

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
Faculdade de Biociências  
Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular

HSP70 DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS INIBE A REJEIÇÃO AO ENXERTO  
E INDUZ CÉLULAS T CD4+CD25+

Dissertação apresentada ao Programa  
de Pós-graduação em Biologia  
Celular e Molecular como requisito  
para obtenção do grau de Mestre

César Augusto Teixeira  
Orientadora: Profa. Dra. Cristina Bonorino

Porto Alegre/RS  
Janeiro de 2007

## ÍNDICE

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1 – APRESENTAÇÃO AO TEMA.....</b>           | <b>05</b> |
| <b>1.1 - As proteínas de choque calor.....</b> | <b>05</b> |
| <b>1.2 - As HSPs e a resposta imune.....</b>   | <b>06</b> |
| <b>1.3- Células T regulatórias.....</b>        | <b>10</b> |
| <b>1.4 – A rejeição à Aloenxertos.....</b>     | <b>11</b> |
| <b>2 – CONCLUSÃO.....</b>                      | <b>15</b> |
| <b>3 – OBJETIVOS.....</b>                      | <b>16</b> |
| <b>4- REFERÊNCIAS.....</b>                     | <b>17</b> |
| <b>5- ARTIGO CIENTÍFICO.....</b>               | <b>22</b> |
| <b>6- CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>            | <b>47</b> |

## RESUMO

Diferentes estudos têm demonstrado que a Hsp70 de *Mycobacterium tuberculosis* (TBHsp70) pode induzir a remissão de modelos de doenças auto-imunes. Entretanto, o mecanismo pelo qual esta proteína exibe propriedades imunorregulatórias necessita ser elucidado. Neste estudo, nos perguntamos se a TBHsp70 poderia suprimir a rejeição em um sistema de transplante alogeneico de tumor. Nós observamos que enquanto camundongos BALB/c (H-2<sup>d</sup>) rejeitam melanócitos B16F10 (H-2<sup>b</sup>) implantados de forma subcutânea, animais BALB/c tratados com TBHsp70 não rejeitam o enxerto de forma similar aos tratados com Dexametasona (DEXA). O tratamento com TBHsp70 inibiu a proliferação de células T induzidas por mitógeno no linfonodo drenante e, finalmente, células T CD4, CD25 e Foxp3 foram observadas no sítio de enxertia e nos linfonodos drenantes de animais tratados com esta proteína. Nossos resultados apontam para um papel imunossupressor da TBHsp70, e sugerem que a indução de células T regulatórias poderia ser o mecanismo pelo qual esta proteína suprime a rejeição ao enxerto.

## CONCLUSÕES

Neste estudo nos propusemos a investigar os efeitos imunossupressores da Hsp70 de *Mycobacterium tuberculosis* (TBHsp70). Para tanto, elaboramos um modelo experimental *in vivo* de rejeição a aloenxerto com um tumor alogeneico transplantado. Testamos ainda se a TBHsp70 apresenta algum efeito sobre a proliferação inespecífica de células mononucleares humanas *in vitro* e murinas *ex vivo*. Em todos os experimentos, a TBHsp70 apresentou um efeito imunossupressor. Finalmente, nossos achados sugerem que o mecanismo de imunossupressão envolve a geração de células T regulatórias (T reg).

Essa subpopulação celular, correspondente a aproximadamente 5 a 10% do total de células T CD4<sup>+</sup>, desempenha um importante papel na manutenção de tolerância periférica, além de prevenir um número de doenças de etiologia relacionada às desordens imunológicas. Dessa forma, podem suprimir respostas a aloantígenos, auto antígenos e até a antígenos tumorais. Um dos mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento de doenças autoimunes poderia ser mediado por quebra no estado de tolerância mantido por estas células. Intervenções terapêuticas sobre células T reg poderiam portanto ser uma alternativa de tratamento para doenças relacionadas às disfunções de células T, e substâncias que apresentem a capacidade de gerar células T reg seriam candidatas ao uso terapêutico. A TBHsp70 parece ser uma dessas substâncias.

Nosso laboratório previamente evidenciou a ação imunossupressora da TBHsp70 no líquido sinovial e em linfócitos de sangue periférico de pacientes com artropatias, somente com proteínas previamente tratadas para a remoção de contaminantes bacterianos. Além disso, também observamos que essa proteína é capaz de retardar a maturação de células

dendríticas (DCs), induzindo a produção de IL-10. Assim sendo, o presente trabalho iniciou com o pressuposto de que, para a real identificação da ação da Hsp70 sobre o sistema imunológico, somente proteínas livres de contaminantes poderiam ser utilizadas.

Nesse estudo, o efeito sobre a inibição da proliferação celular *in vitro* em células mononucleares humanas cultivadas com TBHsp70 foi altamente reproduzível, caracterizando a ação imunorreguladora dessa proteína. Além disso, linfócitos de linfonodos inguinais previamente tratados com TBHsp70, também em falharam em proliferar *ex vivo* quando desafiados com mitógeno, e a produção de IL-10 aumentou nessas células. Contudo, sem dúvida o resultado mais marcante deste estudo foi a resposta *in vivo* observada, ou seja, a aceitação do enxerto alogeneico, caracterizando o efeito imunossupressor dessa proteína além dos modelos experimentais de doenças autoimunes descritos por outros. Além disso, a geração de células T reg (CD4+CD25+ Foxp3+), também pôde ser observada, indicando que o perfil imunorregulador poderia ser atribuído a esse fenótipo celular. Salientamos que embora nosso modelo experimental de rejeição ao enxerto tenha sido efetivo, entendemos que o sistema experimental ideal deveria ser um enxerto de tecido, como o cutâneo. Estes experimentos estão atualmente sendo desenvolvidos em parceria com o laboratório de Nefrologia do Instituto de Pesquisas Biomédicas. Também, estamos trabalhando na padronização da técnica de análise de proliferação por CFSE, para realizar um ensaio funcional das células detectadas neste trabalho. Se as células CD4+CD25+Foxp3+ são realmente células regulatórias, elas devem inibir a proliferação de outras células T convencionais. Nós tentamos realizar esse experimento com MTT, mas duas vezes tivemos falhas técnicas. Porém tentaremos novamente, antes de enviar para publicação, utilizando a diluição do CFSE como indicador de divisão celular.

O mecanismo exato pelo qual a TBHsp70 exerce sua atividade imunossupressora necessita ser elucidado. O tratamento com TBHsp70 no local do enxerto (*in vivo*), ou como estímulo *in vitro*, poderia proporcionar a geração e ativação de células T reg, provavelmente reativas a peptídeos de Hsp endógenos, permitindo assim a fixação das células alogeneicas. De fato, as células T reg parecem ser fundamentais na geração do perfil regulador proporcionado pela Hsp60.

Para testar essa hipótese, iniciamos uma colaboração com o Dr. Willem van Eden, da Universidade de Utrecht, na Holanda, cujo grupo atualmente realiza um mapeamento de peptídeos de TBHsp70 que exerceriam imunossupressão em camundongos BALB/c. Quando recebermos os peptídeos, repetiremos os experimentos descritos neste estudo utilizando diferentes peptídeos de TBHsp70. Acreditamos também ser importante um estudo cinético mais detalhado da geração dessas células neste modelo, para tanto, esta análise depende de colaboradores da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-São Paulo, uma vez que todos os reagentes de células T reg são cedidos por esse grupo.

Realizamos apenas um estudo qualitativo da imunohistologia. Entendemos que a análise quantitativa é necessária. Este processo também está sendo realizado em parceria com o grupo de Ribeirão Preto. Atualmente temos blocos de três grupos de animais do grupo experimental sendo analisados. Estes dados são fundamentais para publicação dos nossos resultados e contribuirão decisivamente para a elucidação do potencial imunossupressor da TBHsp70, possibilitando seu uso adequado como agente terapêutico.

## Referências:

1. Ritossa, F. 1962. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 18:571.
2. Tissieres, A., H. K. Mitchell, and U. M. Tracy. 1974. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *J Mol Biol* 84:389.
3. Lindquist, S. 1986. The heat-shock response. *Annu Rev Biochem* 55:1151.
4. DiDomenico, B. J., G. E. Bugaisky, and S. Lindquist. 1982. The heat shock response is self-regulated at both the transcriptional and posttranscriptional levels. *Cell* 31:593.
5. Hightower, L. E. 1991. Heat shock, stress proteins, chaperones, and proteotoxicity. *Cell* 66:191.
6. Young, J. C., V. R. Agashe, K. Siegers, and F. U. Hartl. 2004. Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:781.
7. Hartl, F. U., and M. Hayer-Hartl. 2002. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 295:1852.
8. Tomanek, L., and E. Sanford. 2003. Heat-shock protein 70 (Hsp70) as a biochemical stress indicator: an experimental field test in two congeneric intertidal gastropods (genus: *Tegula*). *Biol Bull* 205:276.
9. Pockley, G. 2003. Heat shock proteins as regulators of the immune response. *The Lancet* 362:469.
10. Velazquez, J. M., and S. Lindquist. 1984. hsp70: nuclear concentration during environmental stress and cytoplasmic storage during recovery. *Cell* 36:655.
11. Karlin, S., and L. Brocchieri. 1998. Heat shock protein 70 family: multiple sequence comparisons, function, and evolution. *J Mol Evol* 47:565.
12. Boorstein, W. R., T. Ziegelhoffer, and E. A. Craig. 1994. Molecular evolution of the HSP70 multigene family. *J Mol Evol* 38:1.
13. van Eden, W., R. van der Zee, and B. Prakken. 2005. Heat-shock proteins induce T-cell regulation of chronic inflammation. *Nat Rev Immunol* 5:318.
14. Flynn, G. C., T. G. Chappell, and J. E. Rothman. 1989. Peptide binding and release by proteins implicated as catalysts of protein assembly. *Science* 245:385.
15. Beckmann, R. P., L. E. Mizzen, and W. J. Welch. 1990. Interaction of Hsp 70 with newly synthesized proteins: implications for protein folding and assembly. *Science* 248:850.
16. van Eden, W., J. E. Thole, R. van der Zee, A. Noordzij, J. D. van Embden, E. J. Hensen, and I. R. Cohen. 1988. Cloning of the mycobacterial epitope recognized by T lymphocytes in adjuvant arthritis. *Nature* 331:171.
17. Kaufmann, S. H. 1990. Heat shock proteins and the immune response. *Immunol Today* 11:129.
18. Lamb, J. R., V. Bal, P. Mendez-Samperio, A. Mehlert, A. So, J. Rothbard, S. Jindal, R. A. Young, and D. B. Young. 1989. Stress proteins may provide a link between the immune response to infection and autoimmunity. *Int Immunol* 1:191.
19. de Graeff-Meeder, E. R., M. Voorhorst, W. van Eden, H. J. Schuurman, J. Huber, D. Barkley, R. N. Maini, W. Kuis, G. T. Rijkers, and B. J. Zegers. 1990. Antibodies to the mycobacterial 65-kd heat-shock protein are reactive with synovial tissue of

