

(22) Data de pedido: 2003.11.07	(73) Titular(es): VERENIGING VOOR CHRISTELIJK WETENSCHAPPELIJK ONDERWIJS DE BOELELAAN 1105 NL-1081 HV AMSTERDAM	NL
(30) Prioridade(s): 2002.11.07 EP 02079665		
(43) Data de publicação do pedido: 2005.09.07		
(45) Data e BPI da concessão: 2015.08.26 239/2015	(72) Inventor(es): TEUNIS BERNARD HERMAN GEIJTENBEEK YVETTE VAN KOOYK	NL NL
	(74) Mandatário: NUNO MIGUEL OLIVEIRA LOURENÇO RUA CASTILHO, Nº 50 - 9º 1269-163 LISBOA	PT

(54) Epígrafe: **MOLÉCULAS DE LIGAÇÃO DE LECTINAS DE TIPO C, IDENTIFICAÇÃO E UTILIZAÇÕES DAS MESMAS**

(57) Resumo:

AS LECTINAS DE TIPO C ESTÃO ENVOLVIDAS NA LIGAÇÃO DE MUITOS TIPOS DIFERENTES DE HIDRATOS DE CARBONO. CONSIDERANDO A SUA DIVERSIDADE EM TIPO E EXPRESSÃO DE DIFERENTES TIPOS DE CÉLULAS, A INFLUÊNCIA DESSA LIGAÇÃO É MUITO DIVERSA E DEPENDENTE, ENTRE OUTROS, DO TIPO DE CÉLULA, DO AMBIENTE DA CÉLULA E DO TIPO DE HIDRATO DE CARBONO LIGADO. NA PRESENTE INVENÇÃO SÃO DIVULGADAS NOVAS ESPECIFICIDADES DE HIDRATOS DE CARBONO DA LECTINAS DE TIPO C. A INTERFERÊNCIA COM ESTA PROPRIEDADE DE LIGAÇÃO TEM APLICAÇÕES NA PREVENÇÃO DA LIGAÇÃO DE AGENTES PATOGÉNICOS E TAMBÉM PARA INFLUENCIAR AS VIAS DE SINALIZAÇÃO EM CÉLULAS QUE CONTÊM LECTINAS DE TIPO C, PARTICULARMENTE EM CÉLULAS QUE EXPRESSAM RECETORES DE TIPO TOLL TAIS COMO AS CÉLULAS DENDRÍTICAS. É TAMBÉM PROPORCIONADA A UTILIZAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DOS HIDRATOS DE CARBONO PARA MELHORAR A APRESENTAÇÃO DE ANTIGÉNIOS PELAS CÉLULAS APRESENTADORAS DE ANTIGÉNIOS E PARA MANIPULAR A MIGRAÇÃO DE CÉLULAS QUE CONTÊM LECTINAS DE TIPO C E A INTERAÇÃO DAS CÉLULAS QUE EXPRESSAM LECTINAS DE TIPO C COM LIGANDOS CELULARES EM CÉLULAS VIZINHAS.

RESUMO

"MOLECULAS DE LIGAÇÃO DE LECTINAS DE TIPO C, IDENTIFICAÇÃO E UTILIZAÇÕES DAS MESMAS"

As lectinas de tipo C estão envolvidas na ligação de muitos tipos diferentes de hidratos de carbono. Considerando a sua diversidade em tipo e expressão de diferentes tipos de células, a influência dessa ligação é muito diversa e dependente, entre outros, do tipo de célula, do ambiente da célula e do tipo de hidrato de carbono ligado. Na presente invenção são divulgadas novas especificidades de hidratos de carbono da lectinas de tipo C. A interferência com esta propriedade de ligação tem aplicações na prevenção da ligação de agentes patogénicos e também para influenciar as vias de sinalização em células que contêm lectinas de tipo C, particularmente em células que expressam recetores de tipo Toll tais como as células dendríticas. É também proporcionada a utilização da especificidade dos hidratos de carbono para melhorar a apresentação de antígenos pelas células apresentadoras de antígenos e para manipular a migração de células que contêm lectinas de tipo C e a interação das células que expressam lectinas de tipo C com ligandos celulares em células vizinhas.

DESCRIÇÃO

"MOLÉCULAS DE LIGAÇÃO DE LECTINAS DE TIPO C, IDENTIFICAÇÃO E UTILIZAÇÕES DAS MESMAS"

A invenção refere-se ao campo de imunologia.

As células dendríticas (DC) são células apresentadoras de antígenos (APC) profissionais que induzem a imunidade celular após reconhecimento do agente patogénico. Estas células são, portanto, importantes na defesa contra muitos agentes patogénicos^{1;2;3}. As DC imaturas estão distribuídas ao longo dos tecidos periféricos para atuar como sentinelas contra agentes patogénicos invasores⁴. Após captura do agente patogénico, as DC são ativadas, processam os agentes patogénicos para apresentação de antígeno nas moléculas de classe II do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) e migram para os órgãos linfoides secundários onde ativam as células T naíf para iniciar as respostas imunológicas adaptativas^{1;3;4}. Dependendo do agente patogénico que é reconhecido pelas DC, a diferenciação de células T naíf em células Th1 é desencadeada pelas DC em resposta aos micróbios intracelulares, enquanto as respostas mediadas por Th2 são geradas pelas DC para eliminar agentes patogénicos que residem extracelularmente³. Assim, as DC desempenham um papel importante tanto nas respostas inatas como nas respostas imunológicas celulares contra antígenos tumorais bem como agentes patogénicos tais como infeções virais, bacterianas, fúngicas e parasitárias^{1;5}. O conhecimento sobre os recetores da superfície celular nas DC que estão envolvidos no reconhecimento de agentes patogénicos está apenas a começar a emergir, e incluem recetores de tipo Toll (TLR)^{6;7} e lectinas de tipo C⁸. Os TLR reconhecem componentes

específicos derivados dos agentes patogénicos, tais como lipoproteínas, lipopolissacáridos e ADN bacteriano, e transmitem esta informação através de cascatas de sinalização intracelulares que conduzem à produção de citocinas reguladoras e à regulação positiva de MHC e moléculas co-estimuladoras que conduzem à ativação/maturação de DC⁶. Em contraste, as lectinas de tipo C reconhecem estruturas de hidratos de carbono derivadas de agentes patogénicos e após ligação internalizam os agentes patogénicos para processamento de antígeno e apresentação às células T⁸⁻¹⁰. Nas lectinas dependentes de cálcio clássicas, os resíduos de aminoácidos conservados no domínio de reconhecimento de hidratos de carbono (CRD) estão envolvidos na ligação de cálcio e especificidade para o açúcar¹¹. Um número crescente de lectinas de tipo C é descrito como sendo especificamente expresso pelas DC. Para a maioria destas lectinas não existe conhecimento detalhado sobre os alvos dos agentes patogénicos bem como sobre os ligandos celulares, se houver algum, incluindo sobre a identidade da estrutura de hidrato de carbono que elas reconhecem⁸. A lectina de tipo C específica para DC, DC-SIGN (não integrina de fixação de ICAM-3 específica de células dendríticas, CD209), está envolvida na ligação da glicoproteína do envelope de HIV-1 pelas DC para melhorar a infeção das células T¹², enquanto o recetor de manose (MR) está envolvido no reconhecimento de micobactérias e Fungos/Protozoários¹³. Algumas lectinas de tipo C como a DC-SIGN podem interagir com glicoproteínas portadoras de hidratos de carbono (ICAM-2 e ICAM-3) para mediar processos de adesão celular^{14;15}.

Como aqui descrita, uma lectina de tipo C pode compreender especificidade para mais do que um tipo de glicoconjugado. Este conhecimento é útil para uma variedade de finalidades. Por exemplo, as lectinas são instrumentais na mediação da

ligação de agentes patogénicos e na apresentação de antígenos dos mesmos nas células dendríticas. Esta propriedade de ligação das lectinas de tipo C é utilizada por um número de agentes patogénicos para, pelo menos em parte, facilitar a infeção de um indivíduo. Por conseguinte, o conhecimento da especificidade dos glicoconjugados de tais lectinas proporciona uma entrada para o desenvolvimento de medicamentos capazes de interferir com a capacidade dos hidratos de carbono presentes nos agentes patogénicos para interagir com a lectina e, desse modo, interferir, pelo menos em parte, com a infeção ou a gravidade da mesma no indivíduo exposto. Esta divulgação proporciona um método para inibir, pelo menos em parte, a ligação de um ligando a uma lectina de tipo C ou uma parte de ligação de hidratos de carbono da mesma, compreendendo pôr em contacto a referida lectina de tipo C com um glicoconjugado isolado e/ou recombinante compreendendo pelo menos dois resíduos de manose na ligação $\alpha 1,2$ ou um glicoconjugado que compreende um resíduo de fucose ou um glicoconjugado que compreende pelo menos uma extremidade que apresenta N-acetilglucosamina ou um derivado ou multímero da mesma. É também proporcionada a utilização de um glicoconjugado que compreende um resíduo de fucose ou um derivado ou multímero do mesmo para inibir, pelo menos em parte, a ligação de um ligando a uma lectina de tipo C ou uma parte de ligação de hidratos de carbono da mesma. Este método pode ser utilizado, por exemplo, para estudar as propriedades de ligação exatas da lectina. O método é também útil na identificação de compostos capazes de interferir com uma aptidão da referida lectina de tipo C para ligar-se a agentes patogénicos. O referido método compreende ainda uma célula compreendendo a referida lectina de tipo C. Preferencialmente a referida célula é uma célula apresentadora de antígenos, mais preferencialmente uma célula dendrítica ou macrófago. Na

presença dessa célula, o efeito dessa inibição pode ser comparado com a função da célula apresentadora de antígenos, por exemplo quanto à sua capacidade para apresentar o antígeno e/ou a produção de linfocinas e/ou citocinas. A referida lectina de tipo C pode compreender DC-SIGN, mSIGNR1, L-SIGN e/ou DC-SIGNR. Enquanto a DC-SIGNR e a L-SIGN são expressas predominantemente em macrófagos/células endoteliais, nas células dos gânglios linfáticos e nas células endoteliais sinusoidais do fígado e a DC-SIGN é expressa predominantemente nas células dendríticas. As DC-SIGNR e L-SIGN partilham dos efeitos de ligação e sinalização notáveis que o ManLAM tem após ligação às células dendríticas via DC-SIGN. No entanto, enquanto a DC-SIGN inclui ainda uma especificidade particular para glicoconjugados que compreendem um resíduo de fucose ou um derivado ou multímero do mesmo, as DC-SIGNR e L-SIGN não têm essa especificidade particular. Assim, nos métodos acima há uma preferência para a lectina de tipo C DC-SIGN.

Com o termo "glicoconjugado que compreende um resíduo de fucose" entende-se um glicoconjugado que compreende pelo menos um resíduo de fucose que está ligado $\alpha 1,3$ ou $\alpha 1,4$ relativamente ao glicoconjugado. A unidade de ligação consiste preferencialmente em N-acetilglucosamina. A unidade de ligação é preferencialmente acoplada a um oligossacárido ou glicano, o qual, por sua vez, pode fazer parte de uma estrutura maior (ou molécula transportadora) compreendendo glicoconjugados subsequentes que compreendem resíduos de fucose, ou outros compostos tais como manose em qualquer configuração. Um derivado do referido glicoconjugado que compreende um resíduo de fucose compreende a mesma atividade de ligação da lectina de tipo C em tipo mas não necessariamente em quantidade. Um derivado pode ser gerado através da modificação do resíduo

de fucose. Tais modificações podem ser geradas de várias maneiras. Preferencialmente, a referida fucose é uma fucose terminal, isto é, ligada via apenas uma ligação $\alpha 1,3$ ou $\alpha 1,4$ a outra molécula ou fucose. Os exemplos preferidos de glicoconjugados que compreendem um resíduo de fucose são os antigénios dos grupos sanguíneos de Lewis Le^x , Le^y , Le^a , Le^b e/ou LDNF. Diferentes modificações têm diferentes efeitos nas propriedades de ligação de lectinas. A sialilação de Le^x (produzindo sialil- Le^x , um ligando de L-, E- e P-selectina) anula completamente o reconhecimento pela DC-SIGN, indicando que a DC-SIGN tem uma especificidade de hidrato de carbono que é distinta daquela das selectinas que medeiam a circulação de leucócitos. A sulfatação reduz a afinidade de ligação da DC-SIGN ao Le^x , bem como Le^a (Figura 2a). Um derivado de um glicoconjugado que compreende um resíduo de fucose compreende assim uma modificação em que a referida modificação permite ligação do referido glicoconjugado à referida lectina de tipo C. Os glicoconjugados que compreendem múltiplos resíduos de fucose na configuração de um antigénio de grupo sanguíneo de Lewis têm tipicamente uma afinidade de ligação mais alta do que um glicoconjugado que compreende um único resíduo de fucose.

Um glicoconjugado pode ser mono- ou polivalente para os respetivos resíduos de fucose. Um glicoconjugado polivalente compreende pelo menos duas antenas separadas em que pelo menos duas das referidas antenas compreendem os referidos resíduos. Um glicoconjugado polivalente preferido compreende pelo menos duas antenas que têm uma fucose terminal, isto é, ligada via apenas uma ligação $\alpha 1,3$ ou $\alpha 1,4$ ao glicoconjugado ou a outro resíduo de fucose. Um glicoconjugado polivalente preferido compreende pelo menos duas antenas que têm pelo menos dois resíduos de manose na ligação $\alpha 1,2$. Um glicoconjugado polivalente pode

compreender também pelo menos duas antenas que têm uma N-acetilglucosamina terminal, isto é, ligada via apenas uma ligação ao glicoconjugado. Um multímero é preferencialmente um glicoconjugado polivalente.

Uma molécula de ligação pode ser específica para um glicoconjugado monovalente ou um glicoconjugado polivalente. A ligação da molécula de ligação é tipicamente mais forte ao glicoconjugado polivalente.

Tipicamente, a ligação da lectina de tipo C e, mais em particular, a ação subsequente da célula portadora da lectina de tipo C é significativamente maior no caso da ligação de um glicoconjugado polivalente. Isto é particularmente assim para os glicoconjugados que compreendem pelo menos uma extremidade que apresenta um resíduo de N-acetilglucosamina.

As moléculas transportadoras podem compreender ainda uma grande variedade de moléculas diferentes incluindo péptidos, proteínas, lípidos, polissacáridos e também moléculas sintéticas não expressamente aqui mencionadas. A(s) molécula(s) transportadora(s) podem, evidentemente, fazer parte de uma estrutura ainda maior, tal como uma superfície biológica ou artificial, um vírus, uma bactéria ou uma célula eucariótica.

A ligação do ligando à lectina de tipo C pode ser inibida interferindo com o sítio de ligação no ligando, com o sítio de ligação da lectina de tipo C ou ambos. A interferência com o sítio de ligação do ligando pode ser feita utilizando uma molécula de ligação a ligando capaz de se ligar especificamente à parte de ligação à lectina de tipo C do ligando. Isto é preferencialmente feito com uma molécula proteica tal como um anticorpo específico para hidratos de

carbono, preferencialmente específico para um glicoconjugado que compreende pelo menos dois resíduos de manose em ligação $\alpha 1,2$ ou um glicoconjugado que compreende um resíduo de fucose ou um glicoconjugado que compreende pelo menos uma extremidade que apresenta N-acetilglucosamina ou um derivado ou multímero da mesma. A parte experimental descreve exemplos de tais anticorpos. Os exemplos de anticorpos que compreendem uma especificidade para um glicoconjugado que compreende um resíduo de fucose ou um derivado ou multímero do mesmo são SMLDN1.1 ou SMFG4.1, 6H3, Hp151, 4D2, 54,1F6A, NAM61-1A2 ou SMLDN1.1. A molécula de ligação a ligando pode ser também uma lectina de tipo C, preferencialmente um derivado solúvel da mesma, compreendendo especificidade para um glicoconjugado que compreende um resíduo de fucose, um derivado ou multímero do mesmo. Um exemplo de uma lectina de tipo C solúvel da invenção é uma molécula quimérica DC-SIGN-Fc solúvel que compreende os resíduos de aminoácidos 64-404 fundidos na extremidade C-terminal com um fragmento Fc de IgG1 humana como descrito, por exemplo, em Geijtenbeek et al (Geijtenbeek et al 2002, J. Biol. Chem. 277:11314-11320). No entanto, as lectinas de tipo C solúveis compreendendo uma ou mais das especificidades proporcionadas podem ser geradas de várias maneiras (por exemplo, por derivação a partir de DC-SIGNR ou L-SIGN). Agora que a presente divulgação descreve uma molécula quimérica outras podem ser geradas, por exemplo, como descrito em Fawcett J et al (Fawcett J et al 1992, Nature 360:481-4).

Evidentemente, a interferência com o sítio de ligação na lectina de tipo C pode ser também feita de várias maneiras. A interferência com o sítio de ligação na lectina de tipo C pode ser feita utilizando uma molécula de ligação de lectinas de tipo C capaz de se ligar especificamente à parte de ligação a ligando na lectina de tipo C. Isto é

preferencialmente feito com uma molécula proteica tal como um anticorpo específico para a lectina de tipo C ou com um glicoconjugado que compreende um resíduo de fucose ou um derivado ou multímero da mesma, em que o referido glicoconjugado ou ambos podem fazer parte de uma estrutura maior. Evidentemente, a ligação pode ser ainda inibida impedindo estericamente a ligação do ligando à lectina de tipo C. Para isto não é absolutamente necessário que a própria molécula interferente se ligue ao sítio de associação do hidrato de carbono e da lectina de tipo C. A ligação pode também sofrer interferência por impedimento estérico bem sucedido, ligando a molécula interferente na vizinhança do sítio de associação.

O ligando pode ser qualquer tipo de estrutura capaz de se ligar à referida lectina de tipo C. Em geral, isto compreenderá uma molécula proteica ou um hidrato de carbono. O ligando pode ser um anticorpo. É preferido, mas não é rigorosamente necessário, que o ligando compreenda glicanos manosilados tais como componentes da parede celular da Micobactéria ManLAM, ou um derivado de manose, lipofosfoglicano tal como derivado de Leishmania, ou um glicoconjugado que compreende um resíduo de fucose tal como SEA ou CD66 ou um derivado ou multímero do mesmo. O ligando pode ter em vez de, ou além de, um glicoconjugado que compreende uma fucose ou um derivado ou multímero da mesma, glicoconjugados diferentes capazes de se ligarem à mesma à lectina de tipo C.

O ligando compreende preferencialmente um antigénio. Como mencionado acima, o ligando pode compreender um glicoconjugado que compreende um resíduo de fucose. O antigénio compreende, ou não, o referido glicoconjugado. Num ligando preferido o antigénio compreende o referido glicoconjugado. O ligando compreende preferencialmente um

antigénio (tumoral), um agente patogénico e/ou um recetor associado à célula. Um antigénio é aqui utilizado para incluir péptidos ou glicolípidos e seus derivados capazes de serem apresentados no contexto de MHC de classe I ou classe II, ou CD1b. Pelo menos algumas lectinas de tipo C, e particularmente aquelas expressas nas células dendríticas estão envolvidas no processo de captação do antigénio e apresentação do mesmo pelas células apresentadoras de antígenos. Um passo inicial neste processo é a captura do antigénio por essas lectinas. É possível interferir, pelo menos em parte, com este passo inicial no processo de apresentação de antigénio. Considerando a importância da apresentação do antigénio na iniciação e manutenção de respostas imunológicas específicas contra antígenos, é evidente que o método pode ser utilizado favoravelmente para diminuir, pelo menos em parte, a potência de uma resposta imunológica contra o referido antigénio.

O ligando pode compreender um agente patogénico ou uma parte de ligação à lectina de tipo C do mesmo. Verificou-se que muitos agentes patogénicos diferentes compreendem hidratos de carbono capazes de se ligarem a lectinas de tipo C. Em particular, verificou-se que os agentes patogénicos ou partes dos mesmos podem ligar-se às referidas lectinas de tipo C através de um glicoconjugado contendo manose tal como um glicoconjugado que compreende uma fucose ou derivado ou multímero da mesma. Esta ligação facilita, pelo menos em parte, a infeção de um indivíduo pelo referido agente patogénico. A interferência com a ligação do agente patogénico ou parte do mesmo à lectina de tipo C pode assim ajudar, pelo menos em parte, um indivíduo a combater uma infeção pelo agente patogénico e, em certos casos, até mesmo a prevenir o estabelecimento de sintomas clinicamente visíveis da mesma. A última é útil em estratégias de vacinação (passiva ou ativa). O agente

patogénico pode ser um vírus, um fungo, uma (mico)bactéria e/ou um parasita. O agente patogénico pode compreender um glicoconjugado que compreende pelo menos dois resíduos de manose em ligação $\alpha 1,2$ ou um glicoconjugado que compreende um resíduo de fucose ou um glicoconjugado que compreende pelo menos uma extremidade que apresenta N-acetilglucosamina ou um derivado ou multímero da mesma. Os exemplos de agentes patogénicos são o vírus da imunodeficiência humana, uma *helicobacter*, uma *neisseria meningitidis*, uma *leishmania*, uma *schistosoma*, uma *Klebsiella*, um lactobacilo probiótico, vírus da hepatite C, um vírus herpes simplex ou um vírus ébola. A inibição da ligação dos agentes patogénicos especificamente mencionados pode ser conseguida utilizando um glicoconjugado que compreende um resíduo de fucose ou um derivado ou multímero do mesmo. A inibição da ligação é conseguida utilizando um molécula de ligação a ligando (agente patogénico ou parte do mesmo) capaz de se ligar especificamente à parte de ligação à lectina de tipo C do ligando. Isto é preferencialmente feito com uma molécula proteica tal como um anticorpo específico para hidratos de carbono, preferencialmente específica para um hidrato de carbono de manose tal como um glicoconjugado que compreende um resíduo de fucose ou um derivado ou multímero do mesmo. A parte experimental descreve exemplos de tais anticorpos. A molécula de ligação a ligando pode ser também uma lectina de tipo C, preferencialmente um derivado solúvel da mesma, compreendendo especificidade para um hidrato de carbono manose tal como um glicoconjugado que compreende uma fucose ou um derivado ou multímero da mesma. Um exemplo de uma lectina de tipo C solúvel é uma DC-SIGN-Fc solúvel como mencionada acima. Deste modo, a infeção de um indivíduo pelos referidos agentes patogénicos pode ser, pelo menos em parte, prevenida ou tratada administrando ao referido indivíduo um hidrato de carbono manose, tal como um

glicoconjugado que compreende um resíduo de fucose, um derivado ou multímero do mesmo. De igual modo, uma molécula de ligação a ligando é administrada ao referido indivíduo. Esta pode ser também utilizada para inibir, pelo menos em parte, a ligação do agente patogénico a uma célula que expressa lectinas de tipo C, inibindo desse modo, pelo menos em parte, a contaminação ou disseminação do agente patogénico no corpo de um doente, inibindo ainda a maturação de DC e a adesão celular, como é também descrito abaixo.

