RENATO BRITO BALEEIRO

**APRESENTAÇÃO CRUZADA E ATIVIDADE IMUNO-ESTIMULADORA
DE CÉLULAS DENDRÍTICAS PULSADAS COM ANTÍGENOS
PARTICULADOS ACOPLADOS A UM AGONISTA DE “TOLL-LIKE
RECEPTOR”**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas
da Universidade de São Paulo, para obtenção do
Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2012

RENATO BRITO BALEEIRO

**APRESENTAÇÃO CRUZADA E ATIVIDADE IMUNO-ESTIMULADORA
DE CÉLULAS DENDRÍTICAS PULSADAS COM ANTÍGENOS
PARTICULADOS ACOPLADOS A UM AGONISTA DE “TOLL-LIKE
RECEPTOR”**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas
da Universidade de São Paulo, para obtenção do
Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. José Alexandre M. Barbuto

Versão original

São Paulo
2012

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Baleeiro, Renato Brito.

Apresentação cruzada e atividade imuno-estimuladora de células dendríticas pulsadas com antígenos particulados acoplados a um agonista de "Toll-like receptor" / Renato Brito Baleeiro. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Prof. Dr. José Alexandre Marzagão Barbuto.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Imunologia de Tumores.

Versão do título para o inglês: Cross-presentation and induction of immune response by dendritic cells pulsed with particulate antigens coupled to a "Toll-like receptor" agonist.

1. Células Dendríticas 2. Imunoterapia 3. Vacinas 4. Adjuvantes imunológicos 5. Linfócitos T I. Barbuto, Prof. Dr. José Alexandre Marzagão II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB0180/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Renato Brito Baleeiro.

Título da Tese: Apresentação cruzada e atividade imuno-estimuladora de células dendríticas pulsadas com antígenos particulados acoplados a um agonista de "Toll-like receptor".

Orientador(a): Prof. Dr. José Alexandre Marzagão Barbuto.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 14 de novembro de 2007.

PARECER 818/CEP

Prezado Senhor,

Atendendo sua solicitação, a *Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB*, em sua 80ª reunião realizada em 13.11.07, analisou o projeto de sua responsabilidade intitulado: "*Vias intracelulares de sinalização, fenótipo de membrana e atividade imuno-estimuladora de células dendríticas humanas pulsadas com antígenos tumorais acoplados fisicamente a agonistas de Toll-like receptors*".

Informo a V.Sa. que, após análise e discussão o referido projeto foi **aprovado** por esta Comissão.

Lembramos que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final), de acordo com a resolução 196/06 do Conselho Nacional da Saúde, item IX.2 letra c.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **13 de novembro de 2008**.

Atenciosamente,

e/ Prof. Dr. LUIZ VICENTE RIZZO
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB /USP

Ilmo. Sr.
RENATO BRITO BALEEIRO
Departamento de Imunologia
Instituto de Ciências Biomédicas -USP

Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto de Ciências Biomédicas / USP

Aprovada pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, em 10 de fevereiro de 1998.

À minha família.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, o Prof. Dr. José Alexandre Marzagão Barbuto. Por ter me suportado desde a iniciação científica.

Ao meu orientador na Alemanha, o Prof. Dr. Peter Walden, não só por ter me aceitado em seu laboratório, mas também por ter compartilhado comigo seu conhecimento e experiência.

Aos professores Dr. Edécio Cunha, Dra. Vera Calich e Dra. Verônica Coelho pelas valiosas sugestões para meu trabalho, no exame de qualificação.

Aos companheiros do laboratório, Ana Carolina, Célia, Cris, Patty Toniolo, Patty Bergami, Roberto (o Robertson ou Roberium), Rodrigo (o popular Rodrigus Nalius), pelo auxílio, apoio, troca de ideias e momentos de descontração.

Às companheiras e amigas Grá e Isabella pelo companheirismo e ajuda sempre que eu precisei. Vocês são especiais!

À Bruna e Karen, principalmente pelo auxílio com os trâmites burocráticos com a tese. Vocês merecem vários chocolates alemães; se bem que os chocolates suíços e Belgas são melhores!

Aos colegas do laboratório na Alemanha por terem me auxiliado nos experimentos. Em especial a Anja, Arlina, Ulli, Florian, Melanie, Rebecca e Saulius.

Aos amigos Arthur e Michael por terem proporcionado grandes momentos de descontração, pelos almoços na Mensa e pausas para o café. Vocês me fizeram rir à beça.

A secretária do Professor Peter, a Patricia Zambon, que com muita paciência me auxiliou em todos os trâmites burocráticos durante minha estada em Berlim.

Ao Prof. Dr. Yoram Reiter por ter cedido os anticorpos para a identificação dos complexos MHC-I/peptídeo nas DCs.

Ao Dr. Lars Dähne, Barbara Baude e Dr. Jörg Rösner pelo auxílio com o microscópio confocal.

Ao Prof. Karl-Heinz Wiesmüller por ter cedido os peptídeos e lipopeptídeo utilizados nesse trabalho.

Ao pessoal da secretaria do departamento de Imunologia: Eni, Jotelma e Amarildo (*in memoriam*) pela atenção e ajuda sempre que necessário.

Aos professores do departamento de Imunologia, pelo conhecimento transmitido ao longo do tempo que eu passei no departamento.

Aos funcionários André, Maomé, Miltão e Otacílio, pela ajuda e momentos de descontração.

À minha família. Sempre me apoiou em tudo, mesmo que minha realização significasse ausência física temporária.

Aos doadores de sangue, sem os quais esse estudo não seria possível.

As bibliotecárias do ICB-USP, pela gentileza e competência no auxílio com os trâmites da biblioteca.

À FAPESP pelo apoio financeiro ao meu projeto de Doutorado e ao Projeto Temático do laboratório.

Ao DAAD, a Capes e a Fundação Pro Haut do Hospital Charité de Berlim pelo apoio financeiro durante minha estada na Alemanha para o doutorado sanduíche.

Agradeço a todos que, de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

À Deus, por me conceder a oportunidade e o privilégio de fazer o que mais gosto.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”.

Isaac Newton

RESUMO

BALEEIRO, R. B. **Apresentação cruzada e atividade imuno-estimuladora de células dendríticas pulsadas com antígenos particulados acoplados a um agonista de “Toll-like receptor”**. 2012. 163 f. Tese (Doutorado em Imunologia) - São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2012.

As células dendríticas (DCs) são as principais células apresentadoras de antígenos (APCs), sendo responsáveis pela ativação de linfócitos T (LT) CD4⁺ e CD8⁺. A apresentação de antígenos (Ags) exógenos para LT CD8⁺, denominada apresentação cruzada é fundamental para a indução de resposta imune contra tumores e células infectadas por vírus. Apesar de esse fenômeno ter sido bastante estudado nos últimos anos, há ainda muitas lacunas a serem preenchidas para sua total compreensão. Foi recentemente proposto que as DCs selecionam os Ags que serão apresentados e que essa seleção é baseada na presença de ligantes para receptores para reconhecimento de padrões (PRRs), na partícula fagocitada - notadamente, receptores semelhantes ao Toll (TLRs). Mostrou-se que este fenômeno é importante para a apresentação de Ags no contexto de classe II para ativação de LT CD4⁺. Contudo, não foi abordada a importância da co-localização do Ag e do ligante de TLR em uma única “partícula” para a apresentação em classe I – o que levaria à indução de resposta de LT CD8⁺. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar se o acoplamento de Ags particulados a um agonista de TLR poderia torná-los mais eficientes como desencadeadores de uma resposta imune mediada por LT CD8⁺ induzida por DCs humanas tratadas com as moléculas acopladas. Nossos resultados mostraram que a presença de um ligante de TLR no material fagocitado não contribuiu nem para a “maturação do fagossomo”, nem para a via endossômica de apresentação cruzada. Observamos também que a apresentação cruzada não envolve acidificação endossômica e depende de moléculas de MHC recém-sintetizadas do retículo endoplasmático. Por fim, nossos dados confirmam também a importância do estado de maturação das DCs para a indução de resposta proliferativa em LT CD8⁺, embora este não tenha sido associado, em nossas observações, com o nível de apresentação do complexo MHC-I/peptídeo, ou com as moléculas normalmente utilizadas para indicar a maturação das DCs.

Palavras-chave: Células dendríticas. TLRs. Antígenos particulados. Apresentação Cruzada. Adjuvantes. Linfócitos T. Lipopeptídeos.

ABSTRACT

BALEEIRO, R. B. **Cross-presentation and induction of immune response by dendritic cells pulsed with particulate antigens coupled to a “Toll-like receptor” agonist.** 2012. 163 p. Ph. D. thesis (Immunology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Dendritic cells (DCs) are the main antigen presenting cells (APCs), triggering activation of both CD4+ and CD8+ T lymphocytes. The presentation of endocytosed antigens (Ags) to CD8+ T cells is termed cross-presentation and it is a crucial process for the induction of immune response against tumors and virus-infected cells. Although this phenomenon has been intensively studied over the past years, there are still some gaps to be filled. It has recently been proposed that DCs select the Ags that will be presented at their surfaces and this selection seems to be based on the presence of a Toll-like receptor (TLR)-ligand on the cargo. Such a phenomenon has been shown to play a major role in the presentation of Ags in the context of MHC class II, which leads to the activation of CD4+ T cells. However, the relevance of the coupling of the Ag to a TLR-ligand on the Ag presentation in the context of class I has not been addressed. Thus, the goal of this study was to investigate whether the coupling of particulate Ags to a TLR-agonist could improve the cross-presentation and enhance the capacity of the loaded-DCs to trigger CD8+ T cell response. Our data show that the cross-presentation does not involve endosomal acidification and it relies on newly synthesized MHC-I molecules from the endoplasmic reticulum. Moreover, the presence of a TLR-ligand on the cargo neither contributed to the phagosome maturation nor to the endosomal route of cross-presentation. We also show that the maturation status of DCs is crucial for the induction of CD8+ T cells proliferation. Intriguingly, although the coupling of the Ag to the adjuvant has neither changed the expression of the markers related to maturation nor the presentation of the complex MHC-I/peptide at the DC surface, it did affect its capacity of stimulating CD8+ T cells.

Keywords: Dendritic cells. TLRs. Particulate Antigens. Cross-presentation. Adjuvants. T Lymphocytes. Lipopeptides.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ag: Antígeno

APC: Alofococianina

APCs: Células apresentadoras de antígenos (profissionais)

BCR: Receptor do linfócito B

BFA: Brefeldina A

BSA: Albumina bovina sérica

CCR: Receptor para quimiocina

CD: Cluster de diferenciação

CMV: Citomegalovírus

CO₂: Dióxido de carbono

CpG: Citosina fosfatidil guanina

Cy5: Cianina 5

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole

DC: Célula dendrítica

DD: Domínio de morte

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

dsRNA: Ácido ribonucleico (RNA) de dupla fita

EAP: Proteína E α

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA: Ensaio imunoenzimático

Fab: Fragmento de ligação ao antígeno

FITC: Isotiocianato de fluoresceína

GILG: Peptídeo M1₅₈₋₆₆ do vírus influenza A, sequência GILGFVFTL

GM-CSF: Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos

HLA-A: Antígeno Leucocitário Humano A

HLA-DR: Antígeno Leucocitário Humano DR

iDC: Célula Dendrítica Imatura

IFN: Interferon

Ig: Imunoglobulina

IL: Interleucina

IRAK: Quinase associada ao receptor de IL-1

LPS: Lipopolisacarídeo

LT: Linfócito T

M1: Proteína da matriz (do vírus influenza) 1

mDC: Célula dendrítica madura

MFI: Média de intensidade de fluorescência

MHC: Complexo de histocompatibilidade principal

Myd88: Diferenciação mielóide 88

NF-κB: Fator nuclear kappa B

NK: Células assassinas naturais

NLVP: Peptídeo pp65₅₉₅₋₆₀₃ do citomegalovírus (CMV), sequência NLVPMVATV

OVA: Ovalbumina

P2C: Di-acil-lipopeptídeo, ou Pam2, sequência Pam2Cys-GDPKHPKSF

PAMPs: Padrões moleculares associados à patógenos

PBMCs: Células mononucleares de sangue periférico

PBS: Solução salina tamponada com fosfatos

PLGA: Poli (ácido láctico-co-ácido glicólico)

Poli I:C: Ácido poli-inosínico poli-citidílico

pp65: Fosfoproteína de 65 kD, de CMV

PRRs: Receptores para reconhecimento de padrões

pSTAT: Transdutor de sinal e ativador de transcrição (STAT) fosforilado

SBF: Soro bovino fetal

SOCS: Supressores de sinalização de citocinas

ssRNA: Ácido ribonucléico (RNA) de fita única

STAT: Transdutor de sinal e ativador de transcrição

T2: Linhagem de linfócitos deficiente em TAP

TAP: Proteína associada com o processamento de antígenos

TCR: Receptor do linfócito T

TGF: Fator de crescimento transformador

Th: Linfócito T helper

TIR: Receptor para IL-1 e Toll

TIRAP: Proteína associada a TIR

TLRs: Receptores semelhantes ao Toll

TNF: Fator de necrose tumoral

TRAM: Molécula adaptadora relacionada à TRIF

T reg: Linfócitos T reguladores

TRIF: Adaptador indutor de IFN- β contendo domínio TIR

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	17
2 OBJETIVOS	25
3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	26
4 MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 Casuística	28
4.2 Obtenção dos peptídeos e lipopeptídeo.....	28
4.3 Partículas de sílica e conjugação de peptídeos/lipopeptídeo	28
4.4 Diferenciação de DCs a partir de monócitos do sangue periférico in vitro	29
4.5 Tratamento das DCs no dia cinco da cultura	30
4.6 Avaliação do fenótipo de membrana de DCs por citometria de fluxo	31
4.7 Estratégia para análise fenotípica das DCs	32
4.8 Detecção de IL-12p70 por ensaio imunoenzimático (ELISA)	34
4.9 Avaliação da viabilidade celular	34
4.10 Análise das DCs por microscopia confocal de fluorescência.....	35
4.10.1 Internalização das partículas e localização intracelular do peptídeo/P2C	35
4.10.2 Localização intracelular das partículas	36
4.11 Detecção dos complexos MHC-I/peptídeo na membrana das DCs por citometria de fluxo	37
4.12 Tratamento das DCs com inibidores	37
4.13 Separação de linfócitos T CD8+ para ensaio proliferativo	38
4.14 Avaliação da atividade estimuladora das DCs	39
4.15 Análise estatística	39
5 RESULTADOS.....	40
5.1 Caracterização das DCs geradas in vitro	40
5.2 Expressão de TLR2 pelas DCs	42
5.3 Viabilidade celular	43
5.4 Fenótipo de membrana das DCs carregadas com partículas contendo peptídeos e/ou P2C	46
5.5 Produção de IL-12p70 pelas DCs carregadas com partículas	52

5.6 Internalização das partículas e localização intracelular dos peptídeos/P2C a elas associados	54
5.7 Detecção do complexo MHC-I/peptídeo na superfície das DCs	59
5.8 Avaliação do papel da fagocitose na apresentação cruzada do peptídeo associado às partículas	62
5.9 Avaliação da importância da acidificação em compartimentos endossômicos na apresentação cruzada do peptídeo associado às partículas	64
5.10 Envolvimento do transporte retículo endoplasmático-aparelho de Golgi na apresentação cruzada do peptídeo associado às partículas	70
5.11 Avaliação da resposta de linfócitos T CD8+ específicos	72
5.11.1 Resposta ao epítipo de influenza A	72
5.11.2 Resposta ao epítipo de CMV	75
6 DISCUSSÃO	78
7 CONCLUSÕES	87
REFERÊNCIAS	89
APÊNDICES	98
APÊNDICE A - Manuscrito submetido à publicação.....	98
APÊNDICE B - Manuscrito submetido à publicação.....	133

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A idéia de que o sistema imune tenha sido moldado ao longo da evolução com a “finalidade” de discriminar entre o próprio e o não-próprio parece bastante coerente e está bem estabelecida. Com isso, a compreensão do modo pelo qual o organismo detecta a presença de agentes infecciosos e os elimina sem destruir os tecidos próprios tem se tornado um assunto intrigante e fascinante na Imunologia. Esta capacidade, inerente do sistema imune, de reconhecer e responder ao “estranho” e, ao mesmo tempo, tolerar o próprio, não é tão simples como pode parecer à primeira vista, dada a grande diversidade molecular dos patógenos e sua alta taxa de mutação e replicação. Em resposta a esse desafio, os organismos multicelulares, por sua vez, têm desenvolvido, ao longo do processo evolutivo, diversos sistemas de reconhecimento. Nos animais vertebrados, por exemplo, esse sistema pode ser dividido em dois grandes segmentos – o da imunidade inata e o da imunidade adaptativa (JANEWAY, 2001; PANCER; COOPER, 2006).

O sistema de reconhecimento da imunidade adaptativa depende da geração de um repertório altamente diversificado de receptores, distribuídos clonalmente em células especializadas – os linfócitos (B e T), capazes de interagir especificamente com, potencialmente, qualquer molécula (antígenos, por definição). Os receptores de linfócitos B (BCR) e os receptores de linfócitos T (TCR), após serem gerados aleatoriamente, sofrem um processo de seleção que elimina os clones celulares que expressam aqueles com afinidade “excessiva” pelos antígenos (Ags) próprios – diretamente no caso dos linfócitos B e em associação com moléculas codificadas pelo Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC, do inglês **Major Histocompatibility Complex**) próprio no caso dos linfócitos T (PANCER; COOPER, 2006). Um outro importante atributo da imunidade adaptativa é a geração de memória imunológica, que proporciona um ajuste adaptativo considerável aos animais vertebrados.

No entanto, a despeito desses importantes atributos, esta resposta imune adaptativa tem duas importantes “limitações”. Primeiro, receptores para Ags gerados de modo aleatório são incapazes de determinar a origem e o contexto biológico do Ag para o qual eles são específicos, havendo sempre a possibilidade de “escape” de clones

auto-reativos dos processos de seleção, cuja ativação na periferia precisaria de um controle adicional. Segundo, a distribuição clonal de receptores para Ags requer que clones específicos sofram expansão e se diferenciem em células efetoras para que elas possam contribuir de maneira significativa para a defesa do hospedeiro. Como consequência, a resposta imune adaptativa inicial ou “primária” é relativamente demorada, levando de 4 a 7 dias aproximadamente para ser estabelecida de forma efetiva (PANCER; COOPER, 2006), o que é, de fato, tempo demais para combater microorganismos invasores que se replicam rapidamente. É notório, entretanto, que a imunidade adaptativa não funciona de maneira independente. De fato, ela ocorre, quase sempre, em seguida a uma resposta da imunidade inata, que, muito frequentemente, é capaz de conter o processo infeccioso e influenciar significativamente a resposta adaptativa que lhe sucede (MEDZHITOV, 2001). Assim, de maneira geral, a imunidade inata detecta a presença e a natureza da infecção, proporciona a primeira linha de defesa para o hospedeiro, influencia de maneira significativa o início da resposta adaptativa e a classe de células efetoras predominantes na mesma (MEDZHITOV, 2001).

Dentre as várias estratégias de discriminação do “próprio”/“não-próprio” adotadas pelo sistema imune inato dos vertebrados, uma de grande importância é, sem dúvida a que permite ao hospedeiro reconhecer produtos microbianos que lhes são únicos (MEDZHITOV; JANEWAY, 2002). Esta estratégia permite ao sistema imune inato diferenciar, de maneira eficaz, o não-próprio e potencialmente infeccioso do próprio, não-infeccioso. Esses produtos microbianos apresentam o que foi chamado de “padrões moleculares associados à patógenos” (PAMPs) e estão, frequentemente, envolvidos em funções vitais para o microorganismo sendo, desse modo, conservados entre microorganismos de uma dada classe (JANEWAY, 1989, 1992). Como exemplos de PAMPs podemos citar a flagelina, motivos de CpG não metilados e RNA de dupla fita (dsRNA), que são moléculas encontradas em bactérias e/ou vírus, mas não em células do hospedeiro. Portanto, esses produtos podem ser vistos como “assinaturas moleculares” de microorganismos invasores, e seu reconhecimento pela imunidade inata pode ser indicativo da presença de infecção (JANEWAY, 1992). Essas propriedades dos PAMPs indicam que seu reconhecimento deve ter surgido num

estágio muito inicial na evolução do sistema de defesa do hospedeiro, o que é reforçado ainda pelo fato de PAMPs serem reconhecidos também pelos “sistemas imunes” de invertebrados e plantas (MEDZHITOV, 2001).

Para o reconhecimento dos diversos PAMPs, o sistema imune conta com os “receptores para reconhecimento de padrões” (PRRs). Esses PRRs podem ser expressos tanto na superfície celular quanto em compartimentos intracelulares ou ainda, secretados para a corrente sanguínea e fluidos teciduais. Entre as principais funções dos PRRs estão a opsonização (GEWURZ et al., 1982; SCHWALBE et al., 1992; WRIGHT; ULEVITCH; RAMOS, 1989), ativação do complemento (HOLMSKOV, 2000), fagocitose (ELOMA et al., 1995; PEARSON, 1996) e ativação de vias de sinalização para a geração de citocinas importantes na resposta inflamatória, como a IL-12 e o TNF- α (KOSKI; KARIKO; XU, 2004).

Dentre os PRRs conhecidos, os que vêm ganhando especial atenção dos imunologistas nos últimos anos são os receptores semelhantes ao Toll (TLRs). Estes pertencem a um grupo de receptores altamente conservados e primeiramente descritos em *Drosophila* (GAY e KEITH, 1991; POLTORAK et al., 1998). É interessante observar que em drosófilas os receptores do tipo Toll parecem estar envolvidos primariamente na embriogênese (ANDERSON, 2000; HASHIMOTO; HUDSON; ANDERSON, 1988), mas o seu bloqueio torna os animais suscetíveis a infecções, principalmente por fungos (LEMAITRE et al., 1996; MENG; KHANUJA; IP, 1999; RUTSCHMANN et al., 2000).

Estruturalmente, os TLRs são caracterizados pela presença de um domínio de repetição rico em leucina na sua região de ligação ao PAMP e um domínio TIR (receptor para IL-1 e Toll) na sua região de sinalização. Até o momento, foram identificados, em humanos, 11 diferentes TLRs (TLR1-TLR11) (AKIRA; TAKEDA, 2004). Baseado na sequência de aminoácidos TLR1, TLR2, TLR6 e TLR10 são intimamente relacionados e constituem a subfamília TLR2 (TLR1 e TLR6 formam heterodímeros com TLR2 na membrana celular). De igual modo, TLR7, TLR8 e TLR9 constituem a subfamília TLR9 (TAKEDA; KAISHO; AKIRA, 2003). Os demais TLRs ainda não foram classificados em famílias.

Apesar do vasto conhecimento que dispomos nos dias de hoje acerca dos diferentes TLRs, o primeiro deles, o TLR4 só foi descoberto na década de 1990 (GAY;

KEITH, 1991; POLTORAK et al., 1998), tendo sido descrito como transdutor de sinal do lipopolissacarídeo (LPS), o principal componente da parede celular de bactérias Gram-negativas. Desde então, vários outros TLRs foram descritos por serem capazes de reconhecer e mediar sinais intracelulares para uma vasta categoria de componentes microbianos (ou não), como consta no quadro 1 a seguir:

Quadro 1 - Ligantes para TLRs em humanos.

TLR	Ligantes	Referência
TLR1/2	Tri-acil-peptídeos	OZINSKY; UNDERHILL; FONTENOT, 2000
TLR2	Lipoproteínas, peptidoglicano, zimozan	HERTZ ; WU; PORTER, 2003; McCURDY ; OLYNYCH; MAHER, 2003
TLR2/6	Di-acil-lipopeptídeos	OZINSKY; UNDERHILL; FONTENOT, 2000
TLR3	RNA de dupla fita (dsRNA)	ALEXOPOLOU et al., 2001; WANG; TOWN; ALEXOPOULOU, 2004; GUILLOT ; LE GOFFIC; BLOCH, 2005
TLR4	Lipopolissacarídeo bacteriano (LPS)	ROGER ; DAVID; GLAUSER, 2001; FAN ; MALIK, 2005
TLR5	Flagelina	GEWIRTZ; NAVAS; LYONS, 2001
TLR7	RNA de fita simples (ssRNA)	HEIL; HERMMI; HOCKREIN, 2004
TLR8	RNA de fita simples (ssRNA)	HEIL; HERMMI; HOCKREIN, 2004
TLR9	Motivos de CpG não metilados	BAUER ; KIRSCHINING; HACKER, 2001; LATZ ; SCHOENEMEYER; VISINTIN, 2004; SIVORI ; FALCO; DELLA CHIESA, 2004
TLR10	Desconhecido	COOK; PISETSKY; SCHWARTZ, 2004
TLR11	Desconhecido	ZHANG; ZHANG; HAYDEN, 2004

Após interação do TLR com seu ligante, há uma série de eventos intracelulares subsequentes que culminarão na transcrição de genes para citocinas pró-inflamatórias e moléculas do MHC de classe I (MHC-I) e de classe II (MHC-II) (AKIRA; TAKEDA, 2004; KOPP; MEDZHITOV, 2003; TAKEDA; KAISHO; AKIRA, 2003). A maioria dos TLRs, incluindo TLR1, 2, 4, 5, 6, 7 e 9 compartilham uma via de sinalização comum através da molécula adaptadora MyD88 (Diferenciação Mielóide 88, do inglês **Myeloid Differentiation**), que tem um domínio TIR em sua região C-terminal e um domínio de morte (DD, do inglês **Death domain**) em sua região N-terminal (AKIRA; TAKEDA, 2004; KOPP; MEDZHITOV, 2003; TAKEDA; KAISHO; AKIRA, 2003). Ao serem estimulados, estes TLRs recrutam MyD88 pela interação de seus respectivos domínios TIR. O DD de MyD88 liga-se então ao DD de IRAK (Quinase associada ao receptor de IL-1) e o sinal

é propagado via TRAF6 (Fator 6 associado ao receptor de TNF), levando à ativação de MAPK (Proteína quinase ativada por mitógenos), e do fator de transcrição NF- κ B, que resultará na transcrição dos genes para citocinas pró-inflamatórias e moléculas do MHC-I e II (AKIRA; TAKEDA, 2004; KOPP; MEDZHITOV, 2003; TAKEDA; KAISHO; AKIRA, 2003). Uma segunda proteína adaptadora contendo TIR, a TIRAP (Proteína associada a TIR) está envolvida na via MyD88-dependente de TLR1/2, TLR2/6 e TLR4, mas não de outros TLRs (HORNG et al., 2002; YAMAMOTO et al., 2002).

A observação de que o poli I:C, um ligante de TLR3, é capaz de induzir a ativação de NF- κ B e a produção de citocinas inflamatórias em camundongos “nocaute” para MyD88, levou à descoberta, para TLR3, de uma outra via de sinalização, independente de MyD88 (AKIRA; TAKEDA, 2004; ALEXOPOULOU et al., 2001). Parecem participar desta via “alternativa”, duas moléculas adaptadoras diferentes, ambas contendo domínios TIR, o TRIF (Adaptador indutor de IFN- β contendo domínio TIR) e a TRAM (Molécula adaptadora relacionada à TRIF) (YAMAMOTO et al., 2002, 2003).

A atividade destes receptores e moléculas sinalizadoras pode ser identificada em diferentes tipos celulares no organismo (IWASAKI; MEDZHITOV, 2004). Dentre estes, é muito relevante considerar as células dendríticas (DCs), células que fazem uma conexão funcional entre a resposta inata e a resposta adaptativa e que têm papel central na modulação do tipo de resposta adaptativa que se desenvolve. Assim, através de seus TLRs, as DCs imaturas, localizadas nos tecidos periféricos, identificam PAMPs de microorganismos potencialmente perigosos, e com o auxílio, ou não, de receptores endocíticos, capturam esses microorganismos, migram para os órgãos linfóides secundários, passando por um processo de maturação. Nesse estágio, elas expressam altos níveis de moléculas co-estimuladoras (CD80 e CD86), aumentam a expressão de moléculas do MHC-I e II e passam a expressar as moléculas CD83 (EGNER; HART, 1995; ZHOU et al., 1992) e CCR7, ao mesmo tempo em que deixam de expressar CCR1, CCR5 e CCR6 (BANCHEREAU et al., 2000). A mudança da expressão de CCR1, CCR5 e CCR6 para CCR7 favorece a migração destas células ativadas para as áreas timo-dependentes dos linfonodos. Da mesma forma, a mudança da cinética de expressão de moléculas do MHC favorece a apresentação dos antígenos capturados no

momento de sua ativação para os linfócitos T (LT) “naive” (também atraídos para as mesmas áreas do linfonodo). Este processo de maturação das DCs é acompanhado por eventos intracelulares que incluem a diminuição dos níveis de SOCS (Supressores de sinalização de citocinas, do inglês **S**uppressors of **C**ytokine **S**ignaling) 2 e pSTAT6, assim como aumento nos níveis de SOCS1, SOCS3 e pSTAT1 (JACKSON et al., 2004). É interessante notar que esta maturação, ao mesmo tempo em que é estimulada – pelo aumento de pSTAT1 - é também controlada pelo aumento, simultâneo, de SOCS1 (SHEN et al., 2004).

Além de seu papel claro na apresentação de Ags aos linfócitos T, as DCs, dependendo, entre outros possíveis fatores, do perfil de citocinas liberadas, podem, ainda, influenciar o padrão de resposta dos LT. Assim, a produção de IL-12 por DCs favorece o desenvolvimento de linfócitos T helper de padrão 1 (Th1), ao passo que a ausência de produção pelas DCs de IL-12, na presença de IL-4 e/ou IL-13 favoreceria uma resposta predominantemente mediada por linfócitos do tipo Th2. Em contrapartida, a produção de IL-10 pelas DCs pode favorecer o surgimento de linfócitos T reguladores (T reg), caracterizados pela expressão do fator de transcrição Foxp3 e pela produção de citocinas imunossupressoras como TGF- β e IL-10 (FONTENOT; GAVIN; RUDENSKY, 2003; HORI; NOMURA; SAKAGUCHI, 2003; ZOU, 2006). Mostrando a heterogeneidade do sistema, há ainda um outro padrão de resposta recentemente descrito, o de linfócitos do tipo Th17, caracterizado pela produção de IL-17 (STEINMAN, 2007), cuja ativação parece depender da presença de IL-23 (BETTELLI OUKKA; KUCHROO, 2007; KORN et al., 2007).

Neste contexto, é importante notar o papel dos TLRs. Há relatos de que a ativação de TLRs (TLR1 a TLR9), nas DCs, parece levar à indução de uma resposta Th1, ao passo que a maturação de DCs na ausência destes ligantes de TLR estaria relacionada à indução de um padrão Th2 ou T reg (MEDZHITOV, 2001). Um outro aspecto que merece atenção é o fato de que, dependendo do tipo e localização do TLR estimulado (intracelular ou de superfície), as DCs podem induzir uma resposta distinta (NAPOLITANI et al., 2005; TRINCHIERI; SHER, 2007). É interessante notar que o trabalho de Napolitani et al. (2005) mostrou que TLRs localizados na superfície de DCs parecem agir de maneira sinérgica com TLRs de localização intracelular/endossômica

para induzir uma resposta imune mediada por linfócitos Th1 (pela a secreção de grande quantidade de IL-12 pelas DCs). Mostrando o “refinamento” do reconhecimento também na imunidade inata, há as observações de que o acoplamento físico do Ag ao agonista de TLR parece influenciar significativamente a ativação de linfócitos T naive por DCs. Nesse sentido, um interessante estudo feito por Blander e Medzhitov (2006) mostrou que uma maneira bastante eficaz de as DCs estimularem LT naive para o desenvolvimento de uma resposta adaptativa efetora subsequente, seria a maturação dessas células com agonistas de TLR acoplados fisicamente ao Ag contra o qual se pretende induzir imunidade. Nesse trabalho os autores puderam mostrar que, quando diferentes Ags (ovalbumina, lisozima ou proteína E α - EAP), acoplados fisicamente a um agonista de TLR são capturados por DCs, eles são apresentados pelas DCs de maneira substancialmente “melhor” do que se capturados isoladamente ou não-acoplados fisicamente ao agonista de TLR. Na verdade, os pesquisadores puderam observar que o lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), ligante do TLR4, induziu maturação do fagossomo contendo o Ag usado, passo crucial para o processamento e apresentação do mesmo. Desse modo, o Ag que estava acoplado ao ligante de TLR pôde ser melhor processado e teve uma apresentação significativamente melhor de seus epítomos, complexados ao MHC-II na membrana das DCs.

Estes fenômenos mostram, de modo elegante, como o sistema imune pode discriminar entre o “próprio”/“não-próprio”, identificando situações e moléculas potencialmente perigosas, contra as quais a resposta específica da imunidade adaptativa deve ser ativada.

É importante observar que o foco do estudo de Blander e Medzhitov foi a apresentação de antígenos no contexto do MHC de classe II e ativação de linfócitos T CD4+. No mesmo, no entanto, não foi abordada a importância da co-localização do antígeno e do adjuvante em uma única “partícula” para a eficiente apresentação no contexto do MHC de classe I – o que levaria à indução de resposta de linfócitos CD8+. Uma vez que os linfócitos T CD8+ ativados são os responsáveis por matar células tumorais e também células infectadas por vírus, a investigação do melhor modo de induzir sua ativação pode contribuir significativamente para o desenvolvimento de abordagens imunoterapêuticas contra esse tipo de moléstia.

Diante do exposto, torna-se instigante a possibilidade de, acoplando Ags a agonistas de TLRs, torná-los mais eficientes como desencadeadores de uma resposta imune induzida pela vacinação com DCs tratadas com as moléculas acopladas, que poderia ser usado em protocolos de vacinação contra o câncer, por exemplo. O estudo da diferenciação de células dendríticas humanas neste contexto contribuirá para a compreensão das relações entre a resposta inata e a adaptativa e será fundamental para a otimização de protocolos de vacinação anti-tumoral baseados nas DCs, o que vem sendo buscado por nosso grupo nos últimos anos.

Assim, o objetivo deste estudo foi investigar se o acoplamento de antígenos a um agonista de TLR poderia torná-los mais eficientes como desencadeadores de uma resposta imune mediada por linfócitos T CD8⁺ induzida por DCs humanas tratadas com as moléculas acopladas. A indução de resposta à antígenos exógenos mediada por linfócitos T CD8 envolve um fenômeno conhecido como apresentação cruzada. O processamento de antígenos para a apresentação cruzada ainda não foi completamente elucidado e é objeto de intensa investigação por diversos grupos (BURGDORF et al., 2008; DI PUCCHIO et al., 2008; KASTURI; PULENDRAN, 2008). O papel da acidificação endossômica e a participação do retículo endoplasmático no processamento antigênico para a apresentação cruzada ainda não estão bem estabelecidos e são alvo de debate e controvérsia (ACCAPEZZATO et al., 2005; BABON et al., 2005; BURGDORF et al., 2008; DI PUCCHIO et al., 2008; KASTURI; PULENDRAN, 2008; MANTEGAZZA et al., 2008). Diante disso, investigamos também em nosso modelo experimental a importância desses dois parâmetros na apresentação cruzada.

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi investigar a importância do acoplamento de antígenos ao estímulo de maturação (ligantes de TLR) para o processamento antigênico por DCs humanas para apresentação cruzada e consequente ativação de linfócitos T CD8+ antígeno-específicos.

Os peptídeos M1₅₈₋₆₆ (GILGFVFTL) do vírus da influenza A e o pp65₅₉₅₋₆₀₃ (NLVPMVATV) do citomegalovírus (CMV) foram usados como modelos de antígenos. Como estímulo de maturação, utilizou-se o lipopeptídeo di-acetilado Pam2Cys-GDPKHPKSF, um agonista de TLR2 e 6. Tanto os peptídeos quanto o lipopeptídeo foram associados à partículas de sílica antes de serem acrescentados às culturas de DCs. Peptídeos e lipopeptídeo foram adicionados às DCs, adsorvidos às mesmas (acoplado) ou a diferentes partículas (não-acoplado). Nas DCs que receberam os diferentes estímulos foram analisados os seguintes parâmetros:

- viabilidade;
- expressão das moléculas de superfície relacionadas à maturação (HLA-DR, CD80, CD83 e CD86);
- secreção de IL-12;
- internalização das partículas e localização intracelular dos peptídeos a elas associados;
- expressão do complexo MHC-I/peptídeo na superfície;
- papel da fagocitose, acidificação endossômica e transporte retículo endoplasmático-aparelho de Golgi na apresentação do peptídeo adsorvido às partículas;
- capacidade de induzir proliferação em linfócitos T CD8+ autólogos, específicos para os peptídeos com os quais essas DCs foram pulsadas.

3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Inicialmente, DCs imaturas foram obtidas por diferenciação de células mononucleares aderentes do sangue periférico (PBMCs). À cultura de células aderentes foram adicionadas as citocinas GM-CSF e IL-4, o que resultou na geração de DCs imaturas no dia cinco da cultura. Às DCs imaturas foram adicionados os peptídeos GILG ou NLVP, acoplados ou não por partículas ao lipopeptídeo di-acetilado Pam2Cys-GDPKHPKSF (P2C, agonista de TLR2 e 6). Como controle de maturação, foi utilizado o coquetel de citocinas inflamatórias, composto de IL-1- β , IL-6 e TNF- α . No dia seis da cultura, foi investigada nas DCs, a internalização das partículas contendo os peptídeos, assim como a localização intracelular desses peptídeos. Para essas análises foi usada a microscopia confocal. Em paralelo, foi investigada a expressão do complexo MHC-I/peptídeo na superfície dessas DCs por citometria de fluxo. No dia sete da cultura, foi analisada a viabilidade celular. Para isso foi utilizado um kit comercial para a detecção de células vivas e mortas, o kit Live/Dead (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Assim, as DCs foram marcadas com o composto não fluorescente calceína-AM, que é metabolizado em células vivas em um composto altamente fluorescente, a calceína. Junto com a calceína-AM foi adicionado o homodímero de etídio-1, um composto fluorescente que entra em células com membrana danificada e liga-se a ácidos nucleicos. Assim, usando esses dois compostos em conjunto foi possível ter uma medida da quantidade de células vivas (positivas para calceína) e células mortas (positivas para o homodímero de etídio-1) na análise dessas células por citometria de fluxo. Também no dia sete da cultura foi checada a maturação das DCs. Isso foi feito pela análise citofluorimétrica da expressão de moléculas co-estimuladoras (CD80 e CD86), do CD83 e HLA-DR. Um outro importante parâmetro de maturação de DCs, a produção de IL-12, foi avaliada por ELISA no sobrenadante dessas culturas. Por fim, foi avaliada a capacidade dessas DCs de estimular linfócitos T CD8+ autólogos contra os peptídeos GILG e NLVP, com o qual essas células foram pulsadas. Para isso, as DCs foram mantidas em co-cultura com linfócitos T CD8+ autólogos por sete dias, após os quais, esses linfócitos foram marcados com os anticorpos anti-CD8 e tetrâmeros de HLA-A*0201/GILG ou HLA-A*0201/NLVP. Isso permitiu a quantificação dos linfócitos T

CD8+ específicos para os antígenos com os quais as DCs haviam sido carregadas. Essa análise foi feita por citometria de fluxo. A figura 1 abaixo sumariza todo o procedimento experimental adotado.

Figura 1 - Delineamento experimental.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Casuística

Ao longo do estudo foram estudadas células de 47 indivíduos sadios que concordaram previamente em participar da pesquisa. Como critérios de elegibilidade foram considerados idade acima de 18 anos, peso acima de 50 kg e sorologia negativa para exames realizados rotineiramente em banco de sangue. A coleta das amostras, bem como a realização deste projeto de estudo foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital Charité de Berlim e também pelo Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

4.2 Obtenção dos peptídeos e lipopeptídeo

Foi utilizado nesse estudo o peptídeo M1₅₈₋₆₆ do vírus influenza A (GILGFVFTL, referido como GILG) e o pp65₅₉₅₋₆₀₃ do citomegalovírus (CMV) (NLVPMVATV, referido como NLVP), ambos restritos pelo HLA-A*0201 do MHC de classe I. O lipopeptídeo usado foi o di-acil-lipopeptídeo, ou Pam2 (Pam2Cys-GDPKHPKSF), referido aqui como P2C. Em alguns experimentos foram utilizados os mesmos peptídeos e lipopeptídeo, porém corados com rodamina, para visualização por microscopia confocal de fluorescência. Tanto os peptídeos/lipopeptídeo “puros” quanto os corados com rodamina foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Karl-Heinz Wiesmüller da Universidade de Tübingen (Tübingen, Alemanha).

4.3 Partículas de sílica e conjugação de peptídeos/lipopeptídeo

Foram utilizadas para esse estudo, partículas de sílica com diâmetro de 1 µm. Em alguns experimentos utilizaram-se partículas marcadas com corantes fluorescentes (Isotiocianato de fluoresceína, FITC ou cianina 5, Cy5), para visualização por microscopia confocal de fluorescência. Tanto os peptídeos/lipopeptídeos purificados como os “fluorescentes” foram conjugados a essas partículas pela empresa Surflay

Nanotec Berlin GmbH (Berlim, Alemanha), usando-se a metodologia descrita em Peyratout e Dähne, 2004.

Em suma, todos os peptídeos e o P2C continham uma cauda com quatro aminoácidos de lisina (poli-lisina) em uma de suas extremidades. Essa cauda de poli-lisina é carregada positivamente. Por outro lado, as partículas de sílica, em pH entre 6,5 e 8 exibem uma superfície negativamente carregada. Nessas condições, os peptídeos/P2C ligam-se às partículas. Em pH abaixo de 6, a superfície das partículas muda de carga, passando de negativa para positiva. Nesse mesmo pH, a cauda poli-lisina dos peptídeos/P2C mantém-se com carga positiva, o que permite sua liberação das partículas.

4.4 Diferenciação de DCs a partir de monócitos do sangue periférico in vitro

Foram utilizados entre 80 e 120 mL de produto de bolsa (Buffy coat) de doadores de sangue do Hospital Charité, da Faculdade de Medicina da Universidade Humboldt de Berlim. Estas bolsas continham entre 3 a 10×10^8 células mononucleares. As amostras foram colocadas, individualmente, em tubos cônicos de 50 mL, diluídas 1:2 em salina tamponada com fosfato (PBS; Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e submetidas à centrifugação sobre 12 mL de Ficoll-Paque Plus (Amersham Pharmacia, Little Chalfont, Buckinghamshire, Reino Unido) para obtenção de células mononucleares. O material foi centrifugado por 30 min a 900 G, à temperatura entre 18 °C e 20 °C. A camada de células mononucleares foi recuperada, colocada em outro tubo juntamente com meio de cultura RPMI 1640 GlutaMax (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e centrifugada a 600 G por 10 min. As células foram lavadas mais duas vezes a 300 e 200 G, respectivamente. O *pellet* foi coletado, as células quantificadas, ressuspensas em meio de cultura RPMI 1640 GlutaMax acrescido de 10% de soro bovino fetal (SBF; Biochrom, Berlin, Alemanha) (meio de cultura R-10) e colocadas em placas de 6 poços, na concentração de 1×10^7 /mL por poço. As células foram mantidas em estufa de CO₂ por 2 h a 37 °C, para aderência. Após este período, as células não-aderentes foram coletadas e congeladas a -80 °C, em meio contendo SBF e 10% de DMSO (Pierce, Rockford, IL, EUA), para posterior utilização em ensaios para avaliação da resposta linfocitária

(NEVES et al., 2005; PALUCKA et al., 1998). As células aderentes foram cultivadas por sete dias em meio de cultura R-10 (meio RPMI 1640 GlutaMax suplementado com 10% de soro fetal bovino), contendo 50 ng/mL de GM-CSF (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) e 50 ng/mL de IL-4 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), em estufa de CO₂ a 37 °C.

4.5 Tratamento das DCs no dia cinco da cultura

No dia cinco da cultura, as células, agora DCs imaturas receberam como estímulo de maturação um coquetel de citocinas inflamatórias (IL-1- β , IL-6 e TNF- α ; todas da Strathmann Biotech, Hamburgo, Alemanha), um conhecido indutor de maturação para essas células, sendo assim, um controle para maturação em nossos experimentos. Outro grupo de células não recebeu tratamento no quinto dia, sendo nosso controle para DCs imaturas. Os demais grupos foram tratados com partículas contendo o lipopeptídeo di-acetilado (P2C), os peptídeos GILG e NLVP, sozinhos ou em associação ao P2C, na mesma partícula ou em partículas distintas. Para facilitar o entendimento, as diversas condições de cultura receberam denominações, que são relacionadas no Quadro 2.

Quadro 2 - Denominação das condições de cultura

Nomenclatura	Condição de cultura
Sem tratamento (controle)	PBMCs aderentes cultivadas por 7 dias com GM-CSF e IL-4
IL-1- β , IL-6 e TNF- α	Tratadas no 5º dia com TNF- α , IL-1- β e IL-6
(P2C)	Tratadas no 5º dia com partículas contendo P2C
(GILG)	Tratadas no 5º dia com partículas contendo GILG
(NLVP)	Tratadas no 5º dia com partículas contendo NLVP
(GILG-P2C)	Tratadas no 5º dia com partículas contendo GILG e P2C
(NLVP-P2C)	Tratadas no 5º dia com partículas contendo NLVP e P2C
(GILG) + (P2C)	Tratadas no 5º dia com partículas contendo GILG e partículas contendo P2C
(NLVP) + (P2C)	Tratadas no 5º dia com partículas contendo NLVP e partículas contendo P2C
(GILG-P2C) + (NLVP)	Tratadas no 5º dia com partículas contendo GILG e P2C e partículas contendo NLVP
(NLVP-P2C) + (GILG)	Tratadas no 5º dia com partículas contendo NLVP e P2C e partículas contendo GILG

Nota: GILG= M1₅₈₋₆₆ do vírus influenza A (GILGFVFTL); NLVP= pp65₅₉₅₋₆₀₃ do citomegalovírus (CMV) (NLVPMVATV); P2C= di-acil-lipopeptídeo, ou Pam2 (Pam2Cys-GDPKHPKSF).

Os peptídeos GILG e NLVP (adsorvidos às partículas) foram adicionados às DCs na concentração de 1 μ g de peptídeo por mL de meio de cultura.

4.6 Avaliação do fenótipo de membrana de DCs por citometria de fluxo

Para determinação do fenótipo de membrana, as DCs diferenciadas a partir de monócitos do sangue periférico dos doadores saudáveis, após tratamento descrito na seção 4.5, foram marcadas com anticorpos monoclonais comerciais contra as seguintes moléculas de membrana: coquetel de anticorpos marcados com FITC contra as seguintes moléculas: CD3 (marcador de linfócito T), CD14 (marcador de monócito/macrófago), CD19 (marcador de linfócitos B) e CD56 (marcador de linfócitos NK); CD11c (marcador de células mielóides – monócitos, macrófagos e DCs), CD40 (molécula co-estimuladora), CD80 (ou B7-1, molécula co-estimuladora), CD83 (marcador de DCs ativadas/maduras), CD86 (ou B7-2, molécula co-estimuladora), e HLA-DR (molécula do MHC-II, expressa em APCs profissionais). Cada tubo de

marcação continha os anticorpos **Lin** (coquetel contendo anticorpos marcados com FITC para as moléculas CD3, CD14, CD19 e CD56), **HLA-DR**, **CD11c** e um quarto marcador que era **CD80**, **CD86** ou **CD83**. Todos os anticorpos mencionados foram adquiridos da BD Biosciences, Chicago, IL, EUA. Em alguns experimentos, incluímos como quarto marcador o **TLR2** (BioLegend, San Diego, CA, EUA).

Após a contagem em câmara de Neubauer, as células ($\sim 5 \times 10^4$) foram colocadas em tubos cônicos de 5 mL e centrifugadas por 10 min a 300 G e a 4 °C. Foi então, adicionado o anticorpo específico (para os marcadores de superfície acima citados) em concentração apropriada para o marcador de interesse e os tubos incubados por 20 min em temperatura ambiente e ao abrigo de luz. Após este período, foi acrescentado 1 mL de tampão para citometria (FACSFlow, BD) e os tubos foram novamente centrifugados. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e as células resuspensas em 200 μ L do tampão para citometria para posterior aquisição no citômetro de fluxo. Para a análise foi utilizado o “software” CellQuest (BD) ou WinMDI (Purdue University, EUA - www.purdue.edu).

4.7 Estratégia para análise fenotípica das DCs

Ao final do período de cultura, as células foram analisadas quanto ao seu fenótipo de membrana, por citometria de fluxo. A Figura 2 abaixo ilustra a estratégia usada para a análise fenotípica das DCs. Em suma, todas as amostras submetidas à citometria de fluxo foram analisadas dentro do “gate” R1, de acordo com seu tamanho (Forward scatter) e granulosidade (Side scatter). Nesse gate estavam incluídas células relativamente maiores e mais granulosas. Em seguida, as células foram delimitadas em outro gate, de acordo com a expressão de marcadores de linhagem, “Lin” (do inglês, lineage), ou seja, foram incluídas na análise somente células negativas para Lin. Células desses dois Gates que expressavam simultaneamente HLA-DR e CD11c foram delimitadas em um terceiro gate (R3) e a expressão das moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86, do marcador de ativação CD83 e de TLR2 foi analisada.

Figura 2 - Estratégia de gate para a análise das DCs.

4.8 Detecção de IL-12p70 por ensaio imunoenzimático (ELISA)

Os sobrenadantes de culturas de DCs foram coletados no dia sete da cultura e a dosagem da citocina IL-12p70 nesses sobrenadantes foi realizada por ELISA, utilizando o kit ELISA Max Standard para citocinas (BioLegend, San Diego, CA, EUA). Nesse método, placas de 96 poços Maxisorp (Nalge Nunc International, Rochester, NY, EUA) foram sensibilizadas com 100 µL/poço, de anticorpo de captura diluído em solução tampão carbonato-bicarbonato (pH= 9,4), e incubadas por uma noite (*“overnight”*). Após 3 lavagens com 300 µL/poço de tampão de lavagem para ELISA (Tween 20 diluído a 0,05% em PBS pH= 7,2), as placas foram bloqueadas com 300 µL/poço de tampão de bloqueio (PBS pH= 7,2 acrescido de 10% de soro fetal bovino) por 2 h à temperatura ambiente. Após 3 lavagens, as amostras foram incubadas por um período de 2 h em temperatura ambiente. Para a curva-padrão das citocinas, foram incubadas duplicatas de 50 µL/poço das diluições seriadas (fator 2 de diluição) das citocinas recombinantes, conforme recomendações do fabricante. O período de incubação das amostras e da curva-padrão foi de 2 h em temperatura ambiente. Após três lavagens foram adicionados 50 µL/poço do anticorpo de detecção, com incubação por 2 h em temperatura ambiente. Novamente, a placa foi lavada três vezes, 50 µL/poço de estreptoavidina foram adicionados e houve nova incubação de 20 min, no escuro, em temperatura ambiente. Por fim, 50 µL/poço de H₂SO₄ (2 N) foram adicionados para interromper a reação e a densidade óptica foi determinada em espectrofotômetro com filtro de 450 nm.

4.9 Avaliação da viabilidade celular

Para determinação da viabilidade celular das DCs por citometria de fluxo foi usado o kit comercial Live/Dead (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e os procedimentos foram realizados de acordo com as instruções do fabricante. Em suma, as DCs foram contadas em câmara de Neubauer, e alíquotas de $\sim 5 \times 10^4$ células foram colocadas em tubos cônicos de 5 mL e centrifugadas por 10 min a 300 G. Em seguida, as células foram ressuspensas em 1 mL de tampão PBS-BSA 0,1% acrescido de 50 nM de

calceína AM e 2 μ M de homodímero de etídio. Os tubos foram então incubados por 15 min em temperatura ambiente e ao abrigo de luz. Após este período, os tubos foram novamente centrifugados (300 G) e o *pellet* ressuspenso em 200 μ L do tampão PBS-BSA 0,1% para imediata aquisição no citômetro de fluxo. Para a análise foi utilizado o “software” CellQuest (BD) ou WinMDI (Purdue University, EUA - www.purdue.edu).

4.10 Análise das DCs por microscopia confocal de fluorescência

4.10.1 Internalização das partículas e localização intracelular do peptídeo/P2C

Para verificar se as partículas haviam sido internalizadas pelas DCs, assim como se os peptídeos a elas aderidos haviam sido liberados no interior dessas células, as DCs foram analisadas por microscopia confocal de fluorescência.

No dia cinco da cultura, as DCs receberam partículas coradas com isotiocianato de fluoresceína (FITC) ou cianina 5 (Cy5). As partículas marcadas com FITC continham ou o peptídeo GILG (sozinho) ou GILG e P2C a elas associadas. Em alguns experimentos, o próprio peptídeo GILG estava também marcado com um corante fluorescente, a rodamina. As partículas marcadas com o corante Cy5 continham o peptídeo NLVP (sozinho) ou NLVP e P2C. Nesse caso também, em alguns experimentos, o peptídeo NLVP, associado às partículas estava corado com rodamina. Havia também um grupo de DCs que recebeu partículas coradas com Cy5, contendo P2C marcado com rodamina. Vinte e quatro horas após as DCs terem sido incubadas com as partículas, elas foram coletadas e marcadas com anticorpo para a molécula β 2 microglobulina do MHC de classe I (conjugado com FITC) (BD Bioscience, Chicago, IL, EUA). Após terem sido marcadas com o referido anticorpo, as células foram fixadas por 20 min com tampão PBS-BSA 0,5% contendo 1% de paraformaldeído. Após fixação, as células foram postas em lâminas contendo um meio para preservação de fluorescência (Fluoromount-G – SouthernBiotech, Birmingham, AL, EUA). As lâminas foram então cobertas com lamínulas e analisadas em microscópio confocal Leica TCS SP2. O microscópio era equipado com um laser de argônio, para FITC e um laser Hélio-neônio

para rodamina e Cy5. O software usado para fazer a sobreposição das imagens foi o Leica Confocal Software Version 2.5 Build 1227.

4.10.2 Localização intracelular das partículas

A presença ou não das partículas em compartimentos acídicos foi também analisada por microscopia confocal. Para tanto, as DCs imaturas (dia 5 da cultura) foram carregadas com partículas coradas com fluorocromo. Partículas carregando o peptídeo GILG, GILG-P2C ou o P2C estavam coradas com FITC. Quando as DCs receberam partículas contendo somente GILG e simultaneamente partículas contendo P2C, as partículas que continham o GILG estavam coradas com FITC e aquelas que continham o P2C, estavam coradas com Cy5. Cinco horas após as DCs terem sido incubadas com as partículas, foi adicionado o corante LysoTracker Red DND-99 (Invitrogen-Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) na concentração de 50 nM para corar os compartimentos acídicos. Após a adição do corante, as células permaneceram incubadas por mais 1 h em banho maria a 37 °C. Passado o período de incubação, as células foram coletadas, centrifugadas (300 G) e em seguida incubadas com DAPI (Roche, Mannheim, Alemanha) por 5 min, no escuro e em temperatura ambiente, para corar os núcleos das células. A seguir, as células foram novamente centrifugadas (300 G) e depois incubadas por 25 min a 4 °C e no escuro com anti- β 2 microglobulina (conjugado com o fluorocromo FITC) (BD Bioscience, Chicago, IL, EUA) ou anti-HLA (conjugado com o fluorocromo APC) (Caltag-Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), para coloração da membrana plasmática. Após terem sido marcadas com o referido anticorpo, as células foram centrifugadas (300 G) e em seguida fixadas por 20 min com tampão PBS-BSA 0,5% contendo 1% de paraformaldeído. Após fixação, as células foram centrifugadas (300 G) e postas em lâminas contendo meio para preservação de fluorescência (Fluoromount-G – SouthernBiotech, Birmingham, AL, EUA). As lâminas foram então cobertas com lamínulas e analisadas em microscópio confocal Leica DM 2500. O microscópio era equipado com um laser de argônio, para FITC, um laser Hélio-neônio para rodamina, APC e Cy5 e um laser violeta para DAPI. O software usado para fazer a sobreposição das imagens foi o LAS-AF-Lite 2.6.0.

4.11 Detecção dos complexos MHC-I/peptídeo na membrana das DCs por citometria de fluxo

Para detecção dos complexos MHC-I/peptídeo na superfície das DCs carregadas com os diversos conjuntos de partículas, foi utilizada a Fab monoclonal específica para o complexo HLA-A*0201/GILG (clone M1D12, gentilmente cedido pelo Professor Dr. Yoram Reiter, Instituto de Tecnologia Technion-Israel, Haifa, Israel). Antes de analisarmos as DCs, testamos a eficácia e especificidade do anticorpo em células T2 (linhagem celular deficiente em TAP) pulsadas *overnight* com 10 µg/mL dos peptídeos solúveis GILG ou NLVP. As células foram coletadas e após contagem em câmara de Neubauer, as células (DCs ou T2; $\sim 5 \times 10^4$) foram colocadas em tubos cônicos de 5 mL e centrifugadas por 10 min a 300 G e a 4 °C. Foi então, adicionada a Fab específica, diluída a 2,5 µg/mL em tampão PBS-BSA 0,1%. Em seguida, as células foram incubadas por 1 h a 4 °C. Após o período de incubação, foi adicionado 500 µL de tampão PBS-BSA 0,1% e as células foram centrifugadas por 5 min a 300 G e a 4 °C. Foi então, adicionado o anticorpo secundário de cabra anti-F(ab')₂ humana, conjugado com FITC (Policlonal, AbCam, Cambridge, Reino Unido) e as células foram incubadas por 1 h a 4 °C e ao abrigo de luz. Após este período, foi acrescentado 1 mL de tampão PBS-BSA 0,1% e as células foram novamente centrifugadas (300 G). Em seguida, o sobrenadante foi descartado e as células resuspensas em 200 µL do tampão PBS-BSA 0,1% para posterior aquisição no citômetro de fluxo. Para a análise foi utilizado o “software” CellQuest (BD) ou WinMDI (Purdue University, EUA - www.purdue.edu).

4.12 Tratamento das DCs com inibidores

Para investigar a influência da fagocitose, acidificação endossômica e participação da via retículo endoplasmático-aparelho de Golgi na apresentação do peptídeo GILG, foram usados inibidores dessas vias. Citocalasina D a 5 µM (Sigma-Aldrich, Alemanha), cloroquina a 50 µM (Sigma-Aldrich, Alemanha) e brefeldina A a 10 µM (Sigma-Aldrich, Alemanha) foram usados para inibir fagocitose, acidificação endossômica e transporte retículo-Golgi, respectivamente. No dia cinco da cultura, as

DCs foram tratadas com os inibidores e depois de duas horas as partículas foram adicionadas, conforme descrito na seção 4.5 e no Quadro 2. No dia seis da cultura, as DCs foram avaliadas para a expressão do complexo HLA-A*0201/GILG, conforme descrito na seção 4.11.

4.13 Separação de linfócitos T CD8+ para ensaio proliferativo

Para isolar os linfócitos T CD8+ a partir de PBMCs, foi utilizado um kit comercial para separação magnética por seleção positiva (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e seguindo as instruções do fabricante. Em suma, as PBMCs foram incubadas a 4 °C por 15 min com anticorpo IgG de camundongo anti-CD8 humano. Em seguida, foi adicionado às células tampão PBS-BSA 0,5% EDTA 2 mM e submetidas a centrifugação (300 G). Após centrifugação, foi adicionado um anticorpo anti-IgG de camundongo acoplado a beads magnéticas e as células foram incubadas por mais 15 min a 4 °C. Passado o período de incubação, as células foram colocadas em uma coluna magnética (Dyna – Invitrogen) onde permaneceram por 1 minuto. A suspensão contendo células que não se ligaram às beads foi removida com uma pipeta e o tubo, agora contendo somente as células CD8+ com as beads, foi removido da coluna magnética. Adicionou-se tampão de liberação e as células foram incubadas por mais 15 min, em temperatura ambiente. Em seguida, o tubo contendo as células foi novamente colocado na coluna magnética onde permaneceu por mais 1 minuto. Isso foi feito para que as beads, agora liberadas das células CD8+ fossem atraídas para a parede do tubo e a suspensão celular, contendo somente células CD8+ (livres de beads) pudesse ser coletada. As células coletadas foram lavadas por centrifugação (300 G) em meio de cultura R-10, contadas em câmara de Neubauer e plaqueadas em placas de 96 poços para co-cultura com as DCs. Foram obtidas entre 94% e 98% de células CD8+ nos procedimentos de isolamento.

4.14 Avaliação da atividade estimuladora das DCs

Para avaliar a capacidade estimuladora das células geradas após adição dos diversos estímulos de maturação, 1×10^4 DCs (células estimuladoras) foram co-cultivadas com linfócitos T autólogos na concentração de 2×10^5 células/poço (células respondedoras) em um volume final de 300 μ L/poço.

Após terem sido isolados por separação imuno-magnética, os linfócitos T CD8+ foram plaqueados em placas de 96 poços, fundo em U, a 2×10^5 células por poço. Em seguida, foram adicionadas as DCs a 1×10^4 células por poço. As células foram mantidas por sete dias em estufa de CO₂, saturada de água e a 37 °C. Após esse período, as células foram coletadas, marcadas com anticorpos anti-CD8 (BD Bioscience, Chicago, IL, EUA), e tetrâmero de HLA-A*0201/NLVP ou HLA-A*0201/GILG (ambos da Beckman Coulter, Fullerton, CA, EUA). Dessa forma, os linfócitos T CD8+ específicos para esses peptídeos puderam ser identificados e quantificados por citometria de fluxo. Os dados obtidos foram analisados usando-se o “software” CellQuest (BD) ou WinMDi (Purdue University, EUA - www.purdue.edu).

4.15 Análise estatística

Para a análise estatística foi realizada a análise de variâncias (ANOVA). Quando a ANOVA apresentou diferença estatística, utilizou-se o pós-teste de Tukey, que compara todos os grupos entre si. Considerou-se significância estatística quando o teste de Tukey apresentou $p < 0,05$. Alternativamente, em alguns experimentos foi utilizado o teste t. De igual modo, considerou-se significância estatística quando o valor de p foi menor que 0,05. Os gráficos mostrados ao longo da seção de resultados exibem a média e o erro padrão da média. A análise estatística dos resultados foi auxiliada pelo software GraphPrism 5.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização das DCs geradas *in vitro*

Células dendríticas humanas foram geradas a partir de PBMCs aderentes (monócitos), em cultura com GM-CSF e IL-4. Os precursores apresentavam no dia zero da cultura, expressão das moléculas CD11c, CD14 e HLA-DR, assim como ausência do marcador CD83 e da molécula co-estimuladora CD80. Células de alguns doadores expressavam a molécula co-estimuladora CD86 (Figura 3). Ao final do período de cultura, as células que não haviam recebido as citocinas GM-CSF e IL-4 mantiveram o fenótipo que elas apresentavam no dia zero. Por outro lado, as que receberam as citocinas, perderam a expressão da molécula CD14, ao passo que mantiveram a expressão do CD11c. Houve também um aumento na expressão de HLA-DR, CD83, CD80 e CD86. A expressão desse conjunto de moléculas associado a não expressão de CD14 é compatível com o fenótipo descrito para DCs humanas (ROMANI et al., 1996; VERHASSELT et al., 1997; ZHOU; TEDDER, 1996). Para maturação das DCs foi usado o coquetel de citocinas inflamatórias, composto por IL-1- β , IL-6 e TNF- α . Como resultado desse tratamento, as células aumentaram a expressão de HLA-DR, CD83 e das moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86, em comparação com as células que não receberam o coquetel (Figura 4).

Figura 3 - Fenótipo de membrana de PBMCs aderentes (monócitos), células precursoras de DCs humanas, no dia zero da cultura.

Histograma vermelho= células não marcadas com anticorpo; histograma preto= células marcadas com anticorpo.

Figura 4 - Fenótipo de membrana de DCs imaturas e maduras.

Monócitos em cultura por sete dias sem adição de GM-CSF e IL-4 (histograma em vermelho); com a adição de GM-CSF e IL-4 nos dias zero e quatro da cultura (histograma em preto); e com a adição de GM-CSF e IL-4 nos dias zero e quatro da cultura acrescido do coquetel de maturação (IL-1- β , IL-6 e TNF- α) no dia cinco (histograma em verde). No dia sete da cultura, as células foram analisadas quanto ao seu fenótipo de membrana, para as moléculas de superfície CD11c, CD14, HLA-DR, CD80, CD83 e CD86, por citometria de fluxo.

5.2 Expressão de TLR2 pelas DCs

O ligante de TLR utilizado nesse estudo foi o lipopeptídeo di-acetilado, que atua nas células-alvo pela ligação ao TLR2 ou ao dímero TLR2/TLR6 (BUWITT-BECKMANN et al., 2006; FARHAT et al., 2008) comumente expresso na superfície de monócitos, macrófagos e DCs mielóides (BANCHEREAU et al., 2000; CHÁVEZ-SÁNCHEZ et al., 2010). Por isso então checamos a expressão dessa molécula nas células de nossas culturas. O resultado dessa análise é mostrado na figura 5.

Figura 5 - Expressão de TLR2 em precursores de DCs (monócitos), DCs imaturas e DCs maduras.

Expressão de TLR2 em PBMCs aderentes do dia zero (monócitos, no gráfico da esquerda); e em DCs imaturas no dia 5 da cultura (gráfico do meio); o gráfico da direita mostra a expressão de TLR2 em células do dia 7 da cultura: em monócitos (histograma preto), DCs imaturas (histograma azul) e DCs maduras cujo estímulo de maturação foi o P2C (histograma vermelho) ou IL-1- β , IL-6 e TNF- α (histograma verde). Os histogramas preenchidos em cinza representam células não marcadas com anticorpo.

Conforme mostrado na figura, as células precursoras das DCs já estavam expressando TLR2. À medida que as células precursoras foram se diferenciando em DCs, o nível de expressão foi reduzido. É interessante notar que depois de maduras, o nível de expressão não foi alterado em relação às DCs imaturas.

5.3 Viabilidade celular

Uma vez que as condições para obtenção de DCs *in vitro* foram estabelecidas, nosso próximo passo foi o tratamento dessas células com as partículas carregando diferentes peptídeos e/ou P2C. O primeiro parâmetro a ser investigado foi a citotoxicidade das partículas nas DCs. A viabilidade das DCs foi analisada usando a calceína AM e o homodímero de etídio em conjunto. A calceína AM é um éster lipofílico não fluorescente que se difunde passivamente nas células e é transformado em calceína fluorescente, por esterases intracelulares. Uma vez hidrolizada, a calceína livre

insolúvel nos lipídeos e com alta carga negativa, fica retida dentro de células com membranas íntegras e torna-se fluorescente verde a um comprimento de onda de ~ 530 nm. Um segundo corante é então adicionado para corar as células mortas. O homodímero de etídio é um fluorocromo impermeável que passa através de membranas rompidas e estabelece uma ligação forte com os ácidos nucleicos de cadeia dupla, emitindo uma fluorescência vermelha a um comprimento de onda de ~ 617 nm. As células viáveis verdes (positivas para calceína AM) e células não viáveis vermelhas (positivas para homodímero de etídio) podem ser detectadas por citometria de fluxo. Na análise citofluorimétrica realizada, não foi observada diferença na taxa de morte celular entre as condições de cultura estudadas, como pode ser constatado na figura 6.

Figura 6 - Viabilidade celular analisada pela atividade esterásica e incorporação de homodímero de etídio.

DCs no dia cinco da cultura foram submetidas a diferentes tratamentos, conforme descrito em material e métodos. No dia sete da cultura essas células foram coletadas, incubadas com calceína AM e homodímero de etídio e em seguida analisadas por citometria de fluxo. A figura é representativa de três experimentos realizados.

5.4 Fenótipo de membrana das DCs carregadas com partículas contendo peptídeos e/ou P2C

Uma vez que o nosso protocolo para geração de DCs humanas se mostrou eficiente na geração dessas células, o próximo passo foi estudar os efeitos do tratamento dessas DCs no dia cinco da cultura, portanto imaturas, com partículas carregando peptídeos e/ou P2C. Assim, foram adicionados às células, peptídeos e/ou P2C, adsorvidos em partículas de sílica. No dia sete, essas células foram coletadas e submetidas à citometria de fluxo para análise das moléculas de superfície. Além dos marcadores já mencionados, foi analisado também o tamanho (Forward scatter) e a granulosidade (Side scatter) das células, como pode ser observado na figura 7.

Figura 7 - Density Plots mostrando as populações celulares, de acordo com seu tamanho (Forward scatter) e granulosidade (Side scatter).

Células mononucleares separadas por gradiente de Ficoll-Paque foram enriquecidas por aderência em Placa de Petri e cultivadas em meio R-10 na presença de GM-CSF e IL-4 e submetidas às diferentes condições de cultura, especificadas em Material e Métodos. Após a cultura, as células foram analisadas em citômetro de fluxo.

É interessante notar que houve uma alteração clara na granulosidade das células, nos grupos tratados com partículas contendo peptídeo e/ou P2C. O aumento na granulosidade das células indica a associação dessas partículas às células, o que sugere (embora não confirme) que foram capturadas pelas DCs. Isso será mostrado em detalhes mais adiante.

Em seguida, nas células de maior tamanho e granulosidades e negativas para Lin (vide figura 2 em Material e Métodos) foi analisada a porcentagem de células HLA-DR+CD11c+ (Figura 8).

Figura 8 - Porcentagem de células duplo-positivas para HLA-DR e CD11c, dentro do “gate” Lin-.

Células mononucleares separadas por gradiente de Ficoll-Paque foram enriquecidas por aderência em Placa de Petri e cultivadas em meio R-10 na presença de GM-CSF e IL-4 e submetidas às diferentes condições de cultura, especificadas em Material e Métodos. Após a cultura, as células foram marcadas com anticorpos para as moléculas de membrana HLA-DR, CD11c e Lin (coquetel de anticorpos marcados com FITC, contendo anti-CD3, CD14, CD19 e CD56) e analisadas em citômetro de fluxo. Para análise estatística foi empregado teste ANOVA seguido de teste de comparações múltiplas de Tukey. O valor de p refere-se a comparação grupo sem tratamento x grupo tratado; * $p < 0,05$. O traço indica a média e a barra indica o erro padrão da média.

Conforme exibido na figura acima, observamos uma média de aproximadamente 80% de células duplo positivas que não sofreu variação significativa entre os grupos.

Posteriormente, na população Lin-HLA-DR+CD11c+, consideradas como DCs, mostramos a porcentagem e o nível de expressão das moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86, e do marcador de ativação CD83 (figura 9). Os valores correspondentes aos níveis de expressão das moléculas foram designados como MFI relativa. A MFI

relativa foi obtida a partir dos valores de intensidade média de fluorescência (MFI, do inglês, *mean fluorescence intensity*) das células para o marcador analisado, normalizada pela intensidade do mesmo, nas DCs sem tratamento (DCs imaturas). Assim, o valor atribuído para o grupo de DCs sem tratamento é sempre **um**.

Figura 9 - Expressão das moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86 e do marcador de DCs maduras, CD83 (no meio) em DCs (Lin-HLA-DR+CD11c+).

Células mononucleares separadas por gradiente de Ficoll-Paque foram enriquecidas por aderência em Placa de Petri e cultivadas em meio R-10 na presença de GM-CSF e IL-4 e submetidas às diferentes condições de cultura, especificadas em Material e Métodos. Após a cultura, as células foram marcadas com anticorpos para as moléculas de membrana HLA-DR, CD11c e Lin (coquetel de anticorpos marcados com FITC, contendo anti-CD3, CD14, CD19 e CD56), e CD80, CD83 e CD86 e analisadas em citômetro de fluxo. Os gráficos da esquerda mostram porcentagem de células positivas e os da direita, o nível de expressão das moléculas. Para análise estatística foi empregado teste ANOVA seguido de teste de comparações múltiplas de Tukey. O valor de p refere-se a comparação grupo sem tratamento x grupo tratado; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. O traço indica a média e a barra indica o erro padrão da média.

Para a molécula co-estimuladora CD80, a média da porcentagem de células positivas foi de 80% para as DCs sem tratamento. Nos grupos que receberam as partículas ou o coquetel de citocinas, a porcentagem de células positivas não foi significativamente alterada. Por outro lado, o nível de expressão dessa molécula nas células foi mais alto nos grupos que receberam partículas contendo P2C ou o coquetel de citocinas. Efeito semelhante foi observado para a molécula CD86, sendo expressa em 78% das DCs sem tratamento e com um discreto aumento nos grupos que receberam P2C ou o coquetel de citocinas. No entanto, as células que receberam partículas contendo P2C ou coquetel de citocinas tiveram aumento significativo no nível de expressão da molécula, comparado com o grupo não tratado ou com os grupos que receberam partículas contendo somente um dos peptídeos.

É interessante notar que a maioria das DCs imaturas já expressava as moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86, porém em baixos níveis. A expressão dessas moléculas permaneceu constante nos grupos tratados com qualquer dos peptídeos, mas sofreu um aumento dramático ao se adicionar as partículas contendo P2C ou o coquetel de citocinas inflamatórias.

Ao contrário do observado para as moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86, que foram expressas na maioria das DCs imaturas, o CD83 foi expresso em baixa porcentagem de células, quando imaturas. Ao se adicionar partículas contendo P2C ou citocinas inflamatórias solúveis, houve um aumento significativo, tanto na porcentagem de células positivas quanto no nível de expressão da molécula, conforme pode ser visto na figura 9.

5.5 Produção de IL-12p70 pelas DCs carregadas com partículas

Outro parâmetro importante para a ativação das DCs, além das moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86 e da molécula CD83, é a citocina IL-12. DCs maduras, principalmente aquelas maturadas com ligantes de TLRs são descritas como produtoras de IL-12. A IL-12 está também relacionada à ativação de linfócitos T CD8+ e como auxiliares na aquisição de atividade citotóxica por essas células. Decidimos, portanto,

analisar se o tratamento das DCs com as partículas exerceria alguma influência nesse parâmetro (figura 10).

Figura 10 - Detecção de IL-12p70 no sobrenadante de DCs no dia sete da cultura.

Células mononucleares separadas por gradiente de Ficoll-Paque foram enriquecidas por aderência em Placa de Petri e cultivadas em meio R-10 na presença de GM-CSF e IL-4 e submetidas às diferentes condições de cultura, especificadas em Material e Métodos. Após a cultura (no dia sete), o sobrenadante dessas células foi coletado e a presença da IL-12p70 quantificada por ELISA. O p obtido no teste t pareado (Sem tratamento x grupo tratado); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. A barra indica o erro padrão da média. $n = 13$.

Conforme apresentado na figura 10, a adição de partículas contendo P2C causou um aumento na secreção de IL-12 pelas DCs.

5.6 Internalização das partículas e localização intracelular dos peptídeos/P2C a elas associados

Para nos certificarmos de que as DCs haviam capturado as partículas contendo peptídeo e/ou P2C, foi utilizada a análise por microscopia confocal. Essa técnica microscópica apresenta a vantagem de se poder visualizar a célula em vários níveis de profundidade, permitindo assim, afirmar com exatidão quando as partículas estavam contidas no interior da célula. Além da internalização das partículas pelas DCs, queríamos saber se os peptídeos e/ou P2C a elas associados eram liberados e, no caso particular dos peptídeos, se iriam para a superfície das células. Para que esses objetivos pudessem ser alcançados, foram usados, associados às partículas “fluorescentes”, peptídeos/P2C também marcados com um corante fluorescente, a rodamina.

Para que essa identificação pudesse ser feita, as DCs (imaturas) receberam no dia cinco da cultura, partículas coradas com fluorocromo, associadas a um peptídeo ou P2C também marcado com fluorocromo. Vinte e quatro horas depois de receber as partículas, as células foram coletadas e preparadas, conforme descrito em Material e métodos. A presença (ou não) das partículas dentro das células, assim como a distribuição dos peptídeos/P2C a elas associados foi checada em microscópio confocal de fluorescência. As figuras 11-14 mostram as partículas internalizadas pelas DCs, assim como a distribuição do peptídeo/P2C a elas associados.

Figura 11 - Internalização das partículas contendo peptídeos e/ou P2C e localização intra-celular do peptídeo a elas associados.

Em (A) partículas marcadas com FITC (em verde) contendo GILG. É possível visualizar também a membrana das células, que foi marcada com anticorpo anti-MHC de classe I (FITC), em verde; em (B) o peptídeo GILG, marcado com rodamina (em vermelho), onde é possível observar sua distribuição dentro da célula; em (C) uma fotomicrografia em microscopia de transmissão das mesmas células mostradas em (A). Em (D) é possível visualizar as imagens em (A e B) sobrepostas. Experimento representativo de três. Aumento original de 1000x e zoom eletrônico adicional.

Figura 12 - Internalização das partículas contendo peptídeos e/ou P2C e localização intra-celular do peptídeo a elas associados.

Em (A) partículas marcadas com FITC (em verde) contendo GILG e P2C. É possível visualizar também a membrana da célula, que foi marcada com anticorpo anti-MHC de classe I (FITC), em verde; em (B) o peptídeo GILG, marcado com rodamina (em vermelho), onde é possível observar sua distribuição dentro da célula; em (C) partículas marcadas com Cy5 (em azul) contendo o peptídeo NLVP; em (D) uma fotomicrografia em microscopia de transmissão da mesma célula mostrada em (A). Em (E) é possível visualizar as imagens em (A, B e C) sobrepostas. Experimento representativo de três. Aumento original de 1000x e zoom eletrônico adicional.

Figura 13 - Internalização das partículas contendo peptídeos e/ou P2C e localização intra-celular do peptídeo a elas associados.

Em (A) partículas marcadas com FITC (em verde) contendo GILG. É possível visualizar também a membrana das células, que foi marcada com anticorpo anti-MHC de classe I (FITC), em verde; em (B) o peptídeo GILG, marcado com rodamina (em vermelho), onde é possível observar sua distribuição dentro da célula; em (C) partículas marcadas com Cy5 (em azul) contendo o P2C; em (D) uma fotomicrografia em microscopia de transmissão das mesmas células mostradas em (A). Em (E) é possível visualizar as imagens em (A, B e C) sobrepostas. Experimento representativo de três. Aumento original de 1000x e zoom eletrônico adicional.

Figura 14 - Internalização das partículas contendo P2C e localização intra-celular do mesmo associado às partículas.

Em (A) é possível visualizar a membrana das células, que foi marcada com anticorpo anti-MHC de classe I (FITC), em verde; em (B) o P2C, marcado com rodamina (em vermelho), onde é possível observar sua distribuição dentro da célula; em (C) partículas marcadas com Cy5 (em azul) contendo o P2C; em (D) uma fotomicrografia em microscopia de transmissão das mesmas células mostradas em (A). Em (E) é possível visualizar as imagens em (A, B e C) sobrepostas. Experimento representativo de três. Aumento original de 1000x e zoom eletrônico adicional.

Como pode ser observado nas figuras 11-14, houve a internalização das partículas pelas DCs. Vale mencionar que a captura das partículas pelas DCs foi realizada independente do peptídeo/P2C a elas associados. Ainda, quando havia dois conjuntos distintos de partículas na cultura (Figuras 12 e 13), ambos eram capturados pelas DCs. Em suma, do ponto de vista da internalização das partículas, não pareceu ter havido nenhuma seleção pelas DCs de partículas contendo um ou outro peptídeo ou P2C.

É também possível observar que os peptídeos foram encontrados não somente nas partículas, como também em estruturas celulares próximas às mesmas, assim como em estruturas vesiculares na periferia da célula. É possível ainda, visualizar

pontos na membrana plasmática co-localizados com moléculas do MHC de classe I, o que sugere a apresentação desses peptídeos. A apresentação do peptídeo em associação ao MHC-I na superfície das DCs será mostrada em detalhes no próximo tópico.

5.7 Detecção do complexo MHC-I/peptídeo na superfície das DCs

A fim de confirmarmos a apresentação pelas DCs dos peptídeos associados às partículas, usamos o anticorpo M1D12, desenvolvido para reconhecer especificamente o complexo HLA-A*0201/GILG (BIDDISON et al., 2003; KLECHEVSKY et al., 2008). Para nos certificarmos da especificidade do anticorpo, pulsamos células T2 (linhagem de linfócitos deficientes em TAP) com dois diferentes peptídeos, o GILG e o NLVP. Em seguida as células foram marcadas com o anticorpo M1D12 e analisadas por citometria de fluxo. O resultado dessa análise pode ser visto na figura 15.

Figura 15 - Detecção de complexos HLA-A*0201/GILG em células T2.

Células T2 não pulsadas com peptídeo (histograma preenchido na cor vermelha), pulsadas com o peptídeo NLVP (histograma azul vazio) ou pulsadas com o peptídeo GILG (histograma preto vazio).

Como pode ser observado na figura acima, o anticorpo M1D12 foi mostrado ser capaz de reconhecer o complexo HLA-A*0201/GILG, uma vez que as células pulsadas com o peptídeo GILG foram positivas para a marcação com o anticorpo. A especificidade do anticorpo também foi comprovada, uma vez que as células pulsadas com o outro peptídeo, o NLVP, foram negativas quando marcadas com o mesmo anticorpo.

O próximo passo foi então checar a presença do complexo HLA-A*0201/GILG nas DCs carregadas com esse peptídeo associado às partículas (figura 16).

Figura 16 - Detecção de complexos HLA-A*0201/GILG em DCs.

DCs no dia cinco da cultura foram submetidas a diferentes tratamentos, conforme descrito em material e métodos. No dia seis da cultura essas células foram coletadas, marcadas com o anticorpo M1D12, para detecção dos complexos HLA-A*0201/GILG. Os histogramas vermelhos exibem a fluorescência das DCs que não receberam peptídeos e os histogramas em preto mostram a fluorescência das DCs pulsadas com o peptídeo (s) indicado (s). Experimento representativo de sete.

De modo semelhante ao anteriormente observado nas células T2, a especificidade do anticorpo M1D12 pôde ser observada também nas DCs. As DCs pulsadas com o peptídeo NLVP tanto solúvel como associado às partículas, exibiram fluorescência semelhante a das DCs que não foram pulsadas com nenhum peptídeo. Por outro lado, houve um aumento na fluorescência das células quando as mesmas foram pulsadas com o peptídeo GILG, tanto na forma solúvel, como quando o mesmo estava associado às partículas. De maneira surpreendente, não houve maior expressão dos complexos nas DCs que receberam o peptídeo e o P2C. A figura 17 mostra a análise da expressão desses complexos nas DCs dos sete doadores analisados.

Figura 17 - Detecção de complexos HLA-A*0201/GILG em DCs.

DCs no dia cinco da cultura foram submetidas a diferentes tratamentos, conforme descrito em material e métodos. No dia seis da cultura essas células foram coletadas, marcadas com o anticorpo M1D12, para detecção dos complexos HLA-A*0201/GILG. * $p < 0,05$; obtido em teste t pareado, onde foi comparado o grupo sem peptídeo com os que receberam o peptídeo referido no gráfico. A barra indica o erro padrão da média. $n = 7$.

5.8 Avaliação do papel da fagocitose na apresentação cruzada do peptídeo associado às partículas

Peptídeos solúveis podem ligar-se diretamente às moléculas de MHC na superfície das células sem a necessidade de serem internalizados e processados.

Uma vez que as DCs foram carregadas com peptídeos, esses peptídeos poderiam ter sido liberados das partículas para o meio de cultura e dessa forma teriam sido apresentados diretamente, o que explicaria o mesmo nível de expressão dos complexos nas DCs – ora quando o peptídeo era administrado na forma solúvel, ora na

forma particulada; e ainda mais surpreendente, não havendo diferença entre as DCs que receberam somente o peptídeo daquelas que receberam o peptídeo junto com o estímulo de maturação. Para responder a essa questão, as DCs foram tratadas com citocalasina D, um inibidor da fagocitose. Em seguida, as DCs foram carregadas com o peptídeo GILG solúvel ou associado às partículas. Vinte e quatro horas depois do carregamento com as partículas ou peptídeo solúvel, as células foram coletadas e marcadas com o anticorpo anti-HLA-A*0201/GILG e analisadas por citometria de fluxo. A figura 18 mostra o resultado da análise dos sete doadores estudados.

Figura 18 - Detecção de complexos HLA-A*0201/GILG em DCs tratadas com citocalasina D.

DCs no dia cinco da cultura foram submetidas a diferentes tratamentos, conforme descrito em material e métodos. No dia seis da cultura essas células foram coletadas, marcadas com o anticorpo M1D12, para detecção dos complexos HLA-A*0201/GILG. * $p < 0,05$; obtido em teste t pareado. A barra indica o erro padrão da média. $n = 7$.

O que se nota a partir dos experimentos é que a fagocitose das partículas contendo o peptídeo é crucial para que o mesmo seja apresentado em sua superfície. O peptídeo solúvel é apresentado, independente de fagocitose, o que já era esperado.

5.9 Avaliação da importância da acidificação em compartimentos endossômicos na apresentação cruzada do peptídeo associado às partículas

Quando as DCs e macrófagos fagocitam microorganismos, as partículas fagocitadas seguem uma rota intra-celular de processamento onde são degradadas. Os fragmentos peptídicos resultantes dessa degradação/digestão são associados às moléculas do MHC-I e MHC-II para apresentação aos linfócitos T. A degradação do material fagocitado se dá à medida que o fagossomo se torna ácido, o que facilita a atuação das proteases endossômicas. Embora a acidificação do fagossomo seja importante para a geração de epítomos para a apresentação no contexto do MHC classe II, seu papel não está claro na apresentação antigênica via classe I (BURGDORF et al., 2008; DI PUCCHIO et al., 2008; KASTURI; PULENDRAN, 2008). Para investigar a importância da acidificação endossômica para a apresentação de Ags em nosso modelo, tratamos as DCs com cloroquina, um composto lisossomotrópico que se acumula em vesículas acídicas, elevando o pH. Após o tratamento com a cloroquina, as DCs foram carregadas com o peptídeo GILG solúvel (usado como controle) ou associado às partículas. Vinte e quatro horas depois do carregamento com as partículas ou peptídeo solúvel, as células foram coletadas e marcadas com o anticorpo anti-HLA-A*0201/GILG e analisadas por citometria de fluxo. A figura 19 mostra o resultado da análise dos sete doadores estudados

Figura 19 - Detecção de complexos HLA-A*0201/GILG em DCs tratadas com cloroquina.

DCs no dia cinco da cultura foram submetidas a diferentes tratamentos, conforme descrito em material e métodos. No dia seis da cultura essas células foram coletadas, marcadas com o anticorpo M1D12, para detecção dos complexos HLA-A*0201/GILG. * $p < 0,05$; obtido em teste t pareado, onde foi comparado o grupo sem peptídeo ao tratado. A barra indica o erro padrão da média. $n = 7$.

Pelos experimentos realizados fica claro que a acidificação não foi importante para os processos intracelulares que culminaram na apresentação do peptídeo na superfície das DCs. Pelo contrário, a inibição da acidificação intracelular contribuiu para um discreto aumento no nível de expressão dos complexos HLA-A*0201/GILG.

Diante desses resultados, consideramos a possibilidade de as partículas não terem passado por um compartimento ácido durante seu processamento pelas DCs. Para checar a veracidade dessa hipótese, decidimos investigar se as partículas contendo peptídeo e/ou P2C eram contidas em compartimentos ácidos após terem sido internalizadas pelas DCs. Para tal, as DCs foram carregadas com partículas marcadas com fluorocromo e após cinco horas, coletadas e incubadas com

LysoTracker Red (Vide seção 4.10.2 em material e métodos para a descrição detalhada do procedimento). LysoTracker é um composto fluorescente que se acumula em compartimentos intra-celulares acídicos e devido a essa propriedade, é um corante frequentemente utilizado na identificação de lisossomos e fagossomos maduros. Assim, após marcação das DCs, a presença (ou não) das partículas em compartimentos acídicos dentro das células foi checada por microscopia confocal de fluorescência (figuras 20-23).

Figura 20 - Localização intracelular das partículas contendo o peptídeo GILG.

Em (A) é mostrado o núcleo das células (em azul), corados com DAPI. Em (B) é possível visualizar os compartimentos acídicos das células (em vermelho), que foram corados com LysoTracker Red DND-99. As partículas coradas com FITC (em verde) e contendo o peptídeo GILG são mostradas em (C). É possível visualizar em (D) a membrana das células (cinza), que foi marcada com o anticorpo anti-HLA (conjugado ao fluorocromo APC). Em (E) é possível visualizar as imagens em (A-D) sobrepostas. Partículas contidas em compartimentos acídicos deveriam aparecer em (E) na cor amarela. Experimento representativo de dois. Aumento original de 630x e zoom eletrônico adicional.

Figura 21 - Localização intracelular das partículas contendo o lipopeptídeo P2C.

Em (A) é mostrado o núcleo das células (em azul), corados com DAPI. Em (B) é possível visualizar os compartimentos ácidos das células (em vermelho), que foram corados com LysoTracker Red DND-99. As partículas coradas com FITC (em verde) e contendo o lipopeptídeo P2C são mostradas em (C). É possível visualizar em (D) a membrana das células (cinza), que foi marcada com o anticorpo anti-HLA (conjugado ao fluorocromo APC). Em (E) é possível visualizar as imagens em (A-D) sobrepostas. Partículas contidas em compartimentos ácidos deveriam aparecer em (E) na cor amarela. Experimento representativo de dois. Aumento original de 630x e zoom eletrônico adicional.

Figura 22 - Localização intracelular das partículas contendo o peptídeo GILG e o lipopeptídeo P2C (GILG-P2C).

Em (A) é mostrado o núcleo das células (em azul), corados com DAPI. Em (B) é possível visualizar os compartimentos ácidos das células (em vermelho), que foram corados com LysoTracker Red DND-99. As partículas coradas com FITC (em verde) e contendo (GILG-P2C) são mostradas em (C). É possível visualizar em (D) a membrana das células (cinza), que foi marcada com o anticorpo anti-HLA (conjugado ao fluorocromo APC). Em (E) é possível visualizar as imagens em (A-D) sobrepostas. Partículas contidas em compartimentos ácidos deveriam aparecer em (E) na cor amarela. Experimento representativo de dois. Aumento original de 630x e zoom eletrônico adicional.

Figura 23 - Localização intracelular das partículas contendo o peptídeo GILG e partículas contendo P2C.

Em (A) é mostrado o núcleo das células (em azul), corados com DAPI. Em (B) é possível visualizar os compartimentos ácidos das células (em vermelho), que foram corados com LysoTracker Red DND-99. As partículas coradas com FITC (em verde) e contendo o peptídeo GILG são mostradas em (C). A membrana, marcada com o anticorpo anti- $\beta 2$ microglobulina (conjugado ao fluorocromo FITC) pode também ser visualizada em (C). Em (D) são mostradas partículas contendo P2C (em branco). Em (E) é possível visualizar as imagens em (A-D) sobrepostas. Partículas adsorvidas com GILG contidas em compartimentos ácidos deveriam aparecer em (E) na cor amarela; e partículas contendo P2C deveriam aparecer em (E) na cor lilás. Experimento representativo de dois. Aumento original de 630x e zoom eletrônico adicional.

Conforme apresentado nas figuras, a maioria das partículas não foi encontrada em compartimentos ácidos nas DCs. Esse dado ajuda a explicar o porquê de a inibição da acidificação endossômica não ter prejudicado a apresentação do peptídeo associado às partículas. É interessante notar que a presença do P2C não pareceu ter contribuído para a acidificação endossômica, já que essas partículas foram encontradas predominantemente fora dos compartimentos ácidos (figuras 21-23).

5.10 Envolvimento do transporte retículo endoplasmático-aparelho de Golgi na apresentação cruzada do peptídeo associado às partículas

De acordo com a literatura, há duas vias de processamento de antígenos exógenos para a apresentação cruzada. Uma dessas vias é a chamada “rota canônica” ou “fagossomo-citosol” e dependeria do retículo endoplasmático e do complexo de Golgi. A outra via pela qual os antígenos podem ser processados para apresentação em classe I é a chamada “via endossômica”, onde o processamento do material endocitado ocorreria dentro do próprio endossomo (BURGDORF et al., 2008; DI PUCCHIO et al., 2008; KASTURI; PULENDRAN, 2008). Para saber qual dessas duas vias estava sendo utilizada em nosso modelo, tratamos as DCs com brefeldina A (BFA), um inibidor do transporte entre o retículo e o complexo de Golgi. Em seguida, as DCs foram carregadas com o peptídeo GILG solúvel ou associado às partículas. Vinte e quatro horas depois do carregamento com as partículas ou peptídeo solúvel, as células foram coletadas e marcadas com o anticorpo anti-HLA-A*0201/GILG e analisadas por citometria de fluxo. A figura 24 mostra o resultado da análise dos sete doadores estudados.

Figura 24 - Expressão de complexos HLA-A*0201/GILG em DCs tratadas com brefeldina A.

DCs no dia cinco da cultura foram submetidas a diferentes tratamentos, conforme descrito em material e métodos. No dia seis da cultura essas células foram coletadas, marcadas com o anticorpo M1D12, para detecção dos complexos HLA-A*0201/GILG. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ obtido em teste t pareado. A barra indica o erro padrão da média. $n = 7$.

Como pode ser observado, o tratamento das DCs com BFA inibiu significativamente a apresentação do peptídeo, quando este era administrado às células associado às partículas. O uso dessa via não dependeu de ligante de TLR no material fagocitado, uma vez que a apresentação foi igualmente inibida, tanto quando o peptídeo era administrado sozinho como quando o mesmo era dado às DCs em conjunto com o P2C.

5.11 Avaliação da resposta de linfócitos T CD8+ específicos

Para a determinação da resposta de linfócitos T CD8+ específicos para os peptídeos com os quais as DCs foram pulsadas, os diferentes grupos de DCs foram co-cultivados com linfócitos T CD8+ autólogos por sete dias. Passado esse período, as células foram marcadas com tetrâmeros de HLA-A*0201/peptídeo e anticorpos anti-CD8. Essas células foram analisadas por citometria de fluxo.

5.11.1 Resposta ao epítipo de influenza A

Antes de iniciarmos a descrição dos resultados é importante mencionar que as amostras dos doadores foram coletadas em dois períodos distintos, com um período de pausa entre eles. A primeira coleta foi feita entre os meses de agosto e novembro de 2009 e a segunda, entre abril e julho de 2010.

Para as análises da resposta ao epítipo de influenza, essa informação é de relevância, pois há uma diferença notável entre a resposta dos doadores nos dois períodos distintos. Devido a essa diferença na resposta, dividimos os doadores em dois grupos distintos. Os dados dos doadores cujas amostras foram coletadas entre agosto e novembro de 2009 foram agrupados na tabela 1 – e os que tiveram suas amostras coletadas no período de abril a julho de 2010, na tabela 2.

A frequência de linfócitos T CD8+ específicos para o peptídeo de influenza variou entre 0,06% e 1,1% do pool de linfócitos T CD8+ (Tabela 1 e 2). Essa frequência não foi alterada ao se co-cultivar esses linfócitos com DCs imaturas (sem tratamento), bem como com DCs maturadas com P2C ou coquetel de citocinas (Tabela 1 e 2), sem a presença do peptídeo. Nos doadores do primeiro grupo (Tabela 1), as DCs pulsadas com partículas contendo somente o peptídeo e, portanto, ainda imaturas, não foram capazes de induzir uma boa resposta dos linfócitos específicos, exceção feita ao doador 2 (Tabela 1). As DCs pulsadas com partículas contendo o peptídeo e também o P2C foram mais eficientes na estimulação dos linfócitos T específicos. Em dois doadores, as DCs pulsadas com o peptídeo e P2C na mesma partícula foram mais eficientes nessa estimulação. Em outros oito doadores, a resposta ao mesmo peptídeo foi melhor

quando as DCs foram pulsadas com o peptídeo e P2C em partículas distintas. É curioso, entretanto, que desses oito doadores que responderam melhor às DCs pulsadas com o peptídeo e P2C em diferentes partículas, o doador 3 respondeu melhor quando a partícula que carregava o P2C carregava também um outro peptídeo, o NLVP. Embora o doador 2 tenha respondido melhor às DCs que receberam peptídeo e P2C na mesma partícula, aquelas que os receberam em partículas distintas também estimulam uma boa resposta dos linfócitos. E é interessante que, como observado para o doador 3, para o doador 2 também houve melhor resposta quando a partícula que carregava o P2C também carregava um outro peptídeo.

Tabela 1 - Porcentagem de linfócitos T CD8+ específicos para o peptídeo de influenza (GILG) – Os números mostrados são referentes a porcentagem de células CD8+ Tetrâmero HLA-A*0201/GILG+.

Grupos Doador	Somente linfócitos T CD8+	Linfócitos T CD8+ em co-cultura com DCs							
		Sem tratamento	(GILG)	(NLVP)	(P2C)	(GILG-P2C) + (NLVP)	(NLVP-P2C) + (GILG)	(GILG) + (P2C)	(NLVP) + (P2C)
1	0,31	0,24	0,61	0,24	0,19	1,06	0,59	*	*
2	0,12	0,09	5	0,04	0,15	19,9	7,6	2,1	0,03
3	0,13	0,13	0,15	0,1	0,08	1,21	2,32	1,2	0,1
4	0,1	0,1	0,3	0,1	0,1	0,3	0,3	0,6	0,1
6	0,1	0,07	0,17	0,09	0,06	0,27	1,42	2	0,07
7	0,06	0,07	0,09	0,09	0,06	0,09	0,09	0,37	0,09
8	0,1	0,1	0,1	0	0	0,7	1,2	3,2	0,1
9	0,7	0,2	0,3	0,2	0,2	0,7	0,3	0,5	0,3
10	0,7	0,7	1	0,6	0,6	4,2	5,8	10,4	0,6
11	1,1	1,3	0,4	0,9	0,5	0,3	0,5	0,7	0,4
<i>Média</i>	<i>0,36</i>	<i>0,30</i>	<i>0,81</i>	<i>0,23</i>	<i>0,19</i>	<i>2,87</i>	<i>2,01</i>	<i>2,34</i>	<i>0,20</i>

* material não disponível

Figura 25 - Porcentagem de linfócitos T CD8+ específicos para o peptídeo GILG.

Linfócitos T CD8+ foram cultivados por sete dias com: DCs sem tratamento ou DCs que receberam partículas contendo: (P2C); (GILG); (NLVP-P2C) + (GILG); (GILG) + (P2C); ou (GILG-P2C) + (NLVP). Após sete dias em co-cultura, as células foram marcadas com anticorpo anti-CD8 e tetrâmeros de HLA-A*0201/GILG e analisadas por citometria de fluxo.

Nos seis doadores do segundo grupo (Tabela 2), observamos uma intensa resposta ao peptídeo GILG quando este era administrado às DCs sem qualquer estímulo de maturação (tabela 2). Em três dos seis doadores (doador 12, 14 e 16), houve maior porcentagem de linfócitos T CD8+ específicos ao epítipo quando a DC era pulsada com o P2C e o peptídeo cognato. Nos outros três doadores, ou não houve aumento, ou houve diminuição na porcentagem de linfócitos específicos para o peptídeo, quando este era dado a DC em conjunto com o estímulo de maturação.

Tabela 2 - Porcentagem de linfócitos T CD8+ específicos para o peptídeo de influenza (GILG) – Os números mostrados são referentes a porcentagem de células CD8+ Tetrâmero HLA-A*0201/GILG+.

Grupos Doador	Somente linfócitos T CD8+	Sem tratamento	Linfócitos T CD8+ em co-cultura com DCs								
			(GILG)	(NLVP)	(P2C)	(GILG-P2C) +	(NLVP- P2C) +	(GILG) +	(NLVP) +	(GILG- P2C)	(NLVP- P2C)
						(NLVP)	(GILG)	(P2C)	(P2C)		
12	1,1	0,8	36,2	0,9	0,9	41,1	51,4	40,2	1	39,8	*
14	0,3	0,4	5	0,4	1,6	9,4	23,2	13,5	0,6	8,2	0,9
15	0,6	0,6	22	0,5	1,1	16,5	25,9	25,8	1,2	8,1	0,6
16	0,3	0,3	8,1	0,3	0,4	13,9	*	14,6	0,4	12,6	*
17	0,6	0,3	31,7	0,4	0,4	15,5	29,6	11	0,4	21,9	0,3
18	0,1	0,1	14,3	0,2	0,1	10,6	14,9	17,4	0,2	10,7	0,1
Média	0,5	0,41	19,55	0,45	0,75	17,83	29	20,41	0,63	16,88	0,48

* material não disponível

5.11.2 Resposta ao epítipo de CMV

As DCs pulsadas somente com NLVP não foram capazes de estimular proliferação de linfócitos específicos. Ao adicionar-se o P2C, conseguiu-se estimulação dos linfócitos específicos para o NLVP em seis dos 16 doadores analisados. Os doadores respondedores aparecem realçados em cinza na tabela 3. Em três deles, a resposta foi melhor quando o peptídeo estava acoplado ao P2C (peptídeo e P2C na mesma partícula) (Tabela 3 e Figura 26), enquanto que células de dois doadores responderam melhor quando o P2C e peptídeo foram dados às DCs na forma não conjugada (peptídeo e P2C em diferentes partículas) (Tabela 3). No outro doador que respondeu ao estímulo, o fato de o peptídeo e o P2C estarem na mesma ou em diferentes partículas não resultou em diferença na resposta (doador 2, Tabela 3).

Tabela 3 - Porcentagem de linfócitos T CD8+ específicos para o peptídeo de CMV (NLVP) – Os números mostrados são referentes a porcentagem de células CD8+ Tetrâmero HLA-A*0201/NLVP+.

Grupos Doador	Somente linfócitos T CD8+	Linfócitos T CD8+ em co-cultura com DCs									
		Sem tratamento	(GILG)	(NLVP)	(P2C)	(GILG- P2C) + (NLVP)	(NLVP- P2C) + (GILG)	(GILG) + (P2C)	(NLVP) + (P2C)	(GILG-P2C)	(NLVP- P2C)
1	0,13	0,17	0,1	0,14	0,18	0	0,12	*	*	0,2	0,25
2	0,03	0,05	0,12	0,02	0,06	0,7	0,65	0,16	0,1	*	*
3	*	0	0	0	0	0	0	0,02	0	*	*
4	0,2	0,2	0,2	0,4	0,2	0,2	2,3	0,2	1,2	*	*
6	0	0,01	0	0	0	0	0	0,01	0	*	*
7	0,9	0,8	0,7	0,7	0,7	0,9	0,8	0,7	0,9	*	*
8	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	*	*
9	0,7	0,7	0,5	0,7	0,6	0,8	6	0,5	1,4	*	*
10	0,5	0,6	0,3	0,5	0,4	0,8	0,4	0,4	0,8	*	*
11	0,5	1,3	0,6	0,5	0,4	0,2	0,4	0,5	0,5	*	*
12	1,1	0,7	0,6	0,9	0,7	0,9	0,7	0,7	1,7	0,6	*
14	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,3	1	0,1	0,4	0,1	2,4
15	0,1	0,3	0,4	0,2	0,7	0,7	0,3	0,3	0,6	0,6	0,2
16	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	*	0,1	0,1	0,1	*
17	1,1	0,7	0,4	2	0,6	3,1	1,5	0,7	2,2	0,8	0,7
18	5	4,9	4,3	4,8	4,6	16	6,3	3,7	17	4,4	7,7
Média	0,71	0,68	0,54	0,7	0,59	1,6	1,37	0,6	1,8	0,97	2,25

* material não disponível

Figura 26 - Porcentagem de linfócitos T CD8+ específicos para o peptídeo NLVP.

Linfócitos T CD8+ foram mantidos em cocultura por sete dias com: DCs sem tratamento ou DCs que receberam partículas contendo: (P2C); (NLVP); (GILG-P2C) + (NLVP); (NLVP) + (P2C); (NLVP-P2C); ou (NLVP-P2C) + (GILG). Após sete dias em co-cultura, as células foram marcadas com anticorpo anti-CD8 e tetrâmeros de HLA-A*0201/NLVP e analisadas por citometria de fluxo.

6 DISCUSSÃO

As DCs são as principais células apresentadoras de antígenos (BANCHEREAU; STEINMAN, 1998). Esse tipo celular possui a habilidade única para iniciar tanto respostas primárias, estimulando linfócitos T naive, como respostas secundárias, ativando linfócitos T de memória (BANCHEREAU; STEINMAN, 1998). Além disso, parecem ser o tipo celular que melhor realiza o processo de apresentação cruzada, ou seja, apresentação de peptídeos exógenos no contexto do MHC de classe I para linfócitos T CD8+. Essa função é extremamente importante na indução da resposta imune contra vírus que não infectam DCs e também contra tumores (LIN et al., 2008). Assim, o conhecimento de como esse processo ocorre nas DCs poderia ser usado para direcionar a resposta imune a alvos tumorais (ou virais) para os quais a resposta imune natural parece não ter sido eficiente.

Em trabalhos recentes, pesquisadores conseguiram melhorar a apresentação de Ags exógenos pela conjugação dos mesmos à ligantes de TLR (HEIT et al., 2003; KHAN et al., 2007; MAURER et al., 2002). Nesse contexto, em nosso trabalho também pudemos constatar uma melhora na indução de resposta de linfócitos T CD8+ quando os antígenos eram capturados por uma DC que tivesse também sido estimulada por um ligante de TLR, mesmo que não fisicamente acoplado ao Ag.

Enquanto nos trabalhos mencionados, a conjugação dos Ags aos agonistas de TLR era feita por ligação covalente das duas estruturas, em nosso estudo o Ag e o ligante de TLR estavam adsorvidos à partículas. Como resultado da “conjugação química” dos estudos mencionados, os autores tinham um complexo Ag-ligante de TLR solúvel, ao passo que no presente estudo, temos um complexo particulado. Essas diferentes formulações podem culminar em diferentes mecanismos de captura desses complexos pelas DCs, o que, por sua vez poderia induzir diferentes respostas (BURGDORF; KURTS, 2008).

Em nosso estudo pudemos observar a internalização das partículas pelas DCs, o que ocorreu independente do peptídeo/P2C a elas adsorvidos. Mesmo partículas vazias eram capturadas pelas DCs (dados não mostrados), o que sugere um mecanismo inespecífico de fagocitose das mesmas.

Além disso, após a internalização das partículas, os peptídeos a elas adsorvidos eram liberados das mesmas, aparecendo em estruturas vesiculares no interior das células. Posteriormente, com o uso de anticorpos específicos pudemos demonstrar a apresentação do peptídeo em associação com a molécula de MHC-I na superfície das DCs.

Para estudar a apresentação dos peptídeos pelas DCs carregadas com as partículas, nós usamos um anticorpo recombinante semelhante ao TCR, com especificidade para o complexo HLA-A*0201/GILG. Esses anticorpos foram desenvolvidos para reconhecer complexos de MHC-I/peptídeo com alta afinidade e especificidade, o que faz deles uma ferramenta bastante eficiente para a detecção e quantificação direta de antígenos processados, independentes de linfócitos T (ZEHN et al., 2004, 2006). Até o momento, a maioria dos estudos publicados tem utilizado como parâmetro de eficiência de apresentação de antígenos por DCs, sistemas baseados em linfócitos T (LABEUR et al., 1999; LUFT et al., 2001; SALIO et al., 2001). Embora importantes, esses sistemas não são capazes de discriminar entre a apresentação propriamente dita e co-estimulação, necessária para induzir uma resposta dos linfócitos T. Assim, usando esses anticorpos, pudemos observar a apresentação do peptídeo nas DCs em associação com o MHC-I. De maneira intrigante, o ligante de TLR parece não ter um papel relevante na apresentação do antígeno, uma vez que não houve nenhuma melhora na apresentação quando as DCs foram carregadas com partículas contendo o P2C. Esse dado é surpreendente, uma vez que observamos um aumento na expressão da molécula HLA-A2 (o ligante natural para o peptídeo GILG, utilizado nos experimentos) nas células carregadas com o P2C (dados não mostrados). Nossos resultados indicam que a apresentação de peptídeos de origem exógena no contexto do MHC-I não depende do ligante de TLR no material fagocitado, ao contrário do que parece acontecer na apresentação em MHC-II (BLANDER; MEDZHITOV, 2006). No estudo feito por Blander e Medzhitov, os antígenos só eram apresentados na superfície das DCs murinas em MHC de classe II, quando os mesmos eram administrados às DCs, associados fisicamente à um agonista de TLR.

Uma vez que não houve diferença significativa na expressão dos complexos MHC-I/peptídeo entre o grupo de DCs pulsadas com o peptídeo solúvel e as DCs

carregadas com as partículas contendo o peptídeo, consideramos a possibilidade de o peptídeo ter sido liberado das partículas para o meio de cultura e, desse modo, ter se associado ao MHC-I sem passar pela rota intra-celular de processamento. Para nos certificarmos de que o peptídeo aderido às partículas não estava sendo liberado no meio de cultura, tratamos as DCs com citocalasina D, um inibidor de fagocitose e em seguida administramos as partículas. Observamos que a inibição da fagocitose resultou na não apresentação dos peptídeos quando os mesmos foram dados às DCs em partículas. Por outro lado, o peptídeo solúvel, utilizado como controle, pôde ser detectado na superfície das DCs, mesmo quando essas células foram tratadas com citocalasina D. Esses resultados mostram de maneira convincente que o peptídeo associado às partículas seguiu a rota de processamento intra-celular para que pudesse ser apresentado na membrana das células.

Após serem internalizados, os antígenos entram na via endocítica, onde são processados. O aumento do pH endossômico reduz a atividade proteolítica da maioria das enzimas contidas nesses compartimentos, bem como interfere com a fusão entre vesículas (YEWDALL; NORBURY; BENNINK, 1999). Nós queríamos saber se a acidificação no compartimento endossômico das DCs era necessário para a apresentação de antígenos. Para isso, as DCs foram tratadas com cloroquina, um conhecido inibidor da acidificação endossômica, e em seguida carregadas com as partículas. De maneira surpreendente a neutralização do pH endossômico com cloroquina não diminuiu a apresentação, mas a aumentou discretamente. Esses dados mostram que a apresentação cruzada pode ocorrer sem a necessidade de atividades endossômicas dependentes de pH ácido, tais como a proteólise por proteases ou mesmo fusão endossômica. Na verdade, de acordo com estudos de Amigorena, a razão de as DCs serem células tão eficientes na apresentação cruzada se deve a existência de um mecanismo de alcalinização endossômica, que evitaria um excesso de degradação dos peptídeos, favorecendo assim sua apresentação (JOFFRE et al., 2012; MANTEGAZZA et al., 2008). Nossos resultados parecem concordar com os de Amigorena, uma vez que também observamos que as partículas internalizadas pelas DCs não se localizaram em compartimentos acídicos. Mesmo as partículas que continham o agonista de TLR P2C não foram encontradas em compartimentos acídicos.

Esses dados contradizem os descritos por Medzhitov em um trabalho que mostrou que a maturação e acidificação endossômica são dependentes de um agonista de TLR na partícula fagocitada (BLANDER; MEDZHITOV, 2004, 2006). Para adicionar mais complexidade ao sistema, partículas de PLGA (poli (ácido lático-co-ácido glicólico) de 300 nm de diâmetro foram encontradas em compartimentos ácidos em DCs, em experimentos feitos em nosso laboratório (dados não mostrados). Esses dados nos permitem sugerir que o tamanho e a composição da partícula fagocitada são também fatores de relevância e parecem determinar a rota intra-celular de processamento que ela terá. Vale a pena observar que as partículas usadas em nossos experimentos foram desenvolvidas para reter os peptídeos em pH alto ou neutro, mas liberá-los em pH baixo. Uma vez que a acidificação intra-celular foi inibida, era esperada a não apresentação do peptídeo, já que em pH não ácido o mesmo ficaria aderido às partículas, não ficando disponível para ser apresentado.

De acordo com o modelo canônico proposto para a apresentação cruzada, os antígenos endocitados/fagocitados são translocados para o citosol, onde são degradados em peptídeos pelo proteassomo. Em seguida, os fragmentos peptídicos são transportados para o lúmen do retículo endoplasmático pela proteína associada com o processamento de antígenos (TAP, do inglês transporter associated with antigen processing). No retículo, os peptídeos são carregados em moléculas de MHC-I nascentes para posterior apresentação na superfície celular (LI; DAVEY; SUTHERLAND, 2001; NORBURY, 2000; KOVACSOVICS-BANKOWSKI; ROCK, 1995; REIS E SOUSA; GERMAIN, 1995). Para avaliar se a apresentação dos peptídeos aderidos às partículas envolve acesso às moléculas de MHC nascentes no retículo, e se a presença de um ligante de TLR influenciaria esse processo, nós tratamos as DCs com brefeldina A (BFA) antes do carregamento dessas células com as partículas. BFA é um metabólito fúngico que interfere na montagem do aparelho de Golgi, bloqueando o transporte de moléculas de MHC-I recém sintetizadas do retículo para a superfície (NORBURY, 2000). O tratamento das DCs com BFA inibiu quase completamente a apresentação do peptídeo, quando este foi dado às DCs associado às partículas, mas não quando o peptídeo solúvel foi adicionado. Esses dados mostram que um aparelho de Golgi funcional é necessário para a apresentação cruzada do peptídeo particulado.

Isso sugere também que a ligação do peptídeo ao MHC-I ocorre em compartimentos intra-celulares envolvidos na rota secretória contendo moléculas de MHC-I recém sintetizadas e não em vesículas de reciclagem. Uma observação intrigante foi o fato de a BFA ter inibido a apresentação cruzada independente da presença do P2C na partícula fagocitada. A preferência pela chamada rota canônica de apresentação cruzada mesmo quando o antígeno foi coadministrado com o ligante de TLR é surpreendente, uma vez que foi recentemente mostrado que a presença de ligantes de TLR favoreceria a rota endossômica, em detrimento da rota canônica (BURGDORF et al., 2008). Nesse estudo os autores pulsaram DCs com um antígeno ou antígeno complexado com LPS, um agonista de TLR4. Antígeno contendo LPS e sem LPS foram alocados em diferentes compartimentos endossômicos. Os autores observaram que o endossomo contendo antígeno e LPS expressava a TAP. Posteriormente, verificou-se que o LPS presente no endossomo havia induzido o recrutamento da TAP para aquele compartimento endossômico. Para confirmar o papel do ligante de TLR para o recrutamento da TAP para o endossomo, foi mostrado que DCs deficientes para TLR4 ou MyD88 não apresentavam TAP em compartimentos endossômicos, mesmo quando essas células eram pulsadas com antígeno em conjunto com LPS.

Uma vez que as DCs apresentaram os peptídeos em sua superfície, independente do fato de o mesmo ter sido co-administrado em conjunto com P2C, a pergunta que se fez é se essas DCs seriam equivalentes àquelas que capturaram o peptídeo em conjunto com o P2C, na indução de proliferação de linfócitos T CD8+ específicos ao peptídeo.

Vale salientar que as DCs que receberam partículas contendo somente um dos peptídeos não foram capazes, na maioria dos doadores, de expandir a população de linfócitos T CD8+ específicos, mesmo expondo o peptídeo em sua superfície. Essa aparente “ineficiência” na ativação de linfócitos poderia ser justificada pela baixa expressão de moléculas co-estimuladoras nessas DCs, assim como a baixa produção de IL-12, uma vez que esse grupo de DCs não havia recebido qualquer estímulo de maturação. Tal afirmação encontra suporte no fato de que as DCs que receberam partículas contendo peptídeo e também o P2C (na mesma ou em diferentes partículas)

e, portanto, apresentavam um maior nível de expressão de moléculas co-estimuladoras e maior produção de IL-12, foram capazes de induzir expansão de linfócitos específicos.

Se por um lado esses dados mostram a importância do estado de maturação da DC para a estimulação de linfócitos T CD8+, por outro, a apresentação do antígeno não pareceu ser dependente de um ligante de TLR na mesma partícula a qual o antígeno estava adsorvido. Diferentemente do que parece ocorrer na apresentação de peptídeos via MHC de classe II (BLANDER; MEDZHITOV, 2006), a apresentação de peptídeos complexados a moléculas do MHC de classe I ocorreu em todas as DCs que internalizaram partículas contendo o peptídeo. Houve, no entanto, como acima descrito, uma melhora considerável na expansão das células específicas quando o ligante de TLR estava presente, mas não necessariamente na mesma partícula a qual o antígeno estava adsorvido.

Nesse ponto, observamos um fenômeno curioso. A maioria dos doadores respondeu melhor ao peptídeo GILG de influenza quando o mesmo foi dado às DCs juntamente com o P2C, mas em partículas distintas. Em alguns casos, mesmo quando a partícula que carregava o P2C, carregava simultaneamente outro peptídeo (NLVP), houve maior expansão por essas DCs de linfócitos T CD8+ específicos ao GILG, comparado às DCs que carregavam o peptídeo GILG e o P2C nas mesmas partículas. Por outro lado, os linfócitos T CD8+ específicos ao peptídeo NLVP respondiam melhor, na maioria dos doadores quando o peptídeo e o P2C estavam na mesma partícula. Essa diferença não foi absoluta, uma vez que também foi observada em alguns doadores uma melhor expansão de linfócitos T CD8+ específicos ao GILG por DCs que haviam recebido o peptídeo e o P2C na mesma partícula, assim como houve doadores que responderam melhor ao peptídeo NLVP quando o mesmo era dado às DCs com o P2C em partículas distintas.

O que se pode ver com clareza é que a captura pelas DCs de peptídeos acoplados fisicamente a um ligante de TLR (por partículas), influencia a ativação de linfócitos T CD8+ específicos a esses peptídeos. Ora contribuindo para uma melhor expansão dos clones específicos, ora não.

Em conjunto, a maior parte de nossos dados confirma a importância do estado de maturação das DCs para uma eficiente estimulação de linfócitos T específicos, o que

condiz com o mostrado na literatura (MELLMAN; STEINMAN, 2001; REIS E SOUSA, 2006). Contudo, contrariando essa afirmação, observamos nos últimos seis doadores uma intensa resposta de linfócitos específicos ao peptídeo GILG de influenza, mesmo quando esses linfócitos haviam sido co-cultivados com DCs que receberam somente o peptídeo cognato, mas sem qualquer estímulo adicional de maturação.

Indagamo-nos sobre o motivo por trás da intensa resposta de linfócitos T CD8+ específicos para o peptídeo GILG de influenza dos últimos seis doadores estudados, o que não havia sido visto em nenhum dos doadores anteriores. Um dado interessante e que pode ajudar a esclarecer esse fenômeno é que as amostras desses doadores foram obtidas logo após o inverno, que é o período de maior circulação do vírus da gripe. Ao serem expostos ao vírus, esses indivíduos estariam sensibilizados aos antígenos, tendo células específicas “recém-ativadas” e, portanto, com um limiar de ativação mais baixo para tais antígenos, o que explicaria a resposta mais intensa dos linfócitos desses doadores às DCs que receberam somente o peptídeo.

Embora os dados obtidos nesse estudo não permitam uma conclusão definitiva sobre qual o modo mais eficiente de estimular linfócitos T CD8+, eles apontam para o fato de que diferentes clones, de diferentes indivíduos, possuem requisitos distintos para proliferação. Em suma, pudemos ver que, de modo geral as DCs precisam estar maduras para estimular intensa proliferação de linfócitos T CD8+. O que ainda não está claro, porém, é o papel do acoplamento do Ag ao ligante de TLR nesse processo. Nesse ponto nossos dados contrastam aos de Khan e colaboradores que mostram que peptídeos acoplados a agonista de TLR1/2 e também de TLR9 melhoram significativamente o priming de linfócitos T CD8+ específicos comparados com os não-acoplados (KHAN et al., 2007). Resultados similares foram relatados por Oh e Kedl, porém utilizando proteínas acopladas a um agonista de TLR7 (OH; KEDL, 2010). É importante salientar que em ambos os trabalhos foram testados linfócitos T, murinos, CD8+ naive e específicos a epítomos de ovoalbumina (OVA). Ainda mais, os linfócitos T eram provenientes de animais com repertório monoclonal. Em nosso trabalho, por outro lado, foram testados linfócitos T, humanos, CD8+ de duas diferentes especificidades, dentre uma população policlonal. Outro aspecto que merece ser mencionado é o fato de que, embora o sistema imune murino seja extensamente usado para explicar o

funcionamento do humano, há importantes diferenças entre o sistema imune murino e o humano, que merecem ser levadas em consideração na interpretação dos resultados (MESTAS; HUGHES, 2004). Na verdade, estas observações, mesmo relativamente “frustrantes”, por não permitirem conclusões definitivas, são de importância única, pois chamam a atenção para a realidade dos fenômenos naturais, cuja complexidade sempre oferece mais uma oportunidade de refinamento em sua descrição e compreensão.

Ainda merece ser considerado que acoplamento e não-acoplamento poderiam induzir distintos estados funcionais nas DCs. Essas “diferentes” DCs por sua vez, teriam distintas capacidades de expansão de linfócitos T. Um importante parâmetro da capacidade estimuladora das DCs é o nível de expressão de moléculas co-estimuladoras (MELLMAN; STEINMAN, 2001; REIS E SOUSA, 2006). Entretanto, a análise da expressão destas moléculas em nossos experimentos não sugere que este seja um parâmetro capaz de explicar nossas observações. Todavia, é necessária ainda a ressalva de que analisamos a expressão de CD80 e CD86, as duas principais moléculas co-estimuladoras, mas não necessariamente as únicas.

Além disso, dois outros fatores que poderiam influenciar a capacidade de ativação de linfócitos por DCs são o nível de expressão de complexos MHC-peptídeo, e a produção de IL-12 (O’SULLIVAN; THOMAS, 2003). Novamente, a análise desses dois parâmetros não se mostrou capaz de explicar nossas observações, uma vez que tanto o nível de expressão de complexos MHC-peptídeo na superfície das DCs como a produção de IL-12 foram similares entre as DCs carregadas com o Ag acoplado e não-acoplado ao agonista de TLR.

Em suma, nossos resultados mostram que a apresentação cruzada não envolve acidificação endossômica e depende de moléculas de MHC recém-sintetizadas do retículo endoplasmático. Ao contrário do que é sugerido em outros estudos, a presença de um ligante de TLR no material fagocitado não parece contribuir nem para a “maturação do fagossomo”, caracterizado por sua acidificação (BLANDER; MEDZHITOV, 2004, 2006), nem para a via endossômica de apresentação cruzada (BURGDORF et al., 2008). Essas discrepâncias nos resultados podem ser devido aos diferentes modelos e condições experimentais envolvidos em cada estudo. Entre essas

diferenças, vale a pena citar modelos humanos (maioria in vitro) x modelos murinos; antígenos particulados x antígenos solúveis; e no caso de antígenos particulados, tamanho da partícula nano x micro; composição da partícula; sílica x PLGA. Diferenças em cada um desses parâmetros parecem levar a diferentes resultados e mecanismos. Isso só vem a confirmar a complexidade da biologia das DCs, o que deve ser levado em consideração para a interpretação e extrapolação dos dados nesses diferentes trabalhos. Por fim, nossos dados apontam também para a importância do estado de maturação das DCs para a indução de resposta proliferativa em linfócitos T CD8+. De maneira intrigante, o acoplamento do Ag ao estímulo de maturação, embora não altere a expressão das moléculas indicadoras de ativação nas DCs nem a apresentação do complexo MHC-I/peptídeo, altera sua capacidade de estimular linfócitos T CD8+ específicos.

7 CONCLUSÕES

Neste estudo foi observado que:

- o tratamento das DCs com as partículas contendo peptídeo e/ou P2C não afetou sua viabilidade;
- partículas contendo P2C induziram aumento da expressão das moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86, do marcador CD83 e maior secreção de IL-12 pelas DCs carregadas com tais partículas;
- DCs capturaram as partículas independente do peptídeo/lipopeptídeo a elas adsorvidos;
- após internalização das partículas, os peptídeos a elas adsorvidos foram encontrados tanto nas partículas como em estruturas vesiculares dentro das células;
- DCs carregadas com partículas contendo peptídeo apresentaram o mesmo em associação ao MHC-I na superfície;
- a presença de um ligante de TLR na partícula administrada às DCs não induziu aumento da expressão de complexos MHC-I/peptídeo na superfície dessas DCs;
- a inibição da fagocitose bloqueou a apresentação do peptídeo, quando o mesmo era dado às DCs associado às partículas;
- a acidificação endossômica não foi importante para a apresentação do peptídeo associado às partículas;

-
- o processamento do peptídeo para apresentação cruzada envolveu a “via canônica”, com o carregamento de moléculas de MHC-I recém sintetizadas no retículo endoplasmático e o transporte dos complexos MHC-I/peptídeo pela via retículo endoplasmático-aparelho de Golgi;
 - DCs carregadas com partículas contendo o peptídeo cognato estimularam proliferação mais intensa em linfócitos T CD8+ específicos ao peptídeo quando o P2C estava presente – ora na mesma, ora em diferentes partículas.

REFERÊNCIAS*

ACCAPEZZATO, D.; VISCO, V.; FRANCAVILLA, V.; MOLETTE, C.; DONATO, T.; PAROLI, M.; MONDELLI, M. U.; DORIA, M.; TORRISI, M. R.; BARNABA, V. Chloroquine enhances human CD8⁺ T cell responses against soluble antigens in vivo. **J. Exp. Med.**, v. 202, p. 817-828, 2005.

AKIRA, S.; TAKEDA, K. Toll-like receptor signalling. **Nat. Immunol.**, v. 4, p. 499-511, 2004.

ALEXOPOULOU, L.; HOLT, A. C.; MEDZHITOV, R.; FLAVELL, R. A. Recognition of double-stranded RNA and activation of NK- κ B by Toll-like receptor 3. **Nature**, v. 413, p. 732-738, 2001.

ANDERSON, K. V. Toll signaling pathways in the innate immune response. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 12, p. 13-19, 2000.

BABON, A.; ALMUNIA, C.; BOCCACCIO, C.; BEAUMELLE, B.; GELB, M. H.; MÉNEZ, A.; MAILLÈRE, B.; ABASTADO, J. P.; SALCEDO, M.; GILLET, D. Cross-presentation of a CMV pp65 epitope by human dendritic cells using bee venom PLA2 as a membrane-binding vector. **FEBS Lett.**, v. 579, p. 1658-1664, 2005.

BANCHEREAU, J.; BRIERE, F.; CAUX, C.; DAVOUST, J.; LEBECQUE, S.; LIU, Y.; PULENDRAN, B.; PALUCKA, K. Immunobiology of dendritic cells. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 18, p. 767-811, 2000.

BANCHEREAU, J.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**, v. 392, p. 245-252, 1998.

BAUER, S.; KIRSCHINING, C. J.; HACKER, H. Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species specific CpG motif recognition. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 98, p. 9237-9242, 2001.

BETTELLI, E.; OUKKA, M.; KUCHROO, V. K. Th-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. **Nat. Immunol.**, v. 8, p. 345-350, 2007.

BIDDISON, W. E.; TURNER, R. V.; GAGNON, S. J.; LEV, A.; COHEN, C. J.; REITER, Y. Tax and M1 peptide/HLA-A2-specific Fabs and T cell receptors recognize nonidentical structural features on peptide/HLA-A2 complexes. **J. Immunol.**, v. 171, p. 3064-3074, 2003.

BLANDER, J. M.; MEDZHITOV, R. Regulation of phagosome maturation by signals from toll-like receptors. **Science**, v. 304, p. 1014-1018, 2004.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

- BLANDER, J. M.; MEDZHITOV, R. Toll-dependent selection of microbial antigens for presentation by dendritic cells. **Nature**, v. 440, p. 808-812, 2006.
- BURGDORF, S.; SCHÖLZ, C.; KAUTZ, A.; TAMPÉ, R.; KURTS, C. Spatial and mechanistic separation of cross-presentation and endogenous antigen presentation. **Nat. Immunol.**, v. 9, p. 558-566, 2008.
- BURGDORF, S.; KURTS, C. Endocytosis mechanisms and the cell biology of antigen presentation. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 20, p. 89-95, 2008.
- BUWITT-BECKMANN, U.; HEINE, H.; WIESMÜLLER, K. H.; JUNG, G.; BROCK, R.; AKIRA, S.; ULMER, A. J. TLR1- and TLR6-independent recognition of bacterial lipopeptides. **J. Biol. Chem.**, v. 281, p. 9049-9057, 2006.
- CHÁVEZ-SÁNCHEZ, L.; CHÁVEZ-RUEDA, K.; LEGORRETA-HAQUET, M. V.; ZENTENO, E.; LEDESMA-SOTO, Y.; MONTOYA-DÍAZ, E.; TESORO-CRUZ, E.; MADRID-MILLER, A.; BLANCO-FAVELA, F. The activation of CD14, TLR4, and TLR2 by mmLDL induces IL-1 β , IL-6, and IL-10 secretion in human monocytes and macrophages. **Lipids Health. Dis.**, v. 9, p. 117, 2010.
- COOK, D. N.; PISETSKY, D. S.; SCHWARTZ, D. A. Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease. **Nat. Immunol.**, v. 5, p. 975-995, 2004.
- DI PUCCHIO, T.; CHATTERJEE, B.; SMED-SÖRENSEN, A.; CLAYTON, S.; PALAZZO, A.; MONTES, M.; XUE, Y.; MELLMAN, I.; BANCHEREAU, J.; CONNOLLY, J. E. Direct proteasome-independent cross-presentation of viral antigen by plasmacytoid dendritic cells on major histocompatibility complex class I. **Nat. Immunol.**, v. 9, p. 551-557, 2008.
- EGNER, W.; HART, D. N. The phenotype of freshly isolated and cultured human bone marrow allostimulatory cells: possible heterogeneity in bone marrow dendritic cell populations. **Immunology**, v. 85, p. 611-620, 1995.
- ELOMA, A. Cloning of a novel bacteria-binding receptor structurally related to scavenger receptors and expressed in a subset of macrophages. **Cell**, v. 80, p. 603-609, 1995.
- FAN, J.; MALIK, A. B. Toll-like receptor 4 signalling augments chemokine-induced neutrophil migration by modulating cell surface expression of chemokine receptors. **Nat. Med.**, v. 9, p. 315-321, 2005.
- FARHAT, K.; RIEKENBERG, S.; HEINE, H.; DEBARRY, J.; LANG, R.; MAGES, J.; BUWITT-BECKMANN, U.; RÖSCHMANN, K.; JUNG, G.; WIESMÜLLER, K. H.; ULMER, A. J. Heterodimerization of TLR2 with TLR1 or TLR6 expands the ligand spectrum but does not lead to differential signaling. **J. Leukoc. Biol.**, v. 83, p. 692-701, 2008.
- FONTENOT, J. D.; GAVIN, M. A.; RUDENSKY, A. Y. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. **Nat. Immunol.**, v. 4, p. 330-336, 2003.

GAY, N. J.; KEITH, F. J. Drosophila Toll and IL-1 receptor. **Nature**, v. 351, p. 355-356, 1991.

GEWIRTZ, A. T.; NAVAS, T. A.; LYONS, S. Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. **J. Immunol.**, v. 167, p. 1882-1885, 2001.

GEWURZ, H.; MOLD, C.; SIEGEL, J.; FIEDEL, B. C-reactive protein and the acute phase response. **Adv. Intern. Med.**, v. 27, p. 345-372, 1982.

GUILLOT, L.; LE GOFFIC, R.; BLOCH, S. Involvement of toll-like receptor 3 in the immune response of lung epithelial cells to double-stranded RNA and influenza A virus. **J. Biol. Chem.**, v. 280, p. 5571-5580, 2005.

HASHIMOTO, C.; HUDSON, K. L.; ANDERSON, K. V. The toll gene of Drosophila, required for dorso-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrana protein. **Cell**, v. 52, p. 269-279, 1988.

HEIL, F.; HERMMI, H.; HOCKREIN, H. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. **Science**, v. 303, p. 1526-1529, 2004.

HEIT, A.; MAURER, T.; HOCHREIN, H.; BAUER, S.; HUSTER, K. M.; BUSCH, D. H.; WAGNER, H. Cutting edge: Toll-like receptor 9 expression is not required for CpG DNA-aided cross-presentation of DNA-conjugated antigens but essential for cross-priming of CD8 T cells. **J. Immunol.**, v. 170, p. 2802-2805, 2003.

HERTZ, C. J.; WU, Q.; PORTER, E. M. Activation of toll-like receptor 2 on human tracheobronchial epithelial cells induces the antimicrobial peptide human beta defensin-2. **J. Immunol.**, v. 171, p. 6820-6826, 2003.

HOLMSKOV, U. L. Collectins and collectin receptors in innate immunity. **APMIS Suppl.**, v. 100, p. 1-59, 2000.

HORI, S.; NOMURA, T.; SAKAGUCHI, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. **Science**, v. 299, p. 1057-1061, 2003.

HORNG, T.; BARTON, G. M.; FLAVELL, R. A.; MEDZHITOV, R. The adaptor molecule TIRAP provides signaling specificity for Toll-like receptors. **Nature**, v. 420, p. 329-333, 2002.

IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. **Nat. Immunol.**, v. 5, p. 987-995, 2004.

JACKSON, S. H.; YU, C. R.; MAHDI, R. M.; EBONG, S.; EGWUAGU, C. E. Dendritic cell maturation requires STAT1 and is under feedback regulation by suppressors of cytokine signaling. **J. Immunol.**, v. 172, p. 2307-2315, 2004.

JANEWAY, C. A. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. **Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.**, v. 54, p. 1-13, 1989.

JANEWAY, C. A. The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. **Immunol Today**, v. 13, p. 11-16, 1992.

JANEWAY, C. A. How the immune system works to protect the host from infection: A personal view. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 98, p. 7461-7468, 2001.

JOFFRE, O. P.; SEGURA, E.; SAVINA, A.; AMIGORENA, S. Cross-presentation by dendritic cells. **Nat. Rev. Immunol.**, v.12, p. 557-69, 2012.

KASTURI, S. P.; PULENDRAN, B. Cross-presentation: avoiding trafficking chaos? **Nat. Immunol.**, v. 9, p. 461-463, 2008.

KHAN, S.; BIJKER, M. S.; WETERINGS, J. J.; TANKE, H. J.; ADEMA, G. J.; van HALL, T.; DRIJFHOUT, J. W.; MELIEF, C. J. M.; OVERKLEEF, H. S. van der MAREL, G. A.; FILIPPOV, D. V.; van der BURG, S. H.; OSSENDORP, F. Distinct uptake mechanisms but similar intracellular processing of two different toll-like receptor ligand-peptide conjugates in dendritic cells. **J. Biol. Chem.**, v. 282, p. 21145-21148, 2007.

KLECHEVSKY, E.; MORITA, R.; LIU, M.; CAO, Y.; COQUERY, S.; THOMPSON-SNIPES, L.; BRIERE, F.; CHAUSSABEL, D.; ZURAWSKI, G.; PALUCKA, A. K.; REITER, Y.; BANCHEREAU, J.; UENO, H. Functional specializations of human epidermal Langerhans cells and CD14+ dermal dendritic cells. **Immunity**, v. 29, p. 497-510, 2008.

KOPP, E.; MEDZHITOV, R. Recognition of microbial infection by Toll like receptors. **Trends Immunol.**, v. 15, p. 396-401, 2003.

KORN, T.; BETTELLI, E.; GAO, W.; AWASTHI, A.; JÄGER, A.; STROM, T. B.; OUKKA, M.; KUCHROO, V. K. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory TH17 cells. **Nature**, v. 26, p. 484-487, 2007.

KOSKI, G. K.; KARIKO, K.; XU, S. Cutting edge: innate immune system discriminates between RNA containing bacterial versus eukaryotic structural features that prime for high-level IL-12 secretion by dendritic cells. **J. Immunol.**, v. 172, p. 3989-3993, 2004.

KOVACSOVICS-BANKOWSKI, M.; ROCK, K. L. A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. **Science**, v. 267, p. 243-246, 1995.

LABEUR, M. S.; ROTERS, B.; PERS, B.; MEHLING, A.; LUGER, T. A.; SCHWARZ, T.; GRABBE, S. Generation of tumor immunity by bone marrow-derived dendritic cells correlates with dendritic cell maturation stage. **J. Immunol.**, v. 162, p. 168-175, 1999.

- LATZ, E.; SCHOENEMEYER, A.; VISINTIN, A. TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. **Nat. Immunol.**, v. 5, p. 190-198, 2004.
- LEMAITRE, B.; NICOLAS, E.; MICHAUT, L.; REICHHART, J. M.; HOFFMAN, J. A. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. **Cell**, v. 86, p. 973-983, 1996.
- LI, M.; DAVEY, G. M.; SUTHERLAND, R. M. Cell-associated ovalbumin is cross-presented much more efficiently than soluble ovalbumin in vivo. **J. Immunol.**, v. 166, p. 6099-6103, 2001.
- LIN, M. L.; ZHAN, Y.; VILLADANGOS, J. A.; LEW, A. M. The cell biology of cross-presentation and the role of dendritic cell subsets. **Immunol. Cell. Biol.**, v. 86, p. 353-362, 2008.
- LUFT, T.; RIZKALLA, M.; TAI, T. Y.; CHEN, Q.; MacFARLAN, R. I.; DAVIS, I. D.; MARASKOVSKY, E.; CEBON, J. Exogenous peptides presented by transporter associated with antigen processing (TAP)-deficient and TAP-competent cells: intracellular loading and kinetics of presentation. **J. Immunol.**, v. 167, p. 2529-2537, 2001.
- MANTEGAZZA, A. R.; SAVINA, A.; VERMUELEN, M.; PÉREZ, L.; GEFFNER, J.; HERMINE, O.; ROSENZWEIG, S. D.; FAURE, F.; AMIGORENA, S. NADPH oxidase controls phagosomal pH and antigen cross-presentation in human dendritic cells. **Blood**, v. 112, p. 4712-4722, 2008.
- MAURER, T.; HEIT, A.; HOCHREIN, H.; AMPENBERGER, F.; O'KEEFFE, M.; BAUER, S.; LIPFORD, G. B.; VABULAS, R. M.; WAGNER, H. CpG-DNA aided cross-presentation of soluble antigens by dendritic cells. **Eur. J. Immunol.**, v. 32, p. 2356-64, 2002.
- MCCURDY, J. D.; OLYNYCH, T. J.; MAHER, L. H. Cutting edge: distinct toll-like receptor 2 activators selectively induce different classes of mediator production from human mast cells. **J. Immunol.**, v. 170, p. 1625-1629, 2003.
- MEDZHITOV, R. Toll-like receptors and innate immunity. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 1, p. 135-145, 2001.
- MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. A. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. **Science**, v. 296, p. 298-300, 2002.
- MELLMAN, I.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. **Cell**, v. 106, p. 255-258, 2001.
- MENG, X.; KHANUJA, B. S.; IP, Y. T. Toll receptor-mediated *Drosophila* immune response requires Dif, an NF- κ B factor. **Genes Dev.**, v. 13, p. 792-797, 1999.

- MESTAS, J.; HUGHES, C. C. W. Of mice and not men: Differences between mouse and human immunology. **J. Immunol.**, v. 172, p. 2731-2738, 2004.
- NAPOLITANI, G.; RINALDI, A.; BERTONI, F.; SALLUSTO, F.; LANZAVECCHIA, A. Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1–polarizing program in dendritic cells. **Nat. Immunol.**, v. 6, p. 769-776, 2005.
- NEVES, A. R.; ENSINA, L. F. C.; ANSELMO, L. B.; LEITE, K. R. M.; CÂMARA-LOPES, L. H.; BARBUTO, J. A. M. Dendritic cells derived from metastatic cancer patients vaccinated with allogeneic dendritic cell-autologous tumour cell hybrids express more CD86 and induce higher levels of interferon-gamma in mixed lymphocyte reactions. **Cancer Immunol. Immunother.**, v. 54, p. 61-66, 2005.
- NORBURY, C. C. Methods in Molecular Biology: Antigen Processing and Presentation Protocols. **Humana Press. Inc.**, v. 156, p. 1–16, 2000.
- OH, J. Z.; KEDL, R. M. The capacity to induce cross-presentation dictates the success of a TLR7 agonist-conjugate vaccine for eliciting cellular immunity. **J. Immunol.**, v. 185, p. 4602-4608, 2010.
- O’SULLIVAN, B.; THOMAS, R. CD40 and dendritic cell function. **Crit. Rev. Immunol.**, v. 23, p. 83-107, 2003.
- OZINSKY, A.; UNDERHILL, D. M.; FONTENOT, J. D. The repertoire for pattern of recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 97, p. 13766-13771, 2000.
- PALUCKA, K. A.; TAQUET, N.; SANCHEZ-CHAPUIS, F.; GLUCKMAN, J. C. Dendritic cells as the terminal stage of monocyte differentiation. **J. Immunol.**, v. 160, p. 4587–4595, 1998.
- PANCER, Z.; COOPER, M. D. The evolution of adaptive immunity. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 24, p. 497-518, 2006.
- PEARSON, A. M. Scavenger receptors in innate immunity. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 8, p. 20-28, 1996.
- PEYRATOUT, C. S.; DÄHNE, L. Tailor-made polyelectrolyte microcapsules: from multilayers to smart containers. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.**, v. 43, p. 3762-3783, 2004.
- POLTORAK, A.; HE, X.; SMIRNOVA, I.; LIU, M. Y.; van HUFFEL, C.; DU, X. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. **Science**, v. 282, p. 2085–2088, 1998.
- REIS E SOUSA, C. Dendritic cells in a mature age. **Nat. Rev. immunol.**, v. 6, p. 476-483, 2006.

- REIS E SOUSA, C.; GERMAIN, R. N. Major histocompatibility complex class I presentation of peptides derived from soluble exogenous antigen by a subset of cells engaged in phagocytosis. **J. Exp. Med.**, v. 182, p. 841-851, 1995.
- ROGER, T.; DAVID, J.; GLAUSER, M. P. MIF regulates innate immune responses through modulation of toll-like receptor 4. **Nature**, v. 414, p. 920-924, 2001.
- ROMANI, N.; REIDER, D.; HEUER, M.; EBNER, S.; KAMPGEN, E.; EIBL, B.; NIEDERWIESER, D.; SCHULER, G. Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. **J. Immunol. Methods**, v. 196, p. 137-151, 1996.
- RUTSCHMANN, S. The Rel protein DIF mediates the antifungal but not the antibacterial host defense in *Drosophila*. **Immunity**, v. 12, p. 569-580, 2000.
- SALIO, M.; SHEPHERD, D.; DUNBAR, P. R.; PALMOWSKI, M.; MURPHY, K.; WU, L.; CERUNDOLO, V. Mature dendritic cells prime functionally superior melan-A-specific CD8⁺ lymphocytes as compared with nonprofessional APC. **J. Immunol.**, v. 167, p. 1188-1197, 2001.
- SCHWALBE, R. A.; DAHIBACK, B.; COE, J. E.; NEUSESTUEN, G. I. Pentraxin family of proteins interact specifically with phosphorylcholine and/or phosphorylethanolamine. **Biochemistry**, v. 31, p. 4907-4915, 1992.
- SHEN, L.; EVEL-KABLER, K.; STROBE, R.; CHEN, S. Silencing of SOCS1 enhances antigen presentation by dendritic cells and antigen-specific anti-tumor immunity. **Nat. Biotech.**, v. 22, p. 1546-1553, 2004.
- SIVORI, S.; FALCO, M.; DELLA CHIESA, M. CpG and double-stranded RNA trigger human NK cells by toll-like receptors: induction of cytokine release and cytotoxicity against tumors and dendritic cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 101, p. 10116-10121, 2004.
- STEINMAN, L. A brief history of Th17, the first major revision in the Th1/Th2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. **Nat. Med.**, v. 13, p. 139-145, 2007.
- TAKEDA, K.; KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 21, p. 335-376, 2003.
- TRINCHIERI, G.; SHER, A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defense. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 7, p. 179-190, 2007.
- VERHASSELT, V.; BUELENS, C.; WILLEMS, F.; De GROOTE, D.; HAEFFNER-CAVAILLON, N.; GOLDMAN, M. Bacterial lipopolysaccharide stimulates the production of cytokines and the expression of costimulatory molecules by human peripheral blood

dendritic cells: evidence for a soluble CD14-dependent pathway. **J. Immunol.**, v. 158, p. 2919-2925, 1997.

WANG, T.; TOWN, T.; ALEXOPOULOU, L. Toll-like receptor 3 mediates west nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis. **Nat. Med.**, v. 10, p. 1366-1373, 2004.

WRIGHT, P. S.; ULEVITCH, R. J.; RAMOS, R. A. Lipopolysaccharide (LPS) binding protein opsonizes LPS-bearing particles for recognition by a novel receptor on macrophages. **J. Exp. Med.**, v. 170, p. 1231-1241, 1989.

YAMAMOTO, M.; SATO, S.; HEMMI, H.; HOSHINO, K.; KAISHO, T.; SANJO, H. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent Toll-like receptor signaling pathway. **Science**, v. 301, p. 640-643, 2003.

YAMAMOTO, M.; SATO, S.; HEMMI, H.; SANJO, H.; UEMATSU, S.; KAISHO, T. Essential role for TIRAP in activation of the signaling cascade shared by TLR2 and TLR4. **Nature**, v. 420, p. 324-329, 2002.

YAMAMOTO, M.; SATO, S.; HEMMI, H.; UEMATSU, S.; HOSHINO, K.; KAISHO, T. TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor4-mediated MyD88-independent signaling pathway. **Nat. Immunol.**, v. 4, p. 1144-1150, 2003.

YAMAMOTO, M.; SATO, S.; MORI, K.; HISHINO, K.; TAKEUCHI, O.; TAKEDA, K. Cutting edge: a novel Toll-IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. **J. Immunol.**, v. 169, p. 6668-6672, 2002.

YEWDELL, J. W.; NORBURY, C. C.; BENNINK, J. R. Mechanisms of exogenous antigen presentation by MHC class I molecules in vitro and in vivo: implications for generating CD8₊ T cell responses to infectious agents, tumors, transplants, and vaccines. **Adv. Immunol.**, v. 73, p. 1-77, 1999.

ZEHN, D.; COHEN, C. J.; REITER, Y.; WALDEN, P. Extended presentation of specific MHC-peptide complexes by mature dendritic cells compared to other types of antigen-presenting cells. **Eur. J. Immunol.**, v. 34, p. 1551-1560, 2004.

ZEHN, D.; COHEN, C. J.; REITER, Y.; WALDEN, P. Efficiency of peptide presentation by dendritic cells compared with other cell types: implications for cross-priming. **Int. Immunol.**, v. 18, p. 1647-1654, 2006.

ZHANG, D.; ZHANG, G.; HAYDEN, M. S. A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. **Science**, v. 303, p. 1522-1526, 2004.

ZHOU, L. J.; SCHWARTING, R.; SMITH, H. M.; TEDDER, T. F. A novel cell-surface molecule expressed by human interdigitating reticulum cells, Langerhans cells, and activated lymphocytes is a new member of the Ig superfamily. **J. Immunol.**, v. 149, p. 735-742, 1992.

ZHOU, L. J.; TEDDER, T. F. CD14⁺ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83⁺ dendritic cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, p. 2588-2592, 1996.

ZOU, W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 6, p. 295-307, 2006.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Manuscrito submetido à publicação

Topical vaccination with functionalized particles targeting dendritic cells

R. B. Baleeiro ^{1,2}, K.-H. Wiesmüller ³, Y. Reiter ⁵, B. Baude ⁴, L. Dähne ⁴, A. Patzelt ¹, J. Lademann ¹, J. A. Barbuto ² and P. Walden ^{1§}

¹ *Department of Dermatology, Venerology and Allergology*

Charité – Universitätsmedizin Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin and Freie Universität Berlin, Berlin, Germany

² *Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil*

³ *EMC microcollections GmbH, Tübingen, Germany*

⁴ *Surflay Nanotec GmbH, Berlin, Germany*

⁵ *Faculty of Biology, Technion - Israel Institute of Technology, Haifa, Israel*

Running title: Topical vaccination targeting DCs

Keywords: Dendritic cells, nanoparticles, TLR, cellular immunity, vaccines

[§] Corresponding author: Peter Walden, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Dept. of Dermatology, Venerology and Allergology, Charitéplatz 1, 10117 Berlin, Germany; Tel.: +49-30-450 518 031; Fax: +49-30-450 518 932; e-mail: peter.walden@charite.de

Abstract

Needle-free vaccination, for reasons of safety, economy and convenience, is a central goal in vaccine development. We exploited a new principle of non-invasive delivery of antigens to dendritic cells of the skin combined with the immunological principles of cell-mediated immunity to develop microparticle-based topical vaccines. When applied to skin, the microparticles penetrate into hair follicles and target resident dendritic cells, the immunologically most potent cells and site for induction of efficient immune responses. The microparticles proved to be efficient carriers for coordinated delivery of the essential vaccine constituents to dendritic cells for cross-presentation of antigens and stimulation of T cell responses. The microparticle vaccines can be designed with different antigen formats including peptides and proteins, or antigen-coding nucleic acids.

Introduction

Nearly all vaccines to date are administered by injection, a painful procedure, especially for children, which bears the risk of propagating infections when needles are re-used. Moreover, injection often delivers the vaccine into sites that are immunologically not the most active, such as muscles or subcutaneous tissue and thus necessitates high excess of the vaccine components which adds to the risks of adverse effects (1,2). The primary target cells for induction of immune responses are dendritic cells (DCs), which are unique antigen processing and presenting cells that can efficiently initiate immune responses and induce immunological memory (3,4). DCs reside as sentinels of the immune system in all tissue where they sample and process antigens and where they sense dangerous situation via innate immune receptors, which triggers maturation and activation of the cells, migration to lymph nodes and expression of costimulatory molecules for induction of T cells (5). These T cells are CD4-expressing helper cells required for both antibody and cell-mediated immunity (CMI), and CD8-expressing effector T cells for CMI. These cellular requirements define the essential constituents of vaccines for induction of CMI, which are antigens/epitopes for helper and effector T cells, and agonists for innate pattern recognition receptors (PRR) for maturation of DCs. Only mature DCs are capable of inducing strong cytotoxic T cell responses and proinflammatory cytokines, and are resistant to immunosuppressive factors as e.g. those produced in tumor microenvironments (6). Therefore, DCs are important targets and mediators of both prophylactic and therapeutic vaccination.

The skin is the body's largest immune organ and directly in contact with the environment (7). It has an unbroken network of DCs, Langerhans and dermal DCs, that can both sense danger and induce immune responses or control and silence immune responses to avoid chronic inflammation and immune pathologies (8,9). Ideal vaccine would be designed to target the antigens directly to these cells in the skin, best by non-invasive application. Such topical vaccination requires penetration of the physical barrier of the skin and the transfer of the vaccine components to the target DCs. Combining the

principles for non-invasive delivery to dendritic cells through skin and the immunological principles of cell-mediated immunity we developed microparticle-based topical vaccines. We show here that the microparticles are efficient carriers for coordinated delivery of the essential vaccine constituents to dendritic cells for cross-presentation of the antigens and stimulation of T cell responses. When applied to the skin, the microparticles penetrates into hair follicles and target the resident dendritic cells, the immunologically most potent cells and site for induction of efficient immune responses.

Results and Discussion

Delivery system design, conjugation of the peptides/lipopeptide to SiO₂ particles and effect on cell viability

We had established that particles penetrate into skin far more efficiently than soluble compounds (10,11). The ports of entry are the hair follicles, and particles of different sizes penetrate to different depths in the follicle. We tested particles with sizes ranging from 122 nm to 1 μ m in diameter. With a diameter of around 600 nm they reach deepest to about 1,400 μ m into the hair root sheath area whereas particles of around 1,000 nm diameter stay above the root sheath. To avoid disturbance of the sheath and because the region above the sheath, the infundibulum, is lined with a particular dense network of DCs (12,13) and thus an immunologically most active region, we explored particle carriers of 1 μ m diameter for delivery of antigens to DCs both *in vitro* and *in situ* through human skin.

The principles of non-invasive delivery to DCs through skin were combined with the immunological principles of CMI induction to develop a topical vaccine. The particles were prepared by a layer-by-layer (LBL) technology (14) and functionalized with antigenic peptides as model vaccine antigens, and lipopeptide ligands for innate immune receptors (Fig. 1). As antigens, we used influenza matrix protein M1₅₈₋₆₆ GILGFVFTL (GILG) and CMV pp65₅₉₅₋₆₀₃ NLVPMVATV (NLVP). The activator for DCs via innate immune receptors was the diacyl-lipopeptide Pam₂Cys-GDPKHPKSF (P2C). This synthetic lipopeptide represents the N-terminal sequence of the 44-kDa lipoprotein LP44 of *Mycoplasma salivarium*. It carries two ester-bound fatty acids and a free amino terminus. The synthetic lipopeptide FSL-1 elicits cellular responses through Toll-like receptor (TLR) 2/TLR6 heterodimers which involve downstream NF- κ B activation and cytokine release (15). The peptides and lipopeptide were C-terminally extended by 4 lysine residues and immobilized on the particles via electrostatic interactions with the outermost polyanion layer of the particles, which is negatively charged at pH 8.

Polymethacrylate was used as polyanion. It has a pK value of 6.2. At pH 5 it is almost completely protonated with a charge of near zero. At this pH, the polycation layer underneath the polyanion layer carries sufficient positive charges to reverse the particle surface charge (z-potential) to positive as validated by electrophoretic measurements (Malvern Zetasizer). As consequence, the attractive electrostatic forces at pH 8 are converted to repulsive forces and the tagged peptides were efficiently released (Fig. 1). The particles were non-toxic as, among others, shown for immature DCs generated from human peripheral blood monocytes by cultivation for five days in medium containing IL-4 and GM-CSF and incubated with particles coated with the different components for two days (Supplementary Fig. 1).

Particles are efficiently taken up and the antigen is displayed at the DCs surface

The particles were efficiently taken up by human DCs *in vitro* regardless of whether or not peptide or lipopeptide were attached as shown by confocal fluorescence microscopy. They were found in vesicular structures where the peptides detached from the particles (Fig. 2A and Supplementary Fig. 2.). To directly demonstrate cross-presentation of the antigenic peptide by loaded-DCs we made use of recombinant TCR-like antibodies that specifically bind the MHC-peptide complex HLA-A*0201/GILG (Supplementary Fig. 3). The antibodies are designed to recognize specific human MHC-I/peptide complexes with high affinity and, thus, can be used to detect and quantify processed antigen at surfaces of the antigen-presenting cells independent from T cells (14-19). They do not bind the free peptides or peptides associated with other compounds but MHC-I of the correct type. Bioassays which are mostly used to monitor processed antigens can not differentiate antigen processing and costimulatory effects on T cells and do not allow quantifying the amount of processed antigen bound to MHC molecules (20-22). Applying the antibodies to particle-loaded DCs, specific peptides carried by the particles were detected at the cell surface associated with the MHC-I. The amounts of cross-presented peptide on the DCs were about the same for particles loaded with peptides alone and those with peptides plus P2C (Fig. 2B and C). The presentation of antigenic peptides by MHC-I molecules is thus not dependent on the TLR-ligand on the cargo as it had been

suggested to be the case for MHC class II presentation (23). Since the peptides were adsorbed to the surface of the particles, it could be argued that they might be released from the particles into the medium and in this free soluble form would bind to MHC-I molecules without intracellular processing. To address this issue, we inhibited the phagocytosis by treating the DCs with cytochalasin D prior to the adding the particles to the cell cultures. Inhibition of phagocytosis completely abrogated the presentation of peptides bound to particles (Fig. 2D) but had no effect on the presentation of soluble peptides. Particle-bound peptides, thus, follow the intracellular route of antigen cross-processing to get to the cell surface.

Cross-presentation of the antigen delivered by SiO₂ particles does not rely on endosomal acidification and involves newly synthesized MHC-I molecules from the ER

Upon uptake, antigens enter an endocytic pathway and progressively pass through increasingly acidic compartments. Raising the endosomal pH reduces the proteolytic activity of most endosomal proteases and interferes with fusion of vesicles (24). We examined whether acidification of the endosomal compartment of human DCs was required for cross-presentation of antigenic peptides when delivered on particles. For that, DCs were pre-incubated with chloroquine (Fig. 2E) or ammonium chloride (Supplementary Fig. 4), and then incubated with peptide-carrying particle with or without P2C. Surprisingly, the neutralization of endosomal pH with chloroquine did not decrease the cross-presentation, rather, it slightly increased it (Fig. 2E). Cross-presentation of the particle-bound peptides apparently does not require endosomal functions dependent on acidification such as proteolysis by proteases or endosomal fusion for maximum efficiency. Similar results were obtained when endosomal acidification was inhibited with ammonium chloride (Supplementary Fig. 4).

According to the canonical model for cross-presentation endocytosed or phagocytosed antigens are translocated into the cytosol where they are degraded into antigenic peptides by proteasomes. Epitopes generated in this process are transported into the

lumen of the endoplasmic reticulum (ER) by the transporter associated with antigen processing (TAP) loaded onto nascent MHC-I molecules for presentation at the cell surface (25-28). To examine whether the cross-presentation of the particle-bound peptide involved MHC-I molecules recycled from the cell surface or requires access to nascent MHC-I in the ER we treated DCs with brefeldin A (BFA) prior to adding particle-bound peptides. BFA is a fungal metabolite that disassembles the Golgi apparatus and thereby blocks the transport of newly synthesized MHC-I molecules from the ER to the cell surface (29). Treatment of DCs with BFA nearly abolished the presentation of particle-bound peptide but not of soluble peptides (Fig. 2F). Vesicle transport via the Golgi apparatus is, thus, required for cross-presentation of particle-bound peptide. This suggests that binding of the epitope to MHC-I molecules occurs in intracellular compartments involved in export pathways that contain newly synthesized MHC molecules, and not in recycling vesicles. Interestingly, BFA prevented the cross-presentation irrespective of P2C on the particles. The preference for this canonical route of cross-presentation even when the antigen was administered together with a TLR-ligand was surprising, since a recent study by Burgdorf and colleagues demonstrated that in presence of TLR-ligand the endosomal route was favored. The authors had observed that, following signaling via TLR and MyD88, TAP was selectively recruited to endocytic organelles and antigen processing for cross-presentation directed to endosomal compartments (30).

Particle-bound P2C induced maturation of DCs and increased the efficiency of T cell stimulation

As only fully mature DCs are capable of inducing strong and sustained cytotoxic immune responses (4,6,31), we examined whether the particles could induce DC maturation. Particles carrying only peptides were not able to (Fig. 3A-D). However, as expected because the DCs had been shown to express TLR2 (Supplementary Fig. 5), when the P2C was attached to the particles, maturation of the cells was triggered and detectable by the up-regulation of the co-stimulatory molecules CD80 and CD86, the expression of the activation marker CD83 and production of IL-12 (Fig. 3A-D).

To test the immune-stimulatory capacity of DCs charged with particle-bound peptides with or without P2C the cells were cultured with T cells from the same donor for seven days. Proliferation of peptide-specific CD8⁺ T cells was then quantified by flow cytometry using peptide/HLA-A*0201 tetramers. Only fully matured DCs were able to stimulate proliferation of the peptide-specific CD8⁺ T cells (Fig. 3E and F). DCs that had not been exposed to P2C and therefore remained immature were not capable of inducing T cell proliferation despite carrying the same levels of MHC-I/peptide complexes as the mature DCs. Matured DCs also induced strong IFN- γ secretion by the T cells (Fig. 3g). Interestingly, for some donors better expansion of peptide-specific CD8⁺ T cells was observed when the cognate peptide was coupled with TLR ligand to the same particles whereas for other donors better stimulation was achieved when peptide and P2C were on separate particles.

SiO₂ particles reach the hair follicles and deliver the antigen to the resident DCs

To test skin penetration of the particle vaccines, we labeled the particles with Cy5 and loaded them with Rhodamine-labeled peptides. The particles were massaged onto porcine ears by standardized conditions and left for 1 and 24 h, respectively. After this time punch biopsies were taken and cryofixed. Sections of 10 μm were prepared and then analyzed by laser scan fluorescence microscopy for the penetration depths of the blue fluorescence (Cy5) of the particles and red fluorescence (Rhodamine) associated with the peptides. After 1 h the particles were detected in the hair follicles up to a depth of $151.1 \pm 47.1 \mu\text{m}$, the peptide penetrated further to $509.1 \pm 144.2 \mu\text{m}$. After 24 h, an average penetration depth of $259.1 \pm 92.7 \mu\text{m}$ was found for the particles and $631.2 \pm 182.4 \mu\text{m}$ for the peptide (Fig. 4A). The results show that the peptides reach the target region at the infundibulum between 400 and 600 μm (32) already after 1 h. Detection of peptides and particles at different depths in the hair follicles indicated release of the peptide in the follicle presumably triggered by a lower pH compared with the carrier gel into which the particles had been formulated.

The follicles serve as depots for the particle vaccines. Using human calf skin *in situ*, fluorescein-labeled particles were applied and the fluorescence monitored over 10 days

in the follicles and in stratum corneum. Already after one day, the particles at the stratum corneum were nearly gone, likely shed off through contact with the fabric of the cloths. In contrast, in the hair follicles a considerable fraction of the particles prevailed after 10 days still (Fig. 4B). To finally test the delivery of particle-bound antigenic peptides to DCs of the skin we prepared particles with Rhodamine-labeled GILG peptide and applied them to excised human skin of a HLA-A*0201-positive donor. HLA-A*0201 is the specific antigen-presenting MHC-I molecule for GILG. After thoroughly cleansing the skin to remove surface-associated particles and peptide, the skin was minced and dissociated by trypsin digestion. The resulting suspension was filtered and DCs isolated with magnetic beads with anti-CD1c antibodies (Fig. 4C). The isolated DCs were analyzed by confocal laser scanning microscopy for the fluorescence associated with the vaccine peptide. A high proportion of the DCs (77.7%) was found to be positive for the peptide (Fig. 4D) demonstrating an efficient delivery of the peptide to the DCs of the skin.

Conclusions

Taken together, the experiments reported here demonstrate that LBL-coated SiO₂ particles are efficient carriers for the delivery of vaccine antigens into the cross-presentation pathway in human DCs. When the antigen is administered together with TLR agonists as adjuvant, the DCs undergo full maturation and efficiently trigger specific CD8⁺ T cell activation. Application of peptide carrying particles to the skin results in their penetration into hair follicles to a depth controlled by the size of the particles. The particles are retained in the follicle as a depot for several days. Antigenic peptides coupled to the particles are efficiently delivered to DCs of the skin. Microparticles appear to be suitable carriers for topical vaccines for induction of CMI.

Material and methods

Peptides, lipopeptide and peptide-loaded particles

The peptides influenza matrix protein M1₅₈₋₆₆ GILGFVFTL-KKKK (GILG) and CMV pp65₅₉₅₋₆₀₃ NLVPMVATV-KKKK (NLVP) as well as diacyl-lipopeptide Pam2Cys-GDPKHPKSF-KKKK (P2C) were synthesized with C-terminal tetralysine tags. Fully automated solid phase peptide synthesis and Fmoc/tBu chemistry on TCP resin were applied. For coupling of amino acids, a seven-fold molar excess of Fmoc-L-amino acids was used. The peptide resin carrying the sequence GDPKHPKSF-KKKK was elongated with the unusual amino acid Fmoc-Dhc (Dhc: S-2,3-dihydroxy-2-(R,S)-propyl-(R)-cysteine) followed by O-palmitoylation and Fmoc deprotection (33). The coupling was carried out in DMF:CH₂Cl₂ (1:1) with DIC/HOBt in threefold excess within 3 h and was monitored by Kaiser assay. The peptides and the lipopeptide were cleaved off the resin by treatment of the resin with trifluoroacetic acid/phenol/ethanedithiol/thioanisole (96:2:1:1) for 3 h. TFA was removed in vacuum and the products were precipitated from cold diethylether. The precipitate was washed three times with cold diethylether and the pellets were dissolved in tert.butyl alcohol/water 4:1, lyophilized and purified by preparative HPLC. The structural characterisation of the products was carried out by HPLC-ESI-MS. Peptides and lipopeptide were attached to layer-by-layer coated silica beads of 1 µm diameter via negative charges on the outermost polymer layer, as previously described (34).

DC generation and loading

DCs were generated from PBMC using a protocol from Schuler and colleagues (35) with minor modifications. Briefly, PBMC from healthy donors were isolated from buffy coats by Ficoll gradient centrifugation. Cells of the interface were collected and plated in 6 well plates. Monocytes were allowed to adhere. After 2h, non-adherent cells were washed off and the adherent cells cultured for 7 days in RPMI 1640 culture medium (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) with 10% heat-inactivated foetal calf serum (Biochrom, Berlin, Germany). The cells were supplied with the cytokines GM-CSF (50 ng/mL; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) and IL-4 (50ng/mL; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) on days zero and four of the culture. The cultures were kept in a CO₂ incubator in

a humidified atmosphere with 8% CO₂ at 37°C. On day 5, particle-bound peptides as indicated or an inflammatory cytokine cocktail of IL-1 β (10ng/mL), IL-6 (25ng/mL) TNF- α (10ng/mL; all Strathmann Biotech, Hamburg, Germany) were added and the culture continued (Table S1). In some experiments, soluble peptides were used as indicated in the respective figures. Where inhibitors were used, cells were incubated for 2 hours at 37°C with the respective inhibitor prior to addition of particle-bound or soluble peptides. The specific inhibitors used were cytochalasin D at 5 μ M, chloroquine at 50 μ M (both Sigma-Aldrich, Germany), ammonium chloride at 50nM (Merck, Darmstadt, Germany), brefeldin A at 10 μ M (Sigma-Aldrich, Germany). Cells were harvested on day 7 and analyzed by flow cytometry or used for co-cultures with T cell.

The use of human cells for the reported study was reviewed and approved by the institutional ethics committee of the Charité – Universitätsmedizin Berlin (EA1/148/08).

Confocal microscopy for the uptake of particles by DCs

To examine the uptake of the particles by DCs and the intracellular localization of the peptides, cells were transferred to 5mL plastic tubes and fixed in 1% paraformaldehyde solution for 20 min. The cell membrane was stained with FITC-labeled anti- β -microglobulin (BD Pharmingen) for 25 min at 4°C. The intracellular localization of the particles or peptides carried by the particles was analyzed by scanning confocal microscopy (Leica TCS SP2). All images were analyzed and processed using the Leica Confocal Software Version 2.5 Build 1227.

Flow cytometry

To determine DC states and activation, the cell suspensions were labeled with fluorescent monoclonal antibodies against Lin (cocktail of FITC-conjugated antibodies against the molecules CD3, CD14, CD19 and CD56) for exclusion of non-DCs, CD11c, CD80, CD83, CD86 and HLA-DR (BD Bioscience, Chicago, IL, USA) and TLR2 (BioLegend, San Diego, CA, USA). For the detection and quantification of the complexes HLA-A*0201/GILG at the DC surface, the cells were labeled with the purified Fab against such a complex (clone M1D12) (15,36) followed by staining with FITC-labeled secondary polyclonal antibody against human F(ab')₂ (AbCam, Cambridge, UK).

T lymphocytes were labeled with antibody for CD8 and HLA-A*0201/GILG or HLA-A*0201/NLVP tetramers (both Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA). Proliferation of the specific CD8⁺ T cells was determined by flow cytometry after incubation of these cells with the differently treated DC. All stained cells were analyzed with a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, California). The data were processed and displayed using the CellQuest software (Becton Dickinson, San Jose, California) or WinMDi (Purdue University, USA; www.purdue.edu).

ELISA for IL-12p70 and IFN- γ

The supernatants of the DC cultures were collected after 48 h incubation with the indicated stimuli and stored at -20°C . The supernatants of the cocultures of DCs and CD8⁺ T cells were collected after 7 days of culture. IL-12p70 levels from the DC cultures and IFN- γ from the cocultures were measured by ELISA Max Standard kit (BioLegend) in 96-well microtiter plates according to the manufacturer's instructions. Results are expressed as pg/mL.

Cell viability assay

Cell viability was assessed by staining the cells with a commercial kit for discrimination of live and dead cells (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) by flow cytometry. The staining procedures were carried out following the manufacturer's instruction. Briefly, the cell suspension containing DCs was labeled with calcein-AM and ethidium homodimer-1 and the cells then analyzed by flow cytometry. Cells positive for calcein were considered live and those positive for ethidium were considered dead.

CD8⁺ T lymphocytes proliferation assay

Total CD8⁺ T lymphocytes were isolated from peripheral blood by magneto sorting. First, CD8⁺ T cells were isolated from the PBMCs by positive selection using a commercial kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) following the manufacturer's instruction. Then the cells were washed twice in PBS and cultured together with the autologous DCs in 96 wells plates of 1×10^4 DCs with 2×10^5 T lymphocytes for 7 days, then harvested and analyzed by flow cytometry.

Porcine skin samples, particle application and penetration measurement

The porcine ears used in this study were obtained directly from the butcher from freshly slaughtered pigs. Before the experiments were carried out, the porcine ears were rinsed with cold water, dried with paper towels and then the bristles were carefully shortened. The experiments with the animal samples were performed with approval by the Governmental Office of Veterinary Medicine in Berlin-Treptow, Germany.

The application of the particles onto the porcine skin and the penetration measurement were carried out as described previously (32). Briefly, 20 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ of the preparation containing 1% Cy5-labeled particles carrying the Rhodamine-labeled peptide (GILGFVFTL-KKKK) was applied homogeneously onto a defined areas of the porcine ear skin using a massage appliance for 3 min (Massage Gerät PC60, Petra electric, Burgau, Germany). At least 5 porcine ears were used. Following a penetration time of 1 or 24 h, 3 mm punch biopsies were taken. The biopsies were shock-frozen in liquid nitrogen and 10 μm thick cryosections were prepared. The sections were analyzed by laser scanning confocal fluorescence microscopy for the penetration depths of the blue fluorescence (Cy5) associated with the particles and red fluorescence (rhodamine) associated with the peptides. A laser scanning microscope LSM 2000 (Carl Zeiss, Jena, Germany) was used for the analyses. By overlapping the images, the penetration depths of the fluorescent particles and peptides were determined. For statistically sound data, at least 25 hair follicles were investigated.

Investigation of follicular penetration of the particles *in vivo* in the human skin by differential stripping

The follicular penetration of fluorescein-labeled particles was investigated at different time points. Skin samples were taken at 30 min, and 1, 4, 8 and 10 days after topical application of the particles. Five adjacent skin areas of 5 $\times$ 4 cm (A–E) of the calf region of volunteers were marked with a permanent marker. Volunteers had signed an informed consent form approved by the Institutional Ethics Committee of the Medical Faculty of the Charité—Universitätsmedizin Berlin (Germany) and in accordance with the ethical rules stated in the Declaration of Helsinki Principles. The hairs were removed with scissors and the skin was rinsed with water and carefully dried with paper towels.

Subsequently, 20 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ of a hydrogel formulation containing 1% (wt/v) fluorescein-labeled particles was applied onto the marked skin area. Skin sampling was performed from skin area A 30 min after application and from skin area B, C, D and E, respectively 1, 4, 8 and 10 days after application by differential stripping as previously described (37). Differential stripping combines the tape stripping method with the cyanoacrylate skin surface biopsy and affords selective determination of intercellular and follicular penetration *in vivo*. Tape stripping removes the part of the stratum corneum that contained the topically applied dye. First, the stratum corneum was removed layer by layer by tape stripping with an adhesive film (teas No. 5529, Beiersdorf, Hamburg, Germany). Each tape strip was pressed onto the skin with a roller to minimize the influence of skin furrows and wrinkles. The procedure was repeated until no more fluorescein was detectable in the stratum corneum as controlled by laser scanning microscope (LSM 2000, Carl Zeiss, Jena, Germany). Subsequent to the removal of the necessary tape strips, a drop of cyanoacrylate superglue (UHU GmbH, Brühl, Germany) was placed on the stripped skin areas. The glue was covered with a glass slide under slight pressure. After 5 min, the polymerized cyanoacrylate was removed together with the glass slide with one quick movement. These cyanoacrylate skin biopsies contained the content of the hair follicles.

For quantification, the tape strips and the cyanoacrylate skin surface biopsies were dissolved separately in ethanol (Uvasol, Merck, Darmstadt, Germany) in an ultrasonic bath (Sonorex Super RK 102H, Bandelin Electronic, Berlin, Germany). The concentration of fluorescein was determined by fluorescence spectrometry (Luminescent LS 50B, PerkinElmer, Überlingen, Germany). Excitation was at 450 nm and the fluorescence signal measured with a spectral filter covering the wavelength between 520 and 650 nm. The maximum fluorescence signal was detected at 510 nm. The intensity of the fluorescence signal was used as a measure of the concentration of the fluorescent dye. The intensity is given in relative units normalized to the values for the first time point at 30 min.

Human skin samples and topical particle application

Human skin (breast or abdomen) was obtained from healthy volunteers undergoing plastic surgery within 4 to 24 h after surgical excision. Volunteers had signed an informed consent form approved by the Institutional Ethics Committee of the Medical Faculty of the Charité—Universitätsmedizin Berlin (Germany) and in accordance with the ethical rules stated in the Declaration of Helsinki Principles. Skin samples were examined macroscopically and microscopically for tissue damage. Only intact skin explants were used for transcutaneous particle penetration experiments. Skin samples were stretched on expanded polystyrene sheets, previously covered with aluminum foil and laboratory packaging film, and placed in a humidified chamber which consisted of a box provided with wet napkin paper and a cover in order to prevent skin dehydration. A volume of 20 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ containing particles coated with Rhodamine-labeled peptide (GILGFVFTL-KKKK) was applied to the excised human skin and the chamber was placed for 16 h in an incubator at 37°C, 5% CO₂ and 100% humidity. This experimental setup efficiently prevented the evaporation of the particle dispersing phase and drying of the skin. After incubation, adhesive tape stripping was performed five times to remove the particles that had not penetrated. The skin samples were then processed to isolate the Langerhans cells as described below.

Isolation of epidermal Langerhans dendritic cells from the skin explants

Skin samples (16 cm²) were cut into 3 mm² slices and were digested with Dispase (2.4 U/mL Dispase I, Roche, Germany) for 3 h at 37°C to detach the epidermis layers. Trypsin digestion (0.025% trypsin, 1.5 mM CaCl₂ in PBS) of the epidermis was then performed over 15 min to isolate epidermal cells. After filtration, the cells were collected by centrifugation. Subsequently, MACS separation with anti-CD1c antibodies was performed on the isolated epidermal cell according to the manufacturer's instructions (Dendritic Cell Isolation Kit, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). The presence of the peptide (Rhodamine-labeled) at the cell surface was then analyzed by laser scan fluorescence microscopy using a laser scanning microscope LSM 2000 (Carl Zeiss, Jena, Germany).

Statistical Analysis

Results were tested for normality by Kolmogorov–Smirnov tests. Comparisons of the results obtained from the different experimental groups were done by t test. Differences with a $p < 0.05$ were considered significant. All statistical analyses were performed using the Graphpad Software Prism 2.01 for Windows.

Supplementary Materials (List of figures and table)

Supplementary table

Table S1: Test groups of DCs.

Supplementary figures

Fig. S1. Effect of the SiO₂-particles on the viability of DCs.

Fig. S2. Uptake of SiO₂-particles by DCs and intracellular localization of particle-bound peptide and P2C.

Fig. S3. Expression of the complex HLA-A*0201/GILG on T2 cells.

Fig. S4. Inhibition of endosome acidification does not interfere with cross-presentation of the peptide.

Fig. S5. Expression of TLR2 on immature DCs on day five of culture with GMCSF and IL-4.

References

1. A. Egemen, S. Aksit, Z. Kurugol, S. Erensoy, A. Bilgic, M. Akilli, Low-dose intradermal versus intramuscular administration of recombinant hepatitis B vaccine: a comparison of immunogenicity in infants and preschool children. *Vaccine* **16**, 1511–1515 (1998).
2. Mitragotri, S. Immunization without needles. *Nat Rev Immunol* **5**, 905–916 (2005).
3. R.M. Steinman, M.D. Witmer, Lymphoid Dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **75**, 5132-5136 (1978).
4. R.M. Steinman, Dendritic cells: understanding immunogenicity. *Eur J Immunol*. **37**, Suppl 1:S53-60 (2007).
5. F. Sallusto, A. Lanzavecchia, Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor expression. *Immunol. Rev.* **177**, 134-140 (2000).
6. K. Palucka, H. Ueno, J. Fay, J. Banchereau, Dendritic cells and immunity against cancer. *J Intern Med*. **269**, 64-73 (2011).
7. R.L. Gallo, L.V. Hooper, Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine. *Nat Rev Immunol*. **12**, 503-516 (2012).
8. P. Stoitzner, The Langerhans cell controversy: are they immunostimulatory or immunoregulatory cells of the skin immune system? *Immunol Cell Biol*. **88**, 348-350 (2010).
9. J. Seneschal, R.A. Clark, A. Gehad, C.M. Baecher-Allan, T.S. Kupper, Human epidermal Langerhans cells maintain immune homeostasis in skin by activating skin resident regulatory T cells. *Immunity*. **36**, 873-884 (2012).
10. J. Lademann, F. Knorr, H. Richter, U. Blume-Peytavi, A. Vogt, C. Antoniou, W. Sterry, A. Patzelt, Hair follicles--an efficient storage and penetration pathway for topically applied substances. Summary of recent results obtained at the Center of Experimental and Applied Cutaneous Physiology, Charité -Universitätsmedizin Berlin, Germany. *Skin Pharmacol Physiol*. **21**, 150-155 (2008).

-
11. A. Patzelt, H. Richter, F. Knorr, U. Schäfer, C.M. Lehr, L. Dähne, W. Sterry, J. Lademann, Selective follicular targeting by modification of the particle sizes. *J Control Release*. **150**, 45-48 (2011).
 12. A.S. Breathnach, The distribution of Langerhans cells within the human hair follicle and some observations on its staining properties with gold chloride. *J Anat.* **97**, 73–80 (1963).
 13. A.C. Gilliam, I.B. Kremer, Y. Yoshida, S.R. Stevens, E. Tootell, M.B. Teunissen, C. Hammerberg, K.D. Cooper, The human hair follicle: a reservoir of CD40+ B7-deficient Langerhans cells that repopulate epidermis after UVB exposure. *J Invest Dermatol.* **110**, 422-427 (1998).
 14. C.S. Peyratout, L. Dähne, Tailor-Made Polyelectrolyte Mirocapsules: From Multilayers to Smart Containers. *Angew. Chem.* **43**, 3762-3783 (2004).
 15. J.Y. Kang, X. Nan, M.S. Jin, S.J. Youn, Y.H. Ryu, S. Mah, S.H. Han, H. Lee, S.G. Paik, J.O. Lee, Recognition of lipopeptide patterns by Toll-like receptor 2-Toll-like receptor 6 heterodimer. *Immunity* **18**, 873-884 (2009).
 16. D. Zehn, C.J. Cohen, Y. Reiter, P. Walden, Extended presentation of specific MHC-peptide complexes by mature dendritic cells compared to other types of antigen-presenting cells. *Eur J Immunol.* **34**, 1551-1560 (2004).
 17. D. Zehn, C.J. Cohen, Y. Reiter, P. Walden, Efficiency of peptide presentation by dendritic cells compared with other cell types: implications for cross-priming. *Int Immunol.* **18**, 1647-1654 (2006).
 18. Dahan, R., & Reiter, Y. T-cell-receptor-like antibodies - generation, function and applications. *Expert Rev Mol Med.* **14** (2012).
 19. E. Klechevsky, R. Morita, M. Liu, Y. Cao, S. Coquery, L. Thompson-Snipes, F. Briere, D. Chaussabel, G. Zurawski, A.K. Palucka, Y. Reiter, J. Banchereau, H. Ueno, Functional specializations of human epidermal Langerhans cells and CD14+ dermal dendritic cells. *Immunity.* **29**, 497-510 (2008).
 20. T. Luft, M. Rizkalla, T.Y. Tai, Q. Chen, R.I. MacFarlan, I.D. Davis, E. Maraskovsky, J. Cebon, Exogenous peptides presented by transporter associated with antigen processing (TAP)-deficient and TAP-competent cells: intracellular loading and kinetics of presentation. *J. Immunol.* **167**, 2529–2537 (2001).

-
21. M.S. Labeur, B. Roters, B. Pers, A. Mehling, T.A. Luger, T. Schwarz, S. Grabbe, Generation of tumor immunity by bone marrow-derived dendritic cells correlates with dendritic cell maturation stage. *J. Immunol.* **162**, 168–175 (1999).
 22. M. Salio, D. Shepherd, P.R. Dunbar, M. Palmowski, K. Murphy, L. Wu, V. Cerundolo, Mature dendritic cells prime functionally superior melan-A-specific CD8+ lymphocytes as compared with nonprofessional APC. *J. Immunol.* **167**, 1188–1197 (2001).
 23. J.M. Blander, R. Medzhitov, Toll-dependent selection of microbial antigens for presentation by dendritic cells. *Nature.* **440**, 808–812 (2006).
 24. J.W. Yewdell, C.C. Norbury, J.R. Bennink, Mechanisms of exogenous antigen presentation by MHC class I molecules in vitro and in vivo: implications for generating CD8_ T cell responses to infectious agents, tumors, transplants, and vaccines. *Adv Immunol.* **73**, 1–77 (1999).
 25. C.C. Norbury, L.J. Hewlett, A.R. Prescott, N. Shastri, C. Watts, Class I MHC presentation of exogenous soluble antigen via macropinocytosis in bone marrow macrophages. *Immunity.* **3**, 783–791 (1995).
 26. M. Kovacsics-Bankowski, K.L. Rock, A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science.* **267**, 243–246 (1995).
 27. C. Reis e Sousa, R.N. Germain, Major histocompatibility complex class I presentation of peptides derived from soluble exogenous antigen by a subset of cells engaged in phagocytosis. *J Exp Med.* **182**, 841–851 (1995).
 28. M. Li, G.M. Davey, R.M. Sutherland, Cell-associated ovalbumin is cross-presented much more efficiently than soluble ovalbumin in vivo. *J Immunol.* **166**, 6099–6103 (2001).
 29. C.C. Norbury, (2000) (Solheim, J.C., Ed.), *Methods in Molecular Biology: Antigen Processing and Presentation Protocols*, vol. 156, pp. 1–16, Humana Press Inc., Totowa, NJ.
 30. S. Burgdorf, C. Schölz, A. Kautz, R. Tampé, C. Kurts, Spatial and mechanistic separation of cross-presentation and endogenous antigen presentation. *Nat Immunol.* **9**, 558–566 (2008).

-
31. J.K. Tan, H.C. O'Neill, Maturation requirements for dendritic cells in T cell stimulation leading to tolerance versus immunity. *J Leukoc Biol.* **78**, 319-324 (2005).
 32. A. Vogt, S. Hadam, M. Heiderhoff, H. Audring, J. Lademann, W. Sterry, U. Blume-Peytavi, Morphometry of human terminal and vellus hair follicles. *Exp Dermatol.* **16**, 946-950 (2007).
 33. J.W. Metzger, K.H. Wiesmüller, G. Jung, Synthesis of N alpha-Fmoc protected derivatives of S-(2,3-dihydroxypropyl)-cysteine and their application in peptide synthesis. *Int J Pept Protein Res.* **38**, 545-554 (1991).
 34. C.S. Peyratout, L. Dähne, Tailor-made polyelectrolyte microcapsules: from multilayers to smart containers. *Angew Chem Int Ed Engl.* **43**, 3762-3783 (2004).
 35. G. Schuler, D. Brang, N. Romani, N. Production and properties of large numbers of dendritic cells from human blood. *Adv. Exp. Med. Biol.* **378**, 43-52 (1995).
 36. W.E. Biddison, R.V. Turner, S.J. Gagnon, A. Lev, C.J. Cohen, Y. Reiter, Tax and M1 peptide/HLA-A2-specific Fabs and T cell receptors recognize nonidentical structural features on peptide/HLA-A2 complexes. *J Immunol.* **171**, 3064-3074 (2003).
 37. A. Teichmann, U. Jacobi, M. Ossadnik, H. Richter, S. Koch, W. Sterry, J. Lademann, Differential stripping: determination of the amount of topically applied substances penetrated into the hair follicles. *J Invest Dermatol.* **125**, 264-269 (2005).

Acknowledgements

This study was supported by grants from the Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF, German Ministry for Education and Research) WING Programme for Nanobiotechnology Grants 13N9196 and 13N9197, Coordenação de aprimoramento de pessoal de nível superior (Capes), Deutscher Akademischer Austausch Dienst (DAAD), and the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). KHW is CEO of the company EMC microcollection GmbH, LD of the company Surflay Nanotec GmbH.

Fig. 1. Principle of conjugation of the peptides/lipopeptide to SiO₂ particles. (A) The particles are coated with an LbL-film with a negative surface charge at pH 7.5 that binds the peptides and lipopeptides with positively charge tetralysine tags. At pH 5.5 the surface charge changes to positive leading to an almost complete release of the peptides from the particle surface. (B) Uptake at pH 8 and release at pH 5 of GILG and P2C as single components peptides (red, green) or in peptide mixture (blue, light blue). (C) Confocal laser Scanning image of the GILG-Rho adsorbed to the 1 μm LbL-particles at pH 8 (left fluorescence image, right transmission image). (D) Release of the adsorbed peptides from the LbL surface by pH shift from 8 to 5. (E) Desorption of the peptide and lipopeptide from the particle surface in dependence on the pH value.

Fig. 2. Conjugation of peptide GILG to SiO₂ particles resulted in efficient cross-presentation of the GILG antigen. (A) Confocal images of DCs loaded with particle carrying GILG (green particles and red peptide) and P2C (blue particles). The cell surface was stained with FITC-labeled anti-MHC-I antibodies. The confocal analysis shows that internalized GILG was inside the cells in both particle-bound and in free form in intracellular compartments of the DCs. Images were originally obtained at 1000x total magnification and electronically zoomed. Flow-cytometric analysis showing cross-presentation of particle-bound GILG by DCs (**B** and **C**). The cross presentation of the particle-bound GILG was blocked by treatment with cytochalasin D (**D**) and Brefeldin A (**F**), and slightly increased by choroquine (**E**) treatment. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Fig. 3. Particle-bound P2C induced maturation of DCs and increased the efficiency of T cell stimulation. Particles carrying P2C induced up-regulation of CD80 (A), CD83 (B), CD86 (C) expression and higher levels of IL-12 secretion (D) by DCs compared to DCs incubated with particles without P2C. Flow cytometry profiles showing that DCs exposed to particle-bound P2C were more efficient in inducing GILG (E) and NLVP (F) specific CD8⁺ T cells than DCs exposed to particles without P2C. The activated T cells also produce high amounts of the immune regulating and effector cytokine IFN- γ (G).

Fig. 4. Penetration of the particles into hair follicle. (A) After application of Cy5-labeled particles coated with Rhodamine-labeled peptides to porcine skin the fluorescence associated with the particles (left panel) and with the peptides (right panel) was detected by confocal laser scanning microscopy. The penetration depths are indicated with arrows. (B) Fluorescein-labeled particles were applied to human calf skin and the fluorescence measured at the indicated time points. The values were normalized to the fluorescence determined after 30min as starting value. (C) Illustration of the distribution of dendritic cells in the skin and hair follicles of human skin and of the experiments to determine delivery to cutaneous dendritic cells of antigenic peptides administered on particles. (D) After applying particles carrying Rhodamine-labeled peptides to excised human skin, the skin was dissociated and the dendritic cells isolated by magnetic bead separation. The isolated cells were then analyzed for the fluorescence associated with the peptides by confocal laser scanning microscopy. Left panel: bright field image of isolated cells. Right panel: fluorescence detection on the cells.

Topical vaccination with functionalized particles targeting dendritic cells

R. B. Baleeiro, K.-H. Wiesmüller, Y. Reiter, B. Baude, L. Dähne, A. Patzelt, J.

Lademann, J. A. Barbuto and P. Walden

Supplementary Materials

Table S1: Test groups of DCs

Group	Treatment
Untreated (control)	Adherent PBMCs cultured for 7 days with only GM-CSF and IL-4
(GILG)	Treated on day 5 with particles containing GILG
(NLVP)	Treated on day 5 with particles containing NLVP
(P2C)	Treated on day 5 with particles containing P2C
(GILG) + (P2C)	Treated on day 5 with particles containing GILG and particles containing P2C
(NLVP) + P2C)	Treated on day 5 with particles containing NLVP and particles containing P2C
(GILG-P2C)	Treated on day 5 with particles containing GILG and P2C
(NLVP-P2C)	Treated on day 5 with particles containing NLVP and P2C
IL-1- β , IL-6 and TNF- α	Treated on day 5 with IL-1- β , IL-6 and TNF- α

Supplementary figures

Figure S1. Effect of the SiO₂-particles on the viability of DCs. The viability of the DCs was assessed after 48h incubation with the particles. DCs were stained with the nonfluorescent cell-permeant calcein-AM which is metabolized in the cytoplasm of live cells into the highly green fluorescent calcein (ex/em ~495 nm/~515 nm), and Ethidium homodimer-1 which only enters cells with disrupted cell membranes. When Ethidium homodimer-1 binds to nucleic acids in damaged cells it becomes highly red fluorescent (ex/em ~495 nm/~635 nm). After staining, the DCs were analyzed by flow cytometry.

Figure S2. Uptake of SiO₂-particles by DCs and intracellular localization of particle-bound peptide and P2C. Immature DCs were incubated overnight with SiO₂-particles carrying the peptide GILG (a), GILG and P2C (b) or P2C (c). The peptide (a and b) and P2C (c) (red) can be seen on the particles and in vesicular structures within the cells (a-c). The particles shown in a and b are fluorescein-labeled (green) and Cy5-labeled in c (blue). The cell membrane was stained with FITC-labeled anti- β -microglobulin. The images are representative of at least three independent experiments. Images were originally obtained at 1000x total magnification and electronically zoomed.

Figure S3. Expression of the complex HLA-A*0201/GILG on T2 cells. T2 cells were pulsed with the peptide NLVP, GILG or left untreated. Then, the cells were labeled with the antibody with specificity for the complex HLA-A*0201/GILG and a fluorescent secondary antibody, and analyzed by flow cytometry. The cells pulsed with NLVP (blue line) display fluorescence intensity similar to the untreated cells (red-filled), whereas the cells pulsed with GILG display higher fluorescence (black line), which proves its specificity for the complex HLA-A*0201/GILG.

Figure S4. Inhibition of endosome acidification does not interfere with cross-presentation of the peptide. Two hours prior to the loading with the particle-bound or soluble GILG the DCs were treated with ammonium chloride. Afterwards, they were loaded with soluble or particle-bound GILG and cultured for 24h. Then, the cells were collected and stained with the anti-HLA-A*0201/GILG and secondary antibody. The treatment of DCs with ammonium chloride did not reduce the presentation of the peptide on their surfaces.

Figure S5. Expression of TLR2 on immature DCs on day five of culture with GMCSF and IL-4. On day five of culture, the immature DCs were collected and stained with anti-TLR2 and analyzed by flow cytometry. The labeled DCs (thick line) display a higher fluorescence intensity compared with the unlabeled DCs (gray-filled).

APÊNDICE B – Manuscrito submetido à publicação**Direct activation of human dendritic cells via MHC class II molecules**

Renato B. Baleeiro^{*†}, Karl H. Wiesmüller^{#+}, Lars Dähne[‡], Jürgen Lademann^{*}, José A.

Barbuto[†] and Peter Walden^{*§}

** Charité – Universitätsmedizin Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin and Freie*

Universität Berlin, Department of Dermatology, Venerology and Allergology

† Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo

Eberhard-Karls-Universität Tübingen, + EMC microcollections GmbH, Tübingen

‡ Surflay Nanotec GmbH, Berlin

Running title: DC activation via MHC-II molecules

Keywords: Dendritic cells, Pan-DR epitope, adjuvants, cellular immunity

§ Corresponding author: Peter Walden, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Dept. of Dermatology, Venerology and Allergology, Charitéplatz 1, 10117 Berlin, Germany; Tel.: +49-30-450 518 031; Fax: +49-30-450 518 932; e-mail: peter.walden@charite.de

Grant support: This study was supported by grants from the Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF, German Ministry for Education and Research) WING Programme for Nanobiotechnology Grants 13N9196 and 13N9197, Coordenação de aprimoramento de pessoal de nível superior (Capes), Deutscher Akademischer Austausch Dienst (DAAD), and the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). KHW is CEO of the company EMC microcollection GmbH, LD of the company Surflay Nanotec GmbH.

Abstract

Dendritic cells (DCs) are key activators of cellular immune responses through their capacity to induce naïve T cells and sustained effector T cell responses. This capacity is a function of their superior efficiency of antigen presentation via MHC class I and class II molecules, and the expression of co-stimulatory cell surface molecules and cytokines. Maturation of DCs is induced by microbial factors via pattern recognition receptors such as Toll-like receptors, pro-inflammatory cytokines or cognate interaction with CD4⁺ T cells. Here we show that, unexpectedly, the PanDR helper T cell epitope PADRE, a generic T helper cell antigen presented by a large fraction of HLA-DR alleles, when present in particle-bound form can induce maturation of human DCs to become efficient inducers of proliferation and differentiation of naïve CD4 T cells. The maturation of DCs induced by particle-bound PADRE involves sphingosine kinase, calcium signaling from internal sources and downstream signaling through the MAP kinase and the p72syk pathways, and finally activation of transcription factors like NF-κB resulting in full maturation of DCs.

Introduction

Dendritic cells (DCs) are the most efficient and most important antigen presenting cells (APCs) for T cell priming and induction of adaptive immune responses (1). They reside in peripheral tissues in an immature state and sample their microenvironment by taking up and processing antigens (2). Exposure of DCs to inflammatory mediators such as TNF- α , IL-1- β and IL-6 or microbial agents such as TLR agonists induces their maturation with phenotypical and functional changes. The DC activation marker CD83 (3, 4) and receptors for chemokines from secondary lymphoid organs such as CCR7 (5) are expressed and the co-stimulatory molecules CD40, CD80 and CD86 are up-regulated (6). In addition, fully mature DCs produce pro-inflammatory cytokines, in particular interleukin (IL)-12, which play critical roles in the induction of efficient CD4⁺ T helper cell (Th) and sustained effector CD8⁺ T cell immune responses characterized by high interferon (IFN)- γ production and cytotoxicity (7). These changes enable DCs to induce effective adaptive immune responses. Because of their unique capacities as antigen-presenting cells, DCs are widely used in cancer immunotherapy and loaded with tumor-associated antigens as cellular vaccines (8,9). The antigens administered hereby are often synthetic peptides such as epitopes for CD8⁺ effector T cells. To render such peptides immunogenic and enhance the potency of the vaccines, CD4⁺ T cell help is believed to be important in the initiation of CD8⁺ effector T cell responses and for establishing T cell memory (10). In addition to specific MHC class II epitopes, recall antigens and Pan HLA-DR epitopes (PADREs) have been explored as helper T cell antigens. PADREs are designed to bind to many different HLA-DR and thereby to help overcoming the problem of identifying helper antigens that match the HLA class II of a particular patient (11). PADREs have been used together with different vaccine antigens for induction of cytotoxic effector T cells in preclinical models (11-13) as well as in clinical trials (14, 15). To ensure effective induction of DC maturation, combinations of antigens for coordinated induction of helper and effector T cell responses are often given together with TLR agonists or pro-inflammatory cytokines as drivers of functional differentiation of DC and induction of co-stimulatory cytokines and cell surface receptors. Moreover, the design of vaccines for effective induction of T cell-mediated immunity

requires, in addition to the before-mentioned, carrier systems for transport of the essential vaccine constituents to and their timely release at dendritic cells. To this avail we investigated the effects of different essential vaccine constituents on the induction of prophylactic and therapeutic T cell-based immune responses. Unexpectedly, particle-bound in contrast to soluble PADRE was discovered to induce phenotypic and functional differentiation of immature into fully mature DCs with strong T cell-stimulatory capacity.

Materials and Methods

Peptides, lipopeptides and peptide-loaded particles

The peptides aK-(L-Cha)-VAAWTLKAAa-Aca-C (PADRE), influenza matrix protein M1₅₈₋₆₆ GILGFVFTL (GILG) and CMV pp65₅₉₅₋₆₀₃ NLVPMVATV (NLVP) as well as di-acyl-lipopeptide Pam₂Cys-GDPKHPKSF (P2C) were synthesized with C-terminal tetralysine tags and attached to layer-by-layer coated silica beads (16) of 1 μ m diameter via negative charges on the outermost polymer layer.

DC generation and stimulation

DCs were produced from PBMC using a protocol modified from (17). In brief, PBMC from healthy donors were isolated from buffy coats by Ficoll gradient centrifugation. Cells of the interface were collected and plated in 6 well plates. Monocytes were allowed to adhere. After 2h, non-adherent cells were washed off and the adherent cells were cultured for 7 days, in serum free AIM-V culture medium (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) with GM-CSF (50 ng/mL, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) and IL-4 (50ng/mL, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). In some experiments, prior to adherence, the PBMCs were depleted of T cells by magnetodepletion of CD3⁺ cells (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany), following the manufacturer's instruction. The cultures were kept in a CO₂ incubator in a humidized atmosphere with 8% CO₂ at 37°C. On day 5 of culture, empty particles, particles loaded with peptides as indicated or free peptides, LPS (1 μ g/mL; Sigma-Aldrich, Germany), ionomycin (1 μ g/mL; Sigma-Aldrich, Germany) or an inflammatory cytokine cocktail of IL-1 β (10ng/mL), IL-6 (25ng/mL) TNF- α (10ng/mL; all Strathmann Biotech, Hamburg, Germany) were added and the culture continued. Where inhibitors were used, cells were incubated for 2 hours at 37°C with the respective inhibitor prior to the addition of the maturation stimulus. The specific inhibitors used were SB203580 for p38 MAPK at 20 μ M, triptolide for NF- κ B at 100nM, LY294002 for PI3K at 10 μ M (all Invivogen, San Diego, Ca, USA), Piceatannol for p72Syk at 25 μ M and CK59 for CaMKII at 50 μ M (all Calbiochem, Darmstadt, Germany), BAPTA-AM (membrane-permeating calcium chelator) at 10 μ M, D609 for

PLC at 100 μ M, SKI-II for SK at 10 μ M (all Sigma-Aldrich, Germany) and cyclosporine A for calcineurin (Fluka Chemie GmbH, Steinheim, Germany) at 2 μ M.

Cells were harvested on day 7 and analyzed by flow cytometry or used for co-cultures with T cell.

CD4⁺ T lymphocytes assays

Naïve and total CD4⁺ T lymphocytes were isolated from peripheral blood by magnetosorting. First, CD4⁺ T cells were isolated from the PBMCs by negative selection using a commercial kit (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany) following the manufacturer's instruction. In some experiments the memory/effector population was removed by negative selection of the CD45RO⁺ population with PE-labeled monoclonal antibody against the CD45RO (BD Bioscience, Chicago) and magnetic beads with antibodies to PE (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany). The untouched CD45RA⁺ naïve T lymphocytes were labeled with 10 μ M CFSE (18) in PBS with 0.1% BSA for 10 min at 37°C followed by 5 min at 4°C. Then the cells were washed twice in PBS and cultured together with the autologous DCs in 96 wells plates of 1x10⁴ DCs with 2x10⁵ T lymphocytes for 5 or 7 days, then harvested and analyzed by flow cytometry.

Flow cytometry

To determine DC states and activation, the cell suspensions were labeled with fluorescent monoclonal antibodies against Lin (cocktail of FITC-conjugated antibodies against the molecules CD3, CD14, CD19 and CD56) for exclusion of non-DCs, CD11c, CD40, CD80, CD83, CD86 and HLA-DR (Caltag Laboratories, Burlingame, California or BD Bioscience, Chicago). T lymphocytes were labeled with antibodies for CD4, CD25 and CD71 or CD4, CD45RA and CD45RO. Proliferation of the CD4⁺ T cells was determined by flow cytometry after labeling of the cells with CFSE and co-culture with the differently treated DC. All stained cells were analyzed with a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, California). The data were processed and displayed using the CellQuest software (Becton Dickinson, San Jose, California) or WinMDi (Purdue University, USA; www.purdue.edu).

Measurement of intracellular Ca^{2+}

Intracellular Ca^{2+} was measured as described (19) with some modifications. Briefly, DCs were loaded with 5 μM Fluo-3/AM (Calbiochem, Darmstadt, Germany) by incubation at 37°C for 30 min under shaking and protection from light. The Fluo-3/AM-loaded DCs were centrifuged and washed two times. Then the cells were suspended in culture medium with or without EDTA (10mM) and incubated protected from light with empty particles, particle-bound PADRE, particle-bound P2C, soluble LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or ionomycin (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 10 min at 37°C and analyzed by flow cytometry for Ca^{2+} -dependent fluorescence.

ELISA for IL-12p70

The supernatants of the DC cultures were collected after 48 h incubation with the indicated stimuli and stored at -20°C. IL-12p70 levels were measured by ELISA Max Standard kit (BioLegend) in 96-well microtiter plates according to the manufacturer's instructions. Results are expressed as pg/mL.

Statistical Analysis

Results were tested for normality by Kolmogorov–Smirnov test. Comparisons of the results obtained from the different experimental groups were done by ANOVA. Differences with a $p < 0.05$ were considered significant. All statistical analyses were performed using the Graphpad Software Prism 2.01 for Windows.

Ethics clearance

The use of human cells for the reported study was reviewed and approved by the institutional ethics committee of the Charité – Universitätsmedizin Berlin (EA1/148/08).

Results

Particle-bound but not soluble PADRE induces DC maturation

In studies aimed at the development of delivery systems that target vaccine antigens efficiently to dendritic cells we tested particles that were surface-coated with CD8 T cell epitopes of viral antigens, the helper T cell epitope PADRE or the dipalmitoyl lipopeptide P2C as TLR agonist and immunostimulator on immature dendritic cells (iDCs) generated from plastic-adherent human peripheral blood monocytes by incubation in medium with IL-4 and GM-CSF. Unexpectedly, particles with PADRE alone efficiently induced maturation of iDC as evidenced by the expression or up-regulation of the DC activation marker CD83, the co-stimulatory receptors CD80 and CD86, and MHC class II (Figure 1). This effect was dependent on PADRE bound to particles; the free soluble peptide was inactive. Activation of iDC was not caused by the particles themselves as neither particles without peptides nor particles coated with other peptides such as the influenza matrix protein epitope GILGFVFTL or the CMV pp65 epitope NLVPMVATV had any effect (Figure 2). The latter two peptides are MCH class I, specifically HLA-A*0201-restricted T cell epitopes. No activation of DCs by particles bearing these peptides was seen in experiments with iDCs prepared from 20 different HLA-A*0201-positive donors. The DC-stimulating effect of particle-bound PADRE thus seems to be mediated through MHC class II, not MHC class I. The magnitudes of the DC responses were comparable to the effects of the potent immunostimulatory TLR agonist P2C (Figure 2) or a cocktail of the pro-inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6 and TNF- α (Figure 1). PADRE appears to trigger a maximal cellular response of the DC as the addition of P2C either together with PADRE on the same particles or on separate particles did not further enhance the expression of activation and co-stimulatory markers by the DC. Rather, it seems that the combination of PADRE and the TLR agonist reduces the effect of either one of these factors. Figures 1 and 2 summarize experiments done with cells from 5 and 6 independent donors, respectively, that all produced comparable results.

To exclude that T cells contaminating the iDC preparations would cause activation of the DC through cognate interaction with CD4⁺ T cells we eliminated T cells from the DC cultures prior to addition of the particles. As shown in Supplementary Figure 1, the

elimination of T cells had no effect on the DC-stimulatory capacity of PADRE-loaded particles. Also the DC activation marker and co-stimulatory molecule CD40, which normally is induced upon cognate interaction of iDC with CD4⁺ T cells and which via CD40-CD40L interaction leads to mutual activation of the interacting cells (20), is induced to comparable levels disregard of whether or not T cell had been eliminated prior to addition of the particles. These results were reproduced with cells from 4 independent donors in independent experiments.

DCs matured through interaction with particle-bound PADRE stimulates naïve T cell

DCs stimulated with PADRE-loaded particles appeared to be functionally fully matured. Incubation of CD45RA⁺ naïve CD4⁺ T cells, prepared by removing the CD45RO-positive cells from CD3⁺ T cell preparations with anti-CD45RO magnetic beads, with PADRE particle-induced DCs differentiated into CD45RA⁻, CD45RO⁺ effector/memory CD4⁺ T cells and proliferated vigorously as determined by flow cytometry by the dilution of the fluorescent dye CFSE upon successive cell divisions (Figure 3). These results were reproduced in 5 independent experiments with cells from different donors and are summarized in Supplementary Figure 2. The experiments were done with iDCs rigorously depleted of T cells before particles were added. As seen before with the expression of activation and differentiation markers, the capacity of the DCs to induce T cell proliferation was not influenced by the presence of T cells during the maturation of the DCs nor was the induction of the T cell activation markers CD25, the high-affinity IL-2 receptor, and of CD71, the transferrin receptor (Supplementary Figure 3). In these experiments unfractionated T cells had been incubated with DC matured with particle-coupled PADRE with and without prior T cell depletion.

Maturation of DCs induced by particle-bound PADRE involves intracellular calcium signaling

To elucidate the cellular mechanisms involved in the induction of DC maturation by particle-bound PADRE, we analyzed the mobilization of intracellular calcium using Fluo-3 as fluorescent calcium indicator. Particle-bound PADRE induces an increase of

intracellular calcium which is not seen in the DCs exposed to empty particles (Figure 4a). The calcium appears to come from intracellular stores as depletion of extracellular calcium in the culture medium with EDTA does not affect the intracellular increase nor the activation of the DC (Figure 4a). Blockade of intracellular calcium using the BAPT-AM, a membrane-permeable selective chelator of intracellular Ca^{2+} , completely abrogates the maturation of the DCs (Figure 4b-c), as evident from the unaltered low levels of the costimulatory molecules CD80 and CD86, the DC activation marker CD83, MHC class II HLA-DR and complete absence of IL-12p70 secretion.

Sphingosine kinase but not PLC mediates maturation of DCs

Phospholipase C (PLC) cleaves phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate into inositol triphosphate (IP3) and diacylglycerol (DAG). IP3 binds to its receptor on the endoplasmic reticulum triggering the release of calcium from these intracellular stores. PLC acts upstream of calcium release in signal transduction pathways. To determine whether signaling through PLC plays a role in the activation of DCs induced by particle-bound PADRE, we incubated day-5 iDCs with particle-bound PADRE, P2C and ionomycin with or without a prior 2h incubation with the PLC inhibitor D609 at 100 μM . Two days later, the cells were harvested and analyzed by flow cytometry. There was no effect of the inhibitor on any of the maturation markers for DCs indicating that PLC has no role in DC activation by particle-bound PADRE (Figure 5a). Sphingosine 1-phosphate (S1P) has been shown to trigger the release of calcium from intracellular stores independent of IP3. S1P is derived from sphingosine through the phosphorylation of sphingosine by sphingosine kinase (SK). We blocked SK by incubating iDCs for 2 hours with the specific inhibitor SKI-II and then stimulated them with particle-bound PADRE, P2C or ionomycin. Interestingly, the cells treated with the SKI-II did not respond to any of the stimuli pointing at a SK-dependent pathway of DC activation (Figure 5b).

Maturation of DCs induced by particle-bound PADRE involves calmodulin but not calcineurin

Given the essential role of cytosolic Ca^{2+} for DC activation by particle-bound PADRE, we investigated the involvement of the two mediators of Ca^{2+} signalling calcineurin and

calmodulin. Inhibition of calcineurin with cyclosporin A had no effect on DCs activation by particle-bound PADRE (Figure 6); there was still upregulation of CD83 and CD86 in the presence of cyclosporin A as it was the case in DCs stimulated with P2C-bearing particles but not in DC incubated with the Ca^{2+} ionophore ionomycin. Also the induction of IL-12p70 was unaltered. On the other hand, inhibition of the calmodulin pathway with CK59, an inhibitor of the calmodulin-dependent kinases CamKII largely abrogated the induction of CD83 and significantly reduced the up-regulation of CD80, CD86 and HLA-DR by particle-bound PADRE (Figure 7). Partial inhibition of ionomycin-mediated induction of CD83 was seen; otherwise little to no effect was observed when DCs were incubated with ionomycin or particle-bound P2C in the presence of CK59 suggesting that different Ca^{2+} -dependent pathways are involved in DC activation by the three stimulators tested. Thus, induction of DC maturation by particle-bound PADRE appears to involve calmodulin whereas calcineurin seems to play a major role in the activation of DC by ionomycin. The TLR 2/6 agonist P2C acts through again a different mechanism.

Kinase signaling in DC activation by particle-bound PADRE

The kinases p72Syk, PI3K and p38 MAPK have been described to play a significant role in DC maturation induced by different stimuli (21, 22) and the pathway they are involved in are interlinked with calcium signaling (23-25). DC activation by particle-bound PADRE is affected by the inhibitors piceatannol and SB203580 that specifically block p72Syk and p38 MAPK, respectively, whereas the PI3K inhibitor LY294002 had little to no effect on the expression of the activation markers and co-stimulatory molecules, and the secretion of IL-12 by the DCs (Supplementary Figure 4). The pattern of inhibition is similar to the effects of these factors on DC stimulation by the TLR 2/6 agonist P2C but different from LPS stimulation. Expectedly, blockade of the downstream transcription factor NF- κ B with triptolide, an inhibitor of I κ B degradation, had significant effects on the activation of the DC related to the activation markers and co-stimulatory molecules but not to the same extent on IL-12 secretion.

Discussion

The results of the investigations described herein demonstrate that the MHC class II-binding pan-DR epitope PADRE, when administered in particle-bound form, acts directly on iDCs to induce their phenotypic and functional differentiation into mature DC with potent T cell-stimulating capacity. Different than DC activation by cognate antigen-dependent interaction with T cells, this effect was T cell-independent. The receptor for PADRE is HLA-DR (11). Although MHC class II molecules are not known to have direct signal transduction capabilities, some antibodies with specificities for these molecules can activate MHC class II-expressing cells when cross-linking the molecules (26). Also the MHC-II-ligand LAG-3, expressed on the surface of activated T cells was shown to induce DCs maturation (22). The finding that DC activation by PADRE requires its coupling to particles could point into the same direction, that is, particle-bound PADRE may crosslink HLA-DR and thereby induces signaling into the cells with subsequent activation and maturation of immature to fully mature DCs. This signal is, as the experiments presented with this report show, similar in strength and effect on the DCs as signals induced by the known strong immune stimulator P2C, a TLR 2/6 agonist, or a cocktail of proinflammatory cytokines selected for their maximal effects on DCs.

Maturation of DCs involves a number of different signaling molecules and pathways (21, 27). Triggering of DCs by various different ligands was shown to lead to a rise of intracellular calcium (27) pointing to a key role of calcium-modulated signaling pathways in the maturation process. Several different stimuli lead to increase of intracellular calcium in DCs (27), and calcium ionophores induce DCs maturation. Also exposure of DC to particle-bound PADRE induced a raise in the intracellular calcium. This calcium was released from intracellular sources which, however, is not mediated through IP3 as in most other investigated situations, but through sphingosin phosphate. Sphingosin kinase, the enzyme that phosphorylates sphingosin, has been linked to signal transduction from MHC class II molecules. It is prominently expressed in DCs (28) which makes its involvement also in transduction of signals from other stimuli possible.

Calcium exerts its effects by binding to and modulating the function or activity of a variety of different proteins, some enzymes, some themselves modulators of the activity of other proteins (29). Calcineurin (27, 29) and calmodulin (29, 30) are the most

prominent mediators of calcium signaling. Calcineurin has been implicated in the activation of DCs, among others through activation of the transcription factor NFAT (29). However, it played no role in the activation and maturation of DCs triggered by particle-bound PADRE. In contrast to calcineurin, calmodulin was shown to be involved in the activation of DCs by particle-bound PADRE, which is in agreement with recent reports of its involvement in DC maturation induced through other stimuli (31). One of the target molecules of calcium-activated calmodulin is the calmodulin-dependent kinases II (CamKII). CamKII activation has been related to the activation of p38 MAPK (32) and NF- κ B (33) which both have been shown to play important roles in DC maturation (21, 22). In agreement with that, we show here that the inhibition of CamKII, p38 MAPK and NF- κ B blocked the activation of DCs by particle-bound PADRE.

Based on the results of the experiments reported herein, we propose the following model for the mechanism of DC activation by particle-bound PADRE. Particles with bound PADRE may crosslink HLA-DR at the surface of immature DCs, which triggers activation of the sphingosin kinase. The product of sphingosin kinase, phosphosphingosin, mediates calcium release from intracellular sources which binds to and activates calmodulin, and via CamKII activates both the MAPK and the p72syk signaling pathways which ultimately leads to activation of NF- κ B and maybe other transcription factors and as result to activation of the DCs. The need to address both the p72syk and the MAPK signaling pathways for full activation and maturation of DCs has been suggested before and is confirmed with the present report.

The finding of DC activation through particle-bound particle reveals interesting new facets of MHC class II and its molecular cell biology and may have practical implications for the design of immune stimulators and vaccines. Particle-bound PADRE could be used as a new class of immunological adjuvants mediating T cell-dependent immune reactions where it may double as DC activator and helper T cell antigen. PADRE is often used in cancer immunotherapy protocols in the latter capacity to support induction of sustained CD8⁺ effector T cell responses, but so far only in free soluble form (13-15). Binding to particles, as we show here may enhance its effect and lead to induction of additional DC functions known to be essential or at least highly beneficial for the induction of effective and sustained CD8⁺ effector T cell responses.

References

1. Steinman, R. M., and M. D. Witmer. 1978. Lymphoid Dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 75: 5132-5136.
2. Vermaelen, K. Y., I. Carro-Muino, B. N. Lambrecht, and R. A. Pauwels. 2001. Specific migratory dendritic cells rapidly transport antigen from the airways to the thoracic lymph nodes. *J. Exp. Med.* 193: 51-60.
3. Zhou, L. J., R. Schwarting, H. M. Smith, and T. F. Tedder. 1992. A novel cell-surface molecule expressed by human interdigitating reticulum cells, Langerhans cells, and activated lymphocytes is a new member of the Ig superfamily. *J. Immunol.* 149: 735-742.
4. Sallusto, F., B. Palermo, D. Lenig. 1999. Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function. *Eur. J. Immunol.* 29: 1617-1625.
5. Sallusto, F., and A. Lanzavecchia. 2000. Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor expression. *Immunol. Rev.* 177: 134-140.
6. Egner, W., and D. N. Hart. 1995. The phenotype of freshly isolated and cultured human bone marrow allostimulatory cells: possible heterogeneity in bone marrow dendritic cell populations. *Immunology*. 85: 611-620.
7. De Jong, E. C., P. L. Vieira, and P. Kalinski. 2002. Microbial compounds selectively induce Th1 cell-promoting or Th2 cell-promoting dendritic cells in vitro with diverse th cell-polarizing signals. *J. Immunol.* 168: 1704-1709.
8. Lesterhuis, W. J., I. J. De Vries, and G. Schreiber. 2010. Immunogenicity of dendritic cells pulsed with CEA peptide or transfected with CEA mRNA for vaccination of colorectal cancer patients. *Anticancer Res.* 30: 5091-5097.
9. Ocadlikova, D., F. Kryukov, and K. Mollova. 2010. Generation of myeloma-specific T cells using dendritic cells loaded with MUC1- and hTERT- driven nonapeptides or myeloma cell apoptotic bodies. *Neoplasma*. 57: 455-464.
10. Castellino, F., and R. N. Germain. 2006. Cooperation between CD4+ and CD8+ T cells: when, where, and how. *Annu. Rev. Immunol.* 24: 519-540.
11. Alexander, J., M. F. del Guercio, and B. Frame. 2004. Development of experimental carbohydrate-conjugate vaccines composed of *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharides and the universal helper T-lymphocyte epitope (PADRE). *Vaccine*. 22: 2362-2367.
12. Alexander, J., J. Sidney, and S. Southwood. 1994. Development of high potency universal DR-restricted helper epitopes by modification of high affinity DR-blocking peptides. *Immunity*. 1: 751-761.
13. Wierdecky, J., M. R. Muller, S. Wirths. 2006. Immunologic and clinical responses after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells in metastatic renal cancer patients. *Cancer Res.* 66: 5910-5918.
14. Rensing, M. E., W. J. van Driel, and R. M. Brandt. 2000. Detection of T helper responses, but not of human papillomavirus-specific cytotoxic T lymphocyte responses, after peptide vaccination of patients with cervical carcinoma. *J Immunother.* 23: 255-266.

15. Kavanagh, B., A. Ko, and A. Venook. 2007. Vaccination of metastatic colorectal cancer patients with matured dendritic cells loaded with multiple major histocompatibility complex class I peptides. *J. Immunother.* 30: 762-772.
16. Peyratout, C. S., and L. Dähne. 2004. Tailor-Made Polyelectrolyte Mirocapsules: From Multilayers to Smart Containers. *Angew. Chem.* 43: 3762-3783.
17. Schuler, G., D. Brang, and N. Romani. 1995. Production and properties of large numbers of dendritic cells from human blood. *Adv. Exp. Med. Biol.* 378: 43-52.
18. Lyons, A. B. 2000. Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometry measurement of CFSE dye dilution. *J. Immunol. Methods.* 243: 147-154.
19. Andrews, D. A., L. Yang, and P. S. Low. 2002. Phorbol ester stimulates a protein kinase C-mediated agatoxin-TK-sensitive calcium permeability pathway in human red blood cells. *Blood.* 100: 3392-3399.
20. O'Sullivan, B., and R. Thomas. 2003. CD40 and dendritic cell function. *Crit. Rev. Immunol.* 23: 83-107.
21. Kirit, M. A., A. R. Pizzey, S. Devereux, and A. Khwaja. 2000. The PI3 kinase, p38 SAP kinase, and NF- κ B signal transduction pathways are involved in the survival and maturation of lipopolysaccharide-stimulated human monocyte-derived dendritic cells. *Blood.* 96: 1039-1046.
22. Andrae, S., S. Buisson, and F. Triebel. 2003. MHC class II signal transduction in human dendritic cells induced by a natural ligand, the LAG-3 protein (CD223). *Blood.* 102: 2130-2137.
23. Qin, S., T. Inazu, and H. Yamamura. 1995. Activation and tyrosine phosphorylation of p72syk as well as calcium mobilization after hydrogen peroxide stimulation in peripheral blood lymphocytes. *Biochem. J.* 308: 347-352.
24. Danciu, T. E., R. M. Adam, K. Naruse, M. R. Freeman, and P. V. Hauschka. 2003. Calcium regulates the PI3K-Akt pathway in stretched osteoblasts. *FEBS Lett.* 536: 193-197.
25. Sun, C., R. Qi, L. Wang, J. Yan, and Y. Wang. 2012. p38 MAPK regulates calcium signal-mediated lipid accumulation through changing VDR expression in primary preadipocytes of mice. *Mol. Biol. Rep.* 39: 3179-3184.
26. Altomonte, M., C. Pucillo, G. Damante, and M. Maio. 1993. Cross-linking of HLA class II antigens modulates the release of tumor necrosis factor- α by the EBV-B lymphoblastoid cell line JY. *J. Immunol.* 151: 5115-5122.
27. Bagley, K. C., S. F. Abdelwahab, R. G. Tuskan, and G. K. Lewis. 2004. Calcium signaling through phospholipase C activates dendritic cells to mature and is necessary for the activation and maturation of dendritic cells induced by diverse agonists. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 11: 77-82.
28. Spiegel, S., and S. Milstien. 2011. The outs and the ins of sphingosine-1-phosphate in immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 6: 403-415.
29. Shumilina, E., S. M. Huber, and F. Lang. 2011. Ca²⁺ signaling in the regulation of dendritic cell functions. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 300: C1205-C1214.
30. Herrmann, T. L., C. T. Morita, K. Lee, and D. J. Kusner. 2005. Calmodulin kinase II regulates the maturation and antigen presentation of human dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.* 78: 1397-1407.
31. Connolly, S. F., and D. J. Kusner. 2007. The regulation of dendritic cell function by calcium-signaling and its inhibition by microbial pathogens. *Immunol. Res.* 39: 115-127.

-
32. Nguyen, A., P. Chen, and H. Cai. 2004. Role of CaMKII in hydrogen peroxide activation of ERK1/2, p38 MAPK, HSP27 and actin reorganization in endothelial cells. *FEBS Lett.* 572: 307-313.
 33. Meffert, M. K., J. M. Chang, B. J. Wiltgen, M. S. Fanselow, and D. Baltimore. 2003. NF-kappa B functions in synaptic signaling and behavior. *Nat. Neurosci.* 10: 1072-1078.

Figure legends

Figure 1: Phenotypic maturation of dendritic cells (DCs) induced by particles coated with PADRE. Immature dendritic cells were generated from PBMCs by adherence to plastic cell culture flasks and depleted of T cells. The thus prepared monocytes were cultured in serum-free AIM-V medium with GM-CSF and IL-4, harvested on day 5 and incubated with soluble PADRE, particle-bound PADRE or an inflammatory cytokine cocktail of IL-1 β , IL-6 and TNF- α for 2 additional days. On day 7 the cells were labelled with antibodies for the HLA-DR, CD11c and Lin (cocktail of FITC-conjugated antibodies against the molecules CD3, CD14, CD19 and CD56) for exclusion, and CD80, CD83 and CD86, and analyzed by flow cytometry. The graphs show mean fold changes with standard error of the expression of CD80 (**A**), CD86 (**B**), CD83 (**C**), and HLA-DR (**D**) of five independent experiments done with cells from five different healthy donors. NT: no treatment; Cocktail: IL-1 β IL-6 and TNF- α .

Figure 2: Specificity of the DC-inducing activity of particle-bound PADRE. Immature DCs as in the experiments shown in Figure 1 were incubated either without stimuli negative or with an inflammatory cytokine cocktail of IL-1 β , IL-6 and TNF- α as positive controls, or with particles without cargo or loaded with GILGFVFTL peptide, NLVPMVATV peptide, PADRE, diacyl-lipopeptide P2C, a mix of both PADRE and P2C or with a mixture of particles carrying either PADRE or P2C. After two days cultures the cells were labelled with antibodies for the CD11c and Lin (cocktail of FITC-conjugated antibodies against the molecules CD3, CD14, CD19 and CD56) for exclusion, and CD80, CD83, CD86 and HLA-DR, and analyzed by flow cytometry. The graphs show fold of expression of the molecules CD80 (**A**), CD86 (**B**), CD83 (**C**) and HLA-DR (**D**) with standard error of 6 independent experiments with cells from 6 different healthy donors.

Figure 3: Functional capacities of DCs stimulated with particle-bound PADRE. Adherent PBMCs previously depleted of T cells were cultured in presence of GM-CSF and IL-4 for five days and matured by incubation with particles carrying PADRE, P2C, a mixture of both, or a mixture of particles carrying either PADRE or P2C. After two days, the DCs were washed characterized by flow cytometry as for the experiments shown in Figures 1 and 2 and then co-cultured with CFSE-labelled naïve CD4⁺ T cells. After seven days of co-culture, the cells were harvested and labelled with antibodies to CD4, CD45RA and CD45RO and analyzed by flow cytometry. Proliferation of the T cells was determined by the reduction of CFSE upon successive cell divisions. The plots show CFSE and CD45RA (**A**) or CD45RO (**B**) on gated CD4⁺ T cells of one of five independent experiments with cells from five different healthy donors. The summary of the results of all 5 experiments is shown in Supplementary Figure 2.

Figure 4: Mobilization of intracellular calcium in DCs induced by particles carrying PADRE (**A**). Immature DCs were generated from PBMCs by adherence to plastic cell culture flasks. The thus prepared monocytes were cultured in serum-free AIM-V medium with GM-CSF and IL-4, harvested on day 5 and labelled with Fluo-3/AM. The DCs were then suspended in medium with or without EDTA and incubated for 10 minutes with empty particles, particle-bound PADRE, particle-bound P2C, soluble LPS or ionomycin and analyzed by flow cytometry. The graph shows mean fold changes of Fluo-3 fluorescence with standard error of independent experiments done with cells from three to five different healthy donors. * indicates $p < 0.05$ – none vs. stimulus. In (**B-C**) is shown the effect of the blockade of intracellular calcium on the phenotypic maturation and IL-12p70 secretion of DCs induced by particle-bound PADRE. Immature dendritic cells were generated as above described. On day 5 the cells were harvested, labelled or not with BAPTA-AM and incubated with particle-bound PADRE, particle-bound P2C or ionomycin for 2 more days. On day 7 the cells were labelled with antibodies for the CD80, CD86, CD83 and HLA-DR, and analyzed by flow cytometry. The supernatant of the stimulation cultures were collected and analyzed for IL-12p70 by ELISA. The histograms in (**B**) show the expression of CD80, CD86, CD83 and HLA-DR of a representative donor. In (**C**) the secretion of IL-12p70 is shown for three independent experiments with cells from three different healthy donors.

Figure 5: Effect of the PLC inhibitor D609 (**A**) and the sphingosine kinase inhibitor SKI-II (**B**) on the phenotypic maturation of dendritic cells (DCs) induced by particle-bound PADRE. Immature DCs generated from plastic-adherent monocytes by incubation with GM-CSF and IL-4 in serum-free AIM-V medium were incubated with the inhibitors for 2 hours and then cultured with particle-bound PADRE,

particle-bound P2C or ionomycin for 2 days and analyzed by flow cytometry for CD80, CD86, CD83 and HLA-DR. The histograms show the expression levels of a representative donor of at least three independent experiments done with cells from three different healthy donors.

Figure 6: Effect of the calcineurin inhibitor cyclosporine A on the phenotypic maturation and IL-12p70 secretion of DCs induced by particle-bound PADRE. Immature dendritic cells were generated from plastic-adherent monocytes by incubation in serum-free AIM-V medium with GM-CSF and IL-4. On day 5 the cells were collected and incubated with particle-bound PADRE, particle-bound P2C or ionomycin for additional 2 days in the presence or absence of cyclosporine A. On day 7 the cells were stained with antibodies for CD80, CD86, CD83 and HLA-DR, and analyzed by flow cytometry. The culture supernatants were analyzed for IL-12p70 by ELISA. The histograms in **(A)** show the expression of CD80, CD86, CD83 and HLA-DR of a representative donor, diagram **(B)** shows the secretion of IL-12p70. Independent experiments were done with cells from seven different healthy donors.

Figure 7: Effect of the CAMKII inhibitor CK59 on the phenotypic maturation of dendritic cells (DCs) induced by particle-bound PADRE. Immature DCs generated from plastic-adherent monocytes by incubation with GM-CSF and IL-4 in serum-free AIM-V medium were cultured with particle-bound PADRE, particle-bound P2C or ionomycin for 2 days and analyzed by flow cytometry for CD80, CD86, CD83 and HLA-DR. The histograms show the expression levels of a representative donor of four independent experiments done with cells from four different healthy donors.

Figure 1:

Figure 2:

Figure 3:

A

B

Figure 4:

Figure 5:

Figure 6:

Figure 7:

Supplementary Material

Direct activation of human dendritic cells via MHC class II molecules

Renato B. Baleeiro, Karl H. Wiesmüller, Lars Dähne, Jürgen Lademann, José A.

Barbuto and Peter Walden

Supplementary figure 1: Effects of T cells on the maturation of iDCs induced by particle-bound PADRE. PBMCs separated by Ficoll gradient centrifugation were depleted of T cells or not, enriched for monocytes by adherence and cultured in serum-free AIM-V with IL-4 and GM-CSF. **A)** Percentage of CD4⁺ T cells present in one representative of four independent DC cultures. The panel on the left shows the dot plot from a DC culture where the T cells were not depleted, the right panel a DC culture where the T cells were depleted prior to culturing the monocytes for DC production. **B)** Phenotype of DCs from cultures previously depleted of T cells (white bars) or not (gray bars) prior to maturation with an inflammatory cytokine cocktail of IL-1 β , IL-6 and TNF- α , particle-bound P2C or particle bound PADRE. The graphs show means with standard error of MFI for HLA-DR, CD40, CD80, CD83 and CD86, respectively, from four independent experiments with DCs prepared from PBMC of four different healthy donors.

Supplementary figure 2: Proliferation of CD4⁺ T cells incubated with DCs matured with particle-bound PADRE, P2C or both, or an inflammatory cytokine cocktail of IL-1 β , IL-6 and TNF- α . Plastic-adherent PBMCs previously depleted of T cells were cultured in presence of GM-CSF and IL-4 for 5 days and then matured with the stimuli as indicated in the graph. The DCs obtained from the cultures were then cocultured with CFSE-labelled naïve CD4⁺ T cells for seven days. The cells were then stained for CD4, CD45RA and CD45RO, and analyzed by flow cytometry for CFSE levels as indicator for cell proliferation. The values shown refer to the percentage of CD4⁺CFSE^{low} cells and are the means of five independent experiments done with cells from five different healthy donors.

Supplementary figure 3: Activation of T cells by DCs generated from monocytes after rigorous depletion or not of T cells, and matured by exposure to particle-bound P2C or PADRE, or an inflammatory cytokine cocktail of IL-1 β , IL-6 and TNF- α . Adherent PBMCs previously depleted or not of T cells were cultured in presence of GM-CSF and IL-4, and then activated with the stimuli indicated in the graphs. The cells obtained from these cultures were cocultured with CFSE-labelled CD4⁺ T cells. After five days in coculture, the cells were harvested and labelled with antibodies to CD4, CD25 and CD71. The expression of these markers and the proliferative responses of the T cells were analyzed by flow cytometry. The plots show the levels of CFSE and CD25 (**A**) or CD71 (**B**) on the gated CD4⁺ T cells. The experiment was done twice with cells from two different donors with similar results.

Supplementary figure 4: Effect of the specific inhibitors of kinase signaling on the phenotypic maturation of DCs induced by particle-bound PADRE. Immature DCs generated from plastic-adherent PBMCs by culturing for 5 days with GM-CSF and IL-4 in serum-free AIM-V medium were incubated for 2 hours with inhibitors for p72 Syk, PI3K, p38 MAPK or NF- κ B after which particle-bound PADRE, particle-bound P2C or soluble LPS were added and the cultures continued for 2 more days. On day 7 the cells were analyzed by flow cytometry for expression of CD80, CD86, CD83 and HLA-DR and their culture supernatant by ELISA for IL-12p70. The graphs show fold change of expression of CD80 (**A**), CD86 (**B**), CD83 (**C**) and HLA-DR (**D**), or IL-12p70 levels in the supernatants (**E**) with standard error of 7 independent experiments with cells from 7 different healthy donors. * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; and *** = $p < 0.001$ comparing the group treated with stimulus only vs. the groups treated with stimulus plus the specific inhibitor.

Supplementary figure 1:

A**DC cultures:**

Percentage of CD3+CD4+ cells in DC cultures

B

Supplementary figure 2:

Supplementary figure 3:

Supplementary figure 4: