Almeida, Rui Vieira, Conceição Trigo e Paula Viana, pela amizade e companheirismo ao longo destes anos. Um agradecimento particular à Clara, pelo apoio nos trabalhos de clonagem, expressão proteica e imunização, e à Sílvia Almeida, pela ajuda nos ensaios de imunização e de citometria de fluxo sem a qual dificilmente teria sido possível realizá-los.

Ao Rodrigo Cunha e à Ana Bastos, que no decurso da sua formação como Médicos Veterinários optaram por estagiar connosco, contribuindo, não apenas para o enriquecimento deste trabalho, mas também para inúmeros momentos de boa disposição no laboratório.

Ao meu colega e amigo Jaime Carvalheira e a seus pais, por nos terem oferecido o galináceo de onde se extraiu a sequência de ovalbumina, peça fundamental do nosso trabalho, e pelo memorável repasto que antecedeu a colheita de material. E também ao meu amigo Gonçalo Matias, que colaborou, com enorme entusiasmo, em ambos os momentos.

Aos meus avós paternos e maternos, a quem também gostava de deixar aqui uma referência, pois julgo ter sido o gosto e o interesse pela ciência, que herdei dos primeiros, associados à curiosidade que sempre tive pela vida e as coisas do campo, muito por influência dos segundos, que me levaram um dia a optar pelo estudo das Ciências Veterinárias.

Aos meus restantes familiares e aos meus amigos, particularmente à minha irmã Mafalda, ao Iván, ao Zeca, à Teresa, ao Miguel, ao Tomás, pelo incentivo e pelo incansável apoio logístico. E uma palavra especial aos meus pais, com quem me esforço por aprender o árduo ofício. Espero poder dar aos meus filhos tanto quanto deles tenho recebido.

À Joana, a quem devo o maior de todos os agradecimentos, por tudo o que tem feito ao longo destes anos por nós os quatro, sempre com uma enorme e invulgar generosidade que não sei se algum dia conseguirei retribuir.

E, por fim, aos meus dois desorientadores, a Margarida e o Manel, pela sua permanente inquietação, sempre tão inspiradora, e pelos abraços, risos e sorrisos, que não sei se contribuem para fazer uma tese mas que chegam bem para fazer um pai feliz.

Apoios Financeiros

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro das seguintes instituições:

FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia através da bolsa de doutoramento SFRH/BD/23486/2005 e no âmbito do projecto POCI/CVT/59122/2004.

Comissão Europeia, Sétimo Programa-Quadro, no âmbito do projecto KBBE-2007-1-05, #211691 (ASFRISK).

Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA) da Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa (FMV).

FCT Fundação para a Ciência e a Tecnologia
MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E ENSINO SUPERIOR



Um novo sistema de clonagem baseado na lipoproteína OprI para obtenção de formulações imunogénicas derivadas da parede celular bacteriana

Resumo

A modulação de imunidade específica por conjugação de antígenos com ligandos de receptores de reconhecimento de padrão (PRR) constitui uma estratégia emergente para o desenvolvimento de vacinas subunitárias. Neste trabalho, desenvolve-se um novo sistema de clonagem em *Escherichia coli* para expressão de antígenos em fusão com a lipoproteína OprI, um ligando TLR da membrana externa de *Pseudomonas aeruginosa*. O sistema permite um controlo apertado da expressão proteica e a purificação por cromatografia de afinidade com iões metálicos, ultrapassando as principais limitações de versões anteriores. Confirmou-se o processamento, translocação e triacilação da lipoproteína e desenvolveram-se protocolos para a produção de outras formulações recombinantes derivadas da parede bacteriana (fragmentos e vesículas de membrana externa) com potencial distinto para activação PRR. Como modelo, clonaram-se as sequências dos antígenos A104R do vírus da peste suína africana (VPSA), ovalbumina e EGFP. Demonstrou-se a capacidade adjuvante das três formulações, avaliando a resposta humoral e a indução de linfócitos T CD8⁺ *in vivo* e o perfil de citocinas e quimiocinas induzidas em células dendríticas estimuladas *in vitro*. Os resultados observados validam o sistema para a obtenção de formulações imunogénicas com aplicação no desenvolvimento de vacinas subunitárias experimentais e em estudos de modulação de resposta adaptativa.

Palavras-chave: lipoproteína I da membrana externa; OprI; *Pseudomonas aeruginosa*; proteínas da membrana externa bacteriana; vector de clonagem; imunomodulação; adjuvante; padrões moleculares associados a microrganismos patogénicos; vírus da peste suína africana; ovalbumina

A new cloning system based on the OprI lipoprotein for the production of bacterial cell wall-derived immunogenic formulations

Abstract

The modulation of specific immunity through the conjugation of antigens with ligands of pattern recognition receptors (PRR) is emerging as a promising strategy for the development of subunit vaccines. Here, a new *Escherichia coli* cloning system for the expression of antigens in fusion with the OprI lipoprotein, a TLR ligand from the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane, is described. The system offers tight regulation of expression and allows for purification by metal affinity chromatography, circumventing the major drawbacks of former versions. Lipoprotein processing, translocation and triacylation were confirmed and protocols for the productions of other recombinant bacterial cell wall-derived formulations (outer membrane fragments and vesicles) with distinct potential for PRR activation were developed. As models, the sequences coding for the antigens A104R from African swine fever virus (ASFV), ovalbumin and EGFP were cloned. The adjuvant capacity of the three formulations was demonstrated evaluating the induction of humoral and CD8⁺ T cells responses *in vivo* and the cytokine and chemokine profile induced in dendritic cells stimulated *in vitro*. The results observed validate the system for the production of immunogenic formulations suitable for the development of experimental subunit vaccines and for studies on the modulation of adaptive immunity.

Keywords: outer membrane lipoprotein I; OprI; *Pseudomonas aeruginosa*; bacterial outer membrane proteins; cloning vector; immunomodulation; adjuvant; pathogen-associated molecular patterns; African swine fever virus; ovalbumin

Índice

Capítulo 1. Introdução Geral	1
1.1 Breve história dos sistemas de clonagem baseados em OprI.....	3
1.2 O papel da imunidade inata no controlo da imunidade adaptativa	6
1.3 Receptores de reconhecimento de padrão e seus ligandos.....	8
1.3.1 TLR.....	8
1.3.1.1 Receptores expressos na superfície celular – TLR2/1/6, TLR4, TLR5 e TLR11.....	10
1.3.1.1.1 TLR2/1/6.....	10
1.3.1.1.2 TLR4	12
1.3.1.1.3 TLR5 e TLR11	12
1.3.1.2 Receptores expressos em vesículas intracelulares - TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9.....	13
1.3.1.3 Vias de sinalização activadas por ligação a TLR.....	14
1.3.2 NLR, RLR e CLR.....	16
1.4 O efeito da activação TLR em funções de células apresentadoras de antígenos.....	19
1.4.1 Migração e internalização.....	19
1.4.2 Processamento e apresentação antigénica em contexto de MHC classe II.....	20
1.4.3 Co-estimulação: imunidade <i>versus</i> tolerância	22
1.4.4 Polarização de linfócitos Th	22
1.4.5 Apresentação cruzada	26
1.5 Activação TLR em linfócitos e células não-imunitárias.....	29
1.6 Modulação de imunidade específica por ligandos de PRR em imunização e imunoterapia	30
1.6.1 Adjuvantes derivados de ácidos nucleicos	31
1.6.2 Adjuvantes derivados da parede celular bacteriana.....	33
1.6.2.1 Lipoproteínas nativas e lipopéptidos sintéticos: TLR1/2/6	33
1.6.2.2 LPS e derivados do lípido A: TLR4	37
1.6.2.3 Flagelina: TLR5 e NLR	38
1.6.2.4 Formulações complexas derivadas de paredes celulares bacterianas: TLR4, TLR2, TLR5, NOD(?).....	38
1.6.3 Relevância da ligação física entre ligando PRR e antígeno na modulação da resposta imunitária específica	40
1.6.4 Efeitos sinérgicos da activação de diferentes PRR na resposta imunitária	41
1.7 Objectivos gerais.....	43
Capítulo 2. Desenvolvimento e caracterização de um novo sistema de clonagem e expressão baseado na lipoproteína OprI.....	45
2.1 Introdução	47
2.2 Materiais e métodos	52
2.2.1 Estirpes bacterianas e plasmídeos	52

2.2.2	Oligonucleótidos iniciadores para amplificação por PCR	53
2.2.3	Amplificação de DNA por PCR.....	53
2.2.4	Electroforese em gel de agarose.....	54
2.2.5	Purificação de DNA	54
2.2.6	Hidrólise, desfosforilação e ligação de fragmentos de DNA.....	55
2.2.7	Quantificação de DNA.....	56
2.2.8	Preparação e transformação de células competentes de <i>Escherichia coli</i>	56
2.2.9	Rastreio de clones recombinantes por PCR (“colony PCR”)	57
2.2.10	Culturas bacterianas e expressão de proteínas	57
2.2.11	Purificação de DNA plasmídico	58
2.2.12	Preparação de extractos proteicos totais	58
2.2.13	Preparação de fracções de membrana externa	58
2.2.14	Preparação de vesículas de membrana externa	59
2.2.15	Deslipidificação de membranas externas por tratamento com ácido tricloraacético/acetona.....	59
2.2.16	Deslipidificação de membranas externas por tratamento com clorofórmio/metanol	59
2.2.17	Rastreio de detergentes para solubilização de fragmentos de membrana externa.....	60
2.2.18	Avaliação de citotoxicidade pelos detergentes Triton X-100 e OG.....	60
2.2.19	Cromatografia de afinidade.....	61
2.2.20	Teste de adsorção de lipoproteína a tubos de polipropileno	62
2.2.21	Electroforese em gel de poliacrilamida/SDS (SDS-PAGE)	62
2.2.22	Transferência de proteínas para membrana de nitrocelulose	63
2.2.23	Deposição de amostras em membrana de nitrocelulose para “dot blot”	64
2.2.24	Detecção específica de OprI em membranas de nitrocelulose (“western blot” e “dot blot”).....	64
2.2.25	Caracterização da componente lipídica da OprI purificada	64
2.2.26	Microscopia de força atómica	66
2.2.27	Quantificação de proteína pelo método do ácido bicinconínico	66
2.2.28	Quantificação de LPS.....	67
2.2.29	Quantificação de peptidoglicano.....	67
2.3	Resultados	68
2.3.1	Construção de novos vectores plasmídicos de clonagem e expressão baseados no gene <i>oprI</i>	68
2.3.2	O novo sistema permite o controlo da expressão basal de <i>oprI</i>	72
2.3.3	Após indução de expressão, a OprI é processada e inserida na membrana externa da célula hospedeira.....	73
2.3.4	Após indução de expressão, a OprI está presente no meio de cultura devido à libertação de vesículas de membrana externa da bactéria hospedeira.....	75

2.3.5	A cromatografia de afinidade de extractos de membrana externa deslipidificados permite a purificação de OprI	75
2.3.6	A OprI expressa e purificada a partir de <i>Escherichia coli</i> é uma lipoproteína triacilada	81
2.3.7	Antigénios heterólogos clonados no sistema podem ser obtidos em três formulações diferentes com potencial distinto para activação de PRR	83
2.4	Discussão	87
Capítulo 3. Caracterização de propriedades imunomoduladoras das formulações obtidas com o novo sistema baseado em OprI		
3.1	Introdução	95
3.2	Materiais e métodos	98
3.2.1	Clonagem de sequências dos antigénios modelo OVA e EGFP	98
3.2.1.1	Oligonucleótidos iniciadores para amplificação por PCR	98
3.2.1.2	Clonagem	99
3.2.1.3	Rastreamento de clones recombinantes	100
3.2.2	Expressão e purificação de antigénios de fusão	100
3.2.3	Electroforese em gel de poliacrilamida/SDS e “western blot”	101
3.2.4	Quantificação de proteína, LPS e peptidoglicano	101
3.2.5	Imunização	101
3.2.6	Determinação de níveis de IgG anti-OVA em soro de ratinho	102
3.2.7	Detecção de linfócitos CD8 ⁺ específicos de OVA ₂₅₇₋₂₆₄ (epitopo SIINFEKL)	102
3.2.8	Diferenciação e cultura de células dendríticas derivadas da medula óssea de ratinho	104
3.2.9	Estimulação <i>in vitro</i> de células dendríticas	105
3.2.10	ELISA para detecção de citocinas em sobrenadantes de culturas estimuladas	105
3.2.11	Imunodetecção de um painel de mediadores de resposta imunitária em membrana de nitrocelulose (“array”)	106
3.3	Resultados	107
3.3.1	Clonagem, obtenção e caracterização de OVA e EGFP	107
3.3.1.1	Clonagem de sequências de OVA e EGFP em pOLT7	107
3.3.1.2	Expressão de OVApx e EGFP em fusão com OprI	113
3.3.1.3	Obtenção das formulações OprI-OVApx, OMF-OVApx e OMV-OVApx e determinação do seu conteúdo em LPS e peptidoglicano	114
3.3.2	Ensaio preliminar de imunização	115
3.3.3	Ensaio de imunização	117
3.3.3.1	Resposta humoral	117
3.3.3.1.1	Cinética dos níveis de anticorpos IgG	117
3.3.3.1.2	Determinação dos níveis de subclasses de IgG	119
3.3.3.2	Avaliação da resposta por linfócitos CD8 ⁺ específicos por marcação com pentámeros de complexos MHC classe I/SIINFEKL	121

3.3.4	Avaliação preliminar da capacidade estimuladora das três formulações em células dendríticas.....	124
3.3.5	Perfil de citocinas e quimiocinas secretadas por células dendríticas em resposta a estimulação pelas 3 formulações	125
3.4	Discussão.....	131
Capítulo 4.	Conclusões gerais e perspectivas futuras	139
Bibliografia...	147

Lista de Figuras

Figura 1 – Modelos de dimerização de TLR desenvolvidos a partir de estudos de cristalografia.	11
Figura 2 – Resumo das vias de sinalização activadas por ligação a TLR	15
Figura 3 – Péptidos-sinal da lipoproteína de Braun de <i>Escherichia coli</i> e de OprI de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	47
Figura 4 – Processamento das lipoproteínas bacterianas triaciladas.	48
Figura 5 - Representação gráfica da região de clonagem/expressão dos vectores baseados em <i>oprI</i>	70
Figura 6 - O novo sistema permite o controlo da expressão basal de <i>oprI</i>	73
Figura 7 - A OprI é processada e inserida na membrana externa da célula hospedeira.	74
Figura 8 - A OprI está presente no meio de cultura devido à libertação de vesículas de membrana externa (OMV).	76
Figura 9 - A completa deslipidificação dos extractos de membrana externa (ME) é necessária para a purificação de OprI.	78
Figura 10 – A purificação a partir de preparações de membrana externa por cromatografia de afinidade em condições nativas resulta em eluatos maioritariamente compostos por OprI mas contaminados com outras proteínas.	79
Figura 11 – A lipoproteína OprI purificada e armazenada em microtubos convencionais de polipropileno é perdida por adsorção à superfície plástica durante o armazenamento.	81
Figura 12 - A OprI expressa e purificada no novo sistema é uma lipoproteína triacilada.	82
Figura 13 – Os detergentes OG, DM e DDM demonstram maior eficiência na solubilização de fragmentos de membrana contendo OprI.	83
Figura 14 – O detergente OG é mais bem tolerado por células eucariotas do que o detergente Triton X-100.	84
Figura 15 - O novo sistema permite a produção de três formulações imunogénicas.	85
Figura 16 – Sequência aminoacídica teórica da prolipoproteína de fusão OprI-A104R codificada no vector pOLT7-A104R.	86
Figura 17 – As reacções de PCR com os iniciadores OVAt e OVAp originaram amplificação específica a partir do cDNA de amostras colhidas da região do magno do oviduto de uma galinha em fase de postura.	108
Figura 18 – Análise em géis de agarose a 2% (p/v) dos produtos de amplificação originados por PCR nos diferentes passos de clonagem para obtenção dos plasmídeos pOLT7-OVAt, pOLT7-OVAp, pOLT7-EGFP e pOLT7-OVApX.	109
Figura 19 – Sequência aminoacídica teórica da prolipoproteína de fusão OprI-OVAt codificada no vector pOLT7-OVAt.	110
Figura 20 – Sequência aminoacídica teórica da prolipoproteína de fusão OprI-OVAp codificada no vector pOLT7-OVAp.	111
Figura 21 – Sequência aminoacídica teórica da prolipoproteína de fusão OprI-EGFP codificada no vector pOLT7-EGFP.	111
Figura 22 – Sequência aminoacídica teórica da prolipoproteína de fusão OprI-OVApX codificada no vector pOLT7-OVApX.	112

Figura 23 – Análise da presença dos produtos de fusão OprI-OVApx e OprI-EGFP expressos a partir de pOLT7-OVApx e pOLT7-EGFP, respectivamente, em extractos de membrana externa e em eluatos de cromatografia de afinidade.	114
Figura 24 – Obtenção das três formulações, OprI-OVApx, OMF-OVApx e OMV-OVApx, utilizando o plasmídeo pOLT7-OVApx para expressão da proteína de fusão.	115
Figura 25 – Avaliação por ELISA de níveis de IgG em animais imunizados com as três formulações contendo OVApx para determinação de doses a inocular no ensaio de imunização.	116
Figura 26 – Cinética dos níveis de anticorpos IgG específicos de OVA nos soros de animais inoculados com as três formulações contendo OVApx.	118
Figura 27 – Níveis de anticorpos de subclasses de IgG específicas de OVA nos soros colhidos no final do protocolo de imunização.	120
Figura 28 – Resultados de citometria de fluxo de ensaios de optimização da técnica de pentâmeros de moléculas MHC classe I para detecção de linfócitos CD8 ⁺ específicos para o epitopo SIINFEKL de OVA.	122
Figura 29 – Percentagem de linfócitos CD8 ⁺ específicos para o epitopo SIINFEKL de OVA (OVA ₂₅₇₋₂₆₄) no final do protocolo de imunização.	124
Figura 30 – Ensaio preliminar de estimulação de células dendríticas com as três formulações.	125
Figura 31 – Determinação por ELISA dos níveis de TNF- α , IL-12 e IP-10 em sobrenadantes de culturas estimuladas pelas três formulações.	126
Figura 32 – Película de auto-radiografia exposta às membranas do “array” para detecção de citocinas e quimiocinas em sobrenadantes de culturas de células dendríticas estimuladas com as três formulações.	129
Figura 33 – Níveis de citocinas/quimiocinas em sobrenadantes de culturas de células dendríticas estimuladas com OprI, OMF, OMV e RPMI, como controlo negativo, determinados por um ensaio de “array” em membrana de nitrocelulose.	130
Figura 34 – Rácios entre pares de formulações dos valores de densidade de píxeis obtidos no ensaio de “array”.	131

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Receptores TLR e respectivos ligandos	9
Tabela 2 – NLR, RLR e CLR	17
Tabela 3 – Novos vectores baseados em <i>oprI</i> e seus produtos de expressão.	72
Tabela 4 – Plasmídeos recombinantes com sequências dos antígenos modelo OVA e EGFP	113

Lista de Abreviaturas

ABTS	ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico), do inglês “2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)”
AFM	microscopia de força atômica, do inglês “atomic force microscopy”
AIDA	do inglês “adhesin involved in diffuse adhesion”
ALFA	ácido gordo com ligação amida, do inglês “amide-linked fatty acid”
AP-1	do inglês “activator protein 1”
APC	células apresentadoras de antígeno, do inglês “antigen presenting cells”
ATP	adenosina trifosfato, do inglês “adenosine triphosphate”
BCA	ácido bicinconínico, do inglês “bicinchoninic acid”
BCG	bacilo de Calmette-Guérin
BLC	do inglês “B lymphocyte chemoattractant”
BSA	albumina sérica de bovino, do inglês “bovine serum albumin”
C/P/MI	citoplasma/periplasma/membrana interna
CCL	ligando de quimiocina CC, do inglês “CC chemokine ligand”
CCR	receptor de quimiocinas CC, do inglês “CC chemokine receptor”
CD	grupo de diferenciação, do inglês “cluster of differentiation”
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementar, do inglês “complementary deoxyribonucleic acid”
CFSE	éster carboxifluoresceína de succinimidilo, do inglês “Carboxyfluorescein succinimidyl ester”
CIISA	Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal
CLIP	péptido da cadeia invariante associado a MHC classe II, do inglês “class II-associated invariant chain-derived peptide”
CLR	receptores de lectinas do tipo C, do inglês “C-type lectin receptors”
COX	ciclooxigenase
CpG	dinucleótido de citosina-guanina
CWS	esqueleto da parede celular, do inglês “cell wall skeleton”
CXCL	ligando de quimiocina CXC, do inglês “CXC chemokine ligand”
CXCR	receptor de quimiocinas CXC, do inglês “CXC chemokine receptor”
D.O.	densidade óptica
Da	dalton
DAMP	padrões moleculares associados a dano, do inglês “damage-associated molecular patterns”)
DC-SIGN	do inglês “Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin”
DDM	n-dodecil-β-D-maltopiranósido
DM	n-decil-β-D-maltopiranósido
DMEM	do inglês “Dulbecco's Modified Eagle Medium”
DNA	ácido desoxirribonucleico, do inglês “deoxyribonucleic acid”

dNTP	desoxirribonucleótido trifosfato
dsDNA	ácido desoxirribonucleico de cadeia dupla, do inglês “double-stranded deoxyribonucleic acid”
dsRNA	ácido ribonucleico de cadeia dupla, do inglês “double-stranded ribonucleic acid”
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético, do inglês “ethylenediaminetetraacetic acid”
EGF	factor de crescimento epidérmico , do inglês “epidermal growth factor”
EGFP	proteína verde fluorescente melhorada, do inglês “enhanced green fluorescent protein”
ELFA	ácido gordo com ligação éster, do inglês “ester-linked fatty acid”
ELISA	do inglês “enzyme-linked immunosorbent assay”
ERK1/2	do inglês “extracellular signal regulated protein kinases”
ESTeSL	Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa
Fc	fragmento cristalizável
Fc γ R	receptor γ do fragmento cristalizável, do inglês “fragment crystallizable γ receptor”
FCUL	Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa
FITC	isotiocianato de fluoresceína, do inglês “fluorescein isothiocyanate”
FMV	Faculdade de Medicina Veterinária
FSC	dispersão frontal, do inglês “forward scatter”
FSL	do inglês “fibroblast-stimulating lipopeptide”
G-CSF	do inglês “granulocyte colony-stimulating factor”
GFP	proteína verde fluorescente, do inglês “green fluorescent protein”
GM-CSF	do inglês “granulocyte-macrophage colony-stimulating factor”
h	horas
HEPES	ácido N-2-hidroxietil piperazina-N’-2-etano sulfónico
Hib	<i>Haemophilus influenzae</i> do tipo b
HRP	peroxidase de <i>Armoracia rusticana</i> , do inglês “horseradish peroxidase”
hsp60	do inglês “heat-shock protein 60”
ICAM	do inglês “inter-cellular adhesion molecule”
ICBAS	Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar
ICOS	do inglês “inducible T-cell costimulator”
iE-DAP	ácido γ -D-glutamil-meso-diaminopimélico
IFN	interferão, do inglês “interferon”
Ig	imunoglobulina
IGC	Instituto Gulbenkian de Ciência
IHMT	Instituto de Higiene e Medicina Tropical
IICT	Instituto de Investigação Científica Tropical
IL	interleucina

IL-1RA	do inglês “IL-1 receptor antagonist”
INRB	Instituto Nacional dos Recursos Biológicos
INSA	Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge
IP-10	do inglês “IFN- γ -inducible protein 10”
IPAF	do inglês “IL-1 β converting enzyme protease activating factor”
IPTG	isopropil-tio- β -D-galactósido
IRF	do inglês “interferon regulatory transcription factor”
ISS	sequências imunoestimuladoras, do inglês “immunostimulatory sequences”
IST	Instituto Superior Técnico
I-TAC	do inglês “interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant”
ITQB	Instituto de Tecnologia Química e Biológica
JNK	do inglês “c-Jun N-terminal kinases”
KC	do inglês “keratinocyte cell-derived chemokine”
L	litro
LAL	lisado de amebócitos de <i>Limulus</i>
LB	Luria Bertani
LBP	do inglês “LPS binding protein”
LCM	local de clonagem múltipla
LDI	Laboratório de Doenças Infecciosas
LGP-2	do inglês “laboratory of genetics and physiology 2”
LMP	do inglês “large multifunctional proteasome”
LPS	lipopolissacárido
LRR	repetições ricas em leucina, do inglês “leucine-rich repeats”
LT	toxina letal, do inglês “lethal toxin”
LTC	linfócitos T CD8 ⁺ citotóxicos
m/z	massa/carga
MACS	separação celular magnética, do inglês “magnetic-activated cell sorting”
MALDI-TOF	do inglês “matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight”
MALP-2	do inglês “macrophage-activating lipopeptide 2”
MAPK	do inglês “mitogen-activated protein kinases”
MARCH	do inglês “membrane-associated RING-CH”
MCP	do inglês “monocyte chemotactic protein”
M-CSF	do inglês “macrophage colony-stimulating factor”
MD-2	do inglês “myeloid differentiation factor-2”
MDA-5	do inglês “melanoma differentiation-associated gene 5”
MDC	do inglês “macrophage-derived chemokine”
MDP	muramildipéptido
ME	membrana externa

MECL	do inglês “multicatalytic endopeptidase complex-like”
MHC	complexo maior de histocompatibilidade, do inglês “major histocompatibility complex”
MIG	do inglês “monokine induced by gamma-interferon”
min	minutos
MIP	do inglês “macrophage inflammatory protein”
MPL	lípidio A monofosforilado, do inglês “monophosphoryl Lipid A”
mRNA	ácido ribonucleico mensageiro, do inglês “messenger ribonucleic acid”
MyD88	do inglês “myeloid differentiation primary response gene (88)”
NALP	do inglês “NACHT, LRR and pyrin domain containing protein”
NF-κB	do inglês “nuclear factor-κB”
NK	do inglês “natural killer”
NLR	receptores “NOD-like”, do inglês “NOD-like receptors”
NOD	do inglês “nucleotide-binding oligomerization domain”
°C	graus Célsius
ODN	oligodesoxinucleótidos
OG	Octil-β-D-glucopiranosídeo
OMF	fragmentos de membrana externa, do inglês “outer membrane fragments”
OMPC	complexo de proteínas da membrana externa, do inglês “outer membrane protein complex”
OMV	vesículas de membrana externa, do inglês “outer membrane vesicles”
OprI	lipoproteína I da membrana externa, do inglês “outer membrane lipoprotein I”
OVA	ovalbumina
p/v	peso/volume
PAGE	electroforese em gel de poliacrilamida, do inglês “polyacrylamide gel electrophoresis”
PAMP	padrões moleculares associados a microrganismos patogénicos, do inglês “pathogen-associated molecular patterns”
pb	pares de bases
PBS	solução salina tamponada com fosfatos, do inglês “phosphate-buffered saline”
PCR	reação em cadeia da enzima DNA polimerase, do inglês “polymerase chain reaction”
PE-Cy5	ficoeritrina-cianina 5, do inglês “phycoerythrin-cyanine 5”
PMSF	fenilmetilsulfonilfluoreto, do inglês “phenylmethylsulfonyl fluoride”
Poly(I:C)	ácido poli-inosínico:policitidílico, do inglês “polyinosinic polycytidylic acid”
PRR	receptores de reconhecimento de padrão, do inglês “pattern recognition receptors”
PSA	peste suína africana

r.p.m.	rotações por minuto
RANTES	do inglês “regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted”
RIG-I	do inglês “retinoic acid-inducible gene-I”
RLR	receptores “RIG-I-like”, do inglês “RIG-I-like receptors”
RNA	ácido ribonucleico, do inglês “ribonucleic acid”
RNase A	ribonuclease A
RP105	do inglês “radioprotective protein 105 kDa”
R-PE	R-ficoeritrina, do inglês “R-phycoerythrin”
RPMI	do inglês “Roswell Park Memorial Institute”
sarcosil	<i>N</i> -lauril-sarcosinato de sódio
SDF	do inglês “stromal cell-derived factor”
SDS	dodecilsulfato de sódio, do inglês “sodium dodecyl sulphate”
seg	segundos
SFB	soro fetal de bovino
SLC	do inglês “secondary lymphoid tissue chemokine”
SLP	plasma da larva do bicho-da-seda, do inglês “silkworm larvae plasma”
SSC	dispersão lateral, do inglês “side scatter”
ssRNA	ácido ribonucleico de cadeia simples, do inglês “single-stranded ribonucleic acid”
STAT	do inglês “signal transducer and activator of transcription”
TAE	solução de tris-acetato e EDTA
TAP	do inglês “transport associated antigen processing”
<i>Taq</i>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TARC	do inglês “thymus and activation regulated chemokine”
Tat	do inglês “twin arginine transporter”
TCA	ácido tricloroacético, do inglês “trichloroacetic acid”
TCR	receptor de células T, do inglês “T cell receptor”
TGF	do inglês “transforming growth factor”
Th	linfócitos T CD4 ⁺ auxiliares, do inglês “T helper”
TIMP	do inglês “tissue inhibitor of metalloproteinases”
TIR	do inglês “Toll/IL-1 receptor”
TIRAP	do inglês “TIR domain-containing adaptor protein”
TLR	receptores “Toll-like”, do inglês “Toll-like receptors”
TMED	N,N,N',N'-tetrametilenodiamina
TNF	factor necrosante tumoral, do inglês “tumor necrosis factor”
TRAM	do inglês “TRIF-related adaptor molecule”
Treg	linfócitos T reguladores
TREM	do inglês “triggering receptor expressed on myeloid cells”

TRIF	do inglês “TIR domain-containing adaptor protein inducing interferon- β ”
Tris	tris (hidroximetil) aminometano
UTL	Universidade Técnica de Lisboa
v/v	volume/volume
VIH	vírus da imunodeficiência humana
VPSA	vírus da peste suína africana
VUB	Universidade Livre de Bruxelas, do neerlandês “Vrije Universiteit Brussel”

Capítulo 1. Introdução Geral

1.1 Breve história dos sistemas de clonagem baseados em OprI

Ao longo dos últimos duzentos anos, o uso generalizado da vacinação contribuiu para a diminuição drástica na incidência de inúmeras doenças infecciosas e esteve na base daquela que é considerada uma das maiores realizações da história da medicina moderna, a extinção do vírus da varíola humana (Bazin, 2003; Plotkin, 2005). Mais recentemente, desempenhou um papel igualmente decisivo na erradicação global do vírus da peste bovina, permitindo pôr termo a uma doença que durante milhares de anos contribuiu para o surgimento e perpetuação de graves situações de insegurança alimentar (Horzinek, 2011). Até ao final de 2013, a Organização Mundial de Saúde prevê que o vírus da poliomielite humana venha a ser também definitivamente eliminado da natureza (World Health Organization, 2010), o que, a acontecer, representará a terceira extinção deliberada de um agente infeccioso em resultado de planos de erradicação assentes na vacinação.

Mas apesar do enorme êxito alcançado no combate a estes três flagelos, e do sucesso de muitas outras vacinas actualmente disponíveis, não foi possível, até hoje, obter vacinas eficazes e seguras contra diversas doenças com impacto significativo em saúde humana e animal. De entre as doenças veterinárias, a peste suína africana (PSA) é, a esse respeito, um caso paradigmático. As abordagens clássicas de inactivação do agente etiológico, bem como as tentativas de imunização experimental com vacinas subunitárias, não permitiram melhores resultados do que mitigar ou atrasar a manifestação dos sintomas, enquanto as vacinas vivas atenuadas apresentaram sempre virulência residual inaceitável e incapacidade de induzir imunidade cruzada contra isolados virais heterólogos (Martins & Leitão, 1994). Estes insucessos, reproduzidos de forma não muito distinta com outras importantes doenças infecciosas, impuseram, desde há algumas décadas, a adopção de novas estratégias de investigação com o objectivo de ultrapassar as dificuldades até então encontradas. Em contraste com as abordagens precedentes, geralmente realizadas sem um conhecimento preciso sobre o modo de acção dos imunogénios e das respostas imunitárias por eles induzidas, estas novas estratégias apoiam-se no estudo detalhado dos mecanismos imunitários que em cada caso particular se correlacionam com protecção, bem como num conhecimento aprofundado sobre os mecanismos moleculares que permitem a sua indução (Mortellaro & Ricciardi-Castagnoli, 2011; Plotkin, 2009).

No contexto deste tipo de investigação, a formulação de imunogénios constituídos por estruturas subunitárias dos microrganismos alvo, a que se associam componentes que modulam as suas propriedades imunogénicas, tem demonstrado ter uma dupla utilidade. Por um lado, os imunogénios assim obtidos constituem eles mesmos modelos de vacinas

subunitárias susceptíveis de serem utilizados em ensaios de protecção; por outro, por veicularem determinantes antigénicos sob condições que favorecem o seu processamento e apresentação pelo sistema imunitário, os mesmos imunogénios servem os estudos que visam caracterizar os alvos e os mecanismos de respostas imunitárias protectoras (Chua et al., 2008; Khan et al., 2007; Leitão et al., 1998; Lindblad et al., 1997; Tsuji & Zavala, 2001).

Do ponto de vista experimental, desde há muito se utilizam componentes estruturais de microrganismos para modulação de respostas imunitárias. Já no início do século passado, como exemplo da aplicação prática dos seus trabalhos sobre fagocitose, Elie Metchnikoff aludia à utilização de ácidos nucleicos e endotoxinas de origem microbiana com o objectivo de atrair células fagocitárias para o local de incisões cirúrgicas de forma a promover a cicatrização pós-operatória (Mechnikov, 1908). Desde a mesma época, são também utilizadas estruturas derivadas de bactérias com o intuito de estimular imunidade anti-tumoral (revisto por Decker & Safdar, 2009). Por sua vez, a utilização de componentes microbianos para potenciar a imunogenicidade de antigénios co-administrados tem origem nos anos 1940, altura em que Jules T. Freund propõe um adjuvante, mais tarde baptizado com o seu nome e amplamente usado em contexto experimental, que, na sua forma completa, contém extractos inactivados de micobactérias (revisto por Lindblad, 2000; Olitsky & Yager, 1949). Na década de 1950, Arthur G. Johnson e colaboradores demonstraram ser possível utilizar com o mesmo objectivo os lipopolissacáridos (LPS) da parede celular de bactérias Gram-negativas (Johnson et al., 1956) e, mais tarde, foram desenvolvidos derivados sintéticos da componente adjuvante do LPS, actualmente incorporados em vacinas. A partir da década de 1980, na sequência da demonstração das propriedades imunoestimuladoras das lipoproteínas da parede celular bacteriana (Bessler et al., 1985a; Bessler et al., 1985b; Deres et al., 1989; Hoffmann et al., 1988; Hoffmann et al., 1989; Melchers et al., 1975) e de um conjunto de outros estudos que demonstravam as potencialidades da lipidificação sintética de proteínas para modulação de respostas imunitárias (Champlin & Hunter, 1975; Coon & Hunter, 1973, 1975), as proteínas natural ou sinteticamente lipidificadas surgem também como alternativa promissora para formulação de imunogénios.

Foi neste contexto que em 1996 foi proposto pela primeira vez um sistema de expressão em *Escherichia coli* para a produção de antigénios em fusão com OprI, a lipoproteína maioritária da membrana externa de *Pseudomonas aeruginosa* (Cornelis et al., 1996). Os vectores de clonagem então propostos baseavam-se no gene *oprI* modificado pela inserção de um local de clonagem múltipla (LCM), perto do final da sequência codificadora, para a inserção de sequências heterólogas. Foi na altura designado sistema de expressão transportador-adjuvante uma vez que compreendia, simultaneamente, duas funções: 1) os

antígenos clonados eram direccionados para a superfície da célula hospedeira, permitindo aplicações biotecnológicas diversas, incluindo o desenho de vacinas recombinantes vivas, a imobilização de enzimas e biorremediação (revisto por Cornelis, 2000); 2) o sistema podia ser utilizado para obter antígenos em fusão com OprI, reconhecendo-se ao produto híbrido propriedades adjuvantes intrínsecas, ou seja, a capacidade de desencadear respostas imunitárias humorais e celulares dispensando qualquer adjuvante adicional.

Utilizando extractos de membrana externa de bactérias transformadas com vectores deste sistema expressando antígenos de fusão do vírus da peste suína africana (VPSA) demonstrou-se a capacidade de apresentação de epitopos no contexto do complexo maior de histocompatibilidade (MHC, do inglês “major histocompatibility complex”) da classe I de macrófagos de suíno (SLA classe I) (Leitão et al., 2000; Leitão et al., 1998). Esta característica tornou possível, nesses estudos, a identificação de epitopos especificamente reconhecidos por linfócitos T CD8⁺ citotóxicos (LTC) e permitiu a estimulação de actividade LTC *in vitro*. Mais tarde, num modelo de ratinho, uma vacina baseada em OprI contra *Leishmania major* permitiu direccionar a resposta imunitária no sentido de um perfil protector Th1 (linfócitos T CD4⁺ auxiliares do tipo 1, do inglês “T helper 1”) (Cote-Sierra et al., 2002). Nesse trabalho, embora a fusão do antígeno com OprI não-lipidificada tenha aumentado a resposta específica por imunoglobulinas (Ig)G1, demonstrou-se que a componente lipídica era fundamental para o desvio no tipo de resposta e consequente protecção (Cote-Sierra et al., 2002). Num modelo murino de asma, a administração intranasal de OprI levou à supressão dos linfócitos Th2 efectores específicos do alérgeno (Revets et al., 2005) e outros estudos sobre vírus da imunodeficiência humana (VIH) (Piedade, 2003), peste suína clássica (Rau et al., 2006) e tuberculose (Gartner et al., 2007) corroboraram as propriedades adjuvantes da OprI e a possibilidade de modular respostas imunitárias adaptativas com esta lipoproteína. Mais recentemente, demonstrou-se a capacidade de a OprI se ligar *in vitro* e *in vivo* a células epiteliais de traqueia e intestino delgado de galinhas, o que sugere a sua utilidade para apresentação de antígenos em mucosas (Loots et al., 2008).

Apesar de os resultados acima referidos atribuírem ao sistema um vasto campo de promissoras aplicações, um conjunto de limitações técnicas levou, na prática, ao seu abandono. Durante a última década, no entanto, assistiu-se a grandes avanços na compreensão dos mecanismos inatos de reconhecimento de microrganismos e do seu impacto no desencadeamento de respostas específicas que justificam renovado interesse na utilização do sistema. Na base destes novos conhecimentos está a descoberta de receptores inatos que reconhecem componentes microbianos, incluindo moléculas da parede celular bacteriana, o que abre novas perspectivas para o desenvolvimento de vacinas subunitárias com adjuvantes

baseados nestas moléculas. Neste contexto, os sistemas que permitem a fusão entre antigénios e lipoproteínas bacterianas ganham novas utilidades, tanto para o desenvolvimento de imunogénios vacinais, como para o próprio estudo do desencadeamento de respostas adaptativas por estímulos direccionados para os mecanismos inatos de reconhecimento.

1.2 O papel da imunidade inata no controlo da imunidade adaptativa

A capacidade de decisão entre estabelecimento de tolerância e desenvolvimento de imunidade constitui um aspecto central do sistema imunitário que assenta na faculdade de distinguir o que é próprio e inofensivo daquilo que é estranho e potencialmente perigoso. A forma como este discernimento ocorre ao nível dos componentes inatos e adaptativos do sistema imunitário dos vertebrados Gnathostomata tem sido, desde há muito, objecto de estudo e controvérsia, atribuindo-se sempre, porém, um papel secundário aos primeiros e um carácter determinante aos segundos. Assim, classicamente, a imunidade inata compreende mecanismos desprovidos de especificidade particular face a um microrganismo definido, cabendo à imunidade adaptativa o reconhecimento altamente específico dos antigénios estranhos através de um vasto repertório de receptores gerado por rearranjo genético somático durante a diferenciação dos linfócitos T e B (Borghesi & Milcarek, 2007).

Durante vários anos, o carácter peculiar dos mecanismos de reconhecimento específico próprios da imunidade adaptativa e a sua importância para a compreensão dos fenómenos imunológicos relegaram o estudo dos mecanismos inatos de detecção de microrganismos para um plano secundário. No entanto, desde os anos 1970 que, tanto os trabalhos sobre activação de mecanismos efectores em células de imunidade inata, como os estudos sobre activação policlonal B por mitogénios, vinham tornando clara a existência de outros receptores que confeririam capacidade de discriminação entre aquilo que é próprio e aquilo que é estranho ao organismo a um nível distinto daquele atribuído aos receptores clonais linfocitários (revisto por Coutinho & Poltorack, 2003; Medzhitov, 2009). Este conceito foi sistematizado de forma particularmente clarividente por Charles Janeway, que, no final da década de 1980, propôs a existência de um sistema de receptores de tipo inato, conservado em termos evolutivos, capaz de reconhecer padrões moleculares característicos de microrganismos e, assim, discriminar o “próprio não infeccioso” do “infeccioso não próprio” (Janeway, 1989, 1992). Tal reconhecimento anteciparia e estaria na base da activação posterior das respostas adaptativas desempenhadas pelos linfócitos T e B.

Charles Janeway e seus colaboradores realizaram um conjunto de estudos que visavam identificar a base molecular desse sistema inato de reconhecimento, tendo como primeiro

critério de selecção receptores de superfície expressos em macrófagos e células dendríticas cuja activação fosse capaz de induzir a expressão de moléculas co-estimuladoras, ao tempo tidas já como necessárias para a activação linfocitária (Medzhitov, 2009). Na sequência desses trabalhos foi identificada uma proteína transmembranar humana homóloga da proteína Toll de *Drosophila*, pouco tempo antes implicada na resposta imunitária destas espécies contra infecções fúngicas (Lemaitre et al., 1996), cuja activação em linhas celulares humanas resultava em sinalização via NF- κ B (do inglês “nuclear factor- κ B”), com consequente indução de citocinas inflamatórias e expressão de moléculas co-estimuladoras (Medzhitov et al., 1997). Esta descoberta marca o início de um período de enormes avanços na compreensão dos mecanismos moleculares que subjazem ao reconhecimento precoce de microrganismos patogénicos, bem como do papel crucial que a imunidade inata desempenha no desencadeamento e modulação das respostas imunitárias adaptativas subsequentes.

Na linha do que foi proposto no final da década de 1980, é hoje claro que o sistema imunitário inato, para além de outras formas de reconhecimento, é capaz de detectar a presença de microrganismos com um elevado grau de especificidade, através de um conjunto de receptores codificados na linha germinal que reconhecem padrões moleculares associados a microrganismos patogénicos (PAMP, do inglês “pathogen-associated molecular patterns”) (Kumagai & Akira, 2010; Palm & Medzhitov, 2009). No seu conjunto, estes receptores de reconhecimento de padrão (PRR, do inglês “pattern recognition receptors”) detectam um leque variado de componentes conservados, estruturais e essenciais de bactérias, vírus, fungos e parasitas. Esses componentes são na sua maioria elementos da parede celular ou ácidos nucleicos com características específicas de microrganismos (Akira et al., 2006; Kawai & Akira, 2009; Kumar et al., 2009b). Estudos recentes indicam que os PRR podem igualmente mediar respostas em condições patogénicas não-infecciosas, através do reconhecimento de moléculas endógenas, designadas padrões moleculares associados a dano (DAMP, do inglês “damage-associated molecular patterns”), libertadas na sequência de lesão celular, por exemplo devido a isquemia ou trauma (Kono & Rock, 2008). O significado do reconhecimento de DAMP pelo sistema imunitário no contexto de infecção está ainda por esclarecer, mas poderá ter um papel relevante na distinção entre os agentes patogénicos causadores de lesão e os microrganismos comensais inofensivos ou benéficos, com consequente impacto no tipo de resposta desencadeado num e noutro caso (Medzhitov, 2010).

Embora as interacções existentes entre os mecanismos inatos e os componentes adaptativos da imunidade estejam ainda por esclarecer em toda a sua complexidade, a descoberta dos PRR e os estudos que daí advieram têm contribuído decisivamente para uma nova visão sobre o modo como ambos os braços da imunidade se integram e cooperam na

resposta a microrganismos patogénicos. Os conhecimentos gerados neste novo contexto sobre o papel da imunidade inata no controlo das respostas específicas têm aberto caminho a uma área de investigação ainda emergente que apresenta vasto potencial de aplicação nos campos da vacinologia e imunoterapia.

1.3 Receptores de reconhecimento de padrão e seus ligandos

Os PRR reconhecem estruturas derivadas de microrganismos em diferentes compartimentos celulares, como a membrana citoplasmática, os endossomas e o citoplasma. Actualmente distinguem-se quatro grandes famílias de PRR, os receptores “Toll-like” (TLR, do inglês “Toll-like receptors”), os receptores de lectinas do tipo C (CLR, do inglês “C-type lectin receptors”), os receptores “NOD-like” (NLR, do inglês “NOD-like receptors”) e os receptores “RIG-I-like” (RLR, do inglês “RIG-I-like receptors”) (Kawai & Akira, 2009; Kumagai & Akira, 2010; Takeuchi & Akira, 2010). As duas primeiras incluem receptores transmembranares que podem ser expressos à superfície celular e/ou em membranas de compartimentos intracelulares, como fagossomas e endossomas; as duas últimas compreendem receptores de localização citoplasmática.

1.3.1 TLR

Os TLR são glicoproteínas transmembranares do tipo I com uma estrutura composta por três domínios (Kawai & Akira, 2009; Kumar et al., 2009a, 2009b). O domínio N-terminal extracelular consiste em 16 a 28 repetições em tandem de LRR (repetições ricas em leucina, do inglês “leucine-rich repeats”), com o motivo conservado “LxxLxLxxN” de cerca de 20 a 30 aminoácidos. A este domínio, envolvido no reconhecimento dos ligandos de TLR, segue-se uma região transmembranar e, por fim, um domínio TIR (receptor “Toll/IL-1”, do inglês “Toll/IL-1 receptor”) citoplasmático, necessário para a transdução de sinal e que apresenta homologia com a região citoplasmática do receptor da interleucina (IL)-1.

Até ao presente, foram identificados 10 TLR na espécie humana e 13 no ratinho, verificando-se conservação entre ambas as espécies de TLR1 a TLR9. O TLR10 não é funcional no ratinho devido a uma inserção por retrovírus e TLR11, TLR12 e TLR13 estão ausentes do genoma humano. Os receptores TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 e TLR11 são expressos na superfície celular e reconhecem componentes da superfície dos microrganismos. Os receptores TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9 localizam-se em compartimentos intracelulares, como endossomas, lisossomas e retículo endoplasmático, e reconhecem predominantemente

ácidos nucleicos de origem microbiana (Kawai & Akira, 2010). Na Tabela 1 são sumariamente apresentados os receptores e respectivos ligandos.

Tabela 1 – Receptores TLR e respectivos ligandos^a

TLR (co-receptores ^b)	Molécula adaptadora	Factor de transcrição	Citocinas induzidas	PAMP	Origem
Membrana citoplasmática					
TLR1-TLR2	MyD88, TIRAP	NF-κB	Inflamatórias	Lipoproteínas/lipopéptidos triacilados	Bactérias, síntese
TLR2-TLR6 (dectina-1)	MyD88, TIRAP	NF-κB	Inflamatórias	Lipoproteínas/lipopéptidos diacilados	<i>Mycoplasma</i> , síntese
TLR2 (CD36, RP105)	MyD88, TIRAP	NF-κB	Inflamatórias	Ácido lipoteicoico	<i>Streptococcus</i>
				Zimosano	<i>Saccharomyces</i>
				Peptidoglicano	Bactérias
				Lipoarabinomanano	<i>Mycobacterium</i>
				Fosfolipomanano	<i>Candida albicans</i>
TLR4 (MD2, CD14, LBP)	MyD88, TIRAP, TRIF, TRAM	NF-κB, IRF3, IRF7	Inflamatórias; IFN do tipo I	Porinas	<i>Neisseria</i>
				LPS	<i>P. gingivalis</i>
				Hemaglutinina	Vírus do sarampo
				LPS e derivados do lípido A (e.g. MPL)	Bactérias Gram-negativas
				Proteínas de envelope viral	RSV, MMTV
TLR5 mTLR11	MyD88	NF-κB	Inflamatórias	Manano	<i>Candida albicans</i>
				Glicoinositolfosfolípidos	<i>Trypanosoma</i>
				Flagelina	Bactérias flageladas
				Não determinado	Bactérias uropatogénicas
				Molécula homóloga de profilina	<i>Toxoplasma gondii</i>
Endossoma					
TLR3	TRIF	NF-κB, IRF3, IRF7	Inflamatórias, IFN do tipo I	dsRNA	Vírus dsRNA e ssRNA
TLR7	MyD88	NF-κB, IRF7	Inflamatórias, IFN do tipo I	Poly(I:C)	Síntese
				ssRNA	Vírus
				Imidazoquinolinas	Síntese
hTLR8	MyD88	NF-κB, IRF7	Inflamatórias, IFN do tipo I	Análogos de guanosina	Síntese
				ssRNA	Vírus
TLR9	MyD88	NF-κB, IRF7	Inflamatórias, IFN do tipo I	Imidazoquinolinas	Síntese
				DNA com motivos CpG	Bactérias, vírus, síntese
				dsDNA	Vírus
				Hemozoína	<i>Plasmodium</i>

^aadaptado de Kawai e Akira (2009), Kumagai e Akira (2010) e Kumar et al. (2009a, 2009b).

^bco-receptores reportados para alguns ligandos

1.3.1.1 Receptores expressos na superfície celular – TLR2/1/6, TLR4, TLR5 e TLR11

1.3.1.1.1 TLR2/1/6

O TLR2 está descrito como sendo o receptor TLR que reconhece a maior variedade de ligandos. Entre estes incluem-se diversos componentes da parede celular de bactérias, como lipoproteínas, peptidoglicano, ácido lipoteicoico, LPS de algumas espécies bacterianas (como *Porphyromonas gingivalis*), porinas de *Neisseria* e lipoarabinomanano de micobactérias, zimosano e fosfolipomanano da parede celular de leveduras, entre outros (Hirschfeld et al., 2001; Kumar et al., 2009a; Warshakoon et al., 2009). O reconhecimento por TLR2 de um conjunto de ligandos com estrutura tão diversa é atribuído à formação de estruturas heterodiméricas com outras moléculas membranares, como TLR1, TLR6, CD (grupo de diferenciação, do inglês “cluster of differentiation”) 36, CD180/RP105 (do inglês “radioprotective protein 105 kDa”) ou dectina-1 (Kumar et al., 2009a). No entanto, alguns autores defendem que só as lipoproteínas bacterianas são reconhecidas em concentrações fisiológicas por TLR2 e que na maioria dos casos o reconhecimento de outros ligandos se deve principalmente a contaminação com estas moléculas (Travassos et al., 2004; Zähringer et al., 2008).

As lipoproteínas são componentes estruturais das membranas de diversas espécies bacterianas, com estrutura molecular diversa, mas que têm em comum uma modificação lipídica no resíduo de cisteína N-terminal (Sankaran & Wu, 1994). Nos espécimes diacilados, isto é, lipidificados com dois resíduos de ácidos gordos, a modificação consiste numa cisteína S-(2,3-dihidroxipropil)-di-O-acilada. Os exemplares triacilados possuem um terceiro ácido gordo ligado por uma ligação amida ao mesmo resíduo de cisteína N-terminal. São exemplo de estruturas diaciladas o lipopéptido MALP2 (do inglês “macrophage-activating lipopeptide 2”) de *Mycoplasma fermentans* (Mühlradt et al., 1997) e a lipoproteína LP44 de *Mycoplasma salivarium* de onde deriva o lipopéptido FSL (do inglês “fibroblast-stimulating lipopeptide”)-1 (Shibata et al., 2000). A lipoproteína de Braun de *Escherichia coli* constitui o protótipo das lipoproteínas triaciladas de membrana externa das bactérias Gram-negativas e diversos lipopéptidos sintéticos usados como estimuladores de TLR2, como Pam₃CSK₄, possuem uma modificação lipídica análoga à desta lipoproteína (Aliprantis et al., 1999; Bessler et al., 1982; Braun & Hantke, 1975). São também exemplos de lipoproteínas triaciladas a OspA de *Borrelia burgdorferi* (Brandt et al., 1990) e a lipoproteína de 19-kDa de *Mycobacterium tuberculosis* (Akira, 2003; Tschumi et al., 2009). Tanto no caso das lipoproteínas diaciladas como das triaciladas é a componente lipídica N-terminal que confere capacidade estimuladora via TLR (Hirschfeld et al., 1999; Takeuchi et al., 2000). De acordo com estudos iniciais, as

primeiras sinalizam através de heterodímeros TLR2/6, enquanto as segundas o fazem via TLR2/1 (Akira, 2003; Takeda et al., 2002; Takeuchi et al., 2001; Takeuchi et al., 2002). Contudo, estudos mais recentes sugerem que a activação por lipopéptidos via TLR2 pode ocorrer independentemente de TLR1 e TLR6 (Buwitt-Beckmann et al., 2006).

Em 2007, Jin e colaboradores determinaram a estrutura do complexo TLR1-TLR2-lipopéptido por cristalografia, permitindo uma compreensão estrutural da heterodimerização induzida pelo ligando (Jin et al., 2007). A ligação do lipopéptido triacilado Pam₃CSK₄ induz a formação de um heterodímero em forma de “m” dos ectodomínios de TLR1 e TLR2 (Figura 1a), não induzida pelo lipopéptido diacilado Pam₂CSK₄. A inexistência de dimerização pelo ligando diacilado é explicada pelo facto de a dimerização ser induzida pelas três cadeias lipídicas, com os dois ácidos gordos de ligação éster inseridos numa cavidade de TLR2 e o ácido gordo com ligação amida inserido num canal hidrofóbico de TLR1 (Jin et al., 2007). A sinalização intracelular será iniciada pela aproximação dos domínios TIR citoplasmáticos dos dois receptores dimerizados.

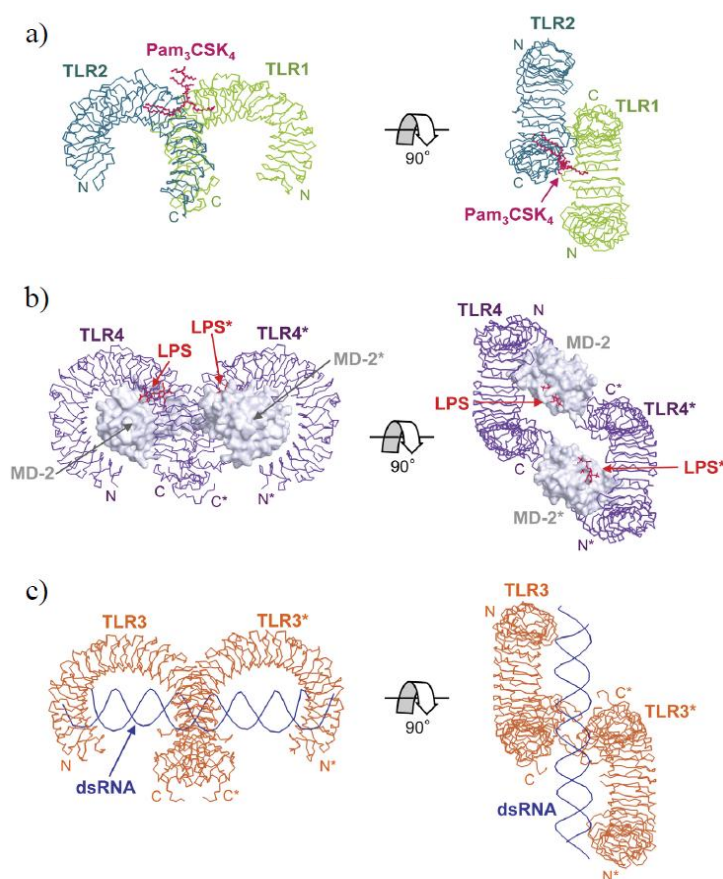


Figura 1 – Modelos de dimerização de TLR desenvolvidos a partir de estudos de cristalografia.

(a) Dimerização de TLR2 e TLR1 induzida pelo lipopéptido triacilado Pam₃CSK₄. (b) Homodimerização do complexo TLR4-MD2-LPS. (c) Homodimerização de TLR3 induzida por ligação de dsRNA. Imagem adaptada a partir de Jin et al. (2008).

1.3.1.1.2 TLR4

O TLR4, em conjunto com a proteína MD-2 (do inglês “myeloid differentiation factor-2”), reconhece o LPS bacteriano, componente estrutural da membrana externa de bactérias Gram-negativas (Shimazu et al., 1999). O LPS consiste numa cadeia lateral O, mais externa, de natureza polissacarídica e variável, num polissacárido central e no lípido A, que constitui a porção mais interna e é altamente hidrofóbico, encontrando-se inserido na membrana externa bacteriana (Raetz & Whitfield, 2002). Este último é o componente responsável pela activação TLR do LPS (Hoshino et al., 1999; Poltorak et al., 1998). Na verdade, o LPS é reconhecido principalmente por MD-2, cabendo ao TLR4 uma função essencialmente de transmissão de sinal para o interior da célula. MD-2 é uma proteína solúvel que se associa à face convexa do domínio extracelular de TLR4 (Kim et al., 2007) e possui uma cavidade hidrofóbica onde encaixam cinco das seis cadeias lipídicas do ligando (Park et al., 2009). São as mudanças estruturais induzidas em MD-2 pela ligação do LPS que promovem a sua interacção com uma segunda molécula TLR4, induzindo homodimerização destes receptores (Park et al., 2009) (Figura 1b).

As proteínas LBP (do inglês “LPS binding protein”) e CD14 estão igualmente envolvidas na resposta a LPS via TLR4 (Miyake, 2007). A primeira existe sob forma solúvel ou ligada à membrana citoplasmática e estabelece ligação ao LPS, enquanto a segunda liga a LBP e dirige LBP-LPS para o complexo TLR4-MD2.

Para além do ligando natural LPS, são também ligandos de TLR4 o lípido A monofosforilado (MPL, do inglês “monophosphoryl Lipid A”), um derivado não-tóxico do lípido A, e análogos sintéticos (Casella & Mitchell, 2008). Este receptor foi também implicado no reconhecimento de proteínas de envelope viral, glicoinositolfosfolípidos de *Trypanosoma* e manano de *Candida albicans* (Kumar et al., 2009a).

1.3.1.1.3 TLR5 e TLR11

TLR5 reconhece a proteína flagelina, constituinte do flagelo de bactérias móveis (Hayashi et al., 2001). Estudos de mutagénesis permitiram identificar um grupo de 13 aminoácidos, conservado e essencial para a motilidade das bactérias, como o local da flagelina reconhecido por TLR5 (Smith et al., 2003). Este receptor é fortemente expresso em células dendríticas da lâmina própria do intestino delgado, bem como em células epiteliais do intestino e do tracto respiratório (Uematsu et al., 2006; Zhang et al., 2005b). TLR11, que existe em rato mas não em humano, tem homologia próxima de TLR5. TLR11 reconhece

bactérias uropatogénicas e uma molécula homóloga da profilina derivada de *Toxoplasma gondii* (Yarovinsky et al., 2005).

1.3.1.2 Receptores expressos em vesículas intracelulares - TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9

Os receptores TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9 são expressos em compartimentos intracelulares endossomais, reconhecem ácidos nucleicos e desempenham um papel fundamental na resposta imunitária anti-viral através da produção de interferão (IFN, do inglês “interferon”) do tipo I e citocinas inflamatórias (Kawai & Akira, 2010). O transporte destes receptores do retículo endoplasmático para as vesículas intracelulares é mediado pela proteína transmembranar do retículo endoplasmático UNC93B1 em resposta a activação celular por PAMP (Brinkmann et al., 2007).

TLR3 reconhece ácido ribonucleico (RNA, do inglês “ribonucleic acid”) viral genómico de cadeia dupla (dsRNA, do inglês “double-stranded ribonucleic acid”) ou dsRNA de vírus com genoma de RNA de cadeia simples (ssRNA, do inglês “single-stranded ribonucleic acid”) mas que produzem dsRNA durante o processo replicativo (Alexopoulou et al., 2001; Wang et al., 2004). TLR3 é também o receptor de poly(I:C) (ácido poli-inosínico:policitidílico, do inglês “polyinosinic polycytidylic acid”), um análogo sintético de dsRNA (Alexopoulou et al., 2001). Este receptor é expresso no endossoma de diversas células imunitárias, como células dendríticas, macrófagos, linfócitos B e células NK (do inglês “natural killer”), e células não-imunitárias, como fibroblastos e células epiteliais. Contudo, ao contrário dos outros TLR reconhedores de ácidos nucleicos, não é expresso em células dendríticas plasmocitóides (Kumar et al., 2009a). A estrutura do complexo TLR3-dsRNA foi determinada por cristalografia (Figura 1c) (Botos et al., 2009). Curiosamente, embora o tipo de interacção entre as componentes lipídicas dos ligandos de TLR2/1 e TLR4 com os respectivos receptores seja bastante diferente daquele observado entre dsRNA e TLR3, verifica-se nos três casos a formação de um dímero em que as mesmas duas superfícies laterais se justapõem possibilitando a aproximação dos extremos C-terminais para que se inicie a transdução de sinal (Botos et al., 2009).

TLR7 de ratinho e de humano e TLR8 de humano, mas não TLR8 de ratinho que parece não ser funcional, detectam ssRNA rico em guanósina ou uracilo de origem viral (Diebold et al., 2004; Heil et al., 2004; Lund et al., 2004), bem como os compostos antivirais sintéticos imiquimod e resiquimod (R848) derivados de imidazoquinolina e análogos de guanina como loxorribina (Hemmi et al., 2002; Jurk et al., 2002). TLR7 detecta ainda RNA bacteriano em endolisossomas de células dendríticas convencionais (Mancuso et al., 2009).

TLR9 reconhece ácido desoxirribonucleico (DNA, do inglês “deoxyribonucleic acid”) com motivos de dinucleótidos de citosina-guanina (CpG) não-metilados derivado de bactérias e vírus e oligodesoxinucleótidos (ODN) sintéticos que possuam os mesmos motivos (Hemmi et al., 2000). Ao contrário do que se verifica nos genomas bacterianos e virais, no DNA de animais vertebrados os dinucleótidos CpG são em geral metilados no resíduo de citosina o que torna o DNA próprio num fraco estimulador destes receptores (Hemmi et al., 2000). TLR9 reconhece também hemozoína, pigmento gerado em *Plasmodium* (Coban et al., 2005).