As lectinas de tipo C não só reconhecem perfis de hidratos de carbono em agentes patogénicos mas também interagem com auto-glicoproteínas para mediar processos celulares tais como diferenciação e migração. Por conseguinte, um método pode ser também utilizado para interferir com a interação com uma ou mais auto-glicoproteínas e ser, desse modo, utilizado para inibir, pelo menos em parte, os processos celulares em que estão envolvidas as mencionadas lectinas de tipo C. Isto pode ser feito proporcionando as estruturas de hidratos de carbono como aqui descritas (isto é, glicoconjugado contendo manose, tal como um glicoconjugado que compreende um resíduo de fucose ou derivado ou multímero da mesma). Preferencialmente, isto é conseguido utilizando uma molécula de ligação a ligando. Assim, o método é utilizado para inibir, pelo menos em parte, a ligação da referida lectina de tipo C a uma auto-glicoproteína preferencialmente um recetor presente na membrana externa de uma célula. Preferencialmente o referido recetor compreende ICAM-2, ICAM-3, CD11b, CD166 ou CD66 ou uma parte funcional, derivado e/ou análogo do mesmo. Os CD166 e CD66 estão presentes num subconjunto de células NK e granulócitos. Dentro do subconjunto de variantes de CD66, o recetor compreende preferencialmente CD66a e/ou CD66e. Assim, a interação destas células com uma

célula que compreende uma lectina de tipo C mencionado pode ser, pelo menos em parte, inibida utilizando um parceiro de ligação específico para uma lectina de tipo C mencionada acima. Assim, a interação de preferencialmente células dendríticas e o referido subconjunto de células NK e granulócitos pode ser sujeita a interferência. Através desta interação é possível modificar uma resposta imunológica. Por exemplo, inibindo, pelo menos em parte, a ligação de um granulócito a uma célula dendrítica, através do fornecimento de lectina de tipo C, é possível inibir, pelo menos em parte, a montagem de uma resposta imunológica eficaz contra antígenos realizada pelos granulócitos. Por outro lado, é possível aumentar ou induzir uma resposta imunológica específica contra o antígeno eficaz proporcionando a célula apresentadora de antígenos com um ligando que compreende o referido antígeno e um glicoconjugado que compreende pelo menos dois resíduos de manose, um resíduo de fucose e/ou uma extremidade que apresenta N-acetilglucosamina. Preferencialmente, a referida lectina de tipo C compreende DC-SIGN. Como parceiro de ligação específico da referida lectina de tipo C pode ser vantajosamente utilizado um glicoconjugado contendo manose, tal como um glicoconjugado que compreende um resíduo de fucose ou um derivado ou multímero do mesmo.

A invenção refere-se assim à utilização de um glicoconjugado que compreende um antígeno tumoral e um antígeno Lewis X não sialilado capaz de se ligar a DC-SIGN numa célula apresentadora de antígenos para a preparação de uma composição para estimular uma resposta imunológica contra o antígeno tumoral num indivíduo. Numa forma de realização preferida, o antígeno tumoral é um péptido ou glicolípido capaz de ser apresentado no contexto de MHC de classe I ou classe II ou C1 b.

Por outras palavras, a invenção refere-se a uma composição para ser utilizada na estimulação de uma resposta imunológica contra um antígeno tumoral num indivíduo, em que a referida composição compreende um glicoconjugado do antígeno tumoral e um antígeno Lewis X não sialilado capaz de se ligar a DC-SIGN numa célula apresentadora de antígenos. Numa forma de realização preferida, o antígeno tumoral é um péptido ou glicolípido capaz de ser apresentado no contexto de MHC de classe I ou classe II ou Clb.

A WO 97/27872 descreve que um antígeno que compreende o antígeno Lewis X tem um efeito estimulador sobre a resposta imunológica de ratos infetados com *S. mansoni*. A WO 97/27872 refere-se a um método para modular uma resposta imunológica. O método compreende colocar em contacto uma célula imunitária com uma forma estimuladora ou inibidora de um antígeno de Lewis. O efeito desta colocação em contacto é que a célula imunitária produz moléculas imunoestimulantes que melhoram uma resposta imunológica. A WO 97/27872 detalha a estimulação da produção de IL-10 por esplenócitos em ratos infetados por *S. mansoni*. Mais em particular, a WO97/27872 descreve conjugados entre LNFP-III (compreendendo Lewis X) e albumina de soro humano (HSA). Estes conjugados foram testados quanto à sua aptidão para estimular PBMCs de humanos que sofrem de cancro do pulmão e cólon. Deste modo, D5 ensina que o antígeno Lewis X é para ser conjugado com HSA, a qual não é um antígeno tumoral.

A interação celular de DC com granulócitos ou células NK é essencial na resposta imunológica inata. Em particular, os granulócitos estão envolvidos no início da ingestão de agentes patogénicos e podem atrair e estimular as DC para participar no reconhecimento do agente patogénico e apresentação às células T. Em contrapartida, as células NK

são bem conhecidas por estarem envolvidas na morte de células infectadas. As células NK podem matar ou ativar as DC que permitem a lise das DC capturadas pelo agente patogénico ou a maturação das DC capturadas pelo agente patogénico para melhorar a estimulação de células T e a resposta imunológica. A interação celular dos granulócitos e células NK com as DC é para melhorar a imunidade contra os agentes patogénicos ou eliminar DC infectadas pelo agente patogénico.

Esta descrição também proporciona um método para inibir, pelo menos em parte, a maturação ou ativação de uma célula apresentadora de antígenos compreendendo proporcionar a referida célula apresentadora de antígenos com um glicoconjugado de ligação de DC-SIGN que compreende, um resíduo de fucose. Utilizando esta técnica é possível, por exemplo, diminuir uma resposta imunológica. É ainda possível induzir tolerância a antígenos através deste método, por exemplo pode proporcionar-se o antígeno em conjunto com o glicoconjugado. No caso da célula apresentadora de antígeno ser ativada através de uma via do recetor de tipo Toll, o equilíbrio entre o nível de ativação/inibição determina a maturação ou ativação da célula apresentadora de antígenos. Quando a via de TLR é fortemente ativada ao mesmo tempo que a via da lectina de tipo C não é, o equilíbrio é deslocado para a ativação da célula apresentadora de antígenos enquanto na situação inversa o equilíbrio é deslocado para a tolerização e inibição da maturação ou ativação.

O vírus da imunodeficiência humana liga-se à DC-SIGN através de um glicoconjugado possuindo pelo menos dois resíduos de manose. A *helicobacter* e, em particular, a *helicobacter pylori* liga-se à DC-SIGN através de um glicoconjugado possuindo um antígeno de Lewis^x. A

Neisseria meningitidis liga-se à DC-SIGN através de um glicoconjugado possuindo um resíduo de N-acetilglucosamina. A *Leishmania mexicana* liga-se à DC-SIGN através de um glicoconjugado possuindo pelo menos dois resíduos de manose. A *Schistosoma mansoni* liga-se à DC-SIGN através de um glicoconjugado possuindo um antigénio de Lewis. A *Klebsiella pneumoniae* liga-se à DC-SIGN através de um glicoconjugado possuindo pelo menos dois resíduos de manose. O vírus da hepatite C liga-se à DC-SIGN através de um glicoconjugado possuindo pelo menos dois resíduos de manose. O vírus herpes simplex liga-se à DC-SIGN através de um glicoconjugado possuindo pelo menos dois resíduos de manose. O vírus ébola liga-se à DC-SIGN através de um glicoconjugado possuindo pelo menos dois resíduos de manose.

Assim, para alterar a resposta imunológica num corpo contra os agentes patogénicos mencionados, uma molécula de ligação inibe preferencialmente, pelo menos em parte, a ligação dos respetivos glicoconjugados à lectina de tipo C.

As DC imaturas são altamente eficazes na captura e processamento de antigénio, enquanto as DC maduras são especializadas na ativação das células T naíf necessárias para as respostas imunológicas celulares. As DC imaturas amadurecem em resposta a sinais de 'perigo' específicos tais como componentes bacterianos (LPS) ou citocinas inflamatórias (TNF α , PGE $_2$). Verificou-se que um glicoconjugado que compreende uma manose, um resíduo de fucose ou um derivado, uma combinação ou multímero do mesmo, não induz a maturação das DC. Em contraste com o LPS que desencadeia o TLR4, não foi observada expressão regulada positivamente dos marcadores de ativação CD80, CD83, CD86 ou HLA-DR. No entanto, quando foi estudada a

maturação de células dendríticas imaturas na situação em que as células são também ativadas através de uma via do recetor de tipo Toll, foi observada uma forte inibição da maturação induzida pelo recetor de tipo Toll, particularmente quando as células dendríticas foram expostas ao ManLAM. Assim, uma tal inibição diminui a resposta das células dendríticas estimuladas pela via do recetor de tipo Toll e, desse modo, a capacidade de um indivíduo para lidar com agentes patogénicos que são combatidos através da ativação da via do recetor de tipo Toll. Em particular, esta redução da ativação de DC pode ser, pelo menos em parte, prevenida inibindo, pelo menos em parte, a ligação de um glicoconjugado que compreende pelo menos dois resíduos de manose em ligação $\alpha 1,2$, mas também analogamente fazendo atuar glicoconjugados para lectinas de tipo C sobre as células dendríticas imaturas. Assim, esta descrição proporciona um método para determinar se um composto é capaz de modular um estado de ativação de uma célula dendrítica compreendendo proporcionar a referida célula dendrítica com um composto capaz de se ligar especificamente a uma lectina de tipo C e determinar se é modulada uma via de sinalização do recetor de tipo Toll na referida célula dendrítica. É ainda proporcionado um método para modular a atividade de uma via de sinalização do recetor de tipo Toll numa célula, em que a referida célula compreende um recetor de tipo Toll e uma lectina de tipo C, em que o referido método compreende pôr em contacto a referida célula com uma molécula de ligação de lectinas de tipo C isolada e/ou recombinante. Preferencialmente, a referida molécula de ligação de tipo C compreende um glicoconjugado que compreende uma manose, um resíduo de fucose ou um derivado, uma combinação ou multímero do mesmo. A atividade pode ser modulada positivamente prevenindo, pelo menos em parte, a estimulação simultânea da lectina de tipo C com um glicoconjugado que compreende

pelo menos dois resíduos de manose em ligação $\alpha 1,2$ ou composto que atua de forma análoga. A atividade é modulada negativamente proporcionando simultaneamente o referido glicoconjugado que compreende pelo menos dois resíduos de manose em ligação $\alpha 1,2$ ou composto que atua de forma análoga. Os compostos que atuam de forma análoga compreendem a mesma capacidade de interferência na sinalização pelo recetor de tipo Toll que o ManLAM em tipo, não necessariamente em quantidade. Um composto que atua de forma análoga preferido compreende um glicoconjugado que compreende um resíduo de fucose ou um derivado ou multímero do mesmo. Um outro nível de controlo é possível utilizando compostos de ligação de lectinas de tipo C que interferem, pelo menos em parte, com a capacidade de ligação de um glicoconjugado que compreende pelo menos dois resíduos de manose em ligação $\alpha 1,2$ ou um composto que atua de forma análoga. Desta maneira, a atividade da via do recetor de tipo Toll pode ser modulada positivamente (na presença do ligando do recetor de tipo Toll apropriado) mesmo na presença de um glicoconjugado que compreende pelo menos dois resíduos de manose em ligação $\alpha 1,2$ ou composto que atua de forma análoga. A última característica é importante nos casos em que o sistema imunitário tem problemas em combater uma infeção através da via do recetor de tipo Toll, em particular quando a referida infeção é acompanhada da secreção de um glicoconjugado que compreende pelo menos dois resíduos de manose em ligação $\alpha 1,2$ ou compostos que atuam de forma análoga, tal como as micobactérias e, em particular, *M. tuberculosis* e *M. Bovis*. Assim, esta divulgação proporciona ainda um método para estimular a maturação de uma célula dendrítica que é posta em contacto com um ligando do recetor de tipo Toll e um glicoconjugado que compreende pelo menos dois resíduos de manose em ligação $\alpha 1,2$ ou composto que atua de forma análoga, em que o referido método compreende proporcionar a referida célula

dendrítica com uma molécula de ligação de lectinas de tipo C capaz de bloquear a ligação do referido glicoconjugado à referida lectina de tipo C. As moléculas de ligação de lectinas de tipo C capazes de inibir, pelo menos em parte, a ligação de um glicoconjugado que compreende pelo menos dois resíduos de manose em ligação $\alpha 1,2$ ou compostos que atuam de forma análoga são, por exemplo, os anticorpos de ligação de lectinas de tipo C ou uma parte, derivado e/ou análogo funcional dos mesmos, com uma especificidade de ligação que bloqueia ou abrange o sítio de ligação de ManLAM na referida lectina de tipo C. De um modo preferido, a referida lectina de tipo C compreende DC-SIGN. O referido anticorpo pode ser um anticorpo específico contra DC-SIGN. Um exemplo adequado de um tal anticorpo é AZN-D1, AZN-D2 ou AZN-D3 ou um análogo humano ou humanizado compreendendo a mesma especificidade de ligação em tipo, não necessariamente em quantidade. Esta divulgação também proporciona um método para estimular a maturação de uma célula dendrítica que é posta em contacto com um ligando do recetor de tipo Toll e um glicoconjugado que compreende pelo menos dois resíduos de manose em ligação $\alpha 1,2$ ou composto que atua de forma análoga, em que o referido método compreende proporcionar a referida célula dendrítica com uma molécula de ligação a ligando que impede, desse modo, pelo menos em parte, a ligação do referido glicoconjugado que compreende pelo menos dois resíduos de manose em ligação $\alpha 1,2$, ou composto que atua de forma análoga, à célula dendrítica.

É também aqui proporcionada a utilização de um glicoconjugado que compreende um resíduo de fucose ou um derivado ou multímero do mesmo, uma molécula de ligação a ligando e/ou uma molécula de ligação de lectinas de tipo C para a preparação de um medicamento. Tais medicamentos podem ser utilizados para o tratamento de uma doença

associada ao sistema imunitário ou o tratamento de uma doença adquirida. Preferencialmente, a referida doença adquirida compreende uma infecção pelo vírus da imunodeficiência humana, uma *Helicobacter*, uma *neisseria Meningitidis*, uma *leishmania*, uma *schistosoma*, uma *Klebsiella*, um lactobacilo probiótico, vírus da hepatite C, um vírus herpes simplex ou um vírus ébola.

Considerando o papel natural das lectinas de tipo C nas células apresentadoras de antígenos, está dentro do âmbito da presente divulgação estimular as respostas imunológicas num indivíduo proporcionando o antígeno através de um recetor de lectinas de tipo C na célula apresentadora de antígenos. Evidentemente, isto pode ser conseguido quando o antígeno compreende um glicoconjugado que compreende um resíduo de fucose ou derivado ou multímero do mesmo. Neste método é preferido que a ativação simultânea da via de sinalização do recetor de tipo Toll seja, pelo menos em parte, impedida. Assim, é proporcionado um glicoconjugado que compreende um antígeno e um glicoconjugado que compreende um resíduo de fucose ou um derivado ou multímero do mesmo para ser utilizado na preparação de uma vacina. A vacina pode ser profilática ou curativa. O antígeno pode ser derivado de qualquer fonte desde que seja capaz de ser apresentado através do complexo principal de histocompatibilidade I, complexo II ou Clb. Numa forma de realização preferida, o referido antígeno compreende um antígeno tumoral. A presença dos hidratos de carbono mencionados nas células tumorais facilita a capture do antígeno pelas DC para melhorar a apresentação do antígeno e, como consequência, a ativação imunitária. Por outro lado, a resposta imunológica contra um antígeno tumoral que carece dos hidratos de carbono mencionados pode ser significativamente estimulada proporcionando o antígeno com um ou mais dos hidratos de carbono

mencionados estimulando assim a captação pelas DC e, desse modo, a resposta imunológica contra o antigénio. Este aspeto é útil na preparação de vacinas.

Foi demonstrado que a DC-SIGN tem uma especificidade de hidratos de carbono para hidratos de carbono que contêm manose, antigénios de Lewis e estruturas que contêm GlcNAc (Figura 33, 34, 63-66). Nós demonstrámos que a especificidade de hidratos de carbono da L-SIGN é diferente, uma vez que não reconhece estruturas de hidratos de carbono de antigénios de Lewis enquanto reconhece estruturas com teores elevados de manose (Figura 33 e 34). O homólogo murídeo mSIGNR1 reconhece de forma semelhante à DC-SIGN antigénios com teores elevados de manose e de Lewis, mas tem também especificidade para antigénios de Lewis sialilados em contraste com DC-SIGN e L-SIGN (Figura 33 e 34).

DC-SIGN é uma lectina de tipo C em particular altamente expressa em Células dendríticas. A sua função consiste em reconhecer o antigénio e em processá-lo e apresentá-lo muito eficientemente em moléculas de classe I e II do MHC.

Julga-se desde há longa data que a DC-SIGN é um recetor de reconhecimento de agentes patogénicos que reconhece os agentes patogénicos para ativar o sistema imunitário, mas como parece agora, a longa lista de agentes patogénicos que visam a DC-SIGN persistem todos e escapam à imunidade através de diferentes mecanismos. Nós temos agora quatro exemplos de agentes patogénicos que visam a DC-SIGN para sobreviver no hospedeiro.

1. O HIV-1 e o HCV visam a DC-SIGN para 'se esconder' dentro das DC e escapar ao encaminhamento intracelular para o compartimento lisossómico.

2. A secreção de ManLam por micobactérias visa a DC-SIGN para induzir a modulação negativa da maturação das DC induzida pelos TLR, e indução de IL-10.

3. O agente patogénico gástrico humano *Helicobacter pylori* persiste: variantes da fase de lipopolissacárido modulam o equilíbrio Th1/Th2 através da interação com a lectina DC-SIGN da célula dendrítica.

4. Os lactobacilos visam a DC-SIGN nas DC e induzem células T reguladoras, a inibição do reconhecimento de lactobacilos pela DC-SIGN reduz o estado regulador das células T.

A DC-SIGN é assim um recetor que 'normalmente' reconhece o auto-antigénio a tolerar (Annual Review Immunology, 2004). Nós demonstrámos aqui que, na realidade, o direccionamento dos lactobacilos para a DC-SIGN pode induzir células T reguladoras. Além disso, parece que a DC-SIGN pode reconhecer também o antigénio tumoral CEA (CD66e) em particular Lewis X e Y. Estes antigénios tumorais podem ser segregados e suprimem a ativação das DC de uma maneira semelhante à ManLam das micobactérias da tuberculose. A interação das DC com granulócitos é elucidada pelo facto de a DC-SIGN reconhecer os CD66a e CD11b nos granulócitos. Em particular, é reconhecido o antigénio Lewis X nestas moléculas. Dessa maneira, a DC-SIGN atua como um recetor de adesão celular que medeia as interações celulares de granulócitos com as DC. Esta função adesiva celular entre granulócitos e células dendríticas nunca foi descrita mas é provável que a interação granulócitos-DC seja essencial para estabelecer uma ponte entre a resposta imunológica inata e a resposta imunológica adaptativa de tal forma que o granulócito passa os agentes infecciosos para a montagem pelas DC de uma resposta imunológica adequada. Em particular, o granulócito ativa e amadurece as DC, induzindo a regulação positiva de citocinas e moléculas co-estimuladoras que são necessárias para a migração das DC e

iniciação da resposta imunológica adaptativa. A interação das DC com os granulócitos é também observada in vivo no caso da doença de Crohns. Um novo agente patogénico que interage com a DC-SIGN nas DC é a *Neisseria Meningitidis*. As variantes de estirpe demonstram que, em particular, um mutante de estirpe IgtB interage que contém um resíduo GlcNAc na posição final. Outras experiências (Figura 66) demonstram que a DC-SIGN também reconhece a GlcNAc.

Esta divulgação também proporciona a utilização de uma molécula de ligação a ligando e/ou uma molécula de ligação de lectinas de tipo C para a preparação de uma vacina. Uma diminuição do sistema imunitário devido ao efeito de um glicoconjugado que compreende pelo menos dois resíduos de manose em ligação $\alpha 1,2$ ou compostos que atuam de forma análoga é reduzida proporcionando um glicoconjugado ou anticorpo capaz de inibir, pelo menos em parte, a ligação de um glicoconjugado que compreende pelo menos dois resíduos de manose em ligação $\alpha 1,2$, ou composto que atua de forma análoga, ao seu recetor de lectinas de tipo C. Preferencialmente, o anticorpo compreende SMLDN1.1, SMFG4.1, 6H3 ou SMLDN1.1. Assim, o antigénio presente na referida vacina ou proporcionado separadamente é mais eficaz na estimulação ou reforço de uma resposta imunológica na presença de um glicoconjugado que compreende pelo menos dois resíduos de manose em ligação $\alpha 1,2$ ou composto que atua de forma análoga. Isto é particularmente importante em doentes que sofrem de uma infeção micobacteriana, tal como, mas não se limitando a, *M. tuberculosis* ou *M. bovis*. Preferencialmente, a referida vacina é utilizada para estimular uma resposta imunológica específica contra o antigénio no referido indivíduo. Numa forma de realização preferida, o medicamento ou vacina é utilizado para o tratamento de um indivíduo que sofre de um cancro.

Como aqui utilizado o termo "anticorpo" refere-se a anticorpos derivados de humanos ou outros animais. O anticorpo é preferencialmente produzido fora do corpo. O anticorpo pode ser também gerado ou selecionado utilizando sistemas artificiais tais como a seleção por apresentação em fagos. Por conseguinte, um anticorpo que não tem um homólogo natural está também abrangido pelo termo. Anticorpos como aqui utilizados incluem também os seus fragmentos capazes de se ligarem ao mesmo alvo, tais como os fragmentos FAB ou até mesmo partes mais pequenas. A parte de ligação ao antigénio de um anticorpo pode ser também enxertada noutro tipo de molécula para dotar essa molécula com uma especificidade de ligação. A modificação do anticorpo para incluir versões humanas ou humanizadas do mesmo com a mesma especificidade de ligação em tipo, não necessariamente em quantidade, é, evidentemente, também possível. Estão também incluídos fragmentos de cadeia simples e variantes dos mesmos.

Como aqui utilizado, o termo molécula proteica refere-se a um péptido, um polipéptido, proteína e semelhantes com ou sem modificações. Tais modificações podem ser sintéticas e/ou proporcionadas por um sistema biológico. Incluindo o último, por exemplo, a modificação pós-tradução tal como a glicosilação.

Nos casos em que a invenção é descrita para ser utilizada em humanos, a invenção é também funcional noutros animais, por exemplo animais de exploração pecuária e animais de estimação. Portanto, estas utilizações médicas e em vacinas fazem também parte da invenção.

Breve descrição dos desenhos

Figura 1. Le^x - neoglicoconjugados que se ligam com alta afinidade à DC-SIGN. a. Diagrama esquemático das estruturas covalentes das cadeias de glicano de glicoconjugados sintéticos utilizados no ensaio de ligação de DC-SIGN. b e c. Os glicoconjugados foram revestidos e a ligação de DC-SIGN-Fc recombinante foi medida após incubação com Fc de cabra anti-humano marcado com peroxidase. O anticorpo monoclonal anti-DC-SIGN AZN-D1 foi utilizado para bloquear a ligação. c. A titulação dos glicoconjugados revelou que a DC-SIGN se liga com alta afinidade aos glicoconjugados de Le^x, Le^y, Le^a, Le^b ou LDNF, e alfa 1,3, alfa 1,6 manotriose, sulfo-Lea, enquanto tem uma menor afinidade de ligação para a alfa-manose, e alfa-L-fucose, e sialil-Le^x.

Figura 2. A DC-SIGN celular apresenta uma especificidade de ligação semelhante à DC-SIGN-Fc solúvel. A ligação de transfetantes K562 que expressam DC-SIGN e DC derivados de monócitos imaturos com esférulas fluorescentes revestidas com glicoconjugado foi medida através de análise por varrimento FAC. A ligação foi inibida pelo anticorpo monoclonal anti-DC-SIGN, AZN-D2. É mostrada uma experiência representativa de três. O DP é inferior a 2 %. Embutido: Fotografia de esférulas fluorescentes acopladas a Le^x que se ligam a DC que expressam DC-SIGN.

Figura 3. DC-SIGN liga quatro novos agentes patogénicos

a. Agentes patogénicos que consistem de *Helicobacter pylori* e *Schistosoma mansoni* ricas em Le^x, e lipoarabinomanano revestido com manose (manLAM) de *Mycobacterium tuberculosis* e lipofosfoglicano revestido com manose de *Leishmania mexicana*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* foram

revestidos e a ligação de DC-SIGN-Fc recombinante foi medida com Fc de cabra anti-humano marcado com peroxidase.

b. A DC-SIGN pode ligar o LPS de *Klebsiella* Len1 que contém extremidade de manose, mas não liga o LPS de *Klebsiella* Len111 que carece de uma extremidade de manose indicando que as estirpes que contêm os hidratos de carbono de ligação a DC-SIGN interagem com a DC-SIGN em Células dendríticas ou transfetantes de DC-SIGN.

Figura 4. As DC interagem fortemente com o LPS de *H. pylori* através da DC-SIGN. O LPS biotinilado (estirpes 11637 e M1019) foi revestido sobre esférulas de estreptavidina e a adesão às DC foi determinada com o ensaio de adesão de esférulas fluorescentes. A especificidade foi determinada utilizando anticorpos contra DC-SIGN e o recetor de manose. Além do mais, a adesão foi determinada na presença de manano e EGTA.

Figura 5. A DC-SIGN internaliza rapidamente os glicanos Le^x para os compartimentos lisossômicos. Le^x-PAA biotinilados sintéticos foram adicionados a células K562 que expressam DC-SIGN ou DC derivadas de monócitos imaturos para incubação de 30 min a 37 °C. As células foram reveladas com anti-CD107a (LAMP-1, verde) como um marcador lisossômico e avidina-Alexa 594 para localização de Le^x após permeabilização das células. A colocalização de LAMP-1 e Le^x resulta numa revelação amarela.

Figura 6. A DC-SIGN liga especificamente ManLAM, um componente das paredes celulares de *M. tuberculosis*.

a) A DC-SIGN interage com várias estirpes de micobactérias. A ligação de DC-SIGN-Fc a micobactérias (5×10^5 bactérias) foi determinada por um ELISA específico para Fc. A especificidade foi determinada medindo a ligação na

presença de anticorpos bloqueadores específicos para DC-SIGN (AZN-D1 ou AZN-D3) e manano. A EGTA foi utilizada para determinar a dependência de cálcio da ligação mediada por DC-SIGN-Fc. A ligação de ICAM-3-Fc a micobactérias foi também medida para excluir a ligação não específica pelo domínio Fc. Desvio padrão < 0,02 OD450. É mostrada uma experiência representativa de três. A ligação de *Mycobacterium Smegmatis* que carece da estrutura de ManLAM não interage com DC-SIGN (dados não apresentados).

b) A estrutura esquemática de ManLAM. O lipoarabinomanano (LAM) de *M. tuberculosis* consiste numa âncora de glicosilfosfatidilo (GPI), um núcleo oligossacárido rico em manose e um polímero arabinosídeo ramificado que termina em extremidades de manose (n=0-3). AraLAM tem uma estrutura semelhante mas não contém a extremidade de manose (ref).

c) O lipoarabinomanano manosilado ManLAM, em contraste com o AraLAM não manosilado, é especificamente ligado pela DC-SIGN. O anticorpo anti-DC-SIGN AZN-D1 foi utilizado para determinar a especificidade. O ensaio de ligação de DC-SIGN-Fc foi realizado como descrito na Figura 1a. Desvio padrão < 0,02 OD450. É mostrada uma experiência representativa de três.

d) DC-SIGN não interage com AraLAM. O ensaio de ligação de DC-SIGN-Fc foi realizado como descrito na Figura 1a. É mostrada uma experiência representativa de três.

Figura 7. A DC-SIGN celular liga-se fortemente a micobactérias viáveis e ao componente micobacteriano ManLAM através do seu sítio de ligação primário.

a) Transfetantes de K562-DC-SIGN expressam níveis altos de DC-SIGN mas carecem da expressão dos outros recetores de ManLAM descritos MR, CD11b e CD11c. Os transfetantes foram gerados como anteriormente descrito?. Os histogramas vazios

representam os controles de isotipo, e os histogramas a cheio indicam a revelação do anticorpo específico.

b) DC-SIGN, expressa pelos transfetantes de K562, liga-se fortemente ao BCG de *M. bovis* intacto e ao componente micobacteriano ManLAM mas não ao AraLAM. A adesão de células aos glicanos LAM foi determinada utilizando o ensaio de adesão de esférulas fluorescentes. A ligação a micobactérias viáveis foi determinada medindo a ligação de transfetantes de K562 a micobactérias conjugadas com FITC (MOI 20) utilizando citometria de fluxo. A especificidade foi determinada medindo a ligação na presença de anticorpos bloqueadores contra DC-SIGN. O desvio padrão para o ensaio de adesão de esférulas fluorescentes e o ensaio de ligação de micobactérias foi < 5% e <2%, respectivamente. É mostrada uma experiência representativa de três.

c) O resíduo de aminoácido Val351 não é essencial para a interação de DC-SIGN com BCG de *M. bovis* e ManLAM, semelhante ao gp120 de HIV-1, enquanto é essencial para a ligação de ICAM-3. A ligação ao mutante de DC-SIGN V351G expresso pelas células K562 foi medida como se descreve na Figura 2. A especificidade foi determinada medindo a ligação na presença de anticorpos bloqueadores contra DC-SIGN, manano ou EGTA. Desvio padrão <5% (ensaio de adesão de esférulas fluorescentes) e <2% (ensaio de ligação de micobactérias). É mostrada uma experiência representativa de três.

d) A ligação de DC-SIGN aos componentes diferenciais de ManLAM. As neoglicoproteínas Ara-Man, Ara-Man2, Ara-Man3 ou Ara6 foram revestidas sobre esférulas fluorescentes e adicionadas a células que expressam DC-SIGN. A DC-SIGN liga preferencialmente as Man2 e Man3 como se demonstra pela ligação forte que pode ser bloqueada pela adição de anticorpos anti-DC-SIGN (AZN-D1).

Figura 8. A DC-SIGN é um recetor importante para ManLAM e micobactérias em DC.

a) As DC imaturas expressam níveis altos de DC-SIGN e os outros recetores de LAM descritos MR, CD11b e CD11c. Os histogramas vazios representam controlo de isotipo e os histogramas a cheio indicam revelação do anticorpo específico.

b) As DC imaturas ligam-se fortemente ao ManLAM via DC-SIGN. A ligação foi determinada utilizando o ensaio de adesão de esférulas fluorescentes. A especificidade foi determinada medindo a ligação na presença de manano, EGTA ou anticorpos bloqueadores contra DC-SIGN (AZN-D2), MR (Clone 19), CD11b (bear-1) ou CD11c (SHCL3). Desvio padrão <5%. É mostrada uma experiência representativa de três.

c) A DC-SIGN medeia a captura de BCG de *M. bovis* pelas DC imaturas. A ligação foi determinada por citometria de fluxo utilizando micobactérias conjugadas com FITC. A especificidade foi determinada medindo a ligação na presença de anticorpos contra DC-SIGN (AZN-D1, AZN-D2 e AZN-D3), MR (Clone 19), CD11b (bear-1) e CD11c (SHCL3). A ligação foi também medida na presença dos inibidores das lectinas de tipo C manano e EGTA, enquanto um ligando de MR conhecido, manose-BSA, foi utilizado para determinar a contribuição do recetor de MR. Desvio padrão <2%. É mostrada uma experiência representativa de três.

d) A DC-SIGN medeia a captura e internalização de BCG de *M. bovis* pelas células K562. Os transfectantes de K562 foram incubados com BCG de *M. bovis* conjugada com FITC (MOI 20). As células foram lavadas e o FITC superficial foi desativado por exposição a azul de tripano. A fagocitose foi determinada comparando a marcação com FITC antes e após desativação utilizando citometria de fluxo. As bactérias ligadas à superfície são representadas por barras vazias,

as internalizadas por barras a cheio. Desvio padrão <4%. É mostrada uma experiência representativa de três.

e) As DC imaturas fagocitam rapidamente as micobactérias através da DC-SIGN. A internalização foi determinada como descrito na Figura 3b. As bactérias ligadas à superfície são representadas por barras vazias, as internalizadas por barras a cheio. Desvio padrão <5%. É mostrada uma experiência representativa de três.

Figura 9. A DC-SIGN medeia a internalização de micobactérias capturadas e ManLAM.

a) A BCG de *M. bovis* e o ManLAM são internalizados pela DC-SIGN em DC imaturas e direcionadas para os lisossomas. O destino das micobactérias capturadas foi seguido analisando as DC imaturas pulsadas com BCG de *M. bovis* conjugada com FITC (MOI 20) durante 2 horas utilizando microscopia de imunofluorescência (ampliação 200x). O ManLAM foi seguido incubando as DC com ManLAM (10 mg/mL) durante 1 hora. DC-SIGN, ManLAM e CD207a/Lamp-1 foram reveladas com AZN-D1, F30.5 e H4A3, respectivamente. É mostrada uma experiência representativa de três.

b) ManLAM induz a regulação negativa de DC-SIGN, mas não de MR, CD11b e CD11c. As DC imaturas foram incubadas com 15 mg/mL de ManLAM ou AraLAM durante 18 horas e, em seguida, a expressão de DC-SIGN foi determinada por citometria de fluxo. É mostrada uma experiência representativa de três.

Figura 10. As micobactérias induzem a produção de IL-10 pelas DC através do ManLAM e infecção direta.

a) O ManLAM induz a produção de IL-10 de DC maturadas com LPS. As DC imaturas foram incubadas com 15 mg/mL de ManLAM ou AraLAM na presença de LPS (10 ng/mL). A especificidade foi determinada na presença de anticorpos bloqueadores

contra DC-SIGN (AZN-D2; 20 µg/mL). Os sobrenadantes foram colhidos após 18 horas e a produção de IL-10 foi medida por ELISA. Os valores são as médias $\pm$ desvios padrão de determinações em triplicado. É mostrada uma experiência representativa de três.

b) A infecção por BCG de *M. bovis* de DC imaturas induz a produção de IL-10. As DC imaturas foram infetadas com BCG de *M. bovis* (MOI 4) e a experiência foi realizada como descrita na Figura 5a. Os valores são as médias $\pm$ desvios padrão de determinações em triplicado. É mostrada uma experiência representativa de três.

Figura 11. O ManLAM inibe a ativação de DC induzida por LPS através da ligação de DC-SIGN.

a) O ManLAM não induz a ativação de DC imaturas. As DC imaturas foram incubadas com ManLAM, AraLAM ou LPS durante 18 horas, e a ativação foi determinada medindo a expressão de CD80, CD86, CD83 e HLA-DR. As linhas pontilhadas representam controlos de isotipo, as linhas finas indicam níveis de expressão de DC imaturas, e a linha espessa representa DC imaturas que foram tratadas com LPS (10 ng/mL), ManLAM (15 µg/mL) ou AraLAM (15 µg/mL). É mostrada uma experiência representativa de três.

b) A ativação induzida por LPS de DC é bloqueada pelo ManLAM. As DC imaturas foram co-cultivadas com LPS sozinho, ou em conjunto com ManLAM ou AraLAM durante 18 horas. As linhas pontilhadas representam controlos de isotipo. As linhas espessas, e os valores de fluorescência média nos histogramas, representam os níveis de expressão após tratamento com LPS sozinho, ou em associação com ManLAM ou AraLAM. As linhas finas indicam a presença de anticorpos contra DC-SIGN ao longo da incubação. É mostrada uma experiência representativa de três.

Figura 12. A BCG de *M. bovis* induz a maturação e o ManLAM inibe a ativação de DC induzida através da ligação de DC-SIGN.

a) A BCG de *M. bovis* induz a maturação de DC imaturas. As DC imaturas foram incubadas com LPS ou BCG de *M. bovis* viável (MOI 4, 20 e 100) durante 18 horas, e a ativação foi determinada medindo a expressão de CD80, CD86, CD83 e HLA-DR. É representada a intensidade de fluorescência média. É mostrada uma experiência representativa de três.

b) A ativação de DC induzida pela BCG de *M. bovis* é bloqueada pelo ManLAM. As DC imaturas foram infectadas com BCG de *M. bovis* (MOI 4). As células foram pré-incubadas com 15 µg/mL de ManLAM ou AraLAM e a expressão dos marcadores foi medida após 18 horas como descrito na Figura 7a. A especificidade foi determinada pré-incubando células com anticorpos bloqueadores contra DC-SIGN (AZN-D2; 20 µg/mL). É mostrada uma experiência representativa de três.

Figura 13. Estruturas de antígenos de hidratos de carbono de SEA de *S. mansoni*, anticorpos monoclonais (Mabs) que os reconhecem, e reatividade destes Mabs com SEA. A reatividade dos MAb foi medida por ELISA, utilizando SEA revestido a uma concentração de 1 µg/mL. Os anticorpos, incubados a uma concentração de 1 µg/mL apresentaram todos uma forte reação com o SEA.

Figura 14. Interação de SEA com DC humanas imaturas.

a) As DC humanas imaturas foram cultivadas a partir de monócitos na presença de GM-CSF e IL-4. As DC expressam níveis próximos de altos de DC-SIGN, o MR, CD83, CD86, CD80 e HLA-DR como determinado por análise por varrimento de FACS

b) A DC-SIGN, expressada pelas DC imaturas, mostra uma ligação ao SEA semelhante à do gp120 de HIV-1, um ligando anteriormente definido de DC-SIGN. A adesão a SEA e gp120 de HIV-1 foi determinada utilizando o ensaio de adesão de esférulas fluorescentes. O manano e o MAb anti-DC-SIGN AZN-D1 (20 µg/mL), mas não o MAb anti-MR clone 19, bloquearam a adesão de SEA às DC. É mostrada uma experiência representativa de três, utilizando anticorpos anti-LDN para acoplar SEA às esférulas fluorescentes. São obtidos resultados semelhantes utilizando anticorpos anti-LDN-DF (não apresentados).

Figura 15. A ligação de DC-SIGN a SEA de *S. mansoni*. A DC-SIGN liga-se de maneira tão forte ao SEA quanto ao gp120 de HIV-1, como foi determinado por um ensaio baseado em ELISA utilizando DC-SIGN-Fc solúvel. Os SEA foram revestidos a uma concentração de 5 µg/mL e a gp120 de HIV-1 a uma concentração de 1 µg/mL. A especificidade foi determinada medindo a ligação na presença do anticorpo bloqueador anti-DC-SIGN, AZN-D1 (20 µg/mL), ou EDTA (5 mM).

Figura 16. A DC-SIGN liga fortemente o SEA. A ligação de DC-SIGN-Fc solúvel a diferentes concentrações de SEA foi medida por um ELISA anti-IgG-Fc.

Figura 17. A DC-SIGN liga uma subfração de SEA. Os SEA foram separados por eletroforese em gel de SDS-PAGE num gel de poliacrilamida a 12,5%.

- a) gel de poliacrilamida com SEA (15 µg) revelado com prata para detetar todas as proteínas
- b) transferência de Western do gel de poliacrilamida após SDS-PAGE de SEA (2 µg), utilizando DC-SIGN-Fc solúvel para detetar glicoproteínas de ligação de DC-SIGN.

Figura 18. A DC-SIGN liga-se a SEA fucosilado e ao trissacárido α 1,3-fucosilado Le^x

a) Os SEA foram desfucosilados por tratamento com ácido suave ou α 3,4-fucosidase. A ligação de DC-SIGN-Fc solúvel aos SEA desfucosilados (revestidos a 1 μ g/mL) foi medida por um ELISA anti-IgG-Fc. O grau de desfucosilação e a integridade de glicanos não fucosilados após os tratamentos foi estabelecido utilizando diferentes MAbs anti-glicano, e IgM de cabra anti-rato-peroxidase para detecção.

b) Inibição competitiva da ligação de DC-SIGNFc solúvel ao SEA e gp120 de HIV pelos mAbs anti-glicanos em ELISA. Os antígenos revestidos foram pré-incubados com mAbs anti-glicano antes da adição de DC-SIGNFc. A ligação de DC-SIGNFc foi medida por um ELISA anti-IgGFc. Os anticorpos preferencialmente utilizados SMLDN1.1 ou SMFG4.1 (anti-Le^x) ou SMLDN1.1 (anti-LDNF) ou anti-DC-SIGN (AZN-D1, D2, AZN-D3),

c) A DC-SIGN liga-se fortemente a neoglicoproteínas que têm oligossacáridos α 1,3-fucosilados Le^x e LDN-F mas fracamente a neoglicoconjugados que têm uma única fucose a-ligada ou ao LDN-DF. As neoglicoproteínas foram revestidas a uma concentração de 5 μ g/mL. Não foi observada qualquer ligação às neoglicoproteínas que têm Galb1,4GlcNAc ou GalNAcb1,4GlcNAc (LDN) (não apresentado).

Figura 19. A ligação de SEA e Le^x às DC-SIGN e L-SIGN mutantes

a) Alinhamento da sequência de aminoácidos de parte dos CRDs de DC-SIGN (AAK20997) com aquela da lectina de tipo C altamente homóloga L-SIGN (AAK20998). As posições das mutações E324A, E347Q e V351G na DC-SIGN são indicadas por uma seta.

b) A ligação de esférulas revestidas com SEA e Le^x-PAA aos transfetantes de K562 que expressam a DC-SIGN de tipo selvagem e os mutantes de DC-SIGN E324A, E347Q e V351G, foi medido utilizando o ensaio de adesão de esférulas fluorescentes. Para detetar SEA, foram utilizadas esférulas fluorescentes acopladas ao MAb LDN-DF. É mostrada uma experiência representativa de duas.

c) SEA bloqueia a ligação de DC-SIGN, expressa por DC humanas imaturas, a ICAM-3 e gp120 de HIV-1. Em contraste, a RNaseB não bloqueia esta ligação. A adesão de ICAM-3 e gp120 de HIV-1 às DC foi determinada utilizando o ensaio de adesão de esférulas fluorescentes. Os inibidores estavam presentes a uma concentração de 20 µg/mL.

d) A DC-SIGN, expressa por transfetantes de K562, liga-se fortemente aos SEA e gp120 de HIV-1, enquanto a L-SIGN, expressa por transfetantes de K562 apenas reconhece a gp120 de HIV-1. A adesão foi determinada utilizando o ensaio de adesão de esférulas fluorescentes. Para detetar o SEA, foram utilizadas esférulas fluorescentes revestidas com anti-LDN e anti-LDN-DF com resultados semelhantes. É mostrada uma experiência representativa de duas, utilizando esférulas fluorescentes anti-LDN-DF.

e) Os transfetantes de K562 expressam eficientemente as DC-SIGN, L-SIGN e os diferentes DC-SIGNs mutantes, como determinado por análise por varrimento de FACS

Figura 20. Os granulócitos interagem fortemente com esférulas revestidas com DC-SIGN, parcialmente através de ligandos contendo Le^x.

A. Tanto a manose como os epítomos de Lewis-X são altamente expressos em glicanos expressos por granulócitos

B. A DC-SIGN liga-se fortemente aos granulócitos recém-isolados. Os granulócitos recém-isolados são incubados com esférulas fluorescentes revestidas com DC-SIGN-Fc. A adesão

é determinada pelo ensaio de adesão de esférulas fluorescentes. A especificidade é determinada medindo a adesão na presença de manano, EGTA e anticorpos contra DC-SIGN (AZN-D1,D2 ou D3), integrinas b2 (NKI-L19) e Le^x (6H3)

Figura 21. A DC-SIGN-Fc tem uma alta afinidade para granulócitos.

A interação de DC-SIGN com granulócitos é ainda investigada por titulação de DC-SIGN-Fc e determinação da ligação medindo a DC-SIGN-Fc ligada utilizando anticorpos Fc de cabra anti-humanos conjugados com FITC. A interação é bloqueada pelos anticorpos contra DC-SIGN (AZN-D1), e manano e EGTA (A) e por anticorpos anti-Le^x (3H3, B).

Figura 22. Uma proteína de 66 kDa (CD66) é o ligando de alta afinidade da DC-SIGN nos granulócitos.

A. Os granulócitos são marcados na superfície com biotina. O lisado celular é incubado de um dia para o outro a 4 °C com esférulas de Proteína A revestidas com DC-SIGN-Fc ou anticorpos de controlo contra ICAM-2, ICAM-3 e LFA-1. As esférulas são lavadas e o produto imunoprecipitado é analisado sobre SDS-PAGE e visualizado por autorradiografia. Em particular, é imunoprecipitada uma proteína com 66kD de tamanho. B. Os granulócitos expressam altamente os antígenos CD66acd e CD66d contendo Le^x, não expressam o ligando de DC-SIGN ICAM-2 e expressam o ICAM-3. C. A imunoprecipitação de CD66acd demonstra forte atividade de ligação para a DC-SIGNFc. MAbs anti-CD66acd revestidos sobre uma placa de ELISA foram incubados com um lisado de granulócitos. Depois de eliminar por lavagem proteínas não específicas, a DC-SIGNFc foi incubada para demonstrar ligandos de alta afinidade. A DC-SIGNFc não reconhece o ICAM-3 de granulócitos demonstrando que nos granulócitos não é o ICAM-3 mas é o CD66acd que é o ligando de alta

afinidade para DC-SIGN. A ligação de CD66acd à DC-SIGNFc é completamente inibida pela remoção de catiões por EDTA.

Figura 23. A DC-SIGN celular liga-se fortemente à proteína específica de granulócitos, CD66a.

Células 293T são transfetadas com pIG-CD66a-Fc, pIG-ICAM-3-Fc e pIG (simulado). Os sobrenadantes são colhidos e as esférulas são revestidos com as quimeras de Fc (CD66a-Fc, ICAM-3-Fc e simulado). As DC imaturas e células K562 transfetadas com DC-SIGN são incubadas com esférulas e a adesão é determinada na presença de anticorpos contra DC-SIGN e integrinas $\beta 2$, e manano e EGTA.

Figura 24. As células NK interagem especificamente com a DC-SIGN-Fc.

A ligação de DC-SIGN-Fc a subconjuntos de linfócitos de sangue periférico (PBL) é determinada por citometria de fluxo na presença de anticorpos contra DC-SIGN. Os subconjuntos de PBL distinguem-se por revelação com CD3 e CD56, e a adesão é determinada por revelação tripla com DC-SIGN-Fc.

Figura 25. As células NK interagem especificamente com DC-SIGN-Fc de uma maneira dependente da concentração. A ligação de DC-SIGN-Fc aos subconjuntos de linfócitos de sangue periférico (PBL) é determinada por citometria de fluxo na presença de anticorpos contra a DC-SIGN. As células NK são detetadas por revelação tripla com CD3, CD56 e DC-SIGN-Fc. As células escurecidas e brilhantes com CD56 não diferem na expressão de ICAM-2 ou ICAM-3 demonstrando que a glicosilação diferencial é o resultado da alta afinidade de ligação de DC-SIGNFc às células NK escurecidas com CD56.

Figura 26. O subconjunto NK CD56^{obscorecidas}CD16⁺ interage especificamente com DC-SIGN-Fc. A ligação de DC-SIGN-Fc aos

subconjuntos de NK é determinada por citometria de fluxo na presença de anticorpos contra DC-SIGN. Os subconjuntos de NK distinguem-se por revelação com CD16 e CD56, e a adesão é determinada por revelação tripla com DC-SIGN-Fc.

Figura 27. Uma proteína de 166 kDa e a ICAM-2 é reconhecida pela DC-SIGN-Fc em células NK.

As células NK são marcadas na superfície com iodo radioativo. O lisado celular é incubado de um dia para o outro a 4 °C com esférulas de Proteína A revestidas com DC-SIGN-Fc ou anticorpos de controlo contra ICAM-2, ICAM-3 e LFA-1. As esférulas são lavadas e o produto imunoprecipitado é analisado sobre SDS-PAGE e visualizado por autorradiografia.

Figura 28. A maturação de DC por células NK é mediada por LFA-1.

As DC imaturas são co-cultivadas com células NK durante 24 horas na presença de anticorpos contra DC-SIGN (AZN-D1) e LFA-1 (NKI-L19). A maturação é determinada medindo a expressão de CD80, CD83, CD86 e HLA-DR. com células NK O/N a 37 °C. Como um controlo, as DC são maturadas com LPS (10 ng/mL).

Figura 29. A lise mediada por NK de DC imaturas é dependente de DC-SIGN. DC imaturas ou maturadas com LPS marcadas com Crómio⁵² são co-cultivadas com células NK ativadas por IL-2 ou não ativadas durante 4 horas na presença de anticorpos contra DC-SIGN (AZN-D1) e LFA-1 (NKI-L19). A lise é determinada medindo a libertação de Cr⁵².

Figura 30. A lise mediada por NK de transfetantes de K562 é melhorada pela DC-SIGN. Células K562 marcadas com Crómio⁵² são co-cultivadas com células NK ativadas com IL-2 ou não

ativadas durante 4 horas na presença de anticorpos contra DC-SIGN. A lise é determinada medindo a libertação de Cr^{52} .

Figura 31. A DC-SIGN tem uma alta afinidade para HSV-1 e HSV-2.

O HSV é revestido em placas ELISA e a ligação de DC-SIGN-Fc é determinada na presença de anticorpos contra DC-SIGN.

Figura 32. A DC-SIGN liga fortemente a glicoproteína gB do envelope de HSV.

A. Transfetantes de DC-SIGN são incubados com esférulas revestidas com glicoproteínas do envelope de HSV e a ligação de DC-SIGN é determinada na presença de anticorpos contra DC-SIGN.

B. A L-SIGN liga fortemente a glicoproteína gB do envelope de HSV.

Transfetantes de L-SIGN são incubados com esférulas revestidas com glicoproteínas do envelope de HCV e a ligação de DC-SIGN é determinada na presença de anticorpos contra DC-SIGN.

Figura 33A. A mSIGNR1 liga hidratos de carbono contendo manose, de maneira semelhante a DC-SIGN e L-SIGN. As células K562 que expressam a DC-SIGN humana, L-SIGN humana ou mSIGNR1 murídea ligam num grau semelhante os hidratos de carbono contendo manose utilizando o ensaio de adesão de esférulas fluorescentes.

Figura 33B. As DC-SIGN, L-SIGN e mSIGNR1 ligam-se de forma diferenciada aos antígenos de Lewis. Os transfetantes que expressam a DC-SIGN humana, L-SIGN humana ou mSIGNR1 murídea ligam num grau semelhante o antígeno de Lewis acoplado a esférulas fluorescentes. As DC-SIGN e mSIGNR1, em contraste com a L-SIGN, reconhecem o antígeno Lewis X.

A mSIGNR1 murídea interage com sialil-Lewis X em contraste com as DC-SIGN e L-SIGN humanas.

Figura 33C A especificidade de hidratos de carbono das DC-SIGN, L-SIGN e mSIGNR1 é diferente. O antigénio Lewis X não é reconhecido pela L-SIGN, enquanto a DC-SIGN humana e a mSIGNR1 o reconhecem. A mSIGNR1 reconhece o sialil-Lewis X em contraste com as DC-SIGN e L-SIGN. Tanto a DC-SIGN humana como a mSIGN1 murídea ligam o sialil-Lewis A, em contraste com a L-SIGN.

Figura 34. DC-SIGN, L-SIGN e mSIGNR1 ligam-se ao manano derivado de levedura, E1/E2 do Vírus da hepatite C, gp120 de HIV-1 e ManLAM micobacteriano. Os ligandos patogénicos foram revestidos sobre esférulas fluorescentes e a adesão foi medida utilizando o ensaio de adesão de esférulas fluorescentes com transfetantes de K562. A ligação de Gp120 a DC-SIGN, L-SIGN e mSIGNR1 foi inibida utilizando o hidrato de carbono manano derivado de levedura, demonstrando que estas lectinas de tipo C também ligam o manano derivado de levedura.

Figura 35. A DC-SIGN liga especificamente as proteínas do envelope de HCV.

A. A DC-SIGN liga proteínas do envelope de HCV produzidas em levedura *Hansenula* e células de mamífero. A interação da DC-SIGN com as proteínas do envelope de HCV, E1 e E2 (2 mg/mL), produzidas pela levedura *Hansenula* ou células de mamíferos infetadas com vírus vaccinia recombinante foi testada num ELISA baseado em Fc. A especificidade da ligação foi confirmada utilizando o anticorpo bloqueador específico contra DC-SIGN, AZN-D1 (50 mg/mL), manano (100 mg/mL) ou o quelante de cálcio EGTA (5 mM).

B. A interação da DC-SIGN com as E1 e E2 de HCV é dependente da concentração. As E1 e E2 produzidas nas células de mamífero foram tituladas (0-16 ou 14 mM resp.) e a ligação de DC-SIGN-Fc foi testada como descrito acima. Foi utilizado AZN-D1 (50 mg/mL) para bloquear especificamente a interação.

C. A DC-SIGN tem uma afinidade semelhante para E1, E2 e gp120. As E1 e E2 produzidas em células de mamífero (10 nM) e gp120 (2 nM) foram revestidas e a ligação de DC-SIGN-Fc foi testada como descrito acima. O manano foi titulado (0-1000 mg/mL) para bloquear a interação. A ligação foi expressa como percentagem da ligação sem bloquear.

D. A ligação de DC-SIGN a E1, E2 e gp120 é igualmente dependente de cálcio. As E1 e E2 produzidas em células de mamífero (10 nM) e gp120 (2 nM) foram revestidas e a ligação de DC-SIGN-Fc foi testada como descrito acima na presença de uma quantidade variável de cálcio (0-5 mM). A ligação foi expressa como percentagem da ligação com cálcio 5 mM.

Figura 36. As proteínas do envelope de HCV são ligadas pelas DC-SIGN e L-SIGN celulares. A. Transfetantes de K562 expressam níveis semelhantes de DC-SIGN e L-SIGN. B. As DC-SIGN e L-SIGN celulares ligam-se a ambas as glicoproteínas do envelope, E1 e E2. Células K562 transfetadas com DC-SIGN e L-SIGN foram utilizadas para medir a ligação à proteína do envelope de HCV com o ensaio de adesão de esférulas revestidas fluorescentes. C. O mutante de DC-SIGN Val351 liga ambas as proteínas do envelope de HCV, E1 e E2. A ligação de DC-SIGN V351G a esférulas revestidas com as glicoproteínas E1 e E2 foi investigada e a especificidade foi determinada bloqueando a interação com o anticorpo específico contra DC-SIGN AZN-D2 ou o quelante de ião cálcio EGTA. D. A análise mutagénica demonstrou que os aminoácidos semelhantes dentro da região CRD de DC-SIGN

estão envolvidos no reconhecimento de HCV e HIV-1 e que aqueles estão também envolvidos na ligação de ICAM-3.

Figura 37. A via de internalização de DC-SIGN é dependente da base celular. A. As DC-SIGN e L-SIGN expressas por transfetantes de K562 e THP-1 ligam as VLPs de HCV de forma semelhante. A ligação da VLP E1/E2 de HCV aos transfetantes de K562 e THP-1 com DC-SIGN e L-SIGN foi medida utilizando o ensaio de adesão de esférulas fluorescentes. B-E. O HCV ligado a DC-SIGN é direcionado para os endossomas precoces (transferrina+) em células THP-1, em contraste com o direcionamento lisossômico (LAMP-1+) em células K562. Células K-562 (B e C) e THP-1 (D e E) que expressam DC-SIGN ou L-SIGN foram incubadas de um dia para o outro com VLPs de HCV. O HCV foi detectado utilizando um anticorpo anti-HCV humano e um anticorpo secundário marcado (FITC) fluorescente. O direcionamento intracelular foi determinado por revelação dos compartimentos endossômicos com um anticorpo de rato para o LAMP-1 específico lisossômico/endossômico tardio e anticorpo secundário marcado (Alexa Fluor 594) fluorescente (B, D), ou co-incubando as células durante 15 minutos com transferrina marcada com Alexa Fluor 594 que é especificamente transportada para os endossomas precoces e funciona como um marcador (C, E). As células foram analisadas por microscopia de fluorescência.

Figura 38. As células dendríticas ligam-se fortemente às E1 e E2 de HCV através de DC-SIGN. A As DC imaturas expressam níveis altos de DC-SIGN. As células dendríticas derivadas de monócitos foram isoladas como descrito em materiais e métodos. A expressão de DC-SIGN foi medida através de revelação por FACS com o anticorpo específico contra DC-SIGN, AZN-D2. B, C As DC imaturas e DC maduras ligam-se fortemente às proteínas do envelope de HCV, E1 e E2, e VLPs

E1/E2 de HCV mistas via DC-SIGN. A ligação de DC imaturas (B) e DC maturadas com LPS (C) a proteínas do envelope de HCV foi determinada por um ensaio de adesão de esférulas fluorescentes. A especificidade foi determinada pelo anticorpo anti-DC-SIGN, AZN-D2 (50 mg/mL), manano (100 mg/mL), EGTA (10 mM), e anticorpo anti-recetor de manose (clone 19) (50 mg/mL).

Figura 39. A DC-SIGN em iDC direciona as VLPs de HCV para os endossomas precoces. A Células dendríticas imaturas foram incubadas com VLPs de HCV (30 mg/mL) durante 4 horas ou de um dia para o outro. O HCV foi detetado com um anticorpo humano anti-HCV e um anticorpo secundário marcado com FITC. O direcionamento intracelular foi determinado por revelação dos compartimentos endossómicos com um anticorpo de rato para a LAMP-1 específica lisossómica/endossómica tardia ou o marcador específico de endossomas precoces EEA-1 e um anticorpo secundário marcado com Alexa Fluor 594, ou co-incubando as células durante 15 minutos com transferrina marcada com Alexa Fluor 594 que é especificamente transportada para os endossomas precoces. B As células dendríticas imaturas foram incubadas com VLPs de HCV (30 mg/mL) durante 4 horas ou de um dia para o outro a 37 ou 4 °C. O HCV foi detetado como descrito para a figura 5A. A localização de DC-SIGN foi determinada com o anticorpo específico contra DC-SIGN, AZN-D2, e um anticorpo secundário marcado com Alexa Fluor 594.

Figura 40. A DC-SIGN em iDCs direciona o seu ligando antigénio Lewis X para endossomas/lisossomas tardios. Células dendríticas imaturas foram incubadas com Lewis X (10 mg/mL) durante 4 horas. O direcionamento intracelular foi determinado por revelação dos compartimentos endossómicos com um anticorpo de rato para a LAMP-1 específica lisossómica/endossómica tardia ou co-incubando

as células durante 15 minutos com transferrina marcada com Alexa Fluor 594 que é especificamente transportada para os endossomas precoces. As células foram analisadas por microscopia de fluorescência.

Figura 41. O HCV interage com células endoteliais sinusoidais do fígado humano que expressam L-SIGN (LSECs) in situ. (A) A L-SIGN é expressa por LSECs humanos, como foi determinado por revelação do tecido hepático com um anticorpo específico contra L-SIGN. (B) A ligação de VLPs de HCV pelo tecido hepático foi determinada incubando secções de fígado com VLPs de HCV durante 2 horas a 37 °C. A ligação de HCV foi detetada utilizando um anticorpo de rato anti-HCV e um anticorpo secundário marcado com Alexa Fluor 594. (C) A ligação de VLP de HCV a LSECs foi bloqueada pelo quelante de cálcio EGTA.

Figura 42. Os antigénios de Lewis do grupo sanguíneo e algumas das suas estruturas relacionadas ligam-se a DC-SIGN. (a) Antigénios de Lewis do grupo sanguíneo expressos por *H. pylori*. (b-c) Hidratos de carbono, que representam antigénios do grupo sanguíneo ou suas subestruturas, conjugados com poliacrilamida (b), ou ceramida (c), foram revestidos e a ligação de DC-SIGN-Fc recombinante foi medida utilizando o ELISA DC-SIGN-Fc.

Figura 43. A ligação de *H. pylori* é dependente da expressão do antígeno Lewis. (a-c) mutantes α 3-fucosiltransferase de *H. pylori* (a), estirpes (b) e variantes de fase (c) foram revestidos e a ligação de DC-SIGN-Fc recombinante foi medida após incubação com Fc de cabra anti-humano marcado com peroxidase. As *H. pylori* foram revestidas e incubadas com anticorpos específicos para antígenos de Lewis como indicado e o seu serótipo foi determinado após incubação com imunoglobulinas anti-rato marcadas com peroxidase.

Figura 44. Variação de fase de LPS em *H. pylori* ocorre in vivo.

(a) Variantes de fase positivas para Lex/y de J223 foram detetadas por transferência de colónias com mAbs específicas para os antígenos de Lewis indicados, após cultura breve diretamente a partir da biopsia, seguida de uma única passagem em fase líquida e distribuição sobre meio sólido. (b) Foi realizada sequenciação do segmento C para determinar o estado "ligado" e "desligado" dos genes *futA* (HP0379) e *futB* (HP0651). O mutante J223.3 *futB* foi gerado por transformação natural com uma construção que contém uma cassete marcadora de resistência a cloranfenicol inserida no gene HP0651, e serotipado como indicado para J223. (c) Consequências do comprimento do segmento C para a expressão funcional de *futA* e *futB*.

Figura 45. A DC-SIGN é expressa em DC gástricas e é o recetor principal para *H. pylori* positivas para Le.

(a) Uma secção de tecido do estômago foi fixa e revelada com anticorpos anti-DC-SIGN. Ampliação original x 20. As setas indicam células análogas a DC positivas para DC-SIGN na lâmina própria. (b-d) DC derivadas de monócitos (b), DC derivadas de monócitos e macrófagos RAW (c) ou células K-562 transfectadas com DC-SIGN (d) foram incubadas com J223.3 ou J223.8 de *H. pylori* marcadas com FITC e a ligação foi analisada utilizando citometria de fluxo. Em b e d, as células foram pré-incubadas com anticorpos anti-DC-SIGN, manano, EDTA, ou anticorpos anti-recetor de manose (MR).

Figura 46. A ligação de *H. pylori* induz um aumento dependente de DC-SIGN da produção de citocinas IL-10 e IL-12, mas nenhuma alteração em IL12p70.

(a) As DC foram incubadas com J223.3 ou J223.8 de *H. pylori* a uma multiplicidade de infecção (M.O.I.) de 20 na presença ou ausência de anticorpos anti-DC-SIGN durante 1 h, lavadas e cultivadas durante 20 h. O sobrenadante foi colhido e a quantidade de IL-10 e IL-12p40 foi analisada por ELISA.

(b) Após co-cultura de DC com J223.3 ou J223.8 de *H. pylori*, as células foram incubadas com fibroblastos de J558 transfetados com CD40L na ausência ou presença de IFN- γ durante 24 h. O sobrenadante foi colhido e a quantidade de IL-12p70 foi analisada por ELISA.

Figura 47. A ligação de *H. pylori* a DC-SIGN induz uma alteração súbita da células T naíf para Th2.

Após pré-incubação com anticorpos anti-DC-SIGN, as DC foram incubadas com J223.3 ou J223.8 de *H. pylori* a uma M.O.I. de 10 durante 48 h, lavadas e subsequentemente co-cultivadas com células T CD45RA+CD4+ altamente purificadas. As células T quiescentes foram novamente estimuladas com PMA e ionomicina e IL-4 e IFN- γ foi analisado com base numa célula única por citometria de fluxo intracelular.

Figura 48: Os lactobacilos induzem maturação parcial de DC. As DC imaturas (iDC) foram geradas como descrito A) A maturação foi induzida por adição de LPS (100 ng/mL), 10⁷ bactérias, LPS mais MF (rIL-1b (25 ng/mL) e rTNFa (50 ng/mL)), ou MF mais 1.10⁷ bactérias. Após 48 h, as DC maduras (mDC) foram colhidas, lavadas e (A) a expressão superficial de CD86, HLA-DR e CD83 foi analisada por citometria de fluxo. (B) DC maduras (2.10⁴ células/poço) foram estimuladas com células de fibroblastos de rato que expressam CD40L de rato (células J558, 2x10⁴ células/poço) para induzir a produção de IL-12, IL-10 e IL-6. Após 24 h, os sobrenadantes foram recolhidos e as produções de IL-12p70, IL-10 e IL-6 foram medidas por ELISA.

Figura 49: *L. reuteri* e *L. casei* induzem o desenvolvimento de células T reguladoras por modulação da função DC. A geração de iDC e as condições de maturação são descritas na legenda da figura 16. (A) DC maduras (5×10^3 célula/poço) foram co-cultivadas com células T auxiliares naíf (células Th) (2×10^4 células/poço) e superantígeno SEB (10 pg/mL). Após 12 dias, as produções de IFN- γ e IL-4 por célula foram analisadas por revelação com FACS intracelular após uma estimulação de 6 h com PMA/ionomicina, as últimas 5 h na presença de Brefeldina A. (B) DC maduras ($2,5 \times 10^3$ célula/poço) foram co-cultivadas com células Th naíf (5×10^4 células/poço). A proliferação de células foi avaliada pela incorporação de $[3H]$ -TdR marcado radioativamente após um impulso com 13 KBq/poço durante as últimas 16 h da cultura de 6 dias após estimulação, como medido por espectroscopia de cintilação líquida. (C) Células Th naíf foram estimuladas como descrito na parte A. Após 12 dias, as células de ensaio foram marcadas fluorescentemente com PKH, e estimuladas com concentrações abaixo da ideal de anti-CD3 (1:5000) e anti-CD28 (1:2000). Após incubação de um dia para o outro, as células T alvo (células T CD4+ periféricas) marcadas (CFSE) fluorescentes, foram adicionados numa proporção 1:1 ($2,5 \times 10^4$ cada). Após 5 dias, a revelação com PKH e CFSE das células foram analisadas por citometria de fluxo. O perfil de CFSE em tons cinzentos representa as condições de ensaio (bactérias: 105), enquanto a sobreposição indica a proliferação na presença de células de ensaio de controlo (MF/LPS). A figura é uma representativa de 7 experiências independentes. (D) A intensidade de fluorescência média (MFI) das células alvo marcadas com CFSE co-cultivadas na presença de células de ensaio de controlo (MF/LPS) foi fixada em 100%, que representa a proliferação máxima. A MFI das células T alvo co-cultivadas com outras células de ensaio foi comparada com este valor, calculando a proliferação relativa. Os

resultados são expressos como as percentagens médias $\pm$ EPM de 4-7 experiências independentes (Cordicepina: 25 - 12,5-6,25 $\mu\text{g/mL}$). Os dados foram analisados quanto à significância estatística utilizando ANOVA seguida do teste de comparação múltipla de Bonferroni. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

Figura 50: Nenhuma atividade TLR pelos Lactobacilos.

(A) Células HEK 293 transfetadas de forma estável com TLR2 ou TLR4 foram aplicadas a $0,2 \times 10^6$ células/poço e estimuladas com 107 bactérias/mL ou TNF α . Após 24 horas, o sobrenadante foi retirado e o teor de IL-8 foi analisado por ELISA. (B) Células HEK 293 foram transfetadas transitoriamente com TLR1, TLR2, TLR3, TLR4 + MD2, TLR6, TLR7 e TLR9 humanos, em conjunto com uma construção repórter de ELAM-luciferase e foram estimuladas com 107 bactérias ou TNF α . A atividade luciferase foi determinada 6 h após estimulação.

Figura 51: *L. reuteri* e *L. casei* ligam a DC-SIGN em moDC.

(A). DC imaturas foram incubadas com bactérias marcadas com FITC. Depois de lavar, as células foram analisadas por citometria de fluxo. (B) Foi utilizado um protocolo semelhante, ao descrito na parte A, para analisar a ligação de bactérias a células K562 transfetadas com DC-SIGN ou células K562 não transfetadas. Foram realizadas pré-incubações com TSM + 0,5% de BSA, EDTA ou anti-DC-SIGN (AZN-D1 e AZN-D2, 20 $\mu\text{g/mL}$). (C) A ligação de DC foi realizada como descrito na parte A. As pré-incubações foram realizadas com TSM + 0,5% de BSA, anti-DC-SIGN (AZN-D1 e AZN-D2, 20 $\mu\text{g/mL}$), anti-MR, Manano ou metilglicosídeo.

Figura 52: Bloqueio da interação DC-SIGN com *L. reuteri* e *L. casei* anula o condicionamento para o desenvolvimento de células T reguladoras.

A geração de iDC é descrita na legenda da figura 1. DC imaturas foram pré-incubadas (30 min, 37 °C) com Ab de controlo de isotipo, anti-DC-SIGN (AZN-D1; 20 µg/mL) ou Manano. Depois disso, a maturação foi realizada como descrita na legenda da figura 16. A indução de atividade celular supressora foi analisada como descrito na legenda da figura 17.

Figura 53. Os Neutrófilos Mononucleares Polimórficos (PMN) expressam o ligando de DC-SIGN Lewisx e ligam-se com alta afinidade à DC-SIGN recombinante. A. Glicoconjugados de poliacrilamida de Lewisx e Lewisx sialilados foram revestidos e a adesão de DC-SIGN-Fc foi medida com Fc de cabra anti-humano marcado com peroxidase em ELISA DC-SIGN-Fc. B. A expressão de Lewisx foi determinada em PMN marcados para CD16 para discriminar entre neutrófilos CD16+ e eosinófilos CD16-. C. A adesão de esférulas revestidas com ICAM-3-Fc ou DC-SIGN-Fc aos PMN foi avaliada utilizando citometria de fluxo. A especificidade da adesão foi obtida utilizando anticorpos bloqueadores anti-DC-SIGN (AZN-D1, 20 mg/mL), manano (50 mg/mL) ou EGTA (10 mM). D. A titulação de DC-SIGN-Fc para os PMN revela alta afinidade de ligação da DC-SIGN aos PMN. E. A ligação da concentração ótima de DC-SIGN-Fc (10 mg/mL) aos PMN marcados com o marcador de neutrófilos CD16. Para avaliar a especificidade foram utilizados anticorpos bloqueadores anti-DC-SIGN (AZN-D1, 50 mg/mL).

Figura 54. O CEACAM1 expresso nos PMN é um ligando de DC-SIGN e liga-se através das suas unidades Lewisx. A. O lisado completo dos PMN foi analisado num gel de poliacrilamida a 7% durante 1,5 h a 120 V, transferido para

transferência de nitrocelulose e revelado com DC-SIGN-Fc, anticorpos anti-CEACAM1 (anti-CD66) ou anti-Lewisx (3 mg/mL) e anticorpos secundários conjugados com fosfatase alcalina. B. Esférulas de Proteína A (protA) revestidas com DC-SIGN-Fc foram utilizadas para imunoprecipitar os ligandos de DC-SIGN a partir de PMN biotinilados na superfície. Os imunoprecipitados foram analisados sobre gel, transferidos para transferência e revelados com estreptavidina conjugada com peroxidase. C. O CEACAM1 imunoprecipitado a partir dos PMN utilizando esférulas de proteína G (protG) revestidas com anticorpos anti-CEACAM1 foi revelado na transferência utilizando DC-SIGN-Fc e anticorpos de cabra anti-humanos conjugados com fosfatase alcalina. D. A incubação com a enzima α -1,3,4 fucosidase (5 mU/mL) durante 3 dias a 37 °C remove o epítipo Lewisx no CEACAM1 derivado de PMN. E. Utilizando um sistema baseado em ELISA, a adesão de DC-SIGN-Fc ao CEACAM1 de PMN foi medida e comparada com aquela após tratamento com α -1,3,4 fucosidase. F. Anticorpos dirigidos contra Lewisx (20 mg/mL) bloqueiam a adesão de DC-SIGN-Fc ao CEACAM1 capturado a partir de PMN utilizando anticorpo anti-CEACAM1 no ELISA de adesão.

Figura 55. DC-SIGN celular expressa em transfetantes de K562 e DC imaturas liga CEACAM1 nativo de PMN. A. Esférulas fluorescentes revestidas com CEACAM1 de PMN foram incubadas com transfetantes de K562 que expressam DC-SIGN de tipo selvagem ou DC-SIGN mutante que apresenta uma única substituição de aminoácido no domínio da lectina de tipo C crucial para ligação ao ligando. A adesão de esférula foi medida utilizando análise por FACS. B. Foi determinada a adesão de esférulas revestidas com CEACAM1 às DC imaturas. A especificidade de adesão foi avaliada utilizando anticorpos bloqueadores anti-DC-SIGN (20 mg/mL), manano (50 mg/mL) ou EGTA (10 mM).

Figura 56. DC-SIGN está envolvida no agrupamento de DC e PMN. A. PMN marcados com CFSE (verde) foram incubados com K562 marcadas com HE fluorescente, K562-DC-SIGN e DC imaturas (vermelho) durante 15 min a 37 °C. Foram utilizados anticorpos anti-DC-SIGN (AZN-D1 e AZN-D2, 10 mg/mL) para determinar o envolvimento da DC-SIGN. O agrupamento de célula foi visualizado utilizando microscopia de fluorescência e foram tiradas fotografias representativas. B. Utilizando análise por FACS, o agrupamento das células foi seguido no tempo pontuando a percentagem de K562 ou K562-DC-SIGN que têm PMN ligados. C. A adesão de PMN a DC imaturas foi quantificada por citometria de fluxo.

Figura 57. Localização de PMN e DC na mucosa do cólon de doentes com doença de Crohn. A. Lamelas de tecido intestinal inflamatório de doentes com doença de Crohn foram reveladas duplamente para os marcadores de PMN Lewisx (6H3, fluorescência verde) e CEACAM1 (CLB-gran/10, fluorescência azul), B. para CEACAM1 (CLB-gran/10, fluorescência verde) e o marcador de DC DC-SIGN (CSRD, fluorescência vermelha), ou C. para Lewisx (6H3, fluorescência verde) e DC-SIGN (CSRD, fluorescência vermelha). O anticorpo anti-CEACAM1 produz revelação de fundo nas criptas do cólon, provavelmente devido à reação cruzada com CEA que é expressa nas células epiteliais do cólon.

Figura 58. Os PMN ativam as DC imaturas através da ligação de DC-SIGN. A. A maturação de DC por contacto com PMN foi determinada medindo a expressão do marcador de maturação de DC, CD86. A maturação pode ser inibida com anticorpos anti-DC-SIGN (AZN-D1). A maturação de DC pelos PMNs foi comparada com a maturação de DCs com LPS ou E.coli. B. A produção de citocinas de IL-12 e TNFa foi analisada após

interação PMN-DC, e é dependente da ligação de DC-SIGN, uma vez que os anticorpos contra DC-SIGN bloqueiam a indução de citocinas.

Figura 59. A DC-SIGN liga CD11b e CD66a-d que expressam Lewis X em PMN.

A Captura de CD11b e CD66acd a partir do lisado de PMN utilizando anticorpos específicos revelou a presença de antígenos de Lewis X nestas moléculas da membrana celular
B Captura de CD11b e CD66acd a partir do lisado de PMN e acoplamento com esférulas fluorescentes revelou que, em particular, os CD11b e CD66acd derivados de PMN interagem fortemente com transfetantes que expressam DC-SIGN, indicando que a DC-SIGN liga CD11b e CD66acd derivados de PMN.

C CD11b/CD18 e CD66 capturados a partir do lisado de PMN demonstra ligação de alta afinidade com DC-SIGNFc como demonstrado no ELISA de DC-SIGN Fc.

D Estudos de imunotransferência demonstram que a DC-SIGNFc interage especificamente com CD66acd e CD11b de PMN quando imunoprecipitados (IP) utilizando mAbs anti-CD66acd (faixa 9) e CD11b (faixa 10) a partir de um lisado de PMN. As proteínas da superfície celular são biotiniladas e os PMN são lisados. Faixa 1. controlo negativo utilizando ICAM-3 Fc para captura por proteínas IP. Deteção é estreptavidina marcada com peroxidase. Faixa 2. DC-SIGN-Fc é utilizada para capturar ligandos biotinilados a partir do lisado; são visíveis duas bandas de proteína, a banda superior consiste em CD11b e CD66a, enquanto a inferior consiste em CD18. Faixa 3. Controlo negativo; nenhuma banda é imunoprecipitada com anticorpos anti-DC-SIGN. Faixa 4, IP com anticorpos contra CD66acd; é visível uma banda fraca contendo CD66a. Faixa 5, IP de CD11b; são visíveis duas bandas; a banda superior é CD11c e a banda inferior é

CD18m, o qual é co-imunoprecipitado com CD11c. Faixa 6. IP com ligandos de DC-SIGN e detecção com anti-CD66acd; CD66a é capturado por DC-SIGN Fc. Faixa 7. IP com ligandos de DC-SIGN e detecção com anti-CD11b; CD11b é capturado por DC-SIGN Fc. Faixa 8. Controlo negativo, IP com anticorpos anti-DC-SIGN e detecção com DC-SIGN-Fc. Faixa 9. IP com anti-CD66acd e detecção com DC-SIGN Fc; CD66a é ligado por DC-SIGN na transferência. Faixa 10. IP com anti-CD11a e detecção com DC-SIGN Fc; CD11a é ligado por DC-SIGN na transferência.

Figura 60

DC-SIGN liga estruturas de Lewis X em CD11b de PMN. Estudos de imunoprecipitação (IP) revelaram que a ligação de DC-SIGN-Fc ao CD11b é anulada quando CD11b é tratado com α -1,3,4 Fucosidase que remove o resíduo de fucose presente no Lewis X (Faixa 7 e 8)

Figura 61

DC-SIGN liga células tumorais que expressam o antígeno tumoral CEA (CD66e), através da interação de DC-SIGN com CD66e.

A. DC-SIGNFc reconhece antígenos tumorais em vários carcinomas da mama e adenocarcinomas. A ligação pode ser bloqueado por mAbs anti-DC-SIGN

B. a linha de células tumorais SW948 interage com células que expressam DC-SIGN e com DC e a adesão celular pode ser bloqueada por anticorpos anti-DC-SIGN (AZN-D1), indicando uma função para a DC-SIGN na interação com um estrutura celular em células tumorais

C. DC-SIGN-Fc liga CD66e imunoprecipitado (CEA). A imunoprecipitação com anti-CD66e (anti-CEA) de lisado de células tumorais SW948 biotiniladas na superfície celular

mostra que a DC-SIGN-Fc liga o antígeno tumoral CEA (faixa 5).

Figura 62

DC-SIGN reconhece Lewis X e Lewis Y em CD66e a partir de células tumorais.

A. CD66e da linha de células tumorais SW948 expressa estruturas de Lewis X e hidratos de carbono de Lewis Y determinadas utilizando anticorpos específicos.

B. CD66e capturado a partir do lisado de SW948 está ligado por DC-SIGN-Fc

C. DC-SIGN-Fc captura o CD66e a partir de um lisado de SW948 como detectado por um anticorpo específico anti-CD66e.

D. Estudos de imunoprecipitação (IP) revelaram que a ligação de DC-SIGN-Fc ao CD66e é anulada quando o CD66e é tratado com α -1, 3,4 Fucosidase que remove o resíduo de fucose presente nos Lewis X,Y (Faixa 3 e 4).

Figura 63.

Figura esquemática de diferentes mutantes de *Neisseria Meningitidis* com diferentes resíduos de hidratos de carbono na posição final nas suas estruturas de LPS.

Figura 64. DC-SIGN liga-se aos mutantes IgtB e rfaF de *Neisseria Meningitidis*. Os diferentes mutantes de *Neisseria Meningitidis* são investigados quanto à sua interação utilizando diferentes moléculas de lectinas de tipo C-Fc (DC-SIGN-Fc, DCIR-Fc, BCDA-2-Fc, MGL-Fc Dectin-1B-Fc) utilizando o ensaio ELISA Fc.

Figura 65 DC imaturas ligam-se fortemente ao mutante IgtB de *Neisseria Meningitidis* através de DC-SIGN. Apenas o mutante fluorescente *Neisseria IgtB*, que contém uma posição final GlcNAc, liga-se fortemente às DC, como determinado

por citometria de fluxo, e a ligação pode ser completamente bloqueado por anticorpos anti-DC-SIGN, indicando que a DC-SIGN está envolvida na captura de *Neisseria* de IgtB. A manose-BSA e o manano inibem parcialmente a interação.

Figura 66. DC-SIGN-Fc liga fortemente células CHOP8 que sobreexpressam GlcNAc, indicando que a DC-SIGN também liga resíduos de GlcNAc em auto-glicoproteínas (CHOP8) e em agentes patogénicos tais como *Neisseria* (Figura 33).

Exemplos

Os exemplos que não se referem a um glicoconjugado que compreende um antígeno tumoral e um antígeno Lewis X não sialilado não fazem parte da invenção

Métodos.

Anticorpos e proteínas. Os seguintes anticorpos monoclonais (Mab) foram utilizados: anti-CD107a (Lamp-1; MabH4A3, BD Pharmingen), anti-MR (Clone 19, BD Pharmingen), CD11b (bear-1)²⁵, CD11c (SHCL3)²⁶, anti-DC-SIGN (AZN-D1, AZN-D2¹⁴, CSRD¹⁰, CD11a bloqueador (NKI-L15), anti-ICAM-1 (Rek-1), anti-ICAM-2(12A2) e anti-ICAM-3 (AZN-IC3/1, icr-2), CD18 ativador (KIM185) e os anticorpos conjugados com PE/FITC CD25, CD69, CD80, CD86, HLA-DR (BD Pharmingen), e CD83 e CD56 (Beckman Coulter). CD3 e CD16 conjugados com biotina (BD Pharmingen). CLB-T4 (α CD4) foi uma oferta generosa de René van Lier. MEM-157 (α CD16) e MEM-97 (α CD20) foram amavelmente proporcionados por Vaclav Horejsi. mAb contra ICAM-1 CBR-IC-1/3, mAb contra ICAM-2 CBR-IC-2/1, e mAb contra ICAM-3 CBR-IC-3/2 foram obtidos através do Human Leukocyte Differentiation Antigen Workshop. Foram utilizados vários anticorpos monoclonais (MAbs) anti-glicanos: o Mab anti-LDN-DF 114-5B1-A¹⁶, o Mab anti-LDN

SMLDN1.1¹⁷, o MAb anti-LDN-F SMLDNF1¹⁰ e o MAb anti-Le^x CB10²⁷, os mAbs anti-Lex SMLDN1.1 e SMFG4.1 e 6H3 (anti-Lex). O mAb (CLB-gran/10) foi utilizado para revelar e imunoprecipitar o CD16.

A neoglicoproteína HSA-Le^x, contendo aprox. 20-25 cadeias de oligossacáridos por molécula de HSA, foi da Isosep AB, Tullinge, Suécia. As neoglicoproteínas BSA-LDN-DF (aprox. 12 cadeias de oligossacáridos por molécula de BSA) e BSA-LDN-F (aprox. 3-4 oligossacáridos por molécula de BSA), foram sintetizadas enzimaticamente como descrito por van Remoortere et al¹⁶, e Nyame et al¹⁷, respetivamente. Le^x-PAA-biotina, contendo Le^x acoplado de forma multivalente a poliacrilamida biotinilada foi de Syntesome, Munique, Alemanha.

Manano purificado de *Saccheromyces cerevisiae* (50 µg/mL) e gp120 recombinante (0,50 µg/mL) foram obtidas de Sigma e da Aidsresource Foundation, respetivamente. O lipoarabinomanano com extremidade de manose (manLAM) purificado de *Mycobacterium tuberculosis*, e LAM sem extremidade (araLAM) de *M. smegmatis* foram amavelmente proporcionados pelo Dr. J. Belisle, Colorado State University através de NIH, contrato NIAID NO1 AI-75320. O antigénio de ovo solúvel (SEA) foi amavelmente proporcionado pelo Dr. A. K. Nyame, Oklahoma University HSC, EUA). O lipofosfoglicano purificado de *Leishmania mexicana* foi amavelmente doado pelo Dr. M Wiese, Bernard Nocht Inst. Tropical Medicine Hamburg, Alemanha. O lipopolissacárido purificado de *Helicobacter pylori* foi obtido de M. Monteiro, NRC, Ottawa, Canadá. Uma amostra tratada com ultrassons de células bacterianas de um isolado clínico de *M. tuberculosis* foi doada por A. Kolk, KIT, Royal Trop. Inst, Amesterdão. Os isolados clínicos de

Helicobacter pylori, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* foram obtidos do VUMC Hospital, Amsterdão. Os glicoconjugados sintéticos foram obtidos de Syntesome, Munique, Alemanha, e compreendem mono- e oligossacáridos ligados de forma multivalente a um veículo de poliacrilamida biotinilado, MM 40 000.

Ensaio de adesão de DC-SIGN-Fc solúvel. A DC-SIGN-Fc consiste na porção extracelular de DC-SIGN (resíduos de aminoácidos 64-404) fundida na extremidade C-terminal com um fragmento Fc de IgG1 humana. A DC-SIGN-Fc foi produzida em células de Ovário de Hamster Chinês K1 por co-transfecção de DC-SIGN-Sig-pIgG1 Fc (20 µg) e vetor pEE14 (5 µg). As concentrações de DC-SIGN-Fc no sobrenadante foram determinadas por um ELISA anti-IgG1 Fc. O ensaio de ligação de DC-SIGN-Fc foi realizado como se segue. Os glicoconjugados e micobactérias submetidas a ultrassons foram revestidas sobre placas ELISA a 5 µg/poço; as células bacterianas intactas foram revestidos a 5×10^7 /mL; o revestimento ocorreu durante 18 horas à temperatura ambiente, seguida de bloqueamento com BSA a 1% durante 30 min, a 37 °C em TSM (Tris-HCl 20 mM, pH 7,4 contendo NaCl 150 mM, CaCl₂ 2 mM e MgCl₂ 2 mM). Foi adicionada DC-SIGN-Fc solúvel (aprox. 2 µg/mL em tampão de TSM) e a adesão foi realizada durante 120 min. à TA. A DC-SIGN-Fc não ligada foi eliminada por lavagem e a ligação foi determinada por um ELISA anti-IgG1 Fc utilizando um conjugado de peroxidase com Fc de cabra anti-humano. A especificidade foi determinada na presença de 20 µg/mL de anticorpos bloqueadores, 50 µg/mL de manano ou EGTA 5 mM.

Células. DC imaturas foram cultivadas a partir de monócitos na presença de IL-4 e GM-CSF (500 e 800 U/mL,

respetivamente; Schering-Plough; Bruxelas, Bélgica²⁸. No dia 7, o fenótipo das DC cultivadas foi confirmado através de análise por citometria de fluxo. As DC expressavam níveis altos de MHC de classe I e II, α M β 2 (CD11b), α X β 2 (CD11c) e ICAM-1, níveis moderados de LFA-1 e CD80, e níveis baixos de CD14. Os transfetantes de K562 que expressam DC-SIGN de tipo selvagem foram gerados por transfeção de células K562 com 10 μ g de plasmídeo pRc/CMV-DC-SIGN por eletroporação como anteriormente descrito.

OS transfetantes estáveis de K562 que expressam ICAM-3 foram obtidos por eletroporação de pCDM8-ICAM-3 e pGK-HYG. As células K562 foram cultivadas em RPMI 10% de FCS, enquanto as células K562-ICAM-3 foram cultivadas em RPMI 10% de FCS : Iscove 5% de FCS 3:1 contendo 0,5 mg/mL de higromicina para manter a expressão de ICAM-3.

As células NK naíf foram isoladas a partir das camadas leucocitárias de doadores saudáveis. Resumidamente, a fração de PBMC obtida por centrifugação em Ficoll foi sequencialmente esgotada de células CD14⁺, e de células CD3⁺, CD4⁺ e CD20⁺ utilizando classificação por MACS. As células CD14⁺ foram esgotadas por microesférulas de CD14 (Miltenyi Biotec) numa coluna LS (Miltenyi Biotec), e as células CD3⁺, CD4⁺ e CD20⁺ foram marcadas pelo mAbs T3B (α CD3), CLB-T4 (α CD4), MEM97 (α CD20), e depois disso esgotadas por microesférulas de cabra- α -rato (Miltenyi Biotec) numa coluna LD (Miltenyi Biotec). As células NK assim obtidas foram rotineiramente testadas para os marcadores de células NK CD16 (75% a 90% de expressão), CD56 (80 a 95% de expressão), os marcadores de não linhagem CD3, CD4, CD14 e CD20 (todos menos de 1% de expressão), e o marcador de ativação inicial CD69 (15% de expressão em células NK não ativadas e 75% de expressão em células NK ativadas 1 dia com IL-2). As populações de células NK

CD56^{obscorecidas} e CD56^{brilhantes} foram isoladas a partir de células NK obtidas de MACS por classificação com FACS em expressão baixa e alta de CD56, respectivamente. As populações de células NK CD56^{obscorecidas} e CD56^{brilhantes} eram mais de 95% puras como avaliado por citometria de fluxo com revelação para CD16 e CD56.

Ativação de DC. As DC imaturas (2×10^6 células/mL) foram cultivadas durante 24 horas na presença de IL-4 (500 U/mL, Schering-Plough, Bruxelas, Bélgica), GM-CSF (800 U/m; Schering-Plough, Bruxelas, Bélgica) e LPS (10 ng/mL) ou glicolípidos de LAM (15 µg/mL). O efeito da LAM na ativação induzida por LPS foi determinada pré-incubando DC imaturas (300 000 células) com AZN-D2 (40 µg/mL) durante 30 minutos, e subsequentemente com LPS na presença de LAM (15 µg/mL) durante 18 horas. Os glicolípidos de LAM foram obtidos de J. Belisle (Colorado State University e NIH (contrato N01 AI-75320)) e continham <5 ng/mg de endotoxina. A ativação foi determinada pela expressão na superfície das células de MHC de classe II (HLA-DR) e as moléculas co-estimuladoras CD80, CD83 e CD86 utilizando anticorpos conjugados com PE.

Ensaio de adesão de esférulas fluorescentes. TransFluorSpheres modificadas com carboxilato (488/645 nm, 1,0 µm; Molecular Probes, Eugene, OR) foram revestidas com gp120 de HIV-1 e ICAM-3 como descrito¹⁴. Estreptavidina foi covalentemente acoplada às esférulas como descrito e as esférulas revestidas com estreptavidina foram incubadas com glicoconjugados ligados a PAA biotinilados (50 pMol; Syntesome, Munique, Alemanha). O ensaio de adesão de esférulas fluorescentes foi realizado como descrito¹⁴. Foram adicionadas esférulas fluorescentes revestidas com ligando (20 esférulas/célula) às células durante 45 minutos a 37 °C, lavadas e analisadas por citometria de fluxo (FACScan, Becton Dickinson, Oxnard, CA), medindo a

percentagem de células que tinham ligado esférulas fluorescentes. As esférulas revestidas com LAM foram geradas incubando esférulas revestidas com estreptavidina foram incubadas com fragmento F(ab')₂ biotinilado de IgG de cabra anti-rato (6 µg/mL; Jackson ImmunoResearch), seguida de incubação de um de um dia para o outro com anticorpo de rato anti-LAM (F30.5) a 4 °C. As esférulas foram lavadas e incubadas com 250 ng/mL de glicolípido LAM purificado (obtido de J. Belisle, Colorado State University e NIH (contrato NO1 AI-75320)) de um dia para o outro a 4 °C. As esférulas revestidas com SEA foram geradas incubando as esférulas revestidas com estreptavidina com fragmento F(ab')₂ biotinilado de IgG de cabra anti-rato (6 µg/mL; Jackson ImmunoResearch), seguida de incubação de um de um dia para o outro a 4 °C com MAb anti-LDN ou MAb anti-LDN-DF. As esférulas foram lavadas e incubadas com 1µg/mL de SEA de um dia para o outro a 4 °C. Essencialmente, 50x10³ células foram pré-incubadas em tampão de adesão (Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 2 mM, 0,5% de BSA) com ou sem MAbs bloqueadores (20 µg/mL) ou manano (50 µg/mL) durante 10 minutos à temperatura ambiente. Foram adicionadas esférulas fluorescentes revestidas com ligando (20 esférulas/célula) às células e a suspensão foi incubada durante 45 minutos a 37 °C. As células foram lavadas e a adesão foi determinada utilizando citometria de fluxo (FACScan, Becton Dickinson, Oxnard, CA), medindo a percentagem de células que tinha esférulas fluorescentes ligadas. As esférulas fluorescentes de gp120 de HIV-1 foram preparadas como descrito anteriormente¹⁹.

Adesão de DC-SIGN-Fc. As células foram incubadas com DC-SIGN-Fc durante 30 minutos a 37 °C sob condições de saturação (concentração: 10 µg/mL), e subsequentemente com Anticorpos secundários de cabra-α-humanos conjugados com FITC para monitorizar a adesão de DC-SIGN-Fc. Antes da

incubação com células, a DC-SIGN-Fc foi pré-incubada durante 10 min à TA com meio, aDC-SIGN (AZN-D1, 50 µg/mL), manano (50 µg/mL) ou EGTA (10 mM) para determinar a especificidade da adesão de DC-SIGN-Fc. A adesão de DC-SIGN-Fc foi determinada por citometria de fluxo (FACS Calibur, Beckman Coulter).

Micobactérias. As estirpes BCG de *M. bovis* (Pasteur) e H37Ra de *M. tuberculosis* foram ofertas de A. Kolk (Royal Tropical Institute, Amesterdão). A BCG de *M. bovis* foi cultivada *in vitro* utilizando caldo 7H9 da Middelbrook suplementado com 0,05% de Tween 80 e albumina-dextrose-catalase. Os glicolípidos ManLAM e AraLAM foram obtidos de J. Belisle, Colorado State University e NIH (contrato NO1 AI-75320). As DC foram infectadas com micobactérias cultivando-as a uma multiplicidade de infecção (MOI) apropriado como indicado nas legendas das figuras.

Ensaio de ligação micobacteriano fluorescente. A captura e internalização de micobactérias pelas células foram avaliadas utilizando BCG de *M. bovis* conjugada com isotiocianato de fluoresceína (FITC). As bactérias (10^9 /mL) foram marcadas por incubação de 0,5 mg de FITC por mL em soro fisiológico tamponado com fosfato (pH 7,4) à temperatura ambiente durante 1 hora. As bactérias pulsadas com FITC foram lavadas três vezes para remover FITC não ligado. A captura foi determinada medindo a percentagem de células que ligaram bactérias conjugadas com FITC utilizando citometria de fluxo (FACS Calibur, Becton Dickinson Immunocytometry, San Jose, CA). A fagocitose foi determinada utilizando uma técnica de desativação de fluorescência como descrita anteriormente²⁹. Em resumo, a desativação de BCG de *M. bovis* conjugada com FITC ligada à membrana não internalizada foi conseguida tratando as

células com azul de tripano a 0,05% durante 5 minutos. A ligação de *H. pylori* foi avaliada marcando as bactérias com FITC e a ligação a DC foi investigada de forma semelhante ao ensaio com esférulas.

Produção de citocinas. Para a detecção de citocinas, os sobrenadantes das culturas foram colhidos no dia 1 e congelados a -80 °C até análise. Os sobrenadantes foram analisados quanto à presença de IL-10 e IL-12p40 por ELISA (Biosource International, CA).

Desfucosilação de SEA. Os SEA foram desfucosilados por incubação dos antígenios a 100 °C durante 1 hora em TFA 0,1M. Após neutralização, o antígeno desfucosilado foi revestido em placas de ELISA. A desfucosilação enzimática foi realizada incubando o SEA em fosfato de sódio 50 mM, pH=5,0 com α 1,3/4-fucosidase (0,4 mU/ μ g de SEA) (Calbiochem) de um dia para o outro a 37 °C. O grau de desfucosilação dos antígenios foi avaliado através da sua aptidão para ligar MAb's que reconhecem especificamente os epítomos de glicano fucosilados LDN-DF e Le^x, enquanto a integridade de outros epítomos de glicanos não fucosilados foi avaliada medindo a reatividade com o MAb anti-LDN.

SDS-PAGE, transferência de Western e revelação com prata. Os SEA foram separados por SDS-PAGE sob condições de redução num gel de poliacrilamida a 12,5%, utilizando o sistema Mini-Protean II (BioRad), e as proteínas visualizadas por revelação com prata. Para transferência de Western, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Schleicher e Schuell). A membrana foi bloqueada numa solução de BSA a 5% em TSM durante 2 h seguida de incubação em 2 μ g/mL de DC-SIGN-Fc em tampão de TSM contendo 1% de BSA durante 1 h. Depois de lavar, a

membrana foi subsequentemente incubada durante 1 h em IgG1 de cabra anti-humana conjugada com peroxidase e as bandas reativas foram visualizadas por detecção com substrato de CN/DAB (Pierce).

Citotoxicidade. O ensaio de libertação de ^{51}Cr às 4 horas padrão foi utilizado para avaliar a citotoxicidade mediada por células NK. Resumidamente, 1×10^6 células alvo foram marcadas como 100 μCi de ^{51}Cr durante 1 hora a 37°C , exaustivamente lavadas para remover o ^{51}Cr livre, ressuspensas a 2500 células/poço (iDC e mDC) ou 1000 células/poço (K562 e K562-DC-SIGN), e incubadas com células NK durante 4 horas a 37°C nas proporções indicadas e nas condições indicadas. Após 4 horas foi adicionado líquido de cintilação (Perkin Elmer) aos sobrenadantes, e a libertação de ^{51}Cr foi determinada num contador micro-b (PerkinElmer).

Maturação de DC mediada por células NK. As células NK em repouso e ativadas foram obtidas por incubação de um dia para o outro em meio e IL-2 (1000 U/mL), respetivamente. Depois disso, as células NK em repouso e ativadas foram incubadas de um dia para o outro com DC imaturas numa placa de 96 poços com fundo em U (Costar) em RPMI com 10% de FCS. As células NK foram pré-incubadas durante 10 min. à TA com meio ou mAbs bloqueadores $\alpha\text{LFA-1}$ (NKI-L15, 50 $\mu\text{g/mL}$), enquanto as DC foram pré-incubadas com meio ou mAbs bloqueadores de $\alpha\text{DC-SINAL}$ (AZN-D2, 50 $\mu\text{g/mL}$). Como um controlo positivo, as DC foram incubadas de um dia para o outro na presença de LPS (2 $\mu\text{g/mL}$). A maturação de DC foi avaliada por citometria de fluxo (FACS Scan, Beckman Coulter) para os marcadores de maturação CD80, CD83, CD86, e HLA-DR por mAbs conjugados com PE ou conjugados com FITC.

Ativação de células NK induzida por DC. As células NK em repouso foram incubadas durante 2 dias com DC imaturas ou

maduras (obtidas por maturação com LPS) numa placa de 96 poços com fundo em U (Costar) em RPMI com 10% de FCS. A ativação de células NK induzida por DC dependente de LFA-1 foi determinada por uma pré-incubação de 10 min. de células NK com mAbs contra α LFA-1 (NKI-L15, 50 μ g/mL), enquanto a dependência de DC-SIGN foi avaliada por uma pré-incubação de 10 min. das DC com mAbs anti-DC-SIGN (AZN-D1 e AZN-D2, 50 μ g/mL). Como um controlo positivo, as células NK foram incubadas durante 2 dias com IL-2 (1000 U/mL). A ativação de célula NK foi avaliada por citometria de fluxo (FACS Calibur, Beckman Coulter) para o marcador de ativação precoce CD69 por mAbs conjugados com FITC.

Imunoprecipitação. As células NK foram iodadas na superfície com 1 mCi de ^{125} I, ou biotiniladas e subsequentemente sujeitas a lise em tampão de lise (1% de Triton-X -100, TEA 10 mM, NaCl 150 mM, CaCl_2 1 mM, MgCl_2 1 mM, PMSF 1 mM, 20 μ g/mL de inibidor de tripsina, 20 μ g/mL de leupeptina e 20 μ g/mL de aprotinina). Os ligandos de DC-SIGN, ICAM-2, ICAM-3, e LFA-1 foram imunoprecipitados a partir do lisado de células NK pré-tratado com prot A por esférulas de prot A ligadas covalentemente a DC-SIGN-Fc, α ICAM-2 (12A2), α ICAM-3 (AZN-IC-3/1) e α LFA-1 (NKI-L15). Os imunoprecipitados foram reduzidos em tampão de amostra (contendo 4% de SDS e 5% de b-mercaptoetanol), aquecidos durante 5 min a 95 °C, e analisados em gradiente de 5-15% em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Alternativamente, anticorpos específicos contra CD66acd ou ICAM-3 ou LFA-1 foram revestidos numa placa ELISA, subsequentemente foram adicionados lisados e incubados durante 1 h a 4 °C para retrainir as proteínas específicas. A DC-SIGNFc foi incubada para atividade de ligação às proteínas específicas e revelada com PO Fc de Cabra anti humano e desenvolvida.

Preparação experimental.

As células dendríticas (DC) são instrumentais no manuseamento de agentes patogénicos para processamento e apresentação às células T, desencadeando assim uma resposta imunológica apropriada. As lectinas de tipo C expressas pela função de DC como recetores de reconhecimento de agentes patogénicos; contudo a sua especificidade para estruturas de hidratos de carbono em agentes patogénicos não é completamente entendida. Aqui nós analisámos a especificidade para hidratos de carbono da DC-SIGN/CD209, o recetor de HIV-1 recentemente documentado em DC. Os nossos estudos mostram que a DC-SIGN se liga com alta afinidade a glicoconjugados sintéticos contendo manose e fucose. Estas estruturas de hidratos de carbono são abundantemente expressas por agentes patogénicos como demonstrado pela afinidade da DC-SIGN para os glicanos naturais na superfície dos agentes patogénicos humanos *Mycobacterium tuberculosis*, *Helicobacter pylori*, *Leishmania mexicana* e *Schistosoma mansoni*. Surpreendentemente, estes agentes patogénicos visam a DC-SIGN para infetar as DC mas também para modular as respostas imunológicas mediadas pelas DC.

Esta análise expande o nosso conhecimento sobre a especificidade para os hidratos de carbono e agentes patogénicos da DC-SIGN, e identifica esta lectina como sendo nucle3ar nas interações agente patogénico-DC.

Exemplo 1: Nova Especificidade de hidratos de carbono para a DC-SIGN

Para os estudos de ligação *in vitro*, nós gerámos uma proteína quimérica de DC-SIGN com um marcador Fc de IgG1 humana, que nós utilizámos para rastrear num formato ELISA

para a reatividade com um painel de glicoconjugados sintéticos contendo resíduos de manose ou fucose e seus derivados na forma multimérica.

Como descrito anteriormente, a DC-SIGN-Fc liga-se ao manano derivado de levedura purificado e à gp120 de HIV-1 contendo altos teores de manose, mas também a glicoconjugados contendo manose menos complexos isto é, manose e $\alpha 1 \rightarrow 3$, $\alpha 1 \rightarrow 6$ manotriose (Tabela I, Figura 1). Surpreendentemente, a DC-SIGN liga-se aos antigénios do grupo sanguíneo de Lewis (Le^x , Le^y , Le^a , Le^b), glicano compreendendo pelo menos uma fucose terminal ligado em $\alpha 1,3$ ou $\alpha 1,4$ a N-acetilglucosamina (Le^x , Le^y , Le^a , Le^b , LDNF), ou $\beta 1,2$ a Galactose (Le^y , Le^b) (Tabela I, Figura 1). A sialilação de Le^x (produzindo sialil- Le^x , um ligando de L-, E- e P-selectina) anula completamente o reconhecimento pela DC-SIGN, indicando que a DC-SIGN tem uma especificidade de hidratos de carbono que é distinta daquela das selectinas que medeiam a circulação de leucócitos. A sulfatação reduziu a afinidade de ligação de DC-SIGN para o Le^x , bem como Le^a (Figura 1c). Para comparar em mais pormenor a afinidade de ligação da DC-SIGN com Le^x e $\alpha 1 \rightarrow 3$, $\alpha 1 \rightarrow 6$ -manotriose, foram realizados estudos de titulação com os diferentes glicoconjugados de ligação a DC-SIGN (Figura 1c). Surpreendentemente, a DC-SIGN liga-se com afinidade muito maior ao hidrato de carbono contendo fucose Le^x do que à manotriose. A atividade de ligação da DC-SIGN-Fc a estas estruturas de glicanos foi específica, uma vez que os anticorpos anti-DC-SIGN bloquearam a interação (Figura 1c).

Para determinar se a DC-SIGN-Fc exhibe um perfil de reconhecimento de hidratos de carbono semelhante à DC-SIGN expressa na superfície de células, ambos os transfetantes de DC-SIGN e as DC derivadas de monócitos foram estudados quanto à atividade de ligação de hidratos de carbono

utilizando um ensaio de adesão de esférulas fluorescentes com diferente glicoconjugados ($\alpha 1 \rightarrow 3$, $\alpha 1 \rightarrow 6$ manotriose, Le^x e sulfo- Le^a) (Figura 2). Na realidade, a DC-SIGN expressa pelos transfetantes de K562 ligou-se de forma semelhante aos glicoconjugados que a DC-SIGN-Fc e a ligação foi completamente inibida por anticorpos anti-DC-SIGN (Figura 2). Ainda que as DC expressem muitas outras lectinas de tipo C na sua superfície celular, os nossos dados demonstram que os glicoconjugados contendo Le^x e $\alpha 1 \rightarrow 3$, $\alpha 1 \rightarrow 6$ manotriose são preferencialmente ligados pela DC-SIGN. A interação é específica, uma vez que os anticorpos anti-DC-SIGN inibiram quase completamente a atividade de ligação. Isto ilustra que a DC-SIGN é o recetor principal nas DC para estas estruturas de hidratos de carbono. A ligação de sulfo- Le^a à DC podia ser apenas parcialmente bloqueada por anticorpos anti-DC-SIGN, indicando que outras lectinas de tipo C nas DC competem com a DC-SIGN para ligação de sulfo- Le^a . Os nossos dados mostram que a DC-SIGN reconhece uma gama mais lata de estruturas de glicanos, incluindo antigénios do grupo sanguíneo de Lewis, do que até agora compreendido. Assim, a DC-SIGN pode ser um recetor importante para reconhecimento de novos alvos biologicamente relevantes expressados pelo hospedeiro, ou alternativamente por agentes patogénicos humanos.

Exemplo 2. Nova especificidade de hidratos de carbono (Le^x e alto teor de manose) identifica novos agentes patogénicos (*Helicobacter pylori*, *Schistosoma mansoni*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Leishmania mexicana*) que interagem com a DC-SIGN

Nós investigámos subseqüentemente a ligação de DC-SIGN aos agentes patogénicos humanos que expressam glicanos contendo manose ou fucose. A bactéria Gram negativa *Helicobacter pylori*, a qual induz úlcera pépticas e carcinoma

gástrico²⁰, e o verme parasita (o agente causador de esquistossomose) expressam ambos Le^x ²¹. Na *H. pylori*, o Le^x está presente no lipopolissacárido localizado na superfície, enquanto na *S. mansoni* o Le^x é expresso pró todas as fases do parasita, incluindo no antigénio do ovo solúvel (SEA)²¹. A ligação de DC-SIGN-Fc ao lisado de *H. pylori* positivo para Le^x e para extrair de *S. mansoni* foi forte e foi completamente inibida por anticorpos anti-DC-SIGN (Figura 3); Quando se analisa duas formas diferentes de LPS de *Klebsiella*, uma contendo extremidade de manose e uma sem (Len1 e Len111, respetivamente) (Figura 3B). A DC-SIGN expressa pelas DC também ligou-se a LPS de *H. pylori* purificado (Figura 4). A ligação de DC às células de *H. pylori* e LPS purificado podia ser completamente bloqueada com Mab anti-DC-SIGN (Figura 4). De igual modo, os glicanos presentes em *Mycobacterium tuberculosis*, o agente ocasionador de tuberculose, são ligados pela DC-SIGN (Figura 3). O glicano da superfície com extremidade de manose, lipoarabinomanano de *Mycobacterium tuberculosis* contém provavelmente o sítio de reconhecimento para a DC-SIGN. Isto é ainda apoiado pelo facto de a DC-SIGN também ter-se ligado ao lipofosfoglicano da superfície com extremidade de manose (LPG) expresso por um parasita unicelular que causa leishmaniose (Figura 3). A ligação de DC-SIGN à *Leishmania* foi descrita muito recentemente³⁰ mas nós demonstrámos aqui que o LPG é a estrutura na *Leishmania* que é reconhecida pela DC-SIGN (Figura 3). Não foi observada ligação de DC-SIGN a três agentes patogénicos humanos bacterianos Gram negativos clinicamente relevantes (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*) nem ao *Staphylococcus aureus* Gram positivo. No entanto, outros isolados clínicos de *Klebsiella* que contêm um LPS com extremidade de manose ligam a DC-SIGN. Estas constatações indicam que a ligação de DC-SIGN aos agentes

patogénicos é seletiva, e que a especificidade de hidratos de carbono da DC-SIGN governa um reconhecimento de agentes patogénico mais lato do que apenas os vírus tais como HIV-1 e Vírus ébola^{12,22}.

Exemplo 3 A DC-SIGN interage com *M. tuberculosis* através dos glicolípidos ManLAM

Micobactérias inteiras tais como a estirpe H37Ra de *M. tuberculosis* e Calmette-Guérin (BCG) de *M. bovis bacillus* foram revestidas e a interação de DC-SIGN com estes agentes patogénicos foi analisada utilizando o ensaio de ligação de DC-SIGN-Fc. A BCG de *M. bovis* é uma estirpe de tuberculose que é quase não patogénica mas que retém as propriedades imunológicas da tuberculose. A DC-SIGN-Fc interagiu especificamente com a H37Ra de *M. tuberculosis* e BCG de *M. bovis*, uma vez que a interação foi inibida com anticorpos específicos bloqueadores de DC-SIGN (Figura 6a). *M. smegmatis*, uma estirpe não virulenta que não contém uma extremidade de manose, não liga a DC-SIGN (dados não apresentados).