- adjuvant arthritic rats and patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Am J Pathol* 137:1013.
20. Hayem, G., M. De Bandt, E. Palazzo, S. Roux, B. Combe, J. F. Eliaou, J. Sany, M. F. Kahn, and O. Meyer. 1999. Anti-heat shock protein 70 kDa and 90 kDa antibodies in serum of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 58:291.
  21. Inman, R. D., M. E. Johnston, B. Chiu, J. Falk, and M. Petric. 1987. Immunochemical analysis of immune response to *Chlamydia trachomatis* in Reiter's syndrome and nonspecific urethritis. *Clin Exp Immunol* 69:246.
  22. De Graeff-Meeder, E. R., R. van der Zee, G. T. Rijkers, H. J. Schuurman, W. Kuis, J. W. Bijlsma, B. J. Zegers, and W. van Eden. 1991. Recognition of human 60 kD heat shock protein by mononuclear cells from patients with juvenile chronic arthritis. *Lancet* 337:1368.
  23. Asea, A., S. K. Kraeft, E. A. Kurt-Jones, M. A. Stevenson, L. B. Chen, R. W. Finberg, G. C. Koo, and S. K. Calderwood. 2000. HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat Med* 6:435.
  24. Srivastava, P. K., H. Udono, N. E. Blachere, and Z. Li. 1994. Heat shock proteins transfer peptides during antigen processing and CTL priming. *Immunogenetics* 39:93.
  25. Binder, R. J., R. Vatner, and P. Srivastava. 2004. The heat-shock protein receptors: some answers and more questions. *Tissue Antigens* 64:442.
  26. Srivastava, P. 2002. Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2:185.
  27. Basu, S., R. J. Binder, T. Ramalingam, and P. K. Srivastava. 2001. CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin. *Immunity* 14:303.
  28. Moseley, P. 2000. Stress proteins and the immune response. *Elsevier Science B.V.* 48:299.
  29. Todryk, S. M., M. J. Gough, and A. G. Pockley. 2003. Facets of heat shock protein 70 show immunotherapeutic potential. *Immunology* 110:1.
  30. Robert, J., A. Menoret, S. Basu, N. Cohen, and P. R. Srivastava. 2001. Phylogenetic conservation of the molecular and immunological properties of the chaperones gp96 and hsp70. *Eur J Immunol* 31:186.
  31. Castelli, C., A. M. Ciupitu, F. Rini, L. Rivoltini, A. Mazzocchi, R. Kiessling, and G. Parmiani. 2001. Human heat shock protein 70 peptide complexes specifically activate antimelanoma T cells. *Cancer Res* 61:222.
  32. Kopp, E. B., and R. Medzhitov. 1999. The Toll-receptor family and control of innate immunity. *Curr Opin Immunol* 11:13.
  33. Tsan, M. F., and B. Gao. 2004. Endogenous ligands of Toll-like receptors. *J Leukoc Biol* 76:514.
  34. Gao, B., and M. F. Tsan. 2003. Endotoxin contamination in recombinant human heat shock protein 70 (Hsp70) preparation is responsible for the induction of tumor necrosis factor alpha release by murine macrophages. *J Biol Chem* 278:174.
  35. Bausinger, H., D. Lipsker, U. Ziylan, S. Manie, J. P. Briand, J. P. Cazenave, S. Muller, J. F. Haeuw, C. Ravanat, H. de la Salle, and D. Hanau. 2002. Endotoxin-free heat-shock protein 70 fails to induce APC activation. *Eur J Immunol* 32:3708.



36. Detanico, T., L. Rodrigues, A. C. Sabritto, M. Keisermann, M. E. Bauer, H. Zwickey, and C. Bonorino. 2004. Mycobacterial heat shock protein 70 induces interleukin-10 production: immunomodulation of synovial cell cytokine profile and dendritic cell maturation. *Clin Exp Immunol* 135:336.
37. Motta, A., C. Schmitz, L. Rodrigues, F. Ribeiro, C. Teixeira, T. Detanico, C. Bonan, H. Zwickey, and C. Bonorino. 2006. Endotoxin-free *Mycobacterium tuberculosis* Hsp70 inhibits maturation of dendritic cells and T cell proliferation. *Submitted*.
38. Kingston, A. E., C. A. Hicks, M. J. Colston, and M. E. Billingham. 1996. A 71-kD heat shock protein (hsp) from *Mycobacterium tuberculosis* has modulatory effects on experimental rat arthritis. *Clin Exp Immunol* 103:77.
39. Prakken, B. J., U. Wendling, Z. R. van der, V. P. Rutten, W. Kuis, and W. van Eden. 2001. Induction of IL-10 and inhibition of experimental arthritis are specific features of microbial heat shock proteins that are absent for other evolutionarily conserved immunodominant proteins. *J. Immunol.* 2001. Oct. 15.; 167. (8.): 4147.-53. 167:4147.
40. Tanaka, S., Y. Kimura, A. Mitani, G. Yamamoto, H. Nishimura, R. Spallek, M. Singh, T. Noguchi, and Y. Yoshikai. 1999. Activation of T cells recognizing an epitope of heat-shock protein 70 can protect against rat adjuvant arthritis. *J. Immunol.* 163:5560.
41. Wendling, U., L. Paul, R. van der Zee, B. Prakken, M. Singh, and W. van Eden. 2000. A conserved mycobacterial heat shock protein (hsp) 70 sequence prevents adjuvant arthritis upon nasal administration and induces IL-10-producing T cells that cross-react with the mammalian self-hsp70 homologue. *J Immunol* 164:2711.
42. Ulmansky, R., C. J. Cohen, F. Szafer, E. Moallem, Z. G. Fridlender, Y. Kashi, and Y. Naparstek. 2002. Resistance to adjuvant arthritis is due to protective antibodies against heat shock protein surface epitopes and the induction of IL-10 secretion. *J Immunol* 168:6463.
43. Prakken, B. J., U. Wendling, R. van der Zee, V. P. Rutten, W. Kuis, and W. van Eden. 2001. Induction of IL-10 and inhibition of experimental arthritis are specific features of microbial heat shock proteins that are absent for other evolutionarily conserved immunodominant proteins. *J Immunol* 167:4147.
44. Sakaguchi, S. 2004. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 22:531.
45. Penhale, W. J., A. Farmer, R. P. McKenna, and W. J. Irvine. 1973. Spontaneous thyroiditis in thymectomized and irradiated Wistar rats. *Clin Exp Immunol* 15:225.
46. Penhale, W. J., W. J. Irvine, J. R. Inglis, and A. Farmer. 1976. Thyroiditis in T cell-depleted rats: suppression of the autoallergic response by reconstitution with normal lymphoid cells. *Clin Exp Immunol* 25:6.
47. Fehervari, Z., and S. Sakaguchi. 2004. CD4+ Tregs and immune control. *J Clin Invest* 114:1209.
48. Hsieh, C. S., Y. Zheng, Y. Liang, J. D. Fontenot, and A. Y. Rudensky. 2006. An intersection between the self-reactive regulatory and nonregulatory T cell receptor repertoires. *Nat Immunol* 7:401.
49. Cozzo, C., J. Larkin, 3rd, and A. J. Caton. 2003. Cutting edge: self-peptides drive the peripheral expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 171:5678.

50. van Eden, W., U. Wendling, L. Paul, B. Prakken, P. van Kooten, and R. van der Zee. 2000. Arthritis protective regulatory potential of self-heat shock protein cross-reactive T cells. *Cell Stress Chaperones* 5:452.
51. Kimura, Y., K. Yamada, T. Sakai, K. Mishima, H. Nishimura, Y. Matsumoto, M. Singh, and Y. Yoshikai. 1998. The regulatory role of heat shock protein 70-reactive CD4+ T cells during rat listeriosis. *Int Immunol* 10:117.
52. Zanin-Zhorov, A., L. Cahalon, G. Tal, R. Margalit, O. Lider, and I. R. Cohen. 2006. Heat shock protein 60 enhances CD4+ CD25+ regulatory T cell function via innate TLR2 signaling. *J Clin Invest* 116:2022.
53. Merrill, J. P., J. E. Murray, J. H. Harrison, and W. R. Guild. 1956. Successful homotransplantation of the human kidney between identical twins. *J Am Med Assoc* 160:277.
54. Cecka, J. M. 1998. The UNOS Scientific Renal Transplant Registry. *Clin Transpl*:1.
55. Opelz, G., T. Wujciak, J. Mytilineos, and S. Scherer. 1993. Revisiting HLA matching for kidney transplantation. *Transplant Proc* 25:173.
56. Held, P. J., B. D. Kahan, L. G. Hunsicker, D. Liska, R. A. Wolfe, F. K. Port, D. S. Gaylin, J. R. Garcia, L. Y. Agodoa, and H. Krakauer. 1994. The impact of HLA mismatches on the survival of first cadaveric kidney transplants. *N Engl J Med* 331:765.
57. Rossini, A. A., D. L. Greiner, and J. P. Mordes. 1999. Induction of immunologic tolerance for transplantation. *Physiol Rev* 79:99.
58. Heeger, P. S. 2003. T-cell allorecognition and transplant rejection: a summary and update. *Am J Transplant* 3:525.
59. Smith, K. D., and C. T. Lutz. 1997. Alloreactive T cell recognition of MHC class I molecules: the T cell receptor interacts with limited regions of the MHC class I long alpha helices. *J Immunol* 158:2805.
60. Saiki, T., T. Ezaki, M. Ogawa, K. Maeda, H. Yagita, and K. Matsuno. 2001. In vivo roles of donor and host dendritic cells in allogeneic immune response: cluster formation with host proliferating T cells. *J Leukoc Biol* 69:705.
61. Benichou, G., P. A. Takizawa, C. A. Olson, M. McMillan, and E. E. Sercarz. 1992. Donor major histocompatibility complex (MHC) peptides are presented by recipient MHC molecules during graft rejection. *J Exp Med* 175:305.
62. Hayry, P., H. Isoniemi, S. Yilmaz, A. Mennander, K. Lemstrom, A. Raisanen-Sokolowski, P. Koskinen, J. Ustinov, I. Lautenschlager, E. Taskinen, and et al. 1993. Chronic allograft rejection. *Immunol Rev* 134:33.
63. Yamagami, S., and M. R. Dana. 2001. The critical role of lymph nodes in corneal alloimmunization and graft rejection. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42:1293.
64. Itano, A. A., and M. K. Jenkins. 2003. Antigen presentation to naive CD4 T cells in the lymph node. *Nat Immunol* 4:733.
65. Yamagami, S., M. R. Dana, and T. Tsuru. 2002. Draining lymph nodes play an essential role in alloimmunity generated in response to high-risk corneal transplantation. *Cornea* 21:405.
66. Jaffee, E. M., and D. M. Pardoll. 1996. Murine tumor antigens: is it worth the search? *Curr Opin Immunol* 8:622.
67. Barnes, P. J. 2006. How corticosteroids control inflammation: Quintiles Prize Lecture 2005. *Br J Pharmacol* 148:245.

68. Sapolsky, R. M., L. M. Romero, and A. U. Munck. 2000. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev* 21:55.
69. Moser, M., T. De Smedt, T. Sornasse, F. Tielemans, A. A. Chentoufi, E. Muraille, M. Van Mechelen, J. Urbain, and O. Leo. 1995. Glucocorticoids down-regulate dendritic cell function in vitro and in vivo. *Eur J Immunol* 25:2818.
70. Pedersen, A. E., M. Gad, M. R. Walter, and M. H. Claesson. 2004. Induction of regulatory dendritic cells by dexamethasone and 1alpha,25-Dihydroxyvitamin D(3). *Immunol Lett* 91:63.
71. Miura, Y., C. J. Thoburn, E. C. Bright, M. L. Phelps, T. Shin, E. C. Matsui, W. H. Matsui, S. Arai, E. J. Fuchs, G. B. Vogelsang, R. J. Jones, and A. D. Hess. 2004. Association of Foxp3 regulatory gene expression with graft-versus-host disease. *Blood* 104:2187.
72. Zorn, E., H. T. Kim, S. J. Lee, B. H. Floyd, D. Litsa, S. Arumugarajah, R. Bellucci, E. P. Alyea, J. H. Antin, R. J. Soiffer, and J. Ritz. 2005. Reduced frequency of FOXP3+ CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with chronic graft-versus-host disease. *Blood* 106:2903.