

VÍAS DE PROCESAMIENTO TAP-INDEPENDIENTES DE VACCINIA Y DE LA gp160 DE VIH

Doctorando: Elena Lorente Galán
Director: Daniel López Rodríguez
Tutor: Julián Gómez Gutiérrez

RESUMEN

Los linfocitos T citotóxicos CD8⁺ (CTL) reconocen péptidos patogénicos asociados a moléculas de HLA de clase I en la superficie celular. Además de la vía clásica de procesamiento antigénico que involucra al proteasoma y a TAP, en la última década se han descrito otras vías que implican a diferentes proteasas, las cuales también contribuyen al procesamiento endógeno de diferentes epítomos virales. Mediante la generación de CTLs específicos y la espectrometría de masas hemos identificado cuatro epítomos TAP-independientes del virus vaccinia, dos de los cuales son presentados por HLA-B7 y otros dos por HLA-A2. Estos resultados indican la existencia de distintas vías de procesamiento diferentes a las previamente descritas.

INTRODUCCIÓN

Los linfocitos T citotóxicos CD8⁺ (CTL) reconocen péptidos patogénicos asociados a moléculas de MHC-I en la superficie celular (revisado en York y Rock 1996). La vía clásica de procesamiento y presentación de antígenos por MHC-I en células infectadas comienza con la proteólisis, generalmente por el complejo multicatalítico denominado proteasoma, de proteínas del patógeno sintetizadas endógenamente o liberadas al citosol. Estos fragmentos peptídicos son transportados al lumen del retículo endoplásmico (RE) mediante un proceso dependiente de ATP y catalizado por los transportadores asociados con el procesamiento de antígeno (TAP). Las cadenas pesadas de MHC de clase I son insertadas cotraduccionalmente en la membrana del RE donde se asocian, mediante la participación de diferentes chaperonas, a β_2 -microglobulina (β_2m) y posteriormente a TAP. Dichas interacciones finalizan con el ensamblaje del péptido. El complejo trimolecular estable, MHC clase I/ β_2m /péptido, viaja a través de la ruta exocítica hasta alcanzar la superficie de la célula, donde el péptido antigénico queda expuesto para ser reconocido por el receptor de la célula T (TCR).

En la hipótesis inicial, el proteasoma era la única proteasa capaz de generar el repertorio antigénico, pero en la última década se han descrito diferentes proteasas alternativas que contribuyen al procesamiento endógeno de epítomos virales (revisado en del Val y López 2002).

El virus vaccinia realiza su ciclo infectivo en el citoplasma al igual que el resto de los Poxvirus. Es un virus de ADN de doble cadena de aproximadamente 200.000 pares de bases, con tres tipos de genes: tempranos, intermedios y tardíos. Tras la síntesis de las proteínas estructurales tardías, el virión se ensambla recubriéndose de membranas provenientes del compartimento intermedio entre el RE y el aparato de Golgi formando partículas inmaduras (Risco y col. 2002). Éstas sufren diversos cambios estructurales y bioquímicos dando lugar al virus maduro intracelular, que constituye la mayor parte de las partículas infecciosas. Algunas de estas partículas se rodean de membranas de las cisternas de la red del trans-Golgi, dando lugar a los virus intracelulares con envuelta (Schmelz y col. 1994). Estas partículas son transportadas a la superficie de la célula mediante el citoesqueleto. Una vez allí, la membrana externa del virus se fusiona con la celular, liberándose los virus extracelulares con envuelta, mientras que otros quedan anclados a la superficie celular.

Hasta el momento, se han descrito aproximadamente un centenar de epítomos de vaccinia presentados por distintos MHC, pero no se han estudiado las vías de procesamiento antigénico de dichos epítomos desconociéndose, por tanto, si alguno es presentado independiente del proteasoma y de TAP. En el contexto de HLA-B7 se han identificado tres epítomos en ratones transgénicos (Pasquetto, V y col. 2005) y otros cuatro en humanos (Oseroff, C y col. 2005).

OBJETIVOS

Identificar epítomos de vaccinia presentados independientemente de TAP.

Estudiar las vías de procesamiento de dichos epítomos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Productos químicos e inmuoquímicos

Las sales inorgánicas, ácidos, bases y compuestos orgánicos (metanol, paraformaldehído, etanol, etc.) fueron suministrados por Sigma-Aldrich, así como el dimetilsulfóxido, el detergente Chaps, el β -mercaptoetanol, la brefeldina y los distintos inhibidores de proteasas empleados salvo la leupeptina (Amersham-UBS) y la lactacistina (Dr. E. J. Corey, Harvard University, Cambridge, MA).

Para los ensayos de fijación y permeabilización de las células se empleó el kit IntraStain (Dako) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los anticuerpos empleados fueron α -CD8-FITC (ProImmune), α -IFN- γ -PE (BD Biosciences) y α -vaccinia-FITC (ViroStat).

Péptidos

Todos los péptidos se sintetizaron en un equipo de Applied Biosystems, modelo 433A. Su identidad se confirmó por espectrometría de masas en un equipo de MALDI-TOF (Unidad de Proteómica, Centro Nacional de Microbiología, Madrid, España).

Virus recombinantes de vaccinia

Se utilizaron los siguientes virus cedidos generosamente por el Doctor Bernard Moss: WR es la cepa silvestre Western Reserve (WR), rVV-ENV recombinante que expresa la glicoproteína de la envuelta de la cepa IIB del virus VIH-1.

Líneas celulares

La línea celular linfoblastoide humana T2 es deficiente en TAP, LMP-2 y LMP-7. La línea celular T2/B27 deriva de la anterior por transfección del alelo de clase I humano HLA-B27. La línea celular RMA/B7 procede del linfoma murino RMA transfectado con HLA-B7. Análogamente el transfectante RMA/B7 procede de la línea deficiente en TAP RMA. Todas las líneas celulares empleadas se crecieron en medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con 2 mM de glutamina, 5×10^{-5} M de β -mercaptoetanol y 10% SBF a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂ y 98% de humedad.

Ratones

Se emplearon ratones transgénicos que son deficientes en H-2D^b y en β2-microglobulina murina y expresan HLA-B7. El transgén codifica para las subunidades α₁ y α₂ humanas y α₃ murina derivada de D^b, lo que permite la interacción con CD8 murino. Los ratones fueron originariamente producidos en el laboratorio del Dr. Lemmonier (Laboratorio Pasteur, Paris, Francia).

Adicionalmente se emplearon ratones de las cepas: BALB/C (H-2^d), C3H (H-2^k) y SJL (H-2^s).

Infecciones virales

Las células se incubaron durante 1 h con los distintos rVV a la multiplicidad de infección (moi) correspondiente, en un volumen de 200 μl/10⁶ células. Tras la adsorción viral las células fueron diluidas cinco veces con RPMI suplementado con 10% de SBF. Se dejó desarrollar la infección incubando las células a 37°C durante 20 h. Inicialmente 10⁸ células T2/B27 se infectaron con rVV-ENV a moi 10 y una vez confirmada la infección por citometría con el anticuerpo α-vaccinia, dichas células se emplearon como inóculo de nuevas células T2/B27 sanas hasta llegar a 4x10¹⁰ células.

Obtención y mantenimiento de CTLs específicos

Se infectaron intraperitonealmente ratones hembras transgénicos con 10⁷ unidades formadoras de placa (u.f.p.)/ratón del virus rVV-ENV. Tras al menos diez días, los animales fueron sacrificados y se aislaron los esplenocitos que fueron cultivados en medio αMEM al 10% de SBF inactivado con distintas concentraciones de péptido en solución, según el epítipo. Semanalmente se añadieron esplenocitos autólogos de ratones naive preincubados con el péptido correspondiente junto con IL-2 tal y como se describió previamente (López y col. 2000).

Los CTLs específicos frente a los epítipos TAP-independientes de vaccinia se reestimularon *in vitro* con células RMA/SB7 infectadas previamente con rVV-ENV (a MOI 40) y tratadas con mitomicina. En las reestimulaciones semanales se emplearon, de forma alterna, esplenocitos de ratones con diferentes haplotipos: H-2^d, H-2^k, H-2^s.

Ensayos de ICS con CTLs

Se incubaron 10⁶ dianas (infectadas o preincubadas con el péptido correspondiente) con 3x10⁵ CTLs durante 4h en presencia de 5 μg/ml de BFA. Pasado este tiempo los CTLs se permeabilizaron con el kit IntraStain de DAKO y se tiñeron con α-CD8-FITC y α-IFN-γ-PE. Las células se analizaron por citometría de flujo.

Ensayos de inhibición

Todos los inhibidores se añadieron quince minutos antes de la infección y se mantuvieron a una concentración 5 veces mayor durante la hora de adsorción, tras este tiempo se diluyó hasta la concentración final (Tabla 1) y se dejó progresar la infección durante 20 horas. La respuesta de los CD8 a las células con los distintos inhibidores se cuantificó por ICS.

Tabla 1

INHIBIDOR	ABREVIATURA	ESPECIFICIDAD	CONCENTRACIÓN EMPLEADA
Brefeldina	BFA	Bloquea el paso del MHC-I por el cis-golgi	5µg/ml
Lactacistina	LC	Proteasoma	50µM
Leupeptina	LEU	Proteasas tipo tripsina y cistein-proteasas	100µM
Pepstatina	PEPST	Aspártico-proteasas	100µM
Fenantrolina	PHE	Metalo-proteasa y caspasa-1	50µM
E64	E64	Cistein-proteasas	50µM

El porcentaje de inhibición se calcula como: $100 \times (\%CD8 \text{ IFN-}\gamma \text{ positivos con dianas infectadas} - \%CD8 \text{ IFN-}\gamma \text{ positivos con dianas infectadas en presencia del inhibidor}) / (\%CD8 \text{ IFN-}\gamma \text{ positivos con dianas infectadas} - \%CD8 \text{ IFN-}\gamma \text{ positivos con dianas sin infectar})$.

Inmunoprecipitación de péptidos unidos al MHC

Se llevó a cabo como describieron previamente Paradela y col., 1998, con pequeñas modificaciones. 4×10^{10} células T2/B27 sin infectar ó infectadas se lisaron a 4°C en buffer Tris/HCl 20mM, 150mM NaCl y 1% Chaps (pH 7.5) con una mezcla de inhibidores de proteasas. Los lisados celulares se cromatografiaron sucesivamente por tres columnas de proteína G a las que previamente se habían unido anticuerpos específicos para HLA-B27 (ME1), HLA-A2 (PA2.1) ó uno monomórfico para HLA de clase I (W6/32) respectivamente. Los péptidos unidos a HLA se eluyeron de la columna con 0.1% de ácido trifluoroacético a temperatura ambiente y se separaron de la cadena pesada de HLA mediante Centricon 3 (Amicon, Beverly, MA). Posteriormente las sales se eliminaron mediante HPLC de fase reversa. La mezcla de péptidos se analizó en un espectrómetro de masas tipo trampa iónica modelo Orbitrap (Thermo Scientific). Mediante un análisis bioinformático utilizando el programa Sequest (Thermo Scientific) junto con la base de datos no redundante del "National Center for Biotechnology Information" se procedió a asignar una secuencia peptídica a cada espectro de fragmentación.

RESULTADOS

Epítomos independientes de TAP presentados por HLA-B7

Se procedió a generar una línea de CTLs, a partir de esplenocitos de ratones transgénicos HLA-B7, que reconocieran epítomos TAP independientes de vaccinia reestimulándolos con RMA-S-B7 (células defectivas en TAP) y se testaron en ICS con los siete péptidos descritos previamente en la bibliografía. Se observó reconocimiento en dos casos: uno identificado anteriormente en ratones transgénicos (D1R₈₀₈₋₈₁₇) y otro en humanos (J6R₃₀₃₋₃₁₁). Estos resultados indican que los mencionados epítomos se generan por vías TAP-independientes. Para identificar las proteasas implicadas en la formación de estos epítomos se realizaron ensayos de ICS en presencia de distintos inhibidores de las diferentes familias de proteasas (tabla 1) con CTLs específicos para cada uno de los péptidos. Se incluyó como control de CTLs TAP-dependientes el descrito en ratones transgénicos, A34R₈₂₋₉₀. (Figura 1)

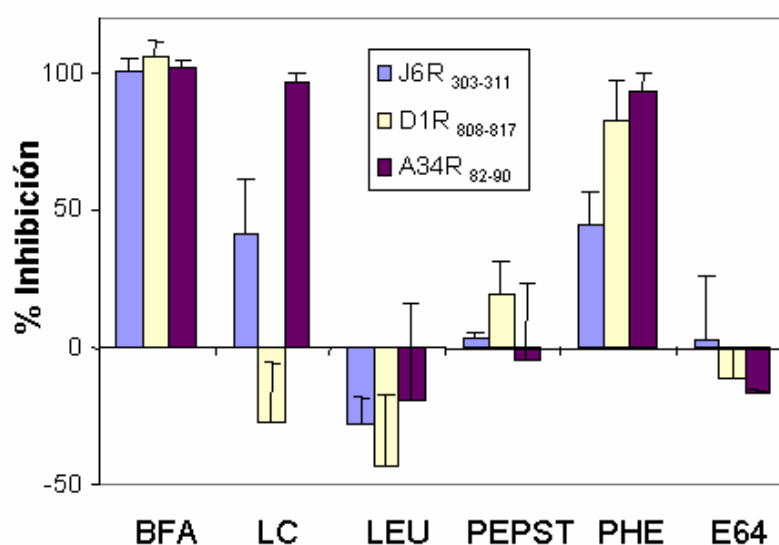


Figura 1: Ensayo de ICS en presencia de inhibidores de las distintas familias de proteasas (tabla 1). En azul el epítomo J6R₃₀₃₋₃₁₁, en amarillo D1R₈₀₈₋₈₁₇ y en violeta A34R₈₂₋₉₀. En la gráfica se representan los porcentajes de inhibición con su desviación estándar.

Mediante el inhibidor BFA que bloquea la salida a membrana del MHC se demostró que todos ellos requieren de procesamiento endógeno. Con el uso de lactacistina se comprobó la implicación del proteasoma en el procesamiento de cada uno de los epítomos. Como era de esperar, el epítomo A34R₈₂₋₉₀ es proteasoma-dependiente ($96 \pm 4\%$ de inhibición con LC). Por el contrario, D1R₈₀₈₋₈₁₇ es independiente del proteasoma ($-27 \pm 22\%$ de inhibición con LC). La inhibición parcial con lactacistina de la presentación del epítomo J6R₃₀₃₋₃₁₁ ($42 \pm 19\%$ de inhibición) sugiere la existencia de dos vías de procesamiento. Inhibidores de otras familias de proteasas como leupeptina, pepstatina y E64 no tienen ningún efecto en la presentación de ninguno de los tres péptidos, mientras que la 1,10-fenantrolina sí que afecta a la presentación de los mismos en distinta medida. Para confirmar que la inhibición de los tres epítomos con fenantrolina es específica se realizaron en paralelo experimentos de inhibición con otros CTLs específicos de un cuarto epítomo, cuya presentación no era inhibida en modo alguno por dicho inhibidor (datos no mostrados).

Obtención de epítomos TAP-independientes de vaccinia presentados por HLA-A2

Se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de los péptidos unidos a HLA-A2 de células infectadas con rVV-ENV. El posterior análisis de espectrometría de masas permitió identificar dos epítomos TAP-independientes tal y como muestran los espectros de fragmentación MS/MS obtenidos experimentalmente de la figura 2A y 2B. Los epítomos identificados corresponden a los péptidos ILDRITNA (A10L₆₈₈₋₆₉₆) y MLDDFSAGA (A17L₉₋₁₇) procedentes de las proteínas A10L y A17L respectivamente que se encuentran presentes en el virión de vaccinia. Se sintetizaron ambas secuencias peptídicas y se confirmó que los espectros de fragmentación de ambos péptidos sintéticos coincidían con los experimentales, tal y como muestra la figura 2C y 2D.

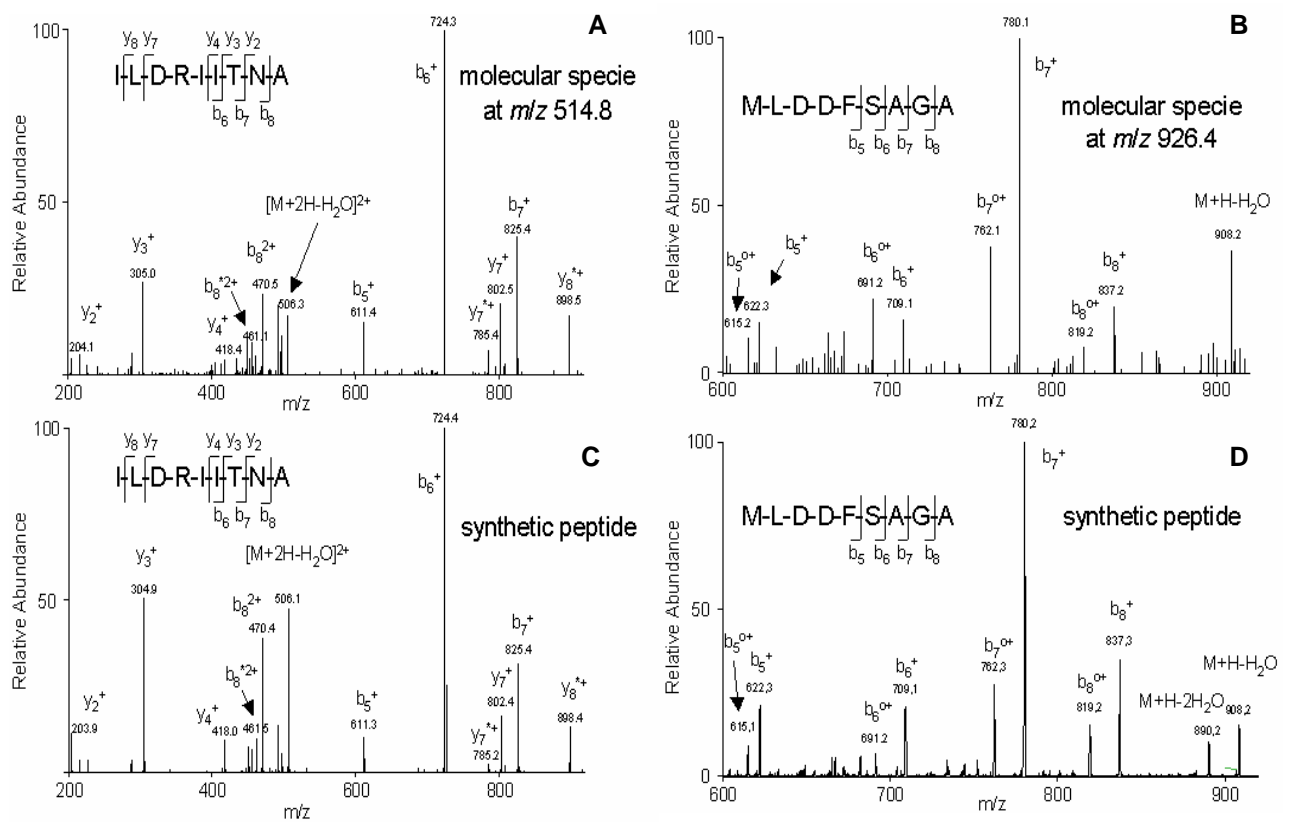


Figura 2: Espectros de fragmentación experimentales (A y B) y sintéticos (C y D) de los péptidos obtenidos de la inmunoprecipitación del HLA-A2 de células infectadas con vaccinia, A10L₆₈₈₋₆₉₆ (A y C) y A17L₉₋₁₇ (B y D). En la parte superior izquierda de cada panel se muestra la secuencia de aminoácidos y los iones correspondientes a las series y b detectados en los distintos espectros.

DISCUSIÓN

Epítomos de HLA-B7

Se han estudiado las vías de procesamiento antigénico de tres epítomos de vaccinia presentados por la molécula HLA-B7. El primero de ellos, A34R₈₂₋₉₀ al inhibirse su presentación en presencia de lactacistina y fenantrolina implica tanto al proteasoma como a una metaloproteasa en la generación del epítomo. Por tanto la explicación más lógica y que además coincide con lo previamente publicado para la mayoría de los epítomos de MHC de clase I, sería un procesamiento inicial por parte del proteasoma seguido de un recorte por la metaloaminopeptidasa ERAAP. Por el contrario, el epítomo D1R₈₀₈₋₈₁₇ cuya presentación sólo es sensible a fenantrolina se formaría independientemente del proteasoma, estando una metaloproteasa involucrada en su procesamiento. El epítomo J6R₃₀₃₋₃₁₁ presentaría una situación intermedia en la que parece haber dos vías de presentación, una dependiente de proteasoma y otra dependiente de una metaloproteasa. (Figura 3)

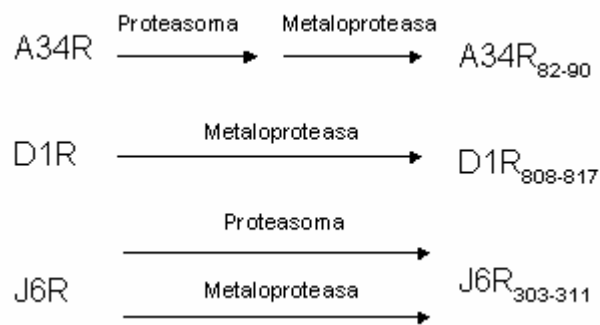


Figura 3: Modelo de las vías de procesamiento propuestas para los distintos epítomos según los resultados obtenidos en los ensayos de inhibición.

Las proteínas D1R, J6R y A34R son proteínas tempranas que se encuentran presentes en el virión, de ellas A34R es la única que al ser N-glicosilada se transporta a través de la vía secretoria y por tanto, su epítomo podría ser presentado independientemente de TAP. Sin embargo, los datos obtenidos demuestran que los epítomos derivados de las proteínas D1R y J6R se pueden procesar por vías TAP-independientes. El modo en que estos péptidos o estas proteínas entran en contacto con la vía secretoria se desconoce. Ya que durante el ensamblaje de las proteínas del virión, éste se recubre de membranas provenientes del compartimento intermedio entre el RE y el aparato de Golgi, una posible explicación es que una vez finalizado el proceso, las membranas puedan volver a fusionarse con el RE ó con el Golgi arrastrando consigo proteínas o péptidos del virión de vaccinia.

En conjunto, los datos demuestran la existencia de múltiples vías de formación de epítomos. Posteriores experimentos permitirán caracterizar en detalle las enzimas implicadas en estas vías de procesamiento antigénico.

Epítomos de HLA-A2

Los epítomos identificados por espectrometría de masas, A10L₆₈₈₋₆₉₆ y A17L₉₋₁₇, corresponden a una proteína estructural de vaccinia (A10L) y otra de membrana (A17L) respectivamente, ambas de expresión tardía y presentes en el virión. Para el ensamblaje del virión ambas proteínas deben ser procesadas por una cistein proteasa del propio virus (I7L). El procesamiento de A10L consiste en dos cortes, entre los residuos 614-615 y 697-698, generando un fragmento de 83 aminoácidos. El epítomo identificado en dicha proteína quedaría adyacente al extremo carboxilo terminal de dicho fragmento (Figura 4). Además, I7L procesa a la proteína A17L en su región amino terminal entre los residuos 16-17 o 18-19 (Ansarah-Sobrinho y Moss 2004). Por tanto, podría generarse un fragmento de 16 residuos con el epítomo identificado destruido o bien un fragmento de 18 residuos que dejaría al epítomo adyacente al carboxilo terminal del fragmento, de forma análoga al epítomo anterior. (Figura 4)

```
A10L    661 afknnlsrfi esg ditgedi fcampynild riitnag|tct vsigdmldni ttqsdcnmtn 720
A17L    1 msylryynml ddfsag |ag| vl dkdlfteeqq qsfmpkdggm mqndyggmnd ylgifknndv 60
```

Figura 4: Sitios de corte de I7L en las proteínas A10L y A17L. Sólo se muestra un fragmento de ambas proteínas en el que se encuentran los epítomos identificados, en rojo.

Por todo ello, se estudiará la posible implicación de I7L en el procesamiento de los dos epítomos mencionados.

CONCLUSIONES

Hemos identificado cuatro epítomos de vaccinia independientes de TAP presentados dos de ellos por HLA-B7 y otros dos por HLA-A2.

El epítomo D1R₈₀₈₋₈₁₇ se forma independientemente del proteasoma.

Los tres epítomos presentados por HLA-B7 son procesados por una metaloproteasa.

BIBLIOGRAFÍA

Ansarah-Sobrinho, C. y Moss, B. Role of the 17 protein in proteolytic processing of vaccinia virus membrane and core components. *J. Virol.* 2004 Jun;78(12):6335-43.

del Val M., López D. Multiple proteases process viral antigens for presentation by MHC class I molecules to CD8(+) T lymphocytes. *Mol Immunol.* 2002 Oct;39(3-4):235-47. Review.

López, D., Gil-Torregrosa, B.C., Bergmann, C., Del Val, M. Sequential cleavage by metallopeptidases and proteasomes is involved in processing HIV-1 ENV epitope for endogenous MHC class I antigen presentation. *J. Immunol.* 2000 May 15;164(10):5070-7.

Oseroff, C., Kos, F., Bui, H.H., Peters, B., Pasquetto, V., Glenn, J., Palmore, T., Sidney, J., Tschärke, D.C., Bennink, J.R., Southwood, S., Grey, H.M., Yewdell, J.W., Sette, A. HLA class I-restricted responses to vaccinia recognize a broad array of proteins mainly involved in virulence and viral gene regulation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2005 Sep 27;102(39):13980-5.

Paradela, A., M. Garcia-Peydro, J. Vazquez, D. Rognan, and J. A. Lopez de Castro. The same natural ligand is involved in allorecognition of multiple HLA-B27 subtypes by a single T cell clone: role of peptide and the MHC molecule in alloreactivity. *J. Immunol.* 1998: 161:5481.

Pasquetto, V., Bui, H.H., Giannino, R., Mirza, F., Sidney, J., Oseroff, C., Tschärke, D.C., Irvine, K., Bennink, J.R., Peters, B., Southwood, S., Cerundolo, V., Grey, H., Yewdell, J.W., Sette, A. HLA-A*0201, HLA-A*1101, and HLA-B*0702 Transgenic Mice Recognize Numerous Poxvirus Determinants from a Wide Variety of Viral Gene Products. *The Journal of Immunology*, 2005, 175: 5504-5515.

Risco, C., Rodríguez, JR., López-Iglesias, C., Carrascosa, JL., Esteban, M., Rodríguez, D. Endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment membranes and vimentin filaments participate in vaccinia virus assembly. *J. Virol.* 2002 Feb;76(4):1839-55.

Schmelz, M., Sodeik, B., Ericsson, M., Wolffe, E., Shida, H., Hiller, G., Griffiths, G. Assembly of vaccinia virus: the second wrapping cisterna is derived from the trans Golgi network. *J Virol* 1994;68:130–147.

York, IA., Rock, KL. Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. *Annu. Rev. Immunol.* 1996;14:369-96.