Além do mais, uma quimera de Fc irrelevante, ICAM-3-Fc, não interagiu com as micobactérias (Figura 6a). A interação é mediada pelo domínio de lectina de tipo C da DC-SIGN, uma vez que a ligação a *M. tuberculosis* e BCG de *M. bovis* foi inibida pelo EGTA, manano e o anticorpo específico contra DC-SIGN, AZN-D1, que reconhece o domínio de lectina²³ (Figura 6a).

Nós investigámos a seguir a ligação de DC-SIGN ao lipoarabinomanano micobacteriano (LAM) purificado, uma vez que a DC-SIGN tem uma alta afinidade para hidratos de carbono contendo manose e o LAM é o componente principal

contendo manose da parede da célula micobacteriana³¹. O LAM compreende um núcleo polissacárido rico em manose, contendo cadeias laterais de arabinofuranosilo altamente ramificadas, e uma âncora GPI (Figura 6b). O LAM isolado a partir de *M. tuberculosis* contém resíduos de manose que consistem exclusivamente de mono-, di- e trímeros de α -D-manoses diretamente ligadas à extremidade de arabinofuranosilo e é denominado ManLAM, enquanto o LAM isolado a partir da *M. smegmatis* de crescimento rápido não tem extremidade de manose e é denominado AraLAM³¹ (Figura 6b). Surpreendentemente, o ManLAM purificado foi eficientemente ligado pela DC-SIGN, em contraste com o AraLAM (Figura 6c), demonstrando que a DC-SIGN interage especificamente com os mono-, di- e trímeros de α -D-manoses de ManLAM. Mesmo em concentrações altas, a DC-SIGN não ligou o AraLAM, demonstrando uma alta especificidade para o ManLAM e para a sua extremidade de manose (Figura 6d). A interação de DC-SIGN com ManLAM é específica, uma vez que a ligação foi inibida por anticorpos contra a DC-SIGN, enquanto uma quimera de Fc irrelevante não interagiu com o ManLAM (Figura 6c). A DC-SIGN interage de forma semelhante com ManLAM e BCG de *M. bovis* inteira indicando que a DC-SIGN liga as micobactérias através de ManLAM (Figura 6a e c).

Exemplo 4 Tanto as micobactérias e o ManLAM interagem com o sítio de ligação primário da DC-SIGN

Nós utilizámos transfetantes de K562 que expressam de forma estável a DC-SIGN para investigar a ligação de DC-SIGN expressa na superfície celular a BCG de *M. bovis* e ao componente micobacteriano ManLAM. Estas células não expressam os recetores micobacterianos previamente descritos Recetor de Manose (MR), CD11b e CD11c (Figura

7a). Os transfetantes de K562 expressam níveis altos de DC-SIGN (Figura 7a) e ligam-se fortemente ao BCG de *M. bovis* e ManLAM, em contraste com as células K562 transfetadas de forma simulada (Figura 7b). A interação é bloqueada por anticorpos específicos para DC-SIGN (Figura 7b). A interação de DC-SIGN com BCG de *M. bovis* e ManLAM é semelhante à dos outros ligandos de DC-SIGN ICAM-3 e HIV-1 (Figura 7b). Assim, a DC-SIGN celular liga-se especificamente a BCG de *M. bovis* e ManLAM, como foi observado com a DC-SIGN-Fc recombinante (Figura 6c).

O domínio de lectina de tipo C da DC-SIGN contém dois sítios de cálcio, e os resíduos de aminoácidos que estão em contacto próximo com o Ca^{2+} no sítio 2 (Glu³⁴⁷, Asn³⁴⁹, Glu³⁵⁴ e Asn³⁶⁵) formam o núcleo do sítios de ligação ao ligando²³. A alteração na DC-SIGN de Glu³⁴⁷ para Gln (E347Q), ou de Asn³⁴⁹ e Asn³⁶⁵ para Asp, resultou na perda completa de ligação às micobactérias inteiras e ManLAM (Figura 7b e dados não apresentados), analogamente como foi demonstrado anteriormente tanto para a ICAM-3 como para a gp120 de HIV-1 (Figura 7b). O Ca^{2+} no sítio 1, o chamado sítio auxiliar, coordena o posicionamento correto do sítio de ligação primário, e a perda deste Ca^{2+} por mutação de Asp³²⁰, Glu³²⁴ (E324A), Asn³⁵⁰ ou Asp³⁵⁵ para resíduos de Ala resultou na perda completa da ligação de BCG de *M. bovis* e ManLAM (Figura 7b e resultados não apresentados).

Recentemente, as requerentes demonstraram que o sítio de ligação de DC-SIGN ao seu ligando celular ICAM-3 é distinto daquele da gp120 de HIV-1, uma vez que uma mutação específica na DC-SIGN (V351G) anula a ligação da ICAM-3, mas não de gp120 de HIV-1 (Figura 7c). Surpreendentemente, o mutante DC-SIGN V351G também interage com a BCG de *M. bovis* bem como ManLAM (Figura 7c), demonstrando que tanto o

HIV-1 como as micobactérias ligam de forma semelhante a DC-SIGN num sítio distinto do ligando celular ICAM-3. A ligação semelhante tanto da BCG de *M. bovis* como do ManLAM aos mutantes de DC-SIGN apoiam ainda mais as nossas observações de que a DC-SIGN interage especificamente com o ManLAM em micobactérias completas. A ligação de esférulas fluorescentes revestidas com neoglicoproteínas distintas de ManLAM que consistem em Arabinose, Arabinose-alfa1,5 manose, Arabinose-alfa1,5Man-alfa 1,2 Man, Ara-alfa, 1,5Man-alfa 1,2Man-alfa 1,2Man ou Ara6 demonstram que a DC-SIGN reconhece particularmente no ManLam uma di-manose (componente Man alfa 1,2) ou manose triose (componente Man alfa 1,2) (Figura 7D).

Exemplo 5 DC-SIGN é um recetor importante para micobactérias nas DC

As DC imaturas expressam, além de níveis altos de DC-SIGN, níveis altos dos recetores MR, CD11b e CD11c (Figura 8a), os quais foram anteriormente descritos como mediando a ligação de micobactérias por macrófagos. Nós utilizámos anticorpos bloqueadores contra estes recetores para avaliar as suas contribuições para a ligação de ManLAM pelas DC. As DC imaturas ligam-se fortemente ao ManLAM, mas não ao AraLAM, e a interação foi inibida pelo anticorpo específico contra DC-SIGN, mas surpreendentemente não o foi por qualquer um dos anticorpos contra MR, CD11b ou CD11c (Figura 8b). Tanto o EGTA como o manano inibidor específico para lectinas de tipo C bloqueiam a ligação de ManLAM pelas DC num grau semelhante aos anticorpos específicos para DC-SIGN, demonstrando que a DC-SIGN é a lectina de tipo C principal de ligação ao ManLAM nas DC imaturas que ligam o ManLAM (Figura 8b).

A contribuição principal da DC-SIGN para a interação de DC imaturas com o ManLAM levou-nos a investigar se a DC-SIGN poderia ser importante na interação das DC imaturas com micobactérias inteiras. As DC imaturas interagiram fortemente com a BCG de *M. bovis* (Figura 8c). Surpreendentemente, a DC-SIGN é um recetor importante para a BCG de *M. bovis*, uma vez que os anticorpos contra DC-SIGN inibiram fortemente a infeção de DC imaturas pela BCG de *M. bovis* (Figura 8c). Os anticorpos contra MR, CD11b e CD11c não inibem a infeção, enquanto o manano inibidor das lectinas de tipo C bloqueou a infeção num nível semelhante ao dos anticorpos contra DC-SIGN (Figura 8c). Além do mais, o ligando de MR manose-BSA não inibiu a interação de DC com BCG de *M. bovis* (Figura 8c) demonstrando que os domínios de MR das lectinas de tipo C não estão envolvidos na infeção das DC pela BCG de *M. bovis*. Tanto o anticorpo anti-MR como a manose-BSA são inibidores da função do MR, uma vez que bloqueiam a ligação de outro ligando de MR, dextrano, às DC (resultados não apresentados). Estes resultados demonstram que a DC-SIGN é a lectina de tipo C principal nas DC que atua como um recetor para a BCG de *M. bovis*. Outros recetores de tipo não lectina podem participar na interação, uma vez que a infeção não foi completamente inibida pelos anticorpos contra DC-SIGN (Figura 8c).

Exemplo 6 DC-SIGN facilita a captura e internalização de BCG de *M. bovis* pelas DC imaturas através da ligação do componente da parede da célula micobacteriana ManLAM.

A seguir, nós investigámos de a DC-SIGN medeia a internalização de BCG de *M. bovis* utilizando azul de tripano para desativar micobactérias conjugadas com FITC na superfície. Células K562 transfetadas de forma simulada não fagocitam a BCG de *M. bovis*, enquanto 50% dos transfetantes

de K562, que expressa DC-SIGN, internalizaram a BCG de *M. bovis* em menos de 45 minutos (Figura 8d). Tanto o manano como os anticorpos contra DC-SIGN bloquearam a internalização de BCG de *M. bovis* (Figura 8d).

As DC imaturas são células altamente fagocitárias e, na realidade, em menos de 45 minutos mais de 90% das células dendríticas que ligaram a BCG de *M. bovis*, tinham internalizado as micobactérias (Figura 8e). De forma semelhante ao que foi observado para a ligação de BCG de *M. bovis* pelas DC (Figura 8c), a fagocitose de BCG de *M. bovis* é parcialmente bloqueada por anticorpos contra DC-SIGN enquanto os anticorpos anti-MR e o ligando de MR manose-BSA não inibiram a fagocitose observado (Figura 8e). Estes resultados demonstram que a DC-SIGN facilita a captura e internalização de BCG de *M. bovis* pelas DC imaturas através da ligação do componente da parede da célula micobacteriana ManLAM.

Exemplo 7. As micobactérias e ManLAM são internalizadas pela DC-SIGN e direcionadas para os lisossomas

Recentemente, nós demonstrámos que a DC-SIGN pode atuar como um recetor de antigénios que internaliza os antigénios e os direciona para os compartimentos lisossómico para apresentação em MHC de Classe II¹⁰. Por conseguinte, o destino da BCG de *M. bovis* capturada pelas DC imaturas foi seguida por análises de imunofluorescência. As DC imaturas foram incubadas com BCG de *M. bovis* conjugada com FITC durante 2 horas e tanto a DC-SIGN como a Lamp-1 foram reveladas (Figura 9a). A colocalização observada da DC-SIGN com a BCG de *M. bovis* conjugada com FITC apoia ainda mais um papel para a DC-SIGN na captura e internalização de micobactérias (Figura 9a). As micobactérias fagocitadas são

direcionadas para os lisossomas, uma vez que as micobactérias conjugadas com FITC internalizadas colocalizam-se com a revelação de Lamp-1 (Figura 9a). De forma semelhante, o ManLAM foi também capturado e internalizado pela DC-SIGN em DC imaturas, uma vez que a revelação do ManLAM o colocou com a DC-SIGN (Figura 9a) enquanto o AraLAM não foi internalizado pelas DC (resultados não apresentados). O ManLAM internalizado colocalizou com o marcador lisossômico LAMP-1/CD107a em DC imaturas (Figura 9a) indicando que o ManLAM internalizado é direcionado para os lisossomas. Assim, tanto as micobactérias inteiras como o componente da parede celular ManLAM são internalizados de forma semelhante pelas DC imaturas através da DC-SIGN, o que apoia os resultados de que a DC-SIGN interage com o ManLAM nas micobactérias.

Recentemente, nós demonstrámos que a ligação de ligandos ou anticorpos solúveis à DC-SIGN desencadeia a internalização do complexo DC-SIGN-ligando para os endossomas/lisossomas finais, e resulta na regulação negativa da DC-SIGN a partir da superfície¹⁰. Por conseguinte, nós investigámos se a DC-SIGN é internalizada após ligação do ManLAM medindo a expressão de DC-SIGN na superfície das células após ligação do ManLAM utilizando um anticorpo específico contra DC-SIGN. Na realidade, a ligação de ManLAM, mas não de AraLAM, à DC-SIGN resulta na regulação negativa da DC-SIGN (Figura 9b), demonstrando que a DC-SIGN nas DC liga o ManLAM e medeia a internalização de ManLAM para os lisossomas CD107a⁺. Além do mais, outros recetores de micobactérias tais como MR, CD11b e CD11c não foram regulados negativamente (Figura 9b). Assim, a ligação de ManLAM à DC-SIGN desencadeia a internalização do complexo DC-SIGN/ManLAM, e podia possibilitar o processamento do antígeno de ManLAM pelas DC.

Exemplo 8. ManLAM altera a produção de citocinas pelas DC através da DC-SIGN

O ManLAM está presente não só como um componente da parede de células micobacterianas mas é também segregado a partir de fagossomas após ingestão de macrófagos de *M. tuberculosis*³¹. Potencialmente, as micobactérias em macrófagos infectados pode influenciar células imunitárias espetadoras e modular a resposta imunológica através da secreção de ManLAM. A citocina IL-10 é um fator imunossupressor potente induzida nos macrófagos por algumas bactérias intracelulares para diminuir as respostas imunológicas do hospedeiro e promover a sua sobrevivência³². Nós investigamos a influência da ligação de ManLAM à DC-SIGN na produção de IL-10 pelas DC. O ManLAM sozinho não induziu a produção de IL-10 pelas DC imaturas (Figura 10a). Surpreendentemente, o ManLAM, mas não o AraLAM, induziu fortemente a produção de IL-10 pelas DC, quando receberam simultaneamente uma sinal de ativação, tal como o LPS (Figura 10a). Esta indução de IL-10 foi completamente inibida por anticorpos específicos contra DC-SIGN ao nível das DC ativadas com LPS sozinhas (Figura 10a). As observações de que apenas o ManLAM poderia induzir a produção de IL-10, a qual poderia ser bloqueada por anticorpos específicos contra DC-SIGN indica que a indução de IL-10 é específica para a interação ManLAM/DC-SIGN. Os anticorpos contra DC-SIGN sozinhos não induzem a produção de IL-10 pelas DC ativadas por LPS (Figura 10a), demonstrando que a ligação de DC-SIGN sozinha não é suficiente para a indução de IL-10. Assim, a ligação de ManLAM à DC-SIGN desencadeia sinais intracelulares que induzem a produção de IL-10 pelas DC, indicando que as micobactérias visam a DC-SIGN para suprimir a resposta imunológica e promover a sua sobrevivência no hospedeiro. Tanto as DC imaturas como as DC ativadas por LPS, sozinhas

ou em associação com ManLAM, produziam quantidades muito baixas de IL-12p70 (<5 pg/mL). A infecção de DC imaturas com BCG de *M. bovis* induziu uma forte produção de IL-10 que não foi inibida pelos anticorpos contra DC-SIGN (Figura 10b). Não foram observadas diferenças na presença de ManLAM (Figura 10b). Estes resultados sugerem que as micobactérias induzem a produção de IL-10 por infecção direta bem como pela segregação de ManLAM.

Exemplo 9. ManLAM inibe a ativação de DC mediada pelo TLR4 através da DC-SIGN

As DC imaturas são altamente eficazes na captura e processamento de antígenos, enquanto as DC maduras são especializadas na ativação de células T naíf necessárias para as respostas imunológicas celulares. As DC imaturas amadurecem em resposta a sinais de 'perigo' específicos tais como componentes bacterianos (LPS) ou citocinas inflamatórias (TNF α , PGE $_2$). Nós investigamos o efeito do ManLAM na maturação de DC. Nem o ManLAM nem o AraLAM induziram a maturação de DC, uma vez que tanto o ManLAM como o AraLAM, em contraste com o LPS que desencadeia o TLR4, não regulam positivamente a expressão dos marcadores de ativação CD80, CD83, CD86 ou HLA-DR (Figura 11a).

As infecções micobacterianas agudas representam sítios de inflamação que atraem e induzem a maturação das DC através da presença de componentes de maturação. Por conseguinte, nós investigamos o efeito de ManLAM e AraLAM em combinação com o estimulador bacteriano LPS. A interação do recetor de tipo Toll-4 (TLR4) com o LPS gera sinalização intracelular, muito especialmente através do fator de transcrição NF κ B, que resulta em ativação/maturação das DC. Na realidade, as DC maturam eficazmente na presença de LPS sozinho (Figura 11b). Surpreendentemente, esta ativação induzida por LPS é

inibida na presença de ManLAM, uma vez que os níveis de expressão dos marcadores de ativação CD80, CD83 e CD86 foram consideravelmente inferiores àqueles de DC ativadas por LPS (Figura 11b). A inibição observada da ativação/maturação das DC é específica para o ManLAM, uma vez que o AraLAM não inibiu a ativação de DC (Figura 11b). Isto é ainda apoiado pela aptidão de anticorpos contra DC-SIGN, que inibem a ligação de ManLAM, para restabelecer completamente a maturação induzida por LPS na presença de ManLAM (Figura 11b). Estes resultados indicam que a ligação de ManLAM à DC-SIGN gera sinais intracelulares que interferem com a ativação de DC mediada por TLR4. Além do mais, este processo é específico para a interação ManLAM-DC-SIGN e a ligação de DC-SIGN sozinha não é suficiente, uma vez que os anticorpos contra DC-SIGN não bloqueiam a ativação/maturação de DC induzida por LPS (Figura 11b).

Exemplo 10. Maturação de DC induzida por BCG de *M. bovis* é inibida pelo ManLAM.

Tanto a *M. tuberculosis* como a BCG de *M. bovis* são capazes de induzir a maturação de DC através dos seus componentes da parede celular através de sinalização mediada por TLR2 e TLR4³³⁻³⁶. Na realidade, a infecção de DC imaturas por BCG de *M. bovis* resulta na maturação das DC, como demonstrado pela expressão aumentada de MHC de classe II e das moléculas co-estimuladoras CD80, CD83 e CD86 após infecção por BCG de *M. bovis* (Figura 12a). A seguir, nós investigámos se a ligação de ManLAM à DC-SIGN impediu a maturação de DC induzida por BCG de *M. bovis*, uma vez que as DC imaturas atraídas para os sítios de infecção micobacteriana encontrarão ManLAM segregado e micobactérias intactas. Surpreendentemente, a maturação de DC induzida por BCG de *M. bovis* é inibida fortemente pelo ManLAM (Figura 12b). A expressão de MHC de

classe II, CD80, CD83 e CD86 em DC infetadas por BCG de *M. bovis* na presença de ManLAM foi consideravelmente inferior à em DC infetadas por BCG de *M. bovis* (Figura 12b). Além do mais, a maturação foi quase totalmente restabelecida quando as DC foram pré-incubadas com o anticorpo específico bloqueador contra DC-SIGN (Figura 12b), demonstrando que a interação de ManLAM com a DC-SIGN previne a maturação de DC por BCG de *M. bovis*. Além do mais, o AraLAM não bloqueou a maturação de DC por BCG de *M. bovis* (Figura 11c), uma vez que as moléculas co-estimuladoras, CD80, CD83 e CD86, são expressas em níveis semelhantes em DC infetadas e DC infetadas tratadas com AraLAM. Isto indica que a interação DC-SIGN-ManLAM bloqueia a maturação de DC induzida por LPS bem como BCG de *M. bovis*.

Exemplo 11. Antigénios do ovo solúveis (SEA) de *S. mansoni* ligam-se a células dendríticas imaturas (DC) humanas através da interação com DC-SIGN.

Uma vez que as DC são fundamentais na coordenação das respostas Th1-Th2, nós procurámos um recetor da superfície celular expresso nas DC que interagisse com o SEA de *S. mansoni*. Para detetar a ligação de SEA às DC imaturas humanas, foi desenvolvido um ensaio de adesão de esférulas fluorescentes. As esférulas fluorescentes foram pré-revestidas com anticorpos monoclonais (MAbs) contra os antigénios de glicanos de SEA e, em seguida, utilizadas para capturar SEA. As esférulas conjugadas foram deixadas interagir com as DC. O SEA é uma mistura de glicoproteínas, contendo muitos antigénios de glicanos imunogénicos (3, 36). Os antigénios de glicanos principais presente no SEA, e o reconhecimento destes antigénios pelos MAbs anti-glicano, são representados na Figura 13. Para capturar o SEA nas esférulas fluorescentes, nós utilizámos MAbs contra

GalNAc β 1,4GlcNAc (LDN) e GalNAc β 1,4(Fuc α 1,2Fuc α 1,3)GlcNAc (LDN-DF) (Figura 13), ambos epítomos que ocorrem em muitos glicoconjugados dentro do SEA e que estão ausentes nas DC. Foi observada forte ligação de SEA às DC com esférulas fluorescentes revestidas com SEA que foram acopladas via MAb anti-LDN bem como via MAb anti-LDN-DF (Figura 14b). A ligação de SEA às DC foi comparável em força à ligação de gp120 de HIV-1 às DC. Uma vez que a DC-SIGN das lectinas de tipo C e o MR, que são expressos pelas DC imaturas (Figura 14a), são recetores potenciais para o reconhecimento de antígenos de glicanos, nós investigámos se os anticorpos dirigidos contra o CRD das lectinas de tipo C destas moléculas, ou o hapteno manano poderiam inibir a ligação de SEA às DC. A ligação de SEA às DC foi fortemente bloqueada tanto pelo anti-DC-SIGN MAb AZN-D1, que se liga ao CRD da DC-SIGN, como pelo e manano, mas não pelo MAb anti-MR clone 19 (Figura 14b). Estes dados indicam que a DC-SIGN não é apenas um recetor de agentes patogénicos nas DC para o HIV-1, mas também para o SEA de Schistosoma.

Exemplo 12. Uma subfração de SEA contém ligandos de alta afinidade para DC-SIGN.

A fim de analisar adicionalmente as propriedades de ligação da DC-SIGN ao SEA de *S. mansoni*, nós investigámos a ligação de DC-SIGN-Fc quimérica solúvel ao SEA. Num ensaio baseado em ELISA, a DC-SIGN-Fc mostrou ligação eficiente a poços revestido com SEA (Figura 15a). A ligação de DC-SIGN-Fc ao SEA é mediada pelo CRD da DC-SIGN, uma vez que a interação foi completamente inibida pelo anticorpo anti-DC-SIGN AZN-D1, ou EGTA que remove iões Ca²⁺ que são essenciais para a ligação dos hidratos de carbono. A ligação de DC-SIGN-Fc ao SEA é provável que seja de alta afinidade, uma vez que foi observada ligação a concentrações muito baixas de revestimento de SEA (Figura 16). Uma vez que o SEA contém

muitas glicoproteínas diferentes, nós investigámos se um subconjunto de glicoproteínas dentro do SEA interage com a DC-SIGN. As glicoproteínas de SEA foram separadas por SDS-PAGE e analisadas por transferência de Western com DC-SIGN-Fc e anticorpos anti-glicano reativos com Le^x e LDN-DF, respetivamente. Entre as proteínas presentes no SEA uma proteína principal de aproximadamente 70-80 kD, e duas proteínas secundárias de alto peso molecular apresentaram interação com DC-SIGN-Fc solúvel (Figura 17). De forma notável, algumas glicoproteínas de peso molecular aparente semelhante àsquelas que reagem com a DC-SIGN-Fc ligaram-se aos MABs específicos para os glicanos de Le^x e LDN-DF.

Exemplo 13. DC-SIGN liga-se aos glicanos α 3-fucosilados.

Muitas glicoproteínas de SEA estão fortemente fucosiladas (3, 36). Uma vez que foi descrito que a DC-SIGN pode exibir ligação à manose e à fucose, e a transferência de Western de SEA sugeriu que os glicanos Le^x e/ou LDN-DF estão presentes nas proteínas SEA com MM aparente semelhante às proteínas de SEA de ligação à DC-SIGN, nós explorámos se a desfucosilação de SEA afeta o seu reconhecimento pela DC-SIGN-Fc. O tratamento de SEA com a Xantomonas α 1,3/1,4-fucosidase resultou numa diminuição de 50% da reatividade de MAb anti-Le^x para o SEA, enquanto não foi observada perda na reatividade, como esperado, com o Mab anti-LDN-DF. O epítipo de LDN-DF contém fucose ligada α 2 terminal. Assim, os resultados indicam que o tratamento com glicosidase removeu especificamente a parte das unidades α 3-fucose presentes no SEA. A perda em 3/4 resíduos de fucose no SEA após tratamento com a Xantomonas α 1,3/ α 1,4-fucosidase também resultou numa perda de 25% da ligação de DC-SIGN-Fc (resultados não apresentados). Estes dados sugerem que os resíduos de fucose ligados α 1,3/ α 1,4 podem

ser importantes para a ligação de DC-SIGN-Fc solúvel ao SEA.

A seguir, nós investigámos se um ou mais dos antígenos de SEA Le^x, LDNF ou LDN-DF (ver Figura 13) fucosilados podem atuar como ligando(s) para a DC-SIGN em SEA. Nós analisámos o potencial de DC-SIGN-Fc para ligar-se a neoglicoproteínas contendo estes antígenos de glicano por ELISA. Os resultados mostram que a DC-SIGN-Fc interage fortemente com a neoglicoproteína HSA-Le^x e em um grau menor com BSA-LDNF, as quais têm ambas uma α 3-fucose terminal. Em contraste, a DC-SIGN-Fc não liga a BSA-LDN-DF na qual a α 3-fucose é terminada com uma α 2-fucose (Figura 18). A ligação é dependente de fucose, uma vez que não foi observada ligação às neoglicoproteínas que têm Gal β 1,4GlcNAc (LN) ou GalNAc β 1,4GlcNAc (LDN). A ligação ao Le^x e LDNF pela DC-SIGN é mediada através do seu CRD, uma vez que a ligação foi inibida por anti-DC-SIGN e EDTA. Em conclusão, estes resultados indicam que a DC-SIGN reconhece fortemente o trissacárido α 3-fucosilado Le^x e muito provavelmente interage com glicanos α 3-fucosilados no SEA tal como Le^x e/ou LDNF.

Exemplo 14. O resíduo de aminoácido Val³⁵¹ dentro da DC-SIGN é crucial para ligação da DC-SIGN ao SEA e ao Le^x

O domínio de lectina de tipo C da DC-SIGN liga dois íons Ca²⁺ e os resíduos de aminoácidos em contacto próximo com o Ca²⁺ no sítio 2 (Glu³⁴⁷, Asn³⁴⁹, Glu³⁵⁴ e Asn³⁶⁵) ou com o Ca²⁺ no sítio 1 (Asp³²⁰, Glu³²⁴, Asn³⁵⁰ e Asp³⁵⁵) são essenciais para ligação ao ligando³⁷. Uma vez que os resultados acima indicaram que o trissacárido α 3-fucosilado Le^x no SEA pode atuar como um ligando para a DC-SIGN, nós investigámos as propriedades de ligação destes antígenos aos transfetantes de células K562 que expressam formas mutadas de DC-SIGN. A

mutação de E³²⁴ para Ala, ou E³⁴⁷ para Gln na DC-SIGN (Figura 19a) resultou na perda completa de interação com o SEA e o Le^x, indicando que a ligação a estes antigénios é mediada através do sítio de ligação a ligando primário e é dependente de Ca²⁺ (Figura 19b). Isto é semelhante aos resultados descritos para ligação da DC-SIGN à gp120 de HIV-1³⁷.

Foi recentemente demonstrado que uma mutação específica no CRD de DC-SIGN (V³⁵¹G) permite a ligação de gp120 de HIV-1, mas anula a ligação à ICAM-3, um ligando de células T que foi anteriormente demonstrado que interage com a DC-SIGN. Os nossos resultados indicam que o mutante DC-SIGN V³⁵¹G não se liga ao SEA ou Le^x, enquanto se continuou a observar a ligação ao HIV-1, indicando que a Val³⁵¹ é essencial para a ligação ao SEA e ao Le^x, mas não ao HIV-1 (Figura 19b). Para determinar se o sítio de ligação de SEA se sobrepõe com os sítios de ligação de ICAM-3 ou HIV-1 na DC-SIGN, nós explorámos se o SEA inibe a interação de DC-SIGN com ICAM-3 e gp120 de HIV-1 num ensaio de ligação de DC. Os resultados demonstram que o SEA pode inibir a interação entre as DC e a ICAM-3 tão eficazmente quanto o MAb anti-DC-SIGN, enquanto a ligação de DC-SIGN à gp120 de HIV foi apenas parcialmente inibida pelo SEA (Figura 19c). Estes resultados demonstram que o sítio de ligação de SEA no DC-SIGN pode assemelhar-se ao sítio de ligação de ICAM-3 e pode sobrepor-se parcialmente ao sítio de ligação da gp120 de HIV-1.

Exemplo 15. L-SIGN não interage com a ligação da DC-SIGN ao SEA ou Lewis X

A L-SIGN, um recetor de adesão que se assemelha à DC-SIGN ao reconhecer as ICAM-2, ICAM-3 e gp120 de HIV, contém um CRD que é quase idêntico ao da DC-SIGN³⁸, e ambos os

recetores reconhecem N-glicanos do tipo de alto teor de manose. Os nossos resultados acima demonstraram uma nova atividade de ligação de DC-SIGN aos glicanos fucosilados e mostraram que a Val³⁵¹ na DC-SIGN é essencial para a sua atividade de ligação. Na posição correspondente no CRD da L-SIGN está presente uma Ser em vez de Val (Figura 19a), suscitando a questão de a L-SIGN pode reconhecer os SEA e Le^x. A ligação de L-SIGN a estes antigénios foi investigada por um ensaio de adesão onde esférulas fluorescentes contendo SEA e Le^x-PAA, respetivamente, foram incubadas com células K562 transfetadas que expressam DC-SIGN e L-SIGN recombinantes (Figura 19e). As células K562 que expressam L-SIGN (K-L-SIGN) não interagem com SEA nem com Le^x-PAA, mas apresentaram interação com a gp120 de HIV-1. As células K562 que expressam DC-SIGN (K-DC-SIGN) ligaram-se aos SEA e Le^x, como esperado (Figura 19b). Estes dados mostram que os dois recetores altamente relacionados DC-SIGN e L-SIGN têm especificidade de ligação de hidratos de carbono e características de reconhecimento de agentes patogénicos distintas.

Exemplo 16. Nova especificidade de hidratos de carbono prevê e confirma novas contra-estruturas celulares para a DC-SIGN; a DC-SIGN reconhece hidratos de carbono Le^x no CD66a presente em granulócitos para mediar interações DC-granulócitos

A DC-SIGN é conhecida por interagir com ICAM-2 e ICAM-3, contudo os ligandos de glicanos nestas moléculas ainda não foram identificados. O antigénio do grupo sanguíneo Le^x (CD15) é expresso pelas células epiteliais da mucosa gástrica, e por leucócitos polimorfonucleares (granulócitos) (Figura 20a); na realidade, esférulas revestidas com DC-SIGN-Fc ligam-se fortemente aos granulócitos (Figura 20b). Além do mais, a DC-SIGN-Fc

também se liga fortemente aos granulócitos (Figura 21). A ligação é específica para a DC-SIGN, uma vez que pode ser inibida por anticorpos anti-DC-SIGN, manano e depleção de cálcio pelo EGTA, mas também por um anticorpo anti-Le^x indicando que a interação celular é dependente de Le^x (Figura 20 e 21). Além do mais, um anticorpo contra Le^x reduz especificamente a adesão observada de DC-SIGN a CD66a, CD66e e CD11b demonstrando que os hidratos de carbono Le^x participam, na realidade, na interação (Figuras 20, 54, 59D). Outras estruturas de glicanos tais como Le^y e Le^b podem estar também envolvidas, uma vez que o bloqueio observado não é completo. Isto demonstra que os granulócitos expressam uma glicoproteína da superfície celular que expressa uma estrutura de glicano que é reconhecida pela DC-SIGN.

Além do mais, nós prevemos que com base no padrão de reconhecimento de hidratos de carbono da DC-SIGN (Figura 1), a DC-SIGN pode mediar também a ligação de DC às células tumorais, uma vez que a expressão de Le^y está aumentada em muitos carcinomas incluindo os cancros do ovário, pâncreas, próstata, mama, cólon e células não pequenas do pulmão²⁴, enquanto o sulfo-Le^a está presente em certos tumores que expressam mucinas. Assim, estes resultados indicam que o reconhecimento de estruturas de hidratos de carbono distintas pela DC-SIGN pode permitir adesão celular mediada pelas DC às células T, células endoteliais, PMNs bem como às células tumorais.

Estudos de imunoprecipitação revelaram que a DC-SIGN-Fc não se liga às contra-estruturas celulares de DC-SIGN, ICAM-2 ou ICAM-3, de granulócitos mas liga-se a uma nova glicoproteína com um peso de 66kD, proteína que está apenas presente nos granulócitos (Figura 22a). O facto de a DC-SIGN ligar hidratos de carbono Le^x e o facto de os

granulócitos expressarem níveis altos de CD66a, um recetor da superfície celular que tem Le^x com um peso molecular de 66kD (Figura 22b e c), levou-nos a examinar a ligação de CD66a-Fc a transfetantes que expressam DC-SIGN e a DC imaturas que expressam DC-SIGN. Foi observada ligação forte de CD66a à DC-SIGN expressada pelas DC e pelas transfetantes de DC-SIGN (Figura 23c), de maneira semelhante à observada para a ligação de ICAM-3 (Figura 23b). As esférulas não revestidas não interagem com estas células (Figura 23a). A interação de CD66a com DC-SIGN pareceu mais forte do que a interação ICAM-3-DC-SIGN anteriormente descrita. Estes dados indicam que o CD66a é uma nova contra-estrutura celular de DC-SIGN e pode desempenhar um papel importante na mediação das interações celulares DC-granulócitos que desempenham um papel nas respostas imunológicas inatas.

Exemplo 17. DC-SIGN liga-se fortemente a um subconjunto de células no sangue periférico.

Para determinar se a DC-SIGN interage preferencialmente com células T naíf que expressam níveis altos de ICAM-3, como foi previamente postulado, nós começámos por investigar a ligação de DC-SIGN à população total de células PBL. Surpreendentemente, a DC-SIGN-Fc interagiu com uma população de células CD3⁺ que eram CD56⁺ e pertencia ao subconjunto de células NK (Figura 24). Além do mais, a interação foi dependente da concentração (Figura 25) e podia ser bloqueada com anticorpos contra DC-SIGN (Figura 24 e 25). As células NK CD56⁺ no sangue podem ser divididas em duas populações de células: células NK CD56^{obscorecidas}CD16⁺ e CD56^{luminosas}CD16⁻ (Figura 26). A DC-SIGN-Fc ligou-se especificamente à população NK CD56^{obscorecidas}CD16⁺ e a interação podia ser inibida por anticorpos anti-DC-SIGN (Figura 26). A ICAM-1-Fc não interagiu com a população NK

CD56^{obscorecidas}CD16⁺, demonstrando que a interação de DC-SIGN-Fc é específica e não mediada pelo marcador Fc. Ambas as populações de células NK foram capazes de interagir especificamente com a ICAM-1-Fc após ativação da sua β 2 integrina LFA-1 (Figura 26). Assim, estes resultados indicam que as DC interagem com as células NK CD56^{obscorecidas}CD16⁺ através da DC-SIGN. Surpreendentemente, ambas as populações de NK têm níveis semelhantes de ICAM-2 e ICAM-3, indicando que a DC-SIGN pode ligar outros novos ligandos na população NK CD56^{obscorecidas}CD16⁺. Na realidade, a imunoprecipitação revela que a DC-SIGN-Fc liga, além da ICAM-2, também uma molécula com peso molecular de 166 kDa (Figura 27). Este ligando poderia ser o CD166 ou CD16, o qual está fortemente glicosilado e é apenas expresso em células NK.

Exemplo 18. DC-SIGN medeia a interação DC-células NK e está envolvido na lise de DC imaturas pelas células NK.

Para investigar se a interação de DC-SIGN com células NK é relevante na resposta imunológica mediada por NK, nós investigámos a lise das DC pelas células NK e a maturação de DC pelas células NK; dois processos que foram recentemente identificados como desempenhando um papel importante na imunidade inata.

A DC-SIGN não inibiu a maturação das DC pelas células NK (Figura 28) mas estava fortemente envolvida na lise de DC imaturas mediada pelas NK (Figura 29), uma vez que os anticorpos contra DC-SIGN inibiram a lise mediada por NK das DC. Estes dados indicam que a DC-SIGN regula a interação de DC imaturas com células NK ligando um proteína de 166 kDa nas células NK CD56^{obscorecidas}CD16⁺. Esta interação DC-SIGN-células NK melhora também fortemente a lise mediada por NK de linhas de células transfetadas com DC-SIGN

(Figura 30), enquanto os anticorpos contra DC-SIGN inibem a lise. Estes resultados indicam que a DC-SIGN pode ser importante na interação das DC com células NK e que a inibição desta interação previne a lise mediada por NK.

Exemplo 19. DC-SIGN interage com o Vírus herpes simplex tipo 1 e 2

Resultados anteriores demonstraram que a DC-SIGN interage especificamente com o HIV-1³⁹ e recentemente foi publicado que a DC-SIGN liga-se ao Vírus ébola⁴⁰. Por conseguinte, nós investigámos se a DC-SIGN e o seu homólogo L-SIGN podem interagir com outros vírus, que contêm proteínas de envelope glicosiladas. Surpreendentemente, a DC-SIGN-Fc liga-se fortemente ao Vírus herpes simplex (HSV)-1 e -2, e esta interação é especificamente inibida por anticorpos contra DC-SIGN (Figura 31). Uma análise adicional demonstra que a DC-SIGN interage com a glicoproteína gB de HSV (Figura 32), uma vez que a DC-SIGN expressa pelas DC e transfetantes liga-se fortemente a esférulas revestidas com gB. Esta interação é bloqueada com anticorpos anti-DC-SIGN (Figura 32). A DC-SIGN é especificamente expressa pelas DC e a L-SIGN é expressa pelas células endoteliais sinusoidais do fígado (LSEC) e algumas populações de macrófagos. Estes dados indicam que tanto a DC-SIGN como a L-SIGN poderiam estar envolvidas na interação de HSV com DC e LSEC, respetivamente. Na realidade, a DC liga-se fortemente à gB de HSV-1 e as interações são mediadas pela DC-SIGN, uma vez que os anticorpos contra DC-SIGN bloqueiam esta interação (Figura 32). Assim, a interação de DC com HSV é mediada pela DC-SIGN e esta lectina de tipo C poderia ser importante na infeção de DC por estes vírus. Além do mais, estes dados poderiam sugerir que estes vírus visam a DC-SIGN em DC não só para infetar estas DC mas também para

fugir à resposta imunológica modulando a função das DC como nós demonstrámos para as micobactérias e HIV-1.

Exemplo 20

Materiais e métodos particulares a este exemplo e relevantes para as experiências descritas nas legendas das figuras 33 a 66.

Estirpes bacterianas.

Isolados clínicos de *H. pylori* de diferentes origens geográficas (Países Baixos, Canadá, Polónia, Itália e República Popular da China) foram anteriormente descritos⁵, bem como a estirpe NCTC 11637 de *H. pylori* e variantes de fase 1c, K4,1, K5,1, 3a, e 1b⁹. Foram descritos o mutante 4187E de *H. pylori* e a geração de mutantes anulados *futA* (gene HP0379) e *futB* (gene HP0651)¹⁰. O isolado clínico de *H. pylori* J223 foi obtido de Dr. H.P. Wirth⁶. Variantes positivas e negativas para Le^{x/y} de J223 foram isoladas como anteriormente descrito⁹. Resumidamente, bactérias da biopsia foram inoculadas em placas Dent (ágar Columbia, 5% de sangue de cavalo + suplemento Dent), seguida de uma única passagem em fase líquida (caldo Brucella + 3% de soro fetal de vitelo) e distribuição sobre meio sólido, após o que ocorreu a deteção de variantes de fase de LPS por transferência de colónias⁹. A genotipagem através de análise por Polimorfismo de Comprimento de Fragmento Amplificado (AFLP) foi realizada como descrito na referência³⁹ com as seguintes modificações: : Num volume final de 20 mL, 20 ng de ADN cromossómico purificado foi digerido com 1 U de EcoRI (Farmacia, Uppsala, Suécia) e 1 U de *MseI* (New England Biolabs, Beverly, MA). O volume final foi em seguida aumentado até 30 mL por adição de 50

pmol de cada um de adaptador *EcoRI* e adaptador *MseI*, 1,2 U de T4 ADN-ligase (Pharmacia), ATP 1 mM e tampão de ligase. Os adaptadores foram deixados ligar-se aos fragmentos de restrição durante 16 h a 167 °C, após o que a amostra foi diluída com água destilada num volume final de 500 mL. O iniciador *EcoO* (50-AGACTGCGTACCAATTC-30 ; Isogen Bioscience, Maarssen, Países Baixos) marcado com Vermelho do Texas fluorescente e o iniciador *MseO* (50 - GACGATGAGTCCTGAG-30) não marcado foram utilizados para amplificação do ADN num sistema de PCR GeneAmp termociclador 9700 (PerkinElmer) com 35 ciclos: desnaturação (30 s a 94 °C), emparelhamento (30 s a 65 - 56 °C), e prolongamento da molécula de ADN (60 s a 72 °C). Nos primeiros 12 ciclos, a temperatura de emparelhamento foi diminuída 0,7 °C por ciclo. Após conclusão do programa de ciclos, cada amostra foi analisada de acordo com as instruções do fabricante num sequenciador de ADN automático Vistra 725 (Amersham Life Science). As imagens fluorescentes de AFLP foram armazenadas como ficheiros TIFF com o software Vistra 2 TIFF (Amersham).

Anticorpos monoclonais e glicoconjugados.

As estirpes de *H. pylori* e variantes de fase foram serotipados como anteriormente descrito⁵ com os seguintes anticorpos monoclonais (mAbs): Hp151, específico para Le^y, 6H3, específico para Le^x monomérico e 4D2, específico para H tipo 1 (todos os três uma oferta generosa de R. Negrini, General Hospital, Brescia, Itália). MAb 54.1F6A, específico para Lewis x polimérico (uma oferta generosa de G. van Dam, Leiden, Países Baixos), NAM61-1A2, específico para o antigénio i (uma oferta generosa de D. Blanchard, Regional Blood Transfusion Service, Nantes, França)¹⁰. Os MAb AZN-D1 e AZN-D2²¹ foram utilizados para bloquear a DC-SIGN e o MAb Clone 17 (uma oferta generosa de S. Gordon, University

of Oxford, UK) foi utilizado para bloquear o recetor de manose. Os glicoconjugados sintéticos (Syntesome, Munique, Alemanha) compreenderam mono- e oligossacáridos que foram ligados de forma multivalente a um veículo de poliacrilamida. Antígenos Le^x diméricos, triméricos e tetraméricos ligados a ceramida foram uma oferta generosa de R.R. Schmidt, University of Konstanz, Alemanha, e foram sintetizados como descrito⁴⁰.

Células

As DC imaturas foram geradas cultivando monócitos em RPMI-1640/10% de FCS na presença de IL-4 (500 U/mL, Schering-Plough, Kenilworth, NJ) e GM-CSF (800 U/mL, Schering-Plough) durante 5-8 dias⁴¹. As células K-562, células K-562-DC-SIGN e macrófagos RAW 264.7 foram cultivados como descrito⁴¹.

Ligação bacteriana

As células *H. pylori* foram marcadas com FITC. As células (50 000) em TSM com 0,5% de BSA foram pré-incubadas com 20 ug/mL de mAb, 200 ug/mL de manano ou EDTA 10 mM durante 10 min à TA. As bactérias marcadas com FITC (10 bactérias/célula) foram adicionadas e incubadas durante 45 min a 37 °C. As amostras foram analisadas por citometria de fluxo.

Ensaio de adesão de DC-SIGN-Fc solúvel.

O ensaio de adesão de DC-SIGN solúvel foi realizado por ELISA⁴². Os antígenos ($3,75 \times 10^6$ células bacterianas/poço ou 5 µg/mL, no caso de LPS ou glicoconