

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DEPARTAMENTO DE  
BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

**O papel do  
imunoproteassoma na  
resposta imune contra a  
infecção pela bactéria  
*Brucella abortus***

Gabriela Guimarães Machado

Belo Horizonte – MG  
Setembro – 2017

Gabriela Guimarães Machado

**O papel do  
imunoproteossoma na  
resposta imune contra a  
infecção pela bactéria  
*Brucella abortus***

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em  
Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências  
Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais  
como requisito para a obtenção do título de Doutor  
em Imunologia

Área de Concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Sergio Costa Oliveira  
Co-orientador: Dr. Marco Túlio Ribeiro Gomes

Belo Horizonte – MG  
Setembro – 2017



Universidade Federal de Minas Gerais  
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG  
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha  
 31270-901 – Belo Horizonte – MG  
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



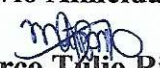
**ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE GABRIELA GUIMARÃES MACHADO.** Aos vinte e seis dias do mês de setembro de 2017 às 14:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado ""O papel do imunoproteossoma na resposta imune contra a infecção pela bactéria *Brucella abortus*"" , requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Imunologia. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Sérgio Costa Oliveira, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Flávio Guimarães da Fonseca (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Renata Meirelles S. Pereira (Universidade Federal do Rio de Janeiro), aprovada; Dr. Gilson Costa Macedo (Universidade Federal de Juiz de Fora), aprovada; Dr. Flávio Almeida Amaral (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Marco Túlio Ribeiro Gomes - Coorientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Sérgio Costa Oliveira - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada APROVADA. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 26 de setembro de 2017.

  
 Dr. Flávio Guimarães da Fonseca (UFMG)


  
 Dra. Renata Meirelles S. Pereira (Universidade Federal do Rio de Janeiro)

  
 Dr. Gilson Costa Macedo (Universidade Federal de Juiz de Fora)

  
 Dr. Flávio Almeida Amaral (UFMG)

  
 Dr. Marco Túlio Ribeiro Gomes - Coorientador (UFMG)

  
 Dr. Sérgio Costa Oliveira - Orientador (UFMG)

  
 Profª Leda Quercia Vieira  
 Coordenadora do Curso de Pós Graduação  
 em Bioquímica e Imunologia  
 ICB - UFMG

*Dedico este trabalho à minha mãe por ser minha maior incentivadora, por todo o amor, acolhimento e carinho. Por ter vibrado com as minhas conquistas mas também ter vivido as dificuldades como se fossem dela. Obrigada também por ser meu maior exemplo de força e dedicação e por ter me proporcionado tudo para que eu pudesse ir atrás de conquistar meus objetivos.*



## **Agradecimentos**

Ao Professor Dr. Sergio Costa pela confiança, pela compreensão em diversos momentos e por me dar o suporte para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Marco Túlio Ribeiro Gomes, por ser o melhor co-orientador que alguém pode ter. Obrigada por todos os ensinamentos, pelas discussões, pela paciência, pela preocupação, pela disponibilidade, pela amizade e pelo apoio. Sem você este trabalho não teria acontecido. Minha eterna gratidão!

À Priscila, por ter me ensinado as técnicas do laboratório, pelas opiniões, pelas críticas e sugestões, mas principalmente por ter se tornado uma “irmã” para mim, compartilhando cada segundo de dificuldade e demonstrando um carinho e apoio enormes.

Ao Natan e ao Fábio pela ajuda com os experimentos de FACS, pela disponibilidade e paciência de sempre.

À Erika por em pouco tempo ter se tornado peça importante do dia a dia no laboratório e na vida, ajudando sempre que preciso e principalmente pela amizade.

À Sandra por tornar o laboratório um ambiente organizado e por facilitar o andamento dos experimentos. Obrigada também pela compreensão nos momentos de dificuldade.

Aos colegas do LIDI, pelas ajudas com os experimentos, pelas discussões e pela agradável convivência diária.

Aos Professores Dr. Carlos Chávez, Dra. Liza Felicori e Dra. Camila Lopes por terem feito parte da minha trajetória acadêmica e por terem se tornado pessoas tão importantes na minha vida.

Às amigas do Labimq que mesmo de longe continuaram compartilhando os momentos de stress e dificuldades mas também as alegrias e conquistas. Obrigada por

terem se tornado amigas tão especiais com as quais eu pude contar inúmeras vezes ao longo de todos esses anos!

Aos membros da banca, por terem aceitado o convite de avaliar este trabalho.

Aos professores, colegas e funcionários do Departamento de Bioquímica e Imunologia, pelos ensinamentos e ajuda sempre que necessário.

À CAPES pelo suporte financeiro.

Aos meus amigos e familiares pela torcida constante.

Aos meus pais e ao Thiago, por serem meu apoio incondicional, sem o suporte e amor de vocês eu não teria condições de concluir este trabalho.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

Muito Obrigado!

## Resumo

O imunoproteassoma é uma isoforma de proteassoma constituído por três subunidades denominadas LMP2, LMP7 e MECL-1. Sua atividade proteolítica aumenta a quantidade e a qualidade dos peptídeos a serem apresentados pelas moléculas de MHC de classe I às células T CD8<sup>+</sup>. Por esta razão, esta isoforma especializada de proteassoma desempenha um importante papel no controle de infecções em hospedeiros. Neste trabalho, foi abordado o papel do imunoproteassoma durante a infecção por *Brucella abortus*, uma bactéria Gram-negativa, intracelular facultativa, patogênica para humanos e animais, cuja resposta imune protetora é dependente dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>. Vários trabalhos demonstraram a importância do imunoproteassoma no controle de infecções por diferentes patógenos por meio da utilização de camundongos *knockout* para uma ou duas subunidades do imunoproteassoma. Nós buscamos investigar, pela primeira vez, o impacto da ausência das três subunidades desta estrutura durante a infecção por uma bactéria intracelular. Para isto, a infecção por *B. abortus* foi induzida em camundongos triplo *knockout* para o imunoproteassoma, que se mostraram mais susceptíveis à infecção bacteriana, devido a uma diminuição na produção de IFN- $\gamma$  por linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup>. Além disso, a ausência do imunoproteassoma teve um impacto sobre a expressão de moléculas de MHC-I na superfície de células dendríticas e na geração e apresentação de antígenos por essas células. A função dos linfócitos T, que desempenha um papel fundamental na imunidade adaptativa contra *B. abortus*, também foi comprometida, tendo sido observada uma redução na produção de granzima-B e conseqüentemente na atividade citotóxica dos linfócitos T CD8<sup>+</sup>. Em conclusão, esses resultados sugerem fortemente que o imunoproteassoma é importante na resistência do hospedeiro à infecção por *B. abortus*, impactando tanto a magnitude quanto a qualidade das respostas das células T CD8<sup>+</sup>.

## Abstract

The immunoproteasome is a specific proteasome isoform constituted of three subunits termed  $\beta 1i$ ,  $\beta 2i$  and  $\beta 5i$ . Its proteolytic activity enhances the quantity and quality of peptides to be presented by MHC class I molecules to CD8<sup>+</sup> T cells. However, the role of combined deficiency of the three immunoproteasome subunits in protective immunity against bacterial pathogens have not been investigated. In this study, we addressed the role of immunoproteasome during *Brucella abortus* infection, an intracellular bacterium that requires CD8<sup>+</sup> T cell responses for control of infection. Here, we demonstrate that immunoproteasome triple knockout mice (TKO) were more susceptible to the *Brucella* infection. This observed susceptibility was accompanied with reduced IFN- $\gamma$  production by mouse CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. Moreover, the absence of the immunoproteasome had an impact on dendritic cells MHC-I surface expression and antigen presentation by these cells. CD8<sup>+</sup> T cell function, which plays a pivotal role in *B. abortus* immunity, also presented partial impairment of granzyme-B expression and consequently reduced cytotoxic activity. In conclusion, these results strongly suggest that immunoproteasome subunits are important components in host resistance to *B. abortus* infection by impacting both the magnitude and quality of CD8<sup>+</sup> T cell responses.

## Lista de Figuras

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1:</b> Bactérias do gênero <i>Brucella</i> .....   | 16 |
| <b>Figura 2:</b> Formas de transmissão de Brucelose.....   | 18 |
| <b>Figura 3:</b> Modelo de tráfego intracelular de <i>Brucella</i> .....   | 21 |
| <b>Figura 4:</b> Estrutura do proteassoma 20S em eucariotos.....   | 26 |
| <b>Figura 5:</b> Porção 20S dos subtipos de proteassoma.....   | 27 |
| <b>Figura 6:</b> Análise da população de linfócitos e células dendríticas em esplenócitos e de camundongos C57BL/6, TKO e IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> não infectados.....   | 46 |
| <b>Figura 7:</b> Análise da população de linfócitos e células dendríticas em linfonodos de camundongos C57BL/6, TKO e IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> não infectados.....   | 47 |
| <b>Figura 8:</b> Cinética de infecção em camundongos C57BL/6, TKO e IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> .....   | 48 |
| <b>Figura 9:</b> Produção de IFN- $\gamma$ pelas células dos baços de camundongos C57BL/6, TKO e IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> infectados com <i>B. abortus</i> .....   | 50 |
| <b>Figura 10:</b> Análise da população de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> e T CD8 <sup>+</sup> em esplenócitos de camundongos C57BL/6, TKO e IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> infectados com <i>B. abortus</i> .....                             | 51 |
| <b>Figura 11:</b> Análise da população de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> e T CD8 <sup>+</sup> produtores de IFN- $\gamma$ em esplenócitos de camundongos C57BL/6, TKO e IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> infectados com <i>B. abortus</i> ..... | 53 |
| <b>Figura 12:</b> Expressão de MHC-I e MHC-II por células dendríticas de TKO e C57BL/6....   | 55 |
| <b>Figura 13:</b> Produção de citocinas pró-inflamatórias por células dendríticas derivadas de medula óssea de camundongos TKO e C57BL/6.....  | 58 |
| <b>Figura 14:</b> Lise de macrófagos infectados com <i>B. abortus</i> por esplenócitos de C57BL/6 e TKO.....   | 60 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 15:</b> Lise de células dendríticas infectadas com <i>B. abortus</i> por esplenócitos de C57BL/6 e TKO.....  | 62 |
| <b>Figura 16:</b> Expressão de do peptídeo SIINFEKL conjugado à MHC-I na superfície de células dendríticas de TKO e C57BL/6.....   | 63 |
| <b>Figura 17:</b> Dot plot demonstrando o perfil das células antes e depois do <i>cell sorting</i> ...   | 65 |
| <b>Figura 18:</b> Lise de células dendríticas infectadas com <i>B. abortus</i> por linfócitos T CD4 <sup>+</sup> e T CD8 <sup>+</sup> de C57BL/6 e TKO.....                                    | 67 |
| <b>Figura 19:</b> Análise da produção de granzima-B por linfócitos T CD4 <sup>+</sup> e T CD8 <sup>+</sup> de esplenócitos de camundongos C57BL/6 e TKO infectados com <i>B. abortus</i> ..... | 69 |
| <b>Figura 20:</b> Modelo esquemático da resposta de células T CD8 <sup>+</sup> durante <i>B. abortus</i> em animais TKO.....   | 78 |



## Lista de abreviaturas

µg – Micrograma

µl – Microlitro

µm – micrômetro

APC – Célula apresentadora de antígenos

BMDC – célula dendrítica derivada de medula óssea

BMDM – macrófago derivado de medula óssea

BSA – albumina bovina sérica

CD – grupo de diferenciação

CFU – unidade formadora de colônia

Con-A – concanavalina A

DC – Célula dendrítica

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DNA – ácido desoxirribonucléico

ELISA – ensaio de absorção imunoenzimático

ERK – *extracellular signal-regulated protein kinase*

FBS – soro fetal bovino

FITC – isotiocianato de fluoresceína

GM-CSF – Fator Estimulador de Colônia Granulócito Macrófago

HBSS – *Hank's balanced salt solution*

IFN – interferon

IL – Interleucina (vários tipos: 1, 6, 12, etc.)

JNK – *c-Jun NH2-terminal kinase*

KO – *knockout*

LAMP-1 – proteína 1 de membrana associada ao lisossomo

LCCM – *L929 cell conditioned medium*

Log – logarítmo

LPS – Lipopolissacarídeo

M – Molar

MAP cinase – proteína cinase ativada por mitógeno

M-CSF – fator estimulador de colônias de monócitos

mg – Miligrama

MHC – Complexo principal de histocompatibilidade

mL – Mililitro

mM – Milimolar

MOI – multiplicidade de infecção

MyD88 – fator de diferenciação mielóide 88

NF- $\kappa$ B – fator nuclear kappa B

ng – nanograma

NK – matadora natural

NLRs – *NOD-like receptor*

nm – nanômetros

nM – nanomolar

NOD – *nucleotide-binding oligomerization domain*

PAMP – padrão molecular associado a patógeno

PBS – Tampão salina fosfato (phosphate-buffered saline)

PE – ficoeritrina pg – picograma

pH – potencial hidrogeniônico

PRRs – receptores que reconhecem padrões

RNA – ácido ribonucléico

rpm – Rotações por minuto

Th1 - Células T auxiliares do tipo 1

Th2 – Células T auxiliares do tipo 2

TIR – domínio dos receptores tipo Toll-IL-1R

TKO – animais triplo *knockout* para o imunoproteassoma

TLR – receptor do tipo Toll

TNF- $\alpha$  - Fator de necrose tumoral alfa

# Sumário

|  |    |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO  |    |
| 1.1 O gênero <i>Brucella</i> .....   | 16 |
| 1.2 Brucelose.....   | 17 |
| 1.3 Patogênese .....   | 19 |
| 1.4 Diagnóstico e Tratamento .....   | 21 |
| 1.5 Resposta Imune à <i>Brucella</i> .....   | 22 |
| 1.5.1 Resposta Imune inata .....   | 22 |
| 1.5.2 Resposta Imune adaptativa.....   | 23 |
| 1.5 Proteólise intracelular .....  | 25 |
| 1.6 O imunoproteassoma.....  | 28 |
| 2. JUSTIFICATIVA .....   | 31 |
| 3. OBJETIVOS   |    |
| 3.1 Geral .....  | 34 |
| 3.2 Específicos.....   | 34 |
| 4. METODOLOGIA   |    |
| 4.1 Animais experimentais.....   | 37 |
| 4.2 Cepas bacterianas.....   | 37 |
| 4.3 Infecção e análise da resposta imunológica .....                                 | 37 |
| 4.4 Determinação do número de unidades formadoras de colônia (UFC) .....             | 38 |
| 4.5 Cultura de esplenócitos.....   | 38 |
| 4.6 Análise por citometria de fluxo.....   | 39 |
| 4.7 Diferenciação de Macrófagos e Células Dendríticas derivadas de medula óssea..... | 40 |
| 4.8 Detecção do complexo MHC-I_SIINFEKL na superfície de células dendríticas.....    | 41 |
| 4.9 Isolamento de linfócitos através de <i>Cell Sorting</i> .....                    | 42 |
| 4.10 Ensaio de Citotoxicidade.....   | 42 |

|  |    |
|--|----|
| 4.11 Dosagem de Citocinas.....   | 43 |
| 4.12 Análises Estatísticas.....  | 43 |
| <b>5. RESULTADOS</b>   |    |
| 5.1 Perfil de populações de células imunes de animais C57BL/6 e TKO não infectados .....   | 45 |
| 5.2 Avaliação da infecção por <i>B. abortus</i> em camundongos C57BL/6 e TKO.....  | 48 |
| 5.3 Produção de IFN- $\gamma$ por esplenócitos de C57BL/6 e TKO infectados por <i>B. abortus</i> .....                           | 49 |
| 5.4 Perfil de populações de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> e T CD8 <sup>+</sup> de animais infectados por <i>B. abortus</i> ..... | 51 |
| 5.5 Determinação das subpopulações de linfócitos produtores de IFN- $\gamma$ após a infecção por <i>B. abortus</i> .....         | 53 |
| 5.6 Expressão de MHC-I por células dendríticas de animais C57BL/6 e TKO.....   | 55 |
| 5.7 Produção de citocinas pró-inflamatórias por células dendríticas de C57BL/6 e TKO .....                                       | 57 |
| 5.8 Citotoxicidade de esplenócitos primados contra macrófagos infectados como células-alvo.....                                  | 59 |
| 5.9 Citotoxicidade de esplenócitos primados contra células dendríticas infectadas.....   | 61 |
| 5.10 Transfecção de células dendríticas com OVA e quantificação da apresentação do epítopo SIINFEKL.....                         | 62 |
| 5.11 Purificação de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> e T CD8 <sup>+</sup> e análise da citotoxicidade.....                          | 64 |
| 5.12 Avaliação da produção de granzima-B por linfócitos T CD4 <sup>+</sup> e T CD8 <sup>+</sup> .....                            | 68 |
| 6. DISCUSSÃO .....   | 70 |
| 7. CONCLUSÃO .....   | 79 |
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....  | 81 |
| 9. ANEXO .....   | 94 |

## **1. Introdução**



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 O gênero *Brucella*

As bactérias do gênero *Brucella*, representadas na Figura 1, são cocobacilos Gram-negativos, intracelulares facultativos, não formadores de esporos e de crescimento aeróbico (Corbel & Morgan, 1984). Apresentam crescimento ótimo a 37°C em meio com pH entre 6,6 a 7,4 (Morgan, 1990).



**Figura 1: Bactérias do gênero *Brucella*.** Imagem obtida de University of Georgia Veterinary College. Brucellosis. Introduction. 2002.

Antigos relatos da humanidade já evidenciaram dados de infecção por bactérias do gênero *Brucella*, pois análises antropológicas de esqueletos datados do ano 79 D.C. revelaram a presença destas bactérias (Caspasso, 2002). No ano de 1859, foi descrita como uma doença infecciosa que apresentava sintomas de fadiga (Vassallo, 1992). Mas apenas em 1887, David Bruce isolou na ilha de Malta o microrganismo causador desta doença que foi denominado *Micrococcus melitensis* (Nicoletti, 2002).

Alguns anos depois, no ano 1895, Berhard Bang, isolou um cocobacilo Gram-negativo de tecidos bovinos abortados e denominou-o *Bacillus abortus*. No entanto, estudos com os dois microrganismos verificaram a grande similaridade entre eles e, diante desse fato, foi decidido homenagear o descobridor deste gênero, denominando-

o *Brucella* (Nicoletti, 2002).

Dez espécies do gênero *Brucella* já foram descritas. Estas espécies foram nomeadas de acordo com os hospedeiros das quais foram isoladas: *Brucella abortus* isolada de bovinos, *Brucella melitensis* isolada de caprinos, *Brucella ovis* isolada de ovinos, *Brucella suis* isolada de suínos, *Brucella canis* isolada de caninos, *Brucella neotomae* isolada de um rato do deserto americano, *Brucella cetaceae* e *Brucella pinnipediae*, ambas isoladas de mamíferos marinhos (Clockaert et al. 2001; Christopher et al. 2010). Recentemente, outras duas espécies foram descritas, *Brucella microti*, isolada de roedores e *Brucella inopinata*, isolada de uma infecção de transplante mamário de seres humanos (Audic et al. 2009; Scholz et al. 2010)

Das espécies identificadas, *B. melitensis*, *B. suis* e *B. abortus* são capazes de infectar seres humanos (Moreno et al., 2002). A espécie *B. abortus* é a mais difundida pelo mundo, sendo então responsável pelo maior número de casos de infecção por bactérias deste gênero (Corbel, 1997). *B. melitensis*, por sua vez, é a espécie mais virulenta para o homem (Solera, 2010).

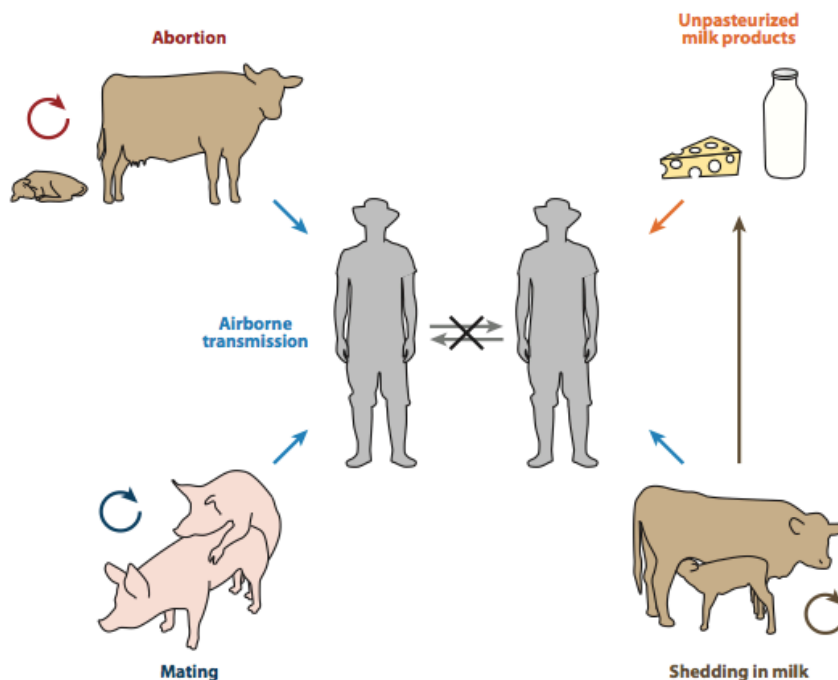
## 1.2 Brucelose

Brucelose é uma zoonose causada por bactérias do gênero *Brucella*. Está na lista de doenças da *World Organization for Animal Health* (Organização Mundial de Saúde Animal – OIE) sendo considerada por este órgão como uma doença de importância sócio-econômica uma vez que pode impactar o comércio internacional de animais e de seus subprodutos, como carne e leite (OIE, 2015). Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO), a cada ano são diagnosticados cerca de 500 mil casos de brucelose humana no mundo. É prevalente em vários países, sendo que a região do Mediterrâneo, Oriente Médio, Arábia Saudita, México, América Central e do Sul, Ásia central e Índia são as regiões mais afetadas (Pappas et al. 2006). A prevalência da brucelose animal é em torno de 5% no Brasil e estima-se que o prejuízo causado por esta enfermidade seja

de mais de 30 milhões de dólares por ano para a economia nacional (Poester et al. 2002).

A Brucelose pode ser chamada também de Febre de Malta, Febre do Mediterrâneo ou Febre ondulante (Jong e Tsohis, 2012). Os reservatórios de espécies causadoras de brucelose humana são suínos, caprinos, ovinos e bovinos. Os indivíduos mais facilmente expostos são os que trabalham diretamente com animais infectados ou com produtos de origem animal, como proprietários, veterinários ou laboratoristas. (Doganay & Aygen, 2003).

Uma forma de transmissão recorrente se dá através da liberação da placenta de animais abortados no ambiente, as quais podem ser ingeridas por outros animais, disseminando assim a doença. Outras formas de infecção entre animais se dá por meio de secreções durante o acasalamento ou através do leite durante a amamentação. Em humanos é adquirida principalmente via consumo de leite não pasteurizado e seus subprodutos contaminados ou pelo contato direto com animais infectados. A Figura 2 retrata as principais formas de transmissão da brucelose (Atluri et al. 2011).



**Figura 2: Formas de transmissão de Brucelose.** Dependendo da espécie de *Brucella* envolvida, a transmissão entre os hospedeiros naturais pode ocorrer via aborto, contato genital durante o acasalamento ou via amamentação. A transmissão para humanos ocorre

principalmente via consumo de leite não pasteurizados e contato com aerossóis contendo *Brucella* spp. (Atluri et al, 2011).

Ao entrar em contato com o homem, as bactérias penetram nas mucosas, alcançando a corrente sanguínea sendo então espalhadas para diversos órgãos (Archambaud et al. 2010). A *Brucella* é disseminada para linfonodos, baço e fígado, estabelecendo assim a infecção e reações inflamatórias. *Brucella* spp. podem ainda atingir estruturas como placenta, glândulas mamárias e epidídimo. Em humanos os sintomas da fase aguda da doença são febre ondulante, dores de cabeça, mialgia, fadiga e perda de peso (Solera, 2010). Já na fase crônica pode ser observado endocardite, artrite, osteomielite e complicações neurológicas (Young, 1988).

Atualmente não existe uma vacina eficiente para humanos enquanto que para bovinos são encontradas três linhagens vacinais: a *B. abortus* S19, a *B. abortus* RB51 e a *B. melitensis* Rev-1, todas elas utilizam cepas vacinais vivas, atenuadas (Young, 2006).

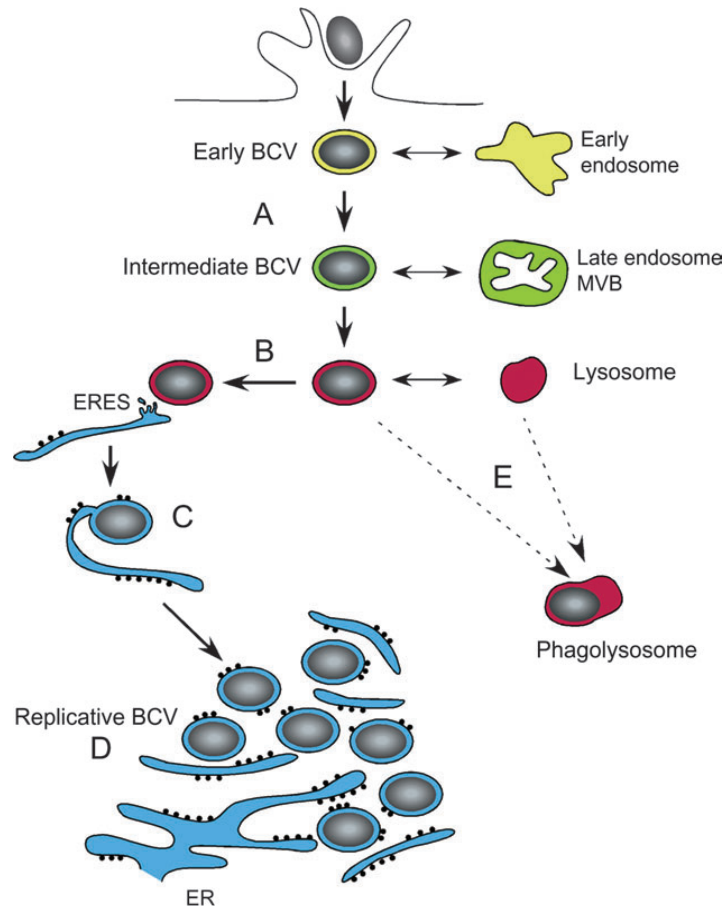
### 1.3 Patogênese

Após a infecção, as bactérias penetram nas mucosas alcançando a corrente sanguínea se espalhando assim pelos órgãos (Archambaud et al. 2010). A patogênese da *Brucella* está associada a sua capacidade de evadir dos mecanismos de defesa do hospedeiro, levando à sua persistência no interior da célula hospedeira bem como aos seus fatores de virulência (Parent et al. 2007). Dentre os mecanismos de evasão do sistema imune podemos citar a presença de uma alteração na estrutura de seu LPS. O lipopolissacarídeo da *Brucella* apresenta uma modificação no lipídeo A, levando à um menor reconhecimento pelas moléculas de TLR4 e maior resistência à ação de macrófagos (Giambartolomei et al. 2004; Forestier et al. 2000). *Brucella* spp., também apresenta uma alteração na porção N-terminal da proteína flagelina, levando a uma fraca ativação do receptor TLR5 (Andersen-Nissen et al. 2005; Jong et al. 2010).

*Brucella* tem a capacidade de alterar o tráfego intracelular nas células hospedeiras, permitindo sua proliferação no interior de células fagocíticas (Arellano-

Reynoso et al. 2005). No interior dos fagócitos, as bactérias formam o "vacúolo contendo *Brucella*" (BCV) que interage com endossomos primários e tardios, seguido da fusão com lisossomos (Starr et al. 2008; Celli et al. 2004; Pizarro-Cerda et al. 1998). Esta fusão leva a uma consequente destruição das bactérias por enzimas proteolíticas e pelos reativos intermediários de nitrogênio e oxigênio (Celli et al. 2004) (Pizarro-Cerda et al. 1998). Cerca de 90% das bactérias internalizadas são mortas pela ação das enzimas, enquanto que os 10% restantes são capazes de evadir dos mecanismos de destruição. Alguns autores sugerem que esta evasão está associada à uma acidificação do BCV que induz o sistema de secreção do tipo IV a liberar moléculas no citoplasma das células hospedeiras (Boschioli et al. 2002). As bactérias sobreviventes, em seguida, redirecionam o tráfego do BCV até chegar ao retículo endoplasmático onde estabelecem seu nicho replicativo (Celli et al. 2004). Algumas cepas atenuadas da bactéria não são capazes de redirecionar o tráfego e acabam sendo destruídas após a fusão com o lisossomo (Gorvel & Moreno, 2002). A Figura 3 exemplifica o tráfego intracelular da cepa virulenta de *Brucella* no interior de uma célula fagocítica.

Este mecanismo de escape do sistema imune do hospedeiro torna-se a principal base para o estabelecimento da infecção crônica. A persistência da *Brucella* no tecido leva à geração de granulomas, como uma resposta do organismo à infecção. Os granulomas já são visíveis a partir da primeira semana após a infecção e podem ser encontrados no fígado e em alguns outros tecidos (Hunt & Bothwell, 1967; Grillá et al. 2012).



**Figura 3: Modelo de tráfego intracelular de *Brucella*.** Após a entrada, o BCV trafega ao longo da via endocítica interagindo com endossomos primários (mostrados em amarelo) e endossomos tardios (mostrados em verde), antes da fusão com lisossomos (mostrados em vermelho). Em seguida ocorre o tráfego e posterior direcionamento para o retículo (ER) onde estabelecem seu nicho replicativo (B, C e D). Mutantes VirB não conseguem direcionar os vacúolos para o retículo e amadurecem em um vacúolo bactericida (E). (Starr et al., 2008).

#### 1.4 Diagnóstico e Tratamento

O diagnóstico clínico da Brucelose muitas vezes pode ser difícil devido à inespecificidade dos sintomas, sendo os testes laboratoriais necessários para um diagnóstico mais acurado. É possível isolar a *Brucella* do sangue, do líquido sinovial ou céfalo-raquidiano e da medula óssea (Shehabi, et al., 1990; Gottuzo, et al., 1992). No entanto a detecção de anticorpos no sangue é a forma mais eficaz de se diagnosticar a



Brucelose. Esse diagnóstico baseia-se na detecção de títulos elevados de anticorpos específicos contra antígenos de *Brucella spp.*, existindo diversos testes serológicos disponíveis, sendo o mais utilizado o teste imuno-enzimático (ELISA). O teste tipo ELISA, apresenta uma maior sensibilidade e maior especificidade quando comparado com outros testes diagnósticos propostos, como por exemplo o Teste de Rosa Bengala e a Imunofluorescência Indireta (Jong and Tsolis, 2012; Pessegueiro et al., 2003)

O tratamento terapêutico preconizado pela OMS consiste na associação dos antibióticos doxiciclina e rifampicina, no entanto a combinação de doxiciclina com estreptomicina também é amplamente utilizado. A politerapia se mostra importante, uma vez que reduz as recidivas e chances de estabelecimento de Brucelose crônica (Ariza et al., 1992; Jong and Tsolis, 2012;)

## **1.5 A resposta imune à *Brucella***

A resposta imune do hospedeiro frente à infecção por bactérias do gênero *Brucella* se dá por meio da ativação da resposta imune inata e de uma resposta imune adquirida. Estes dois tipos de resposta imune agem em conjunto a fim de promover uma proteção à infecção.

### **1.5.1 A resposta imune inata**

O reconhecimento da *Brucella* por células da imunidade inata, como macrófagos e células dendríticas, resulta na ativação dessas células, levando produção de citocinas pró-inflamatórias, principalmente IL-12 (Ugalde et al. 2003; Bessoles et al. 2009). Os macrófagos são importantes componentes na resposta imune à *Brucella* por serem considerados o principal tipo celular no qual essas bactérias se replicam (Sangari & Aguero, 1996). As células dendríticas também são importantes nesta infecção uma vez que após serem infectadas e produzirem IL-12, migram para zona de células T do baço

apresentando antígenos da *Brucella* (Huang et al. 2001; Billard et al. 2007).

Vários receptores são responsáveis pelo reconhecimento inicial da *Brucella*, tais como os receptores da família NOD (*Nucleotide Oligomerization Domain*) e receptores do tipo Toll (TLR) (Inohara & Nunez 2003; Medzhitov R et al. 1997). Estes receptores podem ser encontrados externamente na membrana celular ou em compartimentos intracelulares, desencadeando a ativação de vias de sinalização que induzem a produção de IFN do tipo I bem como de citocinas pró-inflamatórias (Iwasaki and Medzhitov 2004). O reconhecimento de componentes de *B. abortus*, como por exemplo, o LPS pelo receptor TLR4 e de proteínas da membrana externa, Omp16 e Omp19, por TLR2 levam à ativação da sinalização intracelular via MyD88 resultando na ativação de NF- $\kappa$ B, MAP cinases e a expressão de citocinas pró-inflamatórias (Campos et al. 2004; Huang et al. 2005); (Weiss et al. 2005; Oliveira et al. 2008). Estudos com o receptor TLR9, mostraram que este receptor também apresenta um papel importante durante a infecção por *B. abortus*, uma vez que ele é capaz de reconhecer sequências CpG não metiladas do DNA da bactéria (Macedo et al. 2008). Os animais deficientes em TLR9 se mostraram mais susceptíveis após a infecção por *Brucella* quando comparados aos camundongos selvagens e camundongos deficientes em TLR2 e TLR4 (Macedo et al. 2008).

### **1.5.1 A resposta imune adquirida**

A resposta adquirida, por sua vez, é dependente de uma resposta celular de perfil T<sub>H</sub>1 e da ação de linfócitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos e produtores de IFN- $\gamma$  (Araya et al. 1989). A principal fonte produtora de IFN- $\gamma$  é a população de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, no entanto já foi demonstrado que uma fração desta citocina é produzida também por T CD8<sup>+</sup> (Zhan et al. 1993). A citocina IL-12, produzida pelas células fagocíticas, tem como efeito estimular linfócitos T CD4<sup>+</sup> a secretarem IFN- $\gamma$  que por sua vez ativam o poder microbicida dos macrófagos através da produção de espécies reativas de oxigênio levando à morte da bactéria (Golding et al. 2001).

Apesar da importância da resposta mediada pelas células T CD4<sup>+</sup>, em 1995,

Oliveira e colaboradores demonstraram que as células T CD8<sup>+</sup> são mais importantes no controle da infecção por *Brucella*, uma vez que animais deficientes para o MHC-I foram mais susceptíveis, ao passo que a deficiência de MHC-II não impediu que os animais eliminassem as bactérias (Oliveira & Splitter, 1995). A importância dessas células consiste na sua capacidade em eliminar células alvo infectadas com *Brucella*. Estudos anteriores em humanos e camundongos mostraram que há um aumento de células T CD8<sup>+</sup> durante a infecção por *Brucella*, confirmando a capacidade dos macrófagos infectados com *Brucella* em apresentarem antígenos bacterianos por meio de moléculas de MHC-I e ativar respostas de células T CD8<sup>+</sup> citotóxicas (He et al, 2001; Skendros et al., 2011).

A principal função de linfócitos T CD8<sup>+</sup> é destruir células hospedeiras infectadas (Kägi et al. 1994; Russell & Ley, 2002). A citotoxicidade mediada por linfócitos T citotóxicos e células NK pode ocorrer pela via de exocitose de grânulos ou pela via Fas/FasL. A primeira delas utiliza a perforina para formar um poro transmembrânico nas células-alvo por onde as moléculas de granzima entram. A granzima-B é uma serino-protease que ativa alguns membros da família de caspases por meio de proteólise (Darmon et al. 1995). As granzimas então provocam a fragmentação do DNA levando à apoptose celular (Russell & Ley, 2002). Já o segundo deles ocorre em células T ativadas, que expressam o receptor FasL que por sua vez interage com Fas na superfície de células alvo levando à lise celular por meio de apoptose pela ação de caspases (Nagata et al. 1997). O sistema Fas/FasL é responsável pela morte celular induzida por ativação, mas também desempenha um papel importante na morte mediada por linfócitos sob certas circunstâncias (Russell & Ley 2002). Apesar dos sistemas de perforina/granzima e FasL poderem ativar a célula de forma independente, o processo que leva à apoptose é similar nos dois casos (Nagata et al. 1997).

Além da ação citotóxica mediada por T CD8<sup>+</sup>, Martirosyan e colaboradores (2013) identificaram linfócitos T CD4<sup>+</sup> citotóxicos em camundongos infectados por *B. abortus*. Estas células produzem altos níveis de granzima-B e IFN- $\gamma$ , e apresentam atividade citolítica contra fagócitos infectados. Estes dados indicam que a imunidade

adquirida para *B. abortus* é devido à ação cooperativa de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>, principalmente mediado por duas funções efetoras: produção de IFN- $\gamma$  e citotoxicidade.

### 1.6 Proteólise intracelular

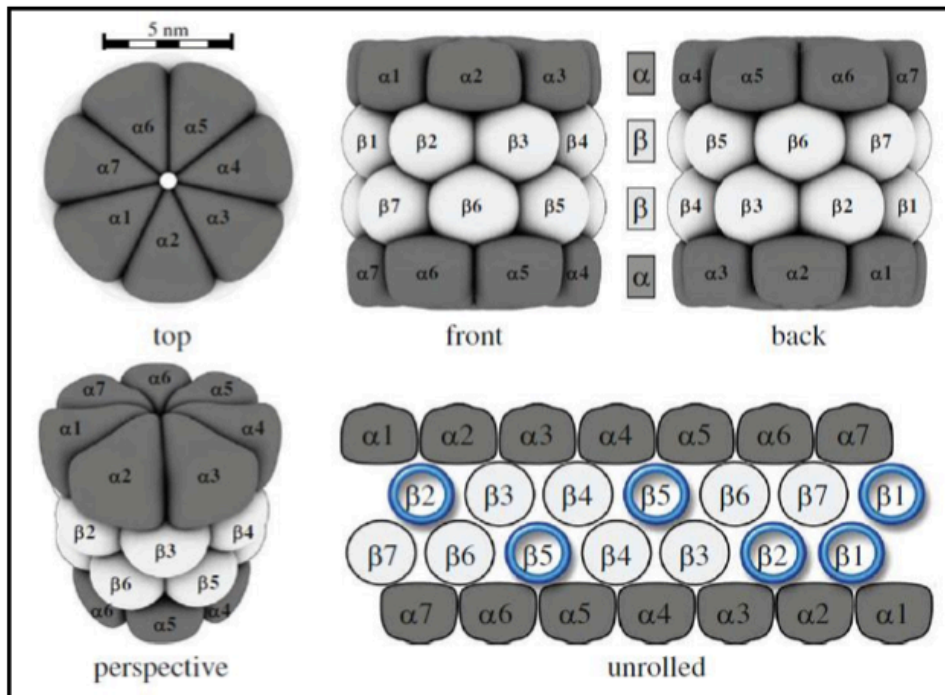
A degradação proteica é imprescindível para manter a homeostase intracelular. Para que isto ocorra, as células eucarióticas apresentam diferentes mecanismos proteolíticos importantes (Berg et al. 2010). Dentre eles podemos destacar a via de degradação lisossomal, as proteases intracelulares dependentes de cálcio e a proteólise dependente de proteassoma (Guha & Padh, 2008; Mykles, 1998; Glickman & Ciechanover, 2002). A via proteassomal é considerada a mais importante dentre as vias citadas (Jung et al. 2009).

O proteassoma é uma estrutura altamente conservada, sendo encontrada em arquea, bactérias e em todas as células eucarióticas (Voges et al. 1999). Está envolvido em processos como: degradação de proteínas mal enoveladas, regulação do ciclo celular, expressão gênica, regulação da meia vida proteica, carcinogênese e na resposta imune, foco principal deste trabalho (Jung et al. 2009).

O proteassoma 26S é um complexo catalítico de proteases encontrado no citoplasma e no núcleo das células. É constituído de dois componentes: uma unidade chamada de 20S, e duas unidades 19S. Esta última é a unidade reguladora do proteassoma e se liga nas duas extremidades do componente 20S, formando o complexo 26S. A unidade 20S é o cerne catalítico e é constituída de quatro anéis com sete subunidades cada. Através de cristalografia e difração de raio-X, Lowe e colaboradores (1995), revelaram que esta estrutura é cilíndrica de diâmetro aproximado de 10 nm e comprimento de 16 nm. Os dois anéis das extremidades são constituídos de subunidades  $\alpha$  e os dois anéis internos de subunidades  $\beta$ , mostrados na Figura 4. Três das sete subunidades  $\beta$  são responsáveis pela atividade catalítica do proteassoma.  $\beta$ 1 tem atividade tipo-caspase e cliva as proteínas após resíduos de aminoácidos ácidos. A

subunidade  $\beta 2$  cliva após resíduos básicos, apresentando atividade tipo-tripsina. Já a  $\beta 5$  tem atividade tipo-quimiotripsina clivando após resíduos hidrofóbicos.

O proteassoma, ao degradar as proteínas, gera um repertório de peptídeos que são transportados para dentro do retículo endoplasmático por meio da proteína TAP (*transportadores associados com o processamentos do antígeno*) onde se ligam ao MHC de classe I. A ligação dos peptídeos é um passo importante na aquisição de um estado estável pelas moléculas de MHC. Portanto, o dobramento final, dessas moléculas, por meio da ação de chaperonas, ocorre apenas após a ligação dos peptídeos à sua fenda. O complexo peptídeo-MHC é então exportado para a superfície celular que por sua vez apresenta estes peptídeos aos receptores TCR de linfócitos T CD8<sup>+</sup>, desencadeando assim uma resposta citotóxica mediada por estas células (Murphy et al. 2008).

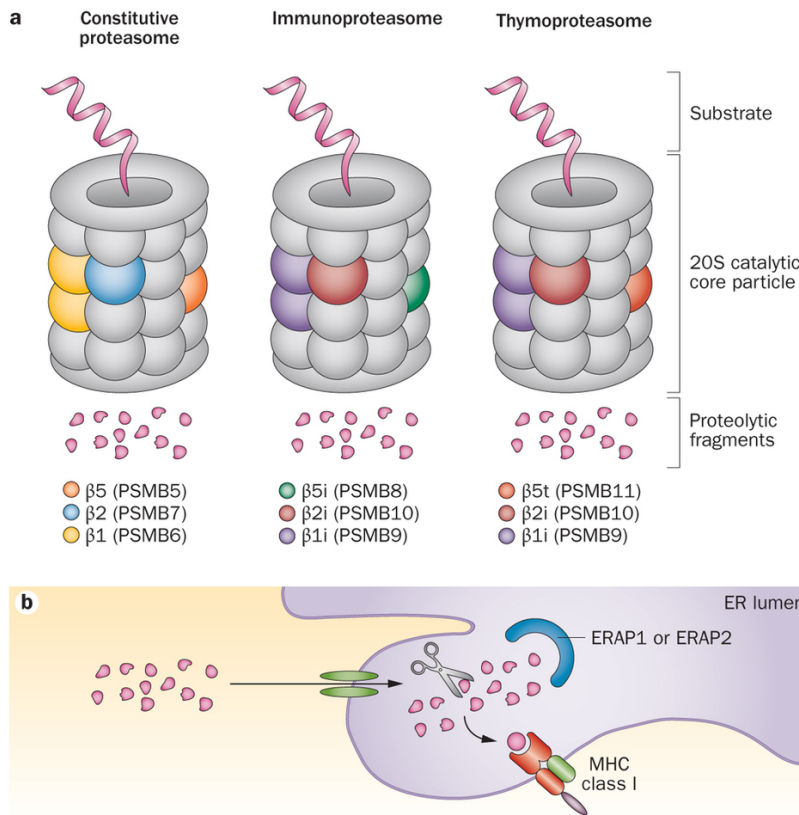


**Figura 4: Estrutura do proteassoma 20S em eucariotos.** Os anéis das extremidades são constituídos de subunidades  $\alpha$  que estão representadas em cinza e os anéis internos formados de subunidades  $\beta$  representadas em branco, formando uma estrutura  $\alpha \beta \alpha$ . Estão destacadas as subunidades catalíticas  $\beta 1, \beta 2$  e  $\beta 5$  (Jung, 2009).

Existem diferentes subtipos de proteassomas que são classificados de acordo com a composição de suas subunidades catalíticas, e são diferentemente

expressos nos tecidos (Jung & Grune, 2012). Além dos proteassomas clássicos, descritos acima, são encontrados também os imunoproteassomas, constituídos das subunidades induzíveis  $\beta 1i$ ,  $\beta 2i$  e  $\beta 5i$  (os quais serão discutidos de forma mais aprofundada no próximo tópico); os proteassomas intermediários, constituídos de uma mistura das subunidades padrões e induzíveis; e o subtipo timo-específico, descrito por Murata e colaboradores (2007). A Figura 5 exemplifica os diferentes tipos de proteassoma.

O subtipo timo-específico é constituído das subunidades  $\beta 1i$  e  $\beta 2i$ , assim como o imunoproteassoma, mas apresenta a subunidade  $\beta 5t$  no lugar de  $\beta 5$ . Esta subunidade é expressa exclusivamente nas células do córtex tímico, que são responsáveis pela seleção positiva dos linfócitos em desenvolvimento (Murata et al. 2007).



**Figura 5: Porção 20S dos subtipos de proteassoma.** (A) Estrutura do proteassoma constitutivo, do imunoproteassoma e do timoproteassoma, e suas subunidades catalíticas. (B) O proteassoma degrada polipeptídeos no citoplasma, gerando peptídeos de tamanhos ideais para a ligação ao MHC-I. No entanto outras clivagens podem ser realizadas por aminopeptidases (ERAP1 e ERAP2) no retículo. Após a interação peptídeo-MHC-I no retículo endoplasmático este complexo é então transportado para a superfície das células (Martinon & Akseptijevich, 2014).



## 1.7 O Imunoproteassoma

O imunoproteassoma, forma especializada do proteassoma, foi descrito em meados da década de 90 e foi assim denominado devido a dois fatores relevantes: a incorporação das subunidades desta estrutura é positivamente regulada por citocinas e os genes codificadores de duas de suas três subunidades estão localizados dentro da região codificadora do complexo de histocompatibilidade principal de classe II (MHC-II) (Ferrington & Gregerson, 2012).

A estrutura do imunoproteassoma é basicamente a mesma do proteassoma clássico, no entanto há uma substituição das subunidades  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  e  $\beta 5$  por  $\beta 1i$ ,  $\beta 2i$  e  $\beta 5i$ , respectivamente.  $\beta 1i$ , também chamada de LMP2 (*low molecular weight proteins*), diferentemente de  $\beta 1$  apresenta atividade tipo-quimiotripsina. Já a substituições de  $\beta 2$  por  $\beta 2i$ , conhecida por MECL-1 (*multicatalytic endopeptidase complex subunit 1*) e de  $\beta 5$  por  $\beta 5i$  (LMP7), não acarretam em diferenças nas especificidade da estrutura, mantendo as mesmas funções tipo-tripsina e tipo-quimiotripsina, respectivamente (Loidl et al. 1999; Groll & Huber, 2004).

Algumas células expressam as subunidades do imunoproteassoma constitutivamente, como por exemplo as células dendríticas, mas na maioria das células, esta expressão é induzida por estímulo da citocina IFN- $\gamma$  (Tanaka, 1994; Tanaka & Kasahara, 1998). Esta citocina gera uma resposta mediada por STAT-1 e IRF-1, os quais são capazes de se ligarem aos promotores dos genes de LMP2 e LMP7, estimulando assim a expressão destas moléculas. Além de IFN- $\gamma$ , sob stress oxidativo e estímulo de TNF- $\alpha$  as subunidades também podem ser expressas (Huber et al. 2012; Hussong et al. 2010).

A montagem do imunoproteassoma se dá de forma rápida, podendo ter uma velocidade até quatro vezes maior do que a incorporação das subunidades do proteassoma padrão. No entanto, a meia vida desta estrutura é menor, tendo ela um maior *turnover*, por isso o imunoproteassoma é rapidamente responsivo à estímulos (Heink et al. 2005).

O proteassoma clássico, ao degradar proteínas, gera um repertório de peptídeos que são apresentados pelo MHC de classe I. O imunoproteassoma é capaz de gerar um repertório ainda maior de peptídeos a serem apresentados pelas moléculas de MHC-I, uma vez que a subunidade LMP2, por apresentar atividade quimiotripsina, gera peptídeos que apresentam aminoácidos hidrofóbicos na porção c-terminal favorecendo a ligação às moléculas do MHC-I e conseqüentemente aumentando a apresentação de antígenos (Ferrington & Gregerson, 2012).

Diversos trabalhos mostraram que a ausência de uma subunidade do imunoproteassoma causam efeitos no sistema imune. Fehling e colaboradores (1994) mostraram que animais *knockout* para a subunidade LMP7 apresentaram uma diminuição da expressão de MHC-I na superfície de suas células, enquanto Van Kaer e colaboradores (1994) e Basler e colaboradores (2006) mostraram, respectivamente, que a ausência de LMP2 ou de MECL-1 leva à uma diminuição da população de linfócitos T CD8<sup>+</sup>.

Apesar dos resultados de estudos com animais *knockout* para uma ou duas das subunidades do imunoproteassoma serem um indício da importância desta estrutura, não retratam de fato como se comportaria uma célula na ausência total do imunoproteassoma. Sendo assim, dois outros trabalhos foram realizados a fim de elucidar a função desta estrutura.

No primeiro deles foi utilizado um animal duplo *knockout* para LMP2<sup>-/-</sup> e MECL-1<sup>-/-</sup> em conjunto com a utilização de um inibidor para a subunidade LMP7, o ONX 0914, gerando assim um animal desprovido da atividade do imunoproteassoma. Estes animais apresentaram uma redução na quantidade de células T CD8<sup>+</sup> bem como alteração nas respostas de células T à diferentes epitópos apresentados via MHC-I, após a infecção pelo vírus causador da coriomeningite linfocítica (LCMV) (Basler et al. 2011).

Em 2012, Kincaid e colaboradores apresentaram pela primeira vez um trabalho utilizando um animal *knockout* para as três subunidades, no qual realizaram infecções virais, e relataram que o imunoproteassoma é mais importante para a apresentação de antígenos do que havia sido relatado até então (Kincaid et al. 2012).

Ersching e colaboradores, mais recentemente, usando esses animais TKO, mostraram que a quantidade e a qualidade das respostas de células T CD8<sup>+</sup> contra *Trypanosoma cruzi* foram alteradas. Além disso, os animais TKO sucumbiram após o desafio com *T. cruzi*, mesmo após a vacinação com o DNA do parasita (Ersching et al., 2016).

Já foi descrito que a inibição do imunoproteassoma pode prevenir doenças como lúpus, colite, e síndrome de Hashimoto em modelos murinos (Basler et al. 2012; Ichikawa et al. 2011; Nagayama et al. 2012). Além disso, outros estudos relacionaram o imunoproteassoma com desordens inflamatórias em humanos (Kitamura et al. 2011; Arima et al. 2011; Agarwal et al. 2010); Basler et al. 2010; Fitzpatrick et al. 2006; Schmidt et al. 2010).

O imunoproteassoma também está envolvido na eliminação de patógenos, e a exigência desta estrutura pode variar de acordo com o modelo de infecção. Foi demonstrada a importância da subunidade LMP7 no controle da infecção por *Listeria monocytogenes*. Esse controle se deu através da super expressão de LMP7 em tecidos não linfóides, levando à um aumento da geração de epitopos para a resposta de linfócitos T CD8<sup>+</sup> nestes tecidos (Strehl et al. 2006). Animais desprovidos da subunidade LMP7 também foram mais susceptíveis à infecção pelo parasita *Toxoplasma gondii*, uma vez que houve uma diminuição do número de linfócitos T CD8<sup>+</sup> funcionais devido à uma redução na geração de epitopos necessários para seu desenvolvimento (Tu et al. 2009). Apesar de inúmeros trabalhos mostrarem a importância do imunoproteassoma para a resposta à patógenos, existem ainda muitas lacunas acerca do papel desta estrutura para o controle de infecções bacterianas.

## **2. Justificativa**

## 2. JUSTIFICATIVA

A Brucelose, causada por bactérias do gênero *Brucella*, é considerada a zoonose bacteriana mais comum em todo o mundo (Pappas, 2010). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) ocorrem 500.000 novos casos de Brucelose por ano no mundo (World Health Organization, 1998). As manifestações patológicas desta zoonose incluem febre ondulante, artrite, endocardite e meningite em humanos, enquanto a brucelose animal causa, principalmente, aborto em fêmeas gestantes.

*Brucella spp.* apresentam diversos mecanismos de evasão do sistema imune do hospedeiro e fatores de virulência que fazem com que a infecção se estabeleça (Parent et al. 2007; Arellano-Garcia et al. 2014). A resposta imune contra *Brucella* requer a participação, principalmente, de linfócitos T CD8<sup>+</sup> e produção de citocinas do perfil T<sub>H</sub>1 como IFN- $\gamma$  e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), além da ativação de macrófagos e células dendríticas (Golding et al. 2001; Oliveira et al. 2012). Dentre os componentes do sistema imune, a ação citotóxica de linfócitos T CD8<sup>+</sup> foi considerada por Oliveira e colaboradores, em 1995 como um dos principais mecanismos de controle da infecção pela *Brucella*.

A ativação dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> se dá por meio da apresentação de antígenos pelo MHC-I de células infectadas aos seus receptores TCR. Os peptídeos do patógeno são gerados no citoplasma pelo complexo multi-catalítico, proteassoma, e exportados ao retículo para ligação ao MHC-I. Conforme descrito por Groettrup e colaboradores, em 1995, o imunoproteassoma, um dos subtipos de proteassoma, otimiza qualitativa e quantitativamente os peptídeos gerados para a apresentação por moléculas de MHC-I. Vários trabalhos mostraram a importância desta estrutura por meio da infecção de animais, desprovidos de uma ou duas subunidades do imunoproteassoma, com diferentes patógenos (Strehl et al. 2006; Basler et al. 2011; Tu et al. 2009).

Porém, só recentemente foi desenvolvido por Kincaid e colaboradores (2012), um animal desprovido das três subunidades do imunoproteassoma, que foi utilizado neste trabalho.

Diante do exposto acima, a investigação do papel do imunoproteassoma durante a infecção por *B. abortus* é uma importante estratégia para entender a relação desta estrutura no desenvolvimento da função efetora de linfócitos T CD8<sup>+</sup> e no controle da infecção no modelo murino.

### **3. Objetivos**

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Avaliar a importância das subunidades do imunoproteassoma na resposta imune adaptativa contra a infecção pela bactéria *Brucella abortus*.

#### **3.2. Objetivos específicos**

**3.2.1.** Analisar o curso da infecção *in vivo* contabilizando o número de unidades formadoras de colônia (UFC) no baço de camundongos *knockout* para as três subunidades do imunoproteassoma (TKO).

**3.2.2.** Avaliar o envolvimento do imunoproteassoma na produção de IFN- $\gamma$  por linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> de animais infectados.

**3.2.3.** Avaliar a atividade citotóxica de esplenócitos totais e linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> de TKO e C57BL/6 frente à macrófagos e células dendríticas infectados.

**3.2.4.** Avaliar a eficiência da geração de epitopos e da apresentação de antígenos por células dendríticas de TKO e C57BL/6.

**3.2.5.** Avaliar a produção de Granzima-B por esplenócitos de TKO e C57BL/6 infectados com *B. abortus*.

**3.2.6.** Analisar a influência do imunoproteassoma na expressão de MHC-I e MHC-II por células dendríticas de C57BL/6 e TKO infectadas.

**3.2.7.** Avaliar o perfil de produção de citocinas pró-inflamatórias por células dendríticas, deficientes para o imunoproteassoma, em resposta a infecção por *B. abortus*.



## **4. Metodologia**

## **4. Metodologia**

### **4.1. Animais experimentais**

Foram utilizados camundongos selvagens da linhagem C57BL/6, camundongos geneticamente deficientes para o imunoproteassoma (TKO) gentilmente cedidos pelo Dr. Keneth Rock (University of Massachusetts, USA) e animais deficientes para a produção de IFN- $\gamma$  (IFN- $\gamma^{-/-}$ ), com 6 a 8 semanas de idade, criados no biotério do Laboratório de Imunologia de Doenças Infecciosas do ICB- UFMG. Os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética Animal (CETEA #128/2014)

### **4.2. Cepas bacterianas**

A cepa virulenta 2308 da bactéria *Brucella abortus* e a linhagem mutante de *B. abortus* expressando proteína verde fluorescente (GFP) foram crescidas, sob agitação, em meio BB (*Brucella Broth*) a 37°C por 72 horas. Posteriormente, as culturas de bactérias foram lavadas com PBS por 10 min a 5.000 rpm. Em seguida, foram ressuspensas em 1 mL PBS:glicerol na proporção de 9:1 e armazenada a -80°C.

### **4.3. Infecção com *B. abortus* e análise da resposta imunológica**

Camundongos C57BL/6 e TKO foram infectados por via intraperitoneal (i.p.) com  $10^6$  unidades formadoras de colônias (UFC) da cepa 2308 de *B. abortus* em 0,1 mL. Após 1, 2 e 4 semanas de infecção os animais foram sacrificados para a extração do baço e contabilização das unidades formadoras de colônia. Foram utilizados 5 animais de cada linhagem em cada tempo de infecção.

#### 4.4. Determinação do número de unidades formadoras de colônia (UFC)

O baço extraído de cada animal foi macerado em 9 mL de PBS, com o auxílio de uma peneira de aço e diluído serialmente. As diluições foram plaqueadas em duplicata, em meio BB (*Brucella Broth*) ágar. Após 3 dias de incubação à 37°C, o número de UFC foi determinado. As células excedentes foram utilizadas em ensaios de cultura celular para análise da produção de IFN- $\gamma$ .

#### 4.5. Cultura de esplenócitos

As suspensões de células obtidas após os baços serem macerados foram submetidas à centrifugação por 10 minutos a 600xg. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e o pellet de células foi ressuscitado em 1 mL de tampão ACK (10mM KHCO<sub>3</sub>, 155mM NH<sub>4</sub>Cl, pH 7.2 em água destilada) e incubadas por 5 minutos, à temperatura ambiente, ocorrendo assim a lise osmótica das hemácias. Acrescentou-se solução salina às amostras até atingir o volume de 30 mL, quando então foram centrifugadas novamente. O pellet foi então ressuscitado em 2 mL de meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado com 10% de FSB e 1% dos antibióticos (penicilina e estreptomicina), e a concentração de células foi determinada na câmara de Neubauer.

As células foram então cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 25mM HEPES, 10% de soro fetal bovino (Sigma), Penicilina (100U/mL) e Streptomicina (100 g/mL) em placas de 96 poços de fundo em U, na concentração de 10<sup>6</sup>células/poço. Em seguida, esplenócitos foram estimulados com a cepa S2308 de *B. abortus* (MOI 100:1). Células não-estimuladas foram utilizadas como controle negativo e as estimuladas com Concanavalina A (5  $\mu$ g/mL) serviram como controle positivo. Após 72 horas de incubação à 37°C e sob 5% de CO<sub>2</sub>, os sobrenadantes foram coletados para posterior análise de da produção de IFN- $\gamma$ .

#### 4.6. Análise por citometria de fluxo

Para a análise do perfil das populações de linfócitos nos esplenócitos de camundongos C57BL/6, TKO e IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> não infectados ou infectados por 1, 2 ou 4 semanas, foram processadas e semeadas a  $1 \times 10^6$  células/poço. As células então foram marcadas para os determinantes de superfície CD4 ou CD8 e CD3. Brevemente, as células foram incubadas por 20 min com anti-mouse CD16/32 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) para bloquear os receptores Fc em FACS buffer (PBS, 0.25% BSA, 1 mM NaN<sub>3</sub>). Então as células receberam os marcadores de superfície anti-mouse CD8 conjugado a FITC (1:200, clone 53-6.7, BD Biosciences), CD4 conjugado a PE-Cy7 (1:200, clone GK1.5, BD Biosciences) e anti-mouse CD3 conjugado a biotina (1:200, clone 500A2, BD Biosciences) por 20 minutos. Em seguida, Streptavidina-Perc-P (1:200, BD Biosciences) foi adicionado. Após 20 min, as células foram lavadas e ressuspensas em PBS.

Para a detecção de IFN- $\gamma$  intracelular ou granzima-B, esplenócitos de camundongos C57BL/6, TKO e IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> infectados por 1, 2 ou 4 semanas, foram processados e semeados a  $1 \times 10^6$  células/poço. Foi adicionada Brefeldina A (1  $\mu$ g/poço) e concanavalina-A (con-A) (5  $\mu$ g/mL) durante 4 horas a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. As células então foram marcadas para os determinantes de superfície CD4 ou CD8 e CD3, conforme protocolo acima. Em seguida, as células foram lavadas, fixadas e permeabilizadas utilizando o kit BD Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences) de acordo com as instruções do fabricante. Então foram marcadas com anti-mouse IFN- $\gamma$  conjugado a APC (clone XMG1.2, BD Biosciences) ou anti-mouse granzima-B conjugado a FITC (1:200, clone FJK-16s, eBioscience) por 30 min. Então elas foram lavadas com a solução de permeabilização e ressuspensas em PBS.

Para os dois tipos de procedimentos descritos acima, 100.000 eventos foram capturados usando citômetro de fluxo Attune Acoustic Focusing Cytometer (Life Technologies, Carlsbad, CA) e os resultados foram analisados usando FlowJo Software (Tree Star, Ashland, OR). A estratégia de gate utilizada foi: células isoladas foram

selecionadas por FSC-H e FSC-A; em seguida selecionamos as células CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> duplo positivas; e, finalmente, selecionamos células CD4<sup>+</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> duplo positivas ou CD4<sup>+</sup>/granzima-B<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>/granzima-B<sup>+</sup> duplo positivas.

As células dendríticas (BMDC) de TKO e de C57BL/6 foram estimuladas com *B. abortus* (MOI 100:1) ou DMEM durante 24 horas e então a marcação com anticorpos foi realizada. No primeiro passo, as células foram bloqueadas com MAbs anti-CD16/CD32 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) e depois coradas para marcadores de superfície CD11c, MHC-I e MHC-II. Anti-mouse CD11c conjugado com FITC (1: 200, clone HL3, de BD Biosciences), anti-mouse MHC-I conjugado com PE (1: 100, clone MOPC-173, Biolegend) e anti-mouse MHC-II conjugado a APC (1 : 100, clone AF6-120.1; BD Biosciences), foram incubadas durante 20 min a 4°C com solução de anticorpo (PBS 0,15 M, albumina de soro bovino a 0,5%, Na<sub>3</sub>N 2 mM). Para o procedimento descrito acima, 100.000 eventos foram capturados usando o citômetro de fluxo Attune Acoustic Focusing Cytometer (Life Technologies, Carlsbad, CA) e os resultados foram analisados usando FlowJo Software (Tree Star, Ashland, OR). As células foram selecionadas por FSC-H e FSC-A; Em seguida, selecionamos as células CD11c<sup>+</sup> MHC-I<sup>+</sup> ou CD11c<sup>+</sup> MHC-II<sup>+</sup> duplo-positivas.

#### **4.7. Diferenciação de Macrófagos e Células Dendríticas derivadas da medula óssea**

Para a obtenção de células da medula óssea, camundongos C57BL/6 e TKO foram sacrificados através de deslocamento cervical para remoção dos fêmures e tíbias. As células da medula foram extraídas através da ruptura das extremidades proximal e distal dos ossos e injeção de HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*) com auxílio de uma seringa, de forma a remover toda a medula do interior do osso. Para diferenciação das células da medula óssea em macrófagos, o material obtido foi centrifugado, ressuspensionado em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) e transferido para uma placa de petri contendo DMEM suplementado com 10% de LCCM (L929 *cell*

*conditioned medium*). Após incubação *overnight* a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, as células não aderentes foram coletadas, contadas e plaqueadas em placas de 24 poços na concentração de 5x10<sup>5</sup> células por mL em meio DMEM acrescido de 10% de LCCM.

Para diferenciação das células da medula óssea em células dendríticas (DC), o material obtido foi lavado com PBS e, em seguida, as células foram incubadas em placas de petri em um total de 1 x 10<sup>7</sup> células em 7mL de meio DMEM contendo 10% de soro fetal bovino inativado (SFB), 100u/mL de penicilina e 100 g/mL de estreptomicina a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Nos dias 0, 3, 5 e 7 foi adicionado 20ng/mL de GM-CSF murina recombinante (fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos). No décimo dia as células já diferenciadas foram coletadas, contadas em câmara de Neubauer e plaqueadas em placas de 24 poços na concentração de 5x10<sup>5</sup> células por mL em meio DMEM.

#### **4.8. Detecção do complexo MHC-I-SIINFEKL na superfície de células dendríticas**

Células dendríticas (5x10<sup>5</sup> células/poço) derivadas dos animais TKO e C57BL/6 foram plaqueadas em placas de 96 poços com 50 µg de ovalbumina (OVA) (Sigma, St. Louis, MO) e 1,25 µL de FUGENE (Promega, Madison, WI) Gaithersburg, MD) em 0,2 mL de DMEM-20 mM de HEPES (pH 7,4) durante 2 horas a 37°C e utilizado para análise por citometria de fluxo. No primeiro passo, as células foram bloqueadas com MAbs CD16/CD32 anti-mouse (Fc-Block) e depois marcadas para marcadores de superfície CD11c e MHC-I-SIINFEKL. Os anticorpos anti-mouse CD11c conjugado com FITC (1: 200, clone HL3, de BD Biosciences) e MHC-I-SIINFEKL conjugado com APC (1: 100, clone 25-D1.16) foram incubados durante 20 min a 4°C com solução de anticorpo (PBS 0,15 M, 0,5% de albumina de soro bovino, Na<sub>3</sub>N 2 mM). As células foram lavadas com 150 µL de tampão de diluição de anticorpo (eBioscience) e ressuspensas em 200 µL de PBS. A aquisição de dados foi realizada pelo citômetro de fluxo Attune Acoustic Focusing Cytometer (Life Technologies, Carlsbad, CA) e os resultados foram analisados usando

FlowJo Software (Tree Star, Ashland, OR). As células individuais foram selecionadas por FSC-H e FSC-A; e em seguida, selecionadas células CD11c<sup>+</sup> MHC-I-SIINFEKL<sup>+</sup> duplo-positivas.

#### **4.9. Isolamento de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> através de *Cell Sorting***

A células obtidas a partir do baço de animais infectados por 2 semanas com *B. abortus* foram preparadas conforme descrito acima. Os esplenócitos receberam os marcadores de superfície anti-mouse CD8 conjugado a FITC (1:200, clone 53-6.7, BD Biosciences), CD4 conjugado a PE-Cy7 (1:200, clone GK1.5, BD Biosciences) e anti-mouse CD3 conjugado a biotina (1:200, clone 500A2, BD Biosciences) por 20 min, seguido da adição de Streptavidina-Perc-P (1:200, BD Biosciences). Após 20 min, as células foram lavadas e ressuspendidas em HBSS + 1% FBS. Em seguida as células foram sorteadas através do aparelho FACS Aria II (BD Biosciences), a fim de se obter linfócitos T CD8<sup>+</sup> e T CD4<sup>+</sup> isolados. Uma pequena quantidade de células foram re-analisadas para certificação da efetiva separação das subpopulações.

#### **4.10. Ensaio de Citotoxicidade**

Para determinar a atividade citotóxica de esplenócitos de camundongos infectados por *Brucella*, utilizou-se o CytoTox 96 Nonradioactive Cytotoxicity Assay (Promega, Madison, USA), que se baseia na detecção colorimétrica dos níveis de liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH). Macrófagos ou células dendríticas diferenciados ( $5 \times 10^5$  células/poço) foram infectados com *B. abortus* (MOI 100:1). Após 24 horas de infecção o sobrenadante foi removido. Os macrófagos ou as células dendríticas infectados foram usados como células alvo para o ensaio citotóxico. Os esplenócitos ( $1 \times 10^6$  células/poço), obtidos a partir de C57BL/6 e TKO com 1, 2 e 4 s.p.i.,

ou linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> isolados foram utilizados como células efetoras e foram co-cultivados com macrófagos ou células dendríticas em placas de 24 poços em meio DMEM.

As células efetoras foram adicionadas às células alvo em duplicata nas seguintes proporções: 2:1 esplenócitos:DC, 1:1 linfócitos T CD4<sup>+</sup>:DC 1:2 linfócitos T CD8<sup>+</sup>:DC. A cultura foi mantida a 37°C em 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas e em seguida os sobrenadantes foram coletados, seguido da adição de um tampão de lise contendo Triton X100 0,1% aos poços. Os sobrenadantes das células foram quantificados quanto a liberação de LDH seguindo o protocolo do fabricante. A porcentagem de lise específica foi calculada de acordo com a fórmula:  $[(\text{Liberação experimental} - \text{Liberação espontânea}) / (\text{Liberação experimental} - \text{Liberação espontânea} + \text{Lisado})] \times 100\%$ . (Brandão et al. 2012).

#### **4.11. Dosagem de Citocinas**

A dosagem das citocina IFN- $\gamma$  na cultura de esplenócitos e de IL-12, IL-6 e TNF- $\alpha$ , nos sobrenadantes das culturas de células dendríticas foram realizadas pelo kit de ELISA Duoset (R&D Diagnostic) de acordo com o protocolo do fabricante.

#### **4.12. Análises estatísticas**

Todos os experimentos foram repetidos pelo menos três vezes e as figuras mostram dados representativos dos experimentos. As análises de gráficos e dados foram realizadas usando o GraphPad Prism 5 (GraphPad Software), utilizando o teste estatístico *one-way ANOVA* e Bonferroni *post-hoc*.



## **5. Resultados**

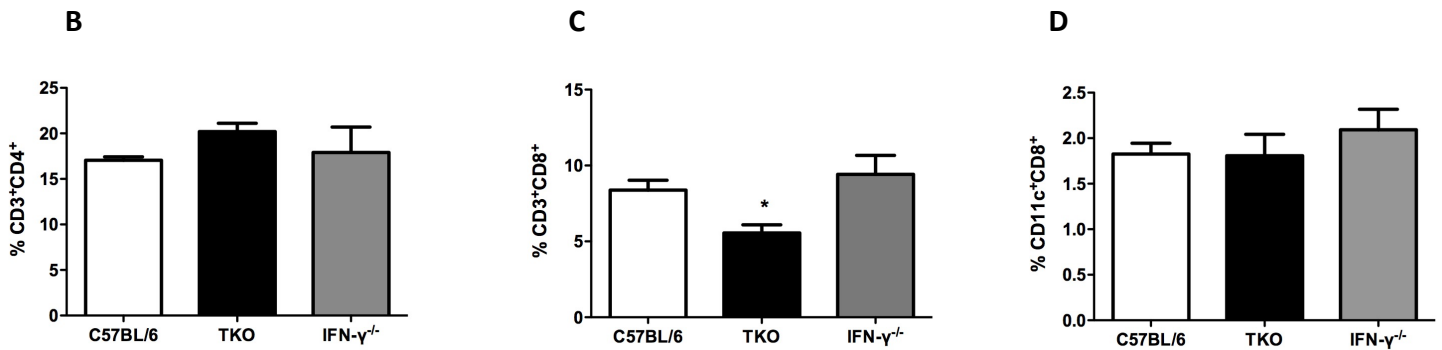
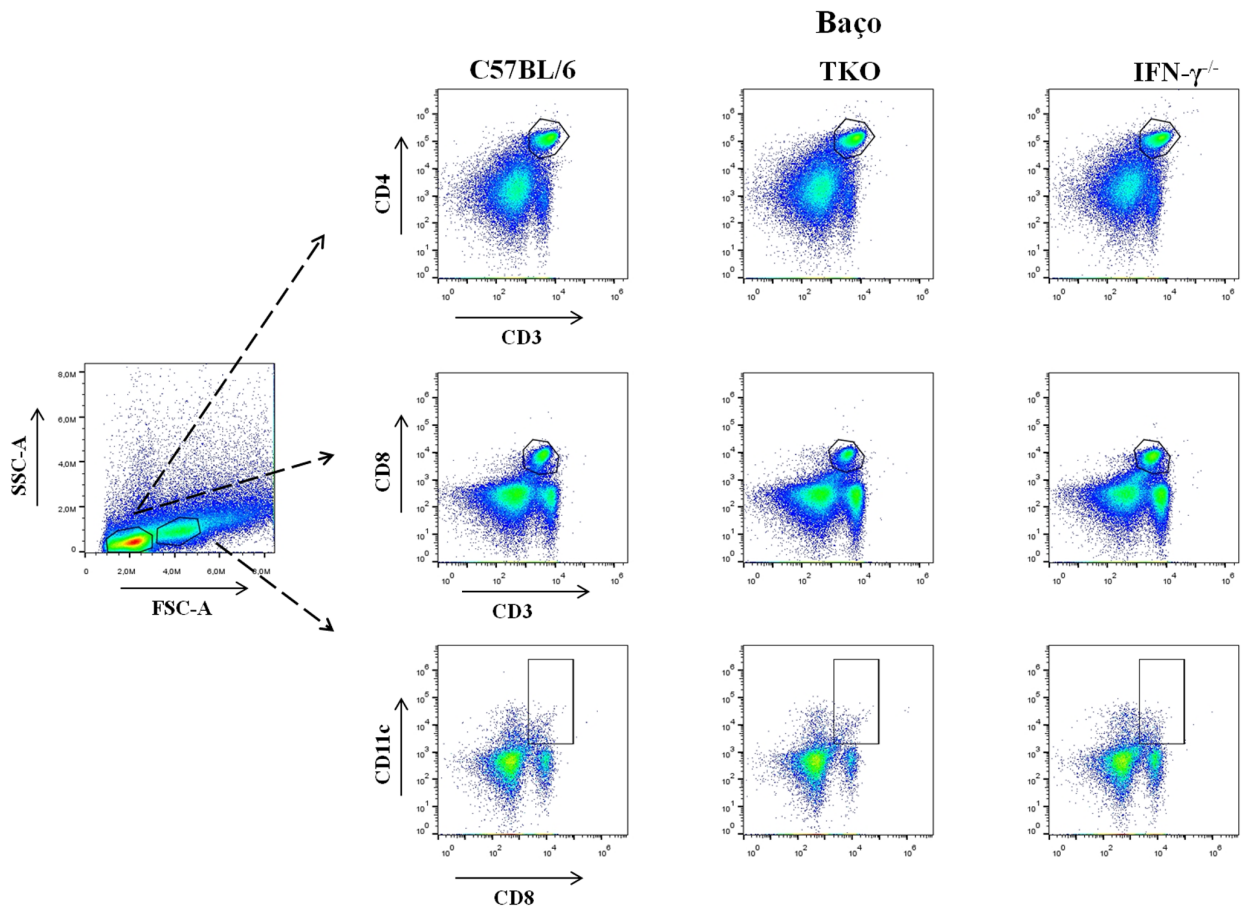
## 5. RESULTADOS

### 5.1. Perfil de populações de células imunes de animais C57BL/6 e TKO não infectados

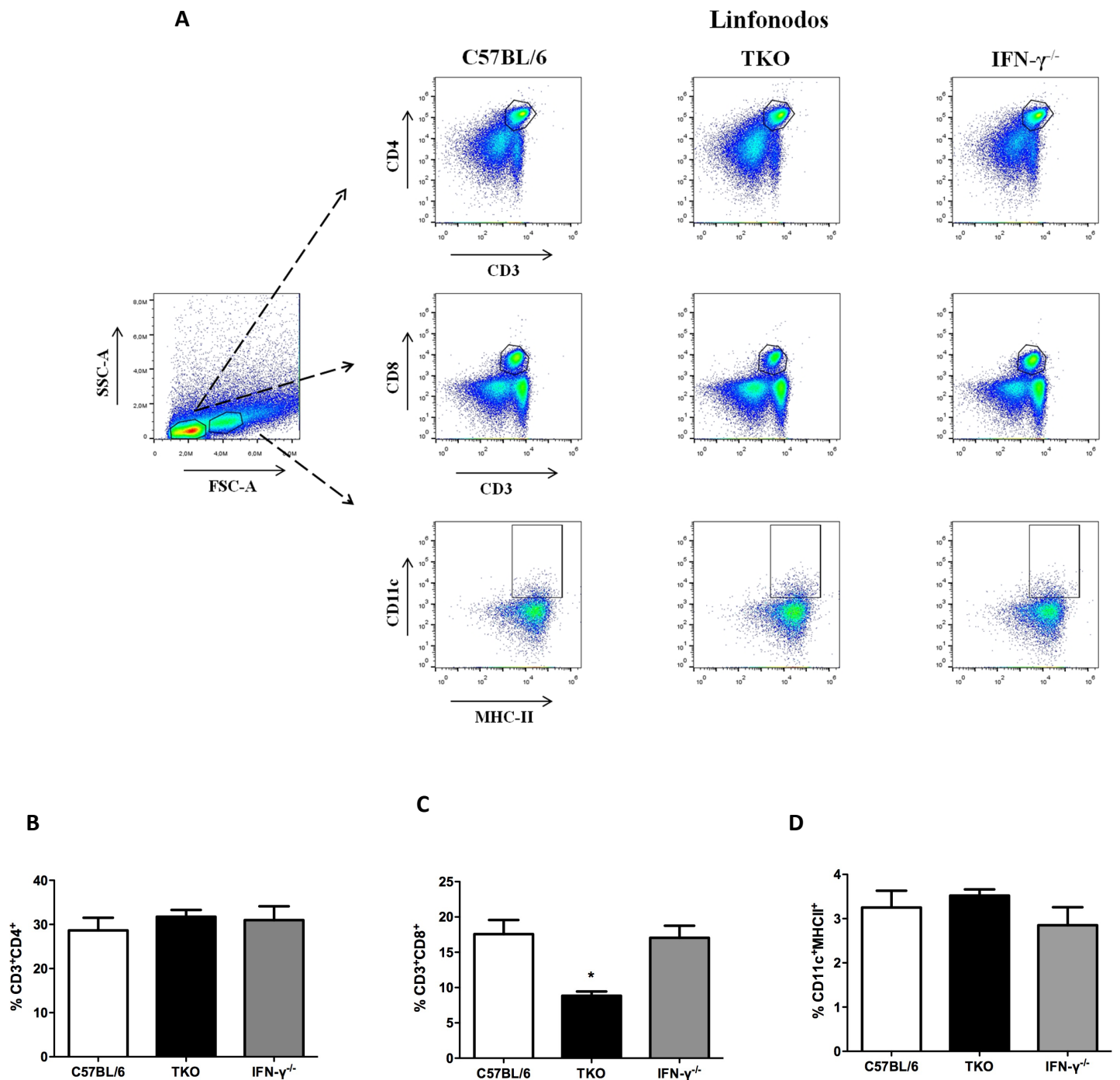
Para avaliar o perfil das populações de células dendríticas e de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> no baço e nos linfonodos dos animais TKO não infectados, foi realizada uma análise por citometria de fluxo. Para este experimento foram usados animais IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> e C57BL/6 como controle.

Primeiramente, as células dendríticas e os linfócitos foram marcados de acordo com o tamanho e a granulosidade característicos dessas células. A partir dessa seleção foram criados *Dot plots* para cada população das células, T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup> e dendríticas, e então foram gerados gráficos revelando a porcentagem de cada população, representados nas Figura 6 e 7.

Análises das células do baço revelaram que os animais TKO apresentaram menor porcentagem de células T CD8<sup>+</sup> (5.55%), quando comparados com o perfil dos animais IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> (9.42%) e C57BL/6 (8.37%) (Figura 6C). Esta diferença foi ainda maior na análise das células dos linfonodos de TKO (8.37%) e C57BL/6 (17.58%) (Figura 7C). Estes resultados mostram que os animais desprovidos de imunoproteassoma apresentam uma deficiência na geração de linfócitos T CD8<sup>+</sup>. Quando analisado o perfil das células T CD4<sup>+</sup> e das células dendríticas, não foi observada diferença entre as três linhagens de animais testadas (Figura 6 B, D, e 7 B, D).

**A**

**Figura 6: Análise da população de linfócitos e células dendríticas em esplenócitos e de camundongos C57BL/6, TKO e IFN- $\gamma^{-/-}$  não infectados.** (A) *Dot plot* demonstrando o quadrante das células CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e dendríticas nos baços dos animais, nesta ordem. A análise de citometria de fluxo de esplenócitos de animais C57BL/6, TKO e IFN- $\gamma^{-/-}$  foi realizada por meio da marcação de células com anticorpos afim de avalia-las para (B) CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (C) CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> e (D) CD11c<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>. 100.000 eventos foram adquiridos no citômetro Attune Acoustic Focusing Cytometer e os resultados foram analisados no programa FlowJo. \* (p<0,05) indica valor estatisticamente significativo referente ao C57BL/6.

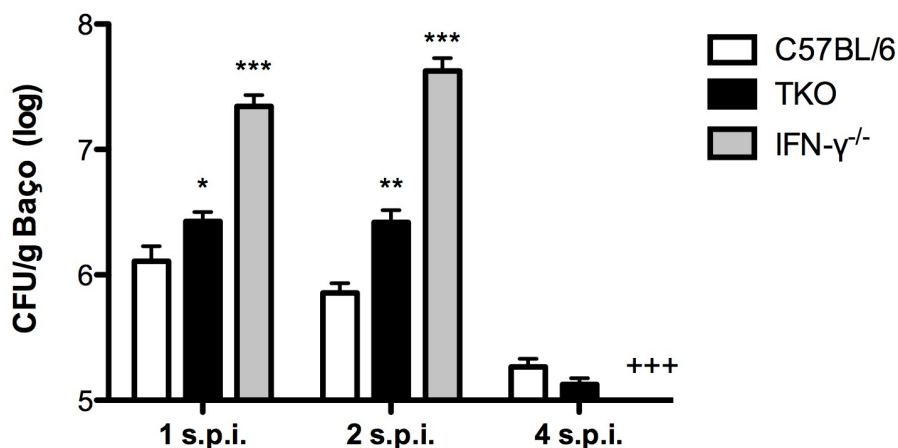


**Figura 7: Análise da população de linfócitos e células dendríticas em linfonodos de camundongos C57BL/6, TKO e IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> não infectados.** (A) Dot plot demonstrando o quadrante das células CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e dendríticas nos linfonodos dos animais, nesta ordem. A análise de citometria de fluxo de esplenócitos de animais C57BL/6, TKO e IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> foi realizada por meio da marcação de células com anticorpos afim de avalia-las para (B) CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (C) CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> e (D) CD11c<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup>. 100.000 eventos foram adquiridos no citômetro Attune Acoustic Focusing Cytometer e os resultados foram analisados no programa FlowJo. \* ( $p < 0,05$ ) indica valor estatisticamente significativo referente ao C57BL/6.

## 5.2. Avaliação da infecção por *B. abortus* em camundongos C57BL/6 e TKO

A fim de se avaliar a importância do imunoproteossoma na infecção causada pela bactéria *B. abortus*, camundongos deficientes para essa estrutura foram infectados com  $1 \times 10^6$  UFC da cepa virulenta 2308 e o número de bactérias no baço foi monitorado por meio da contagem de UFC, 1, 2 e 4 semanas após a infecção (Figura 8).

Os camundongos TKO foram mais susceptíveis à *B. abortus* na primeira e na segunda semana após a infecção, sendo a diferença no número de UFC entre TKO e C57BL/6 ainda maior na segunda semana. Neste período, o número de UFC no baço dos animais TKO foi 0,95 log superior ao número de UFC nos animais selvagens. A partir da quarta semana de infecção a contagem do número de bactérias no baço foi semelhante aos animais C57BL/6, indicando que o imunoproteossoma é mais importante para o controle da *B. abortus* nas fases iniciais da infecção. Os animais  $\text{IFN-}\gamma^{-/-}$  morreram após duas semanas de infecção, ao passo que os animais TKO sobreviveram durante todo o período de experimentação.



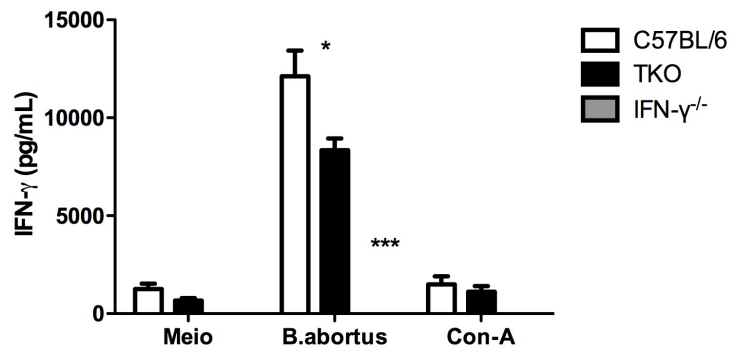
**Figura 8: Cinética de infecção em camundongos C57BL/6, TKO e  $\text{IFN-}\gamma^{-/-}$ .** Os camundongos foram infectados com  $1 \times 10^6$  UFC da cepa S2308 de *B. abortus* e o número de bactérias no baço foi analisado por meio da contagem de UFC 1, 2 e 4 semanas após a infecção. \* ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ) e \*\*\* ( $p < 0,001$ ) indicam valor estatisticamente significativo referente ao C57BL/6. +++ Indica morte dos animais.

### 5.3. Produção de IFN- $\gamma$ por esplenócitos de C57BL/6 e TKO infectados por *B. abortus*

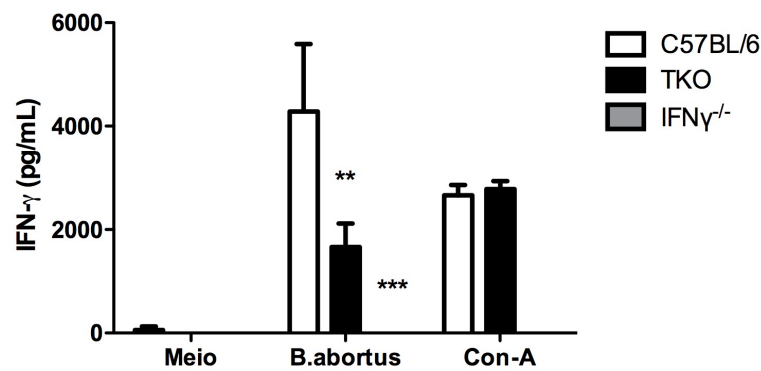
Visto que IFN- $\gamma$  é crucial para o controle da infecção por *Brucella spp.* (Murphy et al., 2001), a produção desta citocina também foi avaliada nas células do baço de animais WT, TKO e IFN- $\gamma^{-/-}$  após a infecção com a bactéria. O baço das três linhagens foram retirados 1, 2 e 4 semanas após a infecção e as células foram preparadas e semeadas conforme descrito na seção 4.5. Os esplenócitos foram re-estimulados com *B. abortus* e também com concanavalina-A como controle positivo da produção de IFN- $\gamma$ .

Após 72 horas de cultura, os sobrenadantes das células foram coletados para avaliação da produção de IFN- $\gamma$  (Figura 9). Houve uma menor produção desta citocina pelos esplenócitos de camundongos TKO em relação aos camundongos C57BL/6 na primeira e na segunda semana após a infecção quando as células foram estimuladas com *B. abortus* S2308, corroborando os dados que indicaram a maior susceptibilidade destes animais nesta fase. Assim como na contagem de UFC, a diferença de produção de IFN- $\gamma$  entre TKO e C57BL/6 foi maior na segunda semana quando comparada à primeira semana pós-infecção. Vale ressaltar que, conforme esperado, os esplenócitos dos animais IFN- $\gamma^{-/-}$  não produziram IFN- $\gamma$  em nenhum tempo de infecção.

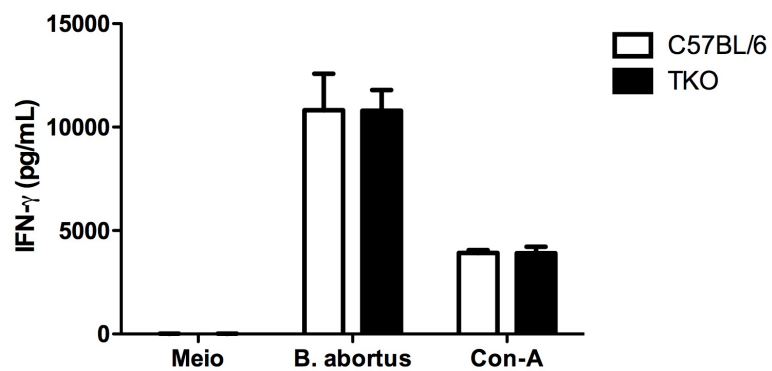
A



B



C



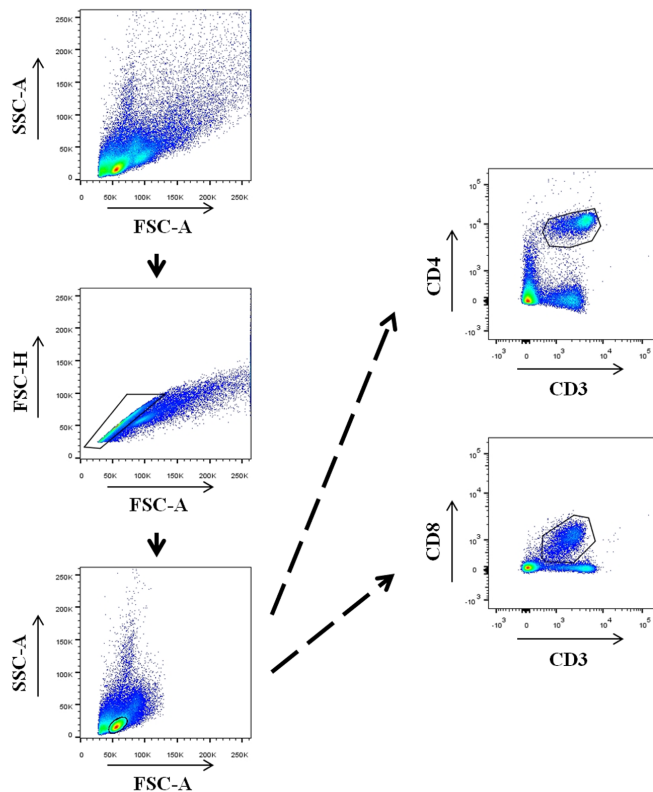
**Figura 9: Produção de IFN- $\gamma$  pelas células dos baços de camundongos C57BL/6, TKO e IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> infectados com *B. abortus*.** (A) Uma semana após a infecção (s.p.i.), (B) 2 s.p.i. e (C) 4 s.p.i. os esplenócitos foram re-estimulados com *B. abortus* (MOI 100:1) e concanavalina-A (con-A) (5  $\mu$ g/mL). Os sobrenadantes foram coletados após 72 horas e a produção de IFN- $\gamma$  foi medida por ELISA. \* ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ) e \*\*\* ( $p < 0,001$ ) indicam valor estatisticamente significativo referente ao C57BL/6.

#### 5.4. Perfil de populações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> de animais infectados por *B. abortus*

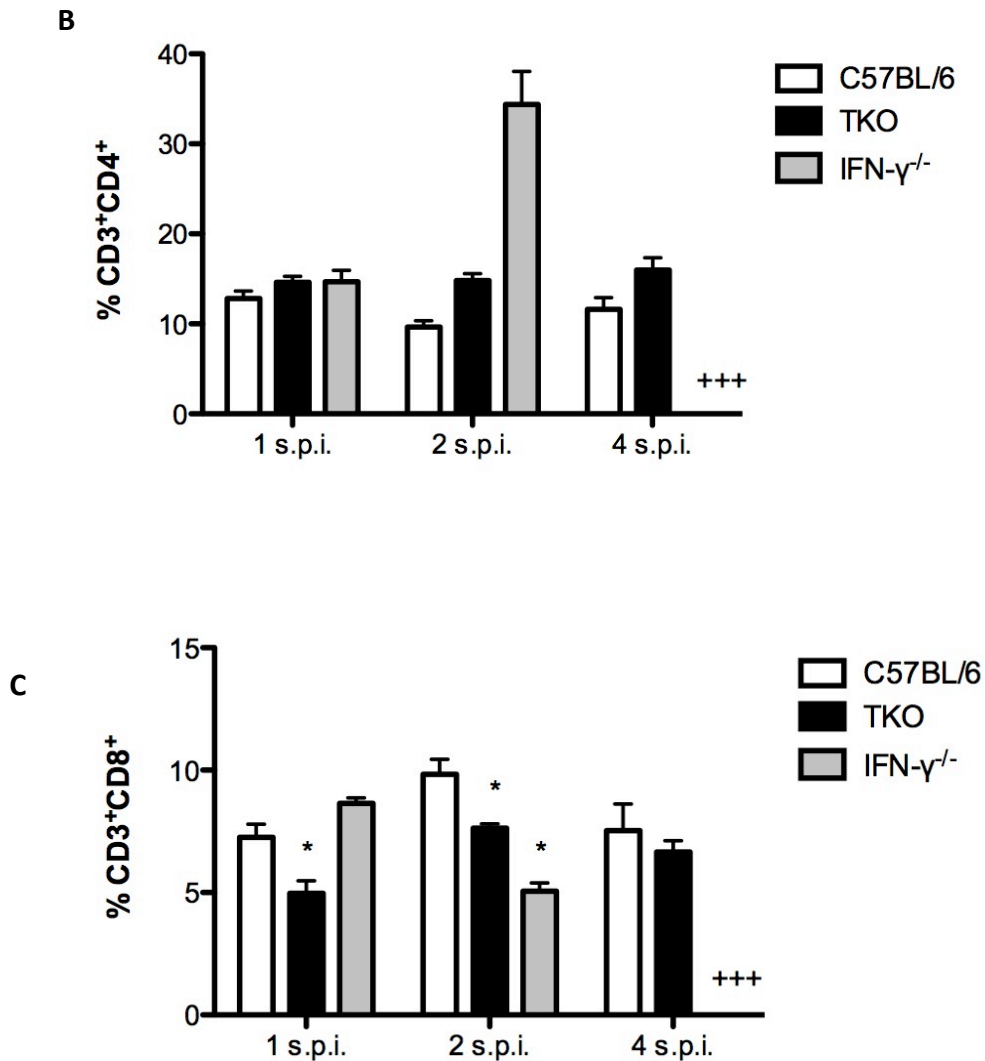
Uma nova análise de citometria de fluxo foi realizada a fim de se avaliar o perfil das populações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e linfócitos T CD8<sup>+</sup> no baço de animais após a infecção por *B. abortus*. Os animais IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> e C57BL/6 foram usados como controle do experimento e foram avaliados os tempos de 1, 2 e 4 semanas de infecção.

Quando analisado, o perfil das células T CD4<sup>+</sup> não foi observada diferença na porcentagem deste tipo celular nos animais deficientes para o imunoproteassoma com relação aos animais C57BL/6 em nenhum dos tempos de infecção analisados (Figura 10 B). No entanto, os animais TKO apresentaram menor porcentagem de linfócitos T CD8<sup>+</sup> na primeira (4.97%) e na segunda (7.63%) semanas pós-infecção por *B. abortus* quando comparados com os animais C57BL/6 (7.25% na primeira e 9.82% na segunda semana) (Figura 10 C). Houve uma diminuição também Esta diferença também havia sido observada em animais TKO não infectados (Figuras 6 e 7).

A





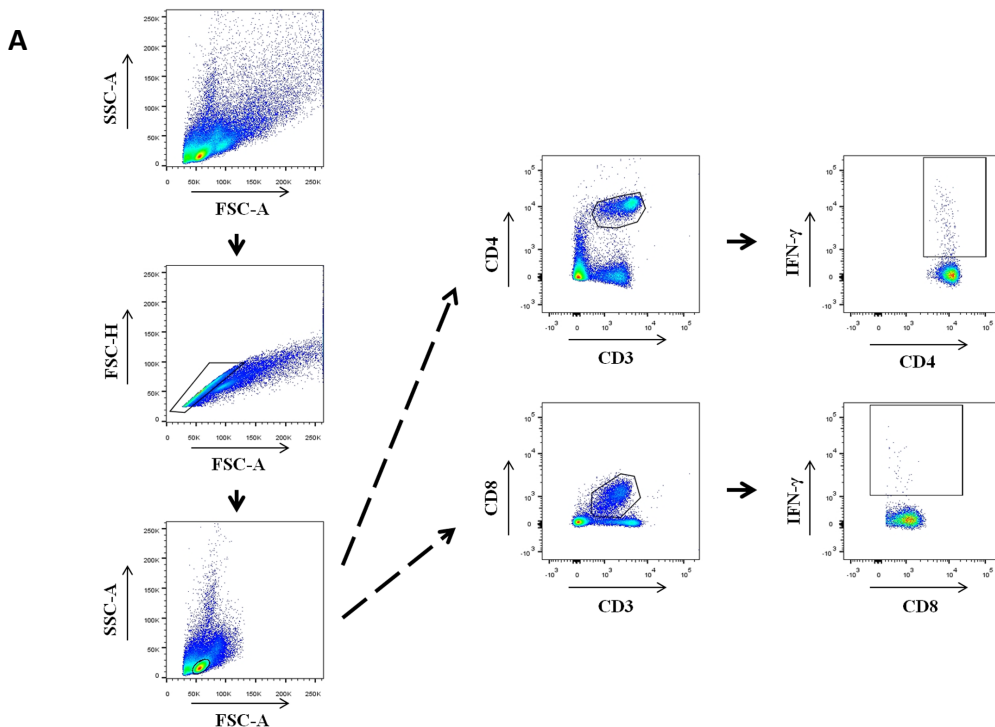


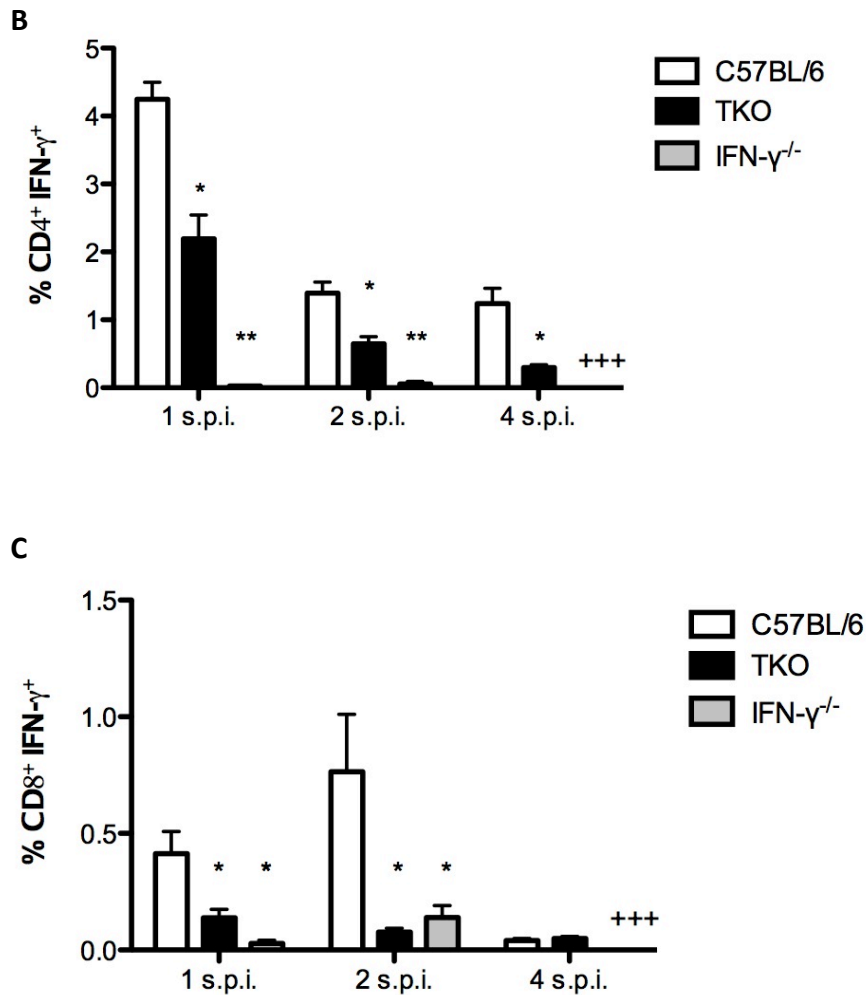
**Figura 10: Análise da população de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> em esplenócitos de camundongos C57BL/6, TKO e IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> infectados com *B. abortus*.** (A) *Dot plot* demonstrando o quadrante das células CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, 1 s.p.i., 2 s.p.i. e 4 s.p.i., nesta ordem. (B) A análise de citometria de fluxo de células dos baços de animais C57BL/6, TKO e IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> após 1, 2 e 4 semanas de infecção com *B. abortus* foi realizada por meio da marcação com anticorpos anti-mouse CD3 e CD4. (C) *Dot plot* demonstrando o quadrante das células CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, 1 s.p.i., 2 s.p.i. e 4 s.p.i., nesta ordem. (D) A análise de citometria de fluxo de células dos baços de animais C57BL/6, TKO e IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> após 1, 2 e 4 semanas de infecção com *B. abortus* foi por meio da marcação com anticorpos anti-mouse CD3 e CD8. 100.000 eventos foram adquiridos no citômetro Attune Acoustic Focusing Cytometer e os resultados foram analisados no programa FlowJo. \* ( $p < 0,05$ ) indica valor estatisticamente significativo referente ao C57BL/6. +++ Indica morte dos animais.

## 5.5. Determinação das subpopulações de linfócitos produtores de IFN- $\gamma$ após a infecção por *B. abortus*

Com o objetivo de verificar o tipo celular envolvido na produção de IFN- $\gamma$  nas células dos baços dos animais TKO, foram feitas análises de citometria de fluxo para avaliar a produção desta citocina pelas células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>. Os animais IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> e C57BL/6 foram usados como controles do experimento.

Primeiramente, foram demarcadas as populações das células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>. Dentro de cada população celular foi obtido um histograma revelando a porcentagem de células dentro daquela população produtora de IFN- $\gamma$ . Os dados obtidos a partir da análise demonstram que o número de células produtoras de IFN- $\gamma$  após a infecção por *B. abortus* é inferior nos linfócitos T CD4<sup>+</sup> dos animais TKO quando comparada à produção dessa citocina nos animais selvagens em todos os tempos analisados (Figura 11B). Além disso, a produção de IFN- $\gamma$  pelos linfócitos T CD8<sup>+</sup> também foi inferior nos camundongos TKO comparada aos camundongos C57BL/6, na 1<sup>a</sup> e na 2<sup>a</sup> s.p.i. (Figura 11C). Estes dados podem explicar a maior susceptibilidade apresentada pelos animais quando infectados com *B. abortus* por uma e duas semanas (Figura 7). É importante ressaltar que os animais IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> não produziram IFN- $\gamma$  após 1 e 2 semanas de infecção e na quarta semana após a infecção foram ao óbito, por isso não estão representados nos gráficos.



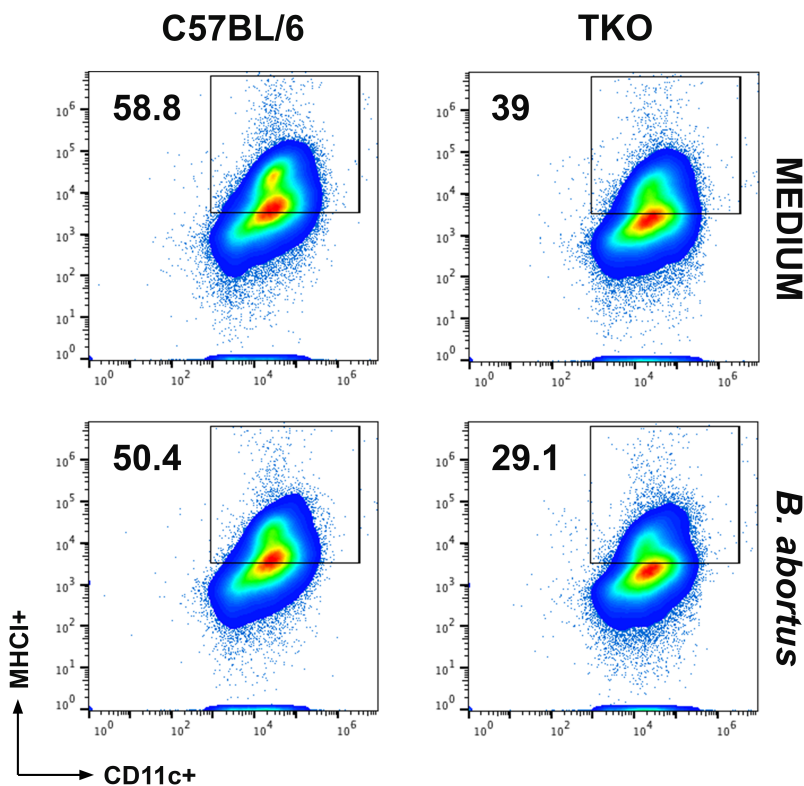


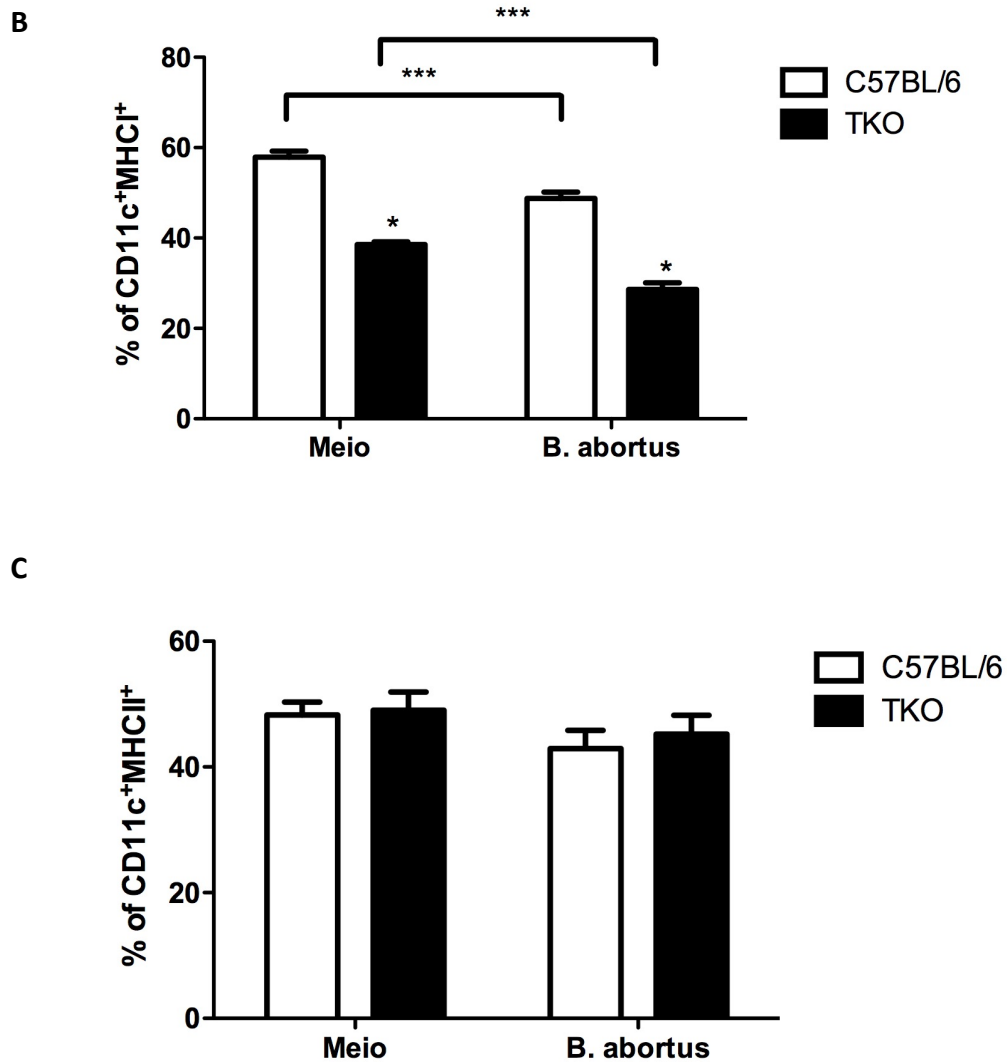
**Figura 11: Análise da população de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> produtores de IFN- $\gamma$  em esplenócitos de camundongos C57BL/6, TKO e IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> infectados com *B. abortus*. (A) *Dot plot* demonstrando o quadrante das células CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, 1 s.p.i., 2 s.p.i. e 4 s.p.i., nesta ordem. (B) A análise de citometria de fluxo de células dos baços de animais C57BL/6, TKO e IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> após 1, 2 e 4 semanas de infecção com *B. abortus* foi realizada após 4 horas de incubação com brefeldina A e Concanavalina A, seguido da marcação com anticorpos anti-mouse CD3, CD4 e IFN- $\gamma$ . (C) *Dot plot* demonstrando o quadrante das células CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, 1 s.p.i., 2 s.p.i. e 4 s.p.i., nesta ordem. 100.000 eventos foram adquiridos no citômetro Attune Acoustic Focusing Cytometer e os resultados foram analisados no programa FlowJo. \* ( $p < 0,05$ ) e \*\* ( $p < 0,01$ ) indicam valor estatisticamente significativo referente ao C57BL/6. +++ Indica morte dos animais.**

## 5.6. Avaliação da expressão de MHC-I e MHC-II na superfície celular

No interior do retículo endoplasmático, as moléculas de MHC-I ligam-se a peptídeos gerados pelo proteassoma ou pelo imunoproteassoma para formar o complexo peptídeo-MHC-I. Esse complexo é então exportado para a membrana celular e apresenta os antígenos aos linfócitos T CD8<sup>+</sup> através de receptores TCR (Janeway, 1992). Para determinar o papel do imunoproteassoma na apresentação do antígeno, medimos a expressão de MHC-I na superfície de células dendríticas por citometria de fluxo e observou-se uma porcentagem diminuída de das células de TKO que expressam moléculas de MHC-I (Figura 12). A Figura 12 mostra que as células dendríticas de TKO reduziram drasticamente a expressão de MHC-I na sua superfície quando comparadas com as células de C57BL/6. Diferentemente, moléculas MHC-II apresentam peptídeo para as células T CD4<sup>+</sup>, independentemente da atividade proteassomal (Janeway et al., 1988). Para confirmar que a ausência do imunoproteassoma não interfere na expressão do MHC-II, também medimos o percentual de células dendríticas expressando moléculas de MHC-II na superfície e não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as células TKO quando comparadas ao C57BL/6 (Figura 12C).

A



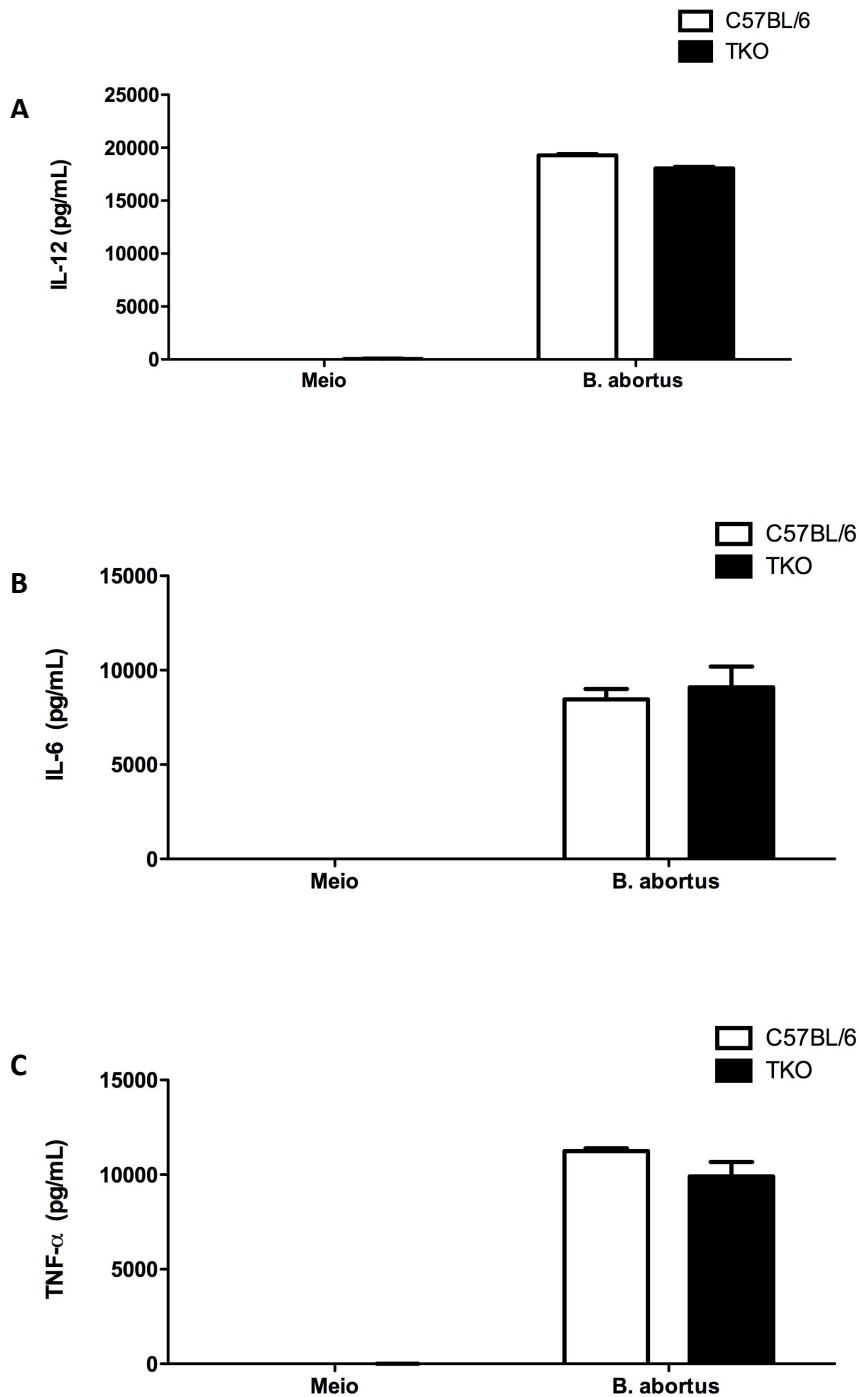


**Figura 12: Expressão de MHC-I e MHC-II por células dendríticas de TKO e C57BL/6.** (A) Dot plot demonstrando o quadrante das células CD11c<sup>+</sup>/MHC-I<sup>+</sup>, CD11c<sup>+</sup>/MHC-II<sup>+</sup>, nesta ordem. As células dendríticas derivadas da medula óssea de C57BL/6 e TKO foram infectadas com *B. abortus* S2308 (MOI 100: 1) e foram avaliadas para (B) CD11c + MHC-I<sup>+</sup> e (C) CD11c + MHC-II<sup>+</sup>. 1000.000 eventos foram adquiridos no citômetro Attune Acoustic Focusing Cytometer e os resultados foram analisados no programa FlowJo. \* (p<0,0005) indicam valor estatisticamente significativo referente ao C57BL/6.

### 5.7. Produção de citocinas pró-inflamatórias por células dendríticas de C57BL/6 e TKO

O reconhecimento da *Brucella* por células dendríticas resulta na ativação dessas células e concomitante produção de citocinas pró-inflamatórias a fim de gerar uma resposta imune protetora. Com o intuito de avaliar o papel do imunoproteassoma na produção das citocinas pró-inflamatórias IL-12, IL-6 e TNF- $\alpha$ , células dendríticas derivadas da medula óssea de C57BL/6 e TKO foram estimuladas com *B. abortus* e após 24 horas de estimulação o sobrenadante foi coletado para determinação da concentração dessas citocinas por ELISA.

Os resultados indicam que o imunoproteassoma parece não exercer papel importante na produção de IL-12, IL-6 e TNF- $\alpha$ , uma vez que não houve diferença nos níveis de produção destas citocinas por células dendríticas de TKO quando estimuladas com a cepa virulenta S2308, quando comparado às células do animal selvagem (Figura 13).



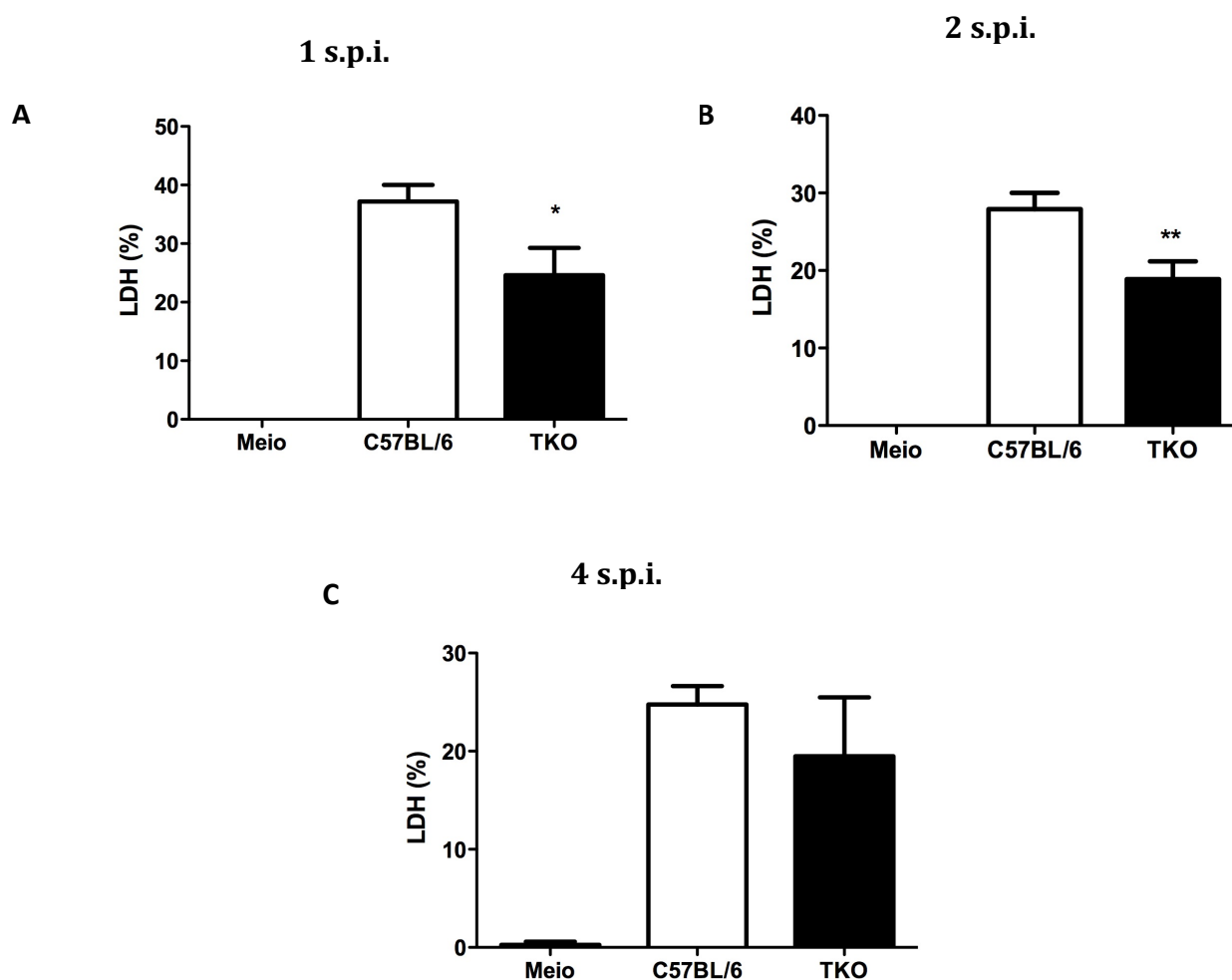
**Figura 13: Produção de citocinas pró-inflamatórias por células dendríticas derivadas de medula óssea de camundongos TKO e C57BL/6.** As células dendríticas foram cultivadas e estimuladas com a cepa S2308 de *B. abortus* e com a bactéria morta pelo calor, HKBa, (MOI 100:1) por 24 horas. As concentrações de (A) IL-12, (B) IL-6 e (C) TNF-α foram determinadas por ELISA conforme instruções do fabricante. \* ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ) e \*\*\* ( $p < 0,001$ ) indicam valor estatisticamente significativo referente ao C57BL/6.

## 5.8. Citotoxicidade de esplenócitos primados contra macrófagos infectados como células-alvo

Após a observação de que os animais deficientes para o imunoproteassoma apresentam menos linfócitos T CD8<sup>+</sup> e um menor número de células produtoras de IFN- $\gamma$ , o próximo passo foi a investigação da capacidade destas células em lisar células alvo apresentando antígenos de interesse. Para esta análise, esplenócitos de animais TKO ou de C57BL/6 na 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> s.p.i. foram incubados com macrófagos derivados da medula óssea de animais C57BL/6, seguido da infecção com *B. abortus*. Após 24 horas de co-cultura, foi avaliada a liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH), uma enzima citosólica estável que, após algum tipo de dano que comprometa a integridade da membrana, é liberada para o exterior da célula (Bernt & Hess, 1965). Portanto, foi estimada a lise celular dos macrófagos pelos linfócitos citotóxicos através da dosagem da quantidade de LDH liberada no sobrenadante da cultura celular.

Os resultados revelam que os esplenócitos de TKO da 1<sup>a</sup> e da 2<sup>a</sup> s.p.i. são capazes de provocar uma menor lise dos macrófagos infectados com *B. abortus* do que os esplenócitos de C57BL/6, indicando uma importância do imunoproteassoma neste processo (Figura 14).



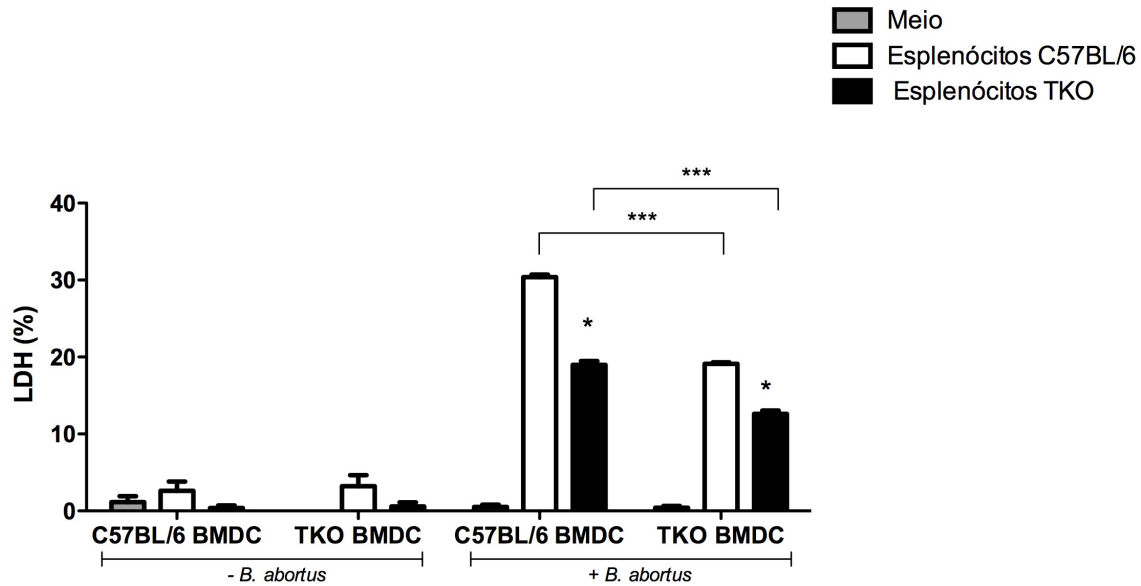


**Figura 14: Lise de macrófagos infectados com *B. abortus* por esplenócitos de C57BL/6 e TKO.** Macrófagos derivados da medula óssea de C57BL/6 foram diferenciados ( $5 \times 10^5$  células/poço), infectados com *B. abortus* (MOI 100:1) e utilizados como células alvo. Após 24 horas de infecção, esplenócitos ( $1 \times 10^6$  células/poço) obtidos de camundongos C57BL/6 e TKO, (A) 1 s.p.i. , (B) 2 s.p.i. ou (C) 4 s.p.i. foram utilizados como células efetoras para o ensaio de citotoxicidade e co-cultivados com os macrófagos em placas de 24 poços em meio DMEM. As células efetoras foram adicionadas na proporção 2:1 Esplenócitos:Macrófagos e 24 horas após a co-cultura o sobrenadante foi coletado para quantificar a liberação da enzima LDH. Como controle, foi adicionado meio de cultura DMEM (Meio). \* ( $p < 0,05$ ) e \*\* ( $p < 0,01$ ) indicam valor estatisticamente significativo referente ao C57BL/6.

## 5.9. Citotoxicidade de esplenócitos primados contra células dendríticas infectadas

O imunoproteassoma é uma estrutura responsável pelo aumento do repertório de peptídeos a serem apresentados pelo MHC de classe I aos linfócitos T CD8<sup>+</sup> (Ferrington & Gregerson, 2012). Sendo assim, o próximo passo do trabalho foi a verificação da eficiência de apresentação de antígenos pelas células dendríticas de TKO. Conforme descrito previamente por Tanaka e colaboradores, em 1994, as células dendríticas expressam constitutivamente as subunidades do imunoproteassoma, sendo assim, as células dos animais C57BL/6 expressam esta estrutura sem necessitar de uma estimulação prévia por IFN- $\gamma$ , enquanto as células dendríticas de TKO não são capazes de expressar o imunoproteassoma, expressando apenas o proteassoma clássico (Tanaka et al. 1994). Para a realização deste experimento mais uma vez foi verificada a liberação de LDH após a co-cultura de esplenócitos de animais obtidos após a infecção com *B. abortus* com células dendríticas infectadas ou não com a bactéria. Neste experimento foram utilizados animais infectados por duas semanas, uma vez que nos experimentos mencionados anteriormente este tempo de infecção foi o tempo que apresentou maior diferença entre os grupos.

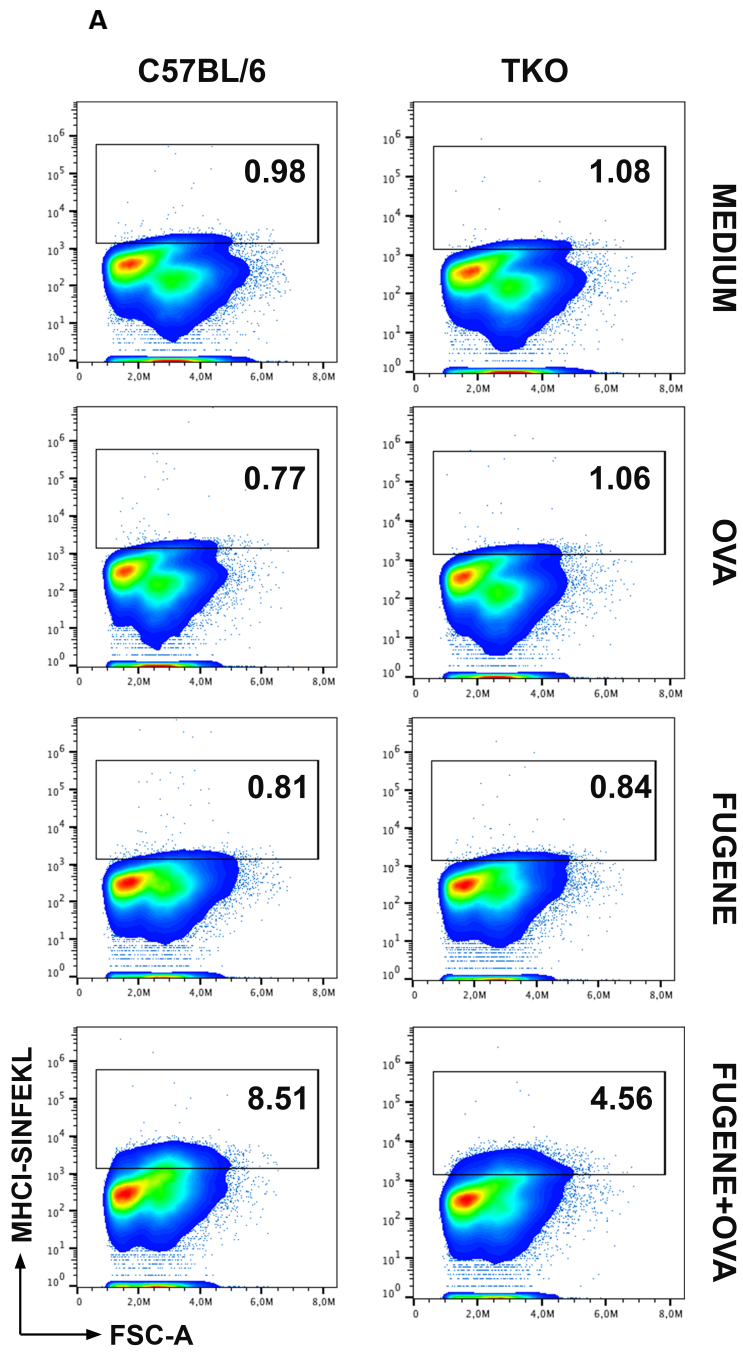
Conforme mostrado na Figura 15, a lise das células apresentadoras de antígenos (APCs) é específica para células dendríticas apresentando antígenos de *Brucella*, uma vez que células não infectadas não foram lisadas. As análises dos dados mostraram que as células dendríticas de C57BL/6 infectadas com *B. abortus* foram lisadas com maior eficiência pelos esplenócitos de C57BL/6 em relação à lise realizada pelos esplenócitos de TKO, corroborando assim os resultados da lise em macrófagos. Já quando as APCs utilizadas foram células dendríticas de TKO a lise diminuiu durante a co-cultura com esplenócitos de ambas linhagens, sugerindo uma deficiência no aparato de apresentação de antígenos das células de TKO. É importante ressaltar que os linfócitos dos animais deficientes no imunoproteassoma apresentaram uma lise menos eficiente das células dendríticas tanto de C57BL/6 quanto de TKO (Figura 15).

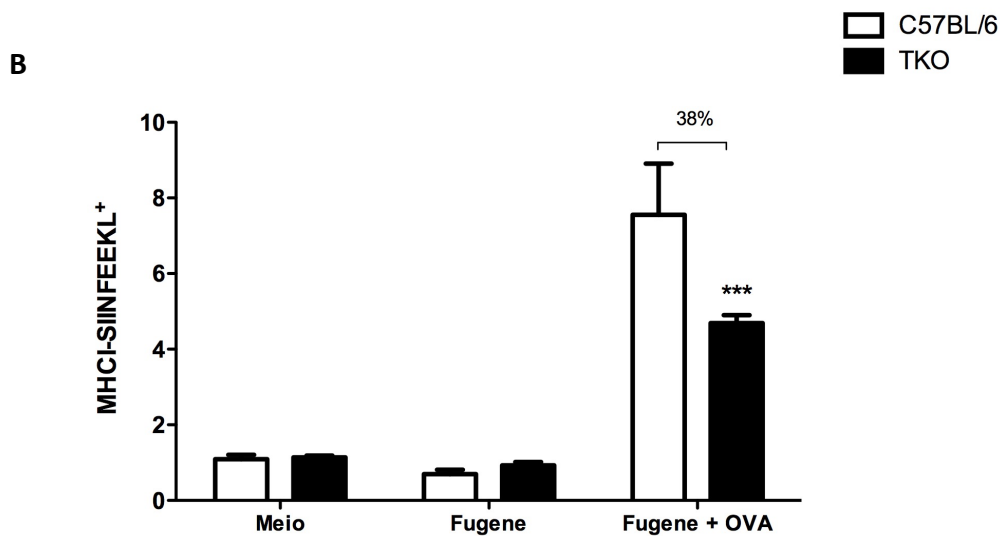


**Figura 15: Lise de células dendríticas infectadas com *B. abortus* por esplenócitos de C57BL/6 e TKO.** Células dendríticas derivadas da medula óssea de C57BL/6 e de TKO foram diferenciadas ( $5 \times 10^5$  células/poço), infectadas ou não com *B. abortus* (MOI 100:1) e utilizadas como células alvo. Após 24 horas de infecção, esplenócitos ( $1 \times 10^6$  células/poço) obtidos de camundongos C57BL/6 e TKO 2 s.p.i. foram utilizados como células efetoras para o ensaio de citotoxicidade e co-cultivados com as células dendríticas em placas de 24 poços em meio DMEM. As células efetoras foram adicionadas na proporção 2:1 Esplenócitos:DCs e 24 horas após a co-cultura o sobrenadante foi coletado para quantificar a liberação da enzima LDH. \* ( $p < 0,05$ ) e \*\*\* ( $p < 0,001$ ) indicam valor estatisticamente significativo referente ao C57BL/6.

### 5.10. Transfecção de células dendríticas com OVA e quantificação da apresentação do epítipo SIINFEKL

Para confirmar a importância do imunoproteossoma na apresentação de antígenos, células dendríticas foram transfectadas com a proteína OVA e em seguida foi realizada uma análise por citometria de fluxo utilizando um anticorpo monoclonal capaz de reconhecer o peptídeo derivado de OVA, SIINFEKL (OVA<sub>257-264</sub>), complexado ao MHC de classe I (Jameson et al., 1992; Porgador et al., 1997). Os resultados apresentados na Figura 16 revelaram uma capacidade diminuída das células dendríticas de TKO em gerar o peptídeo de OVA a ser apresentado por moléculas de MHC-I na superfície celular em comparação com células de animais selvagens.

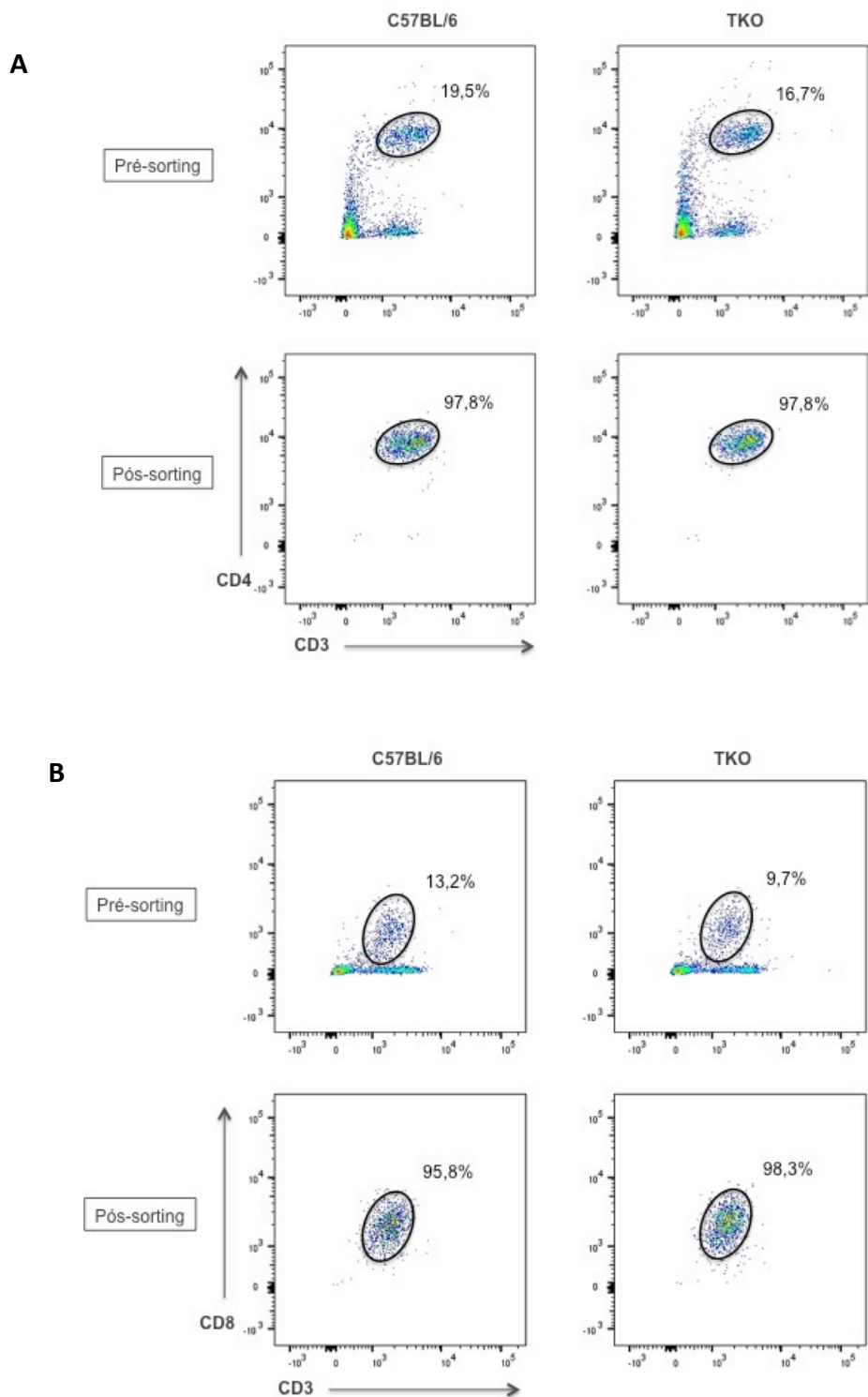




**Figura 16: Expressão de do peptídeo SIINFEKL conjugado à MHC-I na superfície de células dendríticas de TKO e C57BL/6.** (A) Dot plot demonstrando o quadrante das células CD11c<sup>+</sup> MHC-SIINFEKL<sup>+</sup>. (B) As células dendríticas de animais C57BL/6 e TKO foram incubadas com OVA complexada com fugene durante 2 horas, em seguida foram coradas com anticorpo anti-SIINFEKL-H-2b conjugado à APC e analisadas por citometria de fluxo. Foram obtidos e analisados 100.000 eventos. Os eventos foram adquiridos no citômetro Attune Acoustic Focusing Cytometer e os resultados foram analisados no programa FlowJo. \*\*\* (p<0,001) indica valor estatisticamente significativo referente ao C57BL/6.

### 5.11. Purificação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> e análise da citotoxicidade

Visto que os esplenócitos de TKO são menos eficientes em lisar as células apresentadoras de antígenos (Figuras 14 e 15), o próximo passo foi a avaliação da participação das subpopulações de linfócitos, T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>, nesta lise. Para tal, as células dos baços de animais infectados com *B. abortus* por duas semanas, foram purificadas e os linfócitos T CD8<sup>+</sup> ou os linfócitos T CD4<sup>+</sup> isolados foram utilizados neste experimento. A Figura 17 mostra o perfil celular antes e após o isolamento das células por meio da técnica de citometria de fluxo, *Cell Sorting*.

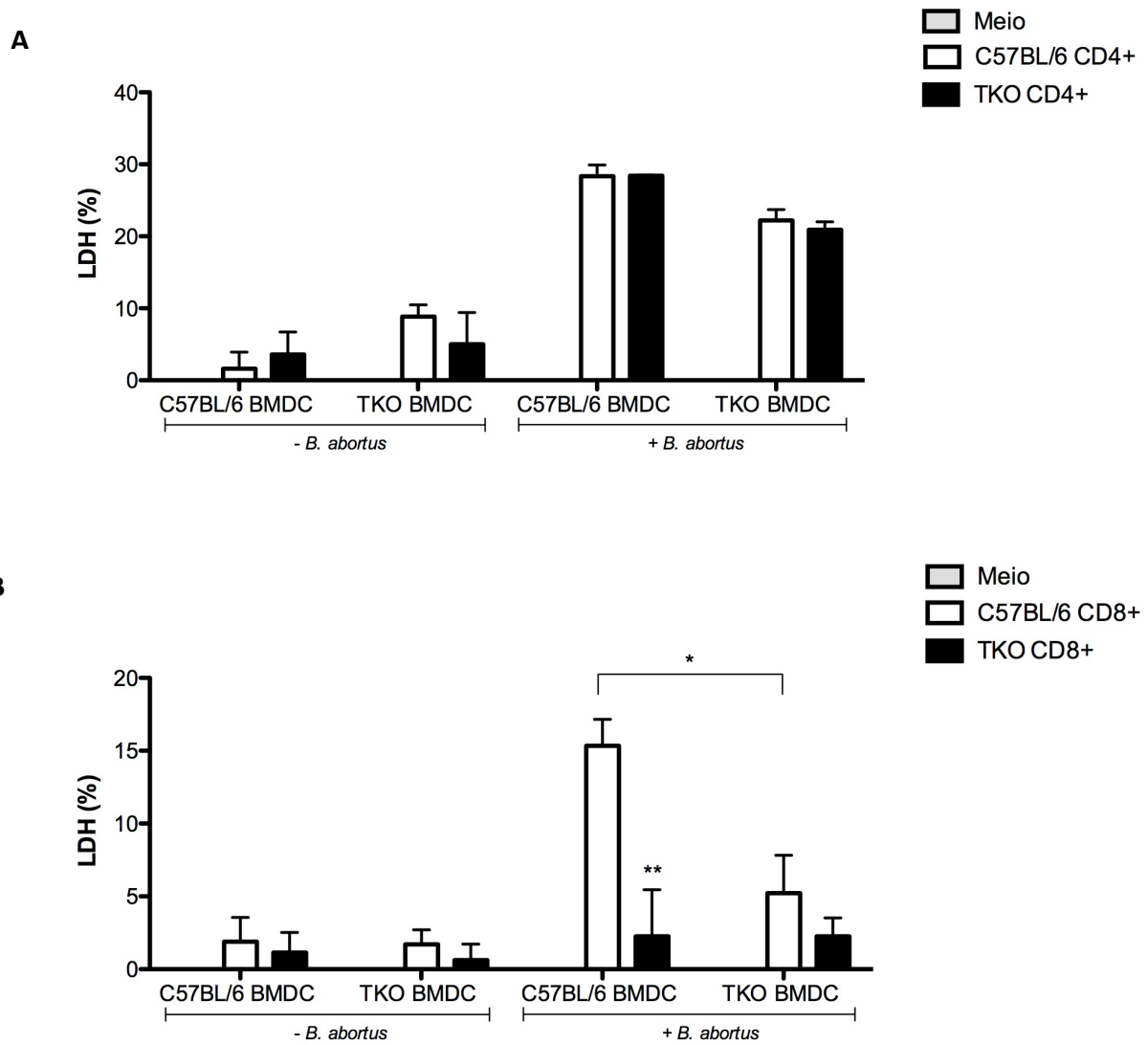


**Figura 17: Dot plot demonstrando o perfil das células antes e depois do *cell sorting*. Os esplenócitos de animais C57BL/6 e TKO obtidos após 2 semanas de infecção com *B. abortus* foram marcados com (A) PE-Cy7 anti-mouse CD4 e biotina-anti mouse CD3 e (B) FITC-anti mouse CD8 e biotina-anti mouse CD3. Em seguida foram submetidos à separação por meio do *Sorting*, através do aparelho FACS Aria II. Os resultados foram analisados no programa FlowJo.**

Após isolar os linfócitos, foi avaliada a importância dos mesmos na lise de células dendríticas infectadas ou não por *B. abortus* em um novo ensaio de citotoxicidade. Para tal, quantidades iguais de linfócitos T CD4<sup>+</sup> ou T CD8<sup>+</sup> de C57BL/6 ou TKO foram utilizadas.

A Figura 18 A mostra que os linfócitos T CD4<sup>+</sup> de ambas as linhagens foram capazes de lisar as células dendríticas de C57BL/6 e de TKO e que não houve diferença estatisticamente significativa na lise provocada por T CD4<sup>+</sup> de C57BL/6 ou TKO. Quando as células dendríticas de C57BL/6 foram incubadas com linfócitos T CD8<sup>+</sup> de C57BL/6 foi observada uma lise maior do que a lise realizada por linfócitos T CD8<sup>+</sup> de TKO quando estas células foram incubadas com células dendríticas de C57BL/6 (Figura 18 B). Visto que a quantidade utilizada de linfócitos das duas linhagens foi a mesma, este resultado indica que os linfócitos T CD8<sup>+</sup> de TKO apresentam uma falha na sua função citotóxica.

Quando as células dendríticas de TKO foram incubadas com linfócitos T CD8<sup>+</sup> de C57BL/6 foi observada uma lise menor destas células quando infectadas com *B. abortus* (Figura 18 B). Esses dados corroboram portanto os indícios que as células dendríticas de TKO apresentam uma deficiência na apresentação de antígenos, independente das células efectoras adicionadas.



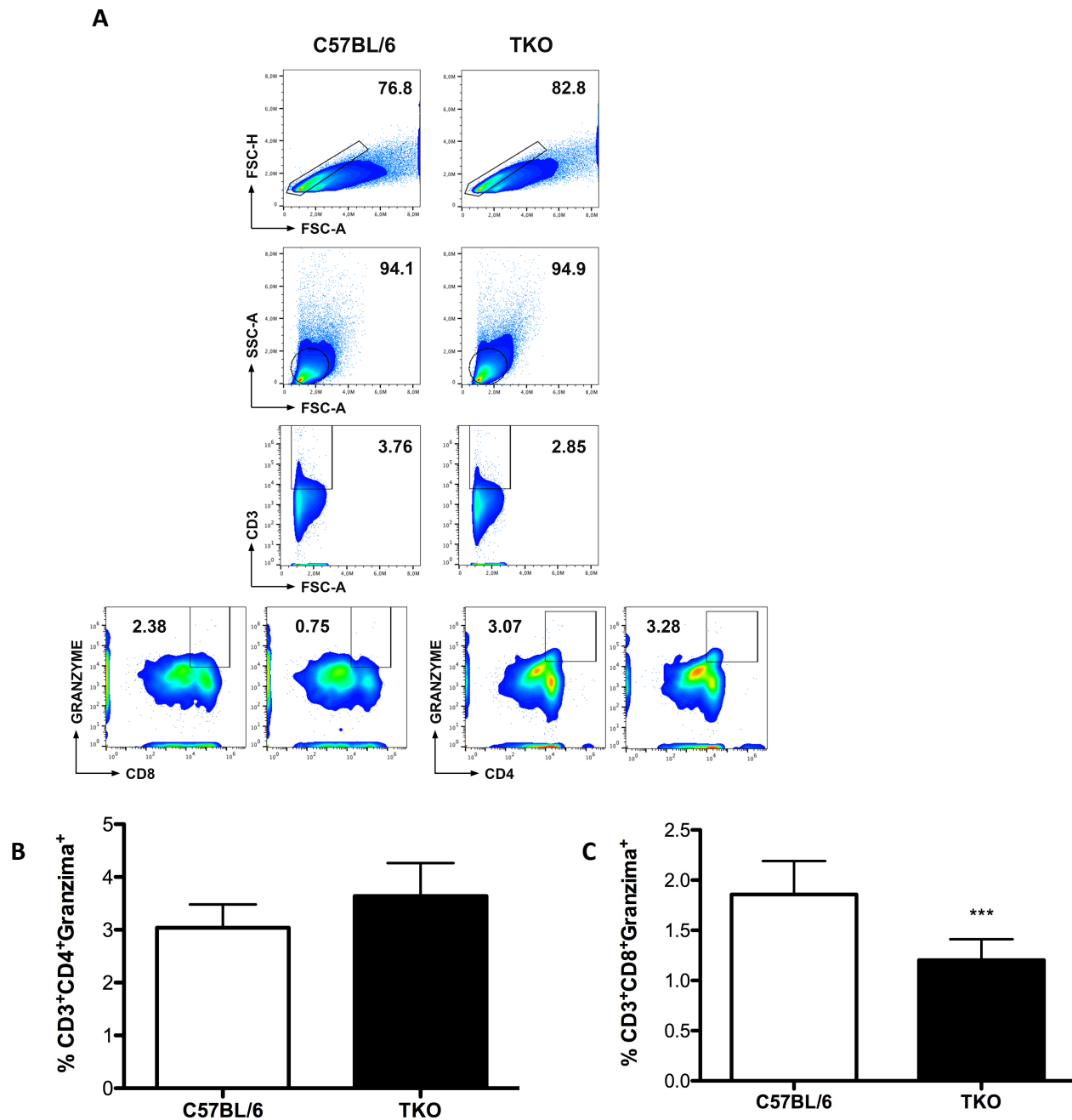
**Figura 18: Lise de células dendríticas infectadas com *B. abortus* por linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> de C57BL/6 e TKO.** Células dendríticas derivadas da medula óssea de C57BL/6 e de TKO foram diferenciadas ( $5 \times 10^5$  células/poço), infectadas ou não com *B. abortus* (MOI 100:1) e utilizados como células alvo. Após 24 horas de infecção, linfócitos (A) T CD4<sup>+</sup> ou (B) T CD8<sup>+</sup> provenientes do baço de camundongos C57BL/6 e TKO infectados foram isolados pelo *sorting* e co-cultivados com as células dendríticas em placas de 24 poços em meio DMEM. Linfócitos T CD4<sup>+</sup> foram adicionados na proporção 1:1 CD4<sup>+</sup>:DCc e linfócitos T CD8<sup>+</sup> na proporção 1:2 CD8<sup>+</sup>:DCs e 24 horas após a co-cultura o sobrenadante foi coletado para quantificar a liberação da enzima LDH. \* ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ) e indicam valor estatisticamente significativo referente ao valor das células dendríticas de C57BL/6.



Estes resultados indicam, portanto, que os animais desprovidos de imunoproteassoma apresentam uma menor capacidade de lise celular devido à uma provável deficiência na função efetora destas células. Além disso, os animais TKO apresentam falhas na apresentação de antígenos de *B. abortus* pelas células dendríticas. Portanto, tanto a célula efetora (T CD8<sup>+</sup>) como a célula alvo (DCs) estão comprometidas nos animais TKO.

#### **5.12. Avaliação da produção de granzima-B por linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>**

Conforme mencionado acima, a atividade citolítica de linfócitos T CD8<sup>+</sup> é predominantemente realizada pela ação de perforinas e granzimas que levam à apoptose do alvo celular (Kagi et al., 1994; Russel et al., 2002). Sendo assim, o próximo passo foi verificar se a produção de granzima-B estava prejudicada nos animais TKO. Para isto, os animais foram infectados com *B. abortus* e, duas semanas depois, retiramos o baço e analisamos a produção de granzima-B intracelular pelos linfócitos. Foram utilizados animais C57BL/6 como controle. Observamos que os linfócitos T CD8<sup>+</sup> de animais TKO produzem menos granzima-B do que as células dos animais selvagens (Figura 19 B). Por outro lado, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre ambas as linhagens de camundongos quando a porcentagem de produção de granzima-B por linfócitos T CD4<sup>+</sup> foi analisada (Figura 19 C). A menor produção de granzima-B por linfócitos T CD8<sup>+</sup> de TKO quanto da lise de células infectadas com *Brucella* pode confirmar a deficiência em sua função citotóxica vista no resultado anterior.



**Figura 19: Análise da produção de granzima-B por linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> de esplenócitos de camundongos C57BL/6 e TKO infectados com *B. abortus*. (A) Dot plot demonstrando o quadrante das células CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/granzima-B<sup>+</sup> e CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>/granzima-B<sup>+</sup>. A análise de citometria de fluxo de células dos baços de animais C57BL/6 e TKO após 2 semanas de infecção com *B. abortus* foi realizada após 4 horas de incubação com brefeldina A e Concanavalina A, seguido da marcação com anticorpos anti-mouse CD3, CD4, CD8 e Granzima-B. 100.000 eventos foram adquiridos no citômetro Attune Acoustic Focusing Cytometer e os resultados foram analisados no programa FlowJo. \*\*\* (p<0,001) indicam valor estatisticamente significativo referente ao C57BL/6.**

## **6. Discussão**

## 6. DISCUSSÃO

A função primária dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> é destruir células hospedeiras infectadas por meio de uma atividade citolítica dependente de perforinas e granzimas ou por interação Fas-Fas (Fas/FasL) (Kagi et al., 1994; Russel et al., 2002). Para induzir uma resposta específica de linfócitos T CD8<sup>+</sup>, as células infectadas apresentam os antígenos através do MHC-I aos receptores TCR expressos pelos linfócitos (Janeway et al., 1988). Os peptídeos apresentados pelo MHC-I são gerados pelo proteassoma, um complexo catalítico responsável pela proteólise intracelular. Além do proteassoma clássico, já foram descritos outros subtipos deste complexo proteolítico, o imunoproteassoma, que é composto pelas subunidades induzíveis  $\beta 1i$ ,  $\beta 2i$  e  $\beta 5i$ , os proteassomas intermediários, constituídos por uma mistura das subunidades padrão e induzíveis e o subtipo timoespecífico, que é encontrado em células do córtex tímico (Murata et al., 2007). O imunoproteassoma otimiza o repertório de peptídeos a ser apresentado pelas moléculas de MHC-I ao seu TCR cognitivo expresso na superfície dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> (Groettrup et al., 2012). Este complexo é constitutivamente expresso em alguns tipos de células, como células dendríticas, mas na maioria das células sua expressão é induzida por IFN- $\gamma$  (Tanaka et al., 1994; Tanaka et al., 1998). Vários estudos mostraram a importância desta estrutura no controle da infecção por diferentes agentes patogênicos em animais desprovidos de uma ou duas subunidades do imunoproteassoma (Strehl et al., 2006; Barton et al., 2002; Hutchinson et al., 2011; Khan et al., 2001). Além disso, o papel desta isoforma do proteassoma em modelos murino de lúpus, colite e síndrome de Hashimoto também foi relatado (Basler et al., 2010; Ichikawa et al., 2012; Nagayama et al., 2012). Mais recentemente, foi desenvolvido por Kincaid e colaboradores um animal knockout para as três subunidades do imunoproteassoma, que foi utilizado no presente estudo (Kincaid et al., 2011)

No presente trabalho, foi investigado o papel do imunoproteassoma durante a infecção pela bactéria *B. abortus* em um modelo murino. *Brucella spp.* são coccobacilos Gram-negativos, intracelulares facultativos e são responsáveis por causar a brucelose

que é considerada a zoonose bacteriana mais comum no mundo. A resposta imune do hospedeiro contra *Brucella* ocorre através da ativação das respostas imunes inata e adaptativa. A resposta inata é a primeira linha de defesa do hospedeiro, onde diferentes tipos de células, como macrófagos, células dendríticas e natural killers, reconhecem a bactéria gerando essa resposta (Archambaud et al., 2010; Diacovich et al., 2010). Entre os receptores capazes de reconhecer *Brucella spp.*, os receptores do tipo Toll (TLR) foram extremamente estudados devido à sua grande importância durante o reconhecimento de *B. abortus*. A resposta imune adaptativa, por sua vez, é dependente principalmente de uma resposta celular que requer a atividade citotóxica de linfócitos T CD8<sup>+</sup> e a produção de citocinas do perfil T<sub>H</sub>1, como IFN- $\gamma$  (Oliveira & Splitter, 1995; Golding et al., 2001). Embora existam inúmeros dados que descrevem os mecanismos da resposta imune contra *Brucella*, a importância do imunoproteossoma permanece desconhecida. Sabendo da importância da resposta imune mediada por células T CD8<sup>+</sup> contra *Brucella* (Oliveira & Splitter, 1995), a investigação do papel do imunoproteossoma durante a infecção bacteriana seria uma estratégia importante para entender melhor a relação dessa estrutura no desenvolvimento da função efetora de células T envolvidas no controle da doença.

Sendo assim, animais desprovidos das três subunidades do imunoproteossoma (TKO) foram infectados com *B. abortus* cepa 2308 afim de se investigar o papel do imunoproteossoma no desenvolvimento da resposta imune e no controle da infecção. Os animais apresentaram uma maior carga bacteriana e uma redução nos níveis de IFN- $\gamma$  produzido por esplenócitos, 1 e 2 semanas após a infecção, sugerindo que o imunoproteossoma é importante no controle desse patógeno. Na quarta semana após a infecção não houve diferença entre os animais TKO e o animais controles, C57BL/6, ressaltando que a participação do imunoproteossoma é mais evidente durante as fases iniciais da infecção (Figuras 8 e 9).

Dados da literatura mostraram que as células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> são consideradas as principais fontes de IFN- $\gamma$  durante a infecção por *Brucella* (Araya et al., 1989; Pavlov et al., 1982), uma vez que foi observada uma redução da produção dessa citocina pelas

células do baço dos animais TKO, decidimos então investigar qual a subpopulação de células T estaria comprometida ao produzir esta citocina. Nossos resultados demonstraram uma grande redução nos níveis de IFN- $\gamma$  produzidos pelos dois subtipos de linfócitos, T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>, nos camundongos TKO durante a infecção por *Brucella*. Alguns trabalhos já mostraram que além da via clássica de geração de antígenos a serem apresentados pela molécula de MHC-II, em que as proteínas exógenas são processadas pelo sistema lisossomal, já foi descrita a geração não clássica de peptídeos a serem apresentados às células T CD4<sup>+</sup>, através de mecanismos de processamento endógeno (Nuchtern et al., 1990; Jaraquemada et al., 1990; Jacobson et al., 1989). Leung e colaboradores discutiram sobre o papel desta via não-clássica, que pode envolver o proteassoma, na geração de epitopos importantes a serem apresentados pelo MHC-II aos receptores do TCR na superfície dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> levando a uma resposta eficiente desta célula (Leung et al., 2015). Diante disso, a ausência do imunoproteassoma pode impactar negativamente no repertório de peptídeos apresentados aos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, levando a uma diminuição da produção de IFN- $\gamma$  por essas células.

No que diz respeito aos dados que mostram a redução da produção de IFN- $\gamma$  por células T CD8<sup>+</sup>, estudos anteriores demonstraram que os camundongos que não possuíam a subunidade LMP7 do imunoproteassoma apresentaram comprometimento na produção de IFN- $\gamma$  por células T CD8<sup>+</sup> após a infecção por *Toxoplasma gondii* (Tu et al., 2009). Neste trabalho, eles hipotetizam que a subunidade LMP7 é crucial para gerar uma resposta eficaz das células T CD8<sup>+</sup> e sugerem que esses animais apresentam um repertório de células T CD8<sup>+</sup> reduzido, devido a problemas na seleção positiva de linfócitos no timo (Tu et al., 2009).

Para gerar respostas eficientes de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>, é necessário o reconhecimento de antígenos através do MHC de classe II e I, respectivamente. A expressão de MHC na superfície das células apresentadoras de antígeno depende da ligação de peptídeos à sua fenda, levando à formação do complexo MHC-peptídeo (van Helden et al., 2011). Fehling e colaboradores mostraram que camundongos LMP7<sup>-/-</sup>

apresentaram uma diminuição da expressão de MHC-I na superfície de suas células comprometendo a apresentação antigênica (Fehling et al., 1994). A deficiência dupla de MECL-1 e LMP7 também reduziu a expressão de MHC de classe I em células knockout após infecção viral (van Heden et al., 2011). Mais recentemente, Kincaid et al., 2012 e Ersching, al., 2016 também demonstraram a deficiência de expressão de MHC-I em animais TKO após a infecção de células dendríticas com LCMV e *T. cruzi*, respectivamente (Kincaid et al., 2011; Ersching et al., 2016). Além disso, Kincaid et al., 2011 mostraram que não apenas as células dendríticas de TKO infectadas reduziram a expressão do MHC-I, mas também as células não infectadas apresentaram uma redução de 50% da expressão dessa molécula (Kincaid et al., 2011). De acordo com esses resultados reportados anteriormente, nossos dados reforçaram essa capacidade diminuída de TKO em expressar MHC-I na superfície das APCs. Os resultados apresentados aqui sugerem que os animais TKO têm capacidade reduzida para expressar moléculas de MHC-I na superfície celular após a infecção, e portanto sugerimos que a formação do complexo MHC-I-*Brucella* está comprometida nesses animais (Figura 12). Em 2012, Barrionuevo e colaboradores já haviam demonstrado que *Brucella abortus* manipula a expressão de moléculas de MHC de classe I e a efetiva ativação de linfócitos TCD8<sup>+</sup>, induzindo a retenção intracelular de moléculas de MHC-I em macrófagos humanos, levando assim à uma menor expressão destas moléculas na superfície celular (Barrionuevo et al. 2013). Este fenômeno era dependente de bactérias metabolicamente viáveis e a modulação de MHC-I correlacionada com o a redução no desenvolvimento de respostas de células T CD8<sup>+</sup> citotóxicas (Milillo et al., 2017).

Alguns autores mostraram que *Brucella* ativa células dendríticas, induzindo a produção da citocina pró-inflamatória IL-12, conforme descrito anteriormente (Bessoles et al., 2009; Ugalde et al., 2003). Nossos dados mostraram que *B. abortus* induz à produção de níveis similares de IL-12, IL-6 e TNF- $\alpha$  por células dendríticas de TKO e C57BL/6 (Figura 13). A literatura, no entanto, é controversa quanto ao papel do imunoproteassoma na via de sinalização de NF- $\kappa$ B e na produção de citocinas pró-inflamatórias. Anteriormente foi demonstrado que a deficiência do imunoproteassoma

levou a uma menor produção de citocinas IL-6, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  por esplenócitos após uma infecção viral (Basler et al., 2011). Em contraste, Bitzer e colaboradores não observaram alterações na produção de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 e na via canônica de NF-kB em macrófagos peritoneais ou fibroblastos embrionários de camundongos *knockout* para duas subunidades do imunoproteassoma após estímulo com LPS (Bitzer et al., 2017). Ao usar os camundongos TKO, Ersching e colaboradores também não observaram diferenças nos níveis de IL-12 após a infecção de células dendríticas derivadas da medula óssea com *T. cruzi* (Ersching, al., 2016). Os dados da literatura aqui apontados, juntamente com os dados obtidos em nossos experimentos, sugerem que a relevância do imunoproteassoma na produção de citocinas pró-inflamatórias varia de acordo com o tipo de célula e os estímulos utilizados.

Uma vez que as células dendríticas expressam constitutivamente as subunidades  $\beta$ 1i,  $\beta$ 2i e  $\beta$ 5i, decidimos investigar sua capacidade de apresentar antígenos durante a infecção por *Brucella*. Nós estimulamos essas células com *B. abortus* e as avaliamos como alvos para esplenócitos de camundongos selvagens e TKO, previamente infectados. Em relação aos ensaios citotóxicos, nossos resultados mostraram que a lise específica era mais evidente em células dendríticas de C57BL/6 infectadas do que em células de TKO. Além disso, a ausência de imunoproteassoma levou a uma redução da função efetora de linfócitos T CD8<sup>+</sup>. Para confirmar a deficiência no processamento de antígenos por células dendríticas de TKO, quantificamos a apresentação do epitopo OVA257-264 (SIINFEKL) por células dendríticas. A degradação da proteína OVA produz comumente este epitopo, que se liga ao MHC-I formando o complexo H-2Kb-SIINFEKL que é expresso na superfície das células. Uma baixa expressão do complexo MHC-I-SIINFEKL na superfície celular pode refletir um desempenho anormal da atividade proteolítica do imunoproteassoma. Nossos resultados mostraram que a geração desse epitopo em animais TKO foi 38% menor em comparação com células do tipo selvagem, confirmando assim uma falha na geração de peptídeos e consequentemente na apresentação do antígeno pelas células de TKO (Figura 16).

Diante deste resultado, investigamos a importância de cada sub-população de



linfócitos T em lisar células dendríticas infectadas com *B. abortus*. A análise das subpopulações de células T indicou que os linfócitos T CD8<sup>+</sup> de TKO não foram capazes de lisar de forma eficiente as DCs infectadas com *Brucella*, mostrando assim uma redução em sua função citotóxica. De acordo com Oliveira et al., a resposta das células T CD8<sup>+</sup> é um mecanismo importante para controlar a infecção por *Brucella*, uma vez que os animais deficientes em MHC-I foram mais susceptíveis a infecção bacteriana, enquanto que a deficiência de MHC-II não impediu que os animais eliminassem a bactéria (Oliveira & Splitter, 1995). Ainda no trabalho mencionado acima, foi mostrado que os animais que não possuíam células T CD8<sup>+</sup> produziram níveis mais altos de IL-10, uma citocina imunossupressora, e essas células não conseguiram eliminar macrófagos infectados com *Brucella*, mostrando a importância das células T CD8<sup>+</sup> durante esta infecção bacteriana (Oliveira & Splitter, 1995). Além disso, Durward-Diioia e colaboradores demonstraram que, durante a brucelose crônica, *Brucella* é capaz de subverter a resposta das células T CD8<sup>+</sup> para permitir sua persistência no hospedeiro como mecanismo de evasão imunológica (Durward-Diioia et al. 2015). Deste modo, a importância das células T CD8<sup>+</sup> na imunidade protetora à infecção por *Brucella* é ilustrada pela maior susceptibilidade dos animais TKO.

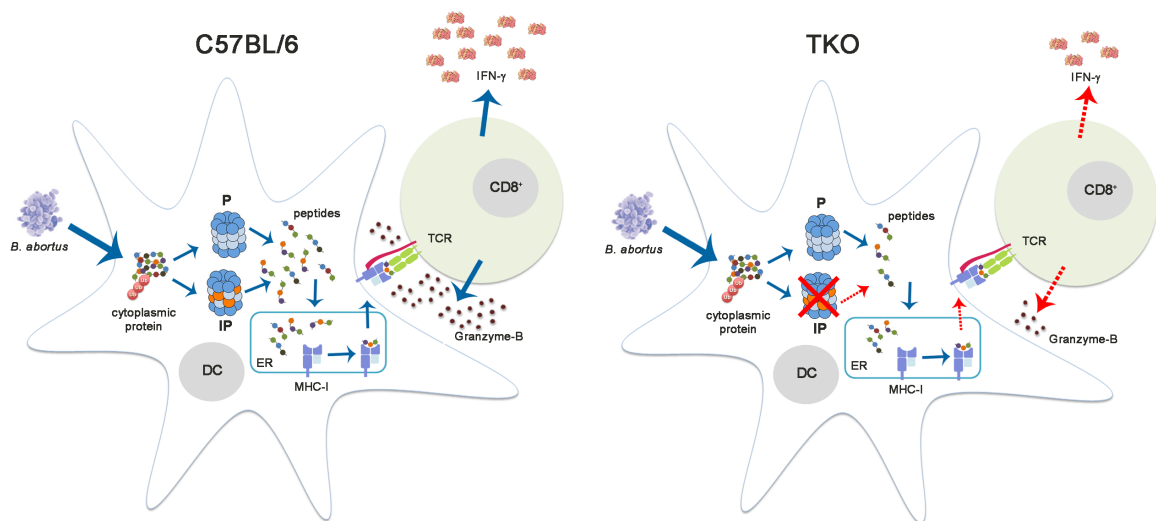
De fato, a deficiência de células TCD8<sup>+</sup> mostrada aqui neste trabalho é coerente com a maior susceptibilidade de animais TKO, uma vez que este subtipo de linfócitos é crucial para controlar a infecção por *Brucella*. Essa deficiência pode estar relacionada a problemas na seleção tímica. Em 2007, Murata e colaboradores descreveram um tipo de proteossoma timo-específico, o qual é constituído das subunidades  $\beta 1i$ ,  $\beta 2i$  e  $\beta 5t$ , sendo esta última encontrada apenas nas células corticais do timo, que são responsáveis pela seleção positiva dos timócitos. Os autores sugerem um papel fundamental de  $\beta 5t$  na geração de repertório para MHC-I a ser apresentado para linfócitos T CD8<sup>+</sup> durante a seleção tímica (Murata et al. 2007). Os animais TKO não apresentam as subunidades  $\beta 1i$  e  $\beta 2i$ , logo não apresenta também o timoproteossoma, sendo assim a seleção tímica pode estar prejudicada nestes animais.

Além da função citotóxica mediada por células T CD8<sup>+</sup>, Martirosyan et al. (2013) descreveram a capacidade dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> em lisar células alvo de camundongos infectados com *B. abortus* (Martirosyan et al., 2013). Estes linfócitos T CD4<sup>+</sup> produziram altos níveis de granzima-B e IFN- $\gamma$ , e apresentaram atividade citolítica contra fagócitos infectados. Os resultados aqui mostrados são consistentes com estes dados, pois também podemos observar a lise mediada por células T CD4<sup>+</sup>. No entanto, a ausência do imunoproteassoma não alterou a atividade dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> contra DCs infectadas com *Brucella*, uma vez que não houve diferença na quantidade de LDH liberada (Figura 18).

A citotoxicidade mediada por células T pode ocorrer através de exocitose de grânulos, que usa perforinas para formar um poro transmembranar nas células alvo pelas quais as moléculas de granzima são internalizadas. Granzima-B é uma serino-protease que ativa alguns membros da família das caspases, levando a apoptose celular (Russel et al., 2002; Darmon et al., 1995). Quando os linfócitos citotóxicos reconhecem o antígeno apresentado via TCR, o grânulo de granzima previamente sintetizado é excitado através da sinapse imunológica formada pelas células T-APCs e também a biossíntese de novo de moléculas de granzima se inicia (Rotonda et al., 2001). Foram descritos vários fatores de transcrição, incluindo NFAT, AP-1 e NF- $\kappa$ B que leva à ativação da transcrição do gene da granzima após um estímulo (Wargnier et al., 1998; Huang, et al., 2006; Haddad et al., 1993). Diante do exposto, e com o objetivo de obter uma melhor compreensão da importância do imunoproteassoma na função efetora dos linfócitos citotóxicos, foi avaliada a produção de granzima-B pelas células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>. Com relação à expressão de granzima-B por células T CD4<sup>+</sup>, não foi observada diferença entre as células de camundongos TKO em comparação com o tipo selvagem (Figura 19). A redução da expressão de granzima-B por linfócitos T CD8<sup>+</sup> de TKO pode explicar a diminuição da lise mediada por esta subpopulação de células T. Esta menor expressão de granzima-B poderia estar relacionada à ativação de fatores de transcrição mencionados, mas ainda é necessário uma investigação mais aprofundada para que isto seja confirmado. Arias e colaboradores mostraram que as células T CD8<sup>+</sup> e a atividade

citólítica por meio de granzima-B participam no controle da infecção por *Brucella microti*, uma vez que a eliminação de bactérias no baço foi retardada em camundongos granzima-B<sup>-/-</sup> (Arias, et al., 2014).

Em resumo, os resultados apresentados aqui sugerem que o imunoproteassoma é importante para o controle da infecção pela bactéria *Brucella abortus*. A Figura 20 resume os resultados obtidos neste trabalho em um modelo que mostra a resposta imune alterada contra *B. abortus* na ausência do imunoproteassoma. Nosso modelo esquemático sugere que, nos animais TKO o repertório de peptídeos gerado pela via proteassomal é diferente de C57BL/6, levando a uma diminuição da ativação de células T CD8<sup>+</sup> e produção reduzida de granzima-B e IFN- $\gamma$ . Portanto, a ausência completa das subunidades do imunoproteassoma interferiu negativamente com os mecanismos de controle do hospedeiro durante a infecção por *B. abortus*.



**Figura 20: Modelo esquemático da resposta de células T CD8<sup>+</sup> durante *B. abortus* em animais TKO.** As proteínas da bactéria *B. abortus* secretadas no citoplasma de células dendríticas são degradadas pelo imunoproteassoma gerando uma variedade de peptídeos. Estes peptídeos são então transportados para o retículo endoplasmático e se ligam à molécula MHC-I. O complexo MHC-I-peptídeo é exportado para a membrana celular e reconhecido pelos linfócitos T CD8<sup>+</sup>. Em seguida, as células T CD8<sup>+</sup> produzem granzima-B e IFN- $\gamma$  em resposta à infecção. As setas vermelhas pontilhadas indicam o processo parcialmente prejudicado nas células dendríticas e nos linfócitos T CD8<sup>+</sup> de TKO. P, proteassoma; IP, imunoproteassoma; E.R., retículo endoplasmático; DC, célula dendrítica.

## **7. Conclusão**

## 7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que o imunoproteassoma é importante para o controle da *Brucella abortus* em fases iniciais da infecção. Além disso, a ausência do imunoproteassoma levou a uma diminuição da população de linfócitos T CD8<sup>+</sup> e T CD4<sup>+</sup> produtores de IFN- $\gamma$  e a uma diminuição da porcentagem de linfócitos T CD8<sup>+</sup>. Foi observada uma menor exposição do complexo MHC-I-peptídeo na superfície das células dendríticas, levando a uma diminuição da ativação de linfócitos T CD8<sup>+</sup> e da produção de granzima-B e de IFN- $\gamma$ . Esses linfócitos, por sua vez, se mostraram menos eficientes quanto à sua função efetora, lisando menos as células alvo infectadas por *B. abortus*. Sendo assim, a ausência do imunoproteassoma interferiu com as duas principais formas de controle da infecção por *Brucella*: produção de IFN- $\gamma$  e citotoxicidade mediada por linfócitos T CD8<sup>+</sup>.

## **8. Referências Bibliográficas**

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agarwal, A.K. et al., 2010. PSMB8 encoding the  $\beta 5i$  proteasome subunit is mutated in joint contractures, muscle atrophy, microcytic anemia, and panniculitis-induced lipodystrophy syndrome. *American journal of human genetics*, 87(6), pp.866–72.
- Alton, G.G.; Forsyth, J.R.L. 1999. Brucella: <http://129.109.112.248/microbook/ch028.htm>.
- Alton, G. G.; Jones, L. M.; Angus, R. D.; Verger, J. M. 1988. Techniques for the brucellosis laboratory. INRA, Paris.
- Andersen-Nissen, E., K. D. Smith, et al. 2005. Evasion of Toll-like receptor 5 by flagellated bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102: 9247-52.
- Araya, L.N. et al., 1989. Temporal development of protective cell-mediated and humoral immunity in BALB/c mice infected with *Brucella abortus*. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 143(10), pp.3330–3337.
- Archambaud, C. et al., 2010. Contrasting roles of macrophages and dendritic cells in controlling initial pulmonary *Brucella* infection. *European Journal of Immunology*, 40(12), pp.3458–3471.
- Arellano-Garcia, M.E. et al., 2014. Interferon- $\gamma$  induces immunoproteasomes and the presentation of MHC I-associated peptides on human salivary gland cells. *PloS one*, 9(8), p.e102878.
- Arellano-Reynoso, B. et al., 2005. Cyclic beta-1,2-glucan is a *Brucella* virulence factor required for intracellular survival. *Nature immunology*, 6(6), pp.618–625.
- Arias, M.A., et al., *Elucidating sources and roles of granzymes A and B during bacterial infection and sepsis*. Cell Rep, 2014. 8(2): p. 420-9.
- Arima, K. et al., 2011. Proteasome assembly defect due to a proteasome subunit beta type 8 (PSMB8) mutation causes the autoinflammatory disorder, Nakajo-Nishimura syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*

*United States of America*, 108(36), pp.14914–9.

Ariza J, Gudiol F, Pallares R et al. Treatment of human brucellosis with doxycycline plus rifampin or doxycycline plus streptomycin. *Ann Intern Med* 1992; 117: 25-30.

Atluri, V.L. et al., 2011. Interactions of the Human Pathogenic *Brucella* Species with Their Hosts. *Annual Review of Microbiology*, 65(1), pp.523–541.

Audic, S. et al., 2009. *Brucella microti*: the genome sequence of an emerging pathogen. *BMC genomics*, 10, p.352.

Barrionuevo, P. et al., 2013. *Brucella abortus* induces intracellular retention of MHC-I molecules in human macrophages down-modulating cytotoxic CD8+ T cell responses. *Cellular Microbiology*, 15(4), pp.487–502.

Barton, L.F., et al., *Regulation of Immunoproteasome Subunit Expression In Vivo Following Pathogenic Fungal Infection*. *The Journal of Immunology*, 2002. **169**(6): p. 3046-3052.

Basler, M. et al., 2010. Prevention of experimental colitis by a selective inhibitor of the immunoproteasome. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 185(1), pp.634–641.

Basler, M. et al., 2011. The Antiviral Immune Response in Mice Devoid of Immunoproteasome Activity.

Basler, M., Kirk, C.J. & Groettrup, M., 2012. The immunoproteasome in antigen processing and other immunological functions. *Current opinion in immunology*, 25(1), pp.74–80.

Berg, J.M., Tymoczko, J.L. & Stryer, L., 2010. *Biochemistry*.

Bernt, E. & Hess, B., 1965. *Methods of Enzymatic Analysis*.

Bessoles, S. et al., 2009. Human CD4+ invariant NKT cells are involved in antibacterial immunity against *Brucella suis* through CD1d-dependent but CD4-independent mechanisms. *European journal of immunology*, 39(4), pp.1025–35.



- Billard, E., Dornand, J. & Gross, A., 2007. Interaction of *Brucella suis* and *Brucella abortus* rough strains with human dendritic cells. *Infection and Immunity*, 75(12), pp.5916–5923.
- Bitzer, A., et al., *Immunoproteasome subunit deficiency has no influence on the canonical pathway of NF-kappaB activation*. *Mol Immunol*, 2017. **83**: p. 147-153.
- Boschiroli, M.L. et al., 2002. Type IV secretion and *Brucella* virulence. *Veterinary Microbiology*, 90(1-4), pp.341–348.
- Brandão, A.P.M.S. et al., 2012. Host Susceptibility to *Brucella abortus* Infection Is More Pronounced in IFN- $\gamma$  knockout than IL-12/  $\beta$  2-Microglobulin Double-Deficient Mice. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012, pp.1–7.
- Campos, M.A. et al., 2004. Role of Toll-like receptor 4 in induction of cell-mediated immunity and resistance to *Brucella abortus* infection in mice. *Infection and immunity*, 72(1), pp.176–86.
- Capasso L. Bacteria in two-millennia- old cheese, and related epizoonoses in Roman populations. *J Infect* 2002;45:122-7.
- Celli, J., 2004. Organelle robbery: *Brucella* interactions with the endoplasmic reticulum. *Current Opinion in Microbiology*, 7(1), pp.93–97.
- Christopher, S., Umopathy, B.L. & Ravikumar, K.L., 2010. Brucellosis: review on the recent trends in pathogenicity and laboratory diagnosis. *Journal of laboratory physicians*, 2(2), pp.55–60.
- Cloekaert, A. et al., 2001. Classification of *Brucella* spp. isolated from marine mammals by DNA polymorphism at the *omp2* locus. *Microbes and Infection*, 3(9), pp.729–738.
- Corbel, M.J. 1997. Brucellosis: an overview. *Emerging Infectious Diseases*. 2: 213-221.
- Jong and Tsolis, 2012
- Darmon, A.J., Nicholson, D.W. & Bleackley, R.C., 1995. Activation of the apoptotic

protease CPP32 by cytotoxic T-cell-derived granzyme B. *Nature*, 377(6548), pp.446–8.

Detilleux, P.G.; Deyoe, B.L.; Cheville, N.F. 1990. Penetration and intracellular growth of *Brucella abortus* in nonphagocytic cells in vitro. *Infect. Immun.* 58: 2320-2328.

Diacovich, L. and J.P. Gorvel, *Bacterial manipulation of innate immunity to promote infection*. *Nat Rev Microbiol*, 2010. **8**(2): p. 117-28.

Doganay, M. & Aygen, B., 2003. Human brucellosis: an overview. *International Journal of Infectious Diseases*, 7(3), pp.173–182.

Durward-Diiioia M, et al., 2015. CD8+ T cell exhaustion, suppressed gamma interferon production, and delayed memory response induced by chronic *Brucella melitensis* infection. *Infect Immun* 83:4759-71.

Ersching, J., et al., *The Combined Deficiency of Immunoproteasome Subunits Affects Both the Magnitude and Quality of Pathogen- and Genetic Vaccination-Induced CD8+ T Cell Responses to the Human Protozoan Parasite Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathog*, 2016. **12**(4): p. e1005593.

Fehling, H.J., et al., *MHC class I expression in mice lacking the proteasome subunit LMP-7*. *Science*, 1994. **265**(5176): p. 1234-7.

Ferrington, D. a. & Gregerson, D.S., 2012. *Immunoproteasomes: Structure, Function, and Antigen Presentation*,

Fitzpatrick, L.R. et al., 2006. Dextran sulfate sodium-induced colitis is associated with enhanced low molecular mass polypeptide 2 (LMP2) expression and is attenuated in LMP2 knockout mice. *Digestive diseases and sciences*, 51(7), pp.1269–76.

Forestier, C.; Deleuil, F.; et al. 2000. *Brucella abortus* lipopolysaccharide in murine peritoneal macrophages acts as a down-regulator of T cell activation. *Journal of Immunology*. 165: 5202-5210.

Giambartolomei, G. H.; Zwerdling, A.; Cassataro, J.; Bruno, L.; Fossati, C. A.; Philipp, E M. T. 2004. Lipoproteins, not lipopolysaccharide, are the key mediators of the

- proinflammatory response elicited by heat-killed *Brucella abortus*. *J. Immunol.* 173: 4635-42.
- Girdlestone, J. et al., 1993. Transcriptional regulation of HLA-A and -B: differential binding of members of the Rel and IRF families of transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(24), pp.11568–11572.
- Glickman, M.H. & Ciechanover, A., 2002. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiological reviews*, 82(2), pp.373–428.
- Golding, B. et al., 2001. Immunity and protection against *Brucella abortus*. *Microbes and Infection*, 3(1), pp.43–48.
- Gorvel, J.P. & Moreno, E., 2002. *Brucella* intracellular life: From invasion to intracellular replication. *Veterinary Microbiology*, 90(1-4), pp.281–297.
- Gottuzo E, Carrilo C, Guerra J et al. An evaluation of diagnostic methods for brucellosis: The value of bone marrow cultures. *J Infect Dis* 1986; 153: 122-125.
- Grillá, M.J. et al., 2012. What have we learned from brucellosis in the mouse model? *Veterinary Research*, 43(1), pp.1–35.
- Groettrup, M., et al., *The Interferon- $\gamma$ -inducible 11 S Regulator (PA28) and the LMP2/LMP7 Subunits Govern the Peptide Production by the 20 S Proteasome in Vitro*. *Journal of Biological Chemistry*, 1995. **270**(40): p. 23808-23815.
- Groll, M. & Huber, R., 2004. Inhibitors of the eukaryotic 20S proteasome core particle: A structural approach. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1695(1-3), pp.33–44.
- Guha, S. & Padh, H., 2008. Cathepsins: Fundamental effectors of endolysosomal proteolysis. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 45(2), pp.75–90.
- Haddad, P., et al., *A promoter element of the human serine esterase granzyme B gene controls specific transcription in activated T cells*. *Eur J Immunol*, 1993. **23**(3): p. 625-9.

- He Y, Vemulapalli R, Zeytun A, Schurig GG. Induction of specific cytotoxic lymphocytes in mice vaccinated with *Brucella abortus* RB51. *Infect Immun* 2001; 69(9): 5502-8.
- Heink, S. et al., 2005. IFN-gamma-induced immune adaptation of the proteasome system is an accelerated and transient response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(26), pp.9241–6.
- Hensley, S.E. et al., 2010. Unexpected role for the immunoproteasome subunit LMP2 in antiviral humoral and innate immune responses. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 184, pp.4115–4122.
- Huang, L.Y. et al., 2001. IL-12 induction by a TH1-inducing adjuvant in vivo: dendritic cell subsets and regulation by IL-10. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 167(3), pp.1423–30.
- Huang, L. Y., K. J. Ishii, et al. (2005). "Th1-like cytokine induction by heat-killed *Brucella abortus* is dependent on triggering of TLR9." *J Immunol* **175**(6): 3964-3970.
- Huang, C., et al., *A novel NF-kappaB binding site controls human granzyme B gene transcription*. *J Immunol*, 2006. **176**(7): p. 4173-81.
- Huber, E.M. et al., 2012. Immuno- and constitutive proteasome crystal structures reveal differences in substrate and inhibitor specificity. *Cell*, 148(4), pp.727–738.
- Hunt, a C. & Bothwell, P.W., 1967. Histological findings in human brucellosis. *Journal of clinical pathology*, 20(3), pp.267–272.
- Hussong, S. a. et al., 2010. Immunoproteasome deficiency alters retinal proteasome's response to stress. *Journal of Neurochemistry*, 113(6), pp.1481–1490.
- Hutchinson, S., et al., *A dominant role for the immunoproteasome in CD8+ T cell responses to murine cytomegalovirus*. *PLoS One*, 2011. **6**(2): p. e14646.
- Ichikawa, H.T. et al., 2011. Novel proteasome inhibitors have a beneficial effect in murine lupus via the dual inhibition of type I interferon and autoantibody secreting cells. *Arthritis and rheumatism*, pp.1–34.

- Ichikawa, H.T., et al., *Beneficial effect of novel proteasome inhibitors in murine lupus via dual inhibition of type I interferon and autoantibody-secreting cells*. *Arthritis Rheum*, 2012. **64**(2): p. 493-503.
- Inohara, N. & Nunez, G., 2003. NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat Rev Immunol*, 3(5), pp.371–382.
- Iwasaki, A. and R. Medzhitov (2004). "Toll-like receptor control of the adaptive immune responses." *Nat Immunol* **5**(10): 987-995.
- Jacobson, S., et al., *HLA class II-restricted presentation of cytoplasmic measles virus antigens to cytotoxic T cells*. *J Virol*, 1989. **63**(4): p. 1756-62.
- Jameson, S.C. and M.J. Bevan, *Dissection of major histocompatibility complex (MHC) and T cell receptor contact residues in a Kb-restricted ovalbumin peptide and an assessment of the predictive power of MHC-binding motifs*. *Eur J Immunol*, 1992. **22**(10): p. 2663-7.
- Janeway, C.A., Jr., et al., *Immune recognition and effector function in subsets of CD4 T cells*. *Princess Takamatsu Symp*, 1988. **19**: p. 193-208.
- Jaraquemada, D., M. Marti, and E.O. Long, *An endogenous processing pathway in vaccinia virus-infected cells for presentation of cytoplasmic antigens to class II-restricted T cells*. *J Exp Med*, 1990. **172**(3): p. 947-54.
- Jong, M.; Rolán, H. G.; Tsolis, R. M. 2010. Innate immune encounters of the (Type) 4 kind: Brucella. *Cellular Microbiology*. 1-8.
- Jung, T., Catalgol, B. & Grune, T., 2009. The proteasomal system. *Molecular Aspects of Medicine*, 30(4), pp.191–296.
- Jung, T. & Grune, T., 2012. *Structure of the proteasome* 1st ed., Elsevier Inc.
- Kägi, D. et al., 1994. Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science (New York, N.Y.)*, 265(5171), pp.528–530.

- Khan, S., et al., *Immunoproteasomes Largely Replace Constitutive Proteasomes During an Antiviral and Antibacterial Immune Response in the Liver*. *The Journal of Immunology*, 2001. **167**(12): p. 6859-6868.
- Kincaid, E.Z. et al., 2012. Mice completely lacking immunoproteasomes display major alterations in antigen presentation. , **13**(2), pp.129–135.
- Kitamura, A. et al., 2011. A mutation in the immunoproteasome subunit PSMB8 causes autoinflammation and lipodystrophy in humans. *The Journal of clinical investigation*, **121**(10), pp.4150–60.
- Leung, C.S., *Endogenous Antigen Presentation of MHC Class II Epitopes through Non-Autophagic Pathways*. *Front Immunol*, 2015. **6**: p. 464.
- Loidl, G. et al., 1999. Bifunctional inhibitors of the trypsin-like activity of eukaryotic proteasomes. *Chemistry and Biology*, **6**(4), pp.197–204.
- Macedo, G. C., D. M. Magnani, et al. (2008). "Central role of MyD88-dependent dendritic cell maturation and proinflammatory cytokine production to control *Brucella abortus* infection." *J Immunol* **180**(2): 1080-1087.
- Martinon, F. & Aksentijevich, I., 2014. New players driving inflammation in monogenic autoinflammatory diseases. *Nature Publishing Group*, **11**(1), pp.11–20.
- Martirosyan, A. et al., 2013. In vivo identification and characterization of CD4+ cytotoxic T cells induced by virulent *Brucella abortus* infection. *PLoS ONE*, **8**(12), pp.1–10.
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P & Janeway CA Jr, 1997. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, **388**(6640), pp.394–397.
- Milillo MA, et al.,. 2017. *B. abortus* RNA is the component involved in the down-modulation of MHC-I expression on human monocytes via TLR8 and the EGFR pathway. *PLoS Pathog* **13**:e1006527.
- Morgan, W.J.B., 1990. Techniques for the Brucellosis laboratory. *British Veterinary Journal*, **146**, p.188.

- Muchamuel, T. et al., 2009. A selective inhibitor of the immunoproteasome subunit LMP7 blocks cytokine production and attenuates progression of experimental arthritis. *Nature Medicine*, 15(7), pp.781–787.
- Murata, S. et al., 2007. Regulation of CD8+ T cell development by thymus-specific proteasomes. *Science (New York, N.Y.)*, 316(5829), pp.1349–1353.
- Murphy, K., Travers, P. & Walport, M., 2008. *Janeway's Immunobiology*.
- Murphy, E.A., et al., *Interferon-gamma is crucial for surviving a Brucella abortus infection in both resistant C57BL/6 and susceptible BALB/c mice*. *Immunology*, 2001. **103**(4): p. 511-8.
- Mykles, D.L., 1998. Intracellular proteinases of invertebrates: calcium-dependent and proteasome/ubiquitin-dependent systems. *International review of cytology*, 184, pp.157–289.
- Nagata, S., 1997. Apoptosis by death factor. *Cell*, 88(3), pp.355–365.
- Nagayama, Y. et al., 2012. Prophylactic and therapeutic efficacies of a selective inhibitor of the immunoproteasome for Hashimoto's thyroiditis, but not for Graves' hyperthyroidism, in mice. *Clinical and experimental immunology*, 168(3), pp.268–73.
- Nicoletti, P., 2002. A short history of Brucellosis. *Veterinary Microbiology*, 90(1-40), pp.5–9.
- Nuchtern, J.G., W.E. Biddison, and R.D. Klausner, *Class II MHC molecules can use the endogenous pathway of antigen presentation*. *Nature*, 1990. **343**(6253): p. 74-6.
- Oliveira, S.C. et al., 2008. The role of innate immune receptors in the control of Brucella abortus infection: Toll-like receptors and beyond. *Microbes and Infection*, 10(9), pp.1005–1009.
- Oliveira, S.C. et al., 2012. Update on the role of innate immune receptors during Brucella abortus infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 148(1-2), pp.129–135.

- Oliveira, S.C. & Splitter, G. a, 1995. CD8<sup>+</sup> type 1 CD44<sup>hi</sup> CD45<sup>RBlo</sup> T lymphocytes control intracellular *Brucella abortus* infection as demonstrated in major histocompatibility complex class I- and class II-deficient mice. *European journal of immunology*, 25(9), pp.2551–2557.
- Pappas, G., 2010. The changing *Brucella* ecology: Novel reservoirs, new threats. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 36(SUPPL. 1), pp.S8–S11.
- Pappas, G. et al., 2006. The new global map of human brucellosis. *The Lancet infectious diseases*, 6(2), pp.91–99.
- Parent, M. a. et al., 2007. *Brucella abortus* bacA mutant induces greater pro-inflammatory cytokines than the wild-type parent strain. *Microbes and Infection*, 9(1), pp.55–62.
- Pavlov, H., et al., *In vivo and in vitro effects of monoclonal antibody to Ly antigens on immunity to infection*. *Cell Immunol*, 1982. **71**(1): p. 127-38.
- Pizarro-Cerda, J. et al., 1998. *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes. *Infect Immun*, 66(12), pp.5711–24.
- Poester, F.P., Gonçalves, V.S.P. & Lage, A.P., 2002. Brucellosis in Brazil. *Veterinary Microbiology*, 90(1-4), pp.55–62.
- Porgador, A., et al., *Localization, quantitation, and in situ detection of specific peptide-MHC class I complexes using a monoclonal antibody*. *Immunity*, 1997. **6**(6): p. 715-26.
- Rotonda, J., et al., *The three-dimensional structure of human granzyme B compared to caspase-3, key mediators of cell death with cleavage specificity for aspartic acid in P1*. *Chem Biol*, 2001. **8**(4): p. 357-68.
- Russell, J.H. & Ley, T.J., 2002. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annual review of immunology*, 20(6), pp.323–370.
- Sangari, F.J. & Agüero, J., 1996. Molecular basis of *Brucella* pathogenicity: an update.



*Microbiologia*, 12(2), pp.207–218.

Schmidt, N. et al., 2010. Targeting the proteasome: partial inhibition of the proteasome by bortezomib or deletion of the immunosubunit LMP7 attenuates experimental colitis. *Gut*, 59(7), pp.896–906.

Scholz, H.C. et al., 2010. *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60, pp.801–808.

Shehabi A, Shakir K, El-Khaterb M et al. Diagnosis and treatment of 106 cases of human brucellosis. *J Infect* 1990; 20 (1): 5-10.

Skendros P, Pappas G, Boura P. Cell-mediated immunity in human brucellosis. *Microbes Infect* 2011; 13(2): 134-42.

Solera, J., 2010. Update on brucellosis: Therapeutic challenges. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 36(SUPPL. 1), pp.6–8.

Starr, T. et al., 2008. *Brucella* intracellular replication requires trafficking through the late endosomal/lysosomal compartment. *Traffic*, 9(5), pp.678–694.

Strehl, B. et al., 2006. Immunoproteasomes are essential for clearance of *Listeria monocytogenes* in nonlymphoid tissues but not for induction of bacteria-specific CD8<sup>+</sup> T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 177(9), pp.6238–6244.

Tanaka, K., 1994. Role of proteasomes modified by interferon-gamma in antigen processing. *Journal of Leukocyte Biology*, 56(5), pp.571–5.

Tanaka, K. & Kasahara, M., 1998. The MHC class I ligand-generating system: roles of immunoproteasomes and the interferon-gamma-inducible proteasome activator PA28. *Immunological reviews*, 163, pp.161–176.

Tu, L. et al., 2009. Critical role for the immunoproteasome subunit LMP7 in the resistance of mice to *Toxoplasma gondii* infection. *European journal of immunology*, 39(12), pp.3385–94.

- Ugalde, J.E. et al., 2003. Evaluation of *Brucella abortus* phosphoglucomutase (pgm) mutant as a new live rough-phenotype vaccine. *Infection and immunity*, 71(11), pp.6264–9.
- van Helden, M.J., et al., *Immunoproteasome-deficiency has no effects on NK cell education, but confers lymphocytes into targets for NK cells in infected wild-type mice*. PLoS One, 2011. 6(8): p. e23769.
- Vassallo, D.J., 1992. The corps disease: brucellosis and its historical association with the Royal Army Medical Corps. *Journal of the Royal Army Medical Corps*, 138, pp.140–150.
- Voges, D., Zwickl, P. & Baumeister, W., 1999. The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annual review of biochemistry*, 68, pp.1015–68.
- Wargnier, A., et al., *Down-regulation of human granzyme B expression by glucocorticoids. Dexamethasone inhibits binding to the Ikaros and AP-1 regulatory elements of the granzyme B promoter*. J Biol Chem, 1998. 273(52): p. 35326-31.
- Weiss, D. S., K. Takeda, et al. (2005). "MyD88, but not toll-like receptors 4 and 2, is required for efficient clearance of *Brucella abortus*." *Infect Immun* 73(8): 5137-5143.
- WHO World Health Organization, 1998. WHO consultation on the development of new/improved brucellosis vaccines. 17 December 1997, Geneva, Switzerland. In *Biologicals*. pp. 361–363.
- Young, E., 2006. *Brucella* species. In *Principles and Practice of Clinical Bacteriology*. p. 620.
- Young, E., 1988. Brucellosis: a model zoonosis in developing countries. *APMIS*, 3, pp.17–20.
- Zhan, Y., Yang, J. & Cheers, C., 1993. Cytokine response of T-cell subsets from *Brucella abortus*-infected mice to soluble *Brucella* proteins. *Infection and immunity*, 61(7), pp.2841–7.

## **9. Anexo**

## 9. ANEXO

Os resultados desta tese foram compilados em um artigo submetido à revista *Infection and Immunity* e se encontra em anexo a seguir.

Durante a realização do doutorado participei também da co-autoria de outros projetos que resultaram na publicação de artigos que listados abaixo:

- “TLR7 and TLR3 sense *Brucella abortus* RNA to induce proinflammatory cytokine production but they are dispensable for host control of infection”. Campos, P.C.; Gomes, M.T.; Guimarães, E.S.; **Guimarães, G.**; Oliveira, S.C.. (Front Immunol. 2017. doi: 10.3389/fimmu.2017.00028.)
- “NLRP12 negatively regulates proinflammatory cytokine production and host defense against *Brucella abortus*”. Silveira, T.N.; Gomes, M.T.; Oliveira, L.S.; Campos, P.C., **Machado, G.G.**; Oliveira, S.C.. (Eur J Immunol., v. 47(1):51-59, 2016).
- “Lack of IL-1 Receptor-Associated Kinase-4 Leads to Defective Th1 Cell Responses and Renders Mice Susceptible to Mycobacterial Infection”. Marinho, F.V.; Fabel, J.S.; Scanga, C.A.; Gomes, M.T.; **Guimarães, G.**; Carvalho, G.R.; Morales, S.V.; Báfica, A.; Oliveira, S.C. (J Immunol., v.197(5), p.1852-63, 2016).
- “Anti-loxoscelic horse serum produced against a recombinant dermonecrotic protein of Brazilian *Loxosceles intermedia* spider neutralize lethal effects of *Loxosceles laeta* venom from Peru”. Duarte, C.G.; Bonilla, C.; **Guimarães, G.**; Machado de Avila, R.A.; Mendes, T.M.; Silva, W.; Tintaya, B.; Yarleque, A.; Chávez-Olórtegui, C. (Toxicon, v. 93, p. 37-40, 2015).
- “*Brucella abortus* DNA is a major bacterial agonist to activate the host innate immune system”. Campos, P.C.; Gomes, M.T.R.; **Guimarães, G.**; Costa-Franco, M.M.S.; Marim, F.M.; Oliveira, S.C.. (Microbes and Infection, v. 16, p. 979, 2014).

## Infection and Immunity® Manuscript Submission and Peer Review System

[Home](#) [Help for Authors](#) [Help for Reviewers](#) [Contact Us](#) [Logout](#)

|                                       |   |
|---------------------------------------|---|
| <b>Manuscript #</b>                   | IAI00615-17   |
| <b>Current Revision #</b>             | 0   |
| <b>Submission Date</b>                | 2017-08-27 21:46:52   |
| <b>Current Stage</b>                  | Under Review  |
| <b>Title</b>                          | Immunoproteasome subunits are required for CD8 <sup>+</sup> T cell function and host resistance to Brucella abortus infection in mice   |
| <b>Running Title</b>                  | Immunoproteasome requirement on Brucella infection  |
| <b>Manuscript Type</b>                | Full-Length Text  |
| <b>Journal Section</b>                | Host Response and Inflammation  |
| <b>Corresponding Author</b>           | Prof. Sergio Costa Oliveira (Department of Biochemistry and Immunology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais.)  |
| <b>Contributing Authors</b>           | Gabriela Guimaraes , Dr. Marco Tulio Gomes , Dr. Priscila Campos , Mr. Fabio Marinho , Dr. Natan de Assis , Dr. Tatiana Silveira , Prof. Sergio Costa Oliveira (corr-auth)<br>The immunoproteasome is a specific proteasome isoform constituted of three subunits termed $\beta 1i$ , $\beta 2i$ and $\beta 5i$ . Its proteolytic activity enhances the quantity and quality of peptides to be presented by MHC class I molecules to CD8 <sup>+</sup> T cells. However, the role of combined deficiency of the three immunoproteasome subunits in protective immunity against bacterial pathogens have not been investigated. In this study, we addressed the role of immunoproteasome during Brucella abortus infection, an intracellular bacterium that requires CD8 <sup>+</sup> T cell responses for control of infection. Here, we demonstrate that immunoproteasome triple knockout mice (TKO) were more susceptible to the Brucella infection. This observed susceptibility was accompanied with reduced IFN- $\gamma$ production by mouse CD4 <sup>+</sup> and CD8 <sup>+</sup> T lymphocytes. Moreover, the absence of the immunoproteasome had an impact on dendritic cells MHC-I surface expression and antigen presentation by these cells. CD8 <sup>+</sup> T cell function, which plays a pivotal role in B. abortus immunity, also presented partial impairment of granzyme-B expression and consequently reduced cytotoxic activity. In conclusion, these results strongly suggest that immunoproteasome subunits are important components in host resistance to B. abortus infection by impacting both the magnitude and quality of CD8 <sup>+</sup> T cell responses. |
| <b>Abstract</b>                       |   |
| <b>Editor</b>                         | <a href="#">Craig R Roy</a>   |
| <b>Suggested Reviewers to Include</b> | Judith Smith (University of Wisconsin-Madison), Maria Victoria Delpino (INIGEM, CONICET-UBA), Diego Comerici (Universidad Nacional de San Martin)   |
| <b>Suggested Reviewers to Exclude</b> | N/A   |
| <b>Keywords</b>                       | immunoproteasome, Brucella abortus, CD8 <sup>+</sup> T cells  |
| <b>Research Areas</b>                 | Immunology, Host-Microbial Interactions   |
| <b>Conflict of Interest</b>           | No conflict of interest.  |
| <b>Preprint Server</b>                | No  |
| <b>Funding Sources</b>                | Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) ✓ : Sergio Costa Oliveira 464711/2014-2, 402527/2013-5, 443662/2014-2, 302660/2015-1<br>Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais ⚠ : Sergio Costa Oliveira 837/15<br>National Institute of Health ⚠ : Sergio Costa Oliveira R01 AI116453<br>Are the data sets and/or code used in the experiments and studies described in this submission identified and cited in the manuscript and reference list in accord with ASM's <a href="#">Data Citation Policy</a> ?  |
| <b>Data Citation</b>                  | Not Applicable (Datasets and code were not used in these experiments or studies)  |

### Manuscript Items

1. Author Cover Letter (last updated: 08/27/2017 21:01:05) [PDF \(402KB\)](#)
2. Merged File containing manuscript text and 6 Figure files. (last updated: 08/27/2017 21:01:05) [PDF \(1512KB\)](#)
  - a. Manuscript Text File (last updated: 08/27/2017 21:01:05) [PDF \(778KB\)](#)
  - b. Figure - 1 (last updated: 08/27/2017 21:01:05) [PDF \(214KB\)](#)
  - c. Figure - 2 (last updated: 08/27/2017 21:01:05) [PDF \(104KB\)](#)
  - d. Figure - 3 (last updated: 08/27/2017 21:01:05) [PDF \(64KB\)](#)
  - e. Figure - 4 (last updated: 08/27/2017 21:01:05) [PDF \(35KB\)](#)
  - f. Figure - 5 (last updated: 08/27/2017 21:01:05) [PDF \(289KB\)](#)
  - g. Figure - 6 (last updated: 08/27/2017 21:01:05) [PDF \(533KB\)](#)

### More Manuscript Info and Tools

[Send Manuscript Correspondence](#)  
[Check Status](#)

1 **Title: Immunoproteasome subunits are required for CD8<sup>+</sup> T cell function and host**  
2 **resistance to *Brucella abortus* infection in mice**

3

4 **Authors:** Gabriela Guimarães<sup>1</sup>, Marco Túlio R. Gomes<sup>1</sup>, Priscila C. Campos<sup>1</sup>, Fabio V.  
5 Marinho<sup>1</sup>, Natan R. G. de Assis<sup>1</sup>, Tatiana N. Silveira<sup>1</sup>, Sergio C. Oliveira<sup>1</sup>

6

7 <sup>1</sup> Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais,  
8 Belo Horizonte, MG, Brazil

9

10 **Correspondence:** Prof. Sergio C. Oliveira, Departamento de Bioquímica e Imunologia,  
11 Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, Pampulha, Belo  
12 Horizonte, Minas Gerais, 31270-901, Brazil. Fax: +55-31-34092666. E-mail:  
13 scozeus@icb.ufmg.br

14

15 **Running title:** Immunoproteasome requirement on *Brucella abortus* infection

16

17 **Keywords:** *Brucella abortus*, immunoproteasome, MHC-I, CD8<sup>+</sup> T cells.

18 **Abstract**

19 The immunoproteasome is a specific proteasome isoform constituted of three subunits  
20 termed  $\beta 1i$ ,  $\beta 2i$  and  $\beta 5i$ . Its proteolytic activity enhances the quantity and quality of  
21 peptides to be presented by MHC class I molecules to CD8<sup>+</sup> T cells. However, the role of  
22 combined deficiency of the three immunoproteasome subunits in protective immunity  
23 against bacterial pathogens have not been investigated. In this study, we addressed the  
24 role of immunoproteasome during *Brucella abortus* infection, an intracellular bacterium  
25 that requires CD8<sup>+</sup> T cell responses for control of infection. Here, we demonstrate that  
26 immunoproteasome triple knockout mice (TKO) were more susceptible to the *Brucella*  
27 infection. This observed susceptibility was accompanied with reduced IFN- $\gamma$  production  
28 by mouse CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. Moreover, the absence of the  
29 immunoproteasome had an impact on dendritic cells MHC-I surface expression and  
30 antigen presentation by these cells. CD8<sup>+</sup> T cell function, which plays a pivotal role in *B.*  
31 *abortus* immunity, also presented partial impairment of granzyme-B expression and  
32 consequently reduced cytotoxic activity. In conclusion, these results strongly suggest that  
33 immunoproteasome subunits are important components in host resistance to *B. abortus*  
34 infection by impacting both the magnitude and quality of CD8<sup>+</sup> T cell responses.

35

36

37 **Introduction**

38           The primary function of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes is to destroy infected host cells by a  
39 perforin and granzyme-dependent cytolytic activity or by Fas-Fas ligand interaction  
40 (Fas/FasL) (1, 2). To induce a potent T CD8<sup>+</sup> response the infected cells present the  
41 antigens through the MHC class I (MHC-I) to the TCR receptors expressed by T  
42 lymphocytes (3). The peptides presented by the MHC-I are generated by the proteasome,  
43 a catalytic protein complex responsible for intracellular proteolysis (4). The 26S  
44 proteasome is found in the cytoplasm of cells and presents a barrel-shaped structure  
45 composed of four rings (two alpha and two beta) with seven subunits each. Three of the  
46 seven beta subunits are responsible for the catalytic activity of the proteasome:  $\beta 1$  has a  
47 caspase-like activity and cleaves the proteins after acidic amino acid residues; the  $\beta 2$   
48 subunit cleaves after basic residues, presenting trypsin-like activity and the  $\beta 5$  has  
49 chymotrypsin-like activity cleaving after hydrophobic residues (5).

50           There are different subtypes of proteasomes that are classified according to the  
51 composition of their catalytic subunits and its differential expression in tissues (6). The  
52 immunoproteasome is a specific proteasome isoform that is constitutively expressed in  
53 some cell types, such as dendritic cells or has its expression induced by cytokines,  
54 especially interferon- $\gamma$  (7, 8). Its structure is similar to the classical proteasome; however,  
55 there is a substitution of  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  and  $\beta 5$  subunits for  $\beta 1i$ ,  $\beta 2i$  and  $\beta 5i$ , respectively.  $\beta 1i$ ,  
56 also called LMP2 (low molecular weight protein), unlike  $\beta 1$ , has chymotrypsin-like  
57 activity. On the other hand, the substitutions of  $\beta 2$  by  $\beta 2i$ , known as MECL-1  
58 (multicatalytic endopeptidase complex subunit 1) and of  $\beta 5$  by  $\beta 5i$  (LMP7), do not result  
59 in differences in enzymatic specificity (9, 10). Due to this structural difference, the  
60 immunoproteasome generates peptides with more affinity to MHC-I molecules. Hence,



61 the immunoproteasome enhances the repertoire of peptides to be presented by the MHC-I  
62 molecules increasing antigen presentation to CD8<sup>+</sup> T cells (11).

63 Several studies have shown the importance of the immunoproteasome during the response to viral  
64 and protozoan pathogens. Animals lacking the LMP7 subunit displayed a low number of functional CD8<sup>+</sup> T  
65 lymphocytes and were more susceptible to infection by the parasite *Toxoplasma gondii* (12). A double  
66 knockout animal for LMP2 and MECL-1 was used together with an inhibitor for the LMP7 subunit; thus,  
67 generating an animal devoid of immunoproteasome activity. These animals showed alterations in T-cell  
68 responses to different epitopes presented via MHC-I after infection with the virus causing lymphocytic  
69 choriomeningitis (LCMV) (13). More recently, Kincaid and collaborators generated an immunoproteasome  
70 triple knockout mouse (TKO) that allowed the better understanding of the role of this protein complex  
71 during immune responses to pathogens (14). Ersching and coworkers, by using these TKO animals, showed  
72 that the quantity and the quality of CD8<sup>+</sup> T cell responses against *Trypanosoma cruzi* were altered.  
73 Additionally, TKO mice succumbed after *T. cruzi* challenge, even after DNA vaccination (15). Despite the  
74 studies described above, many gaps still remaining to determine the role of the immunoproteasome during  
75 immune responses generated against bacterial infections.

76 In this study, we addressed the role of the immunoproteasome during *Brucella*  
77 *abortus* infection in a murine model. *Brucella spp.* are a facultative intracellular Gram-  
78 negative coccobacilli responsible for brucellosis, considered the most common bacterial  
79 zoonosis in the world and causes important economic losses due to its effect in domestic  
80 animals, such as abortion (16). In humans it is mainly acquired via consumption of  
81 unpasteurized milk and its contaminated products or by direct contact with infected  
82 animals (17). Among the symptoms are undulant fever, arthralgia and loss of weight (16).  
83 The host immune response against *Brucella* occurs through the activation of innate and  
84 adaptive immune responses. The innate response is the first line of host defense, where  
85 macrophages and dendritic cells recognize the bacteria and elicit this initial immune  
86 response (18, 19). Among the receptors capable of recognizing *Brucella spp.*, Toll-like

87 receptors (TLR) have been extensively studied due to their importance during *B. abortus*  
88 recognition. TLR2, TLR4, and TLR6 recognize different membrane components of  
89 *Brucella* (20-22), while TLR3, TLR7, and TLR9 are involved in the recognition of  
90 nucleic acid motifs (23, 24). The intracellular signaling via MyD88 and IRAK-4, which  
91 in turn activate NF- $\kappa$ B and MAPKs induce production of proinflammatory cytokines,  
92 such as IL-12 and TNF- $\alpha$ , which are also important during this response (22-27).  
93 Adaptive immunity, in turn, is mainly dependent upon a cellular response that requires  
94 the cytotoxic activity of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes and the production of cytokines from the  
95 Th1 profile such as IFN- $\gamma$  (28, 29). Although there are extensive data describing the  
96 mechanisms of the immune response against *Brucella*, the importance of the  
97 immunoproteasome remains unknown.

98         Knowing the importance of CD8<sup>+</sup> T cell responses against *Brucella* (29),  
99 investigating the role of the immunoproteasome during bacterial infection would be an  
100 important strategy to better understand the relationship of this structure in the  
101 development of an effective T cell function involved in disease control. In this study, we  
102 demonstrate that TKO mice exhibited an impaired antigen presentation and CD8<sup>+</sup> T cell  
103 function, resulting in an increased susceptibility to *B. abortus* infection.

104

105

## 106 **Results**

### 107 **Immunoproteasome is important to control brucellosis *in vivo***

108 To evaluate the importance of the immunoproteasome during *B. abortus* infection,  
109 wild-type C57BL/6 and TKO mice were infected with  $1 \times 10^6$  CFU of the virulent strain  
110 2308 and the bacterial load was monitored in mouse spleens by CFU counting at 1, 2 and  
111 4 weeks post-infection (w.p.i.). IFN- $\gamma$  knockout mice were used as a control since this  
112 cytokine is crucial for efficient control of *B. abortus* (30). As shown in Fig. 1A, TKO  
113 mice were more susceptible to *B. abortus* at the first and second w.p.i., and the CFU  
114 difference was more prominent at the second week. At this time of infection, the number  
115 of CFU in the spleen of TKO animals was 0.95 log higher compared to wild-type mice.  
116 At the fourth week of infection, the number of bacteria in the spleen was similar to  
117 C57BL/6 animals indicating that the immunoproteasome is more important to control  
118 bacterial numbers during the initial phases of *Brucella* infection. The IFN- $\gamma^{-/-}$  animals  
119 succumbed before four weeks of infection, whereas TKO and C57BL/6 animals survived  
120 throughout the entire experiment.

121

### 122 **IFN- $\gamma$ production by TKO T cells is partially impaired during *B. abortus* infection**

123 Given the importance of IFN- $\gamma$  in the control of murine brucellosis, the production of  
124 this cytokine was also evaluated in spleen cells of WT, TKO and IFN- $\gamma^{-/-}$  mice after 1, 2  
125 and 4 weeks of infection with *B. abortus*. Splenocytes were harvested from the infected  
126 animals, re-stimulated with *Brucella* virulent strain 2308, and IFN- $\gamma$  measured after 72  
127 hours of culture. The TKO splenocytes produced less IFN- $\gamma$  compared to C57BL/6 in the  
128 first and second week after infection that parallels with increased susceptibility of these  
129 animals at early stages of infection (Fig. 1B). As observed for CFU counts, the difference

130 in IFN- $\gamma$  production between C57BL/6 and TKO mice was greater at the second w.p.i.  
131 compared to the first week.

132 To investigate the cell type involved in IFN- $\gamma$  production, flow cytometry analysis  
133 was performed to evaluate the percentage of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells producing IFN- $\gamma$  in  
134 the spleen of TKO animals at the first, second and fourth w.p.i. The data showed that the  
135 percentage of IFN- $\gamma$  producing CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes from *B. abortus* infected  
136 TKO mice are reduced when compared to C57BL/6 mice (Fig. 2A,B). The lower levels  
137 of IFN- $\gamma$  produced by TKO lymphocytes correlated with the increased host susceptibility  
138 presented at 1 and 2 w.p.i.. At the fourth week after infection, all IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> animals died,  
139 confirming similar results previously reported by our group (31).

140

#### 141 **Immunoproteasome is critical to MHC-I surface expression on dendritic cells**

142 The MHC-I molecules in the endoplasmic reticulum bind to peptides generated by  
143 the proteasome or the immunoproteasome to form the MHC-I-peptide complex. This  
144 complex is then exported to the cell membrane and presents the antigens to CD8<sup>+</sup> T  
145 lymphocytes via the TCR. To determine the role of the immunoproteasome in antigen  
146 presentation, we measured MHC-I surface expression by flow cytometry. A diminished  
147 percentage of TKO dendritic cells expressing MHC-I molecules was observed (Fig. 3A).  
148 This result suggests the immunoproteasome involvement with antigen presentation by  
149 MHC-I-peptide complex to T CD8<sup>+</sup> lymphocyte TCR. In contrast, MHC-II molecules  
150 present peptides to the CD4<sup>+</sup> T cells, independently of the immunoproteasome activity  
151 (32). To confirm that the absence of the immunoproteasome does not interfere in the  
152 MHC-II expression, we also measured surface MHC-II molecules by flow cytometry, and  
153 no difference was observed between TKO cells when compared to C57BL/6 (Fig. 3B).

154 As previously demonstrated, recognition of *Brucella* by DCs results in the  
155 activation of these cells and the concomitant production of proinflammatory cytokines,  
156 generating a protective immune response (33). To evaluate the role of the  
157 immunoproteasome in the production of TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-12, C57BL/6 and TKO DCs  
158 were stimulated with *B. abortus* and cytokine production was measured. The results  
159 shown in the Fig. 3C, D and E, suggest that lack of the immunoproteasome does not  
160 affect the production of pro-inflammatory cytokines in DCs infected with *B. abortus*.

161

### 162 **Antigen presentation is partially impaired in the absence of immunoproteasome**

163 Considering the immunoproteasome is responsible for enhancing the repertoire of  
164 peptides presented by MHC-I to the CD8<sup>+</sup> T cells (11), we examined the TKO DCs  
165 antigen presentation efficiency. Infected DCs were co-cultured with *Brucella*-primed  
166 splenocytes, and the release of lactate dehydrogenase (LDH) was measured, indicating  
167 cell lysis. The results in Fig. 4A indicate that DCs from C57BL/6 mice infected with *B.*  
168 *abortus* were lysed more efficiently by splenocytes from C57BL/6 compared to lysis  
169 mediated by TKO spleen cells. Conversely, when DCs from TKO mice were used, we  
170 observed reduced cells lysis during co-culture with splenocytes derived from both mouse  
171 strains, suggesting a deficiency in the antigen presentation apparatus of TKO cells (Fig.  
172 4A). As expected, we also observed that specific lysis mediated by splenocytes only  
173 occurred when DCs were previously infected with *B. abortus*. To confirm the role of the  
174 immunoproteasome in antigen presentation, we transfected OVA in DCs and performed  
175 flow cytometry analysis using a monoclonal antibody capable of recognizing the MHC-I  
176 complexed with the OVA-derived peptide SIINFEKL (OVA 257-264) (34, 35). The  
177 results shown in Fig. 4B revealed a diminished ability of TKO DCs to generate OVA

178 peptide presented by MHC-I molecules on the cell surface compared to wild-type cells. A  
179 low occurrence of the MHC-I- SIINFEKL complex on cell surface may reflect an  
180 abnormal performance of immunoproteasome proteolytic activity.

181

### 182 **CD8<sup>+</sup> T cytotoxicity is robustly diminished in TKO animals**

183 To identify which T cell subpopulation is involved in lysing infected dendritic  
184 cells, CD8<sup>+</sup> and the CD4<sup>+</sup> T lymphocytes were isolated by cell sorting from infected  
185 C57BL/6 and TKO splenocytes. First, mice were infected with *Brucella* and 2 weeks  
186 post-infection the spleen cells were harvested, sorted, and used in the cytotoxicity assay  
187 as described above. Equal amounts of CD4<sup>+</sup> T or CD8<sup>+</sup> T cells from C57BL/6 or TKO  
188 were used. The data in Fig. 5A confirm that TKO dendritic cells have a deficiency in  
189 antigen presentation, since TKO DCs co-cultured with either TKO or C57BL/6 CD8<sup>+</sup> T  
190 cells led to reduced LDH release when compared to wild-type DCs. Dendritic cells from  
191 C57BL/6 mice incubated with CD8<sup>+</sup> T cells from C57BL/6 resulted in a significantly  
192 higher percentage of LDH released compared to lysis observed when TKO CD8<sup>+</sup> T  
193 lymphocytes were used. This result suggests that TKO CD8<sup>+</sup> T lymphocytes present a  
194 defect in their cytotoxic function. It is important to note that cell death occurred only  
195 when *Brucella*-primed dendritic cells presented bacterial antigens to previously infected  
196 splenocytes, indicating the specificity of the process. On the other hand, there was no  
197 significant difference in cytolytic activity when TKO CD4<sup>+</sup> T cells were compared to  
198 C57BL/6 lymphocytes (Fig. 5C).

199 As mentioned previously, cytolytic activity of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes is  
200 predominantly performed by the action of perforin and granzyme which lead to cell target  
201 apoptosis (1, 2). Therefore, we infected the animals with *B. abortus* and two weeks later

202 harvested the spleen, and analyzed the production of intracellular granzyme-B by the  
203 lymphocytes. We observed that CD8<sup>+</sup> T lymphocytes from TKO animals produced much  
204 less granzyme-B than the wild-type cells (Fig. 5B). On the other hand, no difference was  
205 observed between both mouse strains when the percentage of granzyme-B production by  
206 CD4<sup>+</sup> T lymphocytes was analyzed (Fig. 5D). The lower production of granzyme-B by  
207 TKO CD8<sup>+</sup> T lymphocytes against *Brucella* infected APC may reflect the deficiency in  
208 its cytotoxic function.

209 **Discussion**

210 Protein degradation is essential to maintain intracellular homeostasis that is  
211 controlled by different important proteolytic mechanisms (36). Among them, we can  
212 highlight the lysosomal degradation pathway, calcium-dependent intracellular proteases  
213 and proteasome-dependent proteolysis (37-39). The proteasomal complex is considered  
214 to be the most important of the pathways mentioned (40). In addition to the classical  
215 proteasomes, other subtypes of this platform are identified: the immunoproteasome; the  
216 intermediate proteasomes, consisting of a mixture of the standard and inducible subunits;  
217 and the thymus specific subtype, which is found in cortical thymic epithelial cells (41).  
218 The immunoproteasome optimizes the peptide repertoire to be presented by MHC-I  
219 molecules to their cognate TCR on CD8<sup>+</sup> T lymphocytes (42). This MHC-I-peptide  
220 repertoire is constitutively expressed in some cell types, such as dendritic cells, but in the  
221 majority of cells its expression is induced by IFN- $\gamma$  (7, 8). Several studies have shown the  
222 importance of this structure in controlling infection by different pathogens in animals  
223 devoid of one or two subunits of the immunoproteasome (43-46). In addition, the role of  
224 this specialized proteasome isoform in murine models of lupus, colitis, and Hashimoto's  
225 syndrome has also been reported (47-49). More recently, Kincaid and collaborators  
226 developed an animal knockout for the three subunits of the immunoproteasome, which  
227 have been used in the present study (14).

228 Herein, we investigated whether the immunoproteasome is important for host  
229 control of *B. abortus* infection. The higher bacterial load and the diminished levels of  
230 IFN- $\gamma$  produced by splenocytes observed in TKO mice after 1 and 2 weeks postinfection  
231 suggests that the immunoproteasome is required for efficient control of this pathogen.  
232 Since CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells are considered the main sources of IFN- $\gamma$  during *Brucella*



233 infection (50, 51), we investigated which T cell subpopulation is partially impaired to  
234 produce this cytokine in TKO mice. Our results demonstrate a dramatic reduction of IFN-  
235  $\gamma$  levels produced by both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in TKO mice during *Brucella*  
236 infection.

237 To generate efficient CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell responses, antigen recognition is  
238 necessary through MHC class II and I, respectively. The expression of MHC on the APC  
239 surface is dependent on the binding of peptides to its groove leading to the formation of  
240 the MHC-peptide complex (52). Fehling et al. (1994) showed that LMP7<sup>-/-</sup> mice  
241 presented a decrease in MHC-I expression on the surface of their cells (53). MECL-1 and  
242 LMP7 double deficiency also reduced MHC class I expression on knockout cells upon  
243 viral infection (54). Additionally, Kincaid et al. (14) and Ersching et al. (15)  
244 demonstrated TKO MHC-I expression deficiency after dendritic cells infection with  
245 LCMV and *T. cruzi*, respectively. Further, Kincaid et al. (14) showed that not only  
246 infected TKO dendritic cells have reduced expression of MHC-I, but also uninfected cells  
247 had a 50% reduction of this molecule. Consistent with these findings, our data reinforced  
248 this diminished ability of TKO to express MHC-I on dendritic cell surface. We also  
249 observed that *Brucella*-induced MHC-I expression was reduced compared to uninfected  
250 cells. Previously, others have reported that *B. abortus* infection of human  
251 monocytes/macrophages inhibited the IFN- $\gamma$ -induced MHC-I cell surface expression  
252 (55). This phenomenon was dependent on metabolically active viable bacteria and MHC-  
253 I down-modulation correlated with the development of diminished CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cell  
254 responses (56). Taken together, our results suggest that TKO animals have impaired  
255 ability to express MHC-I-*Brucella* peptides on cell surface, since the levels of MHC-I  
256 molecules were reduced on DCs after bacterial infection.

257 *Brucella* activates DCs by inducing the production of pro-inflammatory  
258 cytokines, such as TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-12 (57, 58). Our findings showed that *B. abortus*  
259 induces equal amounts of TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-12 in TKO and C57BL/6 DCs. The  
260 literature, however, is controversial concerning the role of the immunoproteasome in the  
261 NF- $\kappa$ B signaling pathway and proinflammatory cytokine production. Basler et al. (13)  
262 showed that immunoproteasome deficiency led to a lower production of IL-6, TNF- $\alpha$  and  
263 IFN- $\gamma$  by splenocytes after a viral infection. However, no changes were observed in TNF-  
264  $\alpha$ , IL-6, and IL-10 production in the canonical pathway of NF- $\kappa$ B activation in peritoneal  
265 macrophages deprived of two immunoproteasome subunits upon stimulation with LPS  
266 (59).

267 Since dendritic cells constitutively express the subunits  $\beta$ 1i,  $\beta$ 2i and  $\beta$ 5i, we  
268 investigated their ability to present antigens during *Brucella* infection. We infected these  
269 cells and evaluated them as targets for *Brucella*-primed splenocytes from wild-type and  
270 TKO mice in cytotoxic assays. Our results revealed specific lysis was more evident in  
271 infected C57BL/6 DCs compared to TKO cells. Also, the lack of a functional  
272 immunoproteasome led to less efficient T cell effector function. To confirm the  
273 deficiency in antigen processing by TKO cells, we measured the presentation of the  
274 OVA<sub>257-264</sub> epitope (SIINFEKL) by dendritic cells. Degradation of OVA commonly  
275 produces this epitope, which binds to MHC-I forming the H-2K<sup>b</sup>-SIINFEKL complex  
276 expressed on the surface of DCs. However, this epitope generation in TKO animal was  
277 38% lower compared to wild-type cells; thus, confirming the failure in antigen  
278 presentation in TKO cells.

279 The data obtained in this study encouraged us to investigate the importance of  
280 each T cell subpopulation to kill infected DCs. Analysis of T cell subpopulations

281 indicated that TKO CD8<sup>+</sup> T lymphocytes did not efficiently kill *Brucella*-infected DCs  
282 indicating a failure of cytotoxic function. According to Oliveira et al. (29), CD8<sup>+</sup> T cells  
283 response is an important mechanism to control *Brucella* infection since MHC-I deficient  
284 animals were more susceptible to bacterial infection. Additionally, Durward-Diioia et al.  
285 (60) demonstrated that during chronic brucellosis, *Brucella* subverts CD8<sup>+</sup> T cell  
286 responses to allow bacterial persistence as an immune evasion mechanism. Thereby, the  
287 importance of CD8<sup>+</sup> T cells in protective immunity to *Brucella* infection is illustrated by  
288 the higher susceptibility of TKO. In addition to the cytotoxic function mediated by CD8<sup>+</sup>  
289 T cells, others (61) described the ability of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes to kill target cells in *B.*  
290 *abortus* infected mice following the production of granzyme-B and IFN- $\gamma$ . Our data are  
291 consistent with that, since we could also observe lysis caused by CD4<sup>+</sup> T cells. However,  
292 the absence of the immunoproteasome did not alter the cytotoxic activity of CD4<sup>+</sup> T  
293 lymphocytes against *Brucella*-infected DCs. The deficiency in cytotoxic function of the  
294 TKO cells may be related to a defect during thymic selection. In 2007, Murata and  
295 colleagues described a thymus specific proteasome, which consists of  $\beta$ 1i,  $\beta$ 2i and  $\beta$ 5t  
296 subunits, the latter being found only in the cortical cells of the thymus, which are  
297 responsible for the positive selection of thymocytes. The authors suggest a key role of the  
298  $\beta$ 5t subunit in generating an antigen repertoire for MHC-I presentation to CD8<sup>+</sup> T cells  
299 during thymic selection (41).

300         The cytotoxicity mediated by T cells may occur via granule exocytosis, which  
301 uses perforin to form a transmembrane pore in the target cells by which the granzyme  
302 molecules enter. Granzyme-B is a serine protease that activates some members of the  
303 caspase family leading to cellular apoptosis (1, 62). When cytotoxic lymphocytes  
304 recognize the presented antigen via TCR, the previously synthesized granzyme granule is

305 released through the APC-T cell immunological synapse (63). It has been described  
306 several transcription factors including nuclear factor of activated T cells (NFAT),  
307 activator protein-1 (AP-1) and nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) that leads to activation of  
308 *granzyme* gene transcription (64-66). To better understand the importance of the  
309 immunoproteasome in T cell function, we measured the expression of granzyme-B by  
310 CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. A lower expression of granzyme-B was observed only in TKO  
311 CD8<sup>+</sup> but not CD4<sup>+</sup> T cells. The reduction in granzyme-B expression may explain the  
312 diminished lysis mediated by this T cell subpopulation. This lower granzyme-B  
313 expression could be related to the activation of the transcription factors mentioned above,  
314 but further investigation is required to confirm this hypothesis. Arias and coworkers (67)  
315 showed that CD8<sup>+</sup> T cells and its cytolytic granzyme-B activity participate in the control  
316 of *Brucella microti* infection since bacterial clearance from the spleen was delayed in  
317 granzyme-B<sup>-/-</sup> mice.

318 In summary, the results presented here suggest that the immunoproteasome is  
319 important for the control of *B. abortus*, mainly during early stages of infection. In  
320 addition, the absence of the immunoproteasome led to a decrease in the production of  
321 IFN- $\gamma$  by CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. Furthermore, CD8<sup>+</sup> T cells from TKO mice  
322 were also deficient in their effector function, exhibiting a diminished cytotoxicity activity  
323 toward target cells infected by *B. abortus*. Fig. 6 summarizes our results in a model  
324 showing the altered immune response against *B. abortus* in the absence of the  
325 immunoproteasome. Our schematic model suggests that in TKO animals the peptide  
326 repertoire generated through the proteasomal pathway is different from C57BL/6, leading  
327 to a diminished activation of CD8<sup>+</sup> T cells and reduced production of granzyme-B and  
328 IFN- $\gamma$ . Therefore, the complete absence of the immunoproteasome subunits interfered

329 negatively with the two major mechanisms of host control of *B. abortus* infection: IFN- $\gamma$   
330 production and CD8<sup>+</sup> T cell cytotoxicity.

331

332

333

## 334 **Material and Methods**

335

### 336 **Bacteria**

337 *Brucella abortus* virulent strain 2308 (wild-type and GFP-expressing bacteria)  
338 was obtained from our laboratory stock. A single colony of the bacteria was inoculated in  
339 10 mL Brucella broth liquid medium (BB) (Difco) and the inoculum was incubated at  
340 37°C at 180 rpm during 72 hours when the bacteria concentration was determined by  
341 counting CFUs.

342

### 343 **Mice**

344 Wild-type (WT) C57BL/6 mice were obtained from the Federal University of  
345 Minas Gerais (UFMG), TKO mice were kindly provided by Dr. Kenneth Rock  
346 (University of Massachusetts, USA) (Kincaid et al., 2012) and IFN- $\gamma$  deficient mice  
347 (IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup>) were obtained from our own facility. Genetically deficient and control mice  
348 were used at 6 to 8 weeks of age. All animal experiments were preapproved by the  
349 Institutional Animal Care and Use Committee of the UFMG (CETEA# 128/2014). Mice  
350 were housed in filter-top cages and provided with sterile water and food *ad libitum*.

351

### 352 **Enumeration of *B. abortus* from spleens**

353 Five mice from each group (C57BL/6, TKO and IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup>) were infected  
354 intraperitoneally with 1x10<sup>6</sup> CFU *B. abortus* virulent strain 2308 and sacrificed at 1, 2  
355 and 4 weeks post-infection. Spleens were macerated in 10 mL of saline (NaCl 0.9%), and  
356 used for CFU (colony-forming units) counting and splenocyte culture. For CFU  
357 determination, homogenized spleen samples were serially diluted 10-fold and then plated  
358 in duplicate on Brucella Broth agar. After 3 days of incubation at 37°C, the number of  
359 CFU was determined.

360

### 361 **Measurement of Cytokines from Splenocyte Culture Supernatants**

362 Spleens cells from TKO, IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup>, and C57BL/6 mice obtained after spleen  
363 maceration were treated with ACK buffer (0.15 M NH<sub>4</sub>Cl, 1.0 mM KHCO<sub>3</sub>, 0.1 mM  
364 Na<sub>2</sub>EDTA, pH 7.2) for 5 min to lyse red blood cells. Then, the cells were washed with  
365 saline (NaCl 0.9%) and resuspended in RPMI 1640 (Gibco, Carlsbad, Calif), 25mM  
366 HEPES, 10% (vol/vol), heat- inactivated FBS (Gibco, Carlsbad, Calif), penicillin G  
367 sodium (100 U/mL), and streptomycin sulfate (100 $\mu$ g/mL). To determine cytokine  
368 concentration by ELISA, 1 × 10<sup>6</sup> spleen cells were plated per well in a 96-well tissue  
369 culture-treated dish. Murine splenocytes from infected animals were re-stimulated with *B.*  
370 *abortus* virulent strain 2308 (MOI 100:1). Unstimulated cells were used as a negative  
371 control. Spleen cells were incubated at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>. Levels of IFN- $\gamma$  in the  
372 supernatants were measured using a commercially available ELISA Duoset kit (R&D  
373 Systems, Minneapolis, MN) according to the manufacturer's instructions, after 72 hrs of  
374 culture.

375

### 376 **Generation and *in vitro* stimulation of dendritic cells**

377 Dendritic cells (DC) were derived as previously described (25). Briefly, bone  
378 marrow cells from TKO and C57BL/6 mice were obtained from the tibias and femurs.  
379 The cells were cultured in DMEM (Gibco) containing 10% FBS (HyClone, Logan, UT,  
380 USA), 1% HEPES, 1% penicillin, 1% streptomycin, and 30% granulocyte-macrophage  
381 colony-stimulating factor (GM-CSF) obtained from Ag8653 cells.  $1 \times 10^7$  cells were  
382 incubated at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere in petri dishes. After 3 days of culture 5 mL  
383 of fresh complete medium, with 30% of GM-CSF was added. At days 5 and 7, 4 mL of  
384 the medium was replaced with fresh GM-CSF supplemented medium. On day 10 of  
385 culture, medium was harvested and non-adherent cells seeded in 24-well plates ( $5 \times 10^5$   
386 cells/well), and then incubated at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere until use.

387 Bone marrow dendritic cells (BMDCs) were stimulated with *B. abortus* (MOI  
388 100:1) or DMEM medium alone. Culture supernatants were collected after 24 hrs of  
389 stimulation and levels of TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-12 was determined by ELISA (R&D  
390 Systems), according to the manufacturer's instructions.

391

### 392 **Flow cytometry analysis of splenocytes and dendritic cells**

393 Spleen cells from TKO, IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> and wild-type mice at 1, 2 and 4 weeks post-  
394 infection with *B. abortus* were collected and homogenized in PBS. Red blood cells were  
395 lysed with ACK buffer. The cell suspension was washed with RPMI 1640 and plated at  
396  $1 \times 10^6$  cells per well for immunostaining. Cells were incubated in medium containing  
397 Concanavalin A (5 mg/mL) and brefeldin A (1 mg/well; both from Sigma-Aldrich) for 4  
398 hrs at 37°C. In the first step, the cells were blocked with anti-mouse CD16/CD32 MAbs  
399 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) and then stained for the markers CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>,  
400 CD3<sup>+</sup> and IFN- $\gamma$  or granzyme-B. Cells were incubated for 20 min at 4°C with antibody

401 solution (PBS 0.15 M, 0.5% bovine serum albumin, 2 mM NaN<sub>3</sub>) containing PE-Cy7–  
402 conjugated anti-mouse CD4 (1:200, clone GK1.5, BD Biosciences), biotin-conjugated  
403 anti-mouse CD8 (1:200, clone 53-6.7, BD Biosciences) and biotin-conjugated anti-mouse  
404 CD3 (1:200, clone 500A2 BD, Biosciences) surface markers. Next, Streptavidin PerCP  
405 (1:200, BD Biosciences) or Streptavidin allophycocyanin (1:200, BD Biosciences) was  
406 added. The cells were then washed twice with PBS 0.15 M and incubated with  
407 fixation/permeabilization solution kit (BD Biosciences) for 30 min at 4°C.  
408 Allophycocyanin-conjugated anti-mouse IFN- $\gamma$  (1:100, clone XMG1.2, BD Biosciences)  
409 or FITC conjugated anti-mouse granzyme-B (1:200, clone FJK-16s, eBioscience) labeled  
410 antibody in permeabilization buffer (eBioscience) were added to cells and then incubated  
411 for 30 min at 4°C. Cells were washed twice with 150  $\mu$ L of antibody dilution buffer  
412 (eBioscience) and resuspended in 200  $\mu$ L of PBS. Data acquisition was performed using  
413 Attune acoustic focusing cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA) and 100,000  
414 events were analyzed using the FlowJo Software (Tree Star, Ashland, OR). Single cells  
415 were selected by FSC-H and FSC-A; next, we selected CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> or CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> double-  
416 positive cells; and finally, we selected CD4<sup>+</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>/granzyme-B<sup>+</sup> or  
417 CD8<sup>+</sup>/granzyme-B<sup>+</sup> double-positive cells. The gate selection is demonstrated in  
418 Supplementary Figures 1 and 4.

419 Dendritic cells from TKO and wild-type mice were stimulated with *B. abortus*  
420 (MOI 100:1) or DMEM medium alone for 24 hrs and then immunostaining were  
421 performed. In the first step, the cells were blocked with anti-mouse CD16/CD32 MAbs  
422 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) and then stained for CD11c, MHC-I and MHC-II  
423 surface markers. FITC conjugated anti-mouse CD11c (1:200, clone HL3, from BD  
424 Biosciences), PE conjugated anti-mouse MHC-I (1:100, clone MOPC-173, Biolegend)



425 and APC conjugated anti-mouse MHC-II (1:100, clone AF6-120.1; BD Biosciences),  
426 were incubated for 20 min at 4°C with antibody solution (PBS 0.15 M, 0.5% bovine  
427 serum albumin, 2 mM NaN<sub>3</sub>). Data acquisition was performed using Attune acoustic  
428 focusing cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA) and 100,000 events were analyzed  
429 using the FlowJo Software (Tree Star, Ashland, OR). Single cells were selected by FSC-  
430 H and FSC-A; next, we selected CD11c<sup>+</sup>MHC-I<sup>+</sup> or CD11c<sup>+</sup>MHC-II<sup>+</sup> double-positive  
431 cells. The gate selection is demonstrated in Supplementary Figure 2.

432

### 433 **Isolation of T CD4<sup>+</sup> and T CD8<sup>+</sup> lymphocytes by cell sorting**

434 Spleen cells of TKO and C57BL/6 animals infected with *B. abortus* for 2 weeks  
435 were prepared as described above. First, the cells were blocked with anti-mouse  
436 CD16/CD32 MAbs (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) and then stained for the  
437 markers CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>. Cells were incubated for 20 min at 4°C with antibody  
438 solution (PBS 0.15 M, 0.5% bovine serum albumin, 2 mM NaN<sub>3</sub>) containing PE-Cy7-  
439 conjugated anti-mouse CD4 (1:200, clone GK1.5, BD Biosciences), FITC-conjugated  
440 anti-mouse CD8 (1:200, clone 53-6.7, BD Biosciences) and biotin-conjugated anti-mouse  
441 CD3 (1:200, clone 500A2, BD Biosciences) surface markers. Next, Streptavidin PerCP  
442 (1:200, BD Biosciences) was added. After that, cells were washed and resuspended in  
443 HBSS + 1% FBS. Then the cells were sorted using the BD FACSAria II cytometer in  
444 order to obtain isolated CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. A small number of cells were re-  
445 analyzed for certification of effective separation of subpopulations.

446

### 447 **Cytotoxic Assay**

448 The cytolytic activity of CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> T cells from spleen of *Brucella*-infected

449 mice was measured using the CytoTox 96 Nonradioactive Cytotoxicity Assay (Promega,  
450 Madison, USA). Differentiated DCs ( $5 \times 10^5$  cells/well) from TKO and C57BL/6 mice  
451 were infected with *B. abortus* (MOI 100:1). Twenty-four hrs after infection, DCs were  
452 used as target cells for cytotoxic assay. Splenocytes, sorted CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> T cells  
453 obtained from TKO and C57BL/6 mice at two weeks post-infection were used as effector  
454 cells. DCs and splenocytes or sorted cells were co-cultured in 24-well plates in DMEM  
455 medium. Effector cells were added to DCs in duplicate at a ratio: 2:1 splenocytes:DCs;  
456 1:1 CD4<sup>+</sup> T cells:DCs; 1:2 CD8<sup>+</sup> T cells:DCs. Culture was maintained at 37°C in 5%  
457 CO<sub>2</sub> and 24 hours later the supernatants were harvested and a lysis buffer was added.  
458 Spontaneous LDH release from effector and target cells, and target maximum release,  
459 were used as controls. The percent of specific lysis was calculated according to  
460 manufacturer's instructions.

461

#### 462 **OVA delivery and SIINFEKL peptide detection**

463  $5 \times 10^5$ /well BMDCs from TKO and wild-type mice were plated in 96-well plates  
464 with 50 µg of OVA (Sigma, St. Louis, MO) and 1.25 µl of FUGENE (Promega, Madison,  
465 WI) in 0.2 mL of DMEM–20 mM HEPES (pH 7.4) for 2 hrs at 37°C and used for  
466 analysis by flow cytometry. In the first step, cells were blocked with anti-mouse  
467 CD16/CD32 MAbs (Fc-Block) and then stained for CD11c, MHC-I- SIINFEKL and  
468 MHC-II surface markers. FITC conjugated anti-mouse CD11c (1:200, clone HL3; from  
469 BD Biosciences), PE conjugated MHC-II (1:200, clone HIS19, from eBiosciences), and  
470 Allophycocyanin-conjugated anti-mouse MHC-I-SIINFEKL (1:100, 25-D1.16; from  
471 eBiosciences), were incubated for 20 min at 4°C with antibody solution (PBS 0.15 M,  
472 0.5% bovine serum albumin, 2 mM NaN<sub>3</sub>). Cells were washed with 150 µL of antibody

473 dilution buffer (eBioscience) and resuspended in 200  $\mu$ L of PBS. Data acquisition was  
474 performed using Attune acoustic focusing cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA)  
475 and 100,000 events were analyzed using the FlowJo Software (Tree Star, Ashland, OR).  
476 Single cells were selected by FSC-H and FSC-A followed by selection of CD11c<sup>+</sup>MHC-  
477 I-SIINFEKL<sup>+</sup> double-positive cells. The gate selection is demonstrated in the  
478 Supplementary Figure 3.

479

#### 480 **Statistical Analysis**

481 All experiments were repeated at least three times with similar results. Graphs and  
482 data analysis were performed using GraphPad Prism 5 (GraphPad Software), using one-  
483 way ANOVA and Bonferroni post-hoc test.

#### 484 **Acknowledgements**

485 This work was supported by grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento  
486 Científico e Tecnológico (CNPq, #464711/2014-2, #402527/2013-5, #443662/2014-2 and  
487 #302660/2015-1), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais  
488 (FAPEMIG, APQ #837/15), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível  
489 Superior (CAPES) and National Institute of Health R01 AI116453.

490

#### 491 **Conflict of interest disclosure**

492 The authors have no financial or commercial conflicts of interest.

493

494

495

496

497

498

499

500

501

502

503

504

505

506

507

508 **References**

509 1. Russell JH, Ley TJ. 2002. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* 20:323-  
510 70.

511 2. Kagi D, Vignaux F, Ledermann B, Burki K, Depraetere V, Nagata S, Hengartner H, Golstein  
512 P. 1994. Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated  
513 cytotoxicity. *Science* 265:528-30.

514 3. Janeway CA, Jr. 1992. The T cell receptor as a multicomponent signalling machine:  
515 CD4/CD8 coreceptors and CD45 in T cell activation. *Annu Rev Immunol* 10:645-74.

516 4. Kloetzel P-M, Ossendorp F. 2004. Proteasome and peptidase function in MHC-class-I-  
517 mediated antigen presentation. *Current Opinion in Immunology* 16:76-81.

518 5. Lowe J, Stock D, Jap B, Zwickl P, Baumeister W, Huber R. 1995. Crystal structure of the  
519 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science* 268:533-  
520 9.

521 6. Jung T, Grune T. 2012. Structure of the proteasome. *Prog Mol Biol Transl Sci* 109:1-39.

522 7. Tanaka K, Kasahara M. 1998. The MHC class I ligand-generating system: roles of  
523 immunoproteasomes and the interferon-gamma-inducible proteasome activator PA28.  
524 *Immunol Rev* 163:161-76.

525 8. Tanaka K. 1994. Role of proteasomes modified by interferon-gamma in antigen  
526 processing. *J Leukoc Biol* 56:571-5.

527 9. Loidl G, Groll M, Musiol HJ, Ditzel L, Huber R, Moroder L. 1999. Bifunctional inhibitors of  
528 the trypsin-like activity of eukaryotic proteasomes. *Chem Biol* 6:197-204.

529 10. Groll M, Huber R. 2004. Inhibitors of the eukaryotic 20S proteasome core particle: a  
530 structural approach. *Biochim Biophys Acta* 1695:33-44.

531 11. Ferrington DA, Gregerson DS. 2012. Immunoproteasomes: structure, function, and  
532 antigen presentation. *Prog Mol Biol Transl Sci* 109:75-112.

- 533 12. Tu L, Moriya C, Imai T, Ishida H, Tetsutani K, Duan X, Murata S, Tanaka K, Shimokawa C,  
534 Hisaeda H, Himeno K. 2009. Critical role for the immunoproteasome subunit LMP7 in  
535 the resistance of mice to *Toxoplasma gondii* infection. *Eur J Immunol* 39:3385-94.
- 536 13. Basler M, Beck U, Kirk CJ, Groettrup M. 2011. The antiviral immune response in mice  
537 devoid of immunoproteasome activity. *J Immunol* 187:5548-57.
- 538 14. Kincaid EZ, Che JW, York I, Escobar H, Reyes-Vargas E, Delgado JC, Welsh RM, Karow ML,  
539 Murphy AJ, Valenzuela DM, Yancopoulos GD, Rock KL. 2011. Mice completely lacking  
540 immunoproteasomes show major changes in antigen presentation. *Nat Immunol*  
541 13:129-35.
- 542 15. Ersching J, Vasconcelos JR, Ferreira CP, Caetano BC, Machado AV, Bruna-Romero O,  
543 Baron MA, Ferreira LR, Cunha-Neto E, Rock KL, Gazzinelli RT, Rodrigues MM. 2016. The  
544 Combined Deficiency of Immunoproteasome Subunits Affects Both the Magnitude and  
545 Quality of Pathogen- and Genetic Vaccination-Induced CD8+ T Cell Responses to the  
546 Human Protozoan Parasite *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathog* 12:e1005593.
- 547 16. Pappas G. 2010. The changing *Brucella* ecology: novel reservoirs, new threats. *Int J*  
548 *Antimicrob Agents* 36 Suppl 1:S8-11.
- 549 17. Atluri VL, Xavier MN, de Jong MF, den Hartigh AB, Tsolis RM. 2011. Interactions of the  
550 human pathogenic *Brucella* species with their hosts. *Annu Rev Microbiol* 65:523-41.
- 551 18. Archambaud C, Salcedo SP, Lelouard H, Devilard E, de Bovis B, Van Rooijen N, Gorvel JP,  
552 Malissen B. 2010. Contrasting roles of macrophages and dendritic cells in controlling  
553 initial pulmonary *Brucella* infection. *Eur J Immunol* 40:3458-71.
- 554 19. Diacovich L, Gorvel JP. 2010. Bacterial manipulation of innate immunity to promote  
555 infection. *Nat Rev Microbiol* 8:117-28.
- 556 20. Delpino MV, Barrionuevo P, Macedo GC, Oliveira SC, Genaro SD, Scian R, Miraglia MC,  
557 Fossati CA, Baldi PC, Giambartolomei GH. 2012. Macrophage-elicited osteoclastogenesis  
558 in response to *Brucella abortus* infection requires TLR2/MyD88-dependent TNF-alpha  
559 production. *J Leukoc Biol* 91:285-98.
- 560 21. Campos MA, Rosinha GM, Almeida IC, Salgueiro XS, Jarvis BW, Splitter GA, Qureshi N,  
561 Bruna-Romero O, Gazzinelli RT, Oliveira SC. 2004. Role of Toll-like receptor 4 in  
562 induction of cell-mediated immunity and resistance to *Brucella abortus* infection in  
563 mice. *Infect Immun* 72:176-86.
- 564 22. de Almeida LA, Macedo GC, Marinho FA, Gomes MT, Corsetti PP, Silva AM, Cassataro J,  
565 Giambartolomei GH, Oliveira SC. 2013. Toll-like receptor 6 plays an important role in  
566 host innate resistance to *Brucella abortus* infection in mice. *Infect Immun* 81:1654-62.
- 567 23. Campos PC, Gomes MT, Guimaraes ES, Guimaraes G, Oliveira SC. 2017. TLR7 and TLR3  
568 Sense *Brucella abortus* RNA to Induce Proinflammatory Cytokine Production but They  
569 Are Dispensable for Host Control of Infection. *Front Immunol* 8:28.
- 570 24. Gomes MT, Campos PC, Pereira Gde S, Bartholomeu DC, Splitter G, Oliveira SC. 2016.  
571 TLR9 is required for MAPK/NF-kappaB activation but does not cooperate with TLR2 or  
572 TLR6 to induce host resistance to *Brucella abortus*. *J Leukoc Biol* 99:771-80.
- 573 25. Macedo GC, Magnani DM, Carvalho NB, Bruna-Romero O, Gazzinelli RT, Oliveira SC.  
574 2008. Central role of MyD88-dependent dendritic cell maturation and proinflammatory  
575 cytokine production to control *Brucella abortus* infection. *J Immunol* 180:1080-7.
- 576 26. Oliveira FS, Carvalho NB, Brandao AP, Gomes MT, de Almeida LA, Oliveira SC. 2011.  
577 Interleukin-1 receptor-associated kinase 4 is essential for initial host control of *Brucella*  
578 *abortus* infection. *Infect Immun* 79:4688-95.

- 579 27. Zhan Y, Liu Z, Cheers C. 1996. Tumor necrosis factor alpha and interleukin-12 contribute  
580 to resistance to the intracellular bacterium *Brucella abortus* by different mechanisms.  
581 *Infect Immun* 64:2782-6.
- 582 28. Golding B, Scott DE, Scharf O, Huang LY, Zaitseva M, Lapham C, Eller N, Golding H. 2001.  
583 Immunity and protection against *Brucella abortus*. *Microbes Infect* 3:43-8.
- 584 29. Oliveira SC, Splitter GA. 1995. CD8+ type 1 CD44hi CD45 RBlo T lymphocytes control  
585 intracellular *Brucella abortus* infection as demonstrated in major histocompatibility  
586 complex class I- and class II-deficient mice. *Eur J Immunol* 25:2551-7.
- 587 30. Murphy EA, Sathiyaseelan J, Parent MA, Zou B, Baldwin CL. 2001. Interferon-gamma is  
588 crucial for surviving a *Brucella abortus* infection in both resistant C57BL/6 and  
589 susceptible BALB/c mice. *Immunology* 103:511-8.
- 590 31. Brandao AP, Oliveira FS, Carvalho NB, Vieira LQ, Azevedo V, Macedo GC, Oliveira SC.  
591 2012. Host susceptibility to *Brucella abortus* infection is more pronounced in IFN-  
592 gamma knockout than IL-12/beta2-microglobulin double-deficient mice. *Clin Dev*  
593 *Immunol* 2012:589494.
- 594 32. Janeway CA, Jr., Yagi J, Rojo J, Portoles P, Carding S, Luqman M, Bottomly K. 1988.  
595 Immune recognition and effector function in subsets of CD4 T cells. *Princess Takamatsu*  
596 *Symp* 19:193-208.
- 597 33. Gomes MT, Campos PC, de Almeida LA, Oliveira FS, Costa MM, Marim FM, Pereira GS,  
598 Oliveira SC. 2012. The role of innate immune signals in immunity to *Brucella abortus*.  
599 *Front Cell Infect Microbiol* 2:130.
- 600 34. Jameson SC, Bevan MJ. 1992. Dissection of major histocompatibility complex (MHC) and  
601 T cell receptor contact residues in a Kb-restricted ovalbumin peptide and an assessment  
602 of the predictive power of MHC-binding motifs. *Eur J Immunol* 22:2663-7.
- 603 35. Porgador A, Yewdell JW, Deng Y, Bennink JR, Germain RN. 1997. Localization,  
604 quantitation, and in situ detection of specific peptide-MHC class I complexes using a  
605 monoclonal antibody. *Immunity* 6:715-26.
- 606 36. Dikic I. 2017. Proteasomal and Autophagic Degradation Systems. *Annu Rev Biochem*  
607 86:193-224.
- 608 37. Glickman MH, Ciechanover A. 2002. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway:  
609 destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* 82:373-428.
- 610 38. Guha S, Padh H. 2008. Cathepsins: fundamental effectors of endolysosomal proteolysis.  
611 *Indian J Biochem Biophys* 45:75-90.
- 612 39. Mykles DL. 1998. Intracellular proteinases of invertebrates: calcium-dependent and  
613 proteasome/ubiquitin-dependent systems. *Int Rev Cytol* 184:157-289.
- 614 40. Jung T, Catalgol B, Grune T. 2009. The proteasomal system. *Mol Aspects Med* 30:191-  
615 296.
- 616 41. Murata S, Sasaki K, Kishimoto T, Niwa S, Hayashi H, Takahama Y, Tanaka K. 2007.  
617 Regulation of CD8+ T cell development by thymus-specific proteasomes. *Science*  
618 316:1349-53.
- 619 42. Groettrup M, Ruppert T, Kuehn L, Seeger M, Standera S, Koszinowski U, Kloetzel PM.  
620 1995. The Interferon- $\gamma$ -inducible 11 S Regulator (PA28) and the LMP2/LMP7 Subunits  
621 Govern the Peptide Production by the 20 S Proteasome in Vitro. *Journal of Biological*  
622 *Chemistry* 270:23808-23815.
- 623 43. Strehl B, Joeris T, Rieger M, Visekruna A, Textoris-Taube K, Kaufmann SHE, Kloetzel PM,  
624 Kuckelkorn U, Steinhoff U. 2006. Immunoproteasomes Are Essential for Clearance of  
625 *Listeria monocytogenes* in Nonlymphoid Tissues but Not for Induction of Bacteria-  
626 Specific CD8+ T Cells. *The Journal of Immunology* 177:6238-6244.

- 627 44. Barton LF, Cruz M, Rangwala R, Deepe GS, Monaco JJ. 2002. Regulation of  
628 Immunoproteasome Subunit Expression In Vivo Following Pathogenic Fungal Infection.  
629 *The Journal of Immunology* 169:3046-3052.
- 630 45. Hutchinson S, Sims S, O'Hara G, Silk J, Gileadi U, Cerundolo V, Klenerman P. 2011. A  
631 dominant role for the immunoproteasome in CD8+ T cell responses to murine  
632 cytomegalovirus. *PLoS One* 6:e14646.
- 633 46. Khan S, van den Broek M, Schwarz K, de Giuli R, Diener PA, Groettrup M. 2001.  
634 Immunoproteasomes Largely Replace Constitutive Proteasomes During an Antiviral and  
635 Antibacterial Immune Response in the Liver. *The Journal of Immunology* 167:6859-6868.
- 636 47. Basler M, Dajee M, Moll C, Groettrup M, Kirk CJ. 2010. Prevention of experimental colitis  
637 by a selective inhibitor of the immunoproteasome. *J Immunol* 185:634-41.
- 638 48. Ichikawa HT, Conley T, Muchamuel T, Jiang J, Lee S, Owen T, Barnard J, Nevarez S,  
639 Goldman BI, Kirk CJ, Looney RJ, Anolik JH. 2012. Beneficial effect of novel proteasome  
640 inhibitors in murine lupus via dual inhibition of type I interferon and autoantibody-  
641 secreting cells. *Arthritis Rheum* 64:493-503.
- 642 49. Nagayama Y, Nakahara M, Shimamura M, Horie I, Arima K, Abiru N. 2012. Prophylactic  
643 and therapeutic efficacies of a selective inhibitor of the immunoproteasome for  
644 Hashimoto's thyroiditis, but not for Graves' hyperthyroidism, in mice. *Clin Exp Immunol*  
645 168:268-73.
- 646 50. Araya LN, Elzer PH, Rowe GE, Enright FM, Winter AJ. 1989. Temporal development of  
647 protective cell-mediated and humoral immunity in BALB/c mice infected with *Brucella*  
648 *abortus*. *J Immunol* 143:3330-7.
- 649 51. Pavlov H, Hogarth M, McKenzie IF, Cheers C. 1982. In vivo and in vitro effects of  
650 monoclonal antibody to Ly antigens on immunity to infection. *Cell Immunol* 71:127-38.
- 651 52. Neefjes J, Jongstra ML, Paul P, Bakke O. 2011. Towards a systems understanding of MHC  
652 class I and MHC class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol* 11:823-36.
- 653 53. Fehling HJ, Swat W, Laplace C, Kuhn R, Rajewsky K, Muller U, von Boehmer H. 1994.  
654 MHC class I expression in mice lacking the proteasome subunit LMP-7. *Science*  
655 265:1234-7.
- 656 54. van Helden MJ, de Graaf N, Bekker CP, Boog CJ, Zaiss DM, Sijts AJ. 2011.  
657 Immunoproteasome-deficiency has no effects on NK cell education, but confers  
658 lymphocytes into targets for NK cells in infected wild-type mice. *PLoS One* 6:e23769.
- 659 55. Barrionuevo P, Delpino MV, Pozner RG, Velasquez LN, Cassataro J, Giambartolomei GH.  
660 2013. *Brucella abortus* induces intracellular retention of MHC-I molecules in human  
661 macrophages down-modulating cytotoxic CD8(+) T cell responses. *Cell Microbiol* 15:487-  
662 502.
- 663 56. Milillo MA, Velasquez LN, Trotta A, Delpino MV, Marinho FV, Balboa L, Vermeulen M,  
664 Espindola SL, Rodriguez-Rodriguez N, Fernandez GC, Oliveira SC, Giambartolomei GH,  
665 Barrionuevo P. 2017. *B. abortus* RNA is the component involved in the down-modulation  
666 of MHC-I expression on human monocytes via TLR8 and the EGFR pathway. *PLoS Pathog*  
667 13:e1006527.
- 668 57. Bessoles S, Dudal S, Besra GS, Sanchez F, Lafont V. 2009. Human CD4+ invariant NKT  
669 cells are involved in antibacterial immunity against *Brucella suis* through CD1d-  
670 dependent but CD4-independent mechanisms. *Eur J Immunol* 39:1025-35.
- 671 58. Ugalde JE, Comerci DJ, Leguizamon MS, Ugalde RA. 2003. Evaluation of *Brucella abortus*  
672 phosphoglucomutase (pgm) mutant as a new live rough-phenotype vaccine. *Infect*  
673 *Immun* 71:6264-9.

- 674 59. Bitzer A, Basler M, Krappmann D, Groettrup M. 2017. Immunoproteasome subunit  
675 deficiency has no influence on the canonical pathway of NF-kappaB activation. Mol  
676 Immunol 83:147-153.
- 677 60. Durward-Dioia M, Harms J, Khan M, Hall C, Smith JA, Splitter GA. 2015. CD8+ T cell  
678 exhaustion, suppressed gamma interferon production, and delayed memory response  
679 induced by chronic Brucella melitensis infection. Infect Immun 83:4759-71.
- 680 61. Martirosyan A, Von Bargen K, Arce Gorvel V, Zhao W, Hanniffy S, Bonnardel J, Meresse  
681 S, Gorvel JP. 2013. In vivo identification and characterization of CD4(+) cytotoxic T cells  
682 induced by virulent Brucella abortus infection. PLoS One 8:e82508.
- 683 62. Darmon AJ, Nicholson DW, Bleackley RC. 1995. Activation of the apoptotic protease  
684 CPP32 by cytotoxic T-cell-derived granzyme B. Nature 377:446-8.
- 685 63. Rotonda J, Garcia-Calvo M, Bull HG, Geissler WM, McKeever BM, Willoughby CA,  
686 Thornberry NA, Becker JW. 2001. The three-dimensional structure of human granzyme B  
687 compared to caspase-3, key mediators of cell death with cleavage specificity for aspartic  
688 acid in P1. Chem Biol 8:357-68.
- 689 64. Wargnier A, Lafaurie C, Legros-Maida S, Bourge JF, Sigaux F, Sasportes M, Paul P. 1998.  
690 Down-regulation of human granzyme B expression by glucocorticoids. Dexamethasone  
691 inhibits binding to the Ikaros and AP-1 regulatory elements of the granzyme B promoter.  
692 J Biol Chem 273:35326-31.
- 693 65. Huang C, Bi E, Hu Y, Deng W, Tian Z, Dong C, Hu Y, Sun B. 2006. A novel NF-kappaB  
694 binding site controls human granzyme B gene transcription. J Immunol 176:4173-81.
- 695 66. Haddad P, Wargnier A, Bourge JF, Sasportes M, Paul P. 1993. A promoter element of the  
696 human serine esterase granzyme B gene controls specific transcription in activated T  
697 cells. Eur J Immunol 23:625-9.
- 698 67. Arias MA, Jimenez de Bagues MP, Aguilo N, Menao S, Hervas-Stubbs S, de Martino A,  
699 Alcaraz A, Simon MM, Froelich CJ, Pardo J. 2014. Elucidating sources and roles of  
700 granzymes A and B during bacterial infection and sepsis. Cell Rep 8:420-9.

## 701 **Figure Legends**

702 **Figure 1. Lack of immunoproteasome renders mice susceptible to *B. abortus***  
703 **infection.** C57BL/6, TKO and IFN- $\gamma^{-/-}$  mice were intraperitoneally inoculated with  $10^6$   
704 CFU of *B. abortus* S2308. **(A)** the number of bacteria in the spleen was analyzed by  
705 counting the CFU after one, two and four weeks of infection. **(B)** 1, 2 or 4 w.p.i. spleen  
706 cells ( $1 \times 10^6$  cells) from C57BL/6, TKO and IFN- $\gamma^{-/-}$  were restimulated with *B. abortus*  
707 S2308 (MOI 100:1) and IFN- $\gamma$  levels were measured by ELISA after 72 hrs. <sup>+++</sup> indicates  
708 death of animals. Data are the mean  $\pm$  SD of five mice/group and representative of three  
709 independent experiments. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.001$  and \*\*\*  $P < 0.0001$  for statistically  
710 significant differences compared to C57BL/6.



711

712 **Figure 2. Immunoproteasome is critical for IFN- $\gamma$  production by CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T**  
713 **cells after *B. abortus* infection.** Flow cytometry analysis of C57BL/6, TKO and IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup>  
714 splenocytes obtained after one, two and four weeks of infection with *B. abortus* was  
715 performed after 4 hrs of incubation with brefeldin A and Concanavalin A. Cells were  
716 assessed for CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> (A) and CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> (B). A total of 100,000 events  
717 was obtained and analyzed. <sup>+++</sup> indicates death of animals. Data are the mean  $\pm$  SD of five  
718 mice/group and representative of three independent experiments. \*  $P < 0.05$  and \*\*  $P <$   
719  $0.001$  for statistically significant differences compared to C57BL/6.

720

721 **Figure 3. MHC class I surface expression is partially impaired on dendritic cells**  
722 **from TKO animals.** Flow cytometry of C57BL/6 and TKO mouse splenocytes was  
723 analyzed at the second week of infection with *B. abortus*. Cells were assessed for  
724 CD11c<sup>+</sup>MHC-I<sup>+</sup> (A) and CD11c<sup>+</sup>MHC-II<sup>+</sup> (B). A total of 100,000 events was obtained  
725 and analyzed. Dendritic cells were cultured ( $5 \times 10^5$  cells/well) and stimulated with *B.*  
726 *abortus* S2308 (MOI 100:1) for 24 hrs. Culture supernatants were harvested and TNF- $\alpha$   
727 (C), IL-6 (D) and IL-12 (E) secretion was determined by ELISA according to the  
728 manufacturer's instructions. Data are the mean  $\pm$  SD of five mice/group and  
729 representative of three independent experiments. \*  $P < 0.05$  for statistically significant  
730 differences compared to C57BL/6 and \*\*\*  $P < 0.001$  for statistically significant  
731 differences between *Brucella*-infected and uninfected cells.

732

733 **Figure 4. Antigen presentation by *Brucella*-infected TKO dendritic cells is**  
734 **dramatically diminished.** (A) dendritic cells differentiated ( $5 \times 10^5$  cells/well) obtained

735 from C57BL/6 and TKO mice were infected with *B. abortus* (MOI 100:1) and used as  
736 target cells. Splenocytes ( $1 \times 10^6$  cells/well) obtained from C57BL/6 and TKO mice at the  
737 second week of infection were used as effector cells for cytotoxic assay and were co-  
738 cultured with dendritic cells in 24-well plates in DMEM medium. Effector cells were  
739 added to target cells in duplicate at 2:1 ratio and 24 hrs after co-culture the supernatant  
740 was collected to quantify LDH release according to the manufacturer's instructions. **(B)**  
741 dendritic cells from C57BL/6 and TKO mice were incubated with OVA-fugene for 2  
742 hours. Cells were then stained with anti-SIINFEKL-H-2<sup>b</sup> and analyzed by flow  
743 cytometry. A total of 100,000 events was obtained and analyzed. Data are the mean  $\pm$  SD  
744 of five mice/group and representative of three independent experiments. \*  $P < 0.05$  and  
745 \*\*\*  $P < 0.0001$  for statistically significant differences compared to C57BL/6 and \*\*\*  $P <$   
746 0.0001 for statistically significant differences between wild-type and TKO dendritic cells  
747 co-cultured with splenocytes.

748

749 **Figure 5. TKO T CD8<sup>+</sup> cytotoxic activity is reduced in *B. abortus* infected mice.**

750 Bone marrow derived dendritic cells ( $5 \times 10^5$  cells/well) obtained from C57BL/6 and  
751 TKO mice were infected with *B. abortus* (MOI 100:1) and used as target cells. T CD8<sup>+</sup>  
752 **(A)** or T CD4<sup>+</sup> **(C)** lymphocytes ( $1 \times 10^6$  cells/well) obtained by cell sorting from  
753 C57BL/6 and TKO splenocytes at the second week of infection were used as effector  
754 cells for cytotoxic assay and were co-cultured with dendritic cells in 24-well plates in  
755 DMEM medium. CD8<sup>+</sup> T cells were added to target cells at 1:2 ratio and T CD4<sup>+</sup> cells  
756 were added to target cells in duplicate at 1:1 ratio, and 24 hrs after co-culture the  
757 supernatant was collected to quantify LDH release according to the manufacturer's  
758 instructions. Percentage of CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>granzyme-B<sup>+</sup> **(B)** and CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>granzyme-B<sup>+</sup>

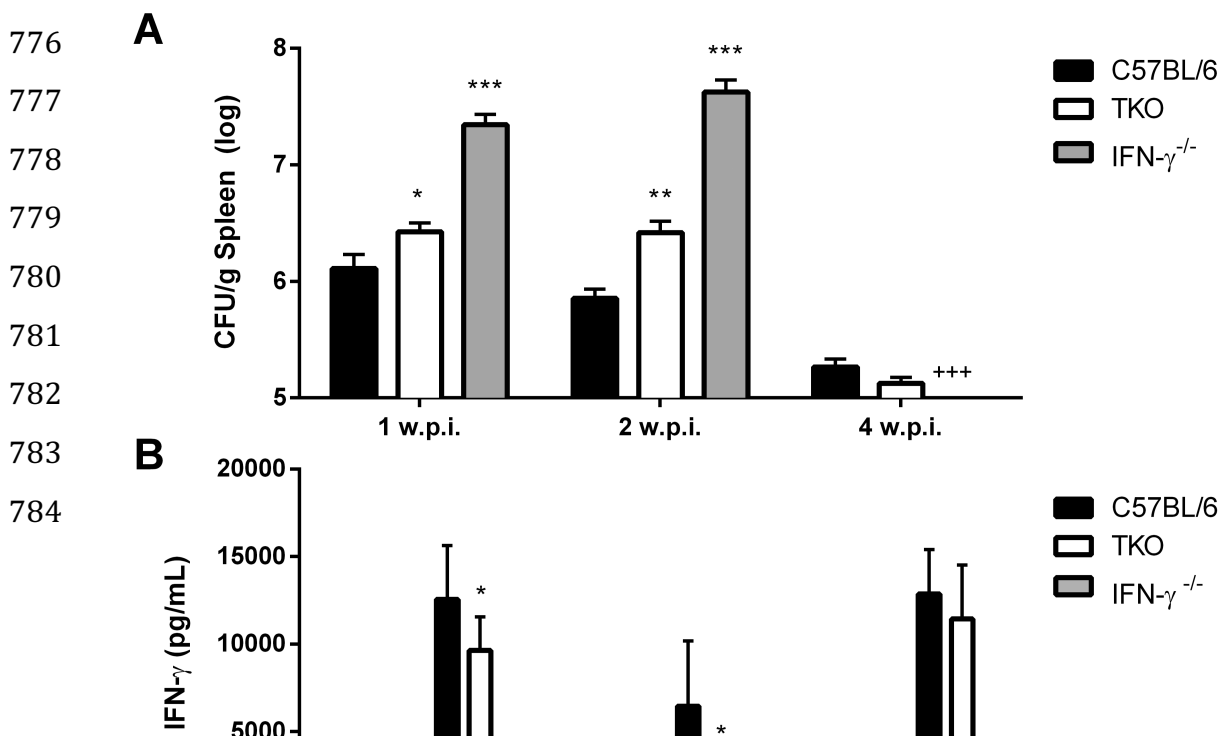
759 cells (D) measured by flow cytometry in splenocytes from C57BL/6 and TKO mice.  
 760 Data are the mean  $\pm$  SD of five mice/group and representative of three independent  
 761 experiments. \*\*  $P < 0.001$  and \*\*\*  $P < 0.0001$  for statistically significant differences  
 762 compared to C57BL/6 and \*  $P < 0.05$  for statistically significant differences between  
 763 wild-type and TKO dendritic cells co-cultured with CD8<sup>+</sup> T cells.

764

765 **Figure 6. Schematic model of CD8<sup>+</sup> T cell response during *B. abortus* in TKO**  
 766 **animals.** *B. abortus* proteins secreted in the cytoplasm of dendritic cells are degraded by  
 767 the immunoproteasome generating a variety of peptides. These peptides are then  
 768 transported to the endoplasmic reticulum and binds to the MHC-I molecule. The MHC-I-  
 769 peptide complex is exported to the cell membrane and recognized by CD8<sup>+</sup> T  
 770 lymphocytes. After that, CD8<sup>+</sup> T cells produce granzyme-B and IFN- $\gamma$  in response to the  
 771 infection. The red dotted arrows indicate the partially impaired process in TKO dendritic  
 772 and CD8<sup>+</sup> T cells. P, proteasome; IP, immunoproteasome; E.R., endoplasmic reticulum;  
 773 DC, dendritic cell.

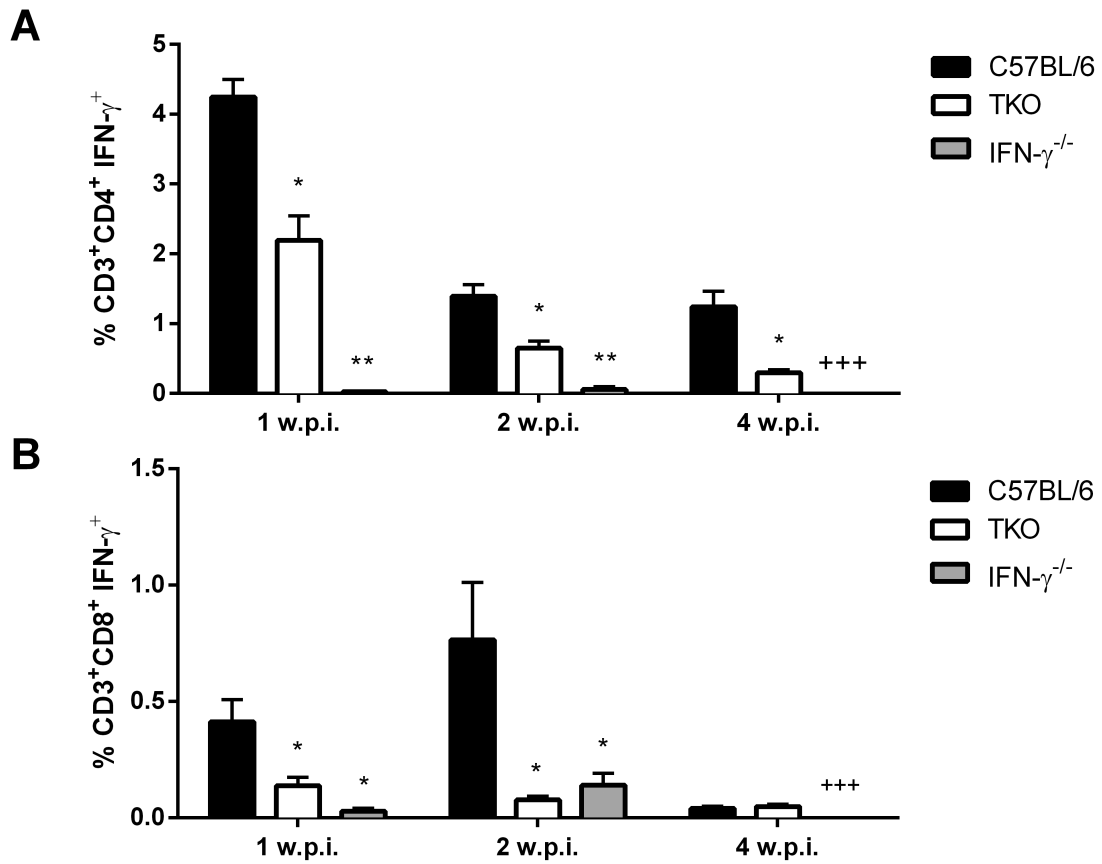
774

775 **FIGURE 1**



785  
786  
787  
788  
789  
790  
791  
792

FIGURE 2



793  
794  
795  
796  
797

798

799

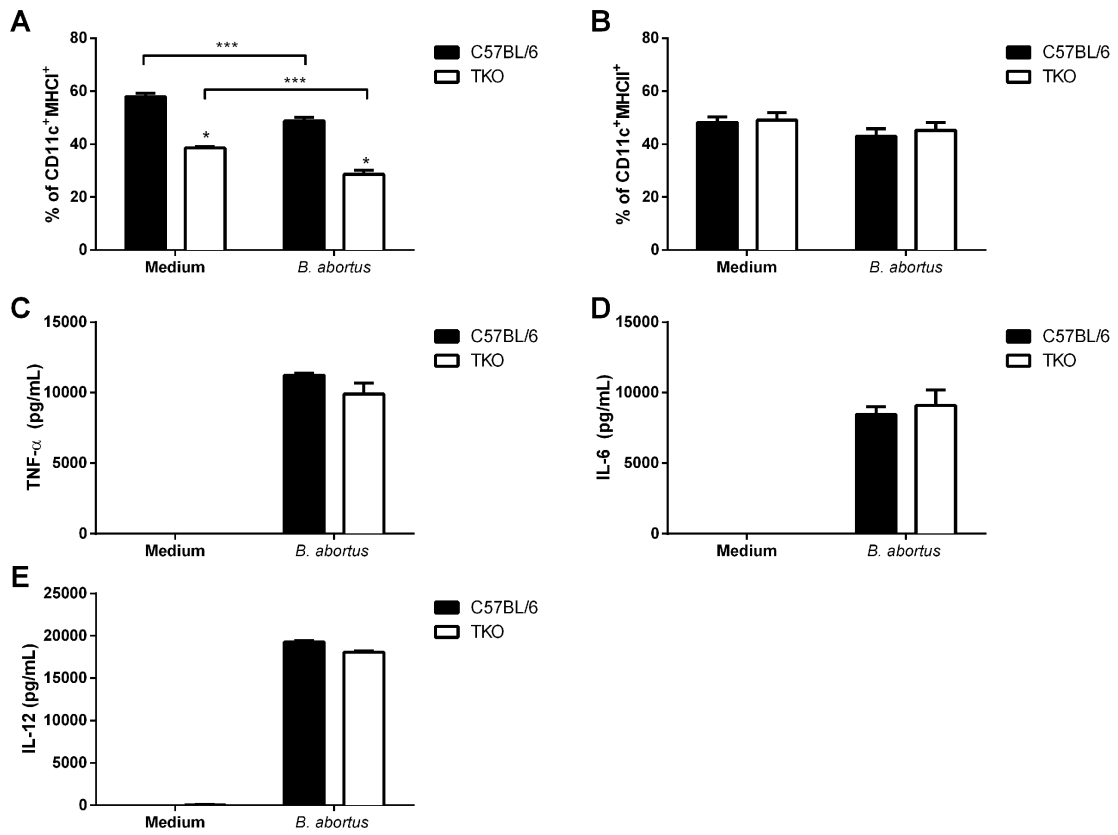
800

801

802

803

804 **FIGURE 3**



805

806

807

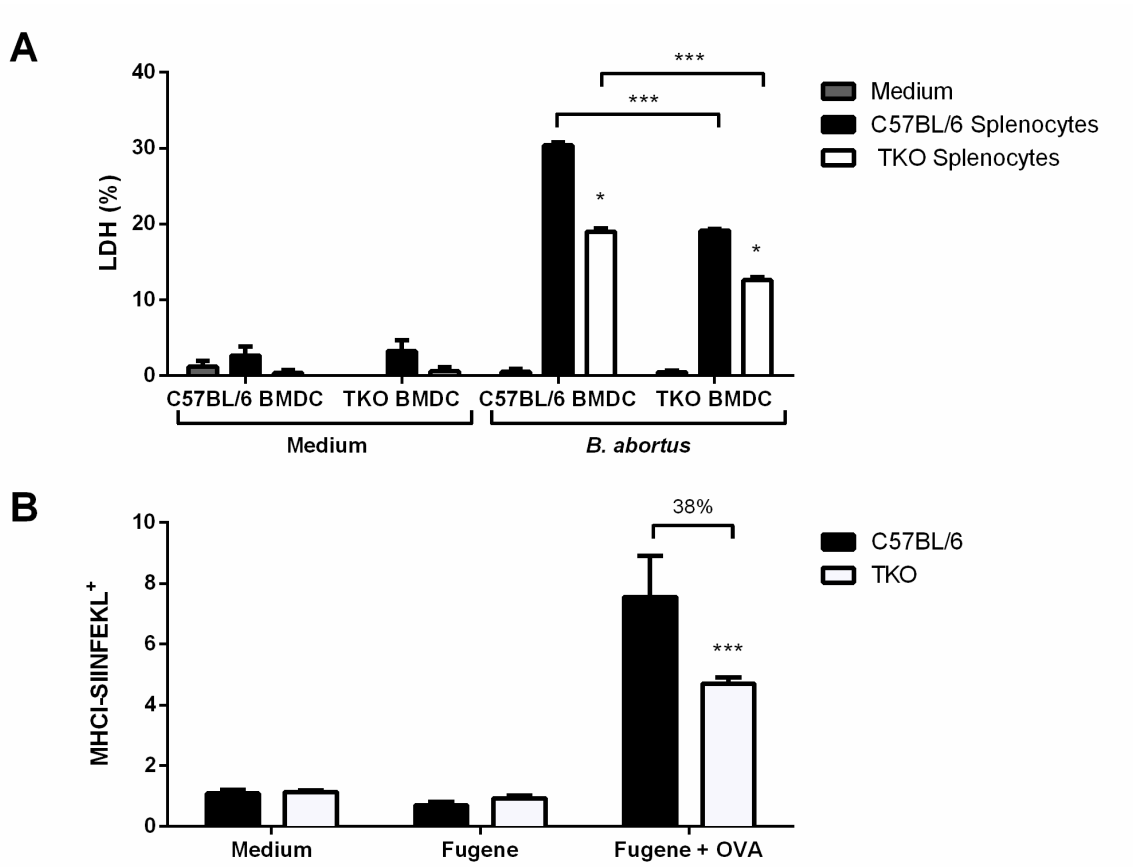
808

809

810

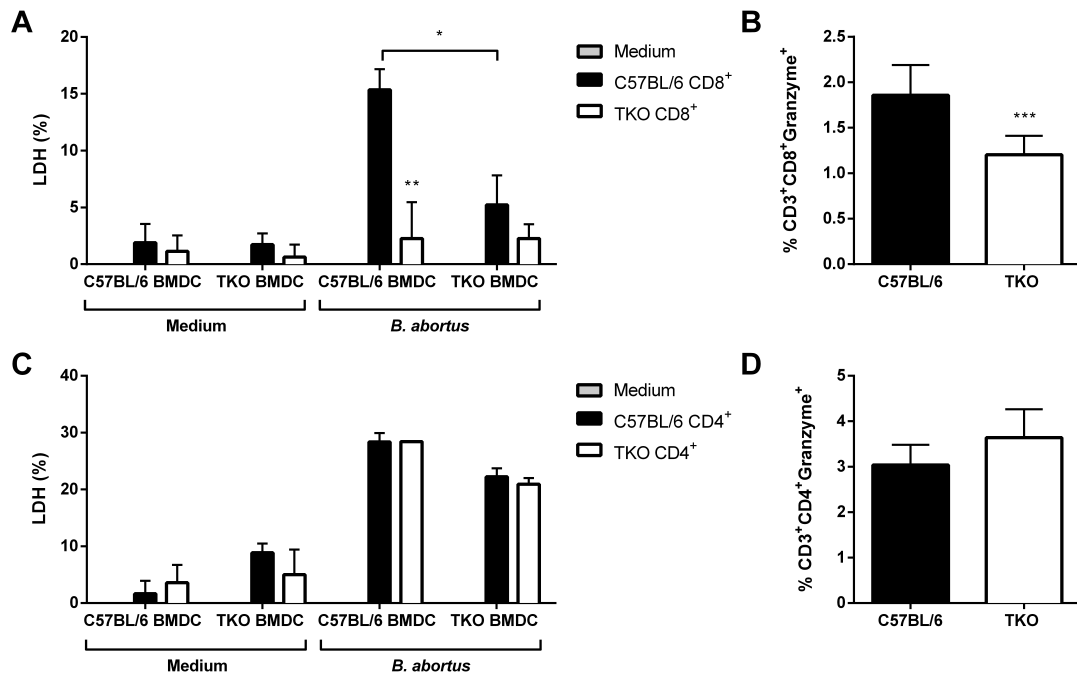
811  
 812  
 813  
 814  
 815  
 816  
 817  
 818  
 819  
 820  
 821  
 822  
 823  
 824  
 825  
 826  
 827  
 828  
 829  
 830  
 831  
 832  
 833  
 834  
 835  
 836  
 837  
 838  
 839

**FIGURE 4**



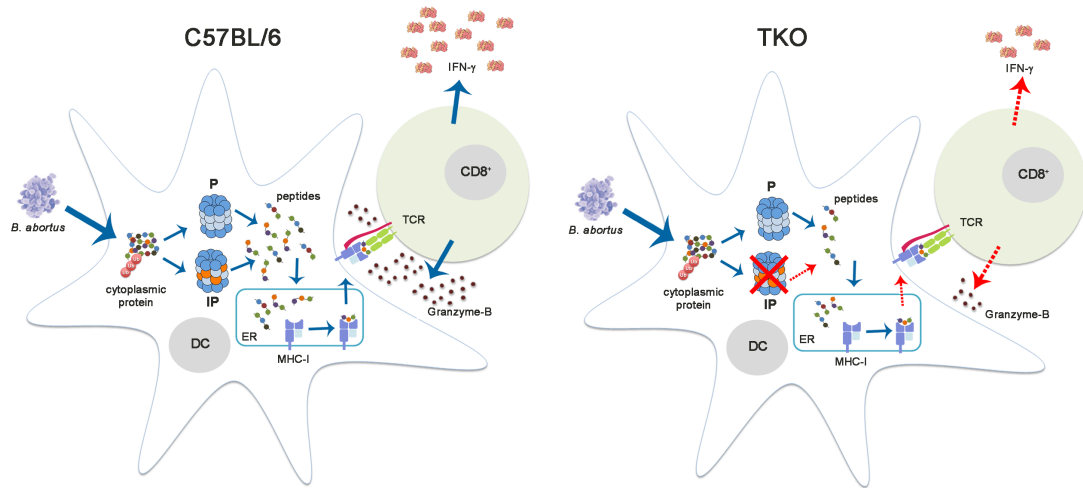
840  
841  
842  
843  
844  
845  
846  
847

FIGURE 5



848  
849  
850  
851

FIGURE 6



852