

Yordanka Medina Armenteros

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CONTRA
AS PROTEÍNAS L E G DO
VÍRUS RESPIRATÓRIO SINCICIAL HUMANO**

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação
em Microbiologia, do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a
obtenção do Título de Doutor em Microbiologia.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Armando Morais Ventura

Versão original

São Paulo
2012

RESUMO

Medina-Armenteros Y. Avaliação da resposta imune contra as proteínas L e G do Vírus Respiratório Sincicial Humano [tese (Doutorado em Microbiologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2012.

O desenvolvimento de vacinas pediátricas contra o Vírus Respiratório Sincicial Humano, HRSV (do inglês, *Human Respiratory Syncytial Virus*), tem sido problemático devido à população alvo envolvida e a dificuldades para atingir um balanço entre atenuação viral e imunogenicidade. Tanto a imunização com a glicoproteína G do HRSV, proteína de ligação ao receptor celular e alvo para a resposta de anticorpos neutralizantes e protetores, quanto a primeira vacina testada inativada com formalina, encontram-se associadas com a indução de eosinofilia pulmonar mediada por uma resposta de células TCD4+ Th2 após exposição ao HRSV selvagem. Foi identificado um peptídeo da proteína G, dentro do ectodomínio conservado (aa 184 a 198), que predispõe para essa resposta Th2, sendo que a introdução de mutações eliminou a capacidade desse peptídeo predispor camundongos a desenvolver eosinofilia. Esse achado torna essa seqüência uma ferramenta atraente para o direcionamento da resposta imune protetora contra o vírus HRSV. Células T CD8+ específicas para o epítopo imunodominante encontrado na proteína M2-1 (aa 82 a 90) de HRSV reduzem a resposta Th2 e mediam resistência contra desafio com HRSV quando administrado por via intranasal em camundongos. Em humanos, existe uma relação entre a resposta de linfócitos T citotóxicos (LTC) contra HRSV e redução dos sintomas clínicos. Assim, a busca de novos epítopos nas proteínas estruturais do vírus é importante. Neste trabalho identificamos epítopos de células TCD8+ na proteína L, a polimerase viral, altamente conservada e a menos estudada nesse aspecto. Essa identificação foi feita por predição utilizando ferramentas de bioinformática, síntese dos peptídeos correspondentes e avaliação da resposta imune celular contra eles, tendo sido demonstrado que L apresenta epítopos de células T restritos pelo H-2^d. Resta caracterizar sua capacidade de proteção frente a desafio com HRSV. Uma segunda abordagem na busca de imunógenos efetivos contra HRSV, consistiu na construção de vacinas de DNA inserindo a seqüência nucleotídica do peptídeo da proteína G mutado (GM, aa164 a 204), mencionado acima. Isso foi feito em vetores de expressão eucariótica em fusão com a seqüência sinal do ativador de plasminogenio tecidual, e com a subunidade B da toxina colérica (CTB), um potente adjuvante de mucosa. Também expressamos e purificamos o peptídeo GM em fusão com CTB, a partir de um vetor bacteriano. A caracterização da resposta imune contra HRSV estimulada por esses vetores eucarióticos e peptídeos purificados revelou que o plasmídeo pTGMCTB, bem como as proteínas GM e GMCTB foram capazes de induzir resposta de anticorpos contra GM. Esses anticorpos, porém, não se mostraram neutralizantes de HRSV, como era nossa expectativa. A capacidade de proteção frente a desafio com HRSV não foi demonstrada, porém nenhum destes imunógenos induziu eosinofilia pulmonar. Concluímos que o peptídeo GM não adquire uma conformação adequada capaz de gerar anticorpos neutralizantes, quando está em fusão com a proteína CTB, tanto na forma de proteína, quanto como vacina de DNA.

Palavras-chave: Vírus Respiratório Sincicial Humano (HRSV). RNA polimerase. Epítopos de células TCD8+. Predição de epítopos. Glicoproteína G de ligação. Eosinofilia pulmonar. FI-HRSV. Vacina de DNA.

ABSTRACT

Medina-Armenteros Y. Evaluation of the immune response against L and G proteins from human respiratory syncytial virus [PhD thesis (Microbiology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2012.

The development of pediatric vaccines against human respiratory syncytial virus (HRSV) infection has been controversial due to the target population and difficulties in achieving a balance between viral attenuation and immunogenicity. The attachment glycoprotein G (target for the neutralizing and protective antibody response), as well as a virus formalin-inactivated vaccine, have been associated with pulmonary eosinophilia induction after natural HRSV infection; mediated by an exaggerated TCD4⁺ Th2 response. A peptide in G protein (aa 184 to 198) within the G conserved ectodomain, was identified as a major contributor for that response since specific mutations on it abrogated the pulmonary eosinophilia. This finding makes that sequence an interesting target to develop a protective immune response against HRSV infection. CD8⁺ T cells specific to M2-1 (aa 82 to 90), an immunodominant epitope from the second matrix protein, reduce the Th2 response in mice, and mediate protection against HRSV challenge, intranasally administrated. In humans, there is a relationship between HRSV specific cytotoxic T lymphocytes (CTL) and symptom-reduction. Thus, searching for new epitopes in the structural proteins is very important. In the present work, we identified CD8⁺ T cell epitopes in the structural L protein; the viral polymerase, highly conserved among different strains, and less studied. The identification was made by epitope prediction using bioinformatics; the peptides were synthesized and the cellular immune response against them was tested. It was demonstrated that L protein contains H-2^d -restricted epitopes. The evaluation of the capacity of these epitopes to protect against HRSV challenge remains to be done. A second approach searching for effective immunogens against HRSV infection was the construction of DNA vaccines. The nucleotide sequence of a peptide derived from G mutated (GM, aa 164 to 204), mentioned above, was cloned in eukaryotic vectors fused to the tissue plasminogen activator plus the cholera toxin B subunit, a potent mucosal adjuvant. We also expressed and purified the GM peptide in fusion with CTB from a bacterial vector. The characterization of the immune response against HRSV induced by those eukaryotic vectors and purified peptides showed that the pTGMCTB plasmid, as well as GM and GMCTB proteins were able to elicit antibodies against GM. These antibodies, however, were not able to neutralize the virus. The protective capacity against HRSV challenge was not demonstrated; however, none of these immunogens induced pulmonary eosinofilia. We conclude that GM peptide did not acquire the proper folding to induce the raising of neutralizing antibodies when fused to CTB, presented as a protein or as a DNA vaccine.

Keywords: Human Respiratory Syncytial Virus (HRSV). RNA polymerase. TCD8⁺ cells epitopes. Epitope prediction. Attachment G glycoprotein. Pulmonary eosinofilia. FI-HRSV. DNA vaccine.

1 INTRODUÇÃO

O HRSV é o principal patógeno viral respiratório em crianças e bebês mundialmente. A infecção pode causar sintomas leves como resfriado comum, otite ou rinite; ou mais graves como bronquiolite, traqueobronquite e pneumonia (Paramore et al., 2004). Estima-se que 50% das crianças contraem o HRSV durante o primeiro ano de vida, e que 100% delas experimentou pelo menos uma infecção antes dos três anos de idade. A infecção provocada pelo vírus não induz imunidade protetora vitalícia, sendo que as reinfecções são freqüentes em todas as idades (CDC, 2004; Falsey et al., 2005).

O HRSV é um vírus envelopado classificado na ordem *Mononegavirales*, família *Paramixoviridae*, subfamília *Pneumovirinae*, gênero pneumovírus (Collins et al., 2001). O HRSV foi isolado pela primeira vez de um chimpanzé com coriza e dois anos mais tarde de duas crianças com doença respiratória (Chanock et al., 1957). O HRSV subdivide-se em dois grupos antigênicos, A e B (Anderson et al., 1985; Mufson et al., 1985), que se correlacionam com vírus diferentes geneticamente (Cristina et al., 1990).

1.1 As partículas virais

As partículas virais de HRSV são heterogêneas em tamanho e forma. Quando observadas no microscópio eletrônico, são identificados dois tipos: (i) arredondadas ou em forma de rim de 150-250nm, e (ii) filamentosas de até 10 µm de comprimento (Bâchi e Howe, 1973).

As partículas virais são envoltas por uma bicamada lipídica (envelope) derivada da membrana plasmática da célula hospedeira, na qual são inseridas três glicoproteínas: a glicoproteína G, responsável pela ligação do vírus ao receptor celular (Levine et al., 1987); a glicoproteína F que media a fusão das membranas celular e viral (Walsh e Hruska, 1983); e a proteína hidrofóbica SH. As glicoproteínas F e G formam as espículas características observadas à microscopia eletrônica, enquanto a SH é expressa abundantemente na superfície de células infectadas com o vírus, mas é incorporada apenas em baixas quantidades nas partículas virais (Collins e Mottet, 1993). Logo abaixo do envelope há uma camada de revestimento formada pela proteína M (de matriz) viral.

No interior da partícula viral, encontramos o nucleocapsídeo que consiste do RNA genômico fortemente ligado à nucleoproteína N, e outras proteínas: a L, subunidade principal

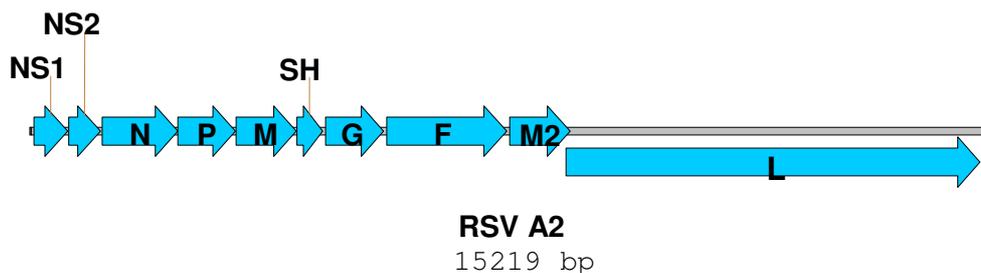
da polimerase viral; a P, uma fosfoproteína que é subunidade da polimerase; e a M2-1, um fator de anti terminação de transcrição.

O genoma de HRSV codifica três proteínas não estruturais (NS1, NS2 e M2-2) que são produzidas nas células infectadas mas não são incorporadas nas partículas virais (Melero, 2007). NS2 inibe a resposta de interferon (IFN) tipo I (Ramaswamy et al., 2006), NS1 e NS2 inibem a apoptose (Bitko et al., 2007), enquanto M2-2 especula-se ser responsável por estimular a replicação viral e inibir a transcrição viral (Collins et al., 2001).

1.2 Genôma do HRSV

O genôma é uma molécula de RNA fita simples de sentido negativo de 15.2 Kb. Esse RNA (figura 1) codifica para 10 genes que são transcritos seqüencialmente a partir da extremidade 3' pela polimerase viral produzindo 10 RNAs mensageiros. Os genes são organizados linearmente ao longo do genoma, separados por seqüências intergênicas variáveis, exceto os dois últimos genes (M2 e L) que se sobrepõe por 68 nucleotídeos. A transcrição de cada mRNA é guiada por essas pequenas seqüências que flanqueiam cada gene (Collins e Murphy, 2005).

Figura 1 – Esquema do genoma do HRSV.



Fonte: Modificado de Collins e Murphy (2005)

No extremo 3' do RNA viral se encontra uma seqüência *leader* de 44 NT, bem conservada, que contém o promotor para a transcrição do RNA e a síntese do antigenoma; enquanto o extremo 5' é caracterizado por uma seqüência *trailer* de 155 NT, altamente heterogênea, que contém o promotor para a síntese do genoma da progênie (Mink et al., 1991).

1.3 A glicoproteína G

A proteína G é uma glicoproteína transmembrana do tipo II constituída por um domínio citoplasmático N terminal, uma região hidrofóbica (domínio transmembrana) e um ectodomínio (porção extra citoplasmática). Há duas regiões hipervariáveis no “ectodomínio”, separadas por uma sequência conservada de 13 aa, sendo que o domínio localizado perto da região carboxilo terminal (C-terminal) da proteína G reflete toda a variabilidade do gene G (Martínez et al., 1999). Estas regiões hipervariáveis são altamente glicosiladas, com açúcares acoplados por ligações do tipo N ou O que reduzem a antigenicidade cobrindo a proteína viral com açúcares específicos da célula (Garcia-Barreno et al., 1994; Hall, 2000). Estas modificações aumentam a massa molar da proteína para 80-90 kDa em SDS-PAGE (Melero, 2007). De fato a glicoproteína G é a proteína de envelope mais variável, sendo os HRSVs classificados em grupo A ou B, dependendo de sua reatividade com um padrão de anticorpos monoclonais dirigidos contra ela (Anderson et al., 1985; Mufson et al., 1985). A sequência de 13 aa que abrange os resíduos 173-186 contém quatro cisteínas (173, 176, 182 e 186), é conservada entre todas as amostras virais humanas, sendo candidata a sítio de ligação ao receptor. As pontes disulfetos são formadas entre Cys 173 e 186, e 176 e 182. Uma sequência pequena localizada entre os resíduos 184-198, perto do motivo conservado de Cys, tem sido identificada como a responsável pela ligação da proteína G a glicosaminoglicanos (GAGs) da superfície celular (Feldman et al., 1999). A região central conservada do ectodomínio, contém epítomos que são tanto mantidos em todos os isolados de HRSV (epítomos conservados), quanto compartilhados por vírus do mesmo grupo antigénico (epítomos específicos de grupo) (Martínez et al., 1997; Melero et al., 1997).

A proteína G é produzida de duas formas nas células infectadas. A primeira, associada a membrana (G_m) de 292-319 aa, dependendo da cepa viral, é a forma completa, incorporada ao virion. A segunda forma observada (Roberts et al., 1994) é secretada (G_s), e gerada a partir da iniciação da tradução em um códon AUG interno que está na mesma ORF usada para produzir a proteína completa (Johnson et al., 1998; Johnson e Graham, 1999). Atualmente não se conhece o papel de G_s, porém algumas pesquisas têm revelado que G_s pode agir como uma “isca” para anticorpos ou ter algum efeito imunomodulatório *in vivo* (Polack et al., 2005). Vírus que expressam apenas G_s multiplicam-se eficientemente em cultura de células, e são atenuados apenas moderadamente *in vivo* (Teng et al., 2001).

1.4 RNA polimerase RNA dependente (proteína L)

A proteína L está no complexo ribonucleoprotéico encontrado no virion de HRSV. A polimerase viral é formada por duas subunidades, L é a que contém o sítio ativo de polimerização e demais atividades enzimáticas, e P age como uma espécie de fator de transcrição. Dessa forma, passaremos a nos referir a L como sendo a polimerase. Ela é uma proteína de 2165 aa, de aproximadamente 250 kDa, e é a menos abundante das proteínas estruturais. A predição de sua seqüência aminoacídica indica um alto conteúdo de leucinas e isoleucinas (21.9% combinados). Seqüências de proteínas L de Mononegavirales foram alinhadas permitindo a identificação de seis regiões (I a VI) relativamente conservadas. O maior grau de conservação é concentrado principalmente na metade N terminal do polipeptídeo (aas 422-938), incluindo a região III que contém quatro motivos característicos de polimerases (Poch et al., 1989; 1990).

Dentre as funções atribuídas à proteína L estão, além de ser uma RNA polimerase RNA dependente, fazer a poliadenilação (Stec et al., 1991) e a adição do CAP nos mRNAs virais (Ferron et al., 2002). Das proteínas do HRSV, ela pode ser considerada uma das menos estudadas, havendo pouca informação sobre suas características imunogênicas e estruturais.

1.5 O ciclo infeccioso

A entrada na célula hospedeira ocorre em dois passos bem diferenciados: 1) ligação do vírus a componentes da superfície celular (receptor), e 2) fusão das membranas viral e celular. A glicoproteína G media o primeiro passo, seguido pela ativação da proteína F que promove a fusão.

Como foi mencionado anteriormente, acredita-se que a proteína G media a ligação das partículas de HRSV à superfície da célula hospedeira (Levine et al., 1987), porém ela não é requerida para a infecção de alguns tipos celulares em cultura de tecidos. Assim, tem sido reportado que vírus que carecem da proteína G são capazes de se replicar *in vitro*, embora são atenuados *in vivo* (Karron et al., 1997; Teng et al., 2001). Isto sugere a existência de vias alternativas independentes de Gm. Neste sentido foi demonstrada a interação do HRSV com a nucleolina, componente da célula hospedeira, através da proteína F de fusão. O silenciamento do gene codificando para nucleolina pulmonar por RNAi foi associado com uma redução significativa da infecção viral em camundongos, confirmando que a nucleolina é um receptor funcional de HRSV, *in vivo*. No entanto, o uso da nucleolina como receptor não explica o

tropismo específico do vírus, sendo que a nucleolina é expressa em muitos tecidos, na superfície de muitos tipos celulares (Tayyari et al., 2011).

A transcrição e a replicação viral ocorrem no citoplasma da célula hospedeira. Após a internalização do nucleocapsídeo viral no citoplasma, ativa-se a transcrição seqüencial do genoma viral para gerar um grupo de mRNAs. Estes mRNAs carregam a informação necessária para serem traduzidos pelos ribossomos, produzindo os produtos gênicos correspondentes. Eventualmente esses produtos se acumulam perto da membrana celular onde são montados nas partículas virais novas. A transcrição requer a ação coordenada de quatro proteínas virais: L, P, N e M2-1. Num determinado momento após infecção, há uma mudança na síntese do RNA, de transcrição para replicação; esta mudança precisa da ação da proteína M2-2. A replicação requer N, P e L, mas não M2-1 e envolve a síntese de uma cópia do genoma viral (vRNA) completo de polaridade oposta (cRNA) ou antigenoma. O antigenoma também forma complexos com a proteína N e ele serve de molde para a síntese do genoma viral da progênie (Melero, 2007).

As partículas virais montadas são liberadas das células infectadas por brotamento através da membrana plasmática celular adquirindo assim, o envelope onde se encontram as glicoproteínas G, SH, e F (Collins et al., 2001). A proteína estrutural M tem um papel duplo no processo de morfogênese do vírus. Ela se liga aos nucleocapsídeos para torná-los transcricionalmente inativos, e também media a associação deles com o envelope viral nascente (Melero, 2007).

O HRSV induz um efeito citopático tardio em células permissivas, comparado com outros vírus líticos, e um desligamento moderado da síntese de proteínas na célula infectada (García-Barreno et al., 1988). Ele pode se replicar e produzir progênie viral infecciosa em células sem núcleo (Follet et al., 1975), indicando que os diferentes passos do ciclo replicativo não requerem funções nucleares ativas. Porém, o HRSV altera a expressão de inúmeras citocinas e quimiocinas em células epiteliais e outros tipos celulares. Acredita-se que a produção de quimiocinas pelas células epiteliais infectadas com HRSV seja o principal determinante da resposta inflamatória que influencia a severidade da infecção (Hoffman et al., 2004).

1.6 Resposta imune contra o HRSV

1.6.1 Resposta imune inata

Um dos mecanismos pelos quais o sistema imune inato identifica a invasão de um microorganismo é através dos *Toll like receptors* (TLRs). Eles constituem uma família de receptores tipo I que reconhecem padrões moleculares específicos presentes em componentes microbianos (PAMPs). A infecção por HRSV incrementa a expressão de TLR4 em células epiteliais das vias aéreas onde este receptor é normalmente expresso em baixo nível (Monick et al., 2003).

Foi observado que a proteína F é reconhecida por TLR4 e CD14 presentes em monócitos humanos (Kurt-Jones et al., 2000). Esta interação conduz à ativação de NF-KB e à produção de mediadores anti microbianos pró-inflamatórios tais como TNF- α , IL-6 e IL-12. Apesar desta ativação existem evidências de que a região rica em cisteína da proteína G pode suprimir a produção de citocinas, mediada por TLR4 em macrófagos e monócitos, inibindo a translocação nuclear de NF-KB (Polack et al., 2005). O mecanismo pelo qual a proteína G media esse efeito é desconhecido, no entanto, a região rica em cisteínas de G apresenta homologia com o quarto domínio do receptor de TNF (Langedijk et al., 1998). Isto sugere que a forma solúvel Gs, secretada bem cedo na infecção antes da progênie viral ser liberada, pode mediar o efeito inibitório se ligando a TNF alfa.

TLR3 é expresso em células epiteliais bronquiais e detecta RNA de dupla fita (dsRNA) (Alexopoulou et al., 2001). A infecção por HRSV ativa a expressão de TLR3, além disso, existem evidências de que a replicação do vírus induz quimiocinas como RANTES (CCL5) pela via de sinalização de TLR3. Alguns estudos sugerem que TLR3 não é necessário para a eliminação dos vírus, porém, é necessário para manter um ambiente imune que evite o desenvolvimento da patologia pulmonar mediada pela resposta Th2 (Melero, 2007).

Uma das primeiras respostas das células frente à infecção viral é a produção de IFN α/β . HRSV é resistente a esse efeito antiviral (Atreya e Kulkarni, 1999; Schlender et al., 2000). NS1 e NS2 agem cooperativamente para interromper a atividade antiviral do IFN e prevenir a sua indução em células infectadas (Spann et al., 2004).

As proteínas surfactantes (SP) A e D são produzidas por células epiteliais das vias respiratórias e são moléculas de reconhecimento de PAMPs, que formam a primeira linha de defesa contra infecções no pulmão. Durante a infecção severa com HRSV os níveis das proteínas A e D no lavado bronquioalveolar estão reduzidos (Kerr e Paton, 1999). SP-A se

liga às proteínas F e G, prevenindo a infecção da célula alvo (Ghildyal et al., 1999) e potenciando a opsonização e a captura do HRSV por macrófagos e monócitos (Barrett et al., 2000). SP-D se liga à proteína G e inibe a infecção de HRSV *in vitro* e *in vivo* (Hickling et al., 1999).

As células dendríticas (CD) são células apresentadoras de antígenos (APC) necessárias para a ativação de células T. Estudos sobre a infecção com HRSV em modelos experimentais sugerem que as CD respiratórias carregam antígenos virais do trato respiratório até os linfonodos onde elas encontram e ativam as células T vírus específicas (de Jong et al., 2005). Esta ativação é diminuída pela infecção das CD pelo HRSV, o que resulta em baixos níveis de proliferação de células T, afetando a produção de citocinas, uma das características das células T regulatórias (Bartz et al., 2003; de Graaff et al., 2005).

As células *natural killer* (NK) são recrutadas no sítio da infecção onde desenvolvem a sua atividade citotóxica e produzem IFN- γ ao reconhecerem as células infectadas. A ativação das NK potencia a ativação de células TCD8+ em linfócitos T citotóxicos (LTC) de memória, e influenciam a diferenciação de células TCD4+ no fenótipo Th1 (Romagnani, 1992; Bancroft, 1993; Kos e Engleman, 1996). Em camundongos Balb/c infectados com HRSV as células NK são recrutadas aos pulmões bem cedo após infecção, atingindo o pico entre os dias três e quatro quando elas representam a fonte principal de IFN- γ (Anderson et al., 1989; Hussell e Openshaw, 1998). Após infecção de camundongos Balb/c com um mutante da cepa B Δ G/SH foi observado um grande número de células NK pulmonares comparado com os animais infectados com a cepa selvagem, sugerindo que as proteínas G e /ou SH podem inibir a resposta destas células (Tripp et al., 1999). Aliás, nestes estudos houve um correlato do número incrementado de células com níveis maiores de mRNA de quimiocinas que atraem as células NK ao pulmão nos camundongos infectados com Δ G/SH (Tripp et al., 2000). Isto pode indicar que G e SH inibem a resposta de quimiocina desde o início da resposta imune (Polack et al., 2005).

1.6.2 Resposta imune adquirida

A resposta imune inata tem um papel importante na patogênese da infecção por HRSV e no estabelecimento da resposta imune adaptativa, enquanto a recuperação da infecção e a resistência à reinfecção são mediadas por componentes do sistema imune adaptativo. Por

Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