TLR9 e TLR7 são expressos em níveis elevados no compartimento endossomal de células dendríticas plasmocitóides, que em resposta a infecção viral produzem elevadas quantidades de IFN do tipo I (Kaisho, 2010), enquanto TLR8 é activado em células dendríticas mielóides e monócitos, levando à produção de citocinas pró-inflamatórias (Gorden et al., 2005).

1.3.1.3 Vias de sinalização activadas por ligação a TLR

Na sequência da ligação dos respectivos ligandos, os TLR dimerizam e sofrem alterações conformacionais que permitem o recrutamento de moléculas adaptadoras com domínios TIR para junto dos domínios TIR citoplasmáticos dos TLR. Iniciam-se desta forma as cascatas de sinalização intracelular que de seguida se sumarizam (Figura 2).

Reconhecem-se quatro moléculas adaptadoras, MyD88 [do inglês “myeloid differentiation primary response gene (88)”], TIRAP (do inglês “TIR domain-containing adaptor protein”), TRIF (do inglês “TIR domain-containing adaptor protein inducing interferon- β ”) e TRAM (do inglês “TRIF-related adaptor molecule”), que são recrutadas de forma distinta pelos receptores, o que em parte justifica as diferentes respostas biológicas obtidas por activação de diferentes TLR (Kawai & Akira, 2010). MyD88 é usado por todos os TLR excepto TLR3 e leva à activação do factor de transcrição NF- κ B e consequente produção de citocinas inflamatórias. A via MyD88 induz ainda a activação de cinases MAPK (do inglês “mitogen-activated protein kinases”), que incluem ERK (do inglês “extracellular signal regulated protein kinases”) 1/2, p38 e JNK (do inglês “c-Jun N-terminal kinases”) e que fosforilam a família de factores de transcrição AP-1 (do inglês “activator protein 1”) reguladores da transcrição ou estabilidade do mRNA (ácido ribonucleico mensageiro, do inglês “messenger ribonucleic acid”) de citocinas inflamatórias. Por sua vez, TRIF é recrutado por TLR3 e TLR4 e conduz à activação dos factores de transcrição IRF (do inglês “interferon regulatory transcription factor”) 3, IRF7 e NF- κ B e à consequente indução de IFN do tipo I e citocinas inflamatórias. TRAM e TIRAP auxiliam o recrutamento de TRIF para TLR4 e de MyD88 para TLR2 e TLR4, respectivamente. Assim, de um modo geral as vias de sinalização

TLR podem ser classificadas como vias MyD88-dependentes, que resultam na indução de citocinas inflamatórias, ou vias TRIF-dependentes, responsáveis pela indução quer de IFN do tipo I quer de citocinas inflamatórias (Kumar et al., 2009a). TLR4 é o único TLR que usa os 4 adaptadores e activa tanto as vias MyD88- como TRIF-dependentes. Esta activação ocorre sequencialmente, primeiro com a activação de NF- κ B e MAPK como consequência do recrutamento na membrana citoplasmática de TIRAP e MyD88, seguindo-se a activação de IRF3 e a activação tardia de NF- κ B e MAPK como consequência do recrutamento de TRAM e TRIF já ao nível do endossoma, após endocitose de TLR4 (Kawai & Akira, 2010). A produção de citocinas inflamatórias em resposta a estimulação TLR4 não se verifica em células deficientes em TRIF, ou seja, requer a activação simultânea das duas vias (Pulendran, 2004a).

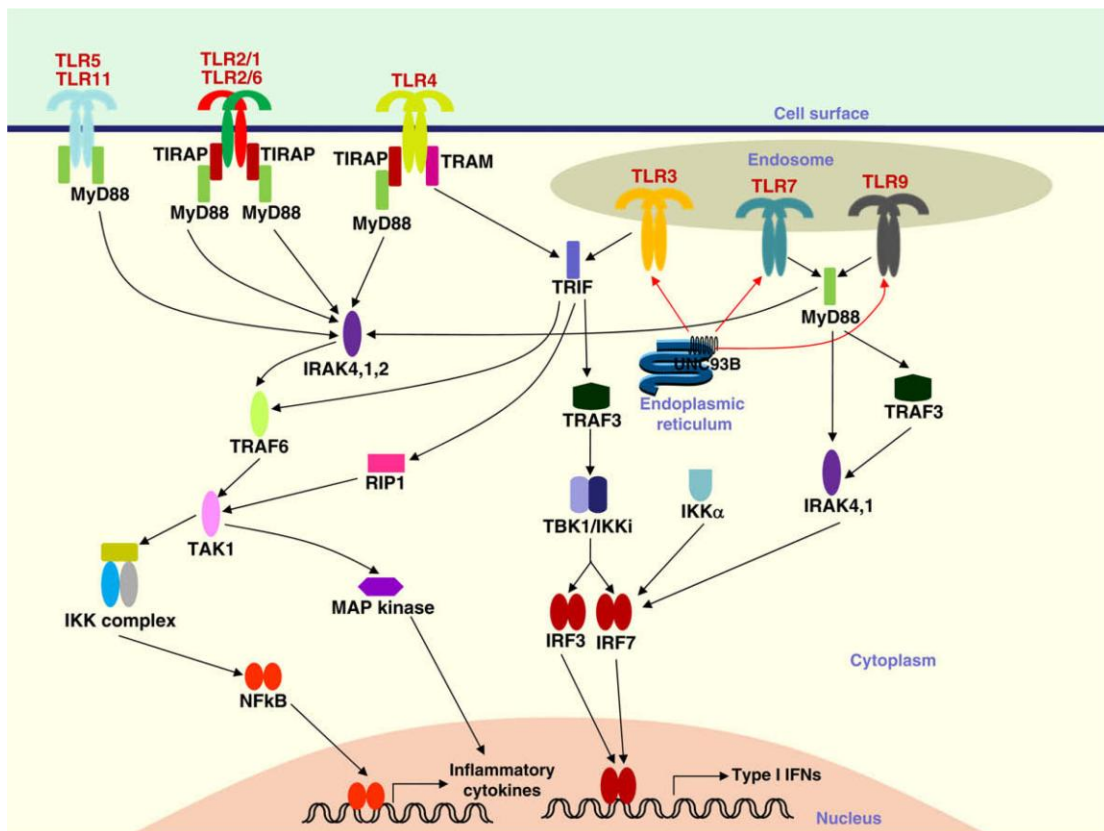


Figura 2 – Resumo das vias de sinalização activadas por ligação a TLR

Ver texto para descrição. Imagem obtida de Kumar et al. (2009b).

Os receptores TLR7 e TLR9 são expressos em níveis elevados em células dendríticas plasmocitóides. À semelhança do que acontece com TLR3, estes receptores encontram-se associados à proteína UNC93B no retículo endoplasmático e são transportados para os compartimentos endossomais em resposta a estímulos exercidos via PRR (Kawai & Akira,

2009). A estimulação de TLR7 e TLR9 nesses compartimentos leva à fosforilação de IRF7 e consequente produção de IFN do tipo I. Em contraste com o que se verifica em consequência da estimulação de TLR3 e TLR4 em células dendríticas convencionais, esta produção de IFN é dependente de MyD88. A estimulação de TLR7 e TLR9 em células dendríticas plasmocitóides induz também a produção de citocinas inflamatórias via NF- κ B, MAPK e IRF5 (Kawai & Akira, 2009). A activação de células dendríticas mielóides e monócitos via TLR8 em humanos também ocorre por via dependente de MyD88, com activação de NF- κ B e MAPK e produção de citocinas pró-inflamatórias (Gorden et al., 2005; Larangé et al., 2009).

As vias acima descritas são as consideradas mais relevantes, no entanto, há que ter em conta a existência de regulação espaço-temporal das interações ligando-TLR que pode resultar em perfis de expressão génica distintos dos acima referidos. Por exemplo, enquanto a estimulação de TLR9 por ODN CpG do tipo D em células dendríticas plasmocitóides resulta na produção de IFN do tipo I via IRF7, a mesma interacção noutras células resulta na transcrição de genes pró-inflamatórios por activação de IRF5 (Trinchieri & Sher, 2007). Por fim, importa também referir que a expressão proteica induzida via TLR sofre regulação pós-transcricional por mecanismos diversos. A este respeito estão descritas, por exemplo, proteínas dedo de zinco (ou “zinc finger”) induzidas por estimulação TLR que se ligam a mRNA de genes envolvidos em resposta imunitária provocando a sua destabilização (Kumagai & Akira, 2010).

1.3.2 NLR, RLR e CLR

Na sequência da descoberta dos TLR, outros PRR têm vindo a ser caracterizados, entre os quais se destacam as famílias de PRR citoplasmáticos NLR e RLR e a família de receptores transmembranares CLR (Tabela 2).

Os receptores da família NLR detectam no citoplasma a presença de PAMP e DAMP (Kanneganti et al., 2007). A estimulação via proteínas NLR pode resultar na activação de NF- κ B, na indução de vias de sinalização de morte celular e na indução do inflamassoma, um complexo multiproteico que permite o processamento de pró-citocinas induzidas por agonistas de TLR, NLR e RLR, como pró-IL-1 β e pró-IL-18, levando à secreção das suas formas maduras. Estão identificadas mais de 30 proteínas NLR em rato, a maioria das quais com função ainda desconhecida. Os receptores NOD (do inglês “nucleotide-binding oligomerization domain”) 1 e NOD2 reconhecem estruturas derivadas do peptidoglicano bacteriano, iE-DAP (ácido γ -D-glutamil-meso-diaminopimélico) e MDP (muramildipéptido), respectivamente, activando NF- κ B e MAPK com consequente indução de citocinas inflamatórias e outros genes envolvidos na resposta imunitária (Girardin et al., 2003a;

Girardin et al., 2003b; Kufer et al., 2006). Os inflamassomas, dependendo das proteínas que os compõem, são classificados em inflamassomas NALP (do inglês “NACHT, LRR and pyrin domain containing protein”) 3, IPAF (do inglês “IL-1 β converting enzyme protease activating factor”) e NALP1 (Kumar et al., 2009a). O inflamassoma NALP3 é activado por ligandos exógenos, como MDP, RNA viral e bacteriano, toxinas e sais de alumínio (adjuvante vacinal clássico), entre outros; e por ligando endógenos, como cristais de urato monossódico e de pirofosfato de cálcio, péptido β -amilóide fibrilar e adenosina trifosfato (ATP, do inglês “adenosine triphosphate”). O inflamassoma IPAF é activado por bactérias intracelulares como *Salmonella typhimurium* e *Legionella pneumophila*, devendo-se este efeito, pelo menos em parte, à proteína flagelina. A toxina letal (LT, do inglês “lethal toxin”) de *Bacillus anthrax* activa o inflamassoma NALP1 (revisto por Kumar et al., 2009a).

Tabela 2 – NLR, RLR e CLR^a

Família	Localização	PRR	PAMP	Origem	
NLR	Citoplasma	NOD1	iE-DAP	Bactérias	
			NOD2	MDP	Bactérias
			NALP3	MDP	Bactérias
				RNA	Bactérias, vírus
				ATP	Bactérias?, hospedeiro?
			Toxinas	Bactérias	
			Sais de alumínio	Adjuvante vacinal	
			Cristais de urato e de pirofosfato, péptido β -amilóide fibrilar, ATP	Hospedeiro	
			Sílica, abestos	Ambiente	
			Hemozoína	<i>Plasmodium</i>	
		Zimosano	<i>Saccharomyces</i>		
		Não determinado	<i>C. albicans</i> , vírus influenza, <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>		
		NALP1	Toxina letal	<i>Bacillus anthracis</i>	
IPAF	Flagelina	Bactérias flageladas			
	Não determinado	<i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Legionella pneumophila</i> , <i>Shigella flexneri</i>			
RLR	Citoplasma	RIG-I	RNA (5'-PPP ssRNA, dsRNA pequenos <50 pb); poly(I:C) pequenos (<300 pb)	Vírus (e.g. <i>Paramyxoviridae</i>); síntese	
			MDA5	dsRNA longos, poly(I:C) longos	Vírus (e.g. <i>Picornaviridae</i>); síntese
		LGP2	RNA (?)	Vírus	
CLR	Membrana plasmática	DC-SIGN	Hidratos de carbono com manose e fucose	Vírus, bactérias e fungos, hospedeiro	
		Dectina-1	β -Glucano	Fungos	

^aAdaptado de Kumar et al. (2009a, 2009b) e de Kawai e Akira (2009).

A família dos receptores citoplasmáticos RLR compreende três membros, RIG-I (do inglês “retinoic acid-inducible gene-I”), MDA5 (do inglês “melanoma differentiation-associated gene 5”) e LGP2 (do inglês “laboratory of genetics and physiology 2”) (Takeuchi & Akira, 2009). Estes receptores detectam dsRNA genómico de vírus e dsRNA originados durante replicação de vírus ssRNA, levando à produção de citocinas inflamatórias e de IFN do tipo I via activação de NF- κ B, IRF3 e IRF7 (Kumar et al., 2009a). RIG-I e MDA5 detectam padrões distintos de moléculas de RNA não-próprio. RIG-I liga-se a RNA 5'-trifosfato em formas de cadeia simples e de cadeia dupla ou pequenos dsRNA de 300 a 1000 pb sem 5'-trifosfato. MDA-5 reconhece dsRNA com mais de 1000 pb e o análogo sintético de dsRNA poly(I:C) (Jin et al., 2010). Estudos *in vitro* sugerem que LGP2 funciona como regulador negativo de RIG-I e MDA5 (Takeuchi & Akira, 2010).

A família CLR compreende um conjunto de receptores transmembranares caracterizados pela presença de um domínio de ligação a hidratos de carbono que permite a detecção de diferentes classes de microrganismos. A ligação a lectinas do tipo C é importante na internalização e no processamento antigénico de microrganismos, mas pode igualmente induzir a transcrição de genes relevantes para o desenvolvimento de imunidade específica (den Dunnen et al., 2010). A proteína DC-SIGN (do inglês “dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin”), expressa em células dendríticas e em algumas subpopulações de macrófagos, reconhece diversas estruturas de hidratos de carbono, como glicoconjugados contendo manose e antígenos de grupo sanguíneo contendo fucose. A ligação a DC-SIGN induz a activação de vias de sinalização que, embora por si só não activem NF- κ B, convergem com as vias de sinalização TLR modulando a sua função (Gringhuis et al., 2007). Exemplo desta modulação é o impedimento da maturação de células dendríticas induzida por LPS e o aumento da produção de IL-10 em células estimuladas via DC-SIGN (Gringhuis et al., 2007). O receptor dectina-1 reconhece β -glucano de diversas espécies de fungos, como *Candida albicans*. A sua estimulação em macrófagos induz fagocitose, produção de espécies reactivas de oxigénio e expressão de citocinas inflamatórias (Underhill et al., 2005). Esta lectina do tipo C é única na capacidade de induzir directamente a activação de NF- κ B (Gross et al., 2006). A sua activação em células dendríticas induz preferencialmente respostas do tipo Th17 (LeibundGut-Landmann et al., 2007).

Todas as famílias de PRR mencionadas, para além de outras aqui não abordadas por ultrapassarem o âmbito deste trabalho ou por serem ainda mal conhecidas, incluem receptores cuja activação promove mecanismos efectores de imunidade inata com um impacto determinante no desenvolvimento das respostas específicas. Neste contexto, os receptores

melhor estudados e mais relevantes para o presente trabalho são os TLR, aos quais é dedicada maior atenção.

1.4 O efeito da activação TLR em funções de células apresentadoras de antígenos

As células apresentadoras de antígenos profissionais (APC, do inglês “antigen presenting cells”) são um elemento fundamental do sistema imunitário inato que desempenha simultaneamente um papel central na indução de respostas específicas por linfócitos T e B. De entre as APC, as células dendríticas são particularmente eficientes na activação de linfócitos T naïf (Banchereau et al., 2000; Hart, 1997) tendo assim um papel único na iniciação de respostas adaptativas. O conjunto de eventos que caracteriza a maturação das células dendríticas, desde o contacto inicial com os microrganismos até à apresentação antigénica a linfócitos T, é influenciado por factores provenientes do ambiente que as circunda, mas é em grande medida desencadeado e regulado pelo reconhecimento dos microrganismos através de PRR (Iwasaki & Medzhitov, 2004).

1.4.1 Migração e internalização

As células dendríticas imaturas distribuem-se pelos tecidos periféricos onde vigiam o meio circundante. Nesta fase, expressam receptores como o receptor de quimiocinas CXC (CXCR, do inglês “CXC chemokine receptor”) 1, o receptor de quimiocinas CC (CCR, do inglês “CC chemokine receptor”) 1, CCR2, CCR5 e CCR6 que permitem a sua migração para os locais de inflamação em resposta a quimiocinas inflamatórias como o ligando de quimiocina CC (CCL, do inglês “CC chemokine ligand”) 3/MIP (do inglês “macrophage inflammatory protein”)-1 α , CCL4/MIP-1 β , CCL20/MIP-3 α , CCL2/MCP (do inglês “monocyte chemotactic protein”)-1 e CCL5/RANTES (do inglês “regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted”) (Lebre et al., 2005; Pulendran, 2004b; Sallusto & Lanzavecchia, 2000; Sallusto et al., 1999). Uma vez no foco inflamatório, o contacto com citocinas como o factor necrosante tumoral (TNF, do inglês “tumor necrosis factor”)- α e IL-1 e com ligandos de PRR induz a sua maturação. Estudos recentes demonstram que nos momentos iniciais após contacto com ligandos TLR a motilidade das células dendríticas diminui transitariamente devido, pelo menos em parte, à modulação da actividade do citoesqueleto de actina (Faure-André et al., 2008; West et al., 2008). Segundo os autores destes estudos, esta imobilização temporária poderá ter como função prolongar o contacto com os microrganismos no local de inflamação. As células dendríticas migram então através

dos vasos linfáticos para os gânglios linfáticos regionais onde ocorre a apresentação dos péptidos processados a linfócitos T. A activação das células dendríticas via TLR promove esta migração através da regulação negativa de receptores de quimiocinas inflamatórias, como CCR1, CCR5 e CCR6, e da regulação positiva de CCR7 (Iwasaki & Medzhitov, 2004; Sozzani et al., 1998; van Duin et al., 2006). Este receptor tem como ligandos as quimiocinas CCL19/MIP-3 β e CCL21/6CKine/SLC (do inglês “secondary lymphoid tissue chemokine”), expressas nos tecidos linfóides secundários, e desempenha um papel crucial na migração de células dendríticas maduras para os vasos linfáticos aferentes e na sua localização nas áreas T dos gânglios linfáticos (Sallusto & Lanzavecchia, 2000).

À semelhança da migração das células dendríticas, a internalização dos microrganismos nos locais de inflamação é igualmente regulada por activação TLR. Embora a diminuição da capacidade endocítica seja comumente descrita como uma característica de maturação destas células – consentânea com a transição de um fenótipo destinado à captura de antígenos para um fenótipo adequado ao processamento e apresentação dos péptidos processados – alguns estudos demonstram ocorrer um aumento transitório da internalização de antígenos em resposta a activação TLR (Gil-Torregrosa et al., 2004; West et al., 2004). Este efeito é observável por estimulação com ligandos de diferentes receptores, incluindo LPS (TLR4), Pam₃CSK₄ (TLR2), poly(I:C) (TLR3) e ODN com motivos CpG (TLR9) (Gil-Torregrosa et al., 2004; West et al., 2004). A importância da activação TLR na internalização de antígenos é ainda evidenciada pela diminuição da capacidade fagocítica de macrófagos deletados em MyD88 (Blander & Medzhitov, 2004). Este fenómeno depende da activação de MAPK (Blander & Medzhitov, 2004; Zaru et al., 2007) e poderá ter um papel determinante na aquisição de antígenos pelas APC quando de um contacto inicial com microrganismos. Importa sublinhar, no entanto, que os autores destes estudos, em conformidade com os resultados obtidos noutros trabalhos (Datta et al., 2003; Weck et al., 2007), registam uma regulação negativa da capacidade de internalização de antígeno por ligandos TLR na fase de maturação tardia.

1.4.2 Processamento e apresentação antigénica em contexto de MHC classe II

Embora ainda alvo de controvérsia (Russell & Yates, 2007a, 2007b; Yates & Russell, 2005), têm-se acumulado observações que suportam um papel determinante da activação TLR no controlo da maturação dos fagossomas, com impacto conseqüente na regulação da apresentação antigénica por APC. Os trabalhos desenvolvidos pelos grupos de Blander e Medzhitov sustentam a existência de dois modos de maturação dos fagossomas, um constitutivo e outro indutível, sendo este último controlado por sinalização TLR (Blander,

2008; Blander & Medzhitov, 2004; Blander & Medzhitov, 2006). De acordo com estes estudos, a fagocitose de bactérias origina uma taxa de fusão fagolisossomal superior à observada na fagocitose de células apoptóticas que não contêm ligandos TLR. Esta diferença observa-se apenas na presença de sinalização TLR e envolve a activação da MAPK p38 via activação de MyD88. Porventura mais relevante, este controlo de maturação exerce-se de forma autónoma nos fagossomas. Isto é, numa mesma célula o modo indutível verifica-se somente nos fagossomas que contêm ligandos de TLR, observando-se o modo de maturação constitutivo nos fagossomas que contêm células apoptóticas, mesmo quando é exercida estimulação exógena com LPS na mesma célula ou quando se verifica fagocitose simultânea de bactérias.

Uma vez ocorrida a fusão fagolisossomal, a formação de complexos péptido-MHC classe II, base da apresentação directa de epitopos de origem exógena a linfócitos T CD4⁺, encontra-se igualmente sob o controlo de activação TLR. Por norma, os antígenos exógenos internalizados por APC são degradados nos lisossomas ácidos por acção de proteases, nomeadamente catepsinas, e os péptidos resultantes são então ligados a moléculas MHC classe II após libertação do péptido da cadeia invariante associado a MHC classe II (CLIP, do inglês “class II-associated invariant chain-derived peptide”), que protege a fenda de ligação a péptidos, por acção da molécula MHC não-clássica HLA-DM (H2-DM em ratinho). Blander e Medzhitov (2006) demonstram que a indução da clivagem da cadeia invariante, de que resulta o péptido CLIP, é especificamente induzida por activação TLR, não se verificando em fagossomas desprovidos de ligandos destes receptores.

Este mecanismo de controlo autónomo do destino do conteúdo de cada fagossoma, baseado na compartimentalização da sinalização TLR, é uma explicação atraente para a compreensão de como o sistema imunitário evita o desencadeamento de resposta contra antígenos próprios em situações de infecção. De facto, nestas condições, ocorrendo fagocitose de microrganismos e células apoptóticas pela mesma APC, e considerando a elevada expressão superficial de moléculas co-estimuladoras induzida pela activação de PRR, ou seja, a aquisição pela célula de um fenótipo fortemente indutor de imunidade, parece essencial a existência de um mecanismo que discrimine o que deve ser apresentado a células T, restringindo-o a péptidos derivados dos microrganismos.

A activação TLR potencia ainda a apresentação directa de antígenos exógenos por células dendríticas através da estabilização de moléculas MHC classe II na superfície celular. Em células não-activadas os complexos MHC-péptido permanecem por períodos curtos na superfície celular, sendo continuamente internalizados por endocitose. Esta reciclagem é controlada pela proteína MARCH (do inglês “membrane-associated RING-CH”) I, uma ligase

da ubiquitina E3, cuja expressão é diminuída em resposta a estimulação por LPS, o que resulta num aumento da expressão superficial de MHC classe II (De Gassart et al., 2008).

1.4.3 Co-estimulação: imunidade *versus* tolerância

A internalização e o processamento de antígenos exógenos por células dendríticas levam à exposição, na superfície da célula, de moléculas MHC classe II ligadas a péptidos derivados do antígeno para serem apresentados a linfócitos T CD4⁺. O seu reconhecimento por uma célula T CD4⁺ naïf através do receptor de células T (TCR, do inglês “T cell receptor”) determina a especificidade da resposta adaptativa contra o antígeno. No entanto, para que se desenvolva imunidade, o reconhecimento necessita de ser acompanhado por co-estimulação, exercida através da ligação de moléculas co-estimuladoras expressas à superfície da célula dendrítica com os respectivos ligandos na superfície da célula T. Na ausência destes sinais a célula T é instruída no sentido de um fenótipo regulador ou anérgico que resulta em tolerância face ao antígeno apresentado (Kapsenberg, 2003). Pelo contrário, conjuntamente com o reconhecimento via TCR, a co-estimulação induz a proliferação das células T naïf e a sua diferenciação em células efectoras e células de memória.

De entre as moléculas co-estimuladoras destacam-se CD80 (B7.1), CD86 (B7.2) e CD40 e o aumento da sua expressão à superfície das células dendríticas é comumente usado como marcador do processo de maturação. A principal via de co-estimulação de células T naïf é exercida através da molécula CD28, expressa constitutivamente pela generalidade das células T, por ligação de CD80 e CD86 expressas à superfície de APC (Reis e Sousa, 2006). Para além da sobreexpressão induzida por citocinas, a expressão de CD80/CD86 e outras moléculas co-estimuladoras à superfície de células dendríticas é estimulada por ligação a TLR (Iwasaki & Medzhitov, 2004).

1.4.4 Polarização de linfócitos Th

As respostas imunitárias específicas dirigidas contra diferentes microrganismos podem ser qualitativamente distintas no que respeita aos mecanismos efectoras e reguladores que as caracterizam. Os diferentes tipos de resposta são em grande medida determinados pelo sentido da diferenciação dos linfócitos T CD4⁺ naïf na sequência da sua activação inicial, induzida pelo reconhecimento de péptidos no contexto de MHC classe II. Este processo, designado por polarização da resposta Th, é também regulado pela activação da célula dendrítica induzida por estimulação TLR.

Os dois perfis Th classicamente entendidos como pólos opostos desta polarização, designados por Th1 e Th2, caracterizam-se por padrões distintos de secreção de citocinas e activam diferentes componentes efectores do sistema imunitário (Annunziato & Romagnani, 2009; Kapsenberg, 2003; Pulendran et al., 2001a; Zhu et al., 2010a). As células Th1 desempenham um papel central na protecção contra microrganismos intracelulares através da produção de níveis elevados de IFN- γ , activação de células fagocitárias e produção de anticorpos opsonizantes e fixadores do complemento. Por seu turno, as células Th2 estão relacionadas com a protecção contra parasitas helmintes e produzem citocinas como IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13. As citocinas IL-4 e IL-13 estão implicadas na mudança de classe de imunoglobulinas produzidas por linfócitos B para IgE, com consequente activação de basófilos e mastócitos e produção de IL-4, IL-13, TNF- α e eotaxinas. IL-5 desempenha papel importante na activação de eosinófilos e IL-9 contribui para a resposta de mastócitos e de IgE e para a produção de mucina pelas células epiteliais.

As respostas do tipo Th1 são, em geral, descritas como respostas tipicamente celulares e as respostas do tipo Th2 como respostas humorais. Importa no entanto salientar que, se as respostas Th2 se caracterizam de facto pela significativa produção de IgG1 e IgE (no caso do ratinho), as respostas Th1 incluem também uma componente humoral embora caracterizada por imunoglobulinas de subclasses distintas, designadamente, no ratinho, IgG2a e IgG3 (Annunziato & Romagnani, 2009; Coffman et al., 1993).

No estabelecimento de resposta a infecção podem coexistir aspectos característicos de ambos os tipos de resposta, mas, devido a mecanismos recíprocos de inibição e auto-reforço, verifica-se, em geral, uma tendência para a estabilização num dos sentidos de polarização (Kaiko et al., 2008).

A diferenciação de um linfócito T CD4⁺ no sentido de uma das classes Th é determinada por um conjunto diversificado de factores que actuam no momento do reconhecimento de um complexo péptido-MHC classe II, em particular por sinais provenientes da célula dendrítica, quer de forma directa por ligação de moléculas de superfície, quer através de citocinas secretadas. A natureza do antígeno e a afinidade da ligação ao TCR contribuem também para a definição do sentido de polarização (Kaiko et al., 2008).

A diferenciação no sentido Th1 ocorre fundamentalmente em resposta a IFN- γ e IL-12, sendo o primeiro produzido, em fases iniciais de uma infecção, por células de resposta inata, como células NK, células dendríticas e macrófagos. As citocinas IL-18, IL-27, IL-23, IFN do tipo I e as moléculas de superfície CD54, ICAM (do inglês “inter-cellular adhesion molecule”)-1, Delta-1 e Delta-4 foram também implicadas na polarização de resposta Th1

(Amsen et al., 2009; Kaiko et al., 2008). A forte expressão do factor de transcrição T-bet caracteriza as células Th1 (Zhu et al., 2010a).

A citocina IL-4 constitui o factor essencial no desenvolvimento de Th2 e o principal factor de transcrição associado ao desenvolvimento deste fenótipo é GATA-3 (Zhu et al., 2010a). A fonte inicial de IL-4 no desencadeamento da polarização no sentido Th2 não está claramente elucidada mas julga-se poder ser a própria célula T naïf em resposta a sinais derivados das células dendríticas, designadamente através do ligando Jagged-1 dos receptores Notch das células T (Amsen et al., 2009). O receptor de ICOS (do inglês “inducible T-cell costimulator”) e as citocinas IL-6 e IL-11 também desempenham um papel na polarização Th2 (Kaiko et al., 2008).

Recentemente foi descrita uma terceira classe de células Th, designada Th17, caracterizada pela expressão de IL-17, que promove resistência a bactérias extracelulares e fungos através da estimulação da actividade de neutrófilos (Annunziato et al., 2010; Harrington et al., 2005). O comprometimento de linfócitos T CD4⁺ no sentido Th17 ocorre na presença de IL-6 em conjunto com TGF (do inglês “transforming growth factor”)- β , mas na ausência de IL-4 e IL-12 (Kaiko et al., 2008). ROR(γ)t constitui o principal factor de transcrição implicado na diferenciação de Th17 e induz a expressão do receptor de IL-23, citocina também envolvida no desenvolvimento deste tipo de resposta (Amsen et al., 2009; Zhu et al., 2010a). IL-21 foi também implicada na diferenciação Th17 (Kaiko et al., 2008).

A estimulação exacerbada de cada uma das classes Th tem sido associada ao desenvolvimento de inúmeros quadros patológicos. As respostas Th1 e Th17 têm sido implicadas em doenças auto-imunes e afecções crónicas inflamatórias enquanto as respostas Th2 desempenham um papel central em doenças alérgicas (Zhu & Paul, 2008).

Têm sido propostos outros tipos de células Th, designadamente Th9 e Th22, caracterizados pela produção de elevados níveis de IL-9 e IL-22, respectivamente, porém o seu significado fisiopatológico está ainda mal caracterizado (Annunziato & Romagnani, 2009).

Um grupo distinto de células T CD4⁺, os linfócitos T reguladores (Treg), distingue-se dos anteriores pela sua função reguladora das respostas efectoras, desempenhando um papel fundamental em mecanismos de tolerância imunitária. Estão descritos dois subgrupos destas células, um composto por linfócitos cuja natureza reguladora é determinada no timo, designados linfócitos Treg CD4⁺ naturais, e outro constituído por células que se diferenciam na periferia a partir de células T CD4⁺ naïf após contacto com células dendríticas, tal como ocorre com Th1, Th2 e Th17. Estas células, designadas linfócitos Treg CD4⁺ adaptativos ou induzidos, podem apresentar diferentes fenótipos e são importantes na manutenção de

tolerância imunitária para com antígenos próprios, através da produção de IL-10 e TGF- β (Pulendran et al., 2010; Zhu et al., 2010a). As células Treg têm como factor de transcrição característico Foxp3 e a sua diferenciação é promovida por citocinas inibidoras, como IL-10 e TGF- β , e por ácido retinóico (Pulendran et al., 2010; Zhu et al., 2010a).

Os sinais polarizadores que actuam no linfócito T provêm em grande medida da célula dendrítica que apresenta o antígeno. O fenótipo desta, por seu turno, é influenciado por citocinas e quimiocinas do ambiente local, mas é também fortemente determinado pelo estímulo de maturação recebido através dos PRR durante a internalização e processamento do antígeno (Kaiko et al., 2008). Inicialmente admitia-se que a estimulação de células dendríticas por ligandos TLR induzia, invariavelmente, a polarização de respostas no sentido Th1 (Barton & Medzhitov, 2002). Contudo, um vasto conjunto de estudos realizados nos últimos anos tem vindo a revelar excepções a esta regra. É hoje claro que células dendríticas expostas a diferentes ligandos de TLR, e em diferentes condições experimentais, se caracterizam por diferente expressão dos factores polarizadores atrás referidos (Manicassamy & Pulendran, 2009). Embora se reconheça a capacidade de ligandos de TLR3, TLR4, TLR7 e TLR9 induzirem respostas do tipo Th1, o tipo de polarização obtido por estimulação TLR2 e TLR5 não é consensual (Pulendran, 2005). Segundo alguns autores, a estimulação TLR2 promove respostas Th2 por não induzir nas células dendríticas a expressão de IFN do tipo I e por activar fortemente e de forma prolongada ERK, uma MAPK, com consequente expressão de níveis elevados de IL-10 e bloqueio da produção IL-12p70 (Dillon et al., 2004; Gautier et al., 2005). Há no entanto, a este respeito, conclusões contraditórias na literatura que sublinham a necessidade de uma interpretação cautelosa dos resultados quando se pretende correlacionar diferentes PRR ou os seus ligandos com capacidade de polarização Th (Kapsenberg, 2003). Por exemplo, em condições *in vitro*, dependendo da dose e da duração do período de estimulação, o ligando de TLR4 LPS pode induzir a diferenciação de células dendríticas imaturas em células com capacidade de polarizar respostas tanto no sentido Th1 como no sentido Th2 (Langenkamp et al., 2000). Do mesmo modo, a inalação de antígeno conjuntamente com doses baixas de LPS promove a indução de resposta Th2 *in vivo*, observando-se, pelo contrário, polarização no sentido Th1 quando são inaladas doses elevadas de LPS simultaneamente com o antígeno (Eisenbarth et al., 2002). Por outro lado, embora o conceito inicial de que diferentes subpopulações de células dendríticas possuem fenótipos pré-determinados (DC1 e DC2) no sentido de polarizar a resposta para um tipo Th1 ou Th2 tenha sido em grande medida posto em causa pela demonstração de uma significativa plasticidade destas células em resposta a diferentes estímulos (Edwards et al., 2002; Manickasingham et al., 2003), devem ser tidas em consideração diferenças nas subpopulações utilizadas nos

estudos de polarização. Por exemplo, a estimulação de células dendríticas CD8 α^+ de ratinho, com fenótipo plasmocitóide, isoladas de gânglios linfáticos mesentéricos, ao contrário daquelas isoladas do baço, induzem diferenciação de Treg mesmo se estimuladas com ODN CpG, um ligando fortemente indutor de respostas Th1 (Bilsborough et al., 2003).

Para além do efeito exercido por indução da secreção de citocinas, a estimulação TLR influencia a polarização ou o reforço da polarização de células T CD4 $^+$ através da indução de quimiocinas. As células Th1 e Th2 expressam diferentes padrões de receptores de quimiocinas sendo por isso atraídas de forma distinta em resposta a gradientes destes mediadores. As células Th1 expressam níveis elevados dos receptores CXCR3 e CCR5, cujos ligandos são, entre outros, o ligando de quimiocina CXC (CXCL, do inglês “CXC chemokine ligand”) 9/MIG (do inglês “monokine induced by gamma-interferon”), CXCL10/IP-10 (do inglês “IFN- γ -inducible protein 10”) e CXCL11/I-TAC (do inglês “interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant”), para o primeiro, e RANTES, MIP-1 α e MIP-1 β para o segundo. Os linfócitos Th2 expressam CCR3, CCR4 e CCR8, cujos ligandos são CCL11/eotaxina para o primeiro, CCL17/TARC (do inglês “thymus and activation regulated chemokine”) e CCL22/MDC (do inglês “macrophage-derived chemokine”), para o segundo, e CCL1/I-309, para o terceiro (Lebre et al., 2005). De acordo com um estudo realizado por Lebre et al. (2005) as células dendríticas diferenciadas num sentido polarizador Th1 expressam preferencialmente quimiocinas inflamatórias (como MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β e RANTES) e quimiocinas que atraem linfócitos Th1 (MIG, IP-10 e I-TAC), enquanto as células dendríticas maduras polarizadoras de Th2 expressam preferencialmente MDC, cujo receptor é expresso em linfócitos Th2. Assim, a indução da expressão de quimiocinas em células dendríticas localizadas nos tecidos periféricos permite o recrutamento dos diferentes tipos de linfócitos para os locais inflamatórios e possibilita o reforço da polarização antes induzida.

O conhecimento sobre as consequências da estimulação por diferentes ligandos TLR, ou exercida simultaneamente por ligandos de diferentes receptores, na polarização de resposta tem grande relevância para o desenvolvimento de novos tipos de vacinas e grande parte do conhecimento relativo a este aspecto provém de estudos de associação de antígenos com ligandos TLR para modulação de resposta. Estas estratégias de imunomodulação com diferentes formulações estimuladoras, bem como os seus efeitos sobre a resposta específica por estimulação directa de células T, são abordados mais adiante.

1.4.5 Apresentação cruzada

Designa-se por apresentação cruzada de antígenos o fenómeno em que os antígenos exógenos, em regra processados pela via endocítica e apresentados no contexto de MHC

classe II a células T CD4⁺, são, ao invés, apresentados em contexto de MHC classe I a linfócitos CD8⁺. Este processo ocorre em APC e distingue-se da apresentação clássica em MHC classe I, que ocorre de forma generalizada em células nucleadas e na qual os péptidos apresentados têm origem endógena. Na apresentação directa pela via clássica os antígenos expressos no citoplasma, de origem própria ou viral, são degradados pelo proteossoma, um complexo multicatalítico de proteases, e os péptidos resultantes são transportados activamente para o lúmen do retículo endoplasmático por moléculas TAP (do inglês “transport associated antigen processing”) onde são inseridos em moléculas MHC classe I sintetizadas *de novo*. Os complexos péptido-MHC classe I são então transportados para a superfície celular onde ficam disponíveis para o reconhecimento por linfócitos CD8⁺. O processo de apresentação clássica é pois crucial para que se desencadeiem os mecanismos citotóxicos de linfócitos T CD8⁺ efectores contra células infectadas por vírus (Guernonprez et al., 2002). Por outro lado, a apresentação cruzada pelas APC, particularmente pelas células dendríticas, para além de desempenhar um papel importante na manutenção de tolerância imunitária contra antígenos próprios (Kurts et al., 1997), constitui o mecanismo que permite a ligação de péptidos de origem exógena a MHC classe I e, dessa forma, o “priming” de linfócitos CD8⁺ reconhecedores de antígenos tumorais e de antígenos de vírus que não infectam APC (Groothuis & Neefjes, 2005). Constitui ainda o processo pelo qual se torna possível a indução de respostas citotóxicas por linfócitos CD8⁺ específicos contra antígenos de vacinas não-replicativas.

Para além do papel atrás referido no controlo do processamento e apresentação de antígenos exógenos no contexto de MHC classe II a células T CD4⁺, começa a ser também evidente um papel relevante da activação TLR na indução de apresentação cruzada de antígenos pelas células dendríticas. Segundo Gil-Torregrossa et al. (2004) a activação de células dendríticas por LPS estimula a apresentação cruzada mediada por receptores γ do fragmento cristalizável (Fc γ R, do inglês “fragment crystallizable γ receptor”) durante as primeiras horas de estimulação. Este fenómeno deve-se a um aumento da internalização e do transporte de antígenos para o citoplasma, bem como a um aumento ligeiro da actividade do proteossoma e do TAP. Inversamente, numa fase posterior da maturação, ocorre uma diminuição da tomada de antígeno e da sua transferência para o citoplasma que origina o bloqueio da apresentação cruzada. Segundo estes autores, este mecanismo poderá ter como função uma focalização no processamento e apresentação dos antígenos internalizados na periferia, aquando do encontro com o estímulo de maturação. Em consonância com estes resultados, West et al. (2004) reportam um aumento na apresentação cruzada de células dendríticas estimuladas de forma aguda (30 a 60 minutos) com LPS. Mais recentemente,

Burgdorf et al. (2008) demonstraram um mecanismo de apresentação cruzada que requer uma deslocação de TAP para os endossomas precoces, a qual é induzida por LPS e dependente de TLR4 e MyD88. A apresentação cruzada nos endossomas precoces, sem que se verifique o acesso ao retículo endoplasmático onde ocorre a ligação de péptidos de origem endógena a MHC classe I, revela uma separação espacial e um mecanismo distinto entre apresentação directa e cruzada e uma tendência desta última no sentido da apresentação de antígenos microbianos, mediada por TLR.

Estudos recentes têm vindo também a demonstrar capacidade de apresentação cruzada pelas células dendríticas plasmocitóides (Di Pucchio et al., 2008; Mouriès et al., 2008), implicando a activação TLR na regulação desse processo. Mouriès et al. (2008) demonstram que células dendríticas plasmocitóides capturam de forma eficiente antígenos exógenos *in vivo*, mas que a apresentação cruzada por um mecanismo dependente de TAP exige estimulação via TLR7 ou TLR9.

Para além dos trabalhos que abordam especificamente os mecanismos de apresentação cruzada nas células dendríticas e que demonstram a influência da estimulação por ligandos TLR nela exercida, diversos outros estudos reforçam o papel da activação via PRR na apresentação cruzada através da demonstração de uma capacidade superior na indução *in vivo* de respostas específicas por linfócitos CD8⁺ em protocolos vacinais que associam ligandos TLR a antígenos proteicos. Pelo menos em parte, tal aumento resultará do efeito de estimulação, directa ou indirecta, nas APC que processam os antígenos vacinais. Os mecanismos subjacentes à indução de respostas citotóxicas específicas *in vivo* através de TLR não estão no entanto totalmente esclarecidos, existindo na literatura resultados contraditórios sobre a sua natureza. De acordo com Durand et al. (2004; 2006) a capacidade dos estímulos TLR iniciarem respostas de linfócitos CD8⁺ contra antígenos solúveis está fortemente dependente da via de sinalização dos IFN do tipo I, activada, no estudo referido, por ligandos de TLR3, TLR4 e TLR9. Também no trabalho realizado por Datta et al. (2003), apenas os ligandos de TLR3 [poly(I:C)] e de TLR9 (CpG DNA), fortemente indutores de IFN- α/β , se revelaram eficientes na indução de apresentação cruzada. Contudo, estão reportados resultados que demonstram a indução de apresentação cruzada e citotoxicidade específica contra antígenos conjugados com ligandos de TLR2, cuja estimulação em células dendríticas não induz IFN (Baz et al., 2008; Chua et al., 2008; Jackson et al., 2004; Khan et al., 2007; Lau et al., 2006).

1.5 Activação TLR em linfócitos e células não-imunitárias

No ponto anterior fez-se referência aos efeitos da estimulação TLR nas células dendríticas e ao seu impacto no desencadeamento ulterior de respostas adaptativas. Contudo, em contexto *in vivo*, a activação através de PRR não se verifica somente nestas células, estando descrita a ocorrência de estimulação directa em neutrófilos, eosinófilos, mastócitos, células NK, células epiteliais e do endotélio vascular, entre outras (Iwasaki & Medzhitov, 2004). Para além de desempenhar um papel na defesa imunitária inata, a estimulação via PRR de outras células que não as APC exerce influência indirecta na resposta adaptativa através de citocinas e quimiocinas que actuam sobre as APC. Ilustrativo dessa possibilidade é o trabalho de Lebre et al. (2003) em que se demonstra a indução de maturação de células dendríticas derivadas de monócitos humanos por sobrenadantes de culturas de queratinócitos activados por um análogo sintético de dsRNA. As células dendríticas assim maturadas favoreceram fortemente o desenvolvimento de células Th1 a partir de linfócitos T naíf, tendo dependido esta polarização dos mediadores IFN- α/β e IL-18 presentes nos sobrenadantes de culturas de queratinócitos estimulados. Outro exemplo do papel da activação via PRR de células não imunitárias no desenvolvimento de imunidade adaptativa é a demonstração de que a activação de células do estroma exercida por poly(I:C) e mediada pelo RLR MDA5 é essencial para o estabelecimento de memória em linfócitos CD8⁺ quando aquele ligando é usado como adjuvante (Wang et al., 2010). Hou et al. (2008) reportam ainda que em ratinhos com células dendríticas deficientes em MyD88 a produção de IFN- γ por células NK e NKT, bem como a polarização Th1 de linfócitos CD4⁺ específicos de antígenos, se mantêm em grande medida inalteradas após administração de um ligando de TLR9 sob forma agregada. O mesmo não se observa quando o ligando é administrado sob forma solúvel, demonstrando, por um lado, uma relação entre a forma física em que o ligando de TLR é administrado e o tipo de células que é activado e, por outro, o papel potencial da activação de outras células, que não as células dendríticas, na promoção de respostas Th1.

Nos últimos anos tem vindo a ser igualmente demonstrada a existência de uma modulação directa das funções de linfócitos por ligandos TLR que se exerce em diferentes subpopulações e que tem impacto na imunidade específica. Diversos estudos sugerem que a estimulação directa de células T por ligandos TLR desempenha um papel co-estimulador semelhante ao exercido via CD28, induzindo a sua proliferação e sobrevivência e baixando o seu limiar de activação (revisto por Gibson et al., 2010). Este facto possibilita o desencadeamento de resposta na presença de sinalização TCR fraca, incluindo a indução de respostas por linfócitos T CD8⁺ (Cottalorda et al., 2009; Mercier et al., 2009). Foi também

demonstrado que a sinalização TLR em linfócitos B é necessária para que ocorra resposta humoral contra antígenos T-dependentes (Pasare & Medzhitov, 2005).

A activação directa de linfócitos via TLR desempenha ainda um papel na polarização das respostas imunitárias. De acordo com Imanishi et al. (2007) a estimulação de linfócitos Th1 de ratinho por ligandos de TLR2 induz, de forma directa, a produção de IFN- γ , assim como proliferação e sobrevivência celulares na ausência de estímulo via TCR. O mesmo efeito não se observa com ligandos de outros TLR, nem em células Th2 com qualquer dos ligandos, o que sugere um papel importante da estimulação TLR2 na promoção e manutenção de respostas Th1. Num modelo de melanoma B16-ovalbumina, demonstrou-se também que a estimulação directa de linfócitos CD8⁺ por esta via aumenta a sua actividade citolítica (Asprodites et al., 2008).

Têm-se ainda acumulado evidências de que a estimulação directa de células Treg via TLR tem um papel importante na modulação das suas funções (Liu et al., 2010). A activação de linfócitos Treg pelo ligando de TLR2/1 Pam₃CSK₄, conjuntamente com estimulação via TCR e na presença de IL-2, induz proliferação e perda temporária de propriedades supressoras, as quais são, no entanto, restauradas após remoção do estímulo (Liu et al., 2006; Suttmuller et al., 2006). A diminuição da capacidade supressora das células Treg foi também observada na sequência de estimulação directa destas células via TLR8 (Peng et al., 2005). Por outro lado, foi reportado o aumento nas propriedades supressoras de linfócitos Treg por estimulação directa com hsp60 (do inglês “heat-shock protein 60”) endógena (Zanin-Zhorov et al., 2006), flagelina (Crellin et al., 2005) e análogos de ssRNA (Forward et al., 2010), ligandos de TLR2, TLR5 e TLR7, respectivamente.

1.6 Modulação de imunidade específica por ligandos de PRR em imunização e imunoterapia

As vacinas subunitárias apresentam vantagens significativas sobre as vacinas vivas no que respeita à sua segurança e estabilidade, mas são em geral pouco imunogénicas, revelando pobre capacidade para induzir respostas citotóxicas específicas e memória imunológica duradoura. Requerem por isso a utilização de elementos adjuvantes que potenciem a imunogenicidade dos antígenos de modo a promover respostas protectoras.

Apesar de um longo historial de tentativas para o desenvolvimento de adjuvantes vacinais, poucos são aqueles que foram até hoje licenciados para uso clínico. Entre eles contam-se os sais de alumínio, identificados nos anos 1920 e hoje largamente usados; as emulsões óleo em água, como MF59 e AS03, licenciadas na Europa e usadas nas vacinas

contra o vírus da gripe pandémico H1N1 em 2009; os lipossomas, vesículas lipídicas usadas em vacinas humanas contra a gripe e a hepatite A; e o AS04, composto por MPL, um derivado do componente activo do LPS, adsorvido a sais de alumínio, usado em vacinas contra o vírus da hepatite B e vírus do papiloma humano (O'Hagan & De Gregorio, 2009).

O conhecimento recente sobre a forma como o sistema imunitário é alertado para o combate a infecções através de PRR abriu novas perspectivas para a indução de respostas específicas efectivas com recurso a estímulos direccionados para os mecanismos de reconhecimento inato do sistema imunitário (Akira, 2009). A conjugação directa ou indirecta de antigénios com ligandos de PRR pode alterar profundamente a sua imunogenicidade, tanto em termos quantitativos como qualitativos, o que tem sido explorado para o desenvolvimento de novos adjuvantes e formulações imunogénicas que permitam ultrapassar as dificuldades até hoje encontradas na obtenção de vacinas eficazes e seguras (Coffman et al., 2010; Ishii & Akira, 2007; Pulendran, 2004b; Warshakoon et al., 2009). Nos pontos seguintes abordam-se algumas das estratégias em estudo para potenciação e modulação de respostas imunitárias através do uso de ligandos PRR. As estratégias baseadas em adjuvantes derivados de ácidos nucleicos microbianos são apenas brevemente referidas, dando-se especial atenção àquelas baseadas nos principais ligandos presentes na parede celular de bactérias Gram-negativas, por estarem directamente relacionadas com o presente trabalho.

1.6.1 Adjuvantes derivados de ácidos nucleicos

O análogo sintético do dsRNA poly(I:C) consiste numa cadeia de ácido inosínico e outra de ácido citidílico e a sua capacidade de induzir elevadas quantidades de IFN tem sido explorada desde o final dos anos 1970 (Jin et al., 2010). Novos análogos sintéticos menos tóxicos destas moléculas têm sido usados experimentalmente como adjuvantes de vacinas anti-virais e anti-tumorais, designadamente para indução de imunidade de mucosas (Adams et al., 2003; Ichinohe et al., 2005). O dsRNA é reconhecido pelos receptores TLR3, dois membros da família RLR (RIG-I e MDA-5) e NALP3 da família NLR, com consequente activação de caspase-1 e dos factores de transcrição NF- κ B, AP-1, IRF3 e IRF7 (Jin et al., 2010). As células dendríticas mielóides expressam o conjunto destes receptores e em resposta a estimulação por dsRNA ou análogos sintéticos produzem, entre outros mediadores, IL-12 e IFN do tipo I (Jin et al., 2010). A estimulação resulta ainda na maturação das células dendríticas com níveis elevados de MHC-classe I/classe II, CD83, CCR7, CD86 e CD40 expressos na superfície celular (Navabi et al., 2009). Estudos recentes demonstram que o dsRNA exerce também activação directa sobre células CD8⁺ (Salem et al., 2009).

As imidazoquinolinas, desenvolvidas nos anos 1980 como agentes antivirais, são uma família de análogos de nucleósidos que incluem o imiquimod (R-837) e o resiquimod (R-848) (Smits et al., 2008). O imiquimod, o primeiro composto desta família a ser autorizado para uso clínico, activa preferencialmente TLR7 e é usado no tratamento das lesões papilomatosas causadas pelo vírus do papiloma humano e em terapia de melanoma. O resiquimod tem uma actividade imunoestimuladora mais pronunciada e actua via TLR7 em ratinho e humano e via TLR8 em humano. Para além das imidazoquinolinas, outros compostos imunoestimuladores análogos de guanósina, como loxorribina, foram identificados como ligandos de TLR7 (Heil et al., 2003; Lee et al., 2003). Posteriormente, o ssRNA rico em guanósina e uridina foi identificado como o agonista natural destes receptores (Diebold et al., 2004; Heil et al., 2004; Lund et al., 2004). No entanto, devido à instabilidade destas moléculas, o seu uso como adjuvante requer estabilização, por exemplo, por encapsulação em lipossomas catiónicos (Meier et al., 2007). Em humanos, a activação de TLR7 e TLR8 em células dendríticas plasmocitóides e células dendríticas mielóides, respectivamente, aumenta a expressão de moléculas co-estimuladoras e a produção de IFN do tipo I e IL-12 (Smits et al., 2008).

As sequências sintéticas de ODN com um ou mais motivos CpG não-metilados, frequentemente designadas sequências imunoestimuladoras (ISS, do inglês “immunostimulatory sequences”), são agonistas de TLR9 e são também estudadas como potenciais adjuvantes vacinais. Existem diferentes classes de ISS ODN, de sequência e estrutura diversa, que possuem propriedades imunomoduladoras distintas (Higgins et al., 2007; Kumar et al., 2009a). Os ODN CpG do tipo A estimulam células dendríticas plasmocitóides e induzem grande quantidade de IFN- α mas níveis baixos de IL-12, TNF- α e IL6. Pelo contrário, ODN CpG do tipo B induzem quantidades elevadas destas citocinas inflamatórias e induzem a sobreexpressão de moléculas co-estimuladoras como CD80, CD86 e moléculas MHC classe II em células dendríticas plasmocitóides. Activam ainda linfócitos B e, no ratinho, células dendríticas mielóides. Estas moléculas têm sido usadas em ensaios clínicos como adjuvantes ou imunomoduladores contra doenças infecciosas (*e.g.* vírus da hepatite B), alérgicas (*e.g.* alergia a ácaros) e oncológicas (*e.g.* melanoma) (Higgins et al., 2007).

A inclusão dos ligandos derivados de ácidos nucleicos microbianos em formulações imunogénicas permite a indução de respostas Th1 e de respostas citotóxicas por linfócitos CD8⁺, sobretudo quando co-administrados com o antigénio numa mesma partícula (Coffman et al., 2010; Higgins et al., 2007; Jin et al., 2010; Longhi et al., 2009; Warshakoon et al., 2009).

1.6.2 Adjuvantes derivados da parede celular bacteriana

As paredes celulares dos microrganismos constituem estruturas essenciais à sua integridade e viabilidade e é através delas, simultaneamente, que os microrganismos patogênicos se relacionam com o organismo que infectam. Em concordância com esta constatação, os ligandos dos PRR que são expressos à superfície das células hospedeiras, como TLR2/1/6, TLR4 ou TLR5, têm como principal origem as paredes celulares dos microrganismos. Alguns produtos de degradação de estruturas constituintes das paredes celulares, como é o caso de iE-DAP e MDP derivados do peptidoglicano, são também reconhecidos por receptores citoplasmáticos, como NOD1/2. Diversas estratégias vacinais e imunoterapêuticas que visam a activação via PRR têm pois por base a utilização de moléculas presentes nas paredes celulares de microrganismos ou seus derivados sintéticos, bem como de estruturas mais complexas e não completamente definidas a nível molecular que são obtidas, por diferentes protocolos, a partir da superfície bacteriana.

1.6.2.1 Lipoproteínas nativas e lipopéptidos sintéticos: TLR1/2/6

Tal como se verificou com outros ligandos TLR, o interesse na utilização de lipoproteínas e lipopéptidos de origem bacteriana como moléculas adjuvantes é bastante anterior ao conhecimento dos seus receptores e do seu modo de acção. Pouco tempo depois dos primeiros estudos em que é descrita e caracterizada uma lipoproteína presente na parede celular de *Escherichia coli*, publicados pelos grupos de Braun e Inouye no final dos anos 1960 e início dos anos 1970 (Bosch & Braun, 1973; Braun, 1975; Braun & Bosch, 1972, 1973; Braun & Hantke, 1975; Braun & Rehn, 1969; Hantke & Braun, 1973; Hirashima et al., 1973; Inouye et al., 1972), demonstrou-se que aquela que viria a ser conhecida como lipoproteína de Braun, à semelhança do LPS das bactérias Gram-negativas, apresentava propriedades mitogénicas sobre linfócitos B de rato (Melchers et al., 1975). O estudo dos fragmentos obtidos por hidrólise da lipoproteína nativa possibilitou a Bessler et al. (1977) atribuírem a capacidade mitogénica à sua porção N-terminal triacilada, o que foi confirmado pouco mais tarde através da síntese química de lipopéptidos com estrutura análoga à dessa região (Bessler et al., 1982). Na sequência destes trabalhos, as propriedades adjuvantes da componente lipídica foram demonstradas *in vivo*. A inoculação de ratinhos com lipopéptidos sintéticos covalentemente ligados a um péptido não-imunogénico do receptor do factor de crescimento epidérmico (EGF, do inglês “epidermal growth factor”) resultou na indução de anticorpos específicos duas semanas após uma única administração (Bessler et al., 1985b) e a inoculação de cobaias com péptidos sintéticos do vírus da febre aftosa conjugados com o lipopéptido

P₃CSS resultou na indução de anticorpos neutralizantes e protecção face a infecção viral (Wiesmüller et al., 1989). No final da década de 1980, observou-se que os lipopéptidos estimulavam *in vitro* não apenas linfócitos mas também monócitos humanos e macrófagos de ratinho (Hoffmann et al., 1988) e Deres et al. (1989) demonstraram a possibilidade de induzir *in vivo* respostas por linfócitos citotóxicos, restritas a MHC classe I, através da inoculação de ratinhos com lipopéptidos sintéticos conjugados com epitopos da nucleoproteína do vírus da gripe. Desde então realizaram-se inúmeros trabalhos usando lipopéptidos sintéticos em diferentes modelos patogénicos e vacinais (revisto por Moyle & Toth, 2008), incluindo a demonstração da capacidade de induzir respostas humorais e celulares, quer em mucosas quer a nível sistémico, através da administração oral de péptidos lipidificados (Nardelli et al., 1994).

Entretanto, na década de 1990 surgiram os primeiros vectores plasmídicos para expressão de proteínas em fusão com lipoproteínas bacterianas em *Escherichia coli* tendo em vista aplicações vacinais. Alguns destes trabalhos tinham apenas por objectivo o transporte e apresentação de antígenos à superfície das bactérias hospedeiras (Harrison et al., 1990; Taylor et al., 1990), mas outros, incluindo os primeiros baseados na lipoproteína OprI de *Pseudomonas aeruginosa*, foram desde o início desenvolvidos com o propósito, também, de fazer uso específico das propriedades adjuvantes da componente lipídica para indução de respostas imunitárias contra antígenos heterólogos (Cornelis et al., 1996; Rioux et al., 1992). Só então, no último ano da mesma década e dois anos após a publicação do trabalho de Medzhitov et al. (1997) em que é descrita a clonagem e caracterização do receptor humano homólogo de Toll de *Drosophila*, são publicados diversos estudos que demonstram que o TLR2 é o receptor das lipoproteínas bacterianas, contribuindo assim para a compreensão das propriedades adjuvantes destas moléculas (Aliprantis et al., 1999; Brightbill et al., 1999; Hirschfeld et al., 1999; Lien et al., 1999). Desde essa altura, foram desenvolvidas diferentes estratégias para a lipidificação de proteínas heterólogas em células procariotas (Chen et al., 2009; Cullen et al., 2003; Kamalakkannan et al., 2004).

Para além de produtos de fusão entre lipoproteínas bacterianas e antígenos heterólogos e de lipopéptidos triacilados (como Pam₃CSK₄) conjugados com péptidos sintéticos, outras formas de conjugação entre proteínas e componentes lipídicos têm sido utilizadas com o objectivo de potenciar respostas imunitárias (revisto por Moyle & Toth, 2008). Nestas inclui-se o uso de análogos de lipoproteínas ou lipopéptidos bacterianos diacilados, como MALP-2 de *Mycoplasma fermentans*, que possuem os mesmos dois ácidos gordos com ligações éster das lipoproteínas triaciladas mas são desprovidos do ácido gordo com ligação amida e que, como acima se refere, actuam via TLR2/6 ou apenas TLR2. Outra estratégia comumente

usada tem sido a síntese de lipopéptidos monoacilados, através da ligação covalente de ácido palmítico à cadeia lateral de um resíduo de lisina, geralmente na extremidade C-terminal. Estas moléculas permitem a indução de respostas por linfócitos CD8⁺ (Andrieu et al., 2000; Zhang et al., 2005a) e, apesar de a monoacilação não corresponder à estrutura nativa das lipoproteínas bacterianas, Zhu et al. (2004) reportaram que estas moléculas promovem a internalização e a maturação de células dendríticas através de TLR2, desencadeando imunidade protectora dependente de Th1. Os lipopéptidos monoacilados têm sido avaliados como vacinas contra VIH-1 em ensaios em humanos tendo sido bem tolerados (Gahéry-Ségard et al., 2000).

Embora o interesse na utilização de antigénios lipidificados tenha, de facto, aumentado na sequência dos estudos iniciais sobre as propriedades mitogénicas da lipoproteína de Braun de *Escherichia coli*, a lipidificação de proteínas como estratégia de modulação de respostas imunitárias é, na verdade, anterior àquelas descobertas. Já em 1973 Coon e Hunter (1973) haviam demonstrado em cobaias a indução de hipersensibilidade retardada por inoculação de albumina sérica de bovino (BSA, do inglês “bovine serum albumin”) lipidificada, sem que se verificasse indução de anticorpos, invertendo desta forma o resultado observado quando a proteína era reiteradamente administrada sem adjuvante. Neste trabalho, a conjugação foi obtida por ligação covalente entre o grupo carboxílico do ácido dodecanóico e os grupos amínicos do carbono épsilon dos resíduos de lisina da proteína. Neste como na maioria dos casos em que se utilizam modificações lipídicas diferentes das das lipoproteínas bacterianas, desconhece-se se o efeito adjuvante ou imunomodulador se exerce via TLR.

De acordo com o que foi antes referido, a estimulação via TLR2 induz a activação de uma via de sinalização intracelular dependente de MyD88, com activação de NF- κ B e da via das MAPK, o que resulta, entre outros efeitos, na produção de citocinas pro-inflamatórias, mas não de IFN do tipo I. A activação deste receptor induz ainda a expressão à superfície de moléculas MHC classe II e co-estimuladoras. Assim, a estimulação de células dendríticas por lipopéptidos sintéticos triacilados (como Pam₃CSK₄ e derivados), diacilados (como Pam₂C e derivados, e.g. FSL-1 ou versões sintéticas de MALP-2), lipoproteínas nativas triaciladas (como OspA de *Borrelia burgdorferi* e lipoproteína de 19-kDa de *Mycobacterium tuberculosis*), lipopéptidos nativos diacilados (como MALP-2 de *M. fermentans*) ou lipoproteínas nativas diaciladas (como LP44 de *Mycoplasma salivarium*, da qual o lipopéptido FSL-1 foi derivado) induzem nas APC um fenótipo propício ao desencadeamento de resposta imunitária e ao “priming” de células T CD4⁺ que contribuirá para a capacidade adjuvante que apresentam (Brightbill et al., 1999; Link et al., 2004; Metzger et al., 1995; Müller et al., 2002; Okusawa et al., 2004; Radolf et al., 1995).

Por outro lado, o uso de lipopéptidos como moléculas adjuvantes permite o desencadeamento de respostas LTC (Baz et al., 2008; Chua et al., 2008; Jackson et al., 2004; Khan et al., 2007; Lau et al., 2006). Foi sugerido que esta capacidade se poderá dever ao acesso dos péptidos lipidificados ao citoplasma das APC facilitado pela interacção dos lípidos membranares com os lípidos da proteína, com conseqüente entrada na via de processamento de MHC classe I (Martinon et al., 1992). Outra justificação sugerida residia nas propriedades físicas conferidas pelos lípidos às formulações, como a possível formação de estruturas micelares, e a um conseqüente processamento pelas APC idêntico ao verificado para os antigénios particulados (Andrieu et al., 2000). Apesar de os mecanismos referidos serem fundamentalmente de natureza física e independentes de TLR, a activação destes receptores poderá desempenhar também um papel importante na indução de citotoxicidade celular. Para além dos estudos referidos anteriormente que indicam que a activação TLR promove a apresentação cruzada (Burgdorf et al., 2008; Gil-Torregrosa et al., 2004; West et al., 2004), demonstrou-se que a estimulação de células dendríticas pelo lipopéptido MALP-2 induz a expressão de proteínas do imunoproteossoma [LMP (do inglês “large multifunctional proteasome”) 2, LMP7 e MECL (do inglês “multicatalytic endopeptidase complex-like”) 1] e um aumento da actividade proteolítica, e assim do processamento antigénico, sugerindo que os lipopéptidos podem, indirectamente, aumentar respostas restritas a MHC classe I (Link et al., 2004).

Um conjunto de resultados tem vindo a associar a activação via TLR2 à indução de respostas do tipo Th2 (Agrawal et al., 2003; Dillon et al., 2004; Kiura et al., 2006; Pulendran et al., 2001b; Redecke et al., 2004). Segundo o modelo proposto por Dillon et al. (2004), a activação via este receptor induz um nível de sinalização ERK1/2 elevado que resulta na estabilização do factor de transcrição c-Fos, suprimindo a produção de IL-12(p70) e promovendo a secreção de IL-10, o que favorece respostas do tipo Th2. Por outro lado, Gautier et al. (2005) atribuem a secreção de IL-12p70 por células dendríticas, essencial para a polarização Th1, a um “loop” autócrino-parácrino de IFN do tipo I iniciado em resposta a estimulação TLR. Assim, a incapacidade de polarizar respostas no sentido Th1 via TLR2 justificar-se-ia pelo facto de este receptor activar somente uma via de sinalização dependente de MyD88 não indutora de IFN do tipo I, ao contrário, por exemplo, de LPS, que o faz por uma via de sinalização TRIF-dependente.

Existem, contudo, outros trabalhos que apontam a estimulação via TLR2, ou a utilização de adjuvantes compostos por ligandos TLR2, como forma eficiente de indução de respostas Th1, podendo contribuir para esse efeito, tanto a estimulação de APC (Chua et al., 2008; Cote-Sierra et al., 2002; Ghielmetti et al., 2005b; Huber et al., 2002; Sieling et al.,

2003; Watanabe et al., 2004; Zhu et al., 2004), como a estimulação directa de células Th1 via TLR2 (Brüll et al., 2010; Imanishi et al., 2007). Noutras condições experimentais, o uso de lipopéptidos sintéticos ou lipoproteínas nativas levou a indução de linfócitos Th1/Treg e inibição de respostas Th2, com potencial aplicação no tratamento de doenças asmáticas (Akdis et al., 2003; Lombardi et al., 2008; Revets et al., 2005), ou a indução de polarização no sentido de Th17 pela produção de IL-1 β , TGF- β e IL-23 por células de Langerhans humanas estimuladas via TLR2 (Aliahmadi et al., 2009).

As diferenças encontradas nestes trabalhos no que respeita às propriedades polarizadoras dos ligandos TLR2, que cobrem praticamente todo o espectro de respostas Th até hoje caracterizadas, poder-se-ão dever à utilização de diferentes modelos experimentais (modelo humano *versus* ratinho; diferentes estirpes de ratinho; diferentes sistemas de culturas celulares, etc.); ao uso de diferentes ligandos TLR2 (lipopéptidos sintéticos *versus* lipoproteínas nativas; peptidoglicano; zimosano); a diferentes formas e critérios para avaliação da polarização (ensaios de polarização *in vitro*; avaliação de citocinas derivadas de APC como único indicador do potencial polarizador; avaliação de citocinas produzidas por linfócitos em resposta a restimulação *ex vivo*). No sentido de dar à utilização de ligandos TLR2 uma aplicação prática racional, é pois desejável que no futuro se desenvolvam estudos que tentem esclarecer especificamente a razão destas discrepâncias e que permitam estabelecer correlações claras entre o tipo de polarização induzida e os diferentes ligandos, receptores e protocolos de imunização.

1.6.2.2 LPS e derivados do lípido A: TLR4

As propriedades adjuvantes do LPS são conhecidas desde os anos 1950 (Johnson et al., 1956) mas a toxicidade das moléculas nativas limitaram o seu uso em vacinas. Contudo, diversas tentativas, iniciadas nos anos 1980 por Edgar Ribi, para obter versões destoxificadas do componente activo do LPS, o lípido A, levaram ao desenvolvimento do derivado MPL, que preserva propriedades adjuvantes mas é destituído de toxicidade (Qureshi et al., 1985). No final da década de 1990, o TLR4 foi identificado como o receptor do LPS, o que contribuiu para a compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes às suas propriedades adjuvantes. Embora outros receptores possam estar envolvidos (Gavin et al., 2006), o MPL também é reconhecido por TLR4, induzindo a maturação das células dendríticas, com um aumento da expressão à superfície de MHC classe II, CD80 e CD86. Contudo, ao contrário do LPS, que induz sinalização através de MyD88 e TRIF, o MPL induz activação apenas via TRIF, o que poderá explicar a sua menor toxicidade considerando a indução menos pronunciada de citocinas pró-inflamatórias (Mata-Haro et al., 2007; Warshakoon et al., 2009).

Como anteriormente se referiu, o adjuvante AS04 é composto por MPL, derivado a partir do LPS de *Salmonella minnesota* R595, adsorvido a hidróxido ou fosfato de alumínio (O'Hagan & De Gregorio, 2009). Este adjuvante foi aprovado para uso em vacinas humanas e tem mostrado ser seguro e efectivo, estimulando preferencialmente respostas do tipo Th1, em contraste com as respostas mistas Th1-Th2 descritas nas vacinas que incluem apenas sais de alumínio como adjuvante (Casella & Mitchell, 2008; Didierlaurent et al., 2009).

1.6.2.3 Flagelina: TLR5 e NLR

A flagelina, ou FliC, é a proteína estrutural principal do flagelo de bactérias Gram-negativas móveis. TLR5 é o receptor extracelular da flagelina, mas quando presente no citoplasma esta sinaliza através dos receptores NLR IPAF e Naip5 (Miao et al., 2006; Molofsky et al., 2006).

A natureza proteica da flagelina possibilita a obtenção de proteínas de fusão que, tanto por via oral como parenteral, induzem uma resposta humoral muito marcada contra o produto híbrido, de forma T-dependente, que requer a activação de células dendríticas via TLR5. Esta resposta não é afectada pela existência prévia de imunidade anti-flagelina (McDonald et al., 2007).

A resposta humoral induzida pela fusão com flagelina caracteriza-se pela produção de IgG1 e IgG2a (Honko et al., 2006; Huleatt et al., 2007), sem indução de IgE (Honko et al., 2006). No entanto, a determinação da natureza das citocinas produzidas por células CD4⁺ específicas indica um perfil do tipo Th2, não sendo por isso claro o tipo de polarização obtida com o uso destas formulações (Cunningham et al., 2004).

A capacidade de induzir resposta por linfócitos CD8⁺ com flagelina não é consensual (Huleatt et al., 2007; Mizel & Bates, 2010). Num estudo recente em que se usou uma proteína de fusão com o antigénio modelo ovalbumina (OVA) verificou-se activação de células CD8⁺ mas esta ocorreu independentemente de TLR5. Segundo os autores, terão sido, neste caso, as propriedades físicas conferidas pela fusão com a flagelina a possibilitar uma forma de processamento do antigénio que resultou em apresentação antigénica cruzada (Mizel & Bates, 2010).

1.6.2.4 Formulações complexas derivadas de paredes celulares bacterianas: TLR4, TLR2, TLR5, NOD(?)

Para além dos ligandos de PRR mencionados, de estrutura molecular definida, têm sido utilizadas, quer em imunização experimental quer clinicamente, outras formulações mais

complexas derivadas de paredes celulares bacterianas cuja composição molecular não é conhecida na totalidade mas que se sabe exercerem o seu efeito adjuvante também via activação de PRR.

As vesículas de membrana externa (OMV, do inglês “outer membrane vesicles”) de *Neisseria meningitidis* constituem um exemplo deste tipo de formulação amplamente usado em clínica humana para indução de imunidade homóloga. A vesiculação da membrana externa é um fenómeno conservado em bactérias Gram-negativas (Kuehn & Kesty, 2005), caracterizado pela libertação de estruturas compostas por um invólucro de membrana externa que circunda constituintes do periplasma. As OMV incluem assim na sua composição proteínas, lipoproteínas, fosfolípidos e LPS (Kuehn & Kesty, 2005), o que torna estas estruturas capazes de estimular simultaneamente diversos PRR, incluindo TLR2/1/6, TLR4, TLR5 (Durand et al., 2009; Ellis et al., 2010). As OMV preparadas a partir de *Neisseria meningitidis* têm sido usadas nas últimas duas décadas como vacina contra a doença meningocócica causada por *Neisseria meningitidis* do serogrupo B, constituindo a única formulação eficaz contra a doença (Holst et al., 2009). Nos últimos anos têm-se desenvolvido diversas estratégias para a incorporação de antígenos heterólogos neste tipo de estruturas (Chen et al., 2010; Kesty & Kuehn, 2004; Schroeder & Aebischer, 2009), mas a sua exploração para indução de imunidade está ainda pouco explorada.

Outro exemplo de formulação derivada da parede celular bacteriana com potencial adjuvante é o complexo de proteínas de membrana externa (OMPC, do inglês “outer membrane protein complex”) também de *Neisseria meningitidis*. As vacinas conjugadas contra a infecção por *Haemophilus influenzae* do tipo b (Hib), usadas clinicamente em imunização pediátrica, são compostas pelo polissacárido capsular de Hib covalentemente ligado de forma aleatória a um OMPC de *Neisseria meningitidis* (Latz et al., 2004). Existem diferentes estratégias para formulação de vacinas glicoconjugadas contra Hib por conjugação do polissacárido capsular, que por si só não é imunogénico, com proteínas transportadoras com o objectivo de obter activação de linfócitos Th. No entanto, ao contrário de outras vacinas com diferentes proteínas transportadoras, a conjugação dos antígenos de Hib com o OMPC de *Neisseria meningitidis* é geralmente capaz de induzir protecção após uma única administração em crianças (Donnelly et al., 1990; Granoff & Holmes, 1991). Latz et al. (2004) demonstraram que o OMPC e o OMPC conjugado com o polissacárido de Hib são reconhecidos por TLR2 humano e murino, induzindo a produção de citocinas em células dendríticas *in vitro*, de forma dependente de MyD88, e que a ausência de sinalização TLR2 reduz grandemente a imunogenicidade das vacinas *in vivo*. Já anteriormente, Massari et al.

(2002) haviam demonstrado que a capacidade de estimulação de linfócitos B por porinas da membrana externa de *Neisseria* se exerce via TLR2.

Outro exemplo deste tipo de formulação é o esqueleto da parede celular (CWS, do inglês “cell-wall skeleton”) do bacilo de Calmette-Guérin (BCG), ou BCG-CWS, que, tal como o BCG vivo, foi usado em imunoterapia pós-cirúrgica de doentes oncológicos (Ishii et al., 2005; Tsuji et al., 2000). BCG-CWS contém peptidoglicano, arabinogalactano e ácidos micólicos, não contém LPS e é reconhecido por TLR2 segundo Murata (2008) e por TLR2 e TLR4 segundo Tsuji et al. (2000). A estimulação de células dendríticas humanas resulta na sobreexpressão à superfície de CD40, CD80, CD83 e CD86 e na secreção de TNF- α , IL-6 e IL-12p40 (Tsuji et al., 2000). Segundo Ishii et al. (2005), apesar de ligar TLR4, o BCG-CWS não induz a expressão de IFN- β dependente de TRIF em células dendríticas mielóides, ao contrário do LPS, o que poderá contribuir para a sua baixa toxicidade. Num estudo realizado em ratinho, a co-administração desta formulação com células tumorais modificadas para expressarem OVA induziu um aumento expressivo da actividade CTL anti-OVA com efeito antitumoral (Murata, 2008).

1.6.3 Relevância da ligação física entre ligando PRR e antigénio na modulação da resposta imunitária específica

A capacidade de desencadear imunidade e o tipo de resposta obtido por imunização com as diferentes formulações atrás mencionadas não dependem apenas do seu potencial para activação PRR, mas também de outros factores, como sejam os protocolos de imunização seguidos e as características físicas da formulação. A existência de uma associação próxima entre o antigénio e o ligando PRR, seja através de uma ligação química covalente, seja por incorporação de ambos numa mesma estrutura física, possível, por exemplo, com recurso a micropartículas sintéticas, permite a indução de respostas mais pronunciadas. Este efeito poder-se-á dever ao facto de se garantir a estimulação das mesmas células que contactam com o antigénio e também por a ligação a PRR poder mediar endocitose (Schjetne et al., 2003). Todavia, a maturação dos fagossomas exercida de forma autónoma e dependente da sinalização TLR (Blander, 2008; Blander & Medzhitov, 2004; Blander & Medzhitov, 2006) contribuirá certamente para a explicação deste fenómeno.

Num estudo em modelo murino publicado por Wille-reece et al. (2005), a molécula R-848, um ligando de TLR7, apesar de induzir *in vivo* a secreção de citocinas pró-inflamatórias e o aumento da expressão superficial de moléculas co-estimuladoras em células dendríticas, quando co-administrado com a proteína Gag de VIH-1 revelou-se um fraco indutor de

resposta Th1 e CD8⁺. No entanto, a conjugação de um agonista de TLR7, similar a R-848, com a proteína Gag permitiu a indução de ambas as respostas.

Em concordância, Khan et al. (2007) reportaram uma diferença marcada, tanto na capacidade de indução de apresentação cruzada *in vitro*, como na indução de respostas específicas por linfócitos CD8⁺ *in vivo*, quando comparada a administração de péptidos sintéticos derivados do antígeno modelo OVA conjugados com CpG ou Pam₃CSK₄ (ligandos de TLR9 e TLR2/1, respectivamente) com a administração simultânea de antígeno e ligandos não conjugados.

O mesmo observaram Schlosser et al. (2008) utilizando OVA encapsulada em microesferas biodegradáveis de poli-(D,L-láctido-co-glicólido). Em comparação com a co-inoculação dos adjuvantes em forma solúvel ou encapsulados em microesferas separadas, o co-encapsulamento daquele antígeno com CpG ou poly(I:C) (ligandos de TLR9 e TLR3, respectivamente) resultou quer no aumento do número de linfócitos CD8⁺ específicos, detectados com tetrâmeros de moléculas MHC classe I, quer no aumento da produção de IFN- γ e dos níveis de citotoxicidade *in vivo* pelos linfócitos CD8⁺ específicos. Verificou-se ainda um aumento dos níveis de protecção após inoculação intraperitoneal de um vírus da vacina recombinante modificado para expressar OVA.

A importância da fusão entre antígeno e ligando PRR na indução tanto de resposta humoral como de resposta celular foi ainda demonstrada com o ligando de TLR5/NLR flagelina utilizando como modelo o antígeno OVA (Huleatt et al., 2007).

Este conjunto de resultados sugere que a potenciação de respostas por associação entre os antígenos e as moléculas adjuvantes é um fenómeno transversal aos diferentes ligandos de PRR, desconhecendo-se, no entanto, se os mecanismos moleculares que a justificam são idênticos nos diferentes casos.

1.6.4 Efeitos sinérgicos da activação de diferentes PRR na resposta imunitária

Os estudos sobre o impacto da activação por ligandos de diferentes PRR e das formulações que os contêm no desencadeamento de respostas inatas e específicas têm revelado efeitos sinérgicos em resultado de estimulação simultânea através de diferentes receptores. Estes efeitos verificam-se na activação *in vitro* de células dendríticas, mas observam-se igualmente nas respostas *in vivo* a antígenos administrados conjuntamente com moléculas activadoras de PRR. A relevância das respostas sinérgicas deverá reflectir a necessidade dos organismos superiores reagirem apenas a estímulos claramente indicadores de um perigo potencial e de identificarem perfis complexos de moléculas característicos dos diferentes microrganismos de forma a adequarem a resposta ao invasor.

Napolitani et al. (2005) reportam um aumento sinérgico na produção de IL-12 e IL-23, bem como do rácio Delta-4/Jagged-1, em células dendríticas estimuladas simultaneamente via TLR3 ou TLR4 (receptores com sinalização associada a TRIF) e TLR7, TLR8 ou TLR9 (receptores endossomais com sinalização dependente de MyD88), com consequente aumento na capacidade de polarização Th1. No mesmo sentido, Warger et al. (2006) observaram um aumento na expressão de IL-6 e IL-12p70 em células dendríticas estimuladas simultaneamente por ligandos TLR7 e TLR3, que activam vias dependentes e independentes de MyD88, respectivamente. Tada et al. (2005) reportam efeitos sinérgicos potenciadores de respostas Th1, nomeadamente produção de IL-12 e IFN- γ , em células dendríticas estimuladas via NOD1 ou NOD2 em combinação com TLR3, TLR4 ou TLR9. Da mesma forma, a associação de estimulação de células dendríticas via TLR3 [poly(I:C)] com estimulação por ligandos de TLR2 (peptidoglicano), TLR2/6 (zimosano) e TLR5 (flagelina), que activam vias MyD88-dependentes e que geralmente induzem níveis baixos de IL-12p70, resultou na produção desta citocina em níveis similares aos obtidos com LPS, o qual induz activação simultânea de vias dependente e independente de MyD88 (Bohnenkamp et al., 2007).

Os estudos acima referidos de Warger et al. (2006) e Bohnenkamp et al. (2007) demonstram ainda uma capacidade superior de indução de respostas CD8⁺ quando se associam antigénios a estímulos que actuam simultaneamente via diferentes PRR. Warger et al. (2006) demonstram que a activação sinérgica de células dendríticas por estimulação simultânea com ligandos TLR que desencadeiam vias de sinalização distintas se caracteriza também por um aumento da expressão de moléculas co-estimuladoras como CD40, Ox40 e CD70, estando esta última reportada como tendo um papel importante no desenvolvimento de respostas CD8⁺ independentes de resposta auxiliar CD4⁺. Num estudo realizado por Zhu et al. (2010b), em que se utilizou um modelo murino de vacinação com um péptido de VIH e contraprova com vírus da vacina recombinante, verificou-se um aumento nos níveis de protecção quando se utilizou uma combinação adjuvante composta por três ligandos de TLR (TLR2/6, TLR3 e TLR9) em comparação com o observado quando da combinação de apenas dois dos ligandos. Curiosamente, o aumento da protecção não resultou de um aumento no número de linfócitos T específicos, mas antes de um aumento na sua avidéz funcional para o antigénio, tendo para tal contribuído a expressão de IL-15 e de IL-15R α nas células dendríticas induzida pela combinação dos 3 ligandos.

1.7 Objectivos gerais

O estudo da forma como os estímulos inatos influenciam o desenvolvimento de respostas específicas é hoje um campo de investigação emergente com enorme potencial de aplicação no desenvolvimento de novas vacinas e novas abordagens imunoterapêuticas. A conjugação de antigénios com ligandos de PRR permite modular funções das APC, desde a internalização à apresentação, passando pelo processamento dos antigénios. Assim, equacionando a activação de receptores inatos do sistema imunitário na formulação de imunogénios, é possível caracterizar respostas imunitárias protectoras e identificar os seus alvos, bem como induzir os mecanismos imunitários que lhes estejam subjacentes.

Os sistemas baseados em OprI para obtenção de antigénios de fusão utilizados no passado ganham um novo interesse à luz destes novos conhecimentos. Todavia, os sistemas de expressão inicialmente propostos impõem limitações técnicas à sua utilização. Por outro lado, o conhecimento actual da importância da ligação física entre antigénio e ligando PRR e a noção de que a activação sinérgica de PRR pode originar respostas quantitativa e qualitativamente distintas sugerem novas potencialidades dos sistemas baseados em OprI.

O presente trabalho tem como objectivo geral desenvolver e explorar um novo sistema de clonagem e expressão em *Escherichia coli* baseado na lipoproteína OprI, um ligando TLR. Pretende-se, especificamente:

- 1) Desenvolver um novo sistema que permita:
 - a. ultrapassar as limitações dos sistemas precedentes, designadamente no que respeita às dificuldades no controlo da expressão e na purificação dos antigénios de fusão;
 - b. a sua exploração para obtenção de novas formulações imunogénicas derivadas da parede celular bacteriana, com potencial distinto para activação PRR.
- 2) Proceder a uma caracterização preliminar das propriedades imunomoduladoras das formulações obtidas com o novo sistema.

Capítulo 2. Desenvolvimento e caracterização de um novo sistema de clonagem e expressão baseado na lipoproteína OprI

2.1 Introdução

As lipoproteínas bacterianas são proteínas com uma modificação lipídica N-terminal que permite a ancoragem da componente proteica nas membranas celulares. Estas moléculas são ubíquas em bactérias, muitas são essenciais à sua sobrevivência e, embora desempenhem funções muito diversificadas, partilham a generalidade dos mecanismos de biossíntese que estão na base da sua lipidificação (Kovacs-Simon et al., 2011). Estes mecanismos foram em grande parte elucidados primeiramente em estudos que envolveram a lipoproteína prototípica da membrana externa de *Escherichia coli*, a lipoproteína de Braun (Braun & Hantke, 1975; Hantke & Braun, 1973; Sankaran & Wu, 1994).

As lipoproteínas bacterianas são expressas no citoplasma sob a forma de prolipoproteína com um péptido-sinal na extremidade amínica. O péptido-sinal das lipoproteínas compreende três regiões distintas (Figura 3) (revisto por Kamalakkannan et al., 2004; Madan Babu & Sankaran, 2002). A região N-terminal (ou região-*n*) caracteriza-se pela presença de resíduos carregados positivamente, em geral dois resíduos de arginina ou lisina nos primeiros 5 a 7 aminoácidos da sequência. A região a jusante, designada região-*h*, é composta por 7 a 22 resíduos de cadeia lateral hidrofóbica e sem carga. A região C-terminal, designada “lipobox” ou região-*c*, distingue o péptido-sinal de outros sinais de translocação membranar de proteínas e determina a lipidificação das lipoproteínas. A análise de 199 lipoproteínas revelou que em 73% dos casos os 4 aminoácidos que compõe esta região obedecem à sequência consenso [LVI][ASTVI][GAS][C] (Madan Babu & Sankaran, 2002). A cisteína C-terminal do péptido sinal, conservada em todas as lipoproteínas, constitui o primeiro resíduo aminoacídico da lipoproteína madura e é o alvo da modificação lipídica.

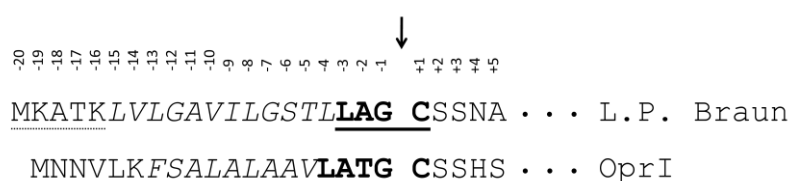


Figura 3 – Péptidos-sinal da lipoproteína de Braun de *Escherichia coli* e de OprI de *Pseudomonas aeruginosa*.

Representa-se a sublinhado pontilhado a região-*n*, a itálico a região-*h* e a cheio e sublinhado contínuo a região-*c* ou “lipobox”. A seta indica o local de clivagem do péptido sinal pela enzima sinal peptidase II.

O péptido-sinal da prolipoproteína conduz à sua translocação através da membrana interna para o espaço periplásmico, numa conformação ainda não enrolada, por um mecanismo dependente de proteínas Sec. É na face periplásmica da membrana interna que ocorre a maturação da lipoproteína. O reconhecimento pela enzima diacilgliceril transferase (também designada Lgt ou fosfatidilglicerol:prolipoproteína diacilgliceril transferase) da sequência consenso de lipidificação (“lipobox”) do péptido-sinal leva à adição de um grupo diacilglicerilo ao resíduo de cisteína através de uma ligação tioéter. Esta modificação constitui um pré-requisito para que ocorra a clivagem do péptido-sinal pela enzima sinal peptidase II (ou LspA, prolipoproteína sinal peptidase) (Sankaran & Wu, 1994). No caso das lipoproteínas triaciladas, após a remoção do péptido-sinal ocorre a adição pela enzima N-acil transacilase (ou Lnt, fosfolípido:apolipoproteína transacilase) da terceira cadeia de ácido gordo, através de uma ligação amida, ao grupo amina do mesmo resíduo de cisteína anteriormente modificado e agora localizado na extremidade amínica da sequência madura (Figura 4).

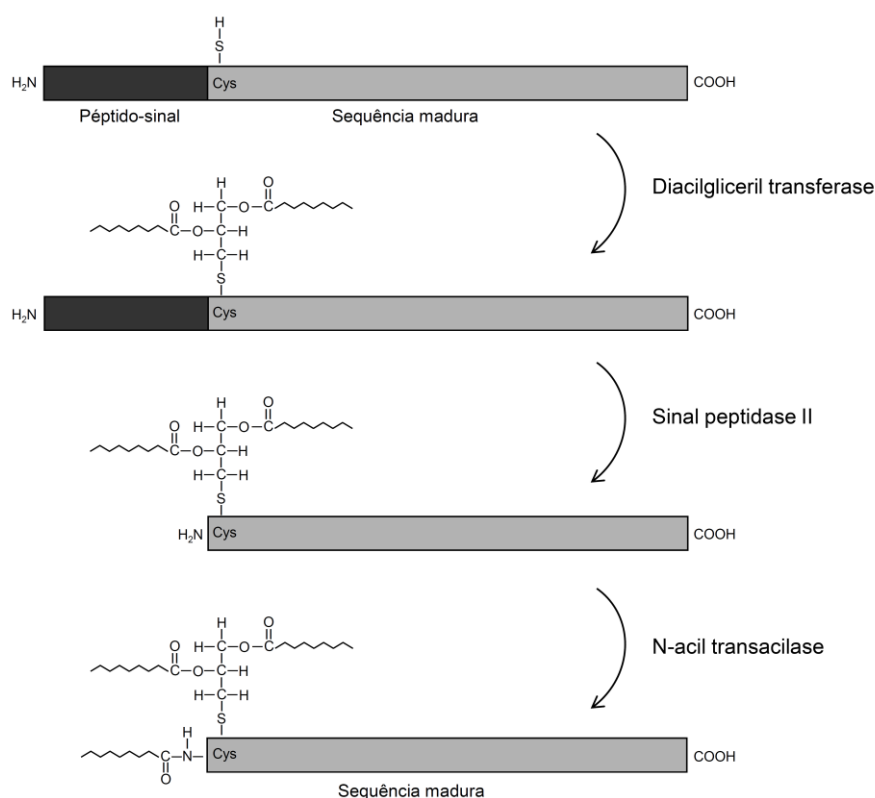


Figura 4 – Processamento das lipoproteínas bacterianas triaciladas.

Ver texto para descrição. Adaptado de Madan Babu e Sankaran (2002).

Embora o processo de maturação ocorra na membrana interna, a maior parte das lipoproteínas das bactérias Gram-negativas encontra-se ancorada por meio da sua componente lipídica à membrana externa bacteriana. O transporte das lipoproteínas da face periplásmica da membrana interna para a membrana externa é mediado pelas proteínas do sistema Lol. As lipoproteínas de membrana interna possuem sinais que impedem este transporte. No caso de *Escherichia coli* o sinal de retenção na membrana interna consiste na presença de um resíduo de aspartato na posição 2 a partir da extremidade amínica da sequência madura da lipoproteína em combinação com resíduos na posição 3 que reforçam esse sinal. Em *Pseudomonas aeruginosa* o sinal é composto por combinações específicas dos resíduos nas posições 3 e 4 (revisto por Remans et al., 2010b). O complexo proteico LolCDE catalisa a libertação, a partir da membrana interna, das lipoproteínas que não possuem sinais de retenção, ocorrendo depois a transferência destas para a proteína periplásmica LolA através da inserção dos resíduos de ácidos gordos numa cavidade hidrofóbica existente nesta proteína. A formação do complexo solúvel LolA-lipoproteína permite o transporte no meio aquoso periplásmico até à face interna da membrana externa. A lipoproteína é então transferida de LolA para a proteína LolB e, a partir desta, inserida na membrana externa bacteriana (Remans et al., 2010a; Tokuda, 2009).

A OprI é uma das proteínas maioritárias da membrana externa da bactéria Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa* (Mizuno & Kageyama, 1978, 1979). A caracterização da composição proteica da membrana externa desta bactéria, realizada por Mizuno e Kageyama no final da década de 1970, permitiu a identificação de 6 a 9 proteínas principais, observadas de forma consistente por análise em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS, do inglês “sodium dodecyl sulphate”) nas diferentes estirpes bacterianas então estudadas (Mizuno & Kageyama, 1978). Os autores classificaram-nas por ordem alfabética de acordo com a respectiva massa molecular aparente, correspondendo assim à proteína de maior mobilidade electroforética a letra I. A demonstração de uma modificação lipídica nesta proteína, conjuntamente com a observação de que incorporava resíduos de glicerol tritiado durante o crescimento bacteriano, e ainda a demonstração da ocorrência de uma forma livre da proteína e outra com ligação covalente ao peptidoglicano, sugeriram uma analogia entre a OprI e a lipoproteína de Braun de *Escherichia coli* (Mizuno & Kageyama, 1979).

O gene *oprI* codifica uma proteína precursora, ou prolipoproteína, de 83 aminoácidos, que compreende na sua extremidade amínica um péptido-sinal de 19 resíduos com uma região central hidrofóbica (Cornelis et al., 1989; Duchêne et al., 1989). A cisteína na posição 20 da prolipoproteína foi assim identificada como o primeiro resíduo da lipoproteína madura.

A sequência aminoacídica difere significativamente da da lipoproteína de Braun (Cornelis et al., 1989; Duchêne et al., 1989), como difere também, segundo Mizuno e Kageyama (1979), a composição da modificação lipídica. Em contraste com a triacilação reportada para a lipoproteína de Braun, estes autores sugerem que a OprI possui uma componente lipídica monoacilada. Apesar destas diferenças, a análise comparativa das sequências aminoacídicas de ambas as proteínas revela semelhanças em motivos essenciais à natureza lipoproteica destas moléculas. É disso exemplo a presença, nas duas proteínas, das três regiões características da porção N-terminal, correspondente ao péptido-sinal, bem como a sequência GCSS no local de clivagem da sinal peptidase II, que compreende os resíduos a jusante da cisteína que determinam a não-retenção na membrana interna. A identidade de aminoácidos na extremidade carboxílica, incluindo a lisina C-terminal que estabelece a ligação com o peptidoglicano no caso das formas não-livres de ambas as lipoproteínas, também revelou semelhanças entre a OprI e a sua homóloga de *Escherichia coli*.

Embora os péptidos-sinal apresentem, em ambos os casos, a estrutura tripartida característica das lipoproteínas, verificam-se diferenças relevantes. O resíduo de leucina presente na posição -3 da “lipobox” da lipoproteína de Braun, que ocorre na maioria das lipoproteínas bacterianas conhecidas, encontra-se na posição -4 em OprI, existindo na posição -3 um resíduo de alanina (Figura 3). Curiosamente, esta diferença resulta em que alguns programas informáticos desenvolvidos para identificar lipoproteínas putativas com base na detecção de péptidos-sinal característicos (Madan Babu & Sankaran, 2002) falhem na identificação da natureza lipoproteica da OprI. No entanto, em diferentes abordagens para expressar OprI em *Escherichia coli* verificou-se sempre o reconhecimento do sinal de lipidificação pela célula hospedeira, como o demonstra a presença de OprI na membrana externa das células de expressão (Cornelis et al., 1996; Cote-Sierra et al., 1998).

O reconhecimento em *Escherichia coli* dos sinais de localização e lipidificação de OprI permitiu equacionar o desenvolvimento de vectores baseados no gene desta lipoproteína para a expressão de proteínas heterólogas lipidificadas naquela espécie bacteriana. Tal estratégia teria por fim a localização dos produtos híbridos à superfície da célula hospedeira e a obtenção de antigénios lipidificados para propósitos de imunização. A primeira abordagem para a construção destes vectores consistiu na inserção de um local de clonagem múltipla (LCM) de 30 nucleótidos no sítio *SphI* de *oprI*, localizado na porção terminal do gene, de forma a possibilitar a introdução das sequências heterólogas que se pretendesse expressar em fusão com a lipoproteína (Cornelis et al., 1996). Desta forma, obtiveram-se dois vectores de expressão constitutiva derivados de pKT240 e designados pLPI35 e pLPI36, que, entre si, diferiam na direcção de inserção do mesmo LCM. Por subclonagem das regiões de expressão

dos dois plasmídeos em pKK233-2, construíram-se ainda os vectores pVUB1 e pVUB2, com o objectivo de obter a repressão da expressão de *oprI* na ausência de indução e a sua expressão por adição de isopropil- β -D-tiogalactósido (IPTG) ao meio de cultura. No entanto, a dificuldade em manter a expressão de *oprI* reprimida constituiu sempre uma importante limitação desta série de vectores. O promotor forte *trc* não sofria repressão em meio de Luria Bertani (LB), o que originava lise celular, obrigando à manutenção das células hospedeiras em meio M9-CAA para uma repressão mais eficiente, sem que se tenha, ainda assim, conseguido um adequado controlo da expressão génica (Cornelis et al., 1996). De facto, nesta série de vectores observava-se com frequência lise celular acentuada e perda selectiva de clones recombinantes, o que poderá explicar dificuldades recorrentes na clonagem de alguns antigénios heterólogos no sistema. Exemplo disso são as observações registadas por Leitão et al. (2000) num trabalho em que o vector pLPI35 foi usado para clonagem aleatória de DNA de VPSA com o objectivo de expressar os antigénios clonados em fusão com OprI e rastrear a sua capacidade de desencadear respostas linfoproliferativas em células mononucleares de sangue periférico obtidas de suínos sobreviventes a infecção. A sequenciação nucleotídica de um dos clones revelou a inserção de um elemento IS-5D de *Escherichia coli* que originou um codão de terminação precoce. Uma explicação possível para a ocorrência desta inserção, como de outras observações semelhantes, será a toxicidade que o produto expresso a partir da sequência inicialmente clonada poderá ter para a bactéria hospedeira, fenómeno já anteriormente reportado em relação a outras proteínas clonadas em *Escherichia coli* (Willemot & Cornelis, 1983).

Numa tentativa de solucionar este problema, foi mais tarde desenvolvido um novo vector de clonagem que se designou pVUB3 (Cote-Sierra et al., 1998). Este plasmídeo foi construído por subclonagem de uma região de pVUB2, a qual continha o promotor *trc*, o local de ligação a ribossoma *lacZ* e o gene *oprI*, no vector pTrc99A, que contém um gene do repressor *lacI^r*. O procedimento de clonagem originou, no vector final, uma versão truncada do gene deste repressor, que no entanto não impediu uma melhor repressão do promotor relativamente aos vectores precedentes. Este aspecto permitiu maior estabilidade dos plasmídeos e a possibilidade de usar vectores OprI noutras bactérias Gram-negativas, como foi demonstrado utilizando *Salmonella typhimurium* como hospedeiro de expressão (Cote-Sierra et al., 1998). No entanto, neste como noutros trabalhos subsequentes que utilizaram o vector pVUB3 e seus derivados (Piedade, 2003), a expressão basal de OprI na ausência de indução não deixou de se verificar.

Outra limitação dos sistemas de clonagem baseados em OprI consistia na necessidade de recorrer a métodos laboriosos para obter antigénios de fusão purificados. Uma vez

confirmada a presença dos antígenos recombinantes em extractos de membrana externa, recorria-se a electroforese preparativa em gel de poliacrilamida, por aplicação das amostras de membrana externa na coluna e recuperação das fracções contendo a proteína de interesse por eluição contínua. A este procedimento seguia-se um passo de filtração em gel para remoção do LPS contaminante (Cote-Sierra et al., 2002). Outra alternativa era proceder à electroeluição de bandas proteicas a partir de géis de poliacrilamida (Leitão et al., 2000). Ambos os métodos, para além de laboriosos, dificultam a obtenção de grandes quantidades do produto de fusão e obrigam a passos de purificação adicionais sempre que ocorra contaminação com proteínas de idêntica mobilidade electroforética.

No trabalho apresentado neste capítulo é proposto e avaliado um novo sistema de expressão baseado em *OprI* que ultrapassa as principais limitações dos sistemas precedentes relativas ao controlo de expressão e às dificuldades de purificação dos produtos expressos. Para além disso, o sistema inclui vectores que permitem a avaliação do processamento da lipoproteína sem o recurso a ácidos gordos marcados radioactivamente e vectores que possibilitam a expressão de proteínas de fusão não lipidificadas para a obtenção de controlos. Por fim, o novo sistema é explorado para a produção de novas formulações imunogénicas baseadas na parede celular bacteriana com potencial distinto para activação PRR.

2.2 Materiais e métodos

2.2.1 Estirpes bacterianas e plasmídeos

Nos procedimentos de clonagem e manutenção dos plasmídeos utilizaram-se as estirpes de *Escherichia coli* JM109 e DH5 α . As estirpes de expressão BL21(DE3) e Rosetta(DE3)pLysS (Novagen) foram usadas nos ensaios de expressão.

O vector pVUB3 (Cote-Sierra et al., 1998), que contém a sequência codificadora de *oprI* com um LCM inserido no local *SphI* perto da extremidade 3', serviu de molde para a amplificação de sequências de *oprI*.

O plasmídeo pET24a (Novagen) foi escolhido como base dos novos vectores de *OprI*. A sua região de expressão consiste num codão de iniciação ATG, que faz parte de um local de restrição *NdeI* e que se prolonga por uma sequência codificadora de uma “tag”-T7 de 11 aminoácidos; a jusante, segue-se um LCM com os locais *BamHI*, *EcoRI*, *SacI*, *SalI*, *HindIII*, *EagI/NotI* e *XhoI* e uma sequência que codifica para 6 histidinas na extremidade carboxílica da proteína.

A sequência codificadora de A104R, uma proteína do VPSA homóloga de histonas, foi amplificada por reacção em cadeia da enzima DNA polimerase (PCR) a partir de um plasmídeo anteriormente descrito (Reis et al., 2007).

2.2.2 Oligonucleótidos iniciadores para amplificação por PCR

Na amplificação de sequências de *oprI* a partir de pVUB3 para subclonagem em pET24a utilizou-se o iniciador esquerdo (“sense” ou “forward”) P3*Bam*HIas (5’ cgggatcCTTG CGGCTGGCTTTTTC 3’) conjuntamente com um dos seguintes iniciadores direitos (“anti-sense” ou “reverse”):

P3*Bam*HIas (5’ cgggatccAACAACGTTCTGAAATTCTCTGC 3’);

P3*Nde*Is (5’ ggaattccatatgAACAACGTTCTGAAATTCTCTGC 3’);

OprIM*Nde*Is (5’ ggaattccatatgTGCAGCAGCCACTCCAAAG 3’).

Os iniciadores usados para amplificação da sequência da proteína A104R do VPSA para clonagem nos novos vectores foram os que se seguem:

A104R*Eco*RI (5’ ggaattccTCGACAAAAAAAAGCCAC 3’);

A104R*Xho*I (5’ ccctcgagATTTAACATATCATGAACAGGTTTC 3’).

As modificações nas extremidades 5’ dos iniciadores estão grafadas em minúsculas. Os nucleótidos sublinhados correspondem aos locais de restrição e os nucleótidos a montante dessas sequências foram acrescentados para aumentar a eficiência da hidrólise.

A síntese dos iniciadores para PCR foi realizada por STAB VIDA, Portugal.

2.2.3 Amplificação de DNA por PCR

As reacções de amplificação por PCR realizaram-se em termociclador convencional num volume de 50 µL em microtubos de 200 µL. Nas reacções com fins analíticos, para confirmação da presença e tamanho das sequências alvo, utilizou-se enzima *Taq* DNA polimerase (Fermentas) a 1,5 U/reacção com o respectivo tampão de reacção [“10X *Taq* Buffer with (NH₄)₂SO₄”: Tris-HCl 750 mM, pH 8,8, (NH₄)₂SO₄ 200 mM, Tween-20 a 0,1% (v/v)] e MgCl₂ 2 mM. Nas reacções com fins preparativos, para obtenção de fragmentos a clonar, utilizou-se enzima com actividade exonucleásica 3’→5’ (actividade de edição) (“NZYDNACchange polymerase”, Nzytech) a 1,25 U/reacção e o respectivo tampão de reacção [Tris-HCl 200 mM, pH 8,8, (NH₄)₂SO₄ 100 mM, KCl 100 mM, MgSO₄ 20 mM, BSA a 1 mg/mL, Triton X-100 a 1% (v/v)]. Em ambos os casos, adicionou-se à mistura de PCR uma solução de desoxirribonucleótidos (dNTP) para uma concentração final de 0,2 mM de cada e os oligonucleótidos iniciadores para uma concentração final de 0,6 µM de cada.

As condições das reacções de amplificação foram as que se seguem: aqueceram-se os tubos a 95 °C durante 3 min para desnaturação do DNA e prosseguiu-se com 35 ciclos de desnaturação a 95 °C durante 30 seg, hibridação a 55 °C durante 30 seg e extensão a 72 °C durante 30 seg; finalizou-se com uma etapa de extensão a 72 °C por mais 10 min, seguida de arrefecimento dos tubos a 4 °C. Quando necessário, ajustou-se empiricamente o tempo das etapas de desnaturação e extensão e a temperatura de hibridação. Nos casos em que se usaram iniciadores modificados na extremidade 5', o programa de amplificação compreendeu, por vezes, 10 ciclos iniciais com uma temperatura de hibridação mais baixa, para melhorar a eficiência inicial de ligação, seguidos dos restantes 20 a 25 ciclos a uma temperatura superior, de forma a promover a especificidade da reacção.

2.2.4 Electroforese em gel de agarose

A análise de amostras de DNA foi realizada por electroforese em gel de agarose a uma concentração de 1 a 2% (p/v), dependendo do tipo de amostra a analisar, em TAE [Tris-acetato 40 mM, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 1 mM]. Antes de aplicadas nos poços do géis, as amostras de DNA foram misturadas com um tampão de aplicação (Bioline) na proporção de 4:1 (v/v), respectivamente. Nas corridas de electroforese utilizaram-se tinas horizontais contendo o mesmo tampão usado na preparação dos géis. Aplicou-se uma diferença de potencial de 90 V durante 25 a 60 min, após o que se procedeu à coloração dos géis por submersão numa solução de brometo de etídeo a 0,5 µg/mL em TAE durante aproximadamente 15 min. Observaram-se os géis em transiluminador sob radiação ultravioleta. A determinação do tamanho dos fragmentos de DNA ou do DNA plasmídico foi feita por comparação da distância por estes percorrida nos géis com a distância percorrida em simultâneo por fragmentos de DNA de um marcador de massa molecular comercial [“HyperLadder” I ou II (Bioline), dependendo do DNA em análise].

2.2.5 Purificação de DNA

A purificação de fragmentos de DNA provenientes de reacções de amplificação ou hidrólise foi realizada utilizando o “High Pure PCR Cleanup Micro Kit” (Roche) que se baseia na propriedade de adsorção dos ácidos nucleicos a sílica quando na presença de um sal caotrópico. O procedimento decorreu de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, misturaram-se as amostras com tampão de ligação desnaturante e solução promotora de ligação, aplicou-se a mistura nas colunas de sílica e lavou-se duas vezes com tampão de lavagem. Por fim, eluiu-se em solução de Tris-HCl 10 mM, pH 8,5.

Nos casos em que se pretendeu recuperar fragmentos de DNA ou plasmídeo linearizado a partir de géis de agarose, excisaram-se as bandas que continham os fragmentos que apresentavam o tamanho esperado, colocaram-se em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL, adicionou-se tampão de ligação na proporção sugerida pelo fabricante e dissolveu-se a agarose por incubação a 56 °C durante 10 min com agitação ocasional. De seguida, adicionou-se solução promotora de ligação e prosseguiu-se com o protocolo do “High Pure PCR Cleanup Micro Kit” (Roche) como acima descrito.

2.2.6 Hidrólise, desfosforilação e ligação de fragmentos de DNA

As enzimas de restrição usadas para linearização de vectores plasmídicos e preparação de extremidades coesivas nos fragmentos de DNA que se pretendia clonar foram as seguintes: *Bam*HI (Promega), *Eco*RI (Roche), *Xho*I (GE Healthcare) e *Nde*I (GE Healthcare). De uma forma geral, as reacções de hidrólise decorreram durante 2 h 30 min a 37 °C com 2 unidades de enzima por micrograma de DNA e utilizando o tampão de reacção sugerido para cada enzima pelo respectivo fabricante. Nos casos de hidrólises simultâneas com duas enzimas, escolheu-se o tampão com melhor eficiência conjunta. Sempre que se justificou, estas condições foram ajustadas empiricamente para obter os resultados desejados. No final de cada reacção, procedeu-se à purificação dos fragmentos hidrolisados utilizando o “High Pure PCR Cleanup Micro Kit” (Roche) seguindo o procedimento descrito no ponto anterior. No caso dos plasmídeos hidrolisados que serviriam de vectores de clonagem, procedeu-se à desfosforilação das suas extremidades 5' com o “Rapid DNA Dephos & Ligation Kit” (Roche) de modo a prevenir a sua recircularização. Resumidamente, ao vector linearizado e purificado (até 1 µg) adicionou-se 1 U de enzima fosfatase alcalina recombinante (“rAPid Alkaline Phosphatase”) e o tampão fornecido (“rAPid Alkaline Phosphatase Buffer”, 10x concentrado: Tris-HCl 0,5 M, EDTA 1 mM, pH 8,5) ajustando o volume final a 20 µL com H₂O. Incubou-se durante 10 min a 37 °C e, no final, inactivou-se a enzima a 75 °C durante 2 min.

As reacções de ligação entre fragmentos de DNA a clonar e vectores plasmídicos foram realizadas partindo de uma proporção molar entre vector:inserto de 1:3 e ajustando empiricamente sempre que necessário. Também neste passo se utilizou o “Rapid DNA Dephos & Ligation Kit” (Roche) seguindo as instruções do fabricante. Brevemente, diluiu-se o vector (geralmente 50 a 100 ng) e o fragmento de DNA na solução de diluição fornecida conforme indicado e adicionou-se tampão de ligação (“T4 DNA Ligation Buffer, 2x”) e 5 U de enzima T4 DNA ligase. No final, incubou-se a mistura durante 5 min à temperatura ambiente ou durante 16 h a 4 °C.

2.2.7 Quantificação de DNA

As determinações de concentração de DNA e do seu grau de pureza realizaram-se por espectrofotometria sob radiação ultravioleta a 260 e 280 nm. Calculou-se a concentração considerando que uma unidade de densidade óptica (D.O.) a um comprimento de onda de 260 nm (D.O.₂₆₀) corresponde a uma concentração de 50 µg/mL de DNA de cadeia dupla (dsDNA, do inglês “double-stranded deoxyribonucleic acid”). O grau de pureza foi avaliado por cálculo do rácio entre D.O.₂₆₀ e D.O.₂₈₀ considerando-se como desejável um valor de 1,8 (Sambrook et al., 1989).

2.2.8 Preparação e transformação de células competentes de *Escherichia coli*

Para preparação de células competentes inoculou-se 1 mL de uma cultura bacteriana, crescida durante a noite, em 100 mL de LB previamente aquecido a 37 °C e incubou-se com agitação a 220 r.p.m. até ser atingida uma D.O.₆₀₀ de 0,45 a 0,55. Distribuiu-se os 100 mL de cultura por 2 tubos de polipropileno de 50 mL previamente arrefecidos e incubou-se em gelo durante 5 a 10 min. Findo este tempo, centrifugou-se a 1800 g durante 10 min a 4 °C, removeu-se o sobrenadante e ressuspendeu-se cada sedimento em 10 mL de uma solução fria de CaCl₂ a 50 mM. Centrifugou-se a 1300 g durante 10 min a 4 °C, ressuspenderam-se novamente os sedimentos celulares nas mesmas condições e incubou-se em gelo durante 30 min. Após nova centrifugação a 800 g durante 5 min a 4 °C, ressuspendeu-se cada um dos sedimentos celulares em 2 mL de uma solução fria de CaCl₂ 100 mM com 15% de glicerol. Distribuiu-se em alíquotas de 100 a 200 µL em microtubos previamente arrefecidos e armazenaram-se as células competentes a -80 °C.

Para transformação de células competentes com DNA plasmídico adicionou-se este a 50 µL de células competentes, incubou-se em gelo durante 20 min e de seguida submeteu-se a mistura a um choque térmico a 42 °C durante 50 seg. Adicionaram-se 900 µL de meio líquido SOC (bactotripton a 20 g/L, extracto de levedura a 5 g/L, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, Mg²⁺ 20 mM e glucose 20 mM) e incubou-se a 37 °C durante 1 h com agitação a 150 r.p.m.. Ao fim desse tempo, centrifugou-se a 1000 g durante 10 min, descartaram-se 800 µL do sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento nos 100 µL de meio que restaram no tubo. Semeou-se a suspensão em placas de Petri com meio LB sólido (“LB Agar Granulated”, NZYTech: tripton a 10 g/L, extracto de levedura a 5 g/L, NaCl a 10 g/L e agar a 12 g/L) adicionado de ampicilina (100 µg/mL), canamicina (30 µg/mL) ou canamicina + cloranfenicol (30 e 34 µg/mL, respectivamente), em função dos genes de resistência presentes no plasmídeo em questão. No final, incubaram-se as culturas cerca de 16 h a 37 °C.

2.2.9 Rastreamento de clones recombinantes por PCR (“colony PCR”)

As colónias de bactérias transformadas durante o processo de clonagem foram rastreadas por PCR (“colony PCR”) usando os iniciadores T7FOR (5’ TAATACGACTCACT ATAGG 3’) e T7REV (5’ GCTAGTTATTGCTCAGCGG 3’) que hibridam com as regiões flanqueadoras do local de clonagem do pET24a. Com uma ponta de micropipeta tocou-se cada colónia e, sucessivamente, mergulhou-se em 5 µL de H₂O num tubo de PCR e tocou-se em nova placa de LB-agar com canamicina de forma a replicar cada colónia. No final, colocou-se a placa com as réplicas de colónias numeradas em estufa a 37 °C até se obter o resultado de PCR. A mistura de PCR que se adicionou aos tubos onde se mergulharam as pontas com bactérias e as condições de reacção foram aquelas descritas para o protocolo com *Taq* DNA polimerase (Fermentas) no ponto 2.2.3 com excepção do tempo de extensão que se prolongou para 45 seg. Os resultados foram analisados em gel de agarose a 2% como descrito em 2.2.4.

2.2.10 Culturas bacterianas e expressão de proteínas

Realizaram-se todas as culturas em meio de LB (“LB broth”, NZYTech: triptona a 10 g/L, extracto de levedura a 5 g/L, NaCl a 10 g/L) suplementado com 100 µg/mL de ampicilina quando as células foram transformadas com pVUB3 ou 30 µg/mL de canamicina com células contendo plasmídeos baseados em pET24a. Quando da utilização da estirpe Rosetta(DE3)pLysS, incluiu-se também 34 µg/mL de cloranfenicol nas culturas, uma vez que o plasmídeo pLysS confere resistência a este antibiótico.

Para os ensaios de indução, cresceram-se células transformadas *de novo* durante 16 h em agitador orbital a 37 °C e 200 r.p.m.. No dia seguinte, diluíram-se as culturas a 1:20 (v/v) em meio fresco e incubou-se a 37 °C e 220 r.p.m. até ser atingida uma D.O.₆₀₀ de 0,6 a 0,9. A expressão de proteína foi então induzida pela adição de IPTG para uma concentração final de 1 mM e a incubação mantida nas mesmas condições pelo período de tempo especificado.

Nos casos em que se pretendeu amplificar plasmídeos, realizaram-se culturas de células de não-expressão previamente transformadas, utilizando meio LB líquido adicionado do antibiótico respectivo, durante 16 h a 37 °C com agitação a 180 r.p.m.. Após esse tempo, centrifugou-se a cultura a 1800 g, durante 10 min a 4 °C, desprezou-se o sobrenadante e purificou-se o plasmídeo a partir do sedimento celular, como descrito a seguir.

2.2.11 Purificação de DNA plasmídico

Os plasmídeos recombinantes foram purificados a partir dos sedimentos celulares obtidos como se refere no ponto anterior utilizando o seguinte método. Ressuspendeu-se o sedimento celular de 5 mL de cultura em 200 µL da solução Tris-HCl 50 mM, EDTA 10 mM, pH 8,0 adicionada de 100 µg/mL de RNase A e misturou-se em vortex. Adicionaram-se 200 µL da solução NaCl 200 mM, SDS a 1% (p/v), misturou-se e juntaram-se 200 µL da solução KCH₃COO 3 M, pH 5,5. Centrifugou-se a 16000 g durante 10 min, descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 0,7 volumes de isopropanol. Centrifugou-se imediatamente a 16000 g durante 10 min, descartou-se o sobrenadante e lavou-se o sedimento com 800 a 1000 µL de etanol a 70% (v/v). Centrifugou-se à mesma velocidade durante 5 min, desprezou-se o sobrenadante, deixou-se evaporar o etanol residual e ressuspendeu-se o DNA em 30 a 50 µL de Tris-HCl 10 mM, pH 8,0.

Em alternativa, utilizaram-se os “kits” comerciais “Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System” (Promega), “NZYMiniprep” ou “NZYMidiprep” (NZYTech) procedendo-se de acordo com as instruções dos fabricantes.

A sequenciação de DNA para confirmação da sequência dos plasmídeos recombinantes foi realizada por STAB VIDA, Portugal.

2.2.12 Preparação de extractos proteicos totais

Os extractos proteicos totais de *Escherichia coli* foram preparados através da ressuspensão de sedimentos celulares, obtidos por centrifugação de culturas de 1 mL a 16000 g durante 1 min à temperatura ambiente, em 100 µL de solução tampão composta por Tris-HCl 50 mM, pH 6,8, glicerol a 20% (v/v), SDS a 4% (p/v), azul de bromofenol a 0,1% (p/v) e β-mercaptoetanol a 4% (v/v). As amostras foram aquecidas a 95 °C durante 4 min e por fim arrefecidas em gelo.

2.2.13 Preparação de fracções de membrana externa

Fracções celulares de membrana externa *versus* citoplasma/periplasma/membrana interna (C/P/MI) foram preparadas como descrito por Piedade (2003) e Cornelis et al. (1989), com ligeiras modificações, tendo como fundamento a solubilização diferencial com *N*-lauril-sarcosinato de sódio (sarcosil) a 1% (p/v) (Filip et al., 1973). Em resumo, o sedimento celular de 1 L de cultura foi obtido por centrifugação a 5500 g durante 20 min a 4 °C, lavado uma vez com solução salina tamponada com fosfatos (PBS, do inglês “phosphate-buffered saline”) e ressuspendido em 25 mL de tampão de lise (Tris-HCl 25 mM pH 8,0, glucose 50 mM, EDTA

10 mM), com lisozima a 2,5 mg/mL e fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF, do inglês “phenylmethylsulfonyl fluoride”) 1 mM como inibidor de proteases. Para a preparação de fragmentos de membrana externa (OMF, do inglês “outer membrane fragments”), omitiu-se a lisozima. Após 30 min de incubação em gelo, adicionou-se igual volume de uma solução de sarcosil a 2% (p/v), a mistura foi homogeneizada e ultrasonicada. Por fim, ultracentrifugou-se o lisado celular a 100000 g, durante 2 h a 4 °C, para obtenção de um sedimento insolúvel de membranas externas e uma fracção solúvel de C/P/MI.

2.2.14 Preparação de vesículas de membrana externa

Após 3 h de indução, sedimentaram-se as células a 5500 g durante 20 min a 4 °C e o sobrenadante foi filtrado em filtro com poro de 0,22 µm (Steritop, Millipore) e ultracentrifugado a 100000 g, durante 2 h a 4 °C. O sedimento foi lavado uma vez e por fim ressuspendido em PBS, aliquoteado e armazenado a -80 °C até uso posterior.

2.2.15 Deslipidificação de membranas externas por tratamento com ácido tricloroacético/acetona

Ressuspenderam-se os sedimentos de membranas externas com o auxílio de uma seringa com agulha de 21 gauge, adicionou-se sarcosil para uma concentração final de 0,075% (p/v) e misturou-se lentamente. Adicionou-se então ácido tricloroacético (TCA, do inglês “trichloroacetic acid”) para uma concentração final de 9% (v/v) e incubou-se a mistura durante 16 h a 4 °C. Sedimentou-se o precipitado proteico a 20000 g durante 20 min a 4 °C, lavou-se o sedimento duas vezes com acetona arrefecida a -20 °C e centrifugou-se como acima se descreve. Por fim, evaporou-se a acetona do precipitado proteico.

2.2.16 Deslipidificação de membranas externas por tratamento com clorofórmio/metanol

Os lípidos não ligados covalentemente a proteínas foram removidos das fracções de membrana externa pelo método de extracção repetida com clorofórmio/metanol, com base em procedimentos anteriormente descritos (Weinberg et al., 1988). Resumidamente, ressuspenderam-se sedimentos de membrana externa de aproximadamente 250 mL de cultura em 0,2 mL de SDS a 1% (p/v) à temperatura ambiente e transferiu-se para tubos de vidro corex. Adicionou-se um volume de 10 mL de clorofórmio/metanol a 2:1 (v/v), misturou-se por agitação em vortex durante 1 min e centrifugou-se a 5000 g durante 10 min. O sedimento

foi de novo solubilizado em SDS a 1% (p/v) e o tratamento com clorofórmio/metanol repetido oito vezes. Por fim, o solvente residual foi evaporado da amostra precipitada.

2.2.17 Rastreo de detergentes para solubilização de fragmentos de membrana externa

Com o intuito de eleger o detergente a ser usado na solubilização de OMF, realizou-se um rastreo inicial em que se utilizaram seis detergentes (Anatrace): n-octil- β -D-glucopiranosido (OG), n-decil- β -D-maltopiranosido (DM), n-dodecil- β -D-maltopiranosido (DDM), CHAPS, FOS-CHOLINE-12 e CYMAL-5. Os sedimentos de membranas externas correspondentes a cerca de 230 mL de cultura foram ressuspensos em solução tamponada (Tris-HCl 20 mM, NaCl 100 mM, pH 7) com ajuda de seringa com agulha de 21 gauge. Adicionaram-se os detergentes para uma concentração de 2% (p/v) num volume final de 4 mL. Solubilizaram-se as membranas com agitação suave durante 2 h a 4 °C e separaram-se as fracções solúveis da matéria insolúvel por ultracentrifugação a 100000 g durante 2 h a 4 °C.

2.2.18 Avaliação de citotoxicidade pelos detergentes Triton X-100 e OG

A avaliação da citotoxicidade de dois detergentes, Triton X-100 e OG, que se equacionaram usar na preparação de OMF, foi realizada pelo teste “CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay” (Promega) que permite a avaliação de viabilidade celular por colorimetria. Este método baseia-se na redução do composto tetrazólico MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetioxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio] que ocorre de forma directamente proporcional ao número de células viáveis e que se avalia por medição de absorvância por espectrofotometria. Para este ensaio utilizaram-se as células de linha contínua HEK393T. Preparou-se uma suspensão a 1×10^5 células/mL em meio DMEM (do inglês “Dulbecco's Modified Eagle Medium”), sem vermelho de fenol, suplementado com L-glutamina 2,5 mM e ácido N-2-hidroxietil piperazina-N'-2-etano sulfónico (HEPES) 15 mM (Invitrogen), a que se adicionou soro de feto de bovino (SFB) para uma concentração final de 10% (v/v), penicilina para 100 U.I./mL e estreptomicina para 100 μ g/mL. Distribuíram-se 100 μ L/poço de placa de 96 alvéolos (1×10^4 células/poço) de modo a obter no dia seguinte aproximadamente 2×10^4 células/poço. Incubaram-se as placas a 37 °C em estufa de atmosfera condicionada, com CO₂ a 5% (v/v) e humidade relativa superior a 80% (estufa de CO₂) durante 16 h. Ao fim desse tempo, colheram-se os sobrenadantes, adicionaram-se 50 μ L por poço de meio sem SFB e adicionaram-se 50 μ L do mesmo meio contendo as diferentes concentrações do detergente a testar, em duplicado. Ao fim de 4 h registaram-se os valores de absorvância de cada alvéolo a um comprimento de onda de 492 nm em espectrofotómetro.

2.2.19 Cromatografia de afinidade

Os ensaios de purificação por cromatografia de afinidade com Ni^{2+} foram realizados com colunas “His SpinTrap” e “Ni Sepharose 6 Fast Flow” em colunas PD10, respectivamente para purificação em pequena ou grande escala, de acordo com as instruções do fabricante (GE Healthcare), com pequenas alterações (composição e volumes das soluções). Nos casos em que a cromatografia foi realizada sob condições desnaturantes usaram-se as seguintes soluções:

- solução de ligação: NaH_2PO_4 20 mM, NaCl 0,5 M, imidazole 20 mM, hidrócloro de guanidina 6 M, Triton X-100 a 2% (v/v), β -mercaptoetanol 20 mM e mistura de inibidores de proteases (“Complete, Mini, EDTA-free”, Roche), pH 7,4;

- 1ª solução de lavagem: NaH_2PO_4 20 mM, NaCl 0,5 M, imidazole 20 mM, ureia 8 M, Triton X-100 a 2% (v/v), pH 7,4;

- 2ª solução de lavagem: NaH_2PO_4 20 mM, NaCl 0,5 M, ureia 8 M, pH 7,4;

- solução de eluição: NaH_2PO_4 20 mM, NaCl 0,5 M, ureia 8 M, pH 4,5.

Para purificação de OMF sob condições nativas as soluções finais otimizadas foram as que se seguem:

- solução de ligação: PBS, OG (Sigma-Aldrich) a 1% (p/v), imidazole 10 mM e mistura de inibidores de proteases (“Complete, Mini, EDTA-free”, Roche), pH 7,4;

- solução de lavagem: PBS, OG a 1% (p/v), imidazole 20 mM, pH 7,4;

- solução de eluição: PBS, OG a 1% (p/v), imidazole 250 mM, pH 7,4.

Nos protocolos finais otimizados os sedimentos de membrana externa, insolúveis em sarcosil, de aproximadamente 1 L de cultura foram ressuspensos em 10 mL da respectiva solução de ligação. A solubilização decorreu a 4 °C, com agitação suave, durante 2 h 30 min ou 16 h, respectivamente para protocolos sob condições nativas ou desnaturantes. Ao fim desse tempo, as amostras foram centrifugadas a 20000 g durante 15 min a 4 °C e, após ajuste do pH a 7,4, os sobrenadantes foram incubados com 750 μL de resina com Ni^{2+} , durante 2 h à temperatura ambiente. Após transferência para uma coluna PD10 vazia, recuperou-se a solução que passou na coluna (“flow-through”) e lavou-se a resina com 19 mL de solução de lavagem. No protocolo para purificações sob condições desnaturantes o passo de lavagem foi repetido com a 2ª solução de lavagem de modo a remover o detergente não dialisável Triton X-100. As proteínas ligadas à coluna foram eluídas com um total de 10 mL de solução de eluição. No final, os eluatos foram dialisados contra PBS, distribuídos em alíquotas em

microtubos de baixa adsorção de proteínas (“Protein LoBind”, Eppendorf) e armazenados a -80 °C após congelação rápida por imersão em azoto líquido.

2.2.20 Teste de adsorção de lipoproteína a tubos de polipropileno

Para testar a possibilidade de perda de lipoproteína durante o armazenamento em microtubos de polipropileno, após congelação rápida por imersão em azoto líquido, armazenaram-se a -80 °C 100 µL da mesma amostra de OprI, purificada e dialisada contra PBS, paralelamente em microtubos convencionais de polipropileno e em microtubos de baixa adsorção de proteínas (“LoBind tubes”, Eppendorf). As amostras foram descongeladas por aquecimento dos tubos de armazenamento a 50 °C durante 10 min e transferidas para novos tubos onde se tinha adicionado previamente tampão de amostra de SDS-PAGE (descrito no ponto seguinte). Adicionou-se aos tubos de armazenamento, então vazios, uma mistura composta por 80 µL de tampão desnaturante com ureia (solução desnaturante de eluição, ponto 2.2.19) e 20 µL de tampão de amostra de SDS-PAGE (ver 2.2.21) e aqueceram-se os tubos a 95 °C durante 10 min. Este passo tinha como objectivo a solubilização em condições extremas de OprI residual que pudesse estar ainda presente nos tubos de armazenamento devido a adsorção ao plástico. Paralelamente, aqueceram-se a 95 °C durante 10 min as amostras inicialmente retiradas dos tubos de armazenamento e procedeu-se à análise do conteúdo proteico de todas as amostras por electroforese em gel de poliacrilamida.

2.2.21 Electroforese em gel de poliacrilamida/SDS (SDS-PAGE)

As amostras proteicas foram analisadas por electroforese em géis de poliacrilamida (PAGE, do inglês “polyacrylamide gel electrophoresis”) com SDS, segundo a técnica de sistema descontínuo de Laemmli (1970), com ligeiras modificações. Utilizou-se o sistema “Mini-PROTEAN 3 Cell” (Bio-Rad), tendo a montagem dos géis sido realizada de acordo com as instruções do fabricante. Os géis, com 1,5 mm de espessura, incluíram um gel de concentração de poliacrilamida a 4% (p/v), no qual se formaram os poços para aplicação das amostras com um pente apropriado, e um gel de separação a 15% (p/v). A composição das soluções utilizadas para obtenção dos géis foi a seguinte: uma solução comercial de acrilamida/bisacrilamida [“30% Acrylamide/Bis Solutions, 37.5:1 mixture (30%T, 2.67% C)”, Bio-Rad] no volume necessário para obter a concentração desejada (4% no gel de concentração e 15% no gel de separação); tampão de gel (Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 para o gel de concentração e Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8 para o gel de separação) numa proporção de ¼ do volume final; SDS a 0,1% (p/v); H₂O no volume necessário para obter o volume final

pretendido. Uma vez preparadas as soluções, a polimerização foi iniciada pela adição de persulfato de amónio a 10% (p/v), numa proporção de 0,005% (v/v) do volume final, e N,N,N',N'-tetrametilenodiamina (TEMED), numa proporção de 0,005% (v/v) ou 0,01% (v/v) do volume final, respectivamente para os géis de concentração e separação.

As corridas de electroforese decorreram em tampão Tris/Glicina/SDS [Tris base 25mM, glicina 192 mM, SDS a 0,1% (p/v)] sob uma diferença de potencial de 200 V, durante aproximadamente 55 min. O marcador de massa molecular de proteínas utilizado foi o “Broad Range SDS-PAGE Standards” (Bio-Rad). Antes da aplicação no gel, as amostras e o marcador de massa molecular foram misturados na proporção de 4:1 com tampão de amostra 5 vezes concentrado [Tris-HCl 125 mM, pH 6,8, glicerol a 50% (v/v), SDS a 10% (p/v), azul de bromofenol a 0,25% (p/v), β -mercaptoetanol a 10% (v/v)] e aquecidos a 95 °C durante 4 min.

Terminada a electroforese, imergiram-se os géis em solução corante de azul brilhante de Coomassie [Coomassie Brilliant Blue R-250 a 0,25% (p/v), metanol a 45% (v/v), ácido acético a 10% (v/v)] durante pelo menos 2 h com agitação. A descoloração para remoção do excesso de corante decorreu em solução idêntica mas sem corante até obter um bom contraste entre as bandas a visualizar e o fundo do gel.

A identificação de proteína mencionada na secção 2.3.5 foi realizada por “peptide mass fingerprint” usando espectrometria de massa MALDI-TOF (do inglês “matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight”) após excisão da banda proteica correspondente do gel de SDS-PAGE (ensaio realizado com a colaboração da Doutora Deborah Penque e da Doutora Fátima Vaz do Laboratório de Proteómica, Departamento de Genética, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Lisboa).

2.2.22 Transferência de proteínas para membrana de nitrocelulose

A transferência de proteínas separadas em géis de poliacrilamida para membranas de nitrocelulose com poro de 0,22 μ m (Bio-Rad) realizou-se utilizando o sistema “Mini Trans-Blot electrophoretic transfer cell” (Bio-Rad) de acordo com as indicações do fabricante. A transferência ocorreu a 100 V durante 1 h ou a 30 V durante 16 h em tampão de transferência [Tris base 25 mM, glicina 192 mM, SDS a 0,1% (p/v), metanol a 20% (v/v)] com refrigeração. No final, submergiram-se as membranas em solução Ponceu-S (Schleicher & Schuell) para confirmação da transferência e marcação das proteínas do marcador de massa molecular. Depois de removido o corante, prosseguiu-se com a detecção específica das proteínas como se descreve no ponto 2.2.24.

2.2.23 Deposição de amostras em membrana de nitrocelulose para “dot blot”

A deposição das amostras proteicas em membrana de nitrocelulose para detecção de OprI com anticorpos específicos foi feita directamente ou utilizando aparelho apropriado (“Hybri-dot Manifold”, Gibco BRL). No último caso, montou-se o sistema com uma folha de papel de filtro e uma membrana de nitrocelulose com poro de 0,2 μm (Bio-Rad) embebida em H_2O e depositaram-se 50 μL de cada diluição das amostras nos alvéolos. Aspiraram-se as amostras através da membrana de nitrocelulose com o auxílio de uma bomba peristáltica e lavaram-se os alvéolos com H_2O . No final, retirou-se a membrana do aparelho e prosseguiu-se com a detecção específica como descrito no ponto seguinte.

2.2.24 Detecção específica de OprI em membranas de nitrocelulose (“western blot” e “dot blot”)

A presença de OprI ou dos seus derivados de fusão foi detectada em membranas de nitrocelulose por “dot” ou “western blot” com anticorpos específicos. As membranas obtidas como se descreve em 2.2.22 e 2.2.23 foram bloqueadas com leite em pó magro a 5% (p/v) em PBS-T [PBS com Tween-20 a 0,05% (v/v)], durante pelo menos 4 h. Findo esse tempo, lavaram-se as membranas por imersão em PBS-T durante 5 min com agitação. De seguida, incubaram-se com o anticorpo monoclonal anti-OprI QB2 (Cornelis et al., 1996) ou com o anticorpo monoclonal anti-“tag”-T7 (Novagen) diluídos a 1:10000 em PBS-T com leite em pó magro a 0,1% (p/v), durante 1h. Após três lavagens de 5 min, incubaram-se as membranas numa solução de PBS-T com leite magro a 0,1% (p/v) contendo um anticorpo secundário de cabra anti-IgG de ratinho [específico para o fragmento cristalizável (Fc)] conjugado com peroxidase de *Armoracia rusticana* (HRP, do inglês “horseradish peroxidase”) (A2554, Sigma) diluído a 1:100000 (nos ensaios de “western blot”) ou 1:200000 (nos ensaios de “dot blot”), durante 1 h. De seguida, lavaram-se as membranas 5 vezes durante 5 min como acima se descreve e procedeu-se à sua revelação utilizando os substratos “Pico” e “Femto” do sistema “SuperSignal Chemiluminescent Substrates” (Pierce) e o sinal quimioluminescente foi registado em filme “Amersham Hyperfilm ECL film” (GE Healthcare).

2.2.25 Caracterização da componente lipídica da OprI purificada

A determinação da massa molecular de OprI purificada por espectrometria de massa MALDI-TOF foi um serviço do Laboratório de Espectrometria de Massa do Instituto de Tecnologia Química e Biológica (ITQB), Universidade Nova de Lisboa, Oeiras.

A análise dos ácidos gordos ligados covalentemente à OprI purificada foi realizada por cromatografia gás-líquido seguida de espectrometria de massa [estudo realizado em colaboração com Susana Alves do Instituto Nacional dos Recursos Biológicos (INRB) e do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar (ICBAS), Universidade do Porto, e Professor Doutor Rui Bessa da Faculdade de Medicina Veterinária (FMV), Universidade Técnica de Lisboa (UTL)]. Primeiramente, removeram-se os ácidos gordos não ligados covalentemente por extracção com clorofórmio/metanol. Para a determinação dos ácidos gordos com ligação éster (ELFA, do inglês “ester-linked fatty acids”) solubilizou-se o resíduo seco de lipoproteína em 1 mL de tolueno seguido da adição de 0,2 mL de KOH 2 M em metanol. Após 4 h, adicionaram-se 2 gotas de ácido acético glacial de forma a parar a reacção e neutralizar a solução. Os ésteres metílicos de ácidos gordos (FAME, do inglês “fatty acid methyl ester”) foram então extraídos com hexano, repetindo o procedimento por quatro vezes, e, no final, removeu-se o solvente sob fluxo de azoto. Os FAME foram dissolvidos em 100 µL de hexano (99,9% de pureza) e transferidos para tubos adequados à análise por cromatografia gás-líquido. Os ácidos gordos com ligação amida (ALFA, do inglês “amide-linked fatty acids”) foram extraídos por solubilização do resíduo remanescente após remoção dos ELFA em 1 mL de tolueno seguida da adição de 3 mL de HCl a 10% (v/v) em metanol e incubação durante 16 h a 70 °C. O extracto foi então lavado com solução de K₂CO₃ e os FAME foram extraídos três vezes com hexano. Após remoção do solvente sob fluxo de azoto, dissolveram-se os FAME em 100 µL de hexano (99,9% de pureza) e transferiram-se para tubos apropriados à análise. O éster metílico do ácido nonadecanóico (C19:0) foi adicionado como padrão interno para quantificação dos ácidos gordos por cromatografia gás-líquido. Os FAME foram determinados usando o sistema de cromatografia gasosa Agilent HP 6890 (Agilent Techn. Inc., Palo Alto, CA, USA) equipado com um detector de ionização de chama e uma coluna capilar CP-Sil 88 de 100 m, com diâmetro interno de 0,25 mm e espessura do filme de 0,20 µm (Chrompack, Varian Inc., Walnut Creek, CA, USA). As condições de cromatografia foram as seguintes: temperatura do injector, 250 °C; temperatura do detector, 280 °C; como gás transportador utilizou-se hélio e a razão de repartição foi de 1:10. A coluna foi mantida a uma temperatura de 100 °C durante 15 min, aumentou-se para 150 °C a uma taxa de 10 °C/min e manteve-se durante 5 min. Aumentou-se então para 158 °C a 1 °C/min e manteve-se por 30 min, após o que se aumentou para 200 °C a uma taxa de 1 °C/min e manteve-se durante 65 min. A identificação dos ácidos gordos foi realizada por comparação com padrões autênticos e por análise de espectrometria de massa utilizando um sistema Varian Saturn 2200 (Varian Inc., Walnut Creek, CA, USA). Os ácidos gordos cíclicos foram identificados por

comparação do espectro de massa com os dados da base de dados “The NIST 08 mass spectral library”.

2.2.26 Microscopia de força atómica

As medições sobre células bacterianas ou OMV por microscopia de força atómica (AFM, do inglês “atomic force microscopy”) foram realizadas com um microscópio Dimension 3100 (Veeco/Digital Instruments) com controlador Nanoscope IIIa e uma ponta OTESPA Si (Veeco, Digital Instruments), com frequência nominal de ressonância de 300 kHz (estudo realizado em colaboração com Rúben Ramalho do Instituto Superior Técnico de Lisboa e do Instituto Gulbenkian de Ciência de Oeiras e com a Professora Doutora Helena Soares do Instituto Gulbenkian de Ciência de Oeiras, do Centro de Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa e da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa). Ressuspenderam-se as amostras em PBS e de seguida depositaram-se as suspensões em lamela de vidro. Deixou-se secar e lavou-se a lamela com água desionizada para remoção de sais. Foi usado o modo intermitente para minimizar o dano das amostras, tendo as medições sido realizadas em ar. As imagens topográficas que se obtêm mostram a configuração da superfície da amostra e as imagens de amplitude correspondem aproximadamente à derivada espacial da topografia ao longo da direcção de leitura e são úteis para salientar os contornos dos objectos.

2.2.27 Quantificação de proteína pelo método do ácido bicinonínico

A proteína total nos extractos de membranas externas, eluatos de cromatografia de afinidade ou produtos finais foi quantificada pelo método do ácido bicinonínico (BCA, do inglês “bicinchoninic acid”) utilizando o “kit” comercial “BCA Protein Assay Kit” (Pierce). Este método baseia-se na detecção da reacção de redução, em meio básico, de iões cúpricos (Cu^{2+}) a iões cuprosos (Cu^{+1}) pelas proteínas (reacção de biureto) através da quelação de ácido bicinonínico com este ião. A quelação de duas moléculas de BCA com um ião cuproso (Cu^{+1}) origina um produto de cor púrpura, com elevada absorvância a 562 nm, que aumenta numa proporção quase linear com o aumento da concentração proteica num leque de concentrações de 20 a 2000 $\mu\text{g/mL}$. Procedeu-se de acordo com as instruções do fabricante, com ligeiras modificações. Resumidamente, adicionou-se 50 μL de amostra ou respectiva diluição a um microtubo de polipropileno e adicionou-se 1 mL de uma mistura do reagente A com o reagente B do “kit” na proporção de 50:1. Incubou-se em banho de água a 37 °C durante 30 min, arrefeceu-se à temperatura ambiente e procedeu-se à leitura de absorvância a

562 nm em cubete de 1 cm de largura num espectrofotómetro. A concentração proteica das amostras foi estimada a partir de uma recta de calibração obtida com leituras de diluições de BSA de 25 a 2000 µg/mL, realizadas a partir das ampolas fornecidas no “kit”.

2.2.28 Quantificação de LPS

A endotoxina bacteriana presente nas formulações obtidas foi quantificada pelo método do lisado de amebócitos de *Limulus* (LAL) usando o “*Limulus Amebocyte Lysate (LAL) Kinetic-QCL*” (Lonza). O método de LAL baseia-se na reacção de coagulação de uma proteína presente nos amebócitos de *Limulus polyphemus* na presença de endotoxinas bacterianas (Young et al., 1972). O teste usado consiste num ensaio cinético quantitativo que faz uso da fase inicial da reacção de LAL para obter, por reacção enzimática, a libertação de p-nitroanilina a partir de um substrato incolor, produzindo uma coloração amarela. A taxa inicial de activação da enzima que catalisa a reacção é proporcional à concentração de endotoxina presente na amostra e a libertação de p-nitroanilina é monitorizada continuamente ao longo do período de incubação por leitura de absorvância a 405 nm. A concentração de endotoxina numa amostra é determinada a partir do seu tempo de reacção (tempo necessário para que o valor de absorvância aumente 0,2 acima do valor inicial de cada amostra) por comparação com uma curva padrão obtida a partir da determinação dos tempos de reacção de soluções com endotoxina em concentração conhecida. O procedimento decorreu de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, adicionaram-se a microplaca de 96 poços livre de endotoxinas (TPP) as diluições seriadas de endotoxina de concentração conhecida (0,005 EU/mL a 50 EU/mL), H₂O livre de endotoxinas (“LAL reagent water”, Lonza) como controlo negativo, PBS e as amostras a testar, em duplicado, num volume de 100 µL. Aqueceu-se a placa durante 10 min a 37 °C no espectrofotómetro e adicionou-se a cada poço 100 µL de reagente LAL (“Kinetic-QCL Reagent”). Procedeu-se a 40 leituras a 405 nm com intervalos de 150 seg durante incubação a 37 °C. No final, de acordo com o indicado pelo fabricante, obteve-se uma recta de calibração com os valores dos logaritmos de base 10 dos tempos médios de reacção e os logaritmos das concentrações de cada padrão a partir da qual se calculou a concentração de endotoxina de cada amostra.

2.2.29 Quantificação de peptidoglicano

A detecção de peptidoglicano foi realizada usando “SLP Reagent Set” (Wako bioproducts). Este método tem por base um sistema de defesa presente na hemolinfa do bicho-da-seda (*Bombyx mori*), designado sistema em cascata da profenoloxidase, o qual é

desencadeado por peptidoglicano bacteriano ou (1→3)-β-D-glucano de fungos, resultando na produção de melanina. O princípio assemelha-se ao teste usado para detecção de LPS e foi realizado de acordo com as instruções para leitor de microplaca fornecidas pelo fabricante. Resumidamente, em microplaca de 96 poços livre de endotoxinas (TPP) distribuíram-se diluições seriadas de peptidoglicano de concentração conhecida (1 a 1000 ng/mL), H₂O livre de endotoxinas (“LAL reagent water”, Lonza), como controlo negativo, PBS e as amostras a testar, em duplicado, num volume de 50 μL e adicionou-se a cada poço 50 μL da solução do teste SLP. Realizaram-se leituras com intervalos de 120 seg durante 90 min a 650 nm e, no final, calculou-se a concentração de cada amostra de forma semelhante ao realizado no teste de LAL.

2.3 Resultados

2.3.1 Construção de novos vectores plasmídicos de clonagem e expressão baseados no gene *oprI*

Os vectores anteriormente construídos para expressão de antigénios em fusão com *OprI*, incluindo pVUB3, contêm a sequência completa de *oprI* modificada pela inserção de um local de clonagem múltipla (LCM1 na Figura 5) no local de restrição *SphI*, perto da extremidade 3' do gene (Figura 5). A série de vectores obtida neste trabalho foi construída por subclonagem em pET24a de sequências de *oprI* amplificadas por PCR a partir de pVUB3. O plasmídeo pET24a foi eleito como vector de subclonagem por três razões principais: primeiro, o sistema pET compreende mecanismos robustos de controlo da expressão dos genes clonados; segundo, o plasmídeo codifica uma cauda de histidinas de localização C-terminal, necessária para a purificação por cromatografia de afinidade das formas maduras de *OprI*; terceiro, o plasmídeo codifica uma “tag”-T7 N-terminal que poderia vir a ser testada para avaliação do processamento pós-tradução da lipoproteína.

Construiu-se um conjunto de três plasmídeos diferentes por subclonagem de produtos de PCR amplificadas a partir de pVUB3 após hidrólise com *SphI* e re-ligação do plasmídeo, de forma a remover o LCM existente (LCM1). Os novos vectores, pOL (derivado do inglês “Outer membrane Lipoprotein”) e pOLT7, contêm a sequência completa de *oprI*, incluindo o péptido-sinal, seguida a jusante pelo LCM de pET24a (LCM2 na Figura 5) e pela cauda C-terminal de seis histidinas. A diferença entre os dois vectores reside na ausência (pOL) ou presença (pOLT7) da sequência de pET24a que codifica a “tag”-T7 na extremidade amínica da prolipoproteína. Um terceiro vector, pOLM, foi construído com o objectivo de expressar

OprI não-lipidificada. Este plasmídeo não possui as sequências que codificam na extremidade amínica a “tag”-T7 ou o péptido-sinal e a sequência codificadora da forma madura da OprI é igualmente seguida a jusante pelo LCM de pET24a e pela cauda de histidinas (Figura 5).

Na construção dos novos vectores, o iniciador direito usado para a amplificação a partir de pVUB3 foi desenhado de forma a ser complementar da região terminal da sequência *oprI*, excluindo o codão de terminação, e foi modificado em 5' pela adição de uma local de restrição *Bam*HI. Os iniciadores esquerdos diferiram em função da intenção de incluir (pOLT7) ou excluir (pOL) na prolipoproteína a “tag”-T7 N-terminal codificada no plasmídeo pET24a. No primeiro caso, desenhou-se o iniciador de forma a hibridar com a parte inicial da sequência *oprI*, excluindo o codão de iniciação, e acrescentou-se igualmente na extremidade 5' um local de reconhecimento *Bam*HI. No segundo caso, o iniciador foi concebido para hibridar na mesma região inicial de *oprI*, mas a modificação na terminação 5' consistiu num local de restrição *Nde*I que inclui o codão de iniciação. Para a construção do vector que expressa OprI não-lipidificada (pOLM), o iniciador esquerdo foi desenhado para conter igualmente um sítio *Nde*I a 5', mas com a restante sequência complementar à sequência que codifica a proteína madura. Pretendia-se, desta forma, que o codão para a cisteína 20 da prolipoproteína, resíduo N-terminal da proteína madura, ficasse no novo vector imediatamente após o codão de iniciação.

Obtiveram-se também três plasmídeos equivalentes sem realizar a hidrólise de pVUB3 por *Sph*I antes da amplificação por PCR. Estes plasmídeos contêm o LCM extra de pVUB3 (LCM1) perto do final da sequência *oprI* e na sua denominação foi incluída a letra “P” (derivado do inglês “polylinker”), pOLP, pOLPT7 e pOLPM (Figura 5).

Após edição e análise dos resultados de sequenciação confirmou-se a inserção correcta dos fragmentos e a ausência de mutações. Na Tabela 3 resumem-se as características dos novos vectores e dos seus produtos de expressão.

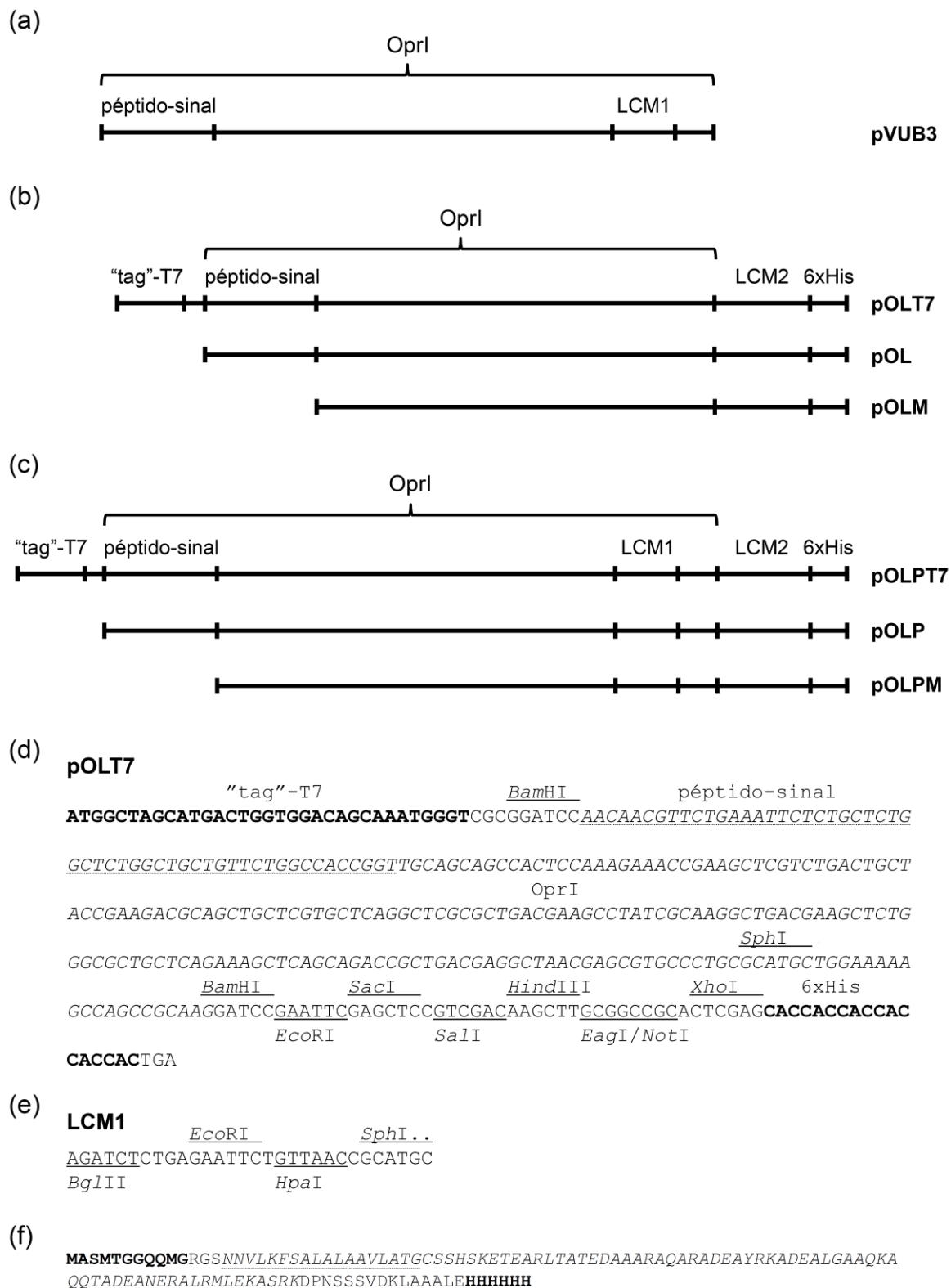


Figura 5 - Representação gráfica da região de clonagem/expressão dos vectores baseados em *oprI*.

Figura 5 (continuação) - Representação gráfica da região de clonagem/expressão dos vectores baseados em *oprI*.

(a) O vector pVUB3 (Cote-Sierra et al., 1998), que contém a sequência codificadora *oprI* com um local de clonagem múltipla (LCM1) inserido no local *SphI* perto da sua terminação 3', serviu de molde para amplificação por PCR de sequências *oprI* para subclonagem em pET-24a. (b) Construíram-se três plasmídeos diferentes por subclonagem de produtos de PCR amplificados após hidrólise com *SphI* e religação, com o intuito de remover LCM1; pOL e pOLT7 contêm a totalidade da sequência *oprI*, incluindo o péptido-sinal, seguida a jusante pelo LCM de pET-24a (LCM2) e pela cauda C-terminal de seis histidinas (6xHis); a "tag"-T7 N-terminal de pET-24a está presente em pOLT7, mas ausente em pOL; pOLM contém a região codificadora da forma madura de OprI, sem o péptido-sinal N-terminal, para a expressão de OprI não-lipidificada. (c) Obtiveram-se três plasmídeos equivalentes – pOLP, pOLPT7 e pOLPM – sem realizar a hidrólise de pVUB3 por *SphI* antes da amplificação por PCR, mantendo dessa forma o LCM anteriormente presente em pVUB3 (LCM1). (d) Região de expressão de pOLT7 em que se mostra em itálico a sequência *oprI*, em sublinhado pontilhado o péptido-sinal e a cheio as "tags" T7 e 6xHis; o LCM2 corresponde à sequência compreendida entre *EcoRI* e *XhoI*. (e) Sequência nucleotídica e locais de restrição do LCM1 inserido no local *SphI* de pVUB3 e presente em pOLP, pOLPT7 e pOLPM. (f) Sequência aminoacídica em código de uma letra da prolipoproteína expressa a partir do vector pOLT7, estando indicadas as diferentes regiões no memo formato usado em (d).

Tabela 3 – Novos vectores baseados em *oprI* e seus produtos de expressão

Vector	Proteína imatura			Proteína madura		
	(pb) ^a	Nº de a.a. ^b	Massa molecular (Dalton)	Nº de a.a. ^b	Massa molecular (Dalton)	
					Sem lipidificação ^c	Com lipidificação ^d
pOLT7	354	117	12405,7	85	9270,0	10059,3
pOL	315	104	11156,3			
pOLM	261	n.a. ^e	n.a.	86	9401,2	n.a.
pOLPT7	384	127	13565,0	95	10429,3	11218,6
pOLP	345	114	12315,6			
pOLPM	291	n.a.	n.a.	96	10560,5	n.a.
Plasmídeo recombinante						
pOLPT7-A104R	669	222	24040,3	190	20904,7	21694,0

^a Nº de pares de bases da região de expressão

^b Nº de resíduos de aminoácidos

^c Sequência aminoácídica da região madura sem modificação lipídica

^d Lipoproteína madura triacilada com resíduos de ácido palmítico

^e Não se aplica

2.3.2 O novo sistema permite o controlo da expressão basal de *oprI*

No sistema pET (Novagen) os genes alvo são clonados sob o controlo de sinais de transcrição do bacteriófago T7 usando células hospedeiras de não-expressão (que não possuem o gene para a RNA polimerase do fago T7). Uma vez estabelecidos, os plasmídeos recombinantes são transferidos para estirpes de expressão, que contêm uma cópia cromossomal do gene da RNA polimerase T7 sob controlo do promotor *lacUV5*. A expressão pode então ser induzida pela adição de IPTG ao meio de cultura. Estirpes de expressão que contêm plasmídeos pLysS ou pLysE permitem um controlo mais apertado da repressão devido à expressão de lisozima T7, um inibidor natural da RNA polimerase T7.

Para avaliar a capacidade de o novo sistema manter a expressão de OprI reprimida até à indução, prepararam-se extractos de proteína total a partir de células da estirpe de não-expressão JM109 e a partir das estirpes de expressão Rosetta(DE3)pLysS e BL21(DE3) transformadas com pOLPT7. A detecção de OprI por “dot blot” com o anticorpo QB2 não revelou a presença de lipoproteína nas culturas de 16 h não-induzidas da estirpe de não-expressão nem da estirpe de expressão que continha o plasmídeo pLysS (Figura 6). Após o período de indução de 3 h, também não se detectou OprI quando não se adicionou IPTG (controlo não-induzido) nas culturas de Rosetta(DE3)pLysS. Nas culturas de 16 h não-induzidas da estirpe de expressão BL21(DE3), que não continha o plasmídeo pLysS, e no respectivo controlo não-induzido (sem adição de IPTG) após o período de indução de 3 h,

detectou-se a presença de OprI, o que revela expressão residual na ausência de indução (Figura 6).

Detectaram-se quantidades expressivas de OprI nos extractos de proteína total preparados a partir de células de ambas as estirpes de expressão após 3 h de indução com IPTG (Figura 6).

Estes resultados demonstram que utilizando estirpes de não-expressão nos passos de clonagem e uma estirpe de expressão que contém o plasmídeo pLysS é possível, com o novo sistema, manter um forte controlo da expressão de *oprI*.

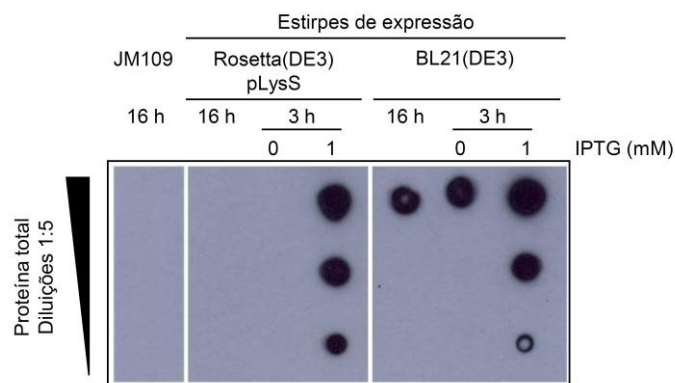


Figura 6 - O novo sistema permite o controlo da expressão basal de *oprI*.

“Dot blot” com diluições seriadas a 1:5 de extractos de proteína total preparados a partir de bactérias da estirpe de não-expressão JM109 e das duas estirpes de expressão Rosetta(DE3)pLysS e BL21(DE3), transformadas com o plasmídeo pOLPT7. Os extractos proteicos foram preparados após cultura de 16 h durante a noite (16 h) a 37 °C sem indução e após o período de indução de 3 h (3 h) a 37 °C, com (1) ou sem (0) indução com IPTG 1 mM. A OprI foi detectada utilizando o anticorpo monoclonal específico QB2.

2.3.3 Após indução de expressão, a OprI é processada e inserida na membrana externa da célula hospedeira

Com o intuito de verificar se o processo de maturação ocorre correctamente após a expressão de OprI no novo sistema, prepararam-se fracções de membrana externa *versus* fracções de citoplasma/periplasma/membrana interna (C/P/MI) por solubilização diferencial com sarcosil. Nas condições usadas, este detergente não solubiliza a membrana externa das bactérias. A presença de OprI nas duas fracções foi detectada em paralelo com o anticorpo QB2, que reconhece uma região da lipoproteína madura, detectando, assim, tanto as formas maduras como as formas precursoras de OprI; e com o anticorpo anti-“tag”-T7, que, em

consequência da remoção do péptido-sinal durante o processamento, reconhece apenas as formas imaturas da lipoproteína. O anticorpo QB2 revelou a presença de OprI em ambas as fracções, enquanto o anticorpo anti-“tag”-T7 detectou as formas imaturas na fracção C/P/MI mas não na membrana externa (Figura 7). Estes resultados demonstram o processamento pós-tradução da lipoproteína, não obstante a adição da “tag”-T7 à extremidade amínica do péptido sinal, e comprovam a sua ancoragem na membrana externa da célula hospedeira.

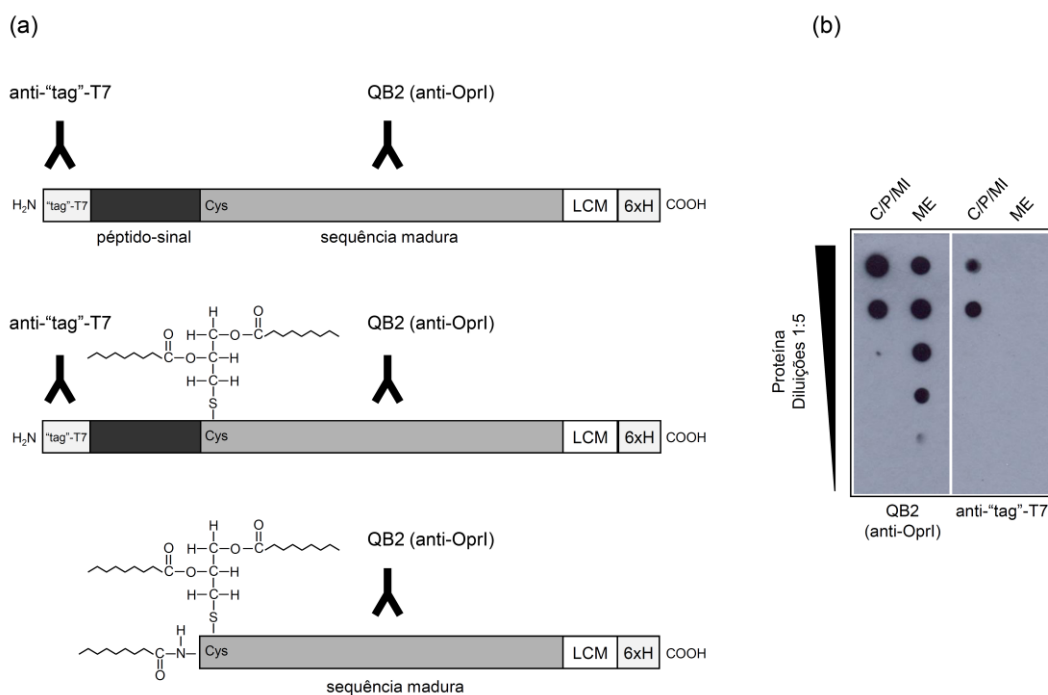


Figura 7 - A OprI é processada e inserida na membrana externa da célula hospedeira.

(a) Representação esquemática do processamento da OprI e sua detecção com os dois anticorpos, QB2 e anti-“tag”-T7; LCM, local de clonagem múltipla; 6xH, cauda de seis histidinas. (b) As fracções citoplasmática/periplásmica/membrana interna (C/P/MI) versus membrana externa (ME) foram preparadas a partir de células transformadas com pOLPT7 por solubilização diferencial com sarcosil a 1% após 3 h de indução a 37 °C com IPTG 1 mM. “Dot blots” com diluições seriadas a 1:5 dos extractos proteicos foram testados com o anticorpo monoclonal anti-OprI QB2, que detecta todas as formas da OprI, ou com o anticorpo monoclonal anti-“tag”-T7, que apenas detecta as suas formas imaturas.

2.3.4 Após indução de expressão, a OprI está presente no meio de cultura devido à libertação de vesículas de membrana externa da bactéria hospedeira

Durante os ensaios para optimização das condições de expressão, a OprI foi detectada por “western blot” no meio de cultura precipitado com acetona após 3 e 5 h de indução com uma mobilidade correspondente a uma massa molecular próxima de 14 kDa (Figura 8a). Este valor está de acordo com o esperado, uma vez que a massa molecular teórica da sequência madura de OprI não lipidificada é de 9270 Da, sabendo-se, de experiência anterior, que a modificação lipídica atrasa a sua mobilidade. Uma vez que a OprI não está descrita como uma lipoproteína secretada, admitiu-se que podia ocorrer libertação de OMV durante a indução.

De facto, a ultracentrifugação do meio de cultura origina um sedimento que analisado por SDS-PAGE mostra um padrão proteico similar àquele das fracções de membrana externa (Figura 8b) e a OprI deixa de ser detectada por “western blot” no sobrenadante após a ultracentrifugação (resultado não apresentado).

A observação do sedimento de ultracentrifugação por AFM revela estruturas compatíveis com vesículas, mostrando, a grande maioria, diâmetros que variam entre 20 e 100 nm (Figura 8c). Em consonância, a observação das células hospedeiras após indução de 3 h revela alterações morfológicas na sua superfície que sugerem vesiculação (Figura 8d).

2.3.5 A cromatografia de afinidade de extractos de membrana externa deslipidificados permite a purificação de OprI

A necessidade de recorrer a métodos laboriosos para purificar os produtos de fusão era uma importante limitação dos anteriores vectores baseados em *oprI*. O plasmídeo escolhido para servir de base aos novos vectores adiciona uma cauda de 6 histidinas à extremidade carboxílica da OprI possibilitando a purificação das formas maduras lipidificadas a partir da membrana externa por cromatografia de afinidade com Ni²⁺.

A abordagem seguida inicialmente para obtenção de OprI pura consistiu na ressuspensão do sedimento de membrana externa, insolúvel em sarcosil, numa solução desnaturante com hidrocloreto de guanidina 6 M, seguida pelo método de cromatografia de afinidade. Embora o produto de eluição obtido com este protocolo fosse composto maioritariamente por OprI (Figura 9, coluna 1), observou-se consistentemente a contaminação dos eluatos com outras proteínas. A presença de proteínas contaminantes, sendo particularmente visível uma proteína com massa molecular aparente de aproximadamente 40 kDa, não foi solucionada com qualquer das variações dos passos de ligação e lavagem ensaiadas (resultados não apresentados) e observou-se de forma semelhante nas tentativas

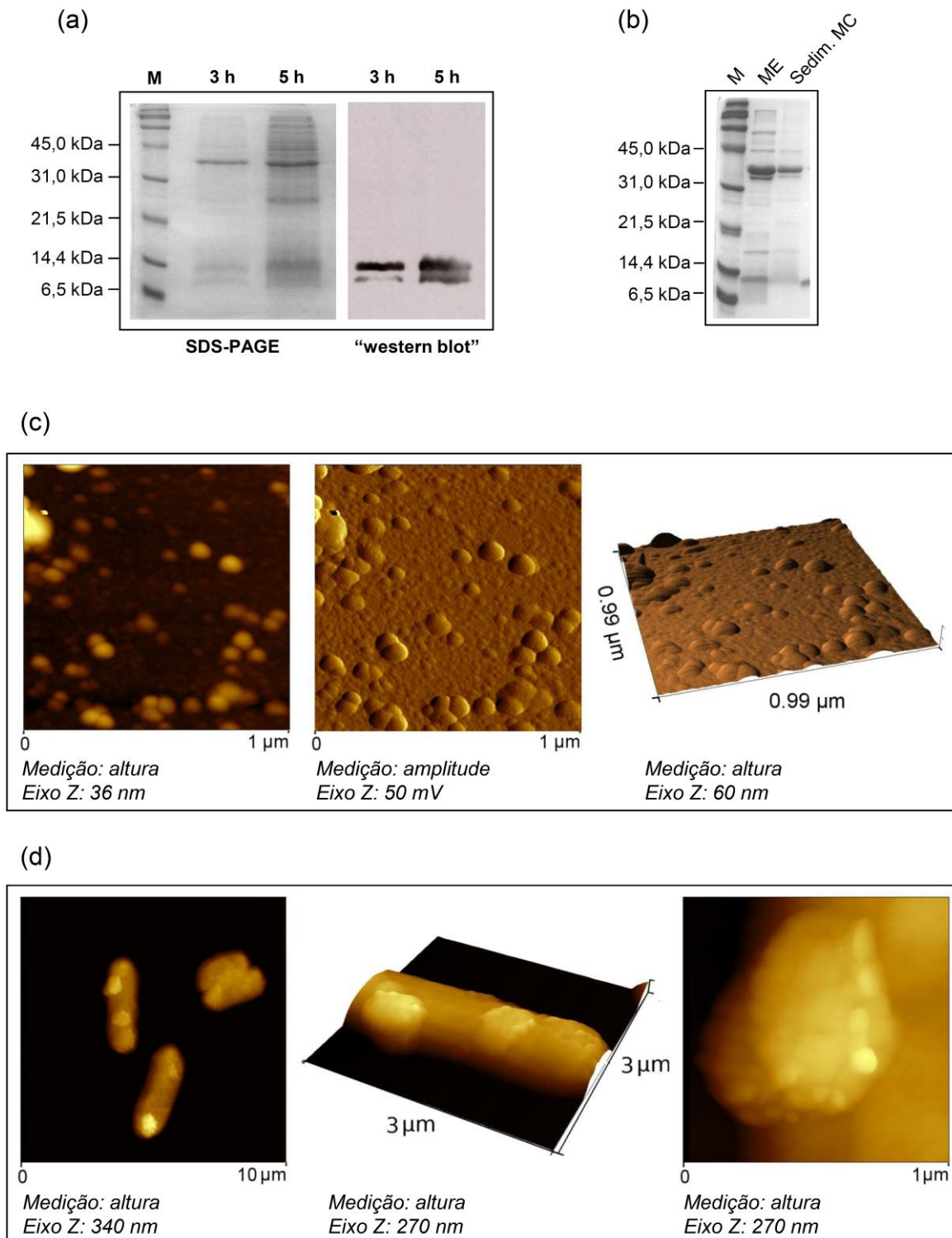


Figura 8 - A *OprI* está presente no meio de cultura devido à libertação de vesículas de membrana externa (OMV).

Figura 8 (continuação) - A OprI está presente no meio de cultura devido à liberação de vesículas de membrana externa (OMV).

(a) O meio de cultura de culturas induzidas durante 3 h e 5 h precipitado com acetona e analisado por SDS-PAGE e “western blot” utilizando o anticorpo anti-OprI QB2 revelou a presença de OprI. (b) O sedimento de ultracentrifugação do meio de cultura (Sedim. MC) de culturas induzidas apresenta um padrão proteico em SDS-PAGE semelhante àquele das membranas externas (ME); o marcador de massa molecular (M) está assinalado em (a) e (b). (c) A observação do sedimento de ultracentrifugação do meio de cultura por microscopia de força atômica revela estruturas com forma e tamanho compatíveis com OMV. Painel esquerdo, vista geral da topografia do sedimento. Na escala de cor o castanho claro corresponde a valores mais elevados de altura e o castanho-escuro a valores menores. Painel central, a mesma imagem em amplitude permitindo uma melhor percepção dos contornos. Painel direito, topografia em vista 3D da imagem da esquerda. (d) As células hospedeiras induzidas durante 3 h com IPTG 1 mM visualizadas por microscopia de força atômica apresentam protruções na superfície celular compatíveis com vesiculação da membrana externa. Painel esquerdo, vista geral de três células em que se observa a sua forma bacilar. Painel central, topografia 3D de uma das células do painel esquerdo. Painel direito, detalhe das protruções na superfície celular. Esta imagem de topografia foi obtida directamente por medição na escala de 1 μm na superfície da célula.

de purificação em condições nativas. Na Figura 10 apresenta-se um desses ensaios realizados em condições nativas em que se utilizou uma solução tamponada com o detergente Triton X-100 a 2% (v/v) e banho de ultra-sons no passo de solubilização e o mesmo detergente nas soluções de lavagem e eluição.

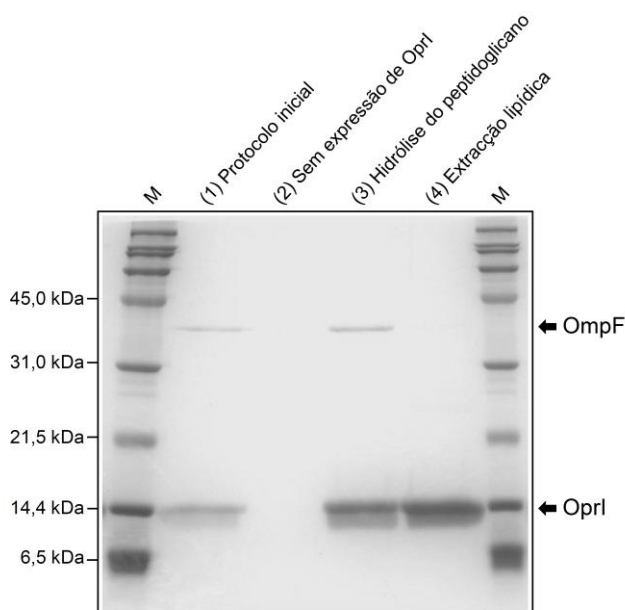


Figura 9 - A completa deslipidificação dos extractos de membrana externa (ME) é necessária para a purificação de OprI.

A figura mostra a análise por SDS-PAGE dos eluatos de cromatografia de afinidade de extractos de ME preparados com diferentes protocolos. A solubilização da ME com uma solução de ligação desnaturante resultou em eluatos contaminados com outras proteínas, principalmente OmpF (coluna 1). Nas condições usadas, a cromatografia de afinidade de extractos de ME de *Escherichia coli* não transformada indicou a inexistência de afinidade natural de proteínas da ME para a coluna de cromatografia (coluna 2). A hidrólise do peptidoglicano antes de realizar a purificação não impediu a co-purificação de outras proteínas (coluna 3), mas a extração lipídica com clorofórmio/metanol permitiu a sua eliminação (coluna 4). O marcador de massa molecular está assinalado por M.

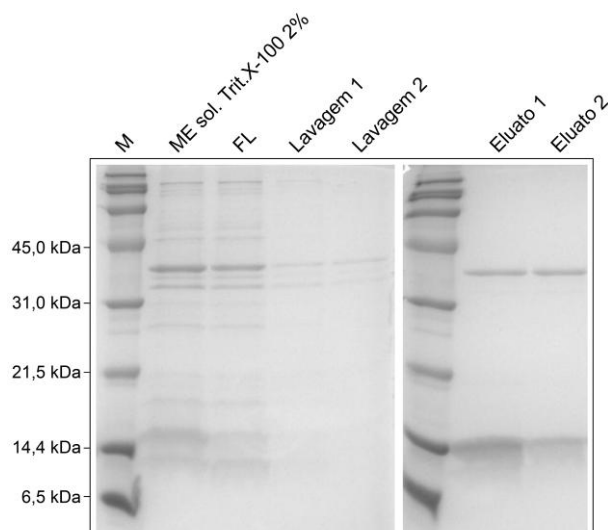


Figura 10 – A purificação a partir de preparações de membrana externa por cromatografia de afinidade em condições nativas resulta em eluatos maioritariamente compostos por OprI mas contaminados com outras proteínas.

Solubilizaram-se extractos de membrana externa em solução tamponada com Triton X-100 a 2% (v/v) em banho de água com sonicação. A fracção solúvel (ME sol. Trit.X-100 2%) foi aplicada em minicoluna de cromatografia (“His SpinTrap”), o “flow-through” (FL) foi colhido e, após duas lavagens com solução contendo o mesmo detergente e 20 mM de imidazole (Lavagem 1 e 2), procedeu-se à eluição com solução idêntica mas com 500 mM de imidazole (Eluato 1 e 2). A figura mostra a análise por SDS-PAGE das diferentes fracções. O marcador de massa molecular está assinalado por M.

A principal proteína contaminante foi analisada por “peptide mass fingerprinting” usando espectrometria de massa MALDI-TOF e identificada como sendo a proteína da membrana externa de *Escherichia coli* OmpF. Nesta fase, consideraram-se como possíveis causas da purificação incompleta da OprI, quer a afinidade natural de proteínas da membrana externa para a coluna de Ni²⁺, quer a existência de ligações físicas entre a OprI e outros componentes da membrana externa. Para testar a primeira hipótese, foi usado o mesmo procedimento de purificação em condições desnaturantes com extractos de membrana externa da mesma estirpe de *Escherichia coli* não transformada. Nestas condições não se observaram proteínas nos eluatos de cromatografia (Figura 9, coluna 2). A existência de ligações entre OprI e outras proteínas da membrana externa através de peptidoglicano foi então testada

procedendo à hidrólise deste último com lisozima antes de realizar a purificação de OprI. Este procedimento não eliminou a presença de proteínas contaminantes nos eluatos (Figura 9, coluna 3). Por fim, a deslipidificação das preparações de membrana externa por tratamento repetido com uma solução de clorofórmio/metanol resultou na obtenção de eluatos de cromatografia cuja análise por SDS-PAGE revelou uma única banda correspondente a OprI (Figura 9, coluna 4). O mesmo se observou após deslipidificação de preparações de membrana externa por tratamento com TCA/acetona (resultado não apresentado). Com base nestas observações, estabeleceu-se o protocolo final para purificação de OprI lipidificada como se segue: (1) preparação de fracções de membrana externa por solubilização diferencial com sarcosil; (2) deslipidificação das preparações de membrana externa por um dos métodos acima referidos; (3) cromatografia de afinidade. No seguimento da extracção dos lípidos de membrana por tratamento com clorofórmio/metanol ou TCA/acetona, a cromatografia é realizada sob condições desnaturantes após solubilização do precipitado proteico em tampão de ligação desnaturante.

No decorrer do trabalho experimental notaram-se, por vezes, diferenças significativas entre a quantidade de lipoproteína que era armazenada a -80 °C em alíquotas distribuídas por microtubos de polipropileno e aquela que era recuperada após descongelação. Esta observação levou-nos a suspeitar de perda de amostra por adsorção à superfície plástica durante o armazenamento. Com o objectivo de avaliar tais perdas e a possibilidade de as minimizar com tubos de polipropileno de baixa adsorção de proteínas, armazenaram-se amostras idênticas de OprI purificada e dialisada contra PBS nos dois tipos de tubo e avaliou-se a presença da lipoproteína na amostra deles recuperada após descongelação a 50 °C. Avaliou-se ainda a presença de lipoproteína residual nos tubos de armazenamento após a remoção da amostra, através da adição de uma solução desnaturante seguida de aquecimento a 95 °C. De facto, a amostra recuperada do tubo convencional descongelada a 50 °C continha apenas uma pequena fracção da quantidade recuperada nas mesmas condições a partir de tubos de baixa adsorção de proteínas (Figura 11). Pelo menos parte da lipoproteína armazenada no tubo convencional foi depois recuperada nas condições extremas de solubilização (adição de tampão desnaturante com ureia e tampão de amostra com aquecimento a 95 °C durante 10 min) usadas após a transferência inicial da amostra. Nas mesmas condições, praticamente não se detectou OprI residual nos tubos de baixa adsorção. Face a este resultado, o armazenamento dos produtos purificados a partir do novo sistema passou a ser feito, de forma sistemática, em tubos de baixa adsorção de proteínas.

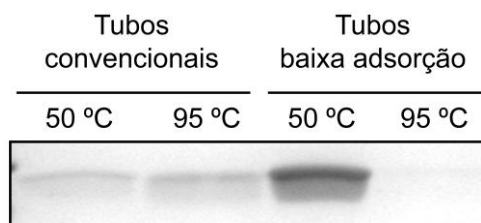


Figura 11 – A lipoproteína OprI purificada e armazenada em microtubos convencionais de polipropileno é perdida por adsorção à superfície plástica durante o armazenamento.

Armazenaram-se alíquotas idênticas da mesma amostra de OprI purificada e dialisada contra PBS em microtubos convencionais de polipropileno (Tubos convencionais) e em microtubos de baixa adsorção de proteínas (Tubos baixa adsorção). A figura mostra a análise por SDS-PAGE da presença de OprI nas amostras recuperadas dos tubos de armazenamento após descongelação a 50 °C (50 °C) e a presença de lipoproteína residual depois recuperada dos tubos vazios em condições extremas de solubilização, por adição de uma solução desnaturante seguida de aquecimento a 95 °C (95 °C).

2.3.6 A OprI expressa e purificada a partir de *Escherichia coli* é uma lipoproteína triacilada

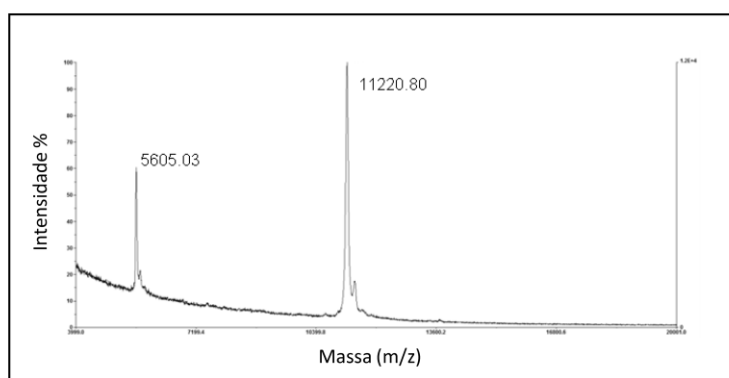
Com o objectivo de clarificar a composição da componente lipídica da lipoproteína obtida com o novo sistema, analisou-se OprI expressa e purificada a partir do vector pOLPT7 por espectrometria de massa MALDI-TOF para determinação da massa molecular. Procedeu-se ainda à caracterização dos resíduos de ácidos gordos por cromatografia gás-líquido seguida de espectrometria de massa.

Por espectrometria de massa MALDI-TOF, o espectro adquirido em modo positivo apresentou um único pico maioritário a m/z 11221, correspondendo a uma massa molecular de 11220 Da (Figura 12a). O pico a m/z 5605 deverá corresponder a uma forma de dupla ionização. No caso de ser acilada com três resíduos de ácido palmítico, a lipoproteína analisada neste ensaio apresentaria uma massa molecular teórica de 11219 Da. O resultado é portanto compatível com uma forma principal de OprI triacilada. Não se observaram picos correspondentes a formas mono ou diaciladas da lipoproteína.

A análise dos ácidos gordos covalentemente ligados a OprI, realizada por cromatografia gás-líquido seguida de espectrometria de massa, corrobora os resultados obtidos por espectrometria de massa MALDI-TOF. Este método revelou a presença quer de ácidos gordos

com ligação éster quer de ácidos gordos com ligação amida e o rácio molar entre os dois grupos foi de 1,9 (Figura 12b). Este resultado sugere a estrutura típica triacilada das lipoproteínas de membrana externa de bactérias Gram-negativas. A análise qualitativa dos ácidos gordos presentes na molécula de OprI (Figura 12b) mostra que o ácido palmítico é o principal constituinte da lipoproteína em ambas as posições, representando 46,6% do total de resíduos com ligação éster e 82,4% do total de ácidos gordos com ligação amida. Para além de C14:0, foram ainda detectados dois ácidos gordos insaturados (C16:1*cis*-9 e C18:1*cis*-9) e dois cíclicos (C17:0 *cyclo* e C19:0 *cyclo*).

(a)



(b)

	AG ligação éster (ELFA)	AG ligação amida (ALFA)	Rácio ELFA/ALFA
Moles (total)	$7,5 \times 10^{-8}$	$3,9 \times 10^{-8}$	1,9

Ácidos gordos	% de ELFA totais	% de ALFA totais
C14:0	2,2	0,0
C16:0	46,6	82,4
C16:1 <i>cis</i> -9	3,2	4,4
C17:0 <i>cyclo</i>	25,3	5,2
C18:1 <i>cis</i> -9	13,1	8,0
C19:0 <i>cyclo</i>	9,6	0,0

Figura 12 - A OprI expressa e purificada no novo sistema é uma lipoproteína triacilada.

(a) A análise por espectrometria de massa MALDI-TOF da OprI expressa a partir do vector pOLPT7 e purificada por cromatografia de afinidade revela um pico principal correspondente a uma massa molecular compatível com uma lipoproteína acilada com três resíduos de ácido palmítico. (b) Os ácidos gordos com ligação éster (ELFA) e os ácidos gordos com ligação amida (ALFA) foram trans-esterificados em ésteres metílicos com KOH e HCl em metanol, respectivamente, e analisados por cromatografia gás-líquido seguida por espectrometria de massa. Apresenta-se o número total de moles, o rácio molar ELFA/ALFA e as percentagens de cada resíduo em relação ao total de ácidos gordos de ligação éster ou amida.

2.3.7 Antígenos heterólogos clonados no sistema podem ser obtidos em três formulações diferentes com potencial distinto para activação de PRR

A observação de que uma deslipidificação incompleta das membranas externas resultava na solubilização de OprI ligada a outras proteínas de membrana, provavelmente através da camada lipídica, levou-nos a explorar o desenvolvimento de protocolos para obtenção e caracterização de uma formulação imunogénica baseada em fragmentos de membrana externa (formulação OMF). Esses protocolos consistiam na solubilização de preparações de membrana externa utilizando soluções com diferentes detergentes, seguida de cromatografia de afinidade em condições nativas. De acordo com a hipótese de solubilização de OprI ligada a OMF, por oposição a uma completa extracção da lipoproteína a partir da membrana, a análise por SDS-PAGE de eluatos de cromatografia assim obtidos demonstra a presença de OprI e dos seus derivados de fusão conjuntamente com outras proteínas de membrana (resultados não apresentados). A presença dessas proteínas variou quantitativamente e qualitativamente em função do tipo de detergente usado, da proporção detergente:proteína total e da solução tampão utilizada (PBS *versus* Tris-HCl/NaCl).

Nesta fase, realizou-se um rastreio de seis detergentes a 2% (p/v) para avaliar comparativamente a sua capacidade de solubilização de OMF contendo OprI a partir de extractos de membrana externa. Este ensaio indicou serem os detergentes OG, DM e DDM os mais eficientes nessa solubilização (Figura 13).

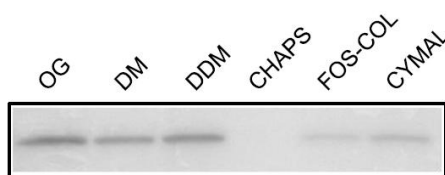


Figura 13 – Os detergentes OG, DM e DDM demonstram maior eficiência na solubilização de fragmentos de membrana contendo OprI.

Rastreio para identificação dos detergentes mais eficientes na solubilização de fragmentos de membrana contendo OprI. A imagem mostra as bandas correspondentes à OprI visualizadas em SDS-PAGE de eluatos obtidos por cromatografia de afinidade de membranas externas solubilizadas com seis detergentes diferentes, n-octil- β -D-glucopiranosido (OG), n-decil- β -D-maltopiranosido (DM), n-dodecil- β -D-maltopiranosido (DDM), CHAPS, FOS-CHOLINE-12 (FOS-COL) e CYMAL-5 (CYMAL).

Considerando que o OG é um detergente não-iónico dialisável, o que permite a sua remoção no final do processo de purificação, este detergente foi tido como a melhor escolha para incluir nos protocolos de preparação da formulação OMF. No entanto, uma vez que alguns ensaios preliminares de incubação de células eucariotas com amostras purificadas de OprI obtidas no sistema haviam revelado efeito citotóxico que se admitiu ser devido à presença de quantidades residuais do detergente Triton X-100 (não dialisável), entendeu-se desejável avaliar se uma eventual citotoxicidade de quantidades residuais do detergente OG poderia constituir uma limitação ao uso deste detergente em ensaios futuros. Para o efeito, expuseram-se células de linha HEK393T a diferentes concentrações dos dois detergentes, Triton X-100 e OG, e avaliou-se a viabilidade celular ao fim de 4 h (Figura 14).

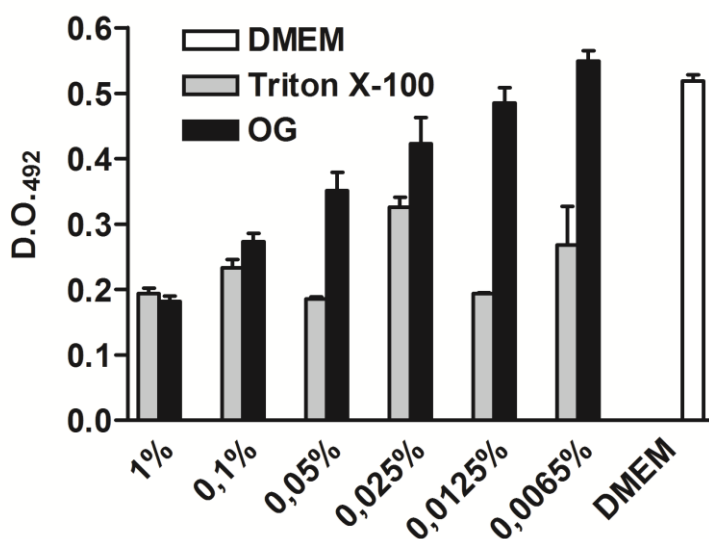


Figura 14 – O detergente OG é mais bem tolerado por células eucariotas do que o detergente Triton X-100.

A citotoxicidade dos detergentes Triton X-100 e do detergente OG foi avaliada por incubação de células HEK393T durante 4 h com concentrações decrescentes destes detergentes seguida da determinação da viabilidade celular por método colorimétrico baseado na redução de MTS. A viabilidade celular é directamente proporcional a essa redução e foi avaliada por absorvância a um comprimento de onda de 492 nm. Apresentam-se médias de duas determinações com o respectivo erro padrão. DMEM, meio de cultura utilizado como controlo negativo.

Os resultados demonstram que ambos os detergentes afectam a viabilidade celular quando em concentrações elevadas. Contudo, ao contrário do verificado para o detergente Triton X-100 em que o efeito citotóxico se verifica mesmo nas concentrações mais baixas testadas, os efeitos deletérios obtidos com OG desaparecem progressivamente com a diluição

do detergente até se obterem valores próximos do controlo a partir de concentrações de 0,0125% (p/v). Tendo em conta o facto de se tratar de um detergente dialisável, possibilitando a sua remoção ou diluição das amostras finais, este resultado reforça a opção pelo detergente OG para uso nos protocolos de obtenção de OMF.

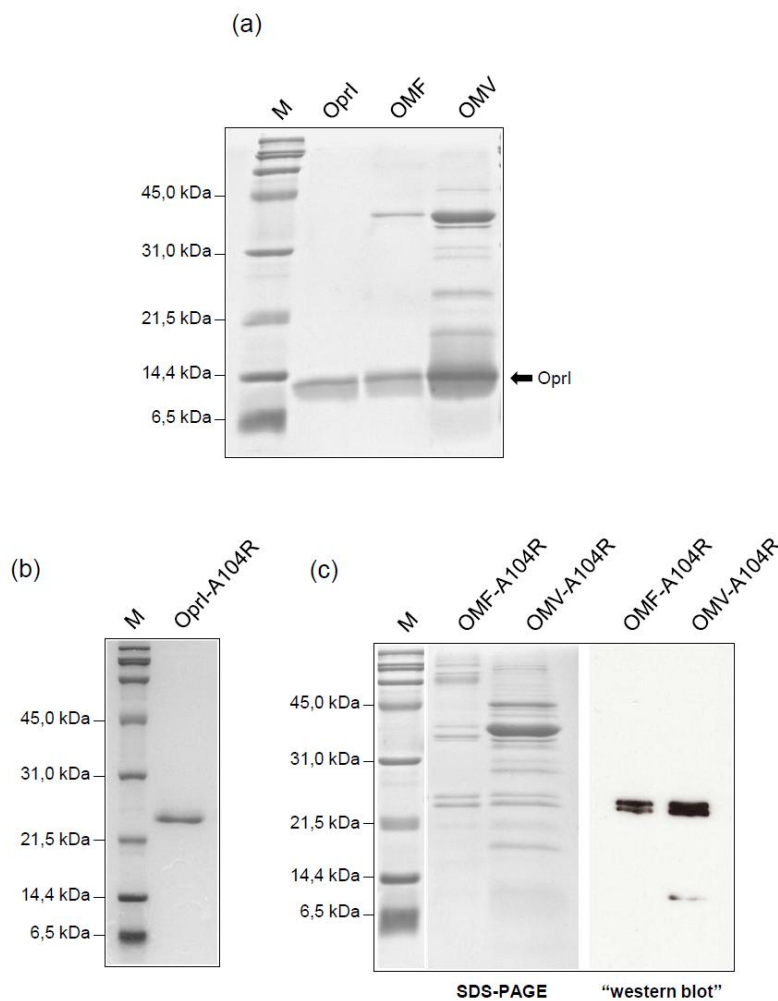


Figura 15 - O novo sistema permite a produção de três formulações imunogénicas.

(a) Análise por SDS-PAGE de OprI, fragmentos de membrana externa (OMF) e vesículas de membrana externa (OMV). (b) Para testar a capacidade de obter um antígeno heterólogo em fusão com OprI, clonou-se a sequência codificadora da proteína A104R do vírus da peste suína africana no vector pOLPT7. Uma vez expressa, a proteína de fusão foi purificada por cromatografia de afinidade sob condições desnaturantes e o produto de eluição foi analisado por SDS-PAGE. (c) Análise por SDS-PAGE e “western blot” de preparações de OMF e OMV obtidas a partir de células expressando a proteína de fusão OprI-A104R; QB2 foi usado como anticorpo primário na análise por “western blot”. O marcador de massa molecular (M) está assinalado nos três géis.

Com base nos resultados obtidos nesta fase do trabalho e na demonstração da vesiculação de membrana externa por *Escherichia coli* (2.3.4), consideraram-se três formulações imunogénicas derivadas da membrana externa da bactéria hospedeira que contêm OprI ou os seus derivados de fusão: OprI, OMF, OMV (Figura 15a). O conteúdo de LPS e peptidoglicano em cada formulação foi determinado pelos métodos de LAL e SLP, respectivamente. O nível de endotoxina foi de 0,09, 3,06 e 26370,76 EU/ μ g de proteína para OprI, OMF e OMV, respectivamente. O peptidoglicano foi detectado apenas em quantidades vestigiais em formulações de OMV. Estes resultados revelam um potencial distinto das três formulações para activação PRR

Como modelo para demonstração da capacidade de clonagem, expressão e translocação de uma proteína de fusão lipidificada para a membrana externa para obtenção de antígenos heterólogos em fusão com OprI, clonou-se a sequência codificadora da proteína A104R de VPSA no vector pOLPT7 e o antígeno recombinante foi purificado por cromatografia de afinidade sob condições desnaturantes (Figura 15b). Na Figura 16 apresenta-se a sequência teórica da proteína de fusão e na Tabela 3 os dados relativos ao plasmídeo recombinante e seu produto de expressão. Por fim, as formulações OMF e OMV, incorporando a proteína de fusão OprI-A104R, foram preparadas de acordo com os mesmos protocolos anteriormente usados para obtenção das formulações com OprI sem fusão (Figura 15c).

1 **MASMTGGQMG**RGSNNVLKFSALALAAVLATGCSSHSKETEARLTATEDAAARAQARADE

61 AYRKADEALGAAQKAQQTADAEANERALRMQISENSLVI **STKKKPTITKQELYSLVAADTQ**

121 **LNKALIERIFTSQOKIIQNALKHNQEVIIPPGIKFTVVTVKAKPARQGHNPATGEP IQIK**

181 **AKPEHKAVKIRALKPVHDMLNESNSSVDKLAALAEHHHHHH-**

Figura 16 – Sequência aminoacídica teórica da prolipoproteína de fusão OprI-A104R codificada no vector pOLPT7-A104R.

Apresenta-se a sequência *oprI* em itálico, a sequência de A104R em itálico e cheio, o péptido-sinal a sublinhado pontilhado e as “tags” T7 e 6xHis a cheio.

2.4 Discussão

Neste capítulo descreve-se o desenvolvimento e a caracterização de um novo sistema de clonagem e expressão baseado na lipoproteína OprI da membrana externa de *Pseudomonas aeruginosa* vocacionado para a produção de formulações imunogénicas recombinantes com potencial para activação de PRR. Os inconvenientes dos sistemas anteriores baseados em OprI são ultrapassados e são exploradas novas aplicações à luz do conhecimento actual sobre a forma como a imunidade inata influencia o desenvolvimento de respostas adaptativas.

A instabilidade dos plasmídeos recombinantes devida à dificuldade em manter a expressão reprimida até ao momento da indução tem constituído uma das principais limitações à utilização dos sistemas baseados em OprI. A repressão da expressão basal assume particular relevância neste tipo de sistemas considerando o interesse na clonagem de uma grande variedade de antígenos heterólogos potencialmente tóxicos para a célula hospedeira. Um bom controlo da expressão é também importante para a capacidade de expressar proteínas com cadeias aminoacídicas longas, o que permite incorporar no imunogénio um repertório de epitopos mais vasto.

Neste trabalho desenvolveram-se novos vectores e procedimentos baseados numa geração mais recente de sistemas de expressão que permitem uma separação completa entre os passos de clonagem e expressão. A ausência nas estirpes de não-expressão do gene da RNA polimerase T7, necessária para o reconhecimento dos sinais de transcrição dos novos vectores plasmídicos, garante que os produtos recombinantes não interferem na viabilidade das células onde se processam os passos de clonagem e manutenção dos plasmídeos (Rosenberg et al., 1987; Studier & Moffatt, 1986). Evita-se, assim, uma selecção negativa de clones que expressem produtos com algum nível de toxicidade para a célula hospedeira, como se observou no passado (Leitão et al., 2000). Por outro lado, a utilização de estirpes de expressão com plasmídeos que codificam um inibidor da RNA polimerase T7 permite estender o controlo da expressão à fase de pré-indução (Studier, 1991). Os resultados obtidos demonstram que, explorando o conjunto destes mecanismos, é possível manter um apertado controlo da expressão de OprI até ao momento da indução.

Os novos vectores designados com a letra “M” (pOLM e pOLPM) foram concebidos de modo que a cisteína N-terminal da sequência madura da OprI fosse codificada imediatamente após o codão de iniciação, excluindo, portanto, a região codificadora do péptido-sinal. A jusante, a sequência é idêntica à dos restantes plasmídeos, o que permite a clonagem em paralelo do mesmo fragmento de DNA em vectores que expressam produtos de fusão lipidificados e não-lipidificados. É também possível a transferência directa da sequência

heteróloga entre vectores. Os antígenos de fusão não lipidificados assim obtidos constituem controlos apropriados em ensaios de estimulação *in vitro* ou em protocolos de imunização.

No conjunto dos vectores obtidos incluem-se ainda plasmídeos que acrescentam uma “tag”-T7 N-terminal, a montante do péptido-sinal da OprI. De acordo com o conhecimento actual acerca do processo de maturação das lipoproteínas bacterianas, a clivagem do péptido-sinal pela enzima sinal peptidase II depende da adição da molécula de glicerol (em regra acilada por dois resíduos de ácidos gordos através de ligações éster) ao resíduo de cisteína localizado na posição 1 da proteína madura, através de uma ligação tioéter (Sankaran & Wu, 1994). Assim, a ausência do péptido-sinal na molécula lipoproteica garante ter ocorrido o passo fundamental do processo de maturação, ou seja, a adição do resíduo diacilglicerilo. A localização N-terminal da “tag”-T7 implica a sua remoção aquando da clivagem do péptido sinal, o que possibilita a avaliação do processamento da lipoproteína utilizando um anticorpo monoclonal anti-“tag”T7 conjuntamente com um anticorpo anti-OprI específico da região madura, como QB2. Este procedimento prático evita o uso de ácidos gordos marcados radioactivamente para a confirmação do processo de maturação, técnica realizada no passado (Cornelis et al., 1996), e permite ainda avaliar a contaminação das preparações de membrana externa com formas citoplasmáticas da lipoproteína.

A observação de que a adição da “tag”-T7 não impede a translocação da OprI através da membrana interna, que neste tipo de lipoproteínas se processa através da maquinaria de proteínas Sec (Tokuda, 2009), tem implicações no conhecimento sobre o processamento das lipoproteínas bacterianas. Embora a relação entre as características das sequências dos péptidos-sinal e os mecanismos moleculares que estão na base do direccionamento e translocação das lipoproteínas através da membrana interna não estejam totalmente esclarecidos, a análise das sequências dos péptidos-sinal de diferentes lipoproteínas permite identificar motivos comuns que definem a estrutura típica destes sinais. Os critérios de programas informáticos que visam identificar lipoproteínas putativas a partir de sequências aminoacídicas assentam nestes motivos. No caso do programa da base de dados de lipoproteínas bacterianas DOLOP (Madan Babu & Sankaran, 2002) os critérios são os seguintes: (1) presença de aminoácidos carregados positivamente nos resíduos iniciais; (2) presença de 7 a 22 resíduos entre a “lipobox” e o resíduo carregado; (3) presença de uma “lipobox” que obedeça à sequência consenso [LVI][ASTVI][ASG][C] nos primeiros 40 resíduos a partir da extremidade amínica da prolipoproteína putativa. Na base de dados PROSITE (Sigrist et al., 2010) a regra usada determina que o resíduo de cisteína no local de clivagem se encontre nos primeiros 35 resíduos da extremidade amínica da sequência e que ocorra um resíduo de lisina ou arginina entre os primeiros 7 aminoácidos. Estes critérios

reflectem, portanto, as características típicas dos péptidos-sinal das lipoproteínas. A adição da “tag”-T7 a montante do péptido-sinal da OprI interfere, quer com os critérios que determinam um número máximo de resíduos entre a extremidade N-terminal e a cisteína no local de clivagem, quer com os critérios relativos às propriedades da região N-terminal do péptido-sinal. Na prolipoproteína com “tag”-T7, a cisteína alvo de modificação lipídica encontra-se na posição 33, obedecendo assim, em ambos os casos, aos critérios exigidos. No entanto, embora ocorram dois aminoácidos de carga positiva a montante da região hidrofóbica central, estes ocorrem nas posições 12 e 19. Estas posições são admitidas pela programa DOLOP, mas não o são pelo programa da base de dados PROSITE, que exige a sua presença nas primeiras 7 posições. É pois relevante sublinhar que, se o algoritmo do programa DOLOP não detecta, como se mencionou na introdução deste capítulo, a sequência de OprI como lipoproteína putativa devido à presença de um resíduo de leucina na posição -4 da lipobox, ao invés da posição canónica -3, o programa PROSITE não detecta a sequência da OprI com “tag”-T7 como lipoproteína putativa devido à ausência de aminoácidos com carga positiva nos primeiros 7 resíduos. No entanto, como se demonstrou neste trabalho, a sequência de prolipoproteína que apresenta uma “tag”-T7 N-terminal comporta-se como uma verdadeira lipoproteína.

A dificuldade técnica na purificação de antigénios de fusão a partir dos extractos de membrana externa constituía uma importante limitação dos anteriores sistemas baseados em OprI. Uma das razões que presidiram à escolha do plasmídeo que serviu de base à construção dos novos vectores foi a localização C-terminal da cauda de seis histidinas que permitia testar a possibilidade de purificar a OprI madura e derivados de fusão por cromatografia de afinidade com iões metálicos. Esta abordagem foi anteriormente experimentada com resultados promissores (Piedade, 2003) mas o plasmídeo obtido não era vocacionado para a clonagem de novos antigénio. Neste como noutros trabalhos (Chen et al., 2009) os autores propõem a purificação da proteína recombinante a partir de lisados celulares totais. Porém, a purificação a partir da membrana externa é desejável para que se obtenham as formas maduras de lipoproteína sem contaminação com os precursores presentes no citoplasma e na membrana interna. A purificação de proteínas ancoradas em membranas celulares apresenta dificuldades técnicas devido à sua natureza hidrofóbica e à dificuldade em extraí-las da matriz lipídica, mas só a forma madura tem capacidade de ligação aos receptores TLR.

Os resultados obtidos no decurso dos ensaios de optimização dos passos de purificação mostraram que uma deslipidificação incompleta das membranas externas resulta na solubilização de fragmentos de membrana compostos por mais do que uma proteína, não se verificando portanto a extracção completa da lipoproteína e a sua solubilização

individualizada. Este facto tem como consequência a presença de fragmentos de membrana ligados a OprI, ou seus derivados de fusão, nos eluatos de cromatografia, o que se reflecte na observação em SDS-PAGE de outras proteínas da membrana externa de *Escherichia coli* co-purificadas com a lipoproteína. Em regra, a porina OmpF foi das proteínas co-purificadas a mais visível, provavelmente por ser uma das mais abundantes da membrana externa de *Escherichia coli* (Inokuchi et al., 1982). A observação posterior de que um passo de deslipidificação efectiva dos extractos de membrana externa, prévio à separação cromatográfica, reduzia significativamente a presença de proteínas contaminantes nos eluatos finais, permitiu-nos por fim estabelecer protocolos para obtenção de OprI com elevado grau de pureza, com níveis de contaminação por endotoxina meramente vestigiais. Os mesmos protocolos foram usados com sucesso na purificação de antigénios expressos sob a forma de proteínas de fusão com a OprI.

A capacidade de activação TLR das lipoproteínas bacterianas e dos seus análogos sintéticos reside na sua componente lipídica (Hirschfeld et al., 1999) e a capacidades estimuladora destas moléculas varia consoante o tipo de ligação química e o comprimento dos resíduos de ácidos gordos nelas presentes (Buwitt-Beckmann et al., 2005a; Buwitt-Beckmann et al., 2005b; Chua et al., 2007; Müller et al., 2004; Spohn et al., 2004). A existência de duas cadeias de ácidos gordos com comprimento superior a oito átomos de carbono é crítica para a adjuvanticidade dos lipopéptidos dependente de TLR (Buwitt-Beckmann et al., 2005b). Pelo contrário, os lipopéptidos monoacilados com um ácido gordo com ligação amida, desprovidos de resíduos com ligação éster, apresentam uma capacidade estimuladora fraca (Meng et al., 2003) ou nula (Ghielmetti et al., 2005a).

Apesar de os estudos recentes que fazem uso de OprI como imunomodulador assumirem que a lipoproteína apresenta uma forma triacilada, a única caracterização lipídica de OprI nativa apresentada até hoje sugere que esta é uma lipoproteína monoacilada (Mizuno & Kageyama, 1979), e, tanto quanto é do nosso conhecimento, nenhuma caracterização de OprI expressa em *Escherichia coli* foi alguma vez realizada. A análise dos ácidos gordos covalentemente ligados à OprI expressa no novo sistema e a determinação da sua massa molecular sugerem fortemente a produção de uma lipoproteína de membrana externa triacilada. A identidade dos ácidos gordos revelou que o ácido palmítico é o mais abundante, principalmente na posição amida, o que está de acordo com o reportado para a lipoproteína de Braun (Braun & Hantke, 1975; Inouye et al., 1976). Também para a OprI nativa de *Pseudomonas aeruginosa* o ácido palmítico está descrito como sendo o mais abundante (Mizuno & Kageyama, 1979). Curiosamente, ao contrário do que aqui se reporta para a OprI expressa em *Escherichia coli*, Mizuno e Kageyama (1979) não detectaram C19:0 cyclo em

OprI nativa de *Pseudomonas aeruginosa*. A presença de ácidos gordos cíclicos, particularmente C17:0 e C19:0, está descrita como sendo característica de *Escherichia coli* (Oursel et al., 2007) e, dado que os resíduos de ácidos gordos das lipoproteínas derivam dos fosfolípidos de membrana da bactéria (Lai & Wu, 1980; Lai et al., 1980; Magnuson et al., 1993) é natural que reflectam o perfil lipídico da bactéria de expressão.

Nesta fase do trabalho pretendia-se ainda explorar o novo sistema para a produção de diferentes formulações imunogénicas tirando partido da ancoragem da componente lipídica da OprI à membrana externa da célula hospedeira. Com base nos resultados obtidos no decurso do trabalho, consideraram-se, para além da OprI purificada, duas outras formulações, OMF e OMV. Nas três formulações obtidas o antigénio clonado está fisicamente ligado aos componentes derivados da parede celular, que contêm ou são eles próprios ligandos de PRR. Para além da lipoproteína OprI, as formulações OMF e OMV contêm ainda, pelo menos, um ligando TLR4 (LPS) e, no caso das OMV, vestígios de peptidoglicano, um ligando TLR2/NOD. Considerando o conhecimento recente, antes referido, acerca da influência da activação PRR no processamento e apresentação antigénica por APC, estas três formulações permitem-nos perspectivar diferentes propriedades de modulação da resposta imunitária. Através dos protocolos estabelecidos, podem ser obtidas, a partir do mesmo clone, as três formulações propostas contendo o mesmo antigénio. Assim, uma potencial aplicação do sistema será a utilização destes imunogénios em estudos de resposta imunitária, designadamente no estabelecimento de correlações entre níveis de protecção e propriedades da imunidade específica desencadeada por cada formulação em modelos de doenças infecciosas ou oncológicas.

Capítulo 3. Caracterização de propriedades imunomoduladoras das formulações obtidas com o novo sistema baseado em OprI

3.1 Introdução

Os estudos sobre a forma como a activação via TLR2 influencia a resposta imunitária específica, nomeadamente a polarização Th, têm gerado resultados contraditórios, sendo portanto controversa a utilidade dos respectivos agonistas enquanto adjuvantes vacinais. Se inicialmente se admitia que a estimulação TLR, exercida através de qualquer um dos receptores, dirigia a resposta num sentido Th1, nos últimos anos têm-se somado estudos que apontam a estimulação via TLR2 como indutora de polarização Th2 (Agrawal et al., 2003; Dillon et al., 2004; Kiura et al., 2006; Pulendran et al., 2001b; Redecke et al., 2004). No entanto, a possibilidade de influenciar através de estimulação TLR2 a diferenciação de células Th no sentido de um fenótipo Th1 (Brüll et al., 2010; Chua et al., 2008; Cote-Sierra et al., 2002; Ghielmetti et al., 2005b; Huber et al., 2002; Imanishi et al., 2007; Sieling et al., 2003; Watanabe et al., 2004; Zhu et al., 2004), Th17 (Aliahmadi et al., 2009) ou regulador de Th2 (Akdis et al., 2003; Lombardi et al., 2008; Revets et al., 2005) foi também demonstrada noutros trabalhos.

Os resultados obtidos em estudos anteriores em que se utilizou OprI produzida a partir do vector pVUB3, em fusão ou co-administrada com antigénios, indicam uma capacidade adjuvante polarizadora da resposta num sentido Th1 (Cote-Sierra et al., 2002; Piedade, 2003) ou mitigadora de respostas Th2 exacerbadas previamente estabelecidas (Revets et al., 2005). Neste último trabalho é ainda sugerido que a lipoproteína OprI actua simultaneamente via TLR2 e TLR4 em contraste com aquilo que tem sido descrito para lipoproteínas bacterianas. No entanto, a caracterização molecular apresentada no capítulo anterior demonstrou que a OprI expressa e purificada no novo sistema é uma lipoproteína triacilada, composta maioritariamente por ácido palmítico, o que corresponde à estrutura típica das lipoproteínas bacterianas agonistas dos receptores TLR2/1.

Os ligandos TLR2 e particularmente os lipopéptidos sintéticos têm também sido apontados como adjuvantes potenciadores de respostas citotóxicas por linfócitos CD8⁺ (Baz et al., 2008; Chua et al., 2008; Jackson et al., 2004; Khan et al., 2007; Lau et al., 2006). Os mecanismos que estão na base desta capacidade não estão totalmente esclarecidos, mas é provável que envolvam aspectos de natureza física, como a interacção da componente lipídica com as membranas celulares ou a conformação espacial dos imunogénios, para além da própria activação TLR (Andrieu et al., 2000; Burgdorf et al., 2008; Gil-Torregrosa et al., 2004; Martinon et al., 1992; West et al., 2004). Num estudo realizado a propósito da caracterização de respostas LTC do suíno face a infecção por VPSA, demonstrou-se que os antigénios expressos em fusão com OprI são eficientemente internalizados por macrófagos

derivados de sangue periférico e que entram na via de processamento que leva a apresentação no contexto de MHC classe I (Leitão et al., 1998). Esta propriedade permitiu a utilização dos produtos de fusão para avaliar o reconhecimento restrito a MHC classe I de epitopos de VPSA por LTC de suínos sobreviventes a infecção com vírus de baixa virulência (Leitão et al., 1998). No entanto, nesse trabalho as preparações antigénicas consistiam em extractos de membranas externas, não ficando por isso demonstrada a capacidade de a fusão com OprI, por si só, induzir respostas LTC. A possibilidade que o sistema agora desenvolvido oferece de realizar a fusão de proteínas com um ligando de TLR2 e de purificar as proteínas de fusão por métodos expeditos poderá ser explorada para obtenção de moléculas que visem o esclarecimento das vias de internalização e processamento das lipoproteínas bacterianas.

A estimulação de APC induzida por ligandos de um único TLR resulta, frequentemente, numa produção pouco pronunciada de citocinas. A expressão de mediadores como TNF- α , IL-1 β , IL6, ciclooxigenase (COX)-2, IL-10, IL-12 e IL-23 é, no entanto, induzida de forma sinérgica pela activação combinada de diferentes receptores (Gautier et al., 2005; Napolitani et al., 2005). O efeito da sinergia é particularmente expressivo quando se conjugam estímulos activadores de vias de sinalização dependentes de MyD88 com estímulos activadores de vias dependentes da molécula adaptadora TRIF (Gautier et al., 2005). Estão também reportadas sinergias entre ligandos de TLR e agonistas de outros PRR, como por exemplo receptores NOD (Gerosa et al., 2008). Uma análise global de transcrição génica por “microarray” mostrou que a sinergia por activação de diferentes receptores TLR aumenta principalmente a transcrição de genes de expressão tardia (com pico de transcrição às 8 h de estimulação) e que o aumento ocorre apenas para 1% dos transcritos induzidos por estimulação através de um único receptor (Napolitani et al., 2005). No entanto, entre esses contam-se diversas proteínas relevantes para a resposta imunitária. Em função dos ligandos usados, o efeito da sinergia pode resultar em fenótipos de células dendríticas com propriedades estimuladoras e polarizadoras de linfócitos T distintas (Bohnenkamp et al., 2007; Gerosa et al., 2008; Napolitani et al., 2005; Netea et al., 2005; Roses et al., 2008; Watanabe et al., 2004).

A formulação obtida no capítulo anterior baseada em fragmentos de membrana externa (OMF) compreende, pelo menos, um ligando TLR2 e um ligando TLR4. Estudos anteriores demonstraram que a estimulação simultânea de TLR4 e TLR2 resulta num aumentado sinérgico da produção de IL6 e IL-12p70 em células dendríticas derivadas de medula óssea de ratinho (Mitchell et al., 2010). Foi também descrita a ocorrência de activação sinérgica em macrófagos por estimulação conjunta com lipoproteína bacteriana e LPS (Liang et al., 2005). Outros componentes da parede bacteriana, incluindo flagelina (Ellis et al., 2010; Mizel &

Bates, 2010) e algumas porinas (Massari et al., 2002), exercem igualmente activação via PRR e poderão contribuir para o efeito adjuvante desta formulação.

O sistema de clonagem aqui proposto permite ainda a obtenção de OMV da bactéria hospedeira onde a OprI e os derivados de fusão se encontram inseridos. As estruturas observadas nos sedimentos obtidos a partir do meio de cultura apresentam morfologia e tamanho semelhantes ao observado noutros trabalhos em que se visualizaram OMV libertadas de *Escherichia coli* (Chen et al., 2010; Kesty & Kuehn, 2004). As OMV de bactérias Gram-negativas, preparadas por diferentes metodologias, têm-se revelado interessantes formulações vacinais, actualmente usadas clinicamente e em modelos experimentais contra doenças bacterianas (Holst et al., 2009; Keenan et al., 2003; Schild et al., 2009; Schild et al., 2008). Embora o potencial das OMV para indução heteróloga de imunidade esteja ainda pouco explorado, nos últimos anos têm sido reportadas algumas estratégias promissoras de localização de antígenos recombinantes no espaço periplásmico ou na membrana externa de bactérias Gram-negativas, visando a sua incorporação em OMV (Chen et al., 2010; Kesty & Kuehn, 2004; Schild et al., 2009; Schroeder & Aebischer, 2009). Kesty et al. (2004) demonstraram a possibilidade de incluir proteínas heterólogas em vesículas de *Escherichia coli* através da expressão, quer da proteína Ail, uma adesina da membrana externa de *Yersinia enterocolitica*, quer de um produto de fusão entre a sequência sinal Tat (do inglês “twin arginine transporter”) e a proteína verde fluorescente (GFP, do inglês “green fluorescent protein”). Neste último caso a sequência Tat permitiu o transporte de GFP para o periplasma pelo sistema de transporte Tat e a consequente inclusão da proteína fluorescente em OMV libertadas pela bactéria hospedeira. Recentemente, Schroeder e Aebischer (2009) desenvolveram vectores baseados na proteína AIDA (do inglês “adhesin involved in diffuse adhesion”) da membrana externa de *Escherichia coli* para localizar antígenos heterólogos na superfície de bactérias Gram-negativas e testaram a utilização de OMV recombinantes obtidas dessa forma para reforço vacinal de imunização com vacinas vivas recombinantes. A inoculação de ratinhos, por via subcutânea, com OMV preparadas a partir de *Escherichia coli* contendo um antígeno de *Leishmania* em fusão com AIDA após primovacinação por via oral com *Salmonella enterica* serovar Typhimurium SL3261 recombinante, modificada para expressar o mesmo antígeno à superfície, resultou num aumento muito marcado dos níveis de anticorpos específicos para o antígeno heterólogo. O aumento nos anticorpos ocorreu apenas para este antígeno e verificou-se tanto para IgG1 como para IgG2a.

Chen et al. (2010) utilizaram uma estratégia baseada na proteína ClyA, uma hemolisina bacteriana particularmente abundante em OMV, para ancorar antígenos heterólogos em vesículas de *Escherichia coli*. Utilizando GFP como antígeno modelo, demonstraram a

capacidade de induzir resposta humoral contra a proteína híbrida com níveis de IgG semelhantes aos obtidos por imunização com produto de fusão ClyA-GFP adsorvido a hidróxido de alumínio.

Nestes trabalhos não foi avaliada a capacidade de induzir respostas citotóxicas específicas por linfócitos T CD8⁺ contra os antígenos heterólogos veiculados nas vesículas recombinantes. Contudo, esta possibilidade foi demonstrada em ratinhos inoculados por via subcutânea e intramuscular com OMV de *Neisseria meningitidis* conjuntamente com o antígeno modelo OVA (Durand et al., 2009).

No desenvolvimento do novo sistema de clonagem e expressão baseado na lipoproteína OprI descrito no Capítulo 2 estabeleceram-se protocolos para obtenção de OprI e seus derivados de fusão sob três formulações distintas derivadas da parede celular bacteriana. Os antígenos heterólogos clonados no sistema e obtidos nestas formulações encontram aplicação em estudos de imunização experimental, mas podem igualmente ser úteis ao estudo dos mecanismos básicos que governam as interações entre imunidade inata e adquirida. Esta segunda parte do trabalho tem assim como objectivo iniciar o estudo da caracterização das propriedades imunomoduladoras das três formulações imunogénicas propostas no capítulo anterior. Pretende-se, numa primeira fase, clonar antígenos modelo para uso nos ensaios de imunização e estimulação aqui desenvolvidos, mas que sirvam também futuras aplicações do sistema. Numa segunda fase, inicia-se uma avaliação preliminar das propriedades adjuvantes das três formulações, através de um ensaio de imunização em modelo murino, e avalia-se, *in vitro*, as suas propriedades estimuladoras de células dendríticas.

3.2 Materiais e métodos

3.2.1 Clonagem de sequências dos antígenos modelo OVA e EGFP

3.2.1.1 Oligonucleótidos iniciadores para amplificação por PCR

Para a clonagem de dois antígenos modelo, OVA e a proteína verde fluorescente melhorada (EGFP, do inglês “enhanced green fluorescent protein”), utilizaram-se os seguintes oligonucleótidos iniciadores:

OVA_{EcoF} 5' ggaattccGGCTCCATCGGCGC 3'

OVA_{XhoR} 5' ccctcgagAGGGGAAACACATCTGCCA 3'

OVA_{EcoF} 5' ggaattccGTGCTGTTGCCTGATGAAGTC 3'

OVA_{XhoR} 5' ccctcgagGAATGGATGGTCAGCCCTAA 3'

OVA_{pEcoF} 5' ggaattccGAGCAAGAAAGCAAACCTGTG 3'

GFP113*EcoF* 5' ggaattccGTGAGCAAGGGCGAGGAG 3'

GFP113*XhoR* 5' ccctcgagTCCGGACTTGTACAGCTCGT 3'

As modificações nas extremidades 5' dos iniciadores estão em letra minúscula e os locais de restrição estão sublinhados. Os nucleótidos a 5' dos locais de restrição foram acrescentados para aumentar a eficiência da hidrólise. A síntese dos oligonucleótidos foi realizada por STAB VIDA, Portugal.

3.2.1.2 Clonagem

A amplificação de sequências de OVA foi feita por PCR a partir de cDNA obtido por transcrição reversa de RNA extraído de oviduto de galinha (*Gallus gallus domesticus*) em fase de postura. Após o abate, removeu-se o tracto reprodutor e recolheram-se amostras de cerca de 3 mm x 3 mm da região do istmo, local onde se encontrava um ovo em formação, e da região do magno, local onde se encontram as glândulas tubulares secretoras de OVA (Shepherd et al., 1980). Colocaram-se as amostras numa solução composta por igual volume de PBS e tampão de ligação do “kit” de extracção de RNA (“High Pure RNA Isolation Kit”, Roche). Macerou-se a amostra e agitou-se vigorosamente com auxílio de vortex. Centrifugou-se a suspensão a 16000 g durante 1 min e a partir do sobrenadante prosseguiu-se com o protocolo para extracção de RNA de acordo com as instruções do fabricante. No final, procedeu-se à retrotranscrição do RNA extraído utilizando o “1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)” (Roche). Resumidamente, ao RNA purificado adicionaram-se oligómeros de desoxitimidina [Oligo-p(dT)] e incubou-se a 65 °C durante 10 min. Arrefeceu-se a mistura e adicionou-se tampão de reacção, inibidor de RNase, dNTP, ditiotreitól e transcriptase reversa AMV, de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Incubou-se a 50 °C durante 30 min, procedeu-se à inactivação da enzima a 85 °C durante 5 min e arrefeceu-se a mistura em gelo. As amostras de cDNA assim obtidas foram testadas por PCR para determinar a presença da sequência de OVA utilizando os pares de iniciadores OVAt e OVAp. As condições de reacção foram aquelas descritas em 2.2.3 para PCR com *Taq* DNA polimerase, excepto o tempo de extensão que foi de 45 seg. As amostras com resultado positivo serviram de molde para amplificação das sequências de OVA a clonar. A sequência de EGFP foi amplificada a partir do plasmídeo pIC113. Utilizou-se a enzima “NZYDNACchange Polymerase” (NZYtech) e as condições de PCR descritas em 2.2.3 para esta enzima, com excepção do tempo de extensão que foi de 45 seg. Os pares de iniciadores usados foram os seguintes: OVAt*EcoF* e OVAt*XhoR*; OVAp*EcoF* e OVAp*XhoR*; GFP113*EcoF* e GFP113*XhoR*; OVAp*EcoF* e OVAt*XhoR*.

No final da reacção, purificaram-se os produtos de amplificação (“High Pure PCR Cleanup Micro Kit”, Roche) (ver 2.2.5) e procedeu-se à hidrólise de aproximadamente 0,3 a 1 µg com as endonucleases *EcoRI* e *XhoI* simultaneamente. Paralelamente, preparou-se o vector pOLT7 por hidrólise com as mesmas enzimas, tendo-se procedido à desfosforilação das extremidades por incubação com fosfatase alcalina antes da ligação entre os fragmentos amplificados e o vector. Estes procedimentos e a transformação de células competentes da estirpe DH5α decorreram de acordo com os protocolos descritos em 2.2.6, 2.2.7, 2.2.8.

3.2.1.3 Rastreo de clones recombinantes

As colónias de bactérias transformadas durante o processo de clonagem foram rastreadas por PCR (como descrito em 2.2.9) usando os iniciadores T7REV (ver 2.2.9) e OprISeqF (5' CTGCGCATGCTGGAAAAG 3'). Este último híbrida com uma sequência complementar de *oprI* a montante do local de clonagem múltipla e é estendido no sentido deste. As colónias correspondentes às amostras com resultados compatíveis com uma inserção correcta do fragmento foram então repicadas para meio LB líquido com canamicina, que se incubou durante 16 h a 37 °C num agitador orbital a 180 r.p.m. Após esse tempo os plasmídeos foram purificados como descrito em 2.2.11 e enviados para sequenciação após confirmação da presença do inserto por PCR com os oligonucleótidos utilizados na obtenção dos fragmentos a clonar e segundo as condições antes descritas em 2.2.3. A sequenciação de DNA para confirmação da sequência dos novos plasmídeos recombinantes foi realizada por STAB VIDA, Portugal, com os iniciadores T7REV e T7FOR e, por vezes, com o iniciador OprISeqF.

3.2.2 Expressão e purificação de antígenos de fusão

Nos procedimentos de manutenção dos plasmídeos utilizou-se a estirpe de *Escherichia coli* de não-expressão DH5α e para indução de expressão usou-se a estirpe Rosetta(DE3)pLysS. As condições de cultura foram as descritas em 2.2.10.

A preparação das três formulações recombinantes contendo a sequência parcial de OVA codificada pelo vector pOLT7-OVApx, ou seja, OprI-OVApx, OMF-OVApx e OMV-OVApx, foi realizada, respectivamente, por cromatografia de afinidade em condições desnaturantes após deslipidificação de membranas externas por TCA/acetona, por cromatografia de afinidade em condições nativas com PBS contendo OG e por ultracentrifugação do meio de cultura, como descrito em 2.2.19 e 2.2.14.

3.2.3 Electroforese em gel de poliacrilamida/SDS e “western blot”

A análise das amostras proteicas por SDS-PAGE e por “western blot” realizaram-se como descrito no capítulo anterior em 2.2.21, 2.2.22 e 2.2.24.

3.2.4 Quantificação de proteína, LPS e peptidoglicano

As quantificações de proteína, LPS e peptidoglicano nas formulações recombinantes realizaram-se pelos métodos de BCA, LAL e SLP, respectivamente, como descrito em 2.2.27, 2.2.28 e 2.2.29.

3.2.5 Imunização

Nos ensaios de imunização utilizaram-se ratinhos C57BL/6, machos, com 6 a 8 semanas, mantidos com luz e temperatura controladas e com alimento e água *ad libitum*, e manipulados de acordo com as normas nacionais e europeias de bem-estar animal. No ensaio preliminar para determinação de doses inocularam-se os animais por via subcutânea na região dorsal inter-escapular com PBS (controlo, 1 animal), OVA nativa (“Albumin from chicken egg white, Grade VII”, Sigma) (6 µg, 2 animais), OprI-OVApx e OMF-OVApx (0,06 µg, 0,6 µg e 6 µg de cada formulação, 2 animais por grupo), OMV-OVApx (0,6 µg, 6 µg e 60 µg de cada formulação, 2 animais por grupo) num volume de 140 µL de PBS. Realizaram-se duas inoculações com um intervalo de 10 dias e colheram-se amostras de sangue, por punção da veia da cauda, antes de cada inoculação e 7 dias após a segunda inoculação.

No ensaio subsequente, os animais foram inoculados aos dias 0, 15 e 29 pela mesma via com PBS (controlo, 250 µL, 2 animais), OVA nativa, OprI-OVApx, OMF-OVApx, OMV-OVApx (5 µg em 250 µL de PBS de cada formulação, 3 animais por grupo) e foram abatidos ao dia 36. Colheram-se amostras de sangue antes de cada inoculação e ainda no dia 22 (7 dias após a segunda inoculação) e no dia 36 (momento do abate, 7 dias após a terceira inoculação). Neste último dia, após o sacrifício dos animais, colheram-se também os baços para pesquisa de linfócitos CD8⁺ específicos para OVA (ver ponto 3.2.7).

Para obtenção do soro, as amostras de sangue foram deixadas a coagular à temperatura ambiente e colocadas posteriormente a 4 °C durante 16 h para retracção do coágulo. O soro foi então transferido para novos tubos e clarificado a 2700 g, durante 10 min a 4 °C e, no final, armazenado a -20 °C.

3.2.6 Determinação de níveis de IgG anti-OVA em soro de ratinho

Os níveis de anticorpos anti-OVA em soros de ratinhos imunizados foram determinados por ELISA (do inglês “enzyme-linked immunosorbent assay”). Revestiram-se os poços de microplacas (MaxiSorp, Nunc) com 50 µL de solução de OVA nativa (“Albumin from chicken egg white; Grade VII”, Sigma) a 10 µg/mL em PBS, durante a noite à temperatura ambiente. Após três lavagens com 300 µL de solução de lavagem [PBS com Tween-20 a 0,05% (v/v)] por poço, adicionaram-se 150 µL de tampão de bloqueio [PBS com BSA a 1% (p/v)] e incubou-se durante 1 h à temperatura ambiente. Após três lavagens adicionaram-se as amostras de soro diluídas (1:50 ou 1:100) em tampão de diluição (PBS com Tween-20 a 0,05% e BSA a 0,1%) num volume de 50 µL por poço e incubou-se durante 1 h à temperatura ambiente. Após três lavagens, adicionou-se a cada poço 50 µL de um dos seguintes anticorpos de cabra anti-ratinho conjugados com HRP: anti-IgG (específico da porção Fc) a 1:10000 (A2554, Sigma); anti-IgG1 (STAR132P, AbdSerotec) a 1:5000; anti-IgG2a (STAR133P, AbdSerotec) a 1:625; anti-IgG2b (STAR134P, AbdSerotec) a 1:625; anti-IgG3 (STAR136P, AbdSerotec) a 1:625. A diluição do anticorpo secundário anti-IgG1 e anti-IgG2a foi determinada com base num ensaio preliminar utilizando quantidades conhecidas de imunoglobulina alvo de forma a obter valores de D.O. idênticos para quantidades iguais. Após incubação com os anticorpos secundários, à temperatura ambiente durante 1 h, realizaram-se mais três lavagens e adicionaram-se 50 µL do substrato ABTS [ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico), do inglês “2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid”)] por poço. O desenvolvimento de cor foi determinado por leitura em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 405 nm durante 45 min com aproximadamente 5 min de intervalo. Realizaram-se também leituras a 650 nm cujos valores se subtraíram àqueles lidos a 405 nm de forma a corrigir variações originadas por imperfeições ópticas das placas.

3.2.7 Detecção de linfócitos CD8⁺ específicos de OVA₂₅₇₋₂₆₄ (epitopo SIINFEKL)

A detecção de linfócitos CD8⁺ específicos de OVA₂₅₇₋₂₆₄ (epitopo SIINFEKL) nos esplenócitos dos animais imunizados foi realizada por marcação com pentâmeros de moléculas MHC classe I. Nesta técnica são usadas estruturas compostas por cinco moléculas MHC classe I do haplotipo correspondente ao dos animais imunizados (neste caso, H-2K^b) ligadas a um epitopo MHC classe I (neste caso, o epitopo SIINFEKL de OVA, imunodominante em ratinhos do haplotipo H-2K^b) conjugadas com um fluorocromo. Paralelamente, as células são marcadas com um anticorpo anti-CD8 conjugado com

fluorocromo distinto, pretendendo-se, desta forma, detectar por citometria de fluxo linfócitos CD8⁺ que possuam TCR com afinidade para o complexo MHC classe I - péptido.

Após o sacrifício dos animais, retirou-se o baço para placa de Petri colocada sobre gelo e adicionou-se 5 mL de meio RPMI (do inglês “Roswell Park Memorial Institute”) completo [RPMI 1640 com L-glutamina 2 mM (Gibco), SFB a 10% (v/v), HEPES 20 mM, piruvato de sódio 1 mM, β-mercaptoetanol 50 μM, penicilina a 100 UI/mL e estreptomicina a 100 μg/mL]. Com a ajuda de rede de nylon e êmbolo de seringa, desintegrou-se o parênquima do órgão e homogeneizou-se a suspensão por pipetagem suave. Transferiu-se a suspensão para tubo de centrífuga e centrifugou-se a 300 g, durante 5 min. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento em 3 mL de solução de lise de eritrócitos (NH₄Cl 0,155 M, KHCO₃ 10 mM, EDTA 0,1 mM). Após incubação durante 3 min à temperatura ambiente no escuro, centrifugou-se novamente nas mesmas condições e ressuspendeu-se em 3 mL de RPMI completo. Procedeu-se à contagem e determinação da viabilidade celular por coloração com azul tripano e retirou-se uma alíquota correspondente a 2 x 10⁷ células para novo tubo. Centrifugou-se a 300 g, durante 5 min, descartou-se o sobrenadante na totalidade e ressuspendeu-se o sedimento em 180 μL de PBS com BSA a 0,5% (p/v) e EDTA 2 mM (solução MACS). Para depleção de linfócitos B por separação celular magnética (MACS, do inglês “magnetic-activated cell sorting”, Miltenyi Biotec) adicionaram-se 20 μL de nanopartículas magnéticas conjugadas com anticorpo anti-CD19, misturou-se e incubou-se durante 15 min a 4 °C. Lavaram-se as células por adição de 1,5 mL de solução MACS e centrifugação a 300 g durante 5 min. Aspirou-se o sobrenadante na totalidade e ressuspenderam-se as células em 500 μL de solução MACS. Prosseguiu-se com a separação, utilizando colunas LS e suporte MidiMACS (Miltenyi Biotec). Após equilíbrio da coluna, aplicou-se a amostra e recolheu-se o efluente. Para a recuperação dos esplenócitos depletados de células CD19⁺, adicionaram-se mais 3 mL de solução MACS à coluna, que se colheram e adicionaram ao efluente anterior. Centrifugou-se a amostra a 300 g, durante 5 min, ressuspendeu-se o sedimento em 1 mL de PBS contendo azida de sódio a 0,1% (p/v) e BSA a 0,1% (p/v) (solução FACS) e procedeu-se à contagem das células como anteriormente. Transferiu-se uma alíquota de 2 x 10⁶ células para microtubo e lavou-se adicionando 1 mL de solução FACS e centrifugando nas mesmas condições atrás descritas. Removeu-se o sobrenadante e após ressuspensão das células em 50 μL procedeu-se à marcação por adição de 10 μL de pentâmero de moléculas MHC classe I H-2K^b/SIINFEKL conjugado com R-ficoeritrina (R-PE, do inglês “R-phycoerythrin”). Misturou-se e incubou-se à temperatura ambiente durante 10 min no escuro. Para remoção dos pentâmeros que permanecessem livres, adicionou-se 1,7 mL de solução FACS e centrifugou-se a 400 g durante 5 min. Descartou-se o

sobrenadante e ao volume residual adicionou-se 1 μL de anticorpo de rato anti-CD8 de ratinho marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC, do inglês “fluorescein isothiocyanate”) (clone KT15, Proimmune) e 2,5 μL de anticorpo de rato anti-CD19 de ratinho marcado com ficoeritrina-cianina 5 (PE-Cy5, do inglês “phycoerythrin-cyanine 5”) (clone 6D5, Proimmune). Incubou-se durante 20 min em gelo no escuro, após o que se procedeu a duas lavagens com 1,7 mL de solução FACS, como anteriormente descrito. Aspirou-se o sobrenadante na totalidade e ressuspendeu-se em 50 μL de solução de FACS a que se juntou 400 μL de solução de fixação [PBS com SFB a 1% (v/v) e formaldeído a 2,5% (v/v)]. Por fim, misturou-se com auxílio de vortex e armazenou-se a 4 °C até análise por citometria de fluxo. A análise foi efectuada em citómetro FACScalibur (Becton Dickinson, Palo Alto).

3.2.8 Diferenciação e cultura de células dendríticas derivadas da medula óssea de ratinho

A diferenciação de células dendríticas de ratinho foi realizada a partir de células da medula óssea obtidas a partir de fêmures e tíbias de ratinhos CD1 com 6 semanas. Após remoção do tecido muscular, submergiram-se os ossos em etanol a 70% (v/v) durante 3 min e lavaram-se com PBS. Em placas de Petri colocadas em gelo, cortaram-se as extremidades dos ossos e removeram-se as células da medula por lavagem com RPMI completo com auxílio de seringa e agulha de 25 gauge. Dispersaram-se as células por pipetagem sucessiva e transferiram-se para tubo de centrífuga de 15 mL. Após sedimentação dos detritos ósseos e musculares decantou-se a suspensão celular para novo tubo e centrifugou-se a 300 g durante 10 min a 4 °C. Ressuspendeu-se o sedimento em 5 mL de RPMI completo, procedeu-se à contagem e avaliação de viabilidade celular por coloração com corante vital de azul tripano, ajustou-se a concentração a 2×10^5 células/mL e adicionou-se GM-CSF (do inglês “granulocyte-macrophage colony-stimulating factor”) (Peprotech) para uma concentração final de 20 ng/mL. Distribuiu-se a suspensão celular por placas de Petri de 100 mm de diâmetro (10 mL por placa) e incubou-se a 37 °C em estufa de CO₂. Ao dia 3 adicionou-se 10 mL de RPMI completo com GM-CSF (20 ng/mL). Aos dias 6 e 8 substituiu-se 10 mL de meio de cultura, colhendo e centrifugando (300 g, 8 min) 10 mL de meio e ressuspendendo o sedimento em meio fresco com GM-CSF. Ao dia 10 colheram-se as células não-aderentes e sedimentaram-se a 300 g durante 5 min a 4 °C. Ressuspendeu-se o sedimento em RPMI completo, ajustou-se a concentração a $0,5 \times 10^6$ células/mL e distribuiu-se em microplacas de 24 ou 96 poços.

3.2.9 Estimulação *in vitro* de células dendríticas

Para a estimulação *in vitro* de células dendríticas derivadas de medula óssea de ratinho utilizaram-se as três formulações base, OprI, OMF e OMV, obtidas de acordo com os protocolos descritos no capítulo anterior. Como controlo positivo utilizou-se LPS (Sigma) e como inibidor do efeito do LPS utilizou-se polimixina B (Sigma) a 15 µg/mL.

As células obtidas como se descreve no ponto anterior e semeadas em placas de 24 ou 96 poços a uma concentração de $0,5 \times 10^6$ células/mL em 1 mL ou 100 µL, respectivamente, foram estimuladas com as formulações ou reagentes atrás descritos durante 24 h a 37 °C em estufa de CO₂. Ao fim desse tempo, colheram-se os sobrenadantes que se clarificaram por centrifugação e armazenaram a -80 °C até posterior utilização.

3.2.10 ELISA para detecção de citocinas em sobrenadantes de culturas estimuladas

A detecção de citocinas em sobrenadantes de culturas de células dendríticas estimuladas *in vitro* foi realizada por ELISA (“Elisa development kits”, Peprotech EC) de acordo com as instruções do fabricante, com ligeiras alterações. Diluíram-se os respectivos anticorpos de captura em PBS para uma concentração de 1 µg/mL e adicionaram-se 50 µL a cada poço de placas de ELISA de 96 poços (MaxiSorp, Nunc) que se incubaram durante a noite à temperatura ambiente. Lavaram-se os poços 3 vezes com 300 µL de tampão de lavagem [PBS com Tween-20 a 0,05% (v/v)] por poço, adicionaram-se 150 µL de tampão de bloqueio [PBS com BSA a 1% (p/v)] e deixou-se a bloquear durante pelo menos 1 h à temperatura ambiente. Após três lavagens com tampão de lavagem, adicionaram-se 50 µL de diluições seriadas da citocina padrão e das amostras e incubou-se durante 2 h à temperatura ambiente. Lavaram-se novamente os poços três vezes com tampão de lavagem, adicionaram-se 50 µL do anticorpo de detecção na concentração indicada pelo fabricante e incubou-se durante 2 h à temperatura ambiente. Após três lavagens realizadas como descrito anteriormente, adicionaram-se 50 µL do conjugado avidina-HRP, na concentração indicada, e incubou-se durante 30 min à temperatura ambiente. Por fim, após três novas lavagens, adicionou-se o substrato ABTS e incubou-se à temperatura ambiente avaliando-se periodicamente o desenvolvimento de cor por espectrofotometria a 405 nm e corrigindo o valor das leituras por subtração daquelas obtidas a 650 nm.

3.2.11 Imunodeteção de um painel de mediadores de resposta imunitária em membrana de nitrocelulose (“array”)

A determinação do perfil de activação de células dendríticas em resposta a cada uma das três formulações foi realizada por “array” em membrana de nitrocelulose (“Proteome Profiler Antibody Array, Mouse Cytokine Array Panel A, ARY006”, R&D). Nesta técnica são utilizadas membranas em que foram depositados, em duplicado, anticorpos de captura para 40 mediadores de resposta imunitária. As amostras são incubadas com uma mistura de anticorpos de detecção biotinilados e aplicadas de seguida sobre as membranas. Após a lavagem dos complexos não ligados a detecção é feita por quimioluminescência depois de adicionada estreptavidina-HRP. O sinal é então registado em película de auto-radiografia.

Resumidamente, prepararam-se as amostras adicionando às soluções de diluição fornecidas pelo fabricante 100 µL de uma mistura de sobrenadantes de estimulação de culturas de células dendríticas de 5 ratinhos (20 µL de cada sobrenadante). Adicionou-se a cada amostra 15 µL da mistura de anticorpos de detecção fornecida no “kit” e incubou-se à temperatura ambiente durante 1 h. Findo esse tempo, aplicaram-se as misturas sobre as membranas previamente bloqueadas durante 1 h à temperatura ambiente em 2 mL da solução de bloqueio. Após incubação a 4 °C durante 16 h, as membranas foram lavadas 3 vezes durante 10 min com 20 mL de tampão de lavagem. Cobriram-se então com 1,5 mL de uma solução com estreptavidina-HRP diluída nas condições indicadas e incubou-se durante 30 min à temperatura ambiente. Após três lavagens com idêntica solução, incubaram-se as membranas com substrato quimioluminescente e detectou-se o sinal com filme “Amersham Hyperfilm ECL film” (GE Healthcare). No registo dos resultados utilizaram-se, sequencialmente, dois substratos de quimioluminescência, “Pico” e “Femto”, com níveis distintos de detecção (“SuperSignal Chemiluminescent Substrates”, Pierce) e variou-se o tempo de exposição de forma a explorar a sensibilidade do sistema. As películas foram digitalizadas em modo de transmissão e as densidades de píxeis de cada duplicado e do fundo foram determinadas recorrendo ao programa informático “ImageJ” (Abràmoff et al., 2004). Após subtracção do valor de fundo de cada membrana, normalizaram-se os valores de cada citocina/quimiocina em relação aos valores médios obtidos para os controlos positivos de cada membrana.

3.3 Resultados

3.3.1 Clonagem, obtenção e caracterização de OVA e EGFP

3.3.1.1 Clonagem de sequências de OVA e EGFP em pOLT7

Com o objectivo de obter ferramentas moleculares a serem usadas em ensaios de caracterização das propriedades imunomoduladoras das diferentes formulações obtidas com o novo sistema, clonaram-se sequências de dois antigénios modelo, OVA e EGFP, no vector pOLT7. Em ambos os casos desenharam-se iniciadores para amplificação por PCR da sequência codificadora completa das proteínas, excluindo os códons de iniciação e terminação. Modificaram-se as extremidades 5' dos iniciadores esquerdos e direitos para que contivessem, respectivamente, locais de restrição *EcoRI* e *XhoI* (iniciadores OVA*tEcoF*, OVA*tXhoR*, GFP113*EcoF*, GFP113*XhoR*), pretendendo, desta forma, inserir as sequências heterólogas no LCM de pOLT7. Desenharam-se ainda os iniciadores OVA*pEcoF* e OVA*pXhoR* para amplificar uma sequência parcial de OVA, a que se designou OVA*p*, que incluiria as sequências codificadoras dos epitopos dominantes MHC classe I e classe II no haplotipo H2-K^b de ratinho (estirpe C57BL/6). As sequências de OVA foram amplificadas por RT-PCR directamente a partir de RNA extraído de fragmentos de oviduto colhidos de uma galinha em fase de postura e a sequência de EGFP foi amplificada a partir do plasmídeo pIC113.

Para confirmar a presença da sequência correspondente a OVA nas diferentes amostras de tecido colhidas do oviduto, procedeu-se à amplificação por PCR do cDNA, após retrotranscrição do RNA extraído, utilizando os pares de iniciadores OVA*tEcoF*/OVA*tXhoR* OVA*pEcoF*/OVA*pXhoR*. A amplificação não ocorreu a partir das amostras colhidas da região do istmo mas sim do magno (Figura 17), região maioritariamente composta pelas glândulas tubulares que segregam OVA (Shepherd et al., 1980). A amostra colhida de uma zona do magno próxima do infundíbulo (Magno 3, na Figura 17) originou amplificação específica apenas com os iniciadores OVA*p* e com menor expressão do que as amostras colhidas na região mais central (Figura 17). Com base nos resultados obtidos optou-se por utilizar a amostra de cDNA correspondente à amostra colhida da região do magno mais próxima do istmo (Magno 1, Figura 17) como molde da amplificação para a clonagem de sequências de OVA. Utilizando enzima DNA polimerase com actividade de edição obtiveram-se então os fragmentos OVA*t* e OVA*p* a partir daquela amostra de cDNA e o fragmento de EGFP a partir do plasmídeo pIC113 (Figura 18a). Após ligação dos fragmentos de DNA com o vector pOLT7 linearizado em *EcoRI*-*XhoI* e transformação de células competentes *Escherichia coli* DH5 α , realizou-se o rastreio dos clones por “colony PCR” utilizando os iniciadores T7REV e

OprISeqF (Figura 18b). Extraíram-se os plasmídeos dos clones positivos e confirmou-se a presença do inserto por PCR (Figura 18c).

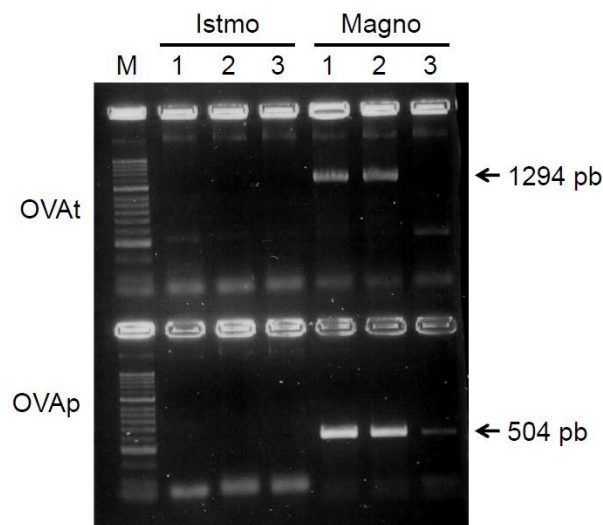


Figura 17 – As reacções de PCR com os iniciadores OVAt e OVAp originaram amplificação específica a partir do cDNA de amostras colhidas da região do magno do oviduto de uma galinha em fase de postura.

A confirmação da presença da sequência correspondente a OVA nas amostras de cDNA obtidas das diferentes amostras de tecido colhidas do oviduto de uma galinha em fase de postura foi realizada por PCR, utilizando os pares de iniciadores OVAt (metade superior do gel) e OVAp (metade inferior do gel). Não se observou amplificação específica (1294 pb ou 504 pb no caso dos iniciadores OVAt e OVAp, respectivamente) das amostras colhidas da região do istmo (Istmo 1, 2, 3), mas esta ocorreu a partir de duas (iniciadores OVAt) ou três (iniciadores OVAp) amostras colhidas da região do magno (Magno 1, 2, 3). O marcador de massa molecular utilizado foi o “HyperLadder II”, Bioline, e está assinalado por M.

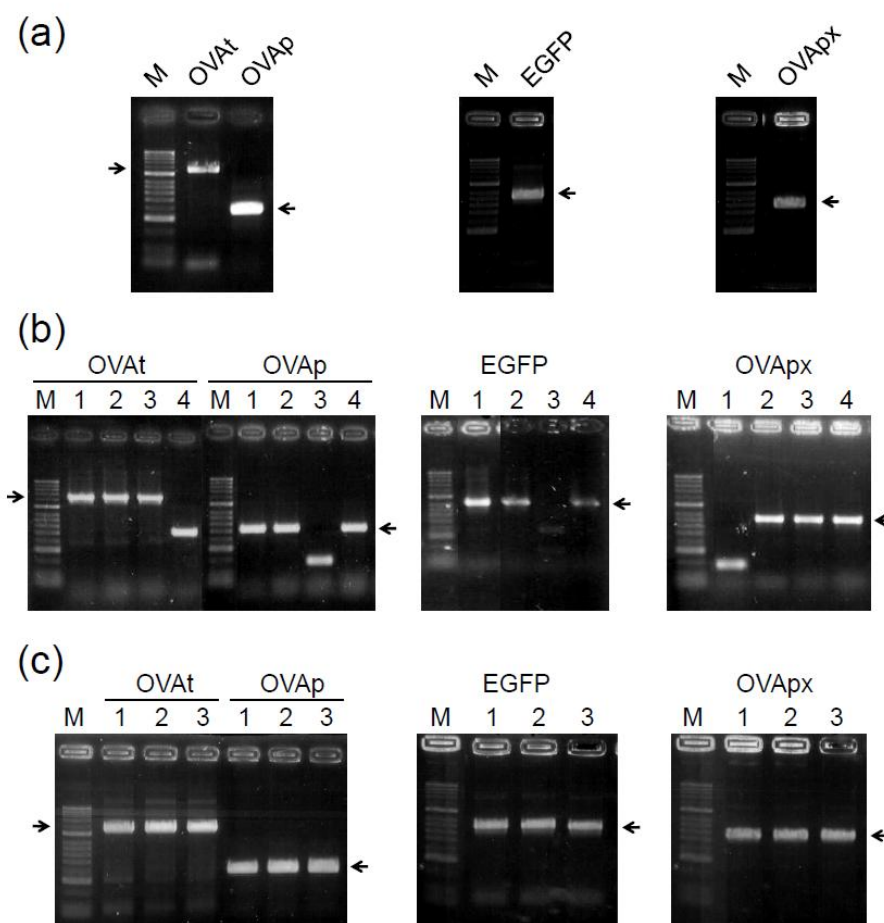


Figura 18 – Análise em géis de agarose a 2% (p/v) dos produtos de amplificação originados por PCR nos diferentes passos de clonagem para obtenção dos plasmídeos pOLT7-OVAt, pOLT7-OVAp, pOLT7-EGFP e pOLT7-OVApX.

(a) Reacções de PCR realizadas com o intuito de obter os fragmentos de sequências nucleotídicas de OVA e EGFP a clonar em pOLT7 utilizando os pares de iniciadores OVAt*EcoF* e OVAt*XhoR*, OVAp*EcoF* e OVAp*XhoR*, EGFP*EcoF* e EGFP*XhoR*, OVApX*EcoF* e OVAt*XhoR*. Os produtos de amplificação serviram para a construção de pOLT7-OVAt, pOLT7-OVAp, pOLT7-EGFP e pOLT7-OVApX, respectivamente. (b) A identificação de plasmídeos recombinantes foi realizada por “colony PCR” com os iniciadores OprISEQF e T7REV. Mostra-se, como exemplo, o resultado observado para 4 colónias de cada clonagem, em que 3 revelam amplificação compatível com uma clonagem correcta. (c) Antes de avaliar, por sequenciação, a construção correcta dos plasmídeos, confirmou-se a presença dos insertos nos plasmídeos recombinantes por amplificação por PCR com os mesmos iniciadores usados na obtenção dos fragmentos a clonar. Nas figuras, OVAt, OVAp, EGFP e OVApX indicam as reacções correspondentes à construção dos plasmídeos pOLT7-OVAt, pOLT7-OVAp, pOLT7-EGFP e pOLT7-OVApX, respectivamente, e as setas indicam o tamanho esperado dos fragmentos de amplificação específica em cada uma das reacções. O marcador de massa molecular “HyperLadder II”, Bioline, está assinalado por M.

Os plasmídeos recombinantes obtidos foram sequenciados, tendo-se confirmado a clonagem das três sequências na correcta grelha de leitura e a ausência de erros. As sequências aminoacídicas deduzidas das sequências nucleotídicas obtidas por sequenciação são apresentadas nas Figuras 19, 20 e 21. Indicam-se a sublinhado os epitopos de OVA dominantes em MHC classe I, SIINFEKL, e classe II, ISQAVHAAHAEINEAGR, em ratinhos do haplotipo H-2K^b (e.g. estirpe C57BL/6), e o epitopo de EGFP, HYLSTQSAL, dominante em MHC classe I em ratinhos do haplotipo H-2K^d (e.g. estirpe BALB/c) (Gambotto et al., 2000).

1 **MASMTGGQOMGRGS**NNVLKFSALALAAVLATGCSSHSKETEARLTATEDAAARAQARADE

61 AYRKADEALGAAQKAQQTADAEANERALRMLEKASRKDPNS**GSIGAASMEFCFDVFKELKV**

121 **HHANENIFYCPIAIMSALAMVYLGAKDSTRTQ**INKVVRFDKLPFGGDSIEAQCGTSVNVH

181 **SSLRDILNQITKPNDVYSFSLASRLYAEERYPILPEYLQCVKELYRGGLEPINFQTAADQ**

241 **ARELINSWVESQXNGIIRNVLQPSSVDSQTAXVLVNAIVFKGLWEKAFKDEDTQAMPFRV**

301 **TEQESKPVQMMYQIGLFRVASMASEKMKILELFPASGTMSMLVLLPDEVSGLEQLES**IIN

361 **FEKL**TewTSSNVMEERKIKVYFPRMKMEEKYNLTSVLMAMGITDVFSSANLSGISSAES

421 **LKISQAVHAAHAEINEAGRE**VVGSAAEAGVDAASVSEEFRADHPFLFCIKHIATNAVLFFG

481 **RCVSPLEHHHHHH-**

Figura 19 – Sequência aminoacídica teórica da prolipoproteína de fusão OprI-OVAt codificada no vector pOLT7-OVAt.

Apresenta-se a sequência *oprI* em itálico, a sequência de OVA em itálico e cheio, o péptido-sinal a sublinhado pontilhado e as “tags” T7 e 6xHis a cheio. Indicam-se a sublinhado os epitopos de OVA, SIINFEKL e ISQAVHAAHAEINEAGR, dominantes em MHC classe I e classe II, respectivamente, em ratinhos do haplotipo H-2K^b (e.g. estirpe C57BL/6).

1 **MASMTGGQQMGRGS**NNVLKFSALALAAVLATGCSSHSKETEARLTATEDAAARAQARADE

61 AYRKADEALGAAQKAQQTADAEANERALRMLEKASRKDPNS **VLLPDEVSGLEQLES**IINFE

121 **KLTEWTS**SNVMEERKIKVYFPRMKMEEKYNLTSVLMAMGITDVFSSANLSGISSAESLK

181 **ISQAVHAAHAE**INEAGREVVGSAEAGVDAASVSEEFRADHPFLEHHHHHHH-

Figura 20 – Sequência aminoacídica teórica da prolipoproteína de fusão OprI-OVAp codificada no vector pOLT7-OVAp.

As diferentes regiões estão assinaladas de forma idêntica ao apresentado na Figura 19.

1 **MASMTGGQQMGRGS**NNVLKFSALALAAVLATGCSSHSKETEARLTATEDAAARAQARADE

61 AYRKADEALGAAQKAQQTADAEANERALRMLEKASRKDPNS **VSKGEELFTGVVP**ILVELDG

121 **DVNGHKFSVSGEGEGDATY**GKLTLLKFICTTGKLPVPWPTLVTTTLTYGVQCFSRYPDHMKQ

181 **HDFFKSAMPEGYVQERTI**FFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHK

241 **LEYNYN**SHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSQLADHYQONTPIGDGPVLLPDNHY

301 **LSTQ**SALSKDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELYKSGLEHHHHHHH-

Figura 21 – Sequência aminoacídica teórica da prolipoproteína de fusão OprI-EGFP codificada no vector pOLT7-EGFP.

A região correspondente a EGFP está grafada em itálico e cheio e o epitopo de EGFP (HYLSTQSAL) dominante em MHC classe I em ratinhos do haplotipo H-2K^d (e.g. estirpe BALB/c) encontra-se sublinhado. As restantes regiões estão assinaladas de forma idêntica ao apresentado na Figura 19.

Nesta fase, tendo em vista os ensaios de caracterização das propriedades adjuvantes das formulações imunogénicas propostas no presente trabalho, pretendia-se prosseguir com a expressão da sequência parcial de OVA, OVAp, em detrimento da sequência completa OVAt, por se prever que, em virtude do seu menor tamanho, aquela seria expressa e purificada com maior facilidade. A sequência continha os dois epitopos de OVA restritos a MHC classe I e II

dominantes na estirpe de ratinhos a ser usada nos ensaios de imunização fazendo-nos admitir que seria suficiente para o desencadeamento de resposta específica anti-OVA. Contudo, foi publicado nessa altura um trabalho em que se demonstrava a necessidade de as regiões flanqueadoras dos epitopos MHC classe I possuírem um tamanho mínimo, então determinado, de modo a garantir a sua eficiente apresentação cruzada (Ma et al., 2009). Para prevenir uma possível diminuição da apresentação antigénica cruzada nos ensaios *in vivo*, decidiu-se, então, clonar nova sequência parcial de OVA, na qual se incluíam regiões flanqueadoras dos epitopos dominantes de maior extensão, tendo por base os resultados do referido estudo.

Desenhou-se novo iniciador esquerdo (OVAp_xEcoF) que se conjugou com o iniciador direito OVA_tXhoR para amplificar a nova sequência parcial de OVA, designada OVA_p_x, a partir de cDNA de oviduto de galinha e de forma a cloná-la em pOLT7 em EcoRI–XhoI. A amplificação originou um produto do tamanho esperado (Figura 18a) e, após ligação com o vector e transformação de células competentes, detectaram-se diversas colónias positivas num primeiro rastreio (Figura 18b). Por PCR confirmou-se a presença do inserto em 3 plasmídeos extraídos dessas colónias (Figura 18c) e a sequenciação demonstrou a obtenção do plasmídeo pOLT7-OVA_p_x. A sequência aminoacídica teórica do produto expresso por este plasmídeo inclui 55 resíduos de aminoácidos de OVA a montante do epitopo SIINFEKL e estende-se até ao final da sequência de OVA (Figura 22).

```

1  MASMTGGQQMGRGSNNNVLKFSALALAAVLATGCSSHSKETEARLTATEDAAARAQARADE
61  AYRKADEALGAAQKAQQTADANERALRMLEKASRKDPNSEQESKPVQMMYQIGLFRVAS
121 MASEKMKILELPFASGTMSMLVLLPDEVSGLEQLESSIINFEKLTEWTSSNVMEERKIKVY
181 LPRMKMEEKYNLTSVLMAMGITDVFSSANLSGISSAESLKISQAVHAAHAEINEAGREV
241 VGSAEAGVDAASVSEEFRADHPFLFCIKHIATNAVLFFGRCVSPLEHHHHHH-
    
```

Figura 22 – Sequência aminoacídica teórica da prolipoproteína de fusão OprI-OVA_p_x codificada no vector pOLT7-OVA_p_x.

As diferentes regiões estão assinaladas de forma idêntica ao apresentado na Figura 19.

Na Tabela 4 apresentam-se algumas características dos vectores e das proteínas de fusão que resultam da expressão a partir dos vectores recombinantes obtidos.

Tabela 4 – Plasmídeos recombinantes com sequências dos antígenos modelo OVA e EGFP

Plasmídeos recombinantes (pb) ^a	Proteína imatura			Proteína madura		
	Nº de a.a. ^b	Massa molecular (Dalton)	Nº de a.a. ^b	Massa molecular (Dalton)		
				Sem lipidação ^c	Com lipidação ^d	
pOLT7-OVA _{t(2-386)}	1482	493	461	51 183,5	51972,8	
pOLT7-OVA _{p(244-365)}	692	230	198	21746,0	22535,3	
pOLT7-OVA _{pX(203-386)}	879	292	260	28652,4	29441,7	
pOLT7-EGFP ₍₂₋₂₄₁₎	1047	348	316	35363,5	36152,8	

^a Nº de pares de bases da região de expressão

^b Nº de resíduos de aminoácidos

^c Sequência aminoacídica da região madura sem modificação lipídica

^d Lipoproteína madura triacilada com resíduos de ácido palmítico

3.3.1.2 Expressão de OVA_{pX} e EGFP em fusão com OprI

Uma vez obtidos os plasmídeos com as sequências heterólogas de OVA e EGFP e confirmada a sua sequência, procedeu-se à transferência dos plasmídeos pOLT7-OVA_{pX} e pOLT7-EGFP para a estirpe de expressão Rosetta(DE3)pLysS e à indução da sua expressão. As fracções de membrana externa foram analisadas por SDS-PAGE, tendo-se observado, em ambos os casos, uma banda principal de massa molecular aparente compreendida entre 31 e 45 kDa, que, de acordo com o resultado obtido no Capítulo 2, corresponderá a OmpF (Figura 23a). No extracto de membrana externa obtido a partir das células transformadas com pOLT7-OVA_{pX} eram também visíveis outras duas bandas de mobilidade electroforética ligeiramente superior. Por “western blot” utilizando o anticorpo QB2, confirmou-se, em ambos os casos, a presença de proteínas de fusão na membrana externa com a mobilidade esperada (Figura 23a).

Para confirmar que a sequência das proteínas expressas se prolongava até à cauda de histidinas C-terminal e, simultaneamente, verificar a possibilidade de purificar os produtos expressos por cromatografia de afinidade com iões metálicos, procedeu-se à separação das proteínas por este método, em pequena escala e em condições desnaturantes, após deslipidação das membranas externas por tratamento com TCA/acetona. Desta forma, obtiveram-se eluatos de cromatografia que por SDS-PAGE apresentaram bandas com a mobilidade esperada e que marcaram com o anticorpo QB2 (anti-OprI) em “western blot” (Figura 23b).

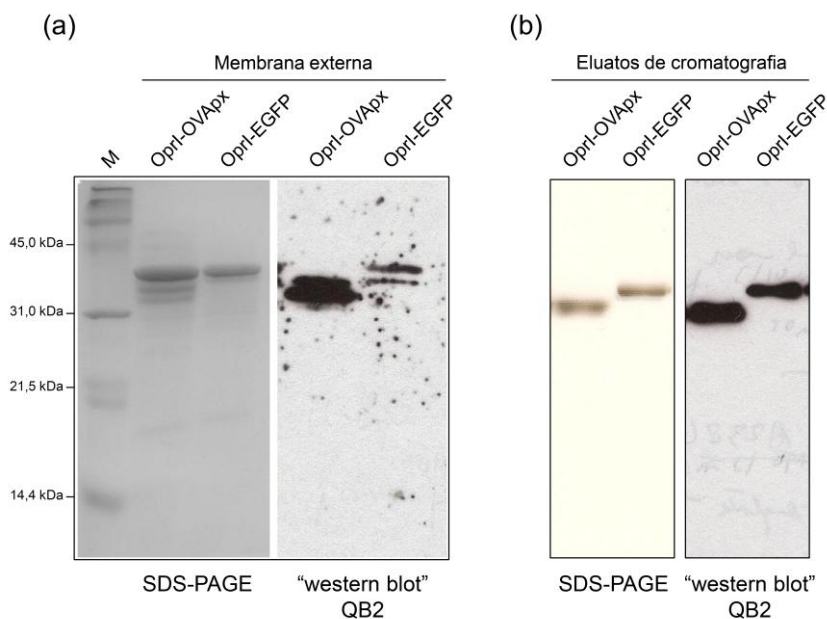


Figura 23 – Análise da presença dos produtos de fusão OprI-OVApx e OprI-EGFP expressos a partir de pOLT7-OVApx e pOLT7-EGFP, respectivamente, em extractos de membrana externa e em eluatos de cromatografia de afinidade.

(a) Avaliaram-se por SDS-PAGE e “western blot”, com o anticorpo anti-OprI QB2, os extractos de membrana externa de células de *Escherichia coli* da estirpe Rosetta(DE3)pLysS transformadas com os vectores pOLT7-OVApx e pOLT7-EGFP e induzidas durante 3 h com IPTG 1 mM. (b) Eluatos de cromatografia de afinidade obtidos em condições desnaturantes a partir desses extractos utilizando minicolumnas “His SpinTrap”. Os resultados demonstram a presença dos produtos de fusão OprI-OVApx e OprI-EGFP.

3.3.1.3 Obtenção das formulações OprI-OVApx, OMF-OVApx e OMV-OVApx e determinação do seu conteúdo em LPS e peptidoglicano

Para a caracterização das propriedades imunomoduladoras das três formulações imunogênicas propostas elegeu-se a OVA como antígeno modelo por existirem comercialmente ferramentas moleculares que permitiriam a avaliação da indução *in vivo* de resposta humoral e de respostas por linfócitos T. Pelas razões antes enunciadas, optou-se pelo plasmídeo pOLT7-OVApx para expressão do produto de fusão OprI-antígeno modelo e sua obtenção nas três formulações imunogênicas. Para o efeito, transferiu-se o plasmídeo para células de *Escherichia coli* da estirpe Rosetta(DE3)pLysS e procedeu-se à indução da sua expressão. Utilizaram-se os protocolos descritos em 2.2.14 e 2.2.19 para preparação das três formulações contendo OprI-OVApx (Figura 24).

A determinação do conteúdo de endotoxina e peptidoglicano nas três formulações pelos métodos de LAL e SLP, respectivamente, revelou valores próximos daqueles obtidos anteriormente para as três formulações sem antígeno de fusão: 0,11, 3,06 e 14226,39 EU/ μ g para OprI-OVApx, OMF-OVApx e OMV-OVApx, respectivamente, e apenas vestígios de peptidoglicano na formulação OMV-OVApx.

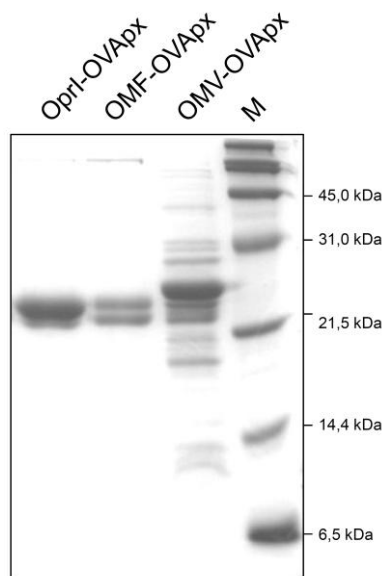


Figura 24 – Obtenção das três formulações, OprI-OVApx, OMF-OVApx e OMV-OVApx, utilizando o plasmídeo pOLT7-OVApx para expressão da proteína de fusão.

Transformaram-se células de *Escherichia coli* da estirpe Rosetta(DE3)pLysS com o plasmídeo pOLT7-OVApx e, após indução da expressão durante 3 h a 37 °C com IPTG 1 mM, prepararam-se as três formulações, OprI-OVApx, OMF-OVApx e OMV-OVApx, seguindo os protocolos estabelecidos como se descreve no Capítulo 2.

3.3.2 Ensaio preliminar de imunização

Com o intuito de determinar a dose de cada formulação a inocular por animal para a realização de um primeiro ensaio de caracterização da capacidade adjuvante de cada uma das formulações, inocularam-se ratinhos com as seguintes doses de proteína total num volume de 140 μ L: 0,06 μ g, 0,6 μ g e 6 μ g de OprI-OVApx e OMF-OVApx e 0,6 μ g, 6 μ g e 60 μ g de OMV-OVApx (2 animais por dose). Optou-se por inocular um leque de doses distinto no caso das OMV por nessa formulação, de acordo com o observado em géis de SDS-PAGE e ensaios de “western blot”, o antígeno se encontrar representado numa proporção muito menor relativamente à quantidade total de proteína. Inocularam-se ainda dois animais com OVA

nativa e um animal com PBS. A via de inoculação escolhida foi a via subcutânea por se adequar melhor a futuros protocolos de imunização experimental. Realizaram-se duas inoculações com um intervalo de 10 dias e testaram-se os soros colhidos 7 dias após a segunda inoculação por ELISA em placas revestidas com OVA nativa para determinação de IgG total específica. Embora com níveis diferentes, os animais inoculados com 6 µg de OprI-OVAp_x e OMF-OVAp_x revelaram resposta. Nos animais inoculados com doses menores não se observaram níveis de resposta inequivocamente distintos dos controlos. Nos animais inoculados com OMV-OVAp_x só aqueles inoculados com 60 µg responderam claramente, tendo, contudo, revelado resposta inflamatória no local de inoculação. Todavia, uma segunda avaliação de um dos animais inicialmente inoculados com 6 µg de OMV, realizada 15 dias mais tarde, demonstrou a presença de IgG específica, sugerindo não ser necessária a dose de 60 µg para a realização do ensaio posterior.

Este ensaio demonstrou que a via subcutânea seria adequada para a realização do ensaio *in vivo* e que a dose a utilizar se situaria na ordem de grandeza de 6 µg.

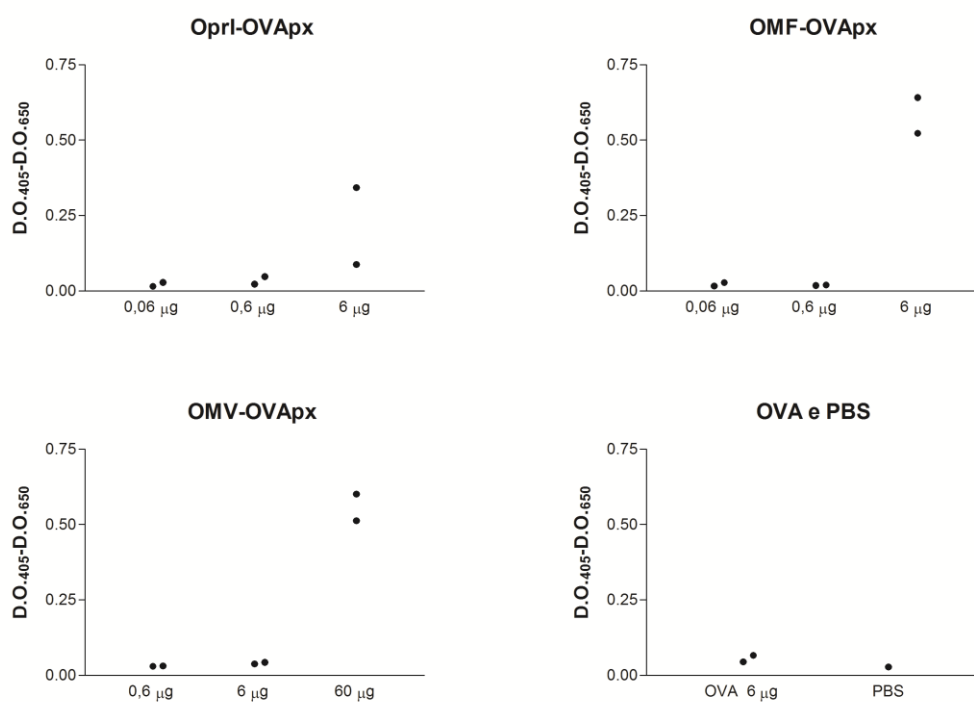


Figura 25 – Avaliação por ELISA de níveis de IgG em animais imunizados com as três formulações contendo OVAp_x para determinação de doses a inocular no ensaio de imunização.

Inocularam-se, duas vezes com intervalo de 10 dias, grupos de dois animais com diferentes doses (indicadas na figura) de OprI-OVAp_x, OMF-OVAp_x, OMV-OVAp_x e OVA e um animal controlo com PBS. Os soros colhidos 7 dias após a segunda inoculação foram testados por ELISA em placas revestidas com OVA nativa para determinação de níveis de IgG específica.

3.3.3 Ensaio de imunização

Para a caracterização das propriedades adjuvantes intrínsecas a cada uma das três formulações propostas, inocularam-se, por via subcutânea, grupos de três animais com 5 µg de OprI-OVApx, OMF-OVApx e OMV-OVApx. Inocularam-se igualmente três animais com a mesma quantidade de OVA nativa e ainda dois animais com PBS, o veículo usado em todos os inóculos. O protocolo de imunização consistiu em três inoculações, aos dias 0, 15 e 29, e os animais foram sacrificados ao dia 36. A fim de avaliar a cinética da resposta humoral, por determinação de IgG total específica, colheram-se amostras de sangue antes de cada inoculação e também 7 dias após o primeiro reforço (dia 22) e 7 dias após o segundo reforço (dia 36) no momento do abate. O sangue colhido no dia 36 serviu ainda para determinação de subclasses de IgG de forma a obter informação sobre o perfil de resposta induzido por cada formulação. Por fim, pretendeu-se avaliar a indução de linfócitos CD8⁺ específicos para OVA no final do protocolo de imunização, tendo para tal sido colhidos os baços no momento do abate.

3.3.3.1 Resposta humoral

3.3.3.1.1 Cinética dos níveis de anticorpos IgG

Os soros obtidos a partir das colheitas realizadas aos dias 0, 15, 22, 29 e 36 foram testados por ELISA utilizando placas sensibilizadas com OVA e um anticorpo secundário anti-IgG (fragmento Fc) de ratinho (Figura 26). A inoculação com OprI-OVApx resultou na indução de resposta logo após a primeira inoculação em dois dos três animais inoculados, de acordo com o resultado observado para os soros colhidos no dia 15. O mesmo se verificou num animal inoculado com OMF-OVApx e num animal inoculado com OMV-OVApx, apesar de nestes casos os níveis serem inferiores aos observados com OprI-OVApx, particularmente no animal inoculado com OMV-OVApx. Os valores observados nas colheitas dos dias 22 e 29 demonstram resposta humoral na sequência da segunda inoculação (primeiro reforço) nos três animais inoculados com OprI-OVApx e OMF-OVApx, embora no caso do animal inoculado com OprI-OVApx que ainda não tinha denotado resposta e em um dos dois animais inoculados com OMF-OVApx nas mesmas condições a resposta só tenha sido evidente ao dia 29, ou seja, 15 dias após a segunda inoculação. Nessa data, curiosamente, o nível de IgG anti-OVA no animal inoculado com OMV-OVApx, após uma subida ao 7º dia após o reforço, declinou, sugerindo uma cinética de indução de IgG distinta das outras formulações. No final do ensaio todos os animais inoculados com OprI-OVApx e

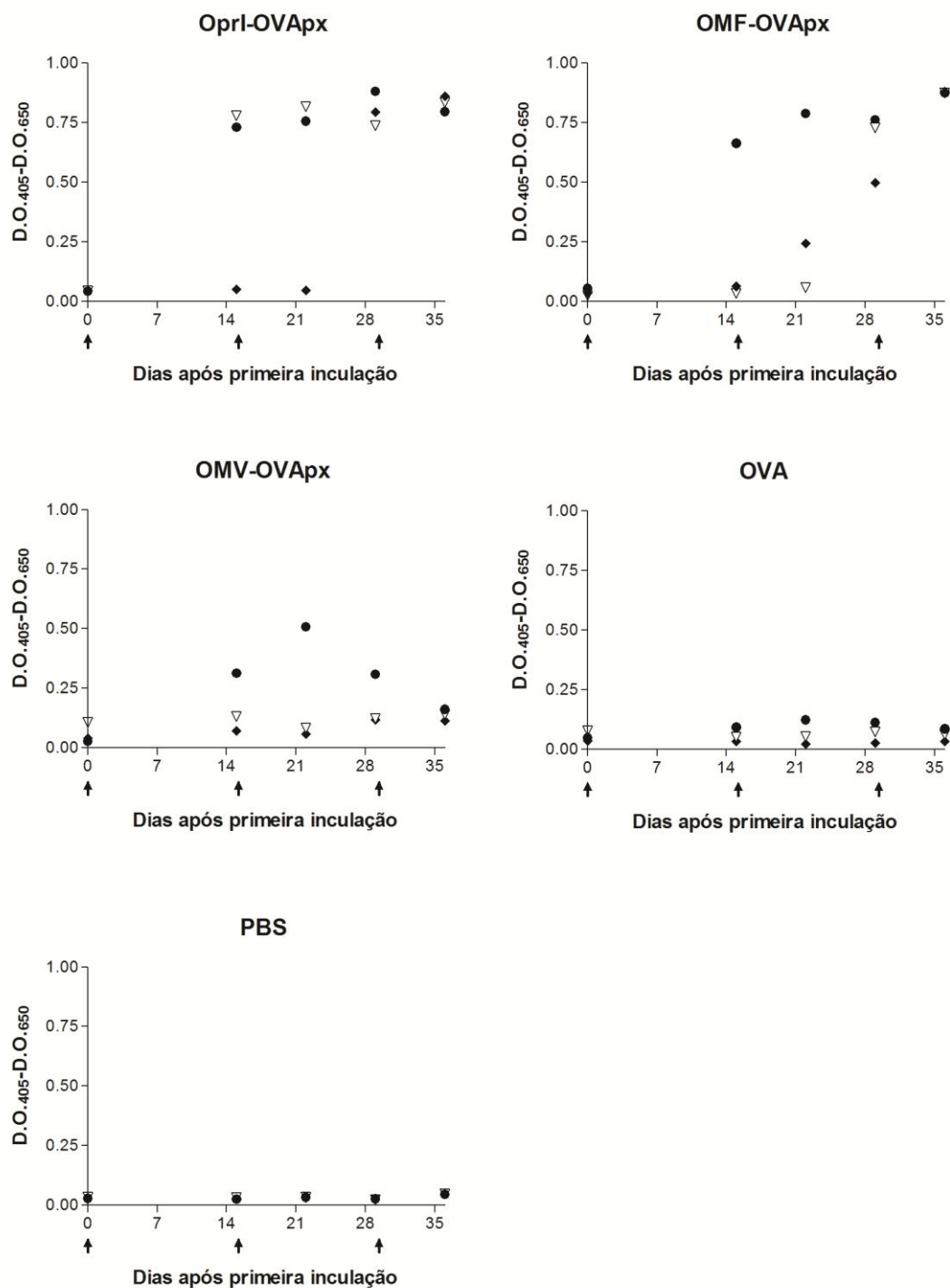


Figura 26 – Cinética dos níveis de anticorpos IgG específicos de OVA nos soros de animais inoculados com as três formulações contendo OVApx.

Inocularam-se, por via subcutânea, grupos de três animais com 5 µg de OprI-OVApx, OMF-OVApx, OMV-OVApx e OVA e dois animais com PBS, aos dias 0, 15 e 29. Colheram-se amostras de sangue antes de cada inoculação e nos dias 22 e 36. Os níveis de IgG total específicos de OVA foram determinados por ELISA. As setas assinalam os dias de inoculação.

OMF-OVA_px revelaram resposta com níveis de IgG comparáveis, enquanto os animais inoculados com OMV-OVA_px mostraram níveis baixos, perto dos valores observados para os soros pré-ímmunes. No entanto, nos três animais inoculados com OMV-OVA_px a resposta ao antigénio foi confirmada, ou pelos valores obtidos em datas anteriores de colheita, ou pelos resultados dos ensaios de detecção de subclasses de IgG (ver Figura 27). Nos animais inoculados com PBS não se detectaram respostas inespecíficas e nos animais inoculados com OVA detectaram-se níveis muito baixos de IgG, mas num dos casos os valores de D.O. obtidos nas colheitas dos dias 22 e 29 ultrapassam 2 vezes o valor do soro pré-ímmune, sugerindo ter havido resposta. De facto, os ensaios de ELISA para determinação de subclasses de IgG demonstraram resposta em dois dos animais inoculados com OVA (ver Figura 27).

3.3.3.1.2 Determinação dos níveis de subclasses de IgG

Com o objectivo de obter informação sobre o perfil da resposta induzido pela imunização com as três formulações, avaliou-se por ELISA os níveis de IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 anti-OVA nos soros colhidos no momento do abate. Para o efeito, usaram-se placas revestidas com OVA e anticorpos secundários específicos para as referidas subclasses (Figura 27). Nos três animais inoculados com OprI-OVA_px, todos com níveis elevados de IgG total ao fim das três inoculações, detectaram-se anticorpos específicos das quatro subclasses, embora com diferenças marcadas entre os três animais, excepto para IgG2b em que todos revelaram valores de D.O. muito elevados. Os resultados revelaram a presença de IgG2a nos três animais, tendo o rácio IgG1/IgG2a sido menor que a unidade em dois deles. Nos animais inoculados com OMF-OVA_px todos revelaram valores elevados de IgG2a e IgG2b, não se tendo detectado num deles anticorpos da subclasse IgG1, o que resultou num rácio IgG1/IgG2a muito pronunciado no sentido de IgG2a.

Os valores obtidos para os animais inoculados com OMV-OVA_px foram baixos, mas os resultados de IgG2b mostram claramente ter ocorrido resposta humoral nos três animais, o que não tinha sido evidente nos resultados de quantificação de IgG total. Num dos casos, o rácio IgG1/IgG2a foi menor que a unidade.

Os resultados relativos a IgG2b também demonstram que dois dos animais inoculados com OVA responderam à inoculação. Nestes casos o rácio IgG1/IgG2a foi sempre maior que a unidade, porém, os valores de D.O. obtidos para estas duas subclasses estão ao nível daqueles obtidos nos animais inoculados com PBS, o que lhes retira significado. Em ensaios preliminares, casos houve em que a administração reiterada de OVA induziu resposta humoral por IgG mais pronunciada do que neste ensaio, todavia o rácio IgG1/IgG2a foi sempre claramente superior à unidade, sem que se verificasse nunca a indução de IgG2a específica.

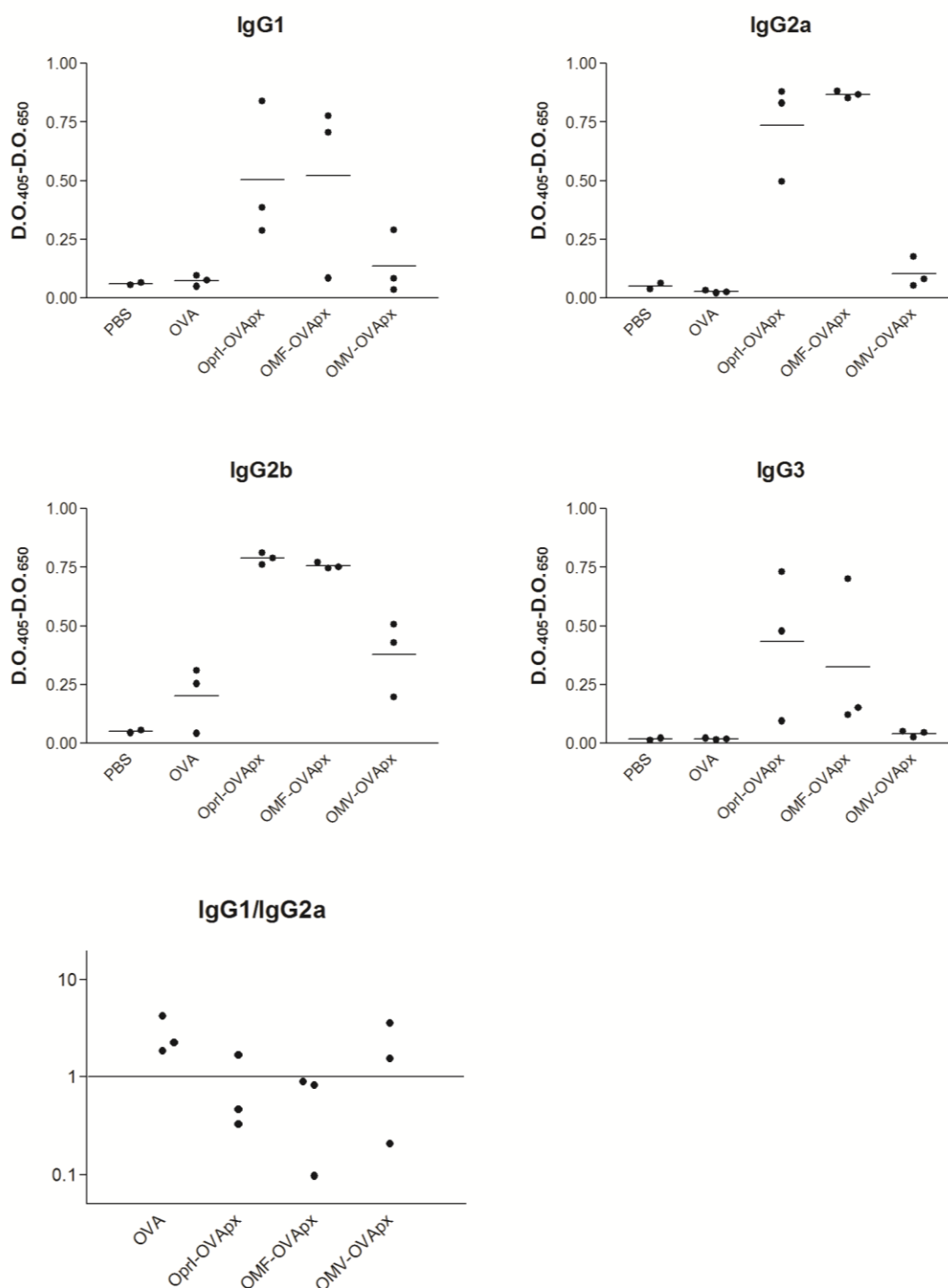


Figura 27 – Níveis de anticorpos de subclasses de IgG específicas de OVA nos soros colhidos no final do protocolo de imunização.

Os níveis de anticorpos das subclasses IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 nos soros colhidos no dia 36, 7 dias após o segundo reforço de imunização, foram determinados por ELISA utilizando placas revestidas por OVA e anticorpos secundários específicos para as referidas subclasses.

3.3.3.2 Avaliação da resposta por linfócitos CD8⁺ específicos por marcação com pentâmeros de complexos MHC classe I/SIINFEKL

Como metodologia de avaliação da indução de linfócitos CD8⁺ específicos para o antigénio em fusão com OprI optou-se pela marcação dos esplenócitos de animais imunizados com pentâmeros de moléculas MHC classe I carregadas com o péptido SIINFEKL. O número de células positivas expectável neste tipo de abordagem é baixo, pelo que qualquer nível de inespecificidade, mesmo que residual, pode dificultar a detecção das células alvo. O facto de os linfócitos B serem, nesta técnica, uma fonte de inespecificidade recomenda o uso de um anticorpo anti-CD19 para identificar estas células e assim permitir excluí-las da análise. De facto, num ensaio preliminar realizado com ratinhos controlo não imunizados, após selecção da população linfocitária de acordo com os valores de dispersão lateral (SSC, do inglês “side scatter”) e de dispersão frontal (FSC, do inglês “forward scatter”) (R1 na Figura 28), embora a exclusão das células marcadas com anticorpo anti-CD19 tenha diminuído significativamente o número de células que marcavam inespecificamente com o pentâmero, verificou-se que um número considerável de células CD8⁺ mantinha a marcação inespecífica. Decidiu-se por isso proceder à depleção das células CD19⁺ por MACS antes da marcação com os anticorpos e com o pentâmero. Como se observa na Figura 28, este procedimento resultou numa redução acentuada do número de células no quadrante superior direito (CD8⁺, pentâmero⁺) do gráfico de pontos correspondente ao animal controlo, enquanto no mesmo quadrante correspondente a um animal imunizado com uma das formulações recombinantes se detectavam células, permitindo assim uma diferenciação entre os dois casos, possivelmente devido à indução de resposta LTC pela formulação usada.

Estabeleceu-se então o protocolo como descrito em 3.2.7 e procedeu-se à testagem dos esplenócitos preparados a partir dos baços colhidos dos animais do ensaio *in vivo* (3.3.3.). Desta forma, observaram-se níveis de células CD8⁺ positivas para o pentâmero que dão indicação de uma indução de resposta celular pelas três formulações (Figura 29). As formulações OprI-OVApx e OMV-OVApx revelaram os valores mais elevados. Os valores observados para OMF-OVApx, embora próximos dos de OVA estão acima do controlo PBS.

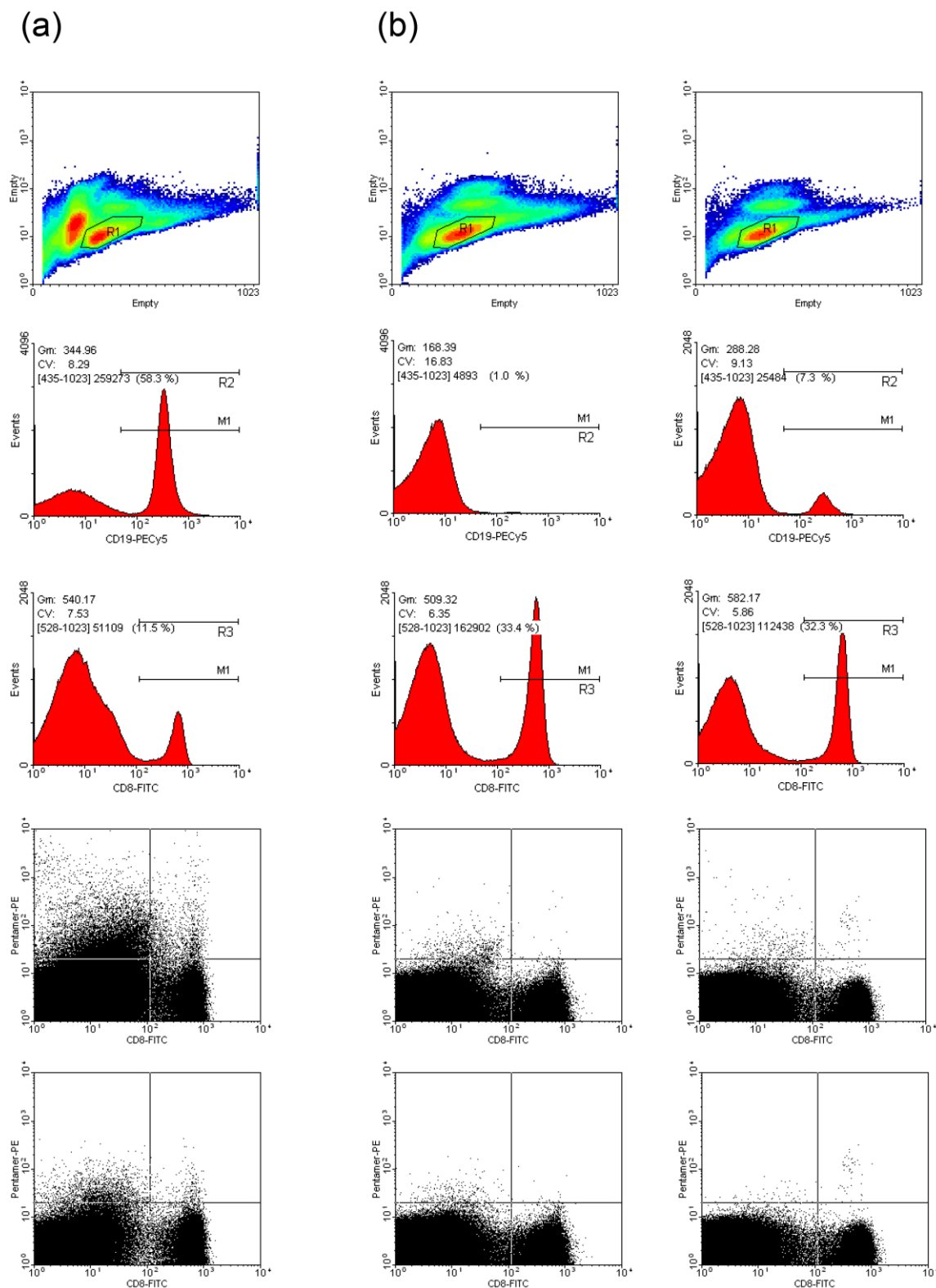


Figura 28 – Resultados de citometria de fluxo de ensaios de optimização da técnica de pentâmeros de moléculas MHC classe I para detecção de linfócitos CD8+ específicos para o epitopo SIINFEKL de OVA.

Figura 28 (continuação) – Resultados de citometria de fluxo de ensaios de optimização da técnica de pentâmeros de moléculas MHC classe I para detecção de linfócitos CD8⁺ específicos para o epitopo SIINFEKL de OVA.

(a) Análise de esplenócitos de ratinho controlo não imunizado em que as células CD19⁺ não foram depletadas por MACS; (b) Análise de esplenócitos de ratinho controlo não imunizado (coluna esquerda) e de ratinho inoculado duas vezes com OMF-OVA_px (coluna direita) em que as células CD19⁺ foram depletadas por MACS. De cima para baixo apresenta-se (1) gráfico de densidade com os valores de dispersão frontal (FSC) no eixo horizontal e os de dispersão lateral (SSC) no eixo vertical, em que se indica a selecção da janela de linfócitos (R1); (2) histograma da marcação com anti-CD19 para a população R1, com número de eventos no eixo vertical e intensidade de fluorescência no eixo horizontal, em que se indica a janela de selecção das células CD19⁺ (R2); (3) histograma semelhante a (2) mas para a marcação anti-CD8 da população R1, em que se indica a janela de selecção das células CD8⁺ (R3); (4) gráfico de pontos de células em R1 correspondendo o eixo horizontal à intensidade de fluorescência da marcação anti-CD8 e o eixo vertical à da marcação com pentâmero H-2k^b-OVA₂₅₇₋₂₆₄ (SIINFEKL), sem excluir da análise células CD19⁺; (4) gráfico de pontos semelhante a (3) mas com exclusão de células CD19⁺.

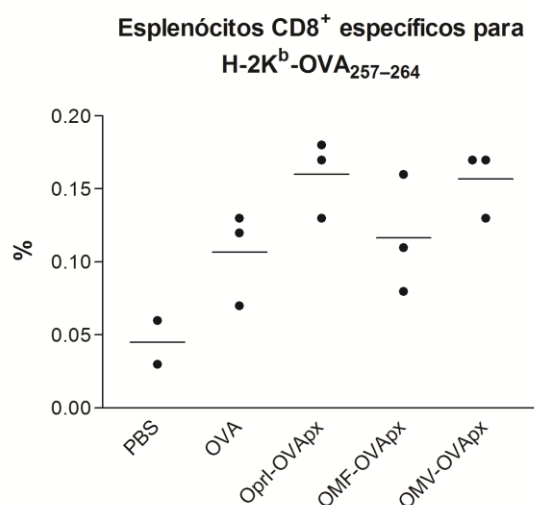


Figura 29 – Percentagem de linfócitos CD8⁺ específicos para o epitopo SIINFEKL de OVA (OVA₂₅₇₋₂₆₄) no final do protocolo de imunização.

No dia 36 do protocolo de imunização, abateram-se os animais, colheram-se os baços e, após depleção de células CD19⁺, analisaram-se por citometria de fluxo os esplenócitos marcados com pentâmeros H-2K^b-OVA₂₅₇₋₂₆₄, anticorpo anti-CD8 e anticorpo anti-CD19, seleccionando as células como na Figura 28. Apresenta-se a percentagem de células CD8⁺ que marcaram positivamente com pentâmeros H-2K^b-OVA₂₅₇₋₂₆₄ em cada animal.

3.3.4 Avaliação preliminar da capacidade estimuladora das três formulações em células dendríticas

Nesta fase do trabalho, pretendeu-se estender a avaliação das propriedades imunomoduladoras de cada uma das formulações propostas através da caracterização do perfil de citocinas secretadas por células dendríticas em resposta a estimulação. Realizou-se um ensaio piloto, em que se estimularam culturas de células dendríticas derivadas de medula óssea de um ratinho com OprI (1 µg/mL), OMF (1 µg/mL), OMV (100 ng/mL) e LPS (20 ng/mL). Em paralelo, estimularam-se as células na presença de polimixina B (15 µg/mL), um inibidor do efeito do LPS. Neste ensaio inicial, avaliou-se por ELISA a secreção de TNF-α como indicador de activação (Figura 30). As três formulações induziram quantidades significativas desta citocina, em níveis idênticos ou superiores ao induzido por 20 ng de LPS. Em contraste com o observado na estimulação com LPS, a adição de polimixina às culturas não anulou o efeito estimulador, sugerindo que este não se deve em exclusivo à presença de LPS nas formulações. Na formulação OprI verificou-se uma ligeira diminuição na produção de TNF-α, que poderá revelar contaminação residual da amostra por LPS, tanto mais que

noutros ensaios de estimulação com esta formulação esta observação não foi consistente (resultado não apresentado).

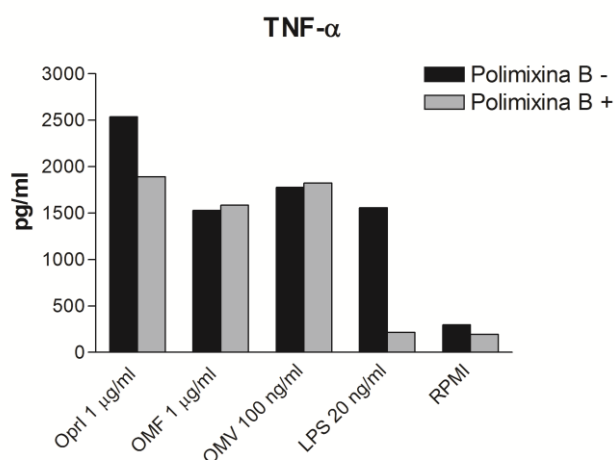


Figura 30 – Ensaio preliminar de estimulação de células dendríticas com as três formulações.

Estimularam-se culturas de células dendríticas de um rato com OprI, OMF, OMV e LPS, com as concentrações indicadas na figura durante 24 h, com (+) e sem (-) adição de polimixina B, um inibidor do efeito do LPS. Avaliou-se por ELISA a secreção de TNF- α como indicador de activação.

3.3.5 Perfil de citocinas e quimiocinas secretadas por células dendríticas em resposta a estimulação pelas 3 formulações

Considerando tratar-se de uma primeira caracterização das propriedades estimuladoras das três formulações em células dendríticas entendeu-se ser desejável uma abordagem que permitisse obter um perfil alargado do tipo de citocinas e quimiocinas secretadas. Pretendia-se, por um lado, obter dados que permitissem uma noção geral da estimulação e, por outro, recolher informação que orientasse estudos futuros que pretendam aprofundar essa caracterização. Optou-se, assim, pela utilização de um “array” de anticorpos que permite a detecção simultânea de 40 citocinas e quimiocinas. Estimularam-se culturas de células dendríticas de 5 animais com OprI (1 µg/mL), OMF (1 µg/mL), OMV (100 ng/mL) e LPS (100 ng/mL) e RPMI como controlos. Após 24 h colheram-se os sobrenadantes e realizaram-se lotes por mistura de volumes iguais de cada uma das cinco culturas. Armazenaram-se também alíquotas dos sobrenadantes de cada cultura individualmente com o objectivo de realizar uma análise prévia por ELISA que confirmasse a ocorrência de estimulação. Para esta análise prévia seleccionaram-se as citocinas TNF- α e IL-12 e ainda a quimiocina IP-10, cuja

expressão é dependente da activação de STAT1, prevendo-se por isso que fosse induzida diferentemente pelas três formulações em consequência dos seus diferentes conteúdos em LPS, uma vez que este induz a expressão de IFN- β . O sobrenadante de um dos cinco animais não foi testado neste ensaio prévio devido a um problema técnico.

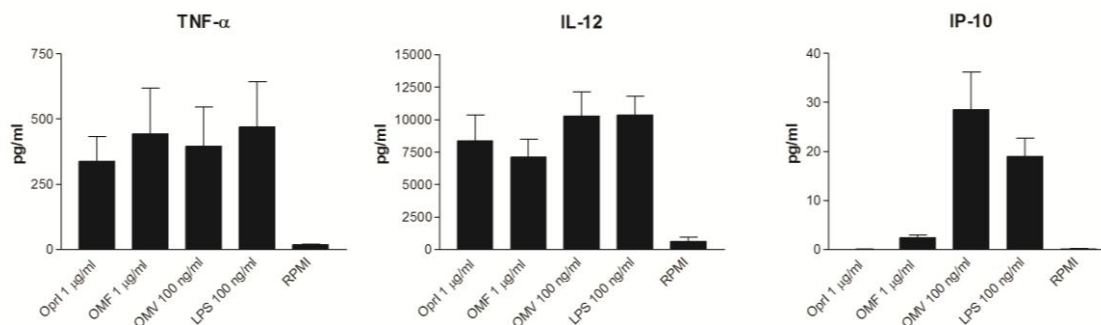


Figura 31 – Determinação por ELISA dos níveis de TNF- α , IL-12 e IP-10 em sobrenadantes de culturas estimuladas pelas três formulações.

Avaliou-se por ELISA a secreção de TNF- α , IL12 e IP-10 em sobrenadantes de culturas de células dendríticas estimuladas durante 24 h com OprI (1 μ g/mL), OMF (1 μ g/mL), OMV (100 ng/mL) e LPS (100 ng/mL) e RPMI como controlos. Os valores apresentados representam o valor médio obtido a partir de culturas de 4 animais e o respectivo erro padrão.

As três formulações induziram níveis de TNF- α e IL-12 com valores idênticos ou ligeiramente inferiores aos obtidos por estimulação com 100 ng/mL de LPS (Figura 31), confirmando a ocorrência de estimulação. Os níveis de IP-10 observados revelaram uma diferença marcada entre as três formulações, sendo muito superiores nas culturas estimuladas por OMV, acima mesmo dos valores obtidos com 100 ng/mL de LPS. Nas culturas estimuladas com OMF detectou-se também produção de IP-10 mas com níveis bastante inferiores, enquanto naquelas estimuladas com OprI os níveis foram idênticos aos do controlo negativo.

Os lotes de sobrenadantes relativos ao conjunto das cinco culturas estimuladas com cada uma das três formulações e com RPMI, como controlo negativo, foram então testados no ensaio de “array”. Para maximizar o espectro de concentrações legível nas películas de auto-

radiografia realizaram-se exposições com diferente duração e usaram-se dois substratos com níveis de detecção distintos (apresenta-se um exemplo na Figura 32). Os resultados apresentados em gráfico (Figura 33) correspondem a leituras efectuadas a partir de três películas que cobrem o espectro de intensidades obtido. Cada gráfico correspondente a cada uma das películas, por ordem decrescente de intensidade, sendo os resultados obtidos a partir da película de menor tempo de exposição (película com menor nível de detecção) apresentados em dois gráficos com escalas distintas devido à diferença pronunciada no nível de alguns mediadores. Os sinais das réplicas de cada analito registados em cada membrana foram, em todos os casos, muito semelhantes.

O perfil de estimulação observado com cada uma das três formulações foi, em termos genéricos, semelhante. Detectou-se com maior intensidade na película de menor exposição as quimiocinas inflamatórias MIP-1 α , CXCL2/MIP-2, CXCL1/KC (do inglês “keratinocyte cell-derived chemokine”), CCL2/JE/MCP-1 e RANTES, a citocina pró-inflamatória IL-6 e o antagonista do receptor de IL-1, IL-1RA (do inglês “IL-1 receptor antagonist”), e, com menor intensidade, a citocina pró-inflamatória TNF- α , a quimiocina inflamatória MIP-1 β e o inibidor de metaloproteinases da matriz TIMP (do inglês “tissue inhibitor of metalloproteinases”)-1. Na película seguinte obtiveram-se resultados para os factores de crescimento G-CSF (do inglês “granulocyte colony-stimulating factor”), GM-CSF, M-CSF (do inglês “macrophage colony-stimulating factor”), as quimiocinas IP-10, I-309, TARC, I-TAC, a forma secretada do receptor TREM (do inglês “triggering receptor expressed on myeloid cells”)-1 e as citocinas IL-5 e IL-3. Por fim, os valores para as moléculas com sinal de menor intensidade foram obtidos a partir da análise da película em que se usou o substrato de maior nível de detecção: as citocinas IL-1 α , IL-1 β , IL-23, IL-27, IL-12, IL-10, IL-13, IL-7, IL-4, IFN- γ , IL-17, IL-16, IL-2, as quimiocinas MIG, CCL12/MCP-5, CXCL13/BLC (do inglês “B lymphocyte chemoattractant”), CXCL12/SDF-1 (do inglês “stromal cell-derived factor”) e eotaxina, o componente do complemento C5a e a forma solúvel de CD54, sICAM-1. As leituras relativas às três formulações foram sempre feitas a partir das mesmas películas.

Embora o perfil obtido com as três formulações seja semelhante, observaram-se diferenças na expressão de alguns analitos. Com o objectivo de facilitar a análise comparativa da estimulação induzida por cada uma das formulações, determinou-se a relação entre os níveis observados para cada uma delas após subtracção do valor observado no controlo negativo (RPMI). Na Figura 34 são apresentados os valores da razão entre cada estímulo e os outros dois, por ordem decrescente. Para cada par de estímulos listam-se separadamente os mediadores que apresentaram níveis superiores aos observados para o par com que está a ser comparado. Para facilitar a leitura da tabela, apresentam-se os valores sobre um fundo de cor

de intensidade proporcional ao valor do rácio, correspondendo o branco à unidade e o verde mais escuro ao valor máximo observado. As citocinas e quimiocinas mais comumente associadas a polarização de resposta estão assinaladas na figura. Para a maioria dos mediadores, as formulações OMF e OMV induziram quantidades superiores às observadas para OprI. Na maioria dos casos os valores dos rácios são pouco expressivos tendo os valores mais pronunciados sido observados nas comparações OMV/OprI, OMV/OMF e OMF/OprI.

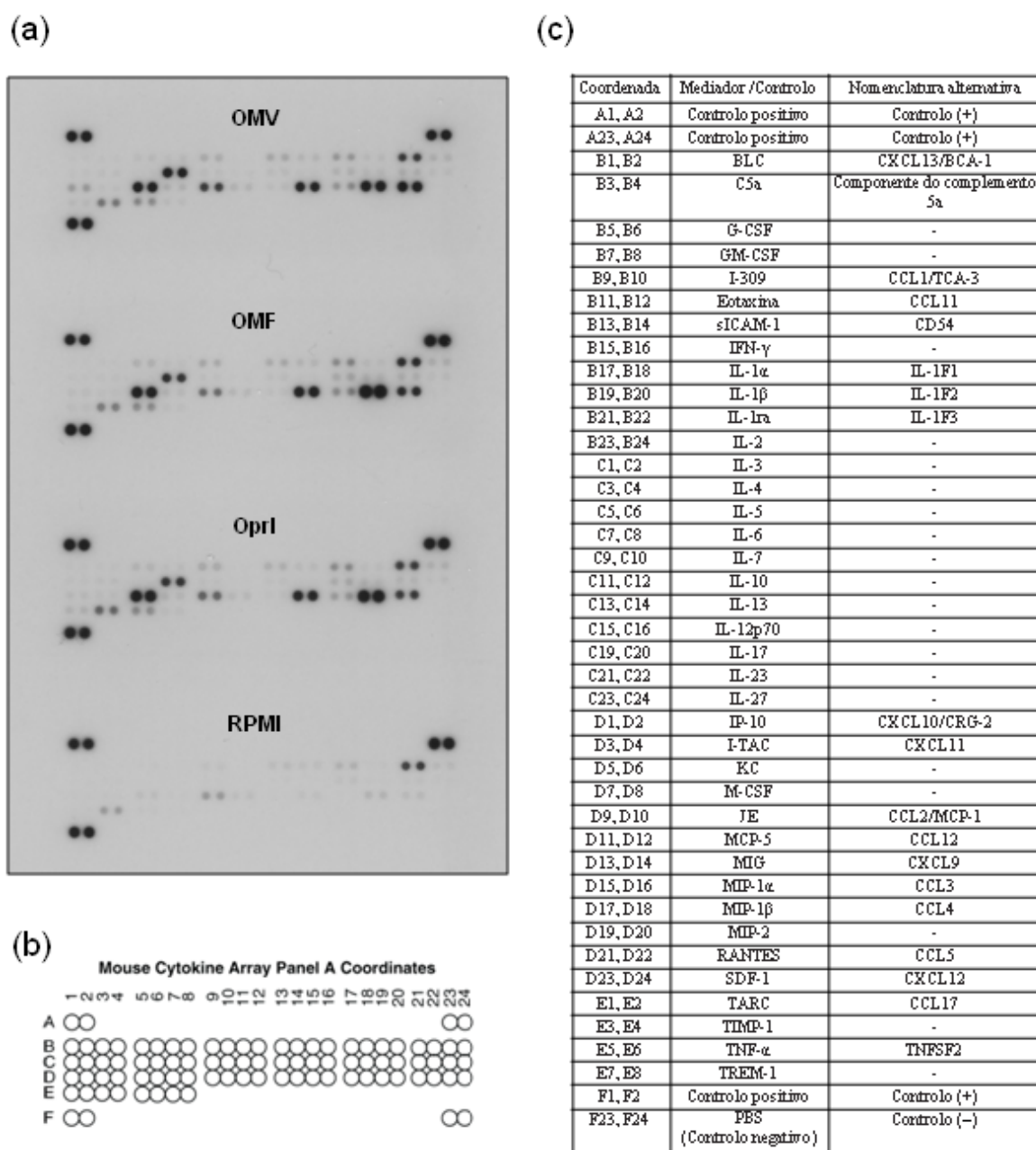


Figura 32 – Película de auto-radiografia exposta às membranas do “array” para detecção de citocinas e quimiocinas em sobrenadantes de culturas de células dendríticas estimuladas com as três formulações.

(a) Incubaram-se quatro membranas do “kit” de “array” com misturas dos sobrenadantes de culturas de células dendríticas obtidas de cinco animais estimuladas com as três formulações e com RPMI, como controlo negativo. Os sinais emitidos foram detectados por quimioluminescência. Para leitura dos resultados realizaram-se exposições de películas por tempos diferentes e usaram-se dois substratos com níveis distintos de detecção. A figura mostra, como exemplo, uma dessas películas. Para cada citocina/quimiocina existem pontos em duplicado em cada membrana. (b) Esquema do “array”. (c) Mediadores de resposta avaliados e respectivas coordenadas.

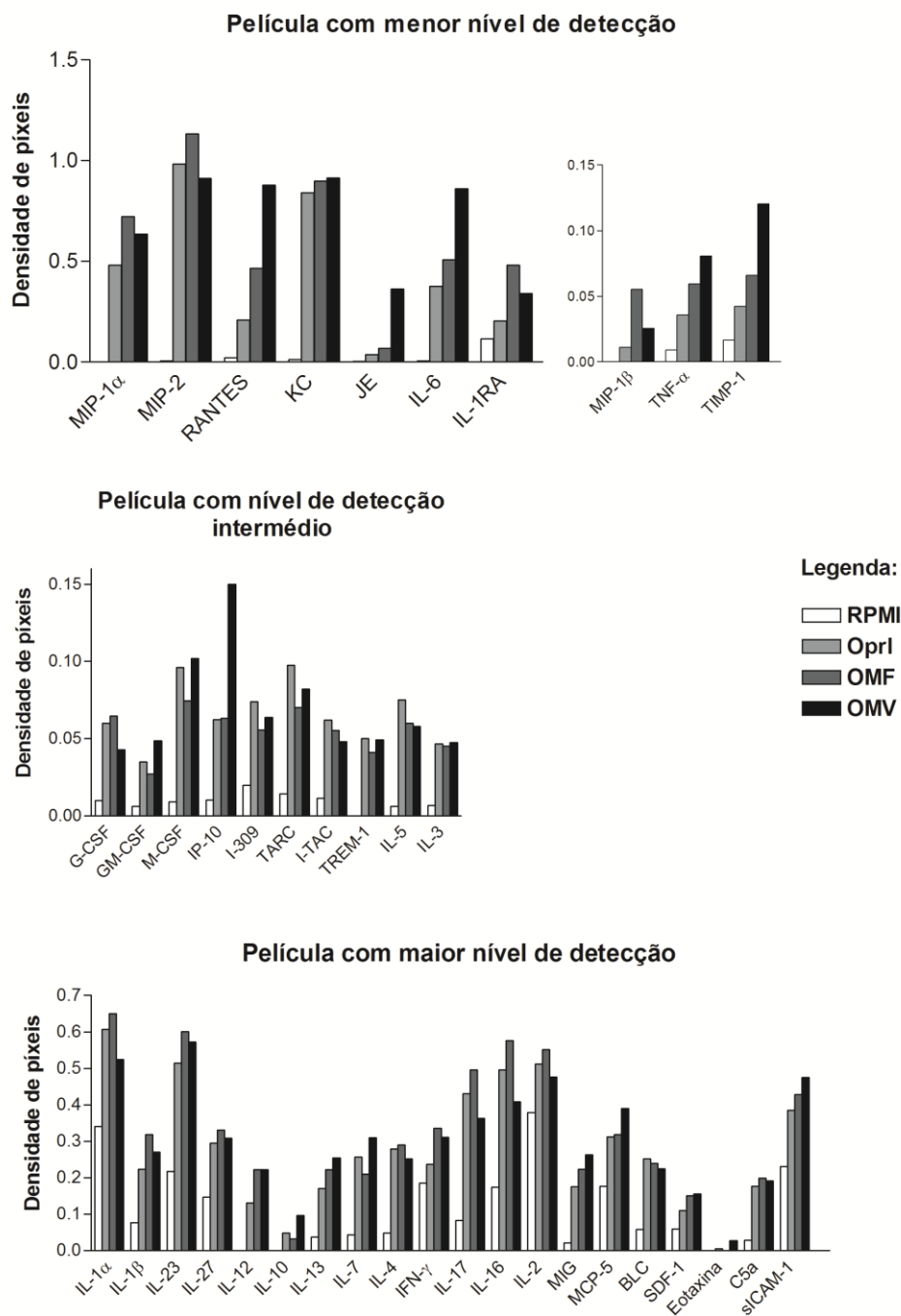


Figura 33 – Níveis de citocinas/quimiocinas em sobrenadantes de culturas de células dendríticas estimuladas com OprI, OMF, OMV e RPMI, como controlo negativo, determinados por um ensaio de “array” em membrana de nitrocelulose.

Cada gráfico apresentado corresponde às leituras efectuadas em cada uma das três películas, por ordem decrescente de nível de detecção. As leituras obtidas a partir da película com menor nível de detecção estão distribuídas por dois gráficos de escala distinta devido aos valores observados serem bastante díspares. Os valores apresentados correspondem aos valores de densidade óptica de cada duplicado após subtracção do valor de fundo de cada membrana e normalização em relação aos valores médios obtidos para os controlos positivos de cada membrana.

OMV vs Oprl				OMF vs Oprl				OMV vs OMF			
OMV > Oprl		Oprl > OMV		OMF > Oprl		Oprl > OMF		OMV > OMF		OMF > OMV	
JE	10,89	G-CSF	1,52	IL-1ra	4,03	² I-309	1,51	JE	5,57	¹ MIP-1β	1,77
¹ RANTES	4,61	IL-1α	1,45	¹ IFN-γ	2,90	² TARC	1,49	^{2, r} IL-10	2,77	IL-2	1,77
TIMP-1	4,03	¹ I-TAC	1,38	¹ MIP-1β	2,84	^{2, r} IL-10	1,46	¹ IP-10	2,64	IL-16	1,71
TNF-α	2,69	IL-16	1,37	¹ RANTES	2,39	² GM-CSF	1,38	TIMP-1	2,11	IL-1α	1,68
¹ IP-10	2,68	IL-2	1,37	JE	1,95	M-CSF	1,33	² GM-CSF	2,03	G-CSF	1,66
IL-1ra	2,48	² IL-5	1,33	TIMP-1	1,91	IL-7	1,28	¹ RANTES	1,93	IL-1ra	1,63
¹ IFN-γ	2,44	¹⁷ IL-17	1,24	TNF-α	1,89	² IL-5	1,28	^{2; 17} IL-6	1,71	¹⁷ IL-17	1,47
^{2; 17} IL-6	2,31	² I-309	1,23	SDF-1	1,80	TREM-1	1,20	IL-7	1,60	IL-3	1,29
¹ IL-27	2,08	IL-3	1,23	IL-12	1,69	¹ I-TAC	1,15	MCP-5	1,51	² IL-1β	1,26
SDF-1	1,91	² TARC	1,22	² IL-1β	1,65	BLC	1,07	TNF-α	1,42	MIP-2	1,24
^{2, r} IL-10	1,90	² IL-5	1,19	¹ MIP-1α	1,50	IL-3	1,04	M-CSF	1,42	² IL-5	1,22
¹ IL-12	1,70	BLC	1,16	² IL-13	1,39			siCAM-1	1,24	¹ I-TAC	1,20
² IL-13	1,63	² IL-4	1,14	^{2; 17} IL-6	1,35			² I-309	1,23	¹ IFN-γ	1,19
¹ MIP-1β	1,60	MIP-2	1,08	¹ MIG	1,31			² TARC	1,22	² IL-4	1,19
siCAM-1	1,59	TREM-1	1,01	IL-2	1,29			¹ MIG	1,19	IL-27	1,14
MCP-5	1,57			IL-23	1,29			TREM-1	1,19	¹ MIP-1α	1,14
¹ MIG	1,57			siCAM-1	1,28			² IL-13	1,17	BLC	1,08
² GM-CSF	1,47			IL-16	1,25			IL-3	1,06	IL-23	1,08
¹ MIP-1α	1,32			IL-27	1,24			SDF-1	1,06	² IL-5	1,04
² IL-1β	1,31			¹⁷ IL-17	1,19			KC	1,02	C5a	1,04
IL-7	1,25			IL-1α	1,16			IL-12	1,00		
^{1; 17} IL-23	1,19			MIP-2	1,15						
C5a	1,10			C5a	1,15						
KC	1,09			G-CSF	1,09						
M-CSF	1,07			KC	1,07						
IL-3	1,02			IL-3	1,05						
				² IL-4	1,05						
				MCP-5	1,04						
				² IL-5	1,03						
				¹ IP-10	1,01						

Figura 34 – Rácios entre pares de formulações dos valores de densidade de píxeis obtidos no ensaio de “array”.

Aos valores de densidade de píxeis obtidos para cada mediador subtraiu-se o valor obtido para o controlo negativo e determinaram-se os rácios entre pares de estímulos. Para cada par são listados separadamente os mediadores que apresentaram níveis superiores aos observados para o par com que está a ser comparado. A intensidade da cor verde do fundo é proporcional ao valor do rácio, correspondendo o branco à unidade e o verde mais escuro ao valor máximo observado. As citocinas e quimiocinas associadas a polarização de resposta estão assinaladas com ¹, ², ¹⁷ e ^r respectivamente para Th1, Th2, Th17 e Treg.

3.4 Discussão

Nesta fase do trabalho clonaram-se antígenos heterólogos num vector do novo sistema de modo a obter ferramentas para a caracterização das propriedades imunomoduladoras de cada uma das três formulações propostas no capítulo anterior. Iniciou-se essa caracterização através da realização de um ensaio *in vivo*, avaliando a capacidade adjuvante das formulações no desencadeamento de resposta humoral e celular contra os antígenos expressos em fusão

com OprI; e de um ensaio *in vitro*, em que se obteve um perfil geral da secreção de citocinas e quimiocinas por células dendríticas em resposta a estimulação com as três formulações.

O trabalho iniciou-se com a clonagem em pOLT7 de dois antígenos modelo, OVA e EGFP. A escolha recaiu nestes dois antígeno por ambos poderem servir os ensaios de imunização que se planeavam no âmbito deste trabalho, mas também por poderem vir a constituir a base de estudos futuros de caracterização das três formulações. A proteína OVA é um antígeno amplamente usado em imunologia experimental, cujos epitópos dominantes apresentados em contexto de MHC classe I (SIINFEKL) e MHC classe II (ISQAVHAAHAEINEAGR) em ratinhos do haplotipo H-2K^b, como a estirpe C57BL/6, estão bem caracterizados, o que permitiria o desenho de ensaios de avaliação de respostas celulares por linfócitos CD4⁺ e CD8⁺. A disponibilidade comercial de oligómeros de moléculas MHC classe I do haplotipo H-2K^b ligadas ao péptido SIINFEKL para detecção de linfócitos CD8⁺ específicos para OVA permitir-nos-ia uma primeira abordagem para avaliação do desencadeamento de respostas LTC em protocolos de imunização. Por outro lado, a proteína nativa obtida comercialmente serviria de controlo nos ensaios de imunização e, simultaneamente, como antígeno de revestimento das placas de ELISA nos ensaios de avaliação de resposta humoral. Outra razão que nos levou a escolher a sequência de OVA foi o facto de estudos futuros de caracterização do novo sistema poderem vir a beneficiar da existência de inúmeras ferramentas desenvolvidas para serem usadas especificamente com este antígeno.

O outro antígeno modelo clonado em pOLT7, a proteína EGFP, tem também identificado um epitopo dominante MHC classe I (HYLSTQSAL) em haplotipo H-2K^d (*e.g.* estirpe BALB/c) (Gambotto et al., 2000). O facto de o haplotipo ser diferente daquele no qual os epitópos de OVA estão caracterizados permite o uso de uma estirpe distinta para avaliação de resposta por linfócitos CD8⁺, existindo também disponíveis comercialmente oligómeros H-2K^d carregados com o péptido HYLSTQSAL que poderão ser usados nesses estudos.

Uma vez confirmadas as clonagens dos antígenos modelo, optou-se pelo plasmídeo com uma sequência parcial de OVA, pOLT7-OVAp, para produção das três formulações a usar no ensaio de imunização. Este plasmídeo resultaria na expressão de uma proteína de fusão na qual existiriam, a montante do epitopo SIINFEKL imunodominante em MHC classe I, 14 aminoácidos de OVA, precedidos pela sequência de OprI, e a jusante do epitopo SIINFEKL 100 aminoácidos do antígeno modelo. No entanto, por essa altura Ma et al. (2009) demonstram ser essencial que as regiões flangeadoras do epitopo SIINFEKL possuam um tamanho mínimo para que a apresentação cruzada ocorra de forma eficiente. A jusante do epitopo esse prolongamento teria de ser de pelo menos 22 aminoácidos e embora a

extensão mínima necessária a montante não tenha sido determinada com exactidão, moléculas com uma extensão de 46 aminoácidos mostraram níveis máximos de apresentação cruzada e moléculas com uma extensão de 18 aminoácidos apresentaram fraca apresentação cruzada. Os resultados deste estudo sugerem ainda ser relevante para uma apresentação cruzada eficiente, não apenas o comprimento, mas também a sequência específica dos aminoácidos das regiões flanqueadoras. Se, por um lado, a substituição das sequências flanqueadoras de SIINFEKL por sequências de igual tamanho derivadas de GFP resultaram em moléculas com o mesmo padrão de apresentação cruzada do que aquelas com as sequências de OVA originais, a substituição de 46 aminoácidos da sequência de OVA a montante do epítipo por uma sequência de igual tamanho da nucleoproteína do vírus da gripe resultou na perda de apresentação cruzada. O clone recombinante para expressão de uma sequência parcial de OVA em fusão com OprI obtido inicialmente (pOLT7-OVAp) permitia a expressão de uma molécula de fusão que, apesar de ter mais de 46 aminoácidos a montante do epítipo SIINFEKL, destes apenas 14 correspondiam à sequência de OVA, sendo os restantes codificados ou por nucleótidos próprios do vector (4 aminoácidos) ou por nucleótidos codificadores da porção C-terminal de OprI (os restantes). Estas observações levaram-nos a construir um novo plasmídeo para expressão de uma sequência parcial de OVA em fusão com OprI de forma a conter sequências flanqueadoras do epítipo SIINFEKL derivadas de OVA de comprimento superior aos valores mínimos requeridos. Este plasmídeo, pOLT7-OVAp_x, serviu de base à produção das três formulações imunogénicas posteriormente usadas no ensaio de imunização.

Utilizando o plasmídeo pOLT7-OVAp_x para expressão de OprI-OVAp_x e seguindo os protocolos estabelecidos no Capítulo 2 deste trabalho, obtiveram-se as três formulações propostas, que revelaram um conteúdo de endotoxina semelhante ao das mesmas formulações sem antígeno heterólogo. Este resultado indica que os protocolos desenvolvidos permitem reproduzir a composição em LPS das diferentes formulações em preparações independentes.

Os resultados obtidos no ensaio *in vivo* demonstram claramente uma capacidade adjuvante intrínseca das formulações OprI-OVAp_x e OMF-OVAp_x, tendo todos os animais inoculados com estas formulações desenvolvido resposta humoral. É de salientar que em dois dos três animais inoculados com OprI-OVAp_x, uma única inoculação foi suficiente para obter uma resposta por IgG pronunciada, em claro contraste com o observado por inoculação com o antígeno nativo em que até ao final do protocolo de imunização apenas dois animais desenvolveram resposta e com níveis de IgG muito baixos.

A formulação OMV-OVAp_x foi das três formulações recombinantes a que induziu o menor nível de IgG. Porém, o conjunto dos resultados de determinação dos níveis de

diferentes subclasses de IgG demonstrou inequivocamente que ocorreu resposta nos três animais inoculados. O facto de as vesículas terem, por um lado, uma quantidade de endotoxina que impede a sua administração parentérica com doses elevadas e, por outro, a quantidade de antigénio recombinante não ser muito elevada, sendo uma proteína não maioritária, poderá constituir uma limitação desta formulação. A extracção de LPS das vesículas por tratamento com detergentes é um procedimento utilizado na preparação de algumas formulações de OMV para imunização contra a meningite meningocócica e poderá ser equacionada no futuro para diminuir a reactogenicidade desta formulação de modo a permitir o uso de doses mais elevadas. Este procedimento poderá, no entanto, trazer dificuldades técnicas à preparação desta formulação decorrentes de possíveis alterações na estrutura física das vesículas e à indução da sua agregação (Cametti, 2008; Holst et al., 2009). Para preservar a estrutura e adjuvanticidade das vesículas é sempre necessário manter uma quantidade residual de LPS (van de Waterbeemd et al., 2010). A eventual extracção do antigénio recombinante pelo tratamento com detergente deve também ser avaliada caso a caso (Koeberling et al., 2009; Koeberling et al., 2008). A utilização de estirpes bacterianas com LPS de baixa toxicidade é outra estratégia usada na produção de OMV de *Neisseria meningitidis* para diminuir os efeitos adversos desta formulação que poderá ser equacionada se se pretender aumentar a dose de antigénio recombinante a inocular por via parentérica (Fisseha et al., 2005; van der Ley et al., 2001). De qualquer forma, a formulação tal como é agora obtida deverá ser também considerada para indução de resposta por vias de administração não-parentéricas, visto que formulações semelhantes têm demonstrado ser efectivas na indução de respostas locais e sistémicas por via intranasal e oro-gástrica sem que se verifiquem efeitos tóxicos (Drabick et al., 1999; Guthrie et al., 2004; Katial et al., 2002; Schild et al., 2009; Schild et al., 2008). Por outro lado, os resultados que sugerem o desenvolvimento de resposta por linfócitos CD8⁺ induzido com esta formulação abrem a possibilidade de uma aplicação mais alargada em imunização.

As formulações OprI-OVAp_x e OMF-OVAp_x induziram ambos níveis expressivos de anticorpos da subclasse IgG2a, o que sugere capacidade de polarização da resposta num sentido Th1. Estes resultados estão de acordo com os trabalhos de Cote-Sierra et al. (2002) e Piedade (2003) em que se observou também a indução de IgG2a em protocolos de imunização com proteínas de fusão com OprI. No entanto, Gartner et al. (2007) refere uma maior tendência para indução de IgG1 com protocolos de imunização em que se procedeu a duas inoculações com uma proteína de *Mycobacterium tuberculosis* em fusão com OprI. No nosso trabalho, embora cinco dos seis animais inoculados com as formulações OprI-OVAp_x e OMF-OVAp_x tenham revelado um rácio IgG1/IgG2a menor que a unidade, apenas um animal

inoculado com OMF-OVA_{px} mostrou um rácio claramente pronunciado no sentido de IgG2a. No estudo reportado por Cote-Sierra et al. (2002) é referido que, apesar de se terem registado níveis equivalentes de IgG1 e IgG2a 10 dias após uma última inoculação de proteína de fusão, os níveis de IgG2a mantiveram-se elevados decorridas 12 semanas após essa administração, enquanto os níveis de IgG1 haviam declinado. Algumas diferenças entre os resultados observados nestes trabalhos poderão assim justificar-se por terem sido realizadas apenas avaliações pontuais dos níveis de subclasses de IgG.

No ensaio *in vivo* avaliou-se a indução de resposta por linfócitos CD8⁺ por marcação com pentâmeros de moléculas MHC classe I ligadas ao péptido de OVA imunodominante na estirpe usada. Esta técnica revelou níveis mais elevados de esplenócitos CD8⁺ reconhecedores de SIIKFEKL nos animais inoculados com as três formulações quando comparados com os animais controlo inoculados com PBS, tendo-se registado valores mais pronunciados para as formulações OprI-OVA_{px} e OMV-OVA_{px}. Contudo, os valores obtidos foram baixos, não ficando claro se isso se deveu a uma deficiente optimização da técnica, com a qual, de acordo com estudos anteriores (Britten et al., 2009), é possível obter valores bastante díspares consoante o protocolo usado, ou se reflecte níveis de indução de LTC de facto baixos. Uma eventual alteração da dominância dos epitopos apresentados como consequência da fusão com a lipoproteína deverá também ser equacionada em estudos futuros.

Considerando os níveis de linfócitos CD8⁺ específicos detectados, bem como o facto de os animais inoculados com OVA nativa apresentaram valores pouco mais baixos que a formulação OMF-OVA_{px}, e tendo também em conta que o número de linfócitos específicos nem sempre reflecte o nível de resposta funcional (Kostense et al., 2002), é necessário que se desenvolvam, no futuro, estudos para confirmação da capacidade de indução de respostas por linfócitos CD8⁺ utilizando metodologias alternativas. A demonstração de citotoxicidade *in vivo*, utilizando como células alvo esplenócitos singénicos carregados com péptido SIINFEKL e marcados com éster carboxifluoresceína de succinimidilo (CFSE, do inglês “carboxyfluorescein succinimidyl ester”) poderá ter particular interesse por fornecer evidência funcional de citotoxicidade (Durward et al., 2010; Ingulli, 2007). A detecção de linfócitos CD8⁺ produtores de IFN- γ em resposta a restimulação com o péptido SIINFEKL por ELISPOT ou citometria de fluxo poderá também esclarecer a capacidade de desencadear respostas LTC com as três formulações (Serbina & Pamer, 2003).

O ensaio *in vitro* de estimulação de células dendríticas tinha como objectivo uma caracterização alargada do perfil de citocinas e quimiocinas induzido por cada formulação. Pretendia-se ainda identificar diferenças entre as três formulações na indução desses mediadores. A sua composição distinta em ligandos de PRR, confirmada neste trabalho

relativamente ao LPS, fazia prever que a activação das células estimuladas não fosse totalmente idêntica. Essa diferença foi avaliada e confirmada num ensaio inicial de ELISA por determinação da secreção da quimiocina IP-10, cuja expressão depende da activação de STAT1. Ao contrário da activação via TLR2/1 exercida pelas lipoproteínas bacterianas, a qual não resulta na produção de IFN, a estimulação via TLR4, para além da activação da via dependente de MyD88, induz a activação da via dependente de TRIF com consequente produção de IFN- β . A acção autócrina/parácrina de IFN- β induz a fosforilação de STAT1 α e STAT1 β o que resulta na produção de IP-10 (Toshchakov et al., 2002). De facto, observou-se uma diferença clara nas culturas de células dendríticas estimuladas, em que a formulação OMV, que contém níveis elevados de LPS, induziu a secreção de quantidades muito superiores desta quimiocina. No ensaio de ELISA não se detectou IP-10 nas culturas estimuladas com OprI purificada, formulação com níveis meramente vestigiais de LPS. A formulação OMF induziu a produção desta quimiocina, embora em níveis baixos quando comparado com OMV. Como esperado, o resultado do “array” foi coincidente relativamente à clara superioridade de OMV para indução de IP-10, embora a diferença entre OMF e OprI não tenha sido aí notada. A expressão da quimiocina MCP-5 está também descrita como depende de STAT1 (Toshchakov et al., 2002). O resultado do “array” revelou que a sua produção está ligeiramente aumentada nas culturas estimuladas por OMV, embora a diferença em relação às outras duas formulações não seja tão evidente como para IP-10, talvez por os níveis de expressão terem sido muito baixos.

Como exposto anteriormente, a estimulação simultânea de células dendríticas através de diferentes PRR leva a diferenças consideráveis tanto na qualidade como na quantidade das citocinas secretadas quando comparado com estimulação por uma única via. O resultado do “array” mostrou que as formulações OMF e OMV, compostas por outros ligandos de PRR para além de OprI, induziram a expressão da maioria dos mediadores em quantidades superiores às observadas com OprI, o que poderá reflectir a maior complexidade do estímulo associada àquelas formulações. A formulação OMV induziu, em alguns casos, quantidades claramente superiores às outras duas formulações, destacando-se IP-10, RANTES, IL-6, JE e TIMP-1. Apesar destas diferenças, de uma forma geral, o “array” revelou um perfil de secreção de mediadores semelhante nas três formulações, sendo que as diferenças menos pronunciadas observadas para os restantes mediadores aconselham futuras análises mais detalhadas.

A citocina IL-12, relevante para a polarização de resposta no sentido Th1, originou sinal apenas na película de maior exposição, o que poderá indicar que a produção foi baixa para as três formulações. De acordo com resultados obtidos noutros estudos, a estimulação de células

dendríticas por ligandos TLR induz, em geral, uma produção fraca de IL-12, excepto se for acompanhada de co-estimulação através de outros sinais, como aqueles provenientes de linfócitos T ou células NK, sob forma secretada (*e.g.* IFN- γ) ou por ligação de receptores/ligandos membranares (*e.g.* CD40L) (Edwards et al., 2002; Ma et al., 1996). No entanto, nessa película os valores foram, para as três formulações, claramente superiores ao valor obtido com o controlo negativo (RPMI), tendo o valor observado para OprI sido claramente inferior ao de OMF e OMV. Alguns estudos sugerem que a activação via TLR2, ao contrário da estimulação via TLR4, não resulta em produção significativa de IL-12p70 (Agrawal et al., 2003; Hirschfeld et al., 2001; Pulendran et al., 2001b; Re & Strominger, 2001) tendo sido reportados diferentes mecanismos que o podem justificar. Segundo Dillon et al. (2004) a estimulação via TLR2 leva a um aumento na magnitude e duração da sinalização ERK, a qual resulta na fosforilação e estabilização do factor de transcrição c-Fos com consequente produção de IL-10 e bloqueio da expressão de IL-12p70. Outros autores defendem que a menor produção de IL-12p70 induzida por ligandos de TLR2 se justifica pela dependência da expressão da subunidade IL-12p35 da activação de STAT1. Esta activação é induzida de forma autócrina/parácrina através do receptor IFNAR pelo IFN- β induzido via TRIF por ligandos de TLR4 ou TLR3, mas não ocorre por estimulação de TLR2 (Gautier et al., 2005). Outros estudos sugerem uma relação entre a activação via TLR2 de PI3K e a supressão da produção de IL-12p70 (Martin et al., 2003).

Por outro lado, os resultados obtidos por ELISA na avaliação preliminar mostraram uma produção de IL-12 semelhante entre formulações, com valores próximos daqueles obtidos por estimulação com LPS. Contudo, o teste de ELISA usado, ao contrário do “array”, não é específico para a forma de IL-12 relevante para polarização Th1 (IL-12p70). Este ensaio tem reactividade para a subunidade IL-12p40 e, logo, detecta também IL-23 e IL-27, assim como homodímeros de IL-12p40. Estes homodímeros estão reportados como tendo uma actividade *in vitro* antagonista do efeito de IL-12p70 (Ling et al., 1995) podendo assim contrariar as propriedades polarizadoras desta citocina. O facto de a expressão da subunidade IL-12p40 não estar dependente de STAT1 (Gautier et al., 2005) poderá explicar a sua produção por estimulação TLR2. Pelo exposto, será necessário no futuro avaliar com um teste específico a produção de IL-12p70 por células dendríticas estimuladas com cada uma das formulações, incluindo também um controlo positivo apropriado.

Da análise da Figura 34 não sobressai uma correlação clara entre a expressão de mediadores, tanto citocinas como quimiocinas, induzida por cada uma das formulações e um perfil de polarização de resposta. Por outro lado, sugere a necessidade de analisar, no futuro, outros mediadores de forma a permitir aprofundar a interpretação dos resultados. Por

exemplo, a determinação dos níveis de TGF- β , citocina não contemplada no “array”, ajudaria a ajuizar sobre a capacidade destas formulações para induzir diferenciação no sentido Th17 e Treg. No entanto, os resultados observados neste ensaio permitirão orientar estudos futuros e oferecem um fundo sobre o qual esses resultados poderão vir a ser interpretados.

Capítulo 4. Conclusões gerais e perspectivas futuras

As duas principais subjacentes ao abandono dos anteriores sistemas baseados na OprI, a instabilidade dos plasmídeos devido a expressão basal e a dificuldade em obter os antígenos purificados, foram agora ultrapassadas. O novo sistema permite um apertado controlo da expressão de *oprI* e os vectores que o compõem possibilitam, no seu conjunto, a avaliação do processamento da lipoproteína, a produção de controlos não-lipidificados e a purificação dos produtos de fusão por cromatografia de afinidade com iões metálicos. Pela primeira vez, obteve-se uma caracterização da componente lipídica da OprI expressa em *Escherichia coli*, o que permitiu revelar a sua natureza triacilada e a identidade dos ácidos gordos envolvidos. Os resultados obtidos durante os processos de optimização da expressão e purificação da lipoproteína levaram-nos ainda a desenvolver protocolos para obtenção de outras duas formulações derivadas da parede da bactéria de expressão, fazendo uso da ancoragem dos antígenos heterólogos à membrana externa por meio da OprI.

As propriedades físicas distintas destas formulações e o seu diferente conteúdo em moléculas activadoras de PRR levaram-nos a admitir diferentes efeitos na estimulação de APC e perfis distintos na modulação de respostas *in vivo*. Iniciámos assim um conjunto de ensaios para uma primeira caracterização das propriedades imunomoduladoras de cada uma das formulações obtidas com o novo sistema. Dos resultados destes ensaios ficou evidente a capacidade adjuvante de OprI e OMF para indução de imunidade humoral, sendo de salientar a indução de níveis elevados de anticorpos com uma única inoculação de antígeno em fusão com OprI. Os resultados indicaram também capacidade de indução de respostas LTC, principalmente por OprI e OMF. O método usado revelou, no entanto, algumas limitações decorrentes da dificuldade de optimização da técnica associadas ao reduzido número de células a detectar. Os resultados obtidos serão no futuro reavaliados por outras metodologias que permitem avaliar a funcionalidade das células específicas desencadeadas por imunização. Nesses estudos deverá ser considerada a possibilidade de alteração da hierarquia de dominância de epitopos em consequência da fusão dos antígenos com OprI.

No que respeita às características de cada formulação na polarização de resposta, os resultados obtidos não permitem ilações definitivas. Se tanto OprI como OMF induziram anticorpos IgG2a, geralmente associados a polarização Th1, o resultado do ensaio de estimulação de células dendríticas obtido por “array” indicou fraca capacidade de indução de IL-12p70, citocina fundamental para a polarização da resposta nesse sentido, por qualquer das formulações, mas principalmente por OprI. No entanto, é difícil concluir sobre o significado biológico dos níveis observados para esta citocina uma vez que não foi possível utilizar no mesmo ensaio de “array” um controlo positivo que permitisse uma análise comparativa. Por outro lado, a capacidade de polarização não depende apenas de propriedades intrínsecas do

imunogénio ou adjuvante usado, mas também de factores como a dose e a via de administração (Eisenbarth et al., 2002; Kaiko et al., 2008). Será essencial, por isso, desenvolver no futuro estudos que permitam uma melhor caracterização do perfil de resposta obtido com cada formulação, por exemplo através de ensaios de polarização *in vitro* e de restimulação de esplenócitos de animais imunizados, em protocolos que incluam um leque mais alargado de condições, particularmente de doses e vias de administração, incluindo controlos apropriados que permitam dar significado biológico aos resultados observados.

Com efeito, esta área de estudo sobre os mecanismos básicos de relação entre estímulos de resposta inata e o desenvolvimento de respostas específicas é uma das possíveis aplicações futuras do novo sistema. Como se referiu anteriormente, o resultado da estimulação exercida via TLR2 e o tipo de resposta Th induzido é hoje um tema controverso. Recentemente, Leng et al. (2010) mostraram existir diferenças significativas no efeito obtido por estimulação de células dendríticas com o ligando sintético de TLR2 Pam₃CSK₄ e com uma lipoproteína de fusão composta pelo domínio N-terminal da lipoproteína Ag473 de *Neisseria meningitidis* e um domínio da proteína E3 do vírus do dengue. Nesse estudo demonstrou-se que a lipoproteína inicia a fosforilação de MAP cinases mais cedo do que o lipopéptido e induz níveis superiores de IL-23, IL-27 e MIP-1 α , o que poderá ter impacto no perfil de resposta desencadeado por um e outro ligando. Assim, tendo em conta as diferenças nas propriedades estimuladoras de diferentes ligandos de TLR2 e considerando que o papel de TLR2 enquanto receptor de algumas moléculas descritas inicialmente como seus ligandos não é consensual (Travassos et al., 2004; Zähringer et al., 2008), a fusão de antigénios com lipoproteínas bacterianas constitui uma estratégia com vasto potencial para o estudo do impacto da activação TLR2 no desencadeamento e modulação da resposta específica.

No mesmo sentido, a capacidade de conjugar antigénios heterólogos com estruturas capazes de estimular simultaneamente diferentes vias de activação, como se verifica na formulação OMF, pode contribuir para o estudo do impacto da sinergia no desenvolvimento de imunidade específica. Variações nos protocolos de preparação das OMF, designadamente na natureza dos detergentes usados na solubilização, podem resultar em diferentes níveis de LPS na formulação final e, em teoria, será também possível ajustar os protocolos para que esta formulação inclua fragmentos de peptidoglicano de forma a obter uma activação simultânea via NLR. Desta forma poderá ser equacionado explorar e caracterizar as interacções entre as vias de sinalização activadas através de TLR2 e NOD2 com impacto na polarização de linfócitos T que foram anteriormente demonstradas (Watanabe et al., 2004). Por outro lado, as OMV, sendo estruturas não replicativas mas que apresentam complexidade estrutural e molecular próxima da das membranas externas de bactérias Gram-negativas, têm

também potencial para serem usadas em estudos que abordem a activação complexa via PRR, por oposição a activação com agonistas únicos ou inoculados em combinações simples. Este tipo de estimulação simples, embora essencial para a compreensão dos efeitos obtidos através da activação de cada receptor, não reflecte a complexidade dos estímulos naturalmente encontrados em interacções hospedeiro-microrganismo. A capacidade de incluir antigénios modelo no contexto de OMV pode ser explorada em trabalhos sobre o impacto destes estímulos complexos nas respostas adaptativas.

O novo sistema baseado na OprI tem, no entanto, aplicação particular em estudos de protecção e caracterização de respostas imunitárias. As três formulações constituem modelos de vacinas subunitárias que podem servir de base a estudos que correlacionem as suas características moleculares com os perfis de resposta induzidos e os níveis de protecção observados em diferentes modelos de doenças infecciosas, podendo gerar desta forma conhecimento relevante para o desenvolvimento de novas vacinas. À luz dos novos conhecimentos sobre desencadeamento de respostas adaptativas estes imunogénios encontram também aplicação no âmbito de doenças oncológicas e distúrbios do foro imunológico, como alergias ou doenças auto-imunes, cujo combate pode beneficiar de abordagens preventivas ou terapêuticas baseadas na modulação de respostas imunitárias (Adams, 2009; Akdis et al., 2003; Asprodites et al., 2008; Baz et al., 2008; Lombardi et al., 2008; Murata, 2008; Pulendran et al., 2010).

A utilização dos vectores agora desenvolvidos noutras espécies bacterianas poderá ser também equacionada tendo em vista a sua exploração para o desenvolvimento de vacinas vivas recombinantes, para obtenção de OMV de bactérias que vesiculem mais abundantemente ou para exploração de propriedades imunomoduladoras de paredes celulares com propriedades diversas. Há no entanto que considerar que os genes se encontram sob o controlo de sinais de transcrição do fago T7, pelo que só poderão ser expressos em estirpes que possuam o gene codificador da RNA polimerase T7. Com o objectivo de alargar o espectro de espécies bacterianas aptas a expressarem genes clonados nestas condições, Kang et al. (2007) desenvolveram uma metodologia que utiliza um transposão com repetições “mariner” para a fácil integração da sequência da RNA polimerase do fago T7, sob o controlo de *lacUV5*, no genoma de bactérias hospedeiras. O transposão inclui também o gene da lisozima T7, à semelhança do plasmídeo pLysS usado neste trabalho na estirpe de expressão Rosetta(DE3), o que, em conjunto com a repressão pelo repressor *lac* do promotor *lacUV5*, deverá permitir o elevado controlo da expressão conseguido no nosso sistema.

Por outro lado, é hoje evidente que a activação PRR promove a apresentação antigénica em MHC classe II (Blander & Medzhitov, 2006) e foi também demonstrado que antigénios

em fusão com OprI veiculados no contexto de membranas externas (Leitão et al., 2000; Leitão et al., 1998), assim como antigénios co-administrados com OMV (Durand et al., 2009), entram na via de apresentação em MHC classe I. Assim, estas formulações servem como ferramentas para apresentação antigénica *in vitro* permitindo a identificação de reconhecimento imunitário específico tanto por linfócitos CD4⁺ como por linfócitos CD8⁺. Fazendo uso desta propriedade é possível o desenho de ensaios que visem a identificação de alvos de resposta imunitária reconhecidos, por exemplo, por linfócitos de animais sobreviventes a infecção (Leitão et al., 2000). Nos mesmos ensaios poder-se-á caracterizar o fenótipo dos linfócitos específicos, potencialmente relacionadas com protecção.

A este respeito, a clonagem do antigénio modelo OVA no sistema terá grande utilidade para avaliar a capacidade de apresentação directa e cruzada de cada formulação, aspecto relevante para este tipo de estudos, mas também para a caracterização das formulações enquanto adjuvantes de respostas imunitárias. Estes estudos beneficiarão da existência de estirpes transgénicas de ratinhos desenhadas para conterem linfócitos reconhedores de péptidos de OVA, bem como de hibridomas desenvolvidos com a mesma finalidade. Os ratinhos OT-I expressam cadeias α e β do TCR que originam receptores específicos para SIINFEKL no contexto de H2-K^b (MHC classe I) e ratinhos OT-II expressam cadeias α e β do TCR que, conjuntamente com a molécula CD4, reconhecem o péptido ISQAVHAAHAEINEAGR em contexto de I-A^b (MHC classe II) (Hogquist et al., 1994; McDonald et al., 2007; Pouniotis et al., 2011). O hibridoma de linfócitos T CD8⁺, designado B3Z, reconhece especificamente o epitopo SIINFEKL no contexto de H-2K^b e expressa β -galactosidase na sequência de activação, o que possibilita avaliar o reconhecimento específico daquele epitopo em MHC classe I através de uma reacção cromogénica (Shastri & Gonzalez, 1993). Assim, a capacidade de promover em células dendríticas a apresentação directa e cruzada dos antigénios heterólogos poderá ser avaliada para cada uma das formulações utilizando, no primeiro caso, linfócitos CD4⁺ de ratinhos OT-II e, no segundo, linfócitos CD8⁺ obtidos de ratinhos OT-I ou a linha celular B3Z.

O impacto das propriedades adjuvantes intrínsecas de cada formulação no desenvolvimento de imunidade anti-tumoral poderá ser também avaliado no futuro com recurso a linhas celulares tumorais transfectadas com plasmídeos codificadores de OVA, como E.G7 (derivada da linha celular EL4 de linfoma) e B16 (linha celular de melanoma), ambas do haplotipo de ratinhos C57BL/6 (Asprodites et al., 2008; Bettahi et al., 2009; Moriya et al., 2010; Murata, 2008; Narayanan et al., 2011).

Com o outro antigénio modelo já clonado no sistema, a proteína EGFP, pretende-se no futuro avaliar se a proteína mantém características de fluorescência que possibilitariam

estudos de localização intracelular dos imunogénios por microscopia. Um obstáculo a esta pretensão poderá ser o facto de a GFP transportada pela via Sec, o que previsivelmente ocorrerá quando em fusão com OprI, ser incapaz de enrolamento no periplasma devido ao ambiente redutor deste compartimento (Kesty & Kuehn, 2004). É possível, contudo, que a exposição extracelular da proteína ou o processo de purificação resultem em formulações com as características pretendidas. Se tal não se verificar, uma alternativa a considerar será a clonagem, num dos vectores do sistema, da proteína vermelha monomérica 1 (mRFP1, do inglês “monomeric red fluorescent protein”), proteína já utilizada com sucesso por Lewenza et al. (2006) em estudos de microscopia de fluorescência sobre os sinais de localização de lipoproteínas na membrana interna e externa de espécies da família *Enterobacteriaceae*.

Por fim, é de salientar que o sistema desenvolvido ao longo deste trabalho, para além das características apresentadas e discutidas anteriormente, tem a vantagem de assentar em metodologias hoje amplamente difundidas em laboratórios com equipamento básico de biologia molecular, o que possibilita o seu uso alargado em estudos de infecção e imunidade.

Bibliografia

- Abràmoff, M. D., Magalhães, P. J. & Ram, S. J. (2004). Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International*, 11(7), 36-42.
- Adams, M., Navabi, H., Jasani, B., Man, S., Fiander, A., Evans, A. S., Donninger, C. & Mason, M. (2003). Dendritic cell (DC) based therapy for cervical cancer: use of DC pulsed with tumour lysate and matured with a novel synthetic clinically non-toxic double stranded RNA analogue poly [I]:poly [C(12)U] (Ampligen R). *Vaccine*, 21(7-8), 787-790.
- Adams, S. (2009). Toll-like receptor agonists in cancer therapy. *Immunotherapy*, 1(6), 949-964.
- Agrawal, S., Agrawal, A., Doughty, B., Gerwitz, A., Blenis, J., Van Dyke, T. & Pulendran, B. (2003). Cutting edge: different Toll-like receptor agonists instruct dendritic cells to induce distinct Th responses via differential modulation of extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase and c-Fos. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 171(10), 4984-4989.
- Akdis, C. A., Kussebi, F., Pulendran, B., Akdis, M., Lauener, R. P., Schmidt-Weber, C. B., Klunker, S., Isitmangil, G., Hansjee, N., Wynn, T. A., Dillon, S., Erb, P., Baschang, G., Blaser, K. & Alkan, S. S. (2003). Inhibition of T helper 2-type responses, IgE production and eosinophilia by synthetic lipopeptides. *European Journal of Immunology*, 33(10), 2717-2726.
- Akira, S. (2003). Mammalian Toll-like receptors. *Current Opinion in Immunology*, 15(1), 5-11.
- Akira, S. (2009). Pathogen recognition by innate immunity and its signaling. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences*, 85(4), 143-156.
- Akira, S., Uematsu, S. & Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124(4), 783-801.
- Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R. & Flavell, R. A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*, 413(6857), 732-738.
- Aliahmadi, E., Gramlich, R., Grützkau, A., Hitzler, M., Krüger, M., Baumgrass, R., Schreiner, M., Wittig, B., Wanner, R. & Peiser, M. (2009). TLR2-activated human langerhans cells promote Th17 polarization via IL-1beta, TGF-beta and IL-23. *European Journal of Immunology*, 39(5), 1221-1230.
- Aliprantis, A. O., Yang, R. B., Mark, M. R., Suggett, S., Devaux, B., Radolf, J. D., Klimpel, G. R., Godowski, P. & Zychlinsky, A. (1999). Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science (New York, N.Y.)*, 285(5428), 736-739.
- Amsen, D., Spilianakis, C. G. & Flavell, R. A. (2009). How are T(H)1 and T(H)2 effector cells made? *Current Opinion in Immunology*, 21(2), 153-160.

- Andrieu, M., Loing, E., Desoutter, J. F., Connan, F., Choppin, J., Gras-Masse, H., Hanau, D., Dautry-Varsat, A., Guillet, J. G. & Hosmalin, A. (2000). Endocytosis of an HIV-derived lipopeptide into human dendritic cells followed by class I-restricted CD8+ T lymphocyte activation. *European Journal of Immunology*, 30(11), 3256-3265.
- Annunziato, F., Cosmi, L. & Romagnani, S. (2010). Human and murine Th17. *Current Opinion in HIV and AIDS*, 5(2), 114-119.
- Annunziato, F. & Romagnani, S. (2009). Heterogeneity of human effector CD4+ T cells. *Arthritis research & therapy*, 11(6), 257.
- Asprodites, N., Zheng, L., Geng, D., Velasco-Gonzalez, C., Sanchez-Perez, L. & Davila, E. (2008). Engagement of Toll-like receptor-2 on cytotoxic T-lymphocytes occurs in vivo and augments antitumor activity. *The FASEB Journal*, 22(10), 3628-3637.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y. J., Pulendran, B. & Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annual Review of Immunology*, 18, 767-811.
- Barton, G. M. & Medzhitov, R. (2002). Control of adaptive immune responses by Toll-like receptors. *Current Opinion in Immunology*, 14(3), 380-383.
- Baz, A., Buttigieg, K., Zeng, W., Rizkalla, M., Jackson, D. C., Groves, P. & Kelso, A. (2008). Branched and linear lipopeptide vaccines have different effects on primary CD4(+) and CD8(+) T-cell activation but induce similar tumor-protective memory CD8(+) T-cell responses. *Vaccine*, 26(21), 2570-2579.
- Bazin, H. (2003). A brief history of the prevention of infectious diseases by immunisations. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 26(5-6), 293-308.
- Bessler, W., Resch, K., Hancock, E. & Hantke, K. (1977). Induction of lymphocyte proliferation and membrane changes by lipopeptide derivatives of the lipoprotein from the outer membrane of *Escherichia coli*. *Zeitschrift Für Immunitätsforschung. Immunobiology*, 153(1), 11-22.
- Bessler, W. G., Cox, M., Lex, A., Suhr, B., Wiesmüller, K. H. & Jung, G. (1985a). Synthetic lipopeptide analogs of bacterial lipoprotein are potent polyclonal activators for murine B lymphocytes. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 135(3), 1900-1905.
- Bessler, W. G., Johnson, R. B., Wiesmüller, K. & Jung, G. (1982). B-lymphocyte mitogenicity in vitro of a synthetic lipopeptide fragment derived from bacterial lipoprotein. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift Für Physiologische Chemie*, 363(7), 767-770.
- Bessler, W. G., Suhr, B., Bühring, H. J., Müller, C. P., Wiesmüller, K. H., Becker, G. & Jung, G. (1985b). Specific antibodies elicited by antigen covalently linked to a synthetic adjuvant. *Immunobiology*, 170(3), 239-244.
- Bettahi, I., Dasgupta, G., Renaudet, O., Chentoufi, A. A., Zhang, X., Carpenter, D., Yoon, S., Dumy, P. & BenMohamed, L. (2009). Antitumor activity of a self-adjuvanting glycolipopeptide vaccine bearing B cell, CD4+ and CD8+ T cell epitopes. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII*, 58(2), 187-200.

- Bilsborough, J., George, T. C., Norment, A. & Viney, J. L. (2003). Mucosal CD8alpha+ DC, with a plasmacytoid phenotype, induce differentiation and support function of T cells with regulatory properties. *Immunology*, 108(4), 481-492.
- Blander, J. M. (2008). Phagocytosis and antigen presentation: a partnership initiated by Toll-like receptors. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 67 Suppl 3, iii44-49-iii44-49.
- Blander, J. M. & Medzhitov, R. (2004). Regulation of phagosome maturation by signals from Toll-like receptors. *Science (New York, N.Y.)*, 304(5673), 1014-1018.
- Blander, J. M. & Medzhitov, R. (2006). Toll-dependent selection of microbial antigens for presentation by dendritic cells. *Nature*, 440(7085), 808-812.
- Bohnenkamp, H. R., Papazisis, K. T., Burchell, J. M. & Taylor-Papadimitriou, J. (2007). Synergism of Toll-like receptor-induced interleukin-12p70 secretion by monocyte-derived dendritic cells is mediated through p38 MAPK and lowers the threshold of T-helper cell type 1 responses. *Cellular Immunology*, 247(2), 72-84.
- Borghesi, L. & Milcarek, C. (2007). Innate versus adaptive immunity: a paradigm past its prime? *Cancer Research*, 67(9), 3989-3993.
- Bosch, V. & Braun, V. (1973). Distribution of murein-lipoprotein between the cytoplasmic and outer membrane of *Escherichia coli*. *FEBS Letters*, 34(2), 307-310.
- Botos, I., Liu, L., Wang, Y., Segal, D. M. & Davies, D. R. (2009). The toll-like receptor 3:dsRNA signaling complex. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1789(9-10), 667-674.
- Brandt, M. E., Riley, B. S., Radolf, J. D. & Norgard, M. V. (1990). Immunogenic integral membrane proteins of *Borrelia burgdorferi* are lipoproteins. *Infection and Immunity*, 58(4), 983-991.
- Braun, V. (1975). Covalent lipoprotein from the outer membrane of *Escherichia coli*. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 415(3), 335-377.
- Braun, V. & Bosch, V. (1972). Sequence of the murein-lipoprotein and the attachment site of the lipid. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 28(1), 51-69.
- Braun, V. & Bosch, V. (1973). In vivo biosynthesis of murein-lipoprotein of the outer membrane of *E. coli*. *FEBS Letters*, 34(2), 302-306.
- Braun, V. & Hantke, K. (1975). Characterization of the free form of murein-lipoprotein from the outer membrane of *Escherichia coli* B/r. *FEBS Letters*, 60(1), 26-28.
- Braun, V. & Rehn, K. (1969). Chemical characterization, spatial distribution and function of a lipoprotein (murein-lipoprotein) of the *E. coli* cell wall. The specific effect of trypsin on the membrane structure. *Eur J Biochem*, 10(3), 426-438.
- Brightbill, H. D., Libraty, D. H., Krutzik, S. R., Yang, R. B., Belisle, J. T., Bleharski, J. R., Maitland, M., Norgard, M. V., Plevy, S. E., Smale, S. T., Brennan, P. J., Bloom, B. R., Godowski, P. J. & Modlin, R. L. (1999). Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science (New York, N.Y.)*, 285(5428), 732-736.

- Brinkmann, M. M., Spooner, E., Hoebe, K., Beutler, B., Ploegh, H. L. & Kim, Y.-M. (2007). The interaction between the ER membrane protein UNC93B and TLR3, 7, and 9 is crucial for TLR signaling. *The Journal of Cell Biology*, 177(2), 265-275.
- Britten, C. M., Janetzki, S., Ben-Porat, L., Clay, T. M., Kalos, M., Maecker, H., Odunsi, K., Pride, M., Old, L., Hoos, A. & Romero, P. (2009). Harmonization guidelines for HLA-peptide multimer assays derived from results of a large scale international proficiency panel of the Cancer Vaccine Consortium. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII*, 58(10), 1701-1713.
- Brüll, F., Mensink, R. P., van den Hurk, K., Duijvestijn, A. & Plat, J. (2010). TLR2 activation is essential to induce a Th1 shift in human peripheral blood mononuclear cells by plant stanols and plant sterols. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(5), 2951-2958.
- Burgdorf, S., Schölz, C., Kautz, A., Tampé, R. & Kurts, C. (2008). Spatial and mechanistic separation of cross-presentation and endogenous antigen presentation. *Nature Immunology*, 9(5), 558-566.
- Buwitt-Beckmann, U., Heine, H., Wiesmüller, K.-H., Jung, G., Brock, R., Akira, S. & Ulmer, A. J. (2005a). Toll-like receptor 6-independent signaling by diacylated lipopeptides. *European Journal of Immunology*, 35(1), 282-289.
- Buwitt-Beckmann, U., Heine, H., Wiesmüller, K.-H., Jung, G., Brock, R. & Ulmer, A. J. (2005b). Lipopeptide structure determines TLR2 dependent cell activation level. *The FEBS Journal*, 272(24), 6354-6364.
- Buwitt-Beckmann, U., Heine, H., Wiesmüller, K. H., Jung, G., Brock, R., Akira, S. & Ulmer, A. J. (2006). TLR1- and TLR6-independent recognition of bacterial lipopeptides. *The Journal of biological chemistry*, 281(14), 9049-9057.
- Cametti, C. (2008). Polyion-induced aggregation of oppositely charged liposomes and charged colloidal particles: the many facets of complex formation in low-density colloidal systems. *Chemistry and Physics of Lipids*, 155(2), 63-73.
- Casella, C. R. & Mitchell, T. C. (2008). Putting endotoxin to work for us: monophosphoryl lipid A as a safe and effective vaccine adjuvant. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 65(20), 3231-3240.
- Champlin, R. & Hunter, R. L. (1975). Studies on the composition of adjuvants which selectively enhance delayed-type hypersensitivity to lipid conjugated protein antigens. *Journal of immunology*, 114(1 Pt 1), 76-80.
- Chen, D. J., Osterrieder, N., Metzger, S. M., Buckles, E., Doody, A. M., DeLisa, M. P. & Putnam, D. (2010). Delivery of foreign antigens by engineered outer membrane vesicle vaccines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(7), 3099-3104.
- Chen, H.-W., Liu, S.-J., Liu, H.-H., Kwok, Y., Lin, C.-L., Lin, L.-H., Chen, M.-Y., Tsai, J.-P., Chang, L.-S., Chiu, F.-F., Lai, L.-w., Lian, W.-C., Yang, C.-Y., Hsieh, S.-Y., Chong, P. & Leng, C.-H. (2009). A novel technology for the production of a heterologous lipoprotein immunogen in high yield has implications for the field of vaccine design. *Vaccine*, 27(9), 1400-1409.

- Chua, B. Y., Eriksson, E. M., Brown, L. E., Zeng, W., Gowans, E. J., Torresi, J. & Jackson, D. C. (2008). A self-adjuvanting lipopeptide-based vaccine candidate for the treatment of hepatitis C virus infection. *Vaccine*, 26(37), 4866-4875.
- Chua, B. Y., Zeng, W., Lau, Y. F. & Jackson, D. C. (2007). Comparison of lipopeptide-based immunocontraceptive vaccines containing different lipid groups. *Vaccine*, 25(1), 92-101.
- Coban, C., Ishii, K. J., Kawai, T., Hemmi, H., Sato, S., Uematsu, S., Yamamoto, M., Takeuchi, O., Itagaki, S., Kumar, N., Horii, T. & Akira, S. (2005). Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. *The Journal of Experimental Medicine*, 201(1), 19-25.
- Coffman, R. L., Leberman, D. A. & Rothman, P. (1993). Mechanism and regulation of immunoglobulin isotype switching. *Advances in Immunology*, 54, 229-270.
- Coffman, R. L., Sher, A. & Seder, R. A. (2010). Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity*, 33(4), 492-503.
- Coon, J. & Hunter, R. (1973). Selective induction of delayed hypersensitivity by a lipid conjugated protein antigen which is localized in thymus dependent lymphoid tissue. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 110(1), 183-190.
- Coon, J. & Hunter, R. (1975). Properties of conjugated protein immunogens which selectively stimulate delayed-type hypersensitivity. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 114(5), 1518-1522.
- Cornelis, P. (2000). Expressing genes in different *Escherichia coli* compartments. *Current opinion in biotechnology*, 11(5), 450-454.
- Cornelis, P., Bouia, A., Belarbi, A., Guyonvarch, A., Kammerer, B., Hannaert, V. & Hubert, J. C. (1989). Cloning and analysis of the gene for the major outer membrane lipoprotein from *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, 3(3), 421-428.
- Cornelis, P., Sierra, J. C., Lim, A., Malur, A., Tungpradabkul, S., Tazka, H., Leitão, A., Martins, C. V., di Perna, C., Brys, L., De Baetseller, P. & Hamers, R. (1996). Development of new cloning vectors for the production of immunogenic outer membrane fusion proteins in *Escherichia coli*. *Bio/Technology (Nature Publishing Company)*, 14(2), 203-208.
- Cote-Sierra, J., Bredan, A., Toldos, C. M., Stijlemans, B., Brys, L., Cornelis, P., Segovia, M., de Baetselier, P. & Revets, H. (2002). Bacterial lipoprotein-based vaccines induce tumor necrosis factor-dependent type 1 protective immunity against *Leishmania major*. *Infection and Immunity*, 70(1), 240-248.
- Cote-Sierra, J., Jongert, E., Bredan, A., Gautam, D. C., Parkhouse, M., Cornelis, P., De Baetselier, P. & Revets, H. (1998). A new membrane-bound OprI lipoprotein expression vector. High production of heterologous fusion proteins in gram (-) bacteria and the implications for oral vaccination. *Gene*, 221(1), 25-34.
- Cottalorda, A., Mercier, B. C., Mbitikon-Kobo, F. M., Arpin, C., Teoh, D. Y. L., McMichael, A., Marvel, J. & Bonnefoy-Bérard, N. (2009). TLR2 engagement on memory CD8(+)

- T cells improves their cytokine-mediated proliferation and IFN-gamma secretion in the absence of Ag. *European Journal of Immunology*, 39(10), 2673-2681.
- Coutinho, A. & Poltorack, A. (2003). Innate immunity: from lymphocyte mitogens to Toll-like receptors and back. *Current Opinion in Immunology*, 15(6), 599-602.
- Crellin, N. K., Garcia, R. V., Hadisfar, O., Allan, S. E., Steiner, T. S. & Levings, M. K. (2005). Human CD4+ T cells express TLR5 and its ligand flagellin enhances the suppressive capacity and expression of FOXP3 in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 175(12), 8051-8059.
- Cullen, P. A., Lo, M., Bulach, D. M., Cordwell, S. J. & Adler, B. (2003). Construction and evaluation of a plasmid vector for the expression of recombinant lipoproteins in *Escherichia coli*. *Plasmid*, 49(1), 18-29.
- Cunningham, A. F., Khan, M., Ball, J., Toellner, K.-M., Serre, K., Mohr, E. & MacLennan, I. C. M. (2004). Responses to the soluble flagellar protein FliC are Th2, while those to FliC on *Salmonella* are Th1. *European Journal of Immunology*, 34(11), 2986-2995.
- Datta, S. K., Redecke, V., Prilliman, K. R., Takabayashi, K., Corr, M., Tallant, T., DiDonato, J., Dziarski, R., Akira, S., Schoenberger, S. P. & Raz, E. (2003). A subset of Toll-like receptor ligands induces cross-presentation by bone marrow-derived dendritic cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 170(8), 4102-4110.
- De Gassart, A., Camosseto, V., Thibodeau, J., Ceppi, M., Catalan, N., Pierre, P. & Gatti, E. (2008). MHC class II stabilization at the surface of human dendritic cells is the result of maturation-dependent MARCH I down-regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(9), 3491-3496.
- Decker, W. K. & Safdar, A. (2009). Bioimmunoadjuvants for the treatment of neoplastic and infectious disease: Coley's legacy revisited. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 20(4), 271-281.
- den Dunnen, J., Gringhuis, S. I. & Geijtenbeek, T. B. H. (2010). Dusting the sugar fingerprint: C-type lectin signaling in adaptive immunity. *Immunology Letters*, 128(1), 12-16.
- Deres, K., Schild, H., Wiesmuller, K. H., Jung, G. & Rammensee, H. G. (1989). In vivo priming of virus-specific cytotoxic T lymphocytes with synthetic lipopeptide vaccine. *Nature*, 342(6249), 561-564.
- Di Pucchio, T., Chatterjee, B., Smed-Sørensen, A., Clayton, S., Palazzo, A., Montes, M., Xue, Y., Mellman, I., Banchereau, J. & Connolly, J. E. (2008). Direct proteasome-independent cross-presentation of viral antigen by plasmacytoid dendritic cells on major histocompatibility complex class I. *Nature Immunology*, 9(5), 551-557.
- Didierlaurent, A. M., Morel, S., Lockman, L., Giannini, S. L., Bisteau, M., Carlsen, H., Kielland, A., Vosters, O., Vanderheyde, N., Schiavetti, F., Larocque, D., Van Mechelen, M. & Garçon, N. (2009). AS04, an aluminum salt- and TLR4 agonist-based adjuvant system, induces a transient localized innate immune response leading to enhanced adaptive immunity. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 183(10), 6186-6197.

- Diebold, S. S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S. & Reis e Sousa, C. (2004). Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science (New York, N.Y.)*, 303(5663), 1529-1531.
- Dillon, S., Agrawal, A., Van Dyke, T., Landreth, G., McCauley, L., Koh, A., Maliszewski, C., Akira, S. & Pulendran, B. (2004). A Toll-like receptor 2 ligand stimulates Th2 responses in vivo, via induction of extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase and c-Fos in dendritic cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 172(8), 4733-4743.
- Donnelly, J. J., Deck, R. R. & Liu, M. A. (1990). Immunogenicity of a *Haemophilus influenzae* polysaccharide-*Neisseria meningitidis* outer membrane protein complex conjugate vaccine. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 145(9), 3071-3079.
- Drabick, J. J., Brandt, B. L., Moran, E. E., Saunders, N. B., Shoemaker, D. R. & Zollinger, W. D. (1999). Safety and immunogenicity testing of an intranasal group B meningococcal native outer membrane vesicle vaccine in healthy volunteers. *Vaccine*, 18(1-2), 160-172.
- Duchêne, M., Barron, C., Schweizer, A., von Specht, B. U. & Domdey, H. (1989). *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane lipoprotein I gene: molecular cloning, sequence, and expression in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 171(8), 4130-4137.
- Durand, V., Mackenzie, J., de Leon, J., Mesa, C., Quesniaux, V., Montoya, M., Le Bon, A. & Wong, S. Y. C. (2009). Role of lipopolysaccharide in the induction of type I interferon-dependent cross-priming and IL-10 production in mice by meningococcal outer membrane vesicles. *Vaccine*, 27(13), 1912-1922.
- Durand, V., Wong, S. Y., Tough, D. F. & Le Bon, A. (2004). Shaping of adaptive immune responses to soluble proteins by TLR agonists: a role for IFN-alpha/beta. *Immunology and Cell Biology*, 82(6), 596-602.
- Durand, V., Wong, S. Y. C., Tough, D. F. & Le Bon, A. (2006). IFN-alpha/beta-dependent cross-priming induced by specific toll-like receptor agonists. *Vaccine*, 24 Suppl 2, S22-23-S22-22-23.
- Durward, M., Harms, J. & Splitter, G. (2010). Antigen specific killing assay using CFSE labeled target cells. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*(45).
- Edwards, A. D., Manickasingham, S. P., Spörri, R., Diebold, S. S., Schulz, O., Sher, A., Kaisho, T., Akira, S. & Reis e Sousa, C. (2002). Microbial recognition via Toll-like receptor-dependent and -independent pathways determines the cytokine response of murine dendritic cell subsets to CD40 triggering. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 169(7), 3652-3660.
- Eisenbarth, S. C., Piggott, D. A., Huleatt, J. W., Visintin, I., Herrick, C. A. & Bottomly, K. (2002). Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen. *The Journal of Experimental Medicine*, 196(12), 1645-1651.

- Ellis, T. N., Leiman, S. A. & Kuehn, M. J. (2010). Naturally Produced Outer Membrane Vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* Elicit a Potent Innate Immune Response via Combined Sensing of Both Lipopolysaccharide and Protein Components. *Infection and Immunity*, 78(9), 3822-3831.
- Faure-André, G., Vargas, P., Yuseff, M.-I., Heuzé, M., Diaz, J., Lankar, D., Steri, V., Manry, J., Hugues, S., Vascotto, F., Boulanger, J., Raposo, G., Bono, M.-R., Roseblatt, M., Piel, M. & Lennon-Duménil, A.-M. (2008). Regulation of dendritic cell migration by CD74, the MHC class II-associated invariant chain. *Science (New York, N.Y.)*, 322(5908), 1705-1710.
- Filip, C., Fletcher, G., Wulff, J. L. & Earhart, C. F. (1973). Solubilization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by the ionic detergent sodium-lauryl sarcosinate. *Journal of Bacteriology*, 115(3), 717-722.
- Fisseha, M., Chen, P., Brandt, B., Kijek, T., Moran, E. & Zollinger, W. (2005). Characterization of native outer membrane vesicles from lpxL mutant strains of *Neisseria meningitidis* for use in parenteral vaccination. *Infection and Immunity*, 73(7), 4070-4080.
- Forward, N. A., Furlong, S. J., Yang, Y., Lin, T.-J. & Hoskin, D. W. (2010). Signaling through TLR7 enhances the immunosuppressive activity of murine CD4+CD25+ T regulatory cells. *Journal of Leukocyte Biology*, 87(1), 117-125.
- Gahéry-Ségard, H., Pialoux, G., Charmeteau, B., Sermet, S., Poncelet, H., Raux, M., Tartar, A., Lévy, J. P., Gras-Masse, H. & Guillet, J. G. (2000). Multiepitopic B- and T-cell responses induced in humans by a human immunodeficiency virus type 1 lipopeptide vaccine. *Journal of Virology*, 74(4), 1694-1703.
- Gambotto, A., Dworacki, G., Cicinnati, V., Kenniston, T., Steitz, J., Tüting, T., Robbins, P. D. & DeLeo, A. B. (2000). Immunogenicity of enhanced green fluorescent protein (EGFP) in BALB/c mice: identification of an H2-Kd-restricted CTL epitope. *Gene Therapy*, 7(23), 2036-2040.
- Gartner, T., Baeten, M., Otieno, S., Revets, H., De Baetselier, P. & Huygen, K. (2007). Mucosal prime-boost vaccination for tuberculosis based on TLR triggering OprI lipoprotein from *Pseudomonas aeruginosa* fused to mycolyl-transferase Ag85A. *Immunology Letters*, 111(1), 26-35.
- Gautier, G., Humbert, M., Deauvieau, F., Scuiller, M., Hiscott, J., Bates, E. E. M., Trinchieri, G., Caux, C. & Garrone, P. (2005). A type I interferon autocrine-paracrine loop is involved in Toll-like receptor-induced interleukin-12p70 secretion by dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 201(9), 1435-1446.
- Gavin, A. L., Hoebe, K., Duong, B., Ota, T., Martin, C., Beutler, B. & Nemazee, D. (2006). Adjuvant-enhanced antibody responses in the absence of toll-like receptor signaling. *Science (New York, N.Y.)*, 314(5807), 1936-1938.
- Gerosa, F., Baldani-Guerra, B., Lyakh, L. A., Batoni, G., Esin, S., Winkler-Pickett, R. T., Consolaro, M. R., De Marchi, M., Giachino, D., Robbiano, A., Astegiano, M., Sambataro, A., Kastelein, R. A., Carra, G. & Trinchieri, G. (2008). Differential

- regulation of interleukin 12 and interleukin 23 production in human dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 205(6), 1447-1461.
- Ghielmetti, M., Reschner, A., Zwicker, M. & Padovan, E. (2005a). Synthetic bacterial lipopeptide analogs: structural requirements for adjuvanticity. *Immunobiology*, 210(2-4), 211-215.
- Ghielmetti, M., Zwicker, M., Ghielmetti, T., Simon, M. M., Villiger, P. M. & Padovan, E. (2005b). Synthetic bacterial lipopeptide analogs facilitate naive CD4+ T cell differentiation and enhance antigen-specific HLA-II-restricted responses. *European Journal of Immunology*, 35(8), 2434-2442.
- Gibson, J., Gow, N. & Wong, S. Y. C. (2010). Expression and Functions of Innate Pattern Recognition Receptors in T and B Cells. *Immunology, Endocrine & Metabolic Agents in Medicinal Chemistry*, 10(1), 11-20.
- Gil-Torregrosa, B. C., Lennon-Duménil, A. M., Kessler, B., Guermonprez, P., Ploegh, H. L., Fruci, D., van Endert, P. & Amigorena, S. (2004). Control of cross-presentation during dendritic cell maturation. *European Journal of Immunology*, 34(2), 398-407.
- Girardin, S. E., Boneca, I. G., Carneiro, L. A. M., Antignac, A., Jéhanno, M., Viala, J., Tedin, K., Taha, M.-K., Labigne, A., Zähringer, U., Coyle, A. J., DiStefano, P. S., Bertin, J., Sansonetti, P. J. & Philpott, D. J. (2003a). Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science (New York, N.Y.)*, 300(5625), 1584-1587.
- Girardin, S. E., Boneca, I. G., Viala, J., Chamaillard, M., Labigne, A., Thomas, G., Philpott, D. J. & Sansonetti, P. J. (2003b). Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(11), 8869-8872.
- Gorden, K. B., Gorski, K. S., Gibson, S. J., Kedl, R. M., Kieper, W. C., Qiu, X., Tomai, M. A., Alkan, S. S. & Vasilakos, J. P. (2005). Synthetic TLR agonists reveal functional differences between human TLR7 and TLR8. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 174(3), 1259-1268.
- Granoff, D. M. & Holmes, S. J. (1991). Comparative immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide-protein conjugate vaccines. *Vaccine*, 9 Suppl, S30-34; discussion S42-43-S30-34; discussion S42-43.
- Gringhuis, S. I., den Dunnen, J., Litjens, M., van Het Hof, B., van Kooyk, Y. & Geijtenbeek, T. B. H. (2007). C-type lectin DC-SIGN modulates Toll-like receptor signaling via Raf-1 kinase-dependent acetylation of transcription factor NF-kappaB. *Immunity*, 26(5), 605-616.
- Groothuis, T. A. M. & Neefjes, J. (2005). The many roads to cross-presentation. *The Journal of Experimental Medicine*, 202(10), 1313-1318.
- Gross, O., Gewies, A., Finger, K., Schäfer, M., Sparwasser, T., Peschel, C., Förster, I. & Ruland, J. (2006). Card9 controls a non-TLR signalling pathway for innate anti-fungal immunity. *Nature*, 442(7103), 651-656.

- Guernonprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Théry, C. & Amigorena, S. (2002). Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annual Review of Immunology*, 20, 621-667.
- Guthrie, T., Wong, S. Y., Liang, B., Hyland, L., Hou, S., Hoiby, E. A. & Andersen, S. R. (2004). Local and systemic antibody responses in mice immunized intranasally with native and detergent-extracted outer membrane vesicles from *Neisseria meningitidis*. *Infection and immunity*, 72(5), 2528-2537.
- Hantke, K. & Braun, V. (1973). Covalent binding of lipid to protein. Diglyceride and amide-linked fatty acid at the N-terminal end of the murein-lipoprotein of the *Escherichia coli* outer membrane. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 34(2), 284-296.
- Harrington, L. E., Hatton, R. D., Mangan, P. R., Turner, H., Murphy, T. L., Murphy, K. M. & Weaver, C. T. (2005). Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nature Immunology*, 6(11), 1123-1132.
- Harrison, J. L., Taylor, I. M. & O'Connor, C. D. (1990). Presentation of foreign antigenic determinants at the bacterial cell surface using the TraT lipoprotein. *Research in Microbiology*, 141(7-8), 1009-1012.
- Hart, D. N. (1997). Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood*, 90(9), 3245-3287.
- Hayashi, F., Smith, K. D., Ozinsky, A., Hawn, T. R., Yi, E. C., Goodlett, D. R., Eng, J. K., Akira, S., Underhill, D. M. & Aderem, A. (2001). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*, 410(6832), 1099-1103.
- Heil, F., Ahmad-Nejad, P., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Gellert, T., Dietrich, H., Lipford, G., Takeda, K., Akira, S., Wagner, H. & Bauer, S. (2003). The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily. *European Journal of Immunology*, 33(11), 2987-2997.
- Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H. & Bauer, S. (2004). Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science (New York, N.Y.)*, 303(5663), 1526-1529.
- Hemmi, H., Kaisho, T., Takeuchi, O., Sato, S., Sanjo, H., Hoshino, K., Horiuchi, T., Tomizawa, H., Takeda, K. & Akira, S. (2002). Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nature Immunology*, 3(2), 196-200.
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K. & Akira, S. (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*, 408(6813), 740-745.
- Higgins, D., Marshall, J. D., Traquina, P., Van Nest, G. & Livingston, B. D. (2007). Immunostimulatory DNA as a vaccine adjuvant. *Expert Review of Vaccines*, 6(5), 747-759.

- Hirashima, A., Wu, H. C., Venkateswaran, P. S. & Inouye, M. (1973). Two forms of a structural lipoprotein in the envelope of *Escherichia coli*. Further characterization of the free form. *The Journal of Biological Chemistry*, 248(16), 5654-5659.
- Hirschfeld, M., Kirschning, C. J., Schwandner, R., Wesche, H., Weis, J. H., Wooten, R. M. & Weis, J. J. (1999). Cutting edge: inflammatory signaling by *Borrelia burgdorferi* lipoproteins is mediated by toll-like receptor 2. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 163(5), 2382-2386.
- Hirschfeld, M., Weis, J. J., Toshchakov, V., Salkowski, C. A., Cody, M. J., Ward, D. C., Qureshi, N., Michalek, S. M. & Vogel, S. N. (2001). Signaling by toll-like receptor 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages. *Infection and Immunity*, 69(3), 1477-1482.
- Hoffmann, P., Heinle, S., Schade, U. F., Loppnow, H., Ulmer, A. J., Flad, H. D., Jung, G. & Bessler, W. G. (1988). Stimulation of human and murine adherent cells by bacterial lipoprotein and synthetic lipopeptide analogues. *Immunobiology*, 177(2), 158-170.
- Hoffmann, P., Wiesmüller, K. H., Metzger, J., Jung, G. & Bessler, W. G. (1989). Induction of tumor cytotoxicity in murine bone marrow-derived macrophages by two synthetic lipopeptide analogues. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, 370(6), 575-582.
- Hogquist, K. A., Jameson, S. C., Heath, W. R., Howard, J. L., Bevan, M. J. & Carbone, F. R. (1994). T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell*, 76(1), 17-27.
- Holst, J., Martin, D., Arnold, R., Huergo, C. C., Oster, P., O'Hallahan, J. & Rosenqvist, E. (2009). Properties and clinical performance of vaccines containing outer membrane vesicles from *Neisseria meningitidis*. *Vaccine*, 27 Suppl 2, B3-12-B13-12.
- Honko, A. N., Sriranganathan, N., Lees, C. J. & Mizel, S. B. (2006). Flagellin is an effective adjuvant for immunization against lethal respiratory challenge with *Yersinia pestis*. *Infection and Immunity*, 74(2), 1113-1120.
- Horzinek, M. C. (2011). Rinderpest: The second viral disease eradicated. *Veterinary Microbiology*, 149(3-4), 295-297.
- Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y., Takeda, K. & Akira, S. (1999). Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 162(7), 3749-3752.
- Hou, B., Reizis, B. & DeFranco, A. L. (2008). Toll-like receptors activate innate and adaptive immunity by using dendritic cell-intrinsic and -extrinsic mechanisms. *Immunity*, 29(2), 272-282.
- Huber, M., Baier, W., Bessler, W. G. & Heinevetter, L. (2002). Modulation of the Th1/Th2 Bias by Lipopeptide and Saponin Adjuvants in Orally Immunized Mice. *Immunobiology*, 205(1), 61-73.
- Huleatt, J. W., Jacobs, A. R., Tang, J., Desai, P., Kopp, E. B., Huang, Y., Song, L., Nakaar, V. & Powell, T. J. (2007). Vaccination with recombinant fusion proteins incorporating

- Toll-like receptor ligands induces rapid cellular and humoral immunity. *Vaccine*, 25(4), 763-775.
- Ichinohe, T., Watanabe, I., Ito, S., Fujii, H., Moriyama, M., Tamura, S.-I., Takahashi, H., Sawa, H., Chiba, J., Kurata, T., Sata, T. & Hasegawa, H. (2005). Synthetic double-stranded RNA poly(I:C) combined with mucosal vaccine protects against influenza virus infection. *Journal of Virology*, 79(5), 2910-2919.
- Imanishi, T., Hara, H., Suzuki, S., Suzuki, N., Akira, S. & Saito, T. (2007). Cutting edge: TLR2 directly triggers Th1 effector functions. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 178(11), 6715-6719.
- Ingulli, E. (2007). Tracing tolerance and immunity in vivo by CFSE-labeling of administered cells. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 380, 365-376.
- Inokuchi, K., Mutoh, N., Matsuyama, S. & Mizushima, S. (1982). Primary structure of the ompF gene that codes for a major outer membrane protein of *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Research*, 10(21), 6957-6968.
- Inouye, M., Shaw, J. & Shen, C. (1972). The assembly of a structural lipoprotein in the envelope of *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, 247(24), 8154-8159.
- Inouye, S., Takeishi, K., Lee, N., DeMartini, M., Hirashima, A. & Inouye, M. (1976). Lipoprotein from the outer membrane of *Escherichia coli*: purification, paracrystallization, and some properties of its free form. *Journal of Bacteriology*, 127(1), 555-563.
- Ishii, K., Kurita-Taniguchi, M., Aoki, M., Kimura, T., Kashiwazaki, Y., Matsumoto, M. & Seya, T. (2005). Gene-inducing program of human dendritic cells in response to BCG cell-wall skeleton (CWS), which reflects adjuvancy required for tumor immunotherapy. *Immunology Letters*, 98(2), 280-290.
- Ishii, K. J. & Akira, S. (2007). Toll or toll-free adjuvant path toward the optimal vaccine development. *Journal of Clinical Immunology*, 27(4), 363-371.
- Iwasaki, A. & Medzhitov, R. (2004). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nature Immunology*, 5(10), 987-995.
- Jackson, D. C., Lau, Y. F., Le, T., Suhrbier, A., Deliyannis, G., Cheers, C., Smith, C., Zeng, W. & Brown, L. E. (2004). A totally synthetic vaccine of generic structure that targets Toll-like receptor 2 on dendritic cells and promotes antibody or cytotoxic T cell responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(43), 15440-15445.
- Janeway, C. A. (1989). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 54 Pt 1, 1-13.
- Janeway, C. A., Jr. (1992). The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunology Today*, 13(1), 11-16.

- Jin, B., Sun, T., Yu, X.-H., Liu, C.-Q., Yang, Y.-X., Lu, P., Fu, S.-F., Qiu, H.-B. & Yeo, A. E. T. (2010). Immunomodulatory effects of dsRNA and its potential as vaccine adjuvant. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2010, 690438-690438.
- Jin, M. S., Kim, S. E., Heo, J. Y., Lee, M. E., Kim, H. M., Paik, S. G., Lee, H. & Lee, J. O. (2007). Crystal Structure of the TLR1-TLR2 Heterodimer Induced by Binding of a Tri-Acylated Lipopeptide. *Cell*, 130(6), 1071-1082.
- Jin, M. S. & Lee, J. O. (2008). Structures of TLR-ligand complexes. *Current opinion in immunology*, 20(4), 414-419.
- Johnson, A. G., Gaines, S. & Landy, M. (1956). Studies on the O antigen of *Salmonella typhosa*. V. Enhancement of antibody response to protein antigens by the purified lipopolysaccharide. *The Journal of Experimental Medicine*, 103(2), 225-246.
- Jurk, M., Heil, F., Vollmer, J., Schetter, C., Krieg, A. M., Wagner, H., Lipford, G. & Bauer, S. (2002). Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *Nature Immunology*, 3(6), 499-499.
- Kaiko, G. E., Horvat, J. C., Beagley, K. W. & Hansbro, P. M. (2008). Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response? *Immunology*, 123(3), 326-338.
- Kaisho, T. (2010). Molecular mechanisms for plasmacytoid dendritic cell function and development. *Vaccine*, 28(50), 8046-8047.
- Kamalakkannan, S., Murugan, V., Jagannadham, M. V., Nagaraj, R. & Sankaran, K. (2004). Bacterial lipid modification of proteins for novel protein engineering applications. *Protein Engineering, Design & Selection: PEDS*, 17(10), 721-729.
- Kang, Y., Son, M. S. & Hoang, T. T. (2007). One step engineering of T7-expression strains for protein production: Increasing the host-range of the T7-expression system. *Protein Expression and Purification*. 55(2), 325-333.
- Kanneganti, T.-D., Lamkanfi, M. & Núñez, G. (2007). Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease. *Immunity*, 27(4), 549-559.
- Kapsenberg, M. L. (2003). Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nature Reviews Immunology*, 3(12), 984-993.
- Katial, R. K., Brandt, B. L., Moran, E. E., Marks, S., Agnello, V. & Zollinger, W. D. (2002). Immunogenicity and safety testing of a group B intranasal meningococcal native outer membrane vesicle vaccine. *Infection and Immunity*, 70(2), 702-707.
- Kawai, T. & Akira, S. (2009). The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *International Immunology*, 21(4), 317-337.
- Kawai, T. & Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature Immunology*, 11(5), 373-384.
- Keenan, J. I., Rijpkema, S. G., Durrani, Z. & Roake, J. A. (2003). Differences in immunogenicity and protection in mice and guinea pigs following intranasal

- immunization with *Helicobacter pylori* outer membrane antigens. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 36(3), 199-205.
- Kesty, N. C. & Kuehn, M. J. (2004). Incorporation of heterologous outer membrane and periplasmic proteins into *Escherichia coli* outer membrane vesicles. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(3), 2069-2076.
- Khan, S., Bijker, M. S., Weterings, J. J., Tanke, H. J., Adema, G. J., van Hall, T., Drijfhout, J. W., Melief, C. J. M., Overkleeft, H. S., van der Marel, G. A., Filippov, D. V., van der Burg, S. H. & Ossendorp, F. (2007). Distinct uptake mechanisms but similar intracellular processing of two different toll-like receptor ligand-peptide conjugates in dendritic cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(29), 21145-21159.
- Kim, H. M., Park, B. S., Kim, J.-I., Kim, S. E., Lee, J., Oh, S. C., Enkhbayar, P., Matsushima, N., Lee, H., Yoo, O. J. & Lee, J.-O. (2007). Crystal structure of the TLR4-MD-2 complex with bound endotoxin antagonist Eritoran. *Cell*, 130(5), 906-917.
- Kiura, K., Kataoka, H., Yasuda, M., Inoue, N. & Shibata, K.-i. (2006). The diacylated lipopeptide FSL-1 induces TLR2-mediated Th2 responses. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 48(1), 44-55.
- Koeberling, O., Giuntini, S., Seubert, A. & Granoff, D. M. (2009). Meningococcal outer membrane vesicle vaccines derived from mutant strains engineered to express factor H binding proteins from antigenic variant groups 1 and 2. *Clinical and Vaccine Immunology: CVI*, 16(2), 156-162.
- Koeberling, O., Seubert, A. & Granoff, D. M. (2008). Bactericidal antibody responses elicited by a meningococcal outer membrane vesicle vaccine with overexpressed factor H-binding protein and genetically attenuated endotoxin. *The Journal of Infectious Diseases*, 198(2), 262-270.
- Kono, H. & Rock, K. L. (2008). How dying cells alert the immune system to danger. *Nature Reviews Immunology*, 8(4), 279-289.
- Kostense, S., Vandenberghe, K., Joling, J., Van Baarle, D., Nanlohy, N., Manting, E. & Miedema, F. (2002). Persistent numbers of tetramer+ CD8(+) T cells, but loss of interferon-gamma+ HIV-specific T cells during progression to AIDS. *Blood*, 99(7), 2505-2511.
- Kovacs-Simon, A., Titball, R. W. & Michell, S. L. (2011). Lipoproteins of bacterial pathogens. *Infection and immunity*, 79(2), 548-561.
- Kuehn, M. J. & Kesty, N. C. (2005). Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. *Genes & Development*, 19(22), 2645-2655.
- Kufer, T. A., Banks, D. J. & Philpott, D. J. (2006). Innate immune sensing of microbes by Nod proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1072, 19-27.
- Kumagai, Y. & Akira, S. (2010). Identification and functions of pattern-recognition receptors. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(5), 985-992.

- Kumar, H., Kawai, T. & Akira, S. (2009a). Pathogen recognition in the innate immune response. *The Biochemical Journal*, 420(1), 1-16.
- Kumar, H., Kawai, T. & Akira, S. (2009b). Toll-like receptors and innate immunity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 388(4), 621-625.
- Kurts, C., Kosaka, H., Carbone, F. R., Miller, J. F. & Heath, W. R. (1997). Class I-restricted cross-presentation of exogenous self-antigens leads to deletion of autoreactive CD8(+) T cells. *The Journal of experimental medicine*, 186(2), 239-245.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- Lai, J. S. & Wu, H. C. (1980). Incorporation of acyl moieties of phospholipids into murein lipoprotein in intact cells of *Escherichia coli* by phospholipid vesicle fusion. *Journal of Bacteriology*, 144(1), 451-453.
- Lai, S. H., Philbrick, W. M. & Wu, H. C. (1980). Acyl moieties in phospholipids are the precursors for the fatty acids in murein lipoprotein of *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry*, 255(11), 5384-5387.
- Langenkamp, A., Messi, M., Lanzavecchia, A. & Sallusto, F. (2000). Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. *Nature Immunology*, 1(4), 311-316.
- Larangé, A., Antonios, D., Pallardy, M. & Kerdine-Römer, S. (2009). TLR7 and TLR8 agonists trigger different signaling pathways for human dendritic cell maturation. *Journal of Leukocyte Biology*, 85(4), 673-683.
- Latz, E., Franko, J., Golenbock, D. T. & Schreiber, J. R. (2004). *Haemophilus influenzae* type b-outer membrane protein complex glycoconjugate vaccine induces cytokine production by engaging human toll-like receptor 2 (TLR2) and requires the presence of TLR2 for optimal immunogenicity. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 172(4), 2431-2438.
- Lau, Y. F., Deliyannis, G., Zeng, W., Mansell, A., Jackson, D. C. & Brown, L. E. (2006). Lipid-containing mimetics of natural triggers of innate immunity as CTL-inducing influenza vaccines. *International Immunology*, 18(12), 1801-1813.
- Lebre, M. C., Antons, J. C., Kalinski, P., Schuitemaker, J. H. N., van Capel, T. M. M., Kapsenberg, M. L. & De Jong, E. C. (2003). Double-stranded RNA-exposed human keratinocytes promote Th1 responses by inducing a Type-1 polarized phenotype in dendritic cells: role of keratinocyte-derived tumor necrosis factor alpha, type I interferons, and interleukin-18. *The Journal of Investigative Dermatology*, 120(6), 990-997.
- Lebre, M. C., Burwell, T., Vieira, P. L., Lora, J., Coyle, A. J., Kapsenberg, M. L., Clausen, B. E. & De Jong, E. C. (2005). Differential expression of inflammatory chemokines by Th1- and Th2-cell promoting dendritic cells: a role for different mature dendritic cell populations in attracting appropriate effector cells to peripheral sites of inflammation. *Immunology and Cell Biology*, 83(5), 525-535.

- Lee, J., Chuang, T.-H., Redecke, V., She, L., Pitha, P. M., Carson, D. A., Raz, E. & Cottam, H. B. (2003). Molecular basis for the immunostimulatory activity of guanine nucleoside analogs: activation of Toll-like receptor 7. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(11), 6646-6651.
- LeibundGut-Landmann, S., Gross, O., Robinson, M. J., Osorio, F., Slack, E. C., Tsoni, S. V., Schweighoffer, E., Tybulewicz, V., Brown, G. D., Ruland, J. & Reis e Sousa, C. (2007). Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. *Nature Immunology*, 8(6), 630-638.
- Leitão, A., Malur, A., Cartaxeiro, C., Vasco, G., Cruz, B., Cornelis, P. & Martins, C. L. (2000). Bacterial lipoprotein based expression vectors as tools for the characterisation of African swine fever virus (ASFV) antigens. *Archives of Virology*, 145(8), 1639-1657.
- Leitão, A., Malur, A., Cornelis, P. & Martins, C. L. (1998). Identification of a 25-aminoacid sequence from the major African swine fever virus structural protein VP72 recognised by porcine cytotoxic T lymphocytes using a lipoprotein based expression system. *Journal of Virological Methods*, 75(1), 113-119.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M. & Hoffmann, J. A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*, 86(6), 973-983.
- Leng, C.-H., Chen, H.-W., Chang, L.-S., Liu, H.-H., Liu, H.-Y., Sher, Y.-P., Chang, Y.-W., Lien, S.-P., Huang, T.-Y., Chen, M.-Y., Chou, A.-H., Chong, P. & Liu, S.-J. (2010). A recombinant lipoprotein containing an unsaturated fatty acid activates NF-kappaB through the TLR2 signaling pathway and induces a differential gene profile from a synthetic lipopeptide. *Molecular Immunology*, 47(11-12), 2015-2021.
- Lewenza, S., Vidal-Ingigliardi, D. & Pugsley, A. P. (2006). Direct visualization of red fluorescent lipoproteins indicates conservation of the membrane sorting rules in the family Enterobacteriaceae. *Journal of Bacteriology*, 188(10), 3516-3524.
- Liang, M. D., Bagchi, A., Warren, H. S., Tehan, M. M., Trigilio, J. A., Beasley-Topliffe, L. K., Tesini, B. L., Lazzaroni, J.-C., Fenton, M. J. & Hellman, J. (2005). Bacterial peptidoglycan-associated lipoprotein: a naturally occurring toll-like receptor 2 agonist that is shed into serum and has synergy with lipopolysaccharide. *The Journal of Infectious Diseases*, 191(6), 939-948.
- Lien, E., Sellati, T. J., Yoshimura, A., Flo, T. H., Rawadi, G., Finberg, R. W., Carroll, J. D., Espevik, T., Ingalls, R. R., Radolf, J. D. & Golenbock, D. T. (1999). Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(47), 33419-33425.
- Lindblad, E. B. (2000). Freund's Adjuvants. In D. T. O'Hagan (Ed.), *Vaccine Adjuvants* (Vol. 42, pp. 49-63). New Jersey: Humana Press.
- Lindblad, E. B., Elhay, M. J., Silva, R., Appelberg, R. & Andersen, P. (1997). Adjuvant modulation of immune responses to tuberculosis subunit vaccines. *Infection and Immunity*, 65(2), 623-629.

- Ling, P., Gately, M. K., Gubler, U., Stern, A. S., Lin, P., Hollfelder, K., Su, C., Pan, Y. C. & Hakimi, J. (1995). Human IL-12 p40 homodimer binds to the IL-12 receptor but does not mediate biologic activity. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 154(1), 116-127.
- Link, C., Gavioli, R., Ebensen, T., Canella, A., Reinhard, E. & Guzmán, C. A. (2004). The Toll-like receptor ligand MALP-2 stimulates dendritic cell maturation and modulates proteasome composition and activity. *European Journal of Immunology*, 34(3), 899-907.
- Liu, G., Zhang, L. & Zhao, Y. (2010). Modulation of immune responses through direct activation of Toll-like receptors to T cells. *Clinical and Experimental Immunology*, 160(2), 168-175.
- Liu, H., Komai-Koma, M., Xu, D. & Liew, F. Y. (2006). Toll-like receptor 2 signaling modulates the functions of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(18), 7048-7053.
- Lombardi, V., Van Overtvelt, L., Horiot, S., Moussu, H., Chabre, H., Louise, A., Balazuc, A. M., Mascarell, L. & Moingeon, P. (2008). Toll-like receptor 2 agonist Pam3CSK4 enhances the induction of antigen-specific tolerance via the sublingual route. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 38(11), 1819-1829.
- Longhi, M. P., Trumfheller, C., Idoyaga, J., Caskey, M., Matos, I., Kluger, C., Salazar, A. M., Colonna, M. & Steinman, R. M. (2009). Dendritic cells require a systemic type I interferon response to mature and induce CD4⁺ Th1 immunity with poly IC as adjuvant. *The Journal of Experimental Medicine*, 206(7), 1589-1602.
- Loots, K., Revets, H. & Goddeeris, B. M. (2008). Attachment of the outer membrane lipoprotein (OprI) of *Pseudomonas aeruginosa* to the mucosal surfaces of the respiratory and digestive tract of chickens. *Vaccine*, 26(4), 546-551.
- Lund, J. M., Alexopoulou, L., Sato, A., Karow, M., Adams, N. C., Gale, N. W., Iwasaki, A. & Flavell, R. A. (2004). Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(15), 5598-5603.
- Ma, X., Chow, J. M., Gri, G., Carra, G., Gerosa, F., Wolf, S. F., Dzialo, R. & Trinchieri, G. (1996). The interleukin 12 p40 gene promoter is primed by interferon gamma in monocytic cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 183(1), 147-157.
- Ma, X., Serna, A., Xu, R.-H. & Sigal, L. J. (2009). The amino acid sequences flanking an antigenic determinant can strongly affect MHC class I cross-presentation without altering direct presentation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 182(8), 4601-4607.
- Madan Babu, M. & Sankaran, K. (2002). DOLOP--database of bacterial lipoproteins. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 18(4), 641-643.
- Magnuson, K., Jackowski, S., Rock, C. O. & Cronan, J. E., Jr. (1993). Regulation of fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli*. *Microbiological Reviews*, 57(3), 522-542.

- Mancuso, G., Gambuzza, M., Midiri, A., Biondo, C., Papasergi, S., Akira, S., Teti, G. & Beninati, C. (2009). Bacterial recognition by TLR7 in the lysosomes of conventional dendritic cells. *Nature Immunology*, 10(6), 587-594.
- Manicassamy, S. & Pulendran, B. (2009). Modulation of adaptive immunity with Toll-like receptors. *Seminars in Immunology*, 21(4), 185-193.
- Manickasingham, S. P., Edwards, A. D., Schulz, O. & Reis e Sousa, C. (2003). The ability of murine dendritic cell subsets to direct T helper cell differentiation is dependent on microbial signals. *European Journal of Immunology*, 33(1), 101-107.
- Martin, M., Schifferle, R. E., Cuesta, N., Vogel, S. N., Katz, J. & Michalek, S. M. (2003). Role of the phosphatidylinositol 3 kinase-Akt pathway in the regulation of IL-10 and IL-12 by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 171(2), 717-725.
- Martinon, F., Gras-Masse, H., Boutillon, C., Chirat, F., Deprez, B., Guillet, J. G., Gomard, E., Tartar, A. & Levy, J. P. (1992). Immunization of mice with lipopeptides bypasses the prerequisite for adjuvant. Immune response of BALB/c mice to human immunodeficiency virus envelope glycoprotein. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 149(10), 3416-3422.
- Martins, C. L. & Leitão, A. C. (1994). Porcine immune responses to African swine fever virus (ASFV) infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 43(1-3), 99-106.
- Massari, P., Henneke, P., Ho, Y., Latz, E., Golenbock, D. T. & Wetzler, L. M. (2002). Cutting edge: Immune stimulation by neisserial porins is toll-like receptor 2 and MyD88 dependent. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 168(4), 1533-1537.
- Mata-Haro, V., Cekic, C., Martin, M., Chilton, P. M., Casella, C. R. & Mitchell, T. C. (2007). The Vaccine Adjuvant Monophosphoryl Lipid A as a TRIF-Biased Agonist of TLR4. *Science*, 316(5831), 1628-1632.
- McDonald, W. F., Huleatt, J. W., Foellmer, H. G., Hewitt, D., Tang, J., Desai, P., Price, A., Jacobs, A., Takahashi, V. N., Huang, Y., Nakaar, V., Alexopoulou, L., Fikrig, E. & Powell, T. J. (2007). A West Nile virus recombinant protein vaccine that coactivates innate and adaptive immunity. *The Journal of infectious diseases*, 195(11), 1607-1617.
- Mechnikov, I. (1908). "Ilya Mechnikov - Nobel Lecture" Retrieved Mar. 1, 2011, from http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1908/mechnikov-lecture.html
- Medzhitov, R. (2009). Approaching the asymptote: 20 years later. *Immunity*, 30(6), 766-775.
- Medzhitov, R. (2010). Innate immunity: quo vadis? *Nature Immunology*, 11(7), 551-553.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. & Janeway, C. A. (1997). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, 388(6640), 394-397.
- Meier, A., Alter, G., Frahm, N., Sidhu, H., Li, B., Bagchi, A., Teigen, N., Streeck, H., Stellbrink, H.-J., Hellman, J., van Lunzen, J. & Altfeld, M. (2007). MyD88-dependent

- immune activation mediated by human immunodeficiency virus type 1-encoded Toll-like receptor ligands. *Journal of Virology*, 81(15), 8180-8191.
- Melchers, F., Braun, V. & Galanos, C. (1975). The lipoprotein of the outer membrane of *Escherichia coli*: a B-lymphocyte mitogen. *The Journal of Experimental Medicine*, 142(2), 473-482.
- Meng, G., Grabiec, A., Vallon, M., Ebe, B., Hampel, S., Bessler, W., Wagner, H. & Kirschning, C. J. (2003). Cellular recognition of tri-/di-palmitoylated peptides is independent from a domain encompassing the N-terminal seven leucine-rich repeat (LRR)/LRR-like motifs of TLR2. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(41), 39822-39829.
- Mercier, B. C., Cottalorda, A., Coupet, C.-A., Marvel, J. & Bonnefoy-Bérard, N. (2009). TLR2 engagement on CD8 T cells enables generation of functional memory cells in response to a suboptimal TCR signal. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 182(4), 1860-1867.
- Metzger, J. W., Beck-Sickinger, A. G., Loleit, M., Eckert, M., Bessler, W. G. & Jung, G. (1995). Synthetic S-(2,3-dihydroxypropyl)-cysteinyl peptides derived from the N-terminus of the cytochrome subunit of the photoreaction centre of *Rhodospseudomonas viridis* enhance murine splenocyte proliferation. *Journal of Peptide Science: An Official Publication of the European Peptide Society*, 1(3), 184-190.
- Miao, E. A., Alpuche-Aranda, C. M., Dors, M., Clark, A. E., Bader, M. W., Miller, S. I. & Aderem, A. (2006). Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1beta via Ipaf. *Nature Immunology*, 7(6), 569-575.
- Mitchell, D., Yong, M., Schroder, W., Black, M., Tirrell, M. & Olive, C. (2010). Dual stimulation of MyD88-dependent Toll-like receptors induces synergistically enhanced production of inflammatory cytokines in murine bone marrow-derived dendritic cells. *The Journal of Infectious Diseases*, 202(2), 318-329.
- Miyake, K. (2007). Innate immune sensing of pathogens and danger signals by cell surface Toll-like receptors. *Seminars in Immunology*, 19(1), 3-10.
- Mizel, S. B. & Bates, J. T. (2010). Flagellin as an adjuvant: cellular mechanisms and potential. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 185(10), 5677-5682.
- Mizuno, T. & Kageyama, M. (1978). Separation and characterization of the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biochemistry*, 84(1), 179-191.
- Mizuno, T. & Kageyama, M. (1979). Isolation and characterization of a major outer membrane protein of *Pseudomonas aeruginosa*. Evidence for the occurrence of a lipoprotein. *Journal of Biochemistry*, 85(1), 115-122.
- Molofsky, A. B., Byrne, B. G., Whitfield, N. N., Madigan, C. A., Fuse, E. T., Tateda, K. & Swanson, M. S. (2006). Cytosolic recognition of flagellin by mouse macrophages restricts *Legionella pneumophila* infection. *The Journal of Experimental Medicine*, 203(4), 1093-1104.

- Moriya, K., Wakabayashi, A., Shimizu, M., Tamura, H., Dan, K. & Takahashi, H. (2010). Induction of tumor-specific acquired immunity against already established tumors by selective stimulation of innate DEC-205(+) dendritic cells. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII*, 59(7), 1083-1095.
- Mortellaro, A. & Ricciardi-Castagnoli, P. (2011). From vaccine practice to vaccine science: the contribution of human immunology to the prevention of infectious disease. *Immunology and Cell Biology*, 89(3), 332-339.
- Mouriès, J., Moron, G., Schlecht, G., Escriou, N., Dadaglio, G. & Leclerc, C. (2008). Plasmacytoid dendritic cells efficiently cross-prime naive T cells in vivo after TLR activation. *Blood*, 112(9), 3713-3722.
- Moyle, P. M. & Toth, I. (2008). Self-adjuvanting lipopeptide vaccines. *Current Medicinal Chemistry*, 15(5), 506-516.
- Mühlradt, P. F., Kiess, M., Meyer, H., Süßmuth, R. & Jung, G. (1997). Isolation, structure elucidation, and synthesis of a macrophage stimulatory lipopeptide from *Mycoplasma fermentans* acting at picomolar concentration. *The Journal of Experimental Medicine*, 185(11), 1951-1958.
- Müller, M. R., Wiesmüller, K. H., Jung, G., Loop, T., Humar, M., Pfannes, S. D. C., Bessler, W. G. & Mittenbühler, K. (2002). Lipopeptide adjuvants: monitoring and comparison of P3CSK4- and LPS-induced gene transcription. *International Immunopharmacology*, 2(8), 1065-1077.
- Müller, S. D. C., Müller, M. R., Huber, M., Esche Uv, U. v. d., Kirschning, C. J., Wagner, H., Bessler, W. G. & Mittenbühler, K. (2004). Triacyl-lipopentapeptide adjuvants: TLR2-dependent activation of macrophages and modulation of receptor-mediated cell activation by altering acyl-moieties. *International Immunopharmacology*, 4(10-11), 1287-1300.
- Murata, M. (2008). Activation of Toll-like receptor 2 by a novel preparation of cell wall skeleton from *Mycobacterium bovis* BCG Tokyo (SMP-105) sufficiently enhances immune responses against tumors. *Cancer Science*, 99(7), 1435-1440.
- Napolitani, G., Rinaldi, A., Bertoni, F., Sallusto, F. & Lanzavecchia, A. (2005). Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells. *Nature Immunology*, 6(8), 769-776.
- Narayanan, P., Lapteva, N., Seethammagari, M., Levitt, J. M., Slawin, K. M. & Spencer, D. M. (2011). A composite MyD88/CD40 switch synergistically activates mouse and human dendritic cells for enhanced antitumor efficacy. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(4), 1524-1534.
- Nardelli, B., Haser, P. B. & Tam, J. P. (1994). Oral administration of an antigenic synthetic lipopeptide (MAP-P3C) evokes salivary antibodies and systemic humoral and cellular responses. *Vaccine*, 12(14), 1335-1339.
- Navabi, H., Jasani, B., Reece, A., Clayton, A., Tabi, Z., Donninger, C., Mason, M. & Adams, M. (2009). A clinical grade poly I:C-analogue (Ampligen) promotes optimal DC

- maturation and Th1-type T cell responses of healthy donors and cancer patients in vitro. *Vaccine*, 27(1), 107-115.
- Netea, M. G., Ferwerda, G., de Jong, D. J., Jansen, T., Jacobs, L., Kramer, M., Naber, T. H. J., Drenth, J. P. H., Girardin, S. E., Kullberg, B. J., Adema, G. J. & Van der Meer, J. W. M. (2005). Nucleotide-binding oligomerization domain-2 modulates specific TLR pathways for the induction of cytokine release. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 174(10), 6518-6523.
- O'Hagan, D. T. & De Gregorio, E. (2009). The path to a successful vaccine adjuvant--'the long and winding road'. *Drug Discovery Today*, 14(11-12), 541-551.
- Okusawa, T., Fujita, M., Nakamura, J.-I., Into, T., Yasuda, M., Yoshimura, A., Hara, Y., Hasebe, A., Golenbock, D. T., Morita, M., Kuroki, Y., Ogawa, T. & Shibata, K.-I. (2004). Relationship between structures and biological activities of mycoplasmal diacylated lipopeptides and their recognition by toll-like receptors 2 and 6. *Infection and Immunity*, 72(3), 1657-1665.
- Olitsky, P. K. & Yager, R. H. (1949). Experimental disseminated encephalomyelitis in white mice. *The Journal of Experimental Medicine*, 90(3), 213-224.
- Oursel, D., Loutelier-Bourhis, C., Orange, N., Chevalier, S., Norris, V. & Lange, C. M. (2007). Identification and relative quantification of fatty acids in *Escherichia coli* membranes by gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM*, 21(20), 3229-3233.
- Palm, N. W. & Medzhitov, R. (2009). Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. *Immunological Reviews*, 227(1), 221-233.
- Park, B. S., Song, D. H., Kim, H. M., Choi, B. S., Lee, H. & Lee, J. O. (2009). The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature*, 458(7242), 1191-1195.
- Pasare, C. & Medzhitov, R. (2005). Control of B-cell responses by Toll-like receptors. *Nature*, 438(7066), 364-368.
- Peng, G., Guo, Z., Kiniwa, Y., Voo, K. S., Peng, W., Fu, T., Wang, D. Y., Li, Y., Wang, H. Y. & Wang, R.-F. (2005). Toll-like receptor 8-mediated reversal of CD4+ regulatory T cell function. *Science (New York, N.Y.)*, 309(5739), 1380-1384.
- Piedade, J. (2003). *Expressão em Escherichia coli da proteína Nef do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (VIH-1) como produto de fusão com a lipoproteína OprI da membrana externa de Pseudomonas aeruginosa e indução de imunidade humoral anti-Nef em modelo animal*. Tese de Doutorado, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa.
- Plotkin, S. A. (2005). Vaccines: past, present and future. *Nature Medicine*, 11(4 Suppl), S5-11-S15-11.
- Plotkin, S. A. (2009). Vaccines: the fourth century. *Clinical and Vaccine Immunology: CVI*, 16(12), 1709-1719.

- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M. Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B. & Beutler, B. (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science (New York, N.Y.)*, 282(5396), 2085-2088.
- Pouniotis, D. S., Esparon, S., Apostolopoulos, V. & Pietersz, G. A. (2011). Whole protein and defined CD8(+) and CD4(+) peptides linked to penetratin targets both MHC class I and II antigen presentation pathways. *Immunology and cell biology*, 89(8):904-913.
- Pulendran, B. (2004a). Modulating TH1/TH2 responses with microbes, dendritic cells, and pathogen recognition receptors. *Immunologic Research*, 29(1-3), 187-196.
- Pulendran, B. (2004b). Modulating vaccine responses with dendritic cells and Toll-like receptors. *Immunological Reviews*, 199, 227-250.
- Pulendran, B. (2005). Variagation of the immune response with dendritic cells and pathogen recognition receptors. *Journal of immunology*, 174(5), 2457-2465.
- Pulendran, B., Banchereau, J., Maraskovsky, E. & Maliszewski, C. (2001a). Modulating the immune response with dendritic cells and their growth factors. *Trends in immunology*, 22(1), 41-47.
- Pulendran, B., Kumar, P., Cutler, C. W., Mohamadzadeh, M., Van Dyke, T. & Banchereau, J. (2001b). Lipopolysaccharides from distinct pathogens induce different classes of immune responses in vivo. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 167(9), 5067-5076.
- Pulendran, B., Tang, H. & Manicassamy, S. (2010). Programming dendritic cells to induce T(H)2 and tolerogenic responses. *Nature Immunology*, 11(8), 647-655.
- Qureshi, N., Mascagni, P., Ribic, E. & Takayama, K. (1985). Monophosphoryl lipid A obtained from lipopolysaccharides of *Salmonella minnesota* R595. Purification of the dimethyl derivative by high performance liquid chromatography and complete structural determination. *The Journal of Biological Chemistry*, 260(9), 5271-5278.
- Radolf, J. D., Arndt, L. L., Akins, D. R., Curetty, L. L., Levi, M. E., Shen, Y., Davis, L. S. & Norgard, M. V. (1995). *Treponema pallidum* and *Borrelia burgdorferi* lipoproteins and synthetic lipopeptides activate monocytes/macrophages. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 154(6), 2866-2877.
- Raetz, C. R. H. & Whitfield, C. (2002). Lipopolysaccharide endotoxins. *Annual Review of Biochemistry*, 71, 635-700.
- Rau, H., Revets, H., Cornelis, P., Titzmann, A., Ruggli, N., McCullough, K. C. & Summerfield, A. (2006). Efficacy and functionality of lipoprotein OprI from *Pseudomonas aeruginosa* as adjuvant for a subunit vaccine against classical swine fever. *Vaccine*, 24(22), 4757-4768.
- Re, F. & Strominger, J. L. (2001). Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human dendritic cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(40), 37692-37699.

- Redecke, V., Häcker, H., Datta, S. K., Fermin, A., Pitha, P. M., Broide, D. H. & Raz, E. (2004). Cutting edge: activation of Toll-like receptor 2 induces a Th2 immune response and promotes experimental asthma. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 172(5), 2739-2743.
- Reis, A. L., Parkhouse, R. M. E., Penedos, A. R., Martins, C. & Leitão, A. (2007). Systematic analysis of longitudinal serological responses of pigs infected experimentally with African swine fever virus. *The Journal of General Virology*, 88(Pt 9), 2426-2434.
- Reis e Sousa, C. (2006). Dendritic cells in a mature age. *Nature Reviews Immunology*, 6(6), 476-483.
- Remans, K., Pauwels, K., van Ulsen, P., Buts, L., Cornelis, P., Tommassen, J., Savvides, S. N., Decanniere, K. & Van Gelder, P. (2010a). Hydrophobic surface patches on LolA of *Pseudomonas aeruginosa* are essential for lipoprotein binding. *Journal of Molecular Biology*, 401(5), 921-930.
- Remans, K., Vercammen, K., Bodilis, J. & Cornelis, P. (2010b). Genome-wide analysis and literature-based survey of lipoproteins in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology (Reading, England)*, 156(Pt 9), 2597-2607.
- Reverts, H., Pynaert, G., Grooten, J. & De Baetselier, P. (2005). Lipoprotein I, a TLR2/4 ligand modulates Th2-driven allergic immune responses. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 174(2), 1097-1103.
- Rioux, C. R., Bergeron, H., Lin, L., Grothe, S., O'Connor-McCourt, M. & Lau, P. C. (1992). A fusion plasmid for the synthesis of lipopeptide-antigen chimeras in *Escherichia coli*. *Gene*, 116(1), 13-20.
- Rosenberg, A. H., Lade, B. N., Chui, D. S., Lin, S. W., Dunn, J. J. & Studier, F. W. (1987). Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. *Gene*, 56(1), 125-135.
- Roses, R. E., Xu, S., Xu, M., Koldovsky, U., Koski, G. & Czerniecki, B. J. (2008). Differential production of IL-23 and IL-12 by myeloid-derived dendritic cells in response to TLR agonists. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 181(7), 5120-5127.
- Russell, D. G. & Yates, R. M. (2007a). TLR signalling and phagosome maturation: an alternative viewpoint. *Cellular Microbiology*, 9(4), 849-850.
- Russell, D. G. & Yates, R. M. (2007b). Toll-like receptors and phagosome maturation. *Nature Immunology*, 8(3), 217; author reply 217-218-217; author reply 217-218.
- Salem, M. L., Diaz-Montero, C. M., El-Naggar, S. A., Chen, Y., Moussa, O. & Cole, D. J. (2009). The TLR3 agonist poly(I:C) targets CD8+ T cells and augments their antigen-specific responses upon their adoptive transfer into naïve recipient mice. *Vaccine*, 27(4), 549-557.
- Sallusto, F. & Lanzavecchia, A. (2000). Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor expression. *Immunological Reviews*, 177, 134-140.

- Sallusto, F., Palermo, B., Lenig, D., Miettinen, M., Matikainen, S., Julkunen, I., Forster, R., Burgstahler, R., Lipp, M. & Lanzavecchia, A. (1999). Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function. *European Journal of Immunology*, 29(5), 1617-1625.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed.). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sankaran, K. & Wu, H. C. (1994). Lipid modification of bacterial prolipoprotein. Transfer of diacylglycerol moiety from phosphatidylglycerol. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(31), 19701-19706.
- Schild, S., Nelson, E. J., Bishop, A. L. & Camilli, A. (2009). Characterization of *Vibrio cholerae* outer membrane vesicles as a candidate vaccine for cholera. *Infection and Immunity*, 77(1), 472-484.
- Schild, S., Nelson, E. J. & Camilli, A. (2008). Immunization with *Vibrio cholerae* outer membrane vesicles induces protective immunity in mice. *Infection and Immunity*, 76(10), 4554-4563.
- Schjetne, K. W., Thompson, K. M., Nilsen, N., Flo, T. H., Fleckenstein, B., Iversen, J.-G., Espevik, T. & Bogen, B. (2003). Cutting edge: link between innate and adaptive immunity: Toll-like receptor 2 internalizes antigen for presentation to CD4+ T cells and could be an efficient vaccine target. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 171(1), 32-36.
- Schlosser, E., Mueller, M., Fischer, S., Basta, S., Busch, D. H., Gander, B. & Groettrup, M. (2008). TLR ligands and antigen need to be coencapsulated into the same biodegradable microsphere for the generation of potent cytotoxic T lymphocyte responses. *Vaccine*, 26(13), 1626-1637.
- Schroeder, J. & Aebischer, T. (2009). Recombinant outer membrane vesicles to augment antigen-specific live vaccine responses. *Vaccine*, 27(48), 6748-6754.
- Serbina, N. & Pamer, E. G. (2003). Quantitative studies of CD8+ T-cell responses during microbial infection. *Current Opinion in Immunology*, 15(4), 436-442.
- Shastri, N. & Gonzalez, F. (1993). Endogenous generation and presentation of the ovalbumin peptide/Kb complex to T cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 150(7), 2724-2736.
- Shepherd, J. H., Mulvihill, E. R., Thomas, P. S. & Palmiter, R. D. (1980). Commitment of chick oviduct tubular gland cells to produce ovalbumin mRNA during hormonal withdrawal and restimulation. *The Journal of Cell Biology*, 87(1), 142-151.
- Shibata, K., Hasebe, A., Into, T., Yamada, M. & Watanabe, T. (2000). The N-terminal lipopeptide of a 44-kDa membrane-bound lipoprotein of *Mycoplasma salivarium* is responsible for the expression of intercellular adhesion molecule-1 on the cell surface of normal human gingival fibroblasts. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 165(11), 6538-6544.

- Shimazu, R., Akashi, S., Ogata, H., Nagai, Y., Fukudome, K., Miyake, K. & Kimoto, M. (1999). MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *The Journal of Experimental Medicine*, 189(11), 1777-1782.
- Sieling, P. A., Chung, W., Duong, B. T., Godowski, P. J. & Modlin, R. L. (2003). Toll-like receptor 2 ligands as adjuvants for human Th1 responses. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 170(1), 194-200.
- Sigrist, C. J. A., Cerutti, L., de Castro, E., Langendijk-Genevaux, P. S., Bulliard, V., Bairoch, A. & Hulo, N. (2010). PROSITE, a protein domain database for functional characterization and annotation. *Nucleic Acids Research*, 38(Database issue), D161-166-D161-166.
- Smith, K. D., Andersen-Nissen, E., Hayashi, F., Strobe, K., Bergman, M. A., Barrett, S. L., Cookson, B. T. & Aderem, A. (2003). Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. *Nature immunology*, 4(12), 1247-1253.
- Smits, E. L. J. M., Ponsaerts, P., Berneman, Z. N. & Van Tendeloo, V. F. I. (2008). The use of TLR7 and TLR8 ligands for the enhancement of cancer immunotherapy. *The Oncologist*, 13(8), 859-875.
- Sozzani, S., Allavena, P., D'Amico, G., Luini, W., Bianchi, G., Kataura, M., Imai, T., Yoshie, O., Bonecchi, R. & Mantovani, A. (1998). Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 161(3), 1083-1086.
- Spohn, R., Buwitt-Beckmann, U., Brock, R., Jung, G. n., Ulmer, A. J. & Wiesmüller, K.-H. (2004). Synthetic lipopeptide adjuvants and Toll-like receptor 2--structure-activity relationships. *Vaccine*, 22(19), 2494-2499.
- Studier, F. W. (1991). Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *Journal of Molecular Biology*, 219(1), 37-44.
- Studier, F. W. & Moffatt, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology*, 189(1), 113-130.
- Sutmuller, R. P. M., den Brok, M. H. M. G. M., Kramer, M., Bennink, E. J., Toonen, L. W. J., Kullberg, B.-J., Joosten, L. A., Akira, S., Netea, M. G. & Adema, G. J. (2006). Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells. *The Journal of Clinical Investigation*, 116(2), 485-494.
- Tada, H., Aiba, S., Shibata, K.-I., Ohteki, T. & Takada, H. (2005). Synergistic effect of Nod1 and Nod2 agonists with toll-like receptor agonists on human dendritic cells to generate interleukin-12 and T helper type 1 cells. *Infection and Immunity*, 73(12), 7967-7976.
- Takeda, K., Takeuchi, O. & Akira, S. (2002). Recognition of lipopeptides by Toll-like receptors. *Journal of Endotoxin Research*, 8(6), 459-463.
- Takeuchi, O. & Akira, S. (2009). Innate immunity to virus infection. *Immunological Reviews*, 227(1), 75-86.

- Takeuchi, O. & Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, *140*(6), 805-820.
- Takeuchi, O., Kaufmann, A., Grote, K., Kawai, T., Hoshino, K., Morr, M., Mühlradt, P. F. & Akira, S. (2000). Cutting edge: preferentially the R-stereoisomer of the mycoplasmal lipopeptide macrophage-activating lipopeptide-2 activates immune cells through a toll-like receptor 2- and MyD88-dependent signaling pathway. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *164*(2), 554-557.
- Takeuchi, O., Kawai, T., Mühlradt, P. F., Morr, M., Radolf, J. D., Zychlinsky, A., Takeda, K. & Akira, S. (2001). Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *International Immunology*, *13*(7), 933-940.
- Takeuchi, O., Sato, S., Horiuchi, T., Hoshino, K., Takeda, K., Dong, Z., Modlin, R. L. & Akira, S. (2002). Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *169*(1), 10-14.
- Taylor, I. M., Harrison, J. L., Timmis, K. N. & O'Connor, C. D. (1990). The TraT lipoprotein as a vehicle for the transport of foreign antigenic determinants to the cell surface of *Escherichia coli* K12: structure-function relationships in the TraT protein. *Molecular Microbiology*, *4*(8), 1259-1268.
- Tokuda, H. (2009). Biogenesis of outer membranes in Gram-negative bacteria. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *73*(3), 465-473.
- Toshchakov, V., Jones, B. W., Perera, P.-Y., Thomas, K., Cody, M. J., Zhang, S., Williams, B. R. G., Major, J., Hamilton, T. A., Fenton, M. J. & Vogel, S. N. (2002). TLR4, but not TLR2, mediates IFN-beta-induced STAT1alpha/beta-dependent gene expression in macrophages. *Nature Immunology*, *3*(4), 392-398.
- Travassos, L. H., Girardin, S. E., Philpott, D. J., Blanot, D., Nahori, M.-A., Werts, C. & Boneca, I. G. (2004). Toll-like receptor 2-dependent bacterial sensing does not occur via peptidoglycan recognition. *EMBO Reports*, *5*(10), 1000-1006.
- Trinchieri, G. & Sher, A. (2007). Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nature reviews. Immunology*, *7*(3), 179-190.
- Tschumi, A., Nai, C., Auchli, Y., Hunziker, P., Gehrig, P., Keller, P., Grau, T. & Sander, P. (2009). Identification of apolipoprotein N-acyltransferase (Lnt) in mycobacteria. *The Journal of biological chemistry*, *284*(40), 27146-27156.
- Tsuji, M. & Zavala, F. (2001). Peptide-based subunit vaccines against pre-erythrocytic stages of malaria parasites. *Molecular immunology*, *38*(6), 433-442.
- Tsuji, S., Matsumoto, M., Takeuchi, O., Akira, S., Azuma, I., Hayashi, A., Toyoshima, K. & Seya, T. (2000). Maturation of human dendritic cells by cell wall skeleton of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin: involvement of toll-like receptors. *Infection and Immunity*, *68*(12), 6883-6890.
- Uematsu, S., Jang, M. H., Chevrier, N., Guo, Z., Kumagai, Y., Yamamoto, M., Kato, H., Sougawa, N., Matsui, H., Kuwata, H., Hemmi, H., Coban, C., Kawai, T., Ishii, K. J.,

- Takeuchi, O., Miyasaka, M., Takeda, K. & Akira, S. (2006). Detection of pathogenic intestinal bacteria by Toll-like receptor 5 on intestinal CD11c⁺ lamina propria cells. *Nature Immunology*, 7(8), 868-874.
- Underhill, D. M., Rosnagle, E., Lowell, C. A. & Simmons, R. M. (2005). Dectin-1 activates Syk tyrosine kinase in a dynamic subset of macrophages for reactive oxygen production. *Blood*, 106(7), 2543-2550.
- van de Waterbeemd, B., Streefland, M., van der Ley, P., Zomer, B., van Dijken, H., Martens, D., Wijffels, R. & van der Pol, L. (2010). Improved OMV vaccine against *Neisseria meningitidis* using genetically engineered strains and a detergent-free purification process. *Vaccine*, 28(30), 4810-4816.
- van der Ley, P., Steeghs, L., Hamstra, H. J., ten Hove, J., Zomer, B. & van Alphen, L. (2001). Modification of lipid A biosynthesis in *Neisseria meningitidis* lpxL mutants: influence on lipopolysaccharide structure, toxicity, and adjuvant activity. *Infection and Immunity*, 69(10), 5981-5990.
- van Duin, D., Medzhitov, R. & Shaw, A. C. (2006). Triggering TLR signaling in vaccination. *Trends in Immunology*, 27(1), 49-55.
- Wang, T., Town, T., Alexopoulou, L., Anderson, J. F., Fikrig, E. & Flavell, R. A. (2004). Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis. *Nature Medicine*, 10(12), 1366-1373.
- Wang, Y., Cella, M., Gilfillan, S. & Colonna, M. (2010). Cutting edge: polyinosinic:polycytidylic acid boosts the generation of memory CD8 T cells through melanoma differentiation-associated protein 5 expressed in stromal cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 184(6), 2751-2755.
- Warger, T., Osterloh, P., Rechtsteiner, G., Fassbender, M., Heib, V., Schmid, B., Schmitt, E., Schild, H. & Radsak, M. P. (2006). Synergistic activation of dendritic cells by combined Toll-like receptor ligation induces superior CTL responses in vivo. *Blood*, 108(2), 544-550.
- Warshakoon, H. J., Hood, J. D., Kimbrell, M. R., Malladi, S., Wu, W. Y., Shukla, N. M., Agnihotri, G., Sil, D. & David, S. A. (2009). Potential adjuvantic properties of innate immune stimuli. *Human Vaccines*, 5(6), 381-394.
- Watanabe, T., Kitani, A., Murray, P. J. & Strober, W. (2004). NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses. *Nature Immunology*, 5(8), 800-808.
- Weck, M. M., Grunebach, F., Werth, D., Sinzger, C., Bringmann, A. & Brossart, P. (2007). TLR ligands differentially affect uptake and presentation of cellular antigens. *Blood*, 109(9), 3890-3894.
- Weinberg, G. A., Towler, D. A. & Munson, R. S. (1988). Lipoproteins of *Haemophilus influenzae* type b. *Journal of Bacteriology*, 170(9), 4161-4164.

- West, M. A., Prescott, A. R., Chan, K. M., Zhou, Z., Rose-John, S., Scheller, J. & Watts, C. (2008). TLR ligand-induced podosome disassembly in dendritic cells is ADAM17 dependent. *The Journal of Cell Biology*, 182(5), 993-1005.
- West, M. A., Wallin, R. P. A., Matthews, S. P., Svensson, H. G., Zaru, R., Ljunggren, H.-G., Prescott, A. R. & Watts, C. (2004). Enhanced dendritic cell antigen capture via toll-like receptor-induced actin remodeling. *Science (New York, N.Y.)*, 305(5687), 1153-1157.
- Wiesmüller, K. H., Jung, G. & Hess, G. (1989). Novel low-molecular-weight synthetic vaccine against foot-and-mouth disease containing a potent B-cell and macrophage activator. *Vaccine*, 7(1), 29-33.
- Wille-Reece, U., Flynn, B. J., Loré, K., Koup, R. A., Kedl, R. M., Mattapallil, J. J., Weiss, W. R., Roederer, M. & Seder, R. A. (2005). HIV Gag protein conjugated to a Toll-like receptor 7/8 agonist improves the magnitude and quality of Th1 and CD8+ T cell responses in nonhuman primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(42), 15190-15194.
- Willemot, K. & Cornelis, P. (1983). Growth defects of *Escherichia coli* cells which contain the gene of an alpha-amylase from *Bacillus coagulans* on a multicopy plasmid. *Journal of General Microbiology*, 129(2), 311-319.
- World Health Organization. (2010). *Global Polio Eradication Initiative Strategic Plan 2010–2012*. Geneva: World Health Organization.
- Yarovinsky, F., Zhang, D., Andersen, J. F., Bannenberg, G. L., Serhan, C. N., Hayden, M. S., Hieny, S., Sutterwala, F. S., Flavell, R. A., Ghosh, S. & Sher, A. (2005). TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science (New York, N.Y.)*, 308(5728), 1626-1629.
- Yates, R. M. & Russell, D. G. (2005). Phagosome maturation proceeds independently of stimulation of toll-like receptors 2 and 4. *Immunity*, 23(4), 409-417.
- Young, N. S., Levin, J. & Prendergast, R. A. (1972). An invertebrate coagulation system activated by endotoxin: evidence for enzymatic mediation. *The Journal of clinical investigation*, 51(7), 1790-1797.
- Zähringer, U., Lindner, B., Inamura, S., Heine, H. & Alexander, C. (2008). TLR2 - promiscuous or specific? A critical re-evaluation of a receptor expressing apparent broad specificity. *Immunobiology*, 213(3-4), 205-224.
- Zanin-Zhorov, A., Cahalon, L., Tal, G., Margalit, R., Lider, O. & Cohen, I. R. (2006). Heat shock protein 60 enhances CD4+ CD25+ regulatory T cell function via innate TLR2 signaling. *The Journal of Clinical Investigation*, 116(7), 2022-2032.
- Zaru, R., Ronkina, N., Gaestel, M., Arthur, J. S. C. & Watts, C. (2007). The MAPK-activated kinase Rsk controls an acute Toll-like receptor signaling response in dendritic cells and is activated through two distinct pathways. *Nature Immunology*, 8(11), 1227-1235.

- Zhang, X., Issagholian, A., Berg, E. A., Fishman, J. B., Nesburn, A. B. & BenMohamed, L. (2005a). Th-cytotoxic T-lymphocyte chimeric epitopes extended by Nepsilon-palmitoyl lysines induce herpes simplex virus type 1-specific effector CD8⁺ Tc1 responses and protect against ocular infection. *Journal of Virology*, 79(24), 15289-15301.
- Zhang, Z., Louboutin, J.-P., Weiner, D. J., Goldberg, J. B. & Wilson, J. M. (2005b). Human airway epithelial cells sense *Pseudomonas aeruginosa* infection via recognition of flagellin by Toll-like receptor 5. *Infection and Immunity*, 73(11), 7151-7160.
- Zhu, J. & Paul, W. E. (2008). CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood*, 112(5), 1557-1569.
- Zhu, J., Yamane, H. & Paul, W. E. (2010a). Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annual Review of Immunology*, 28, 445-489.
- Zhu, Q., Egelston, C., Gagnon, S., Sui, Y., Belyakov, I. M., Klinman, D. M. & Berzofsky, J. A. (2010b). Using 3 TLR ligands as a combination adjuvant induces qualitative changes in T cell responses needed for antiviral protection in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 120(2), 607-616.
- Zhu, X., Ramos, T. V., Gras-Masse, H., Kaplan, B. E. & BenMohamed, L. (2004). Lipopeptide epitopes extended by an Nepsilon-palmitoyl-lysine moiety increase uptake and maturation of dendritic cells through a Toll-like receptor-2 pathway and trigger a Th1-dependent protective immunity. *European Journal of Immunology*, 34(11), 3102-3114.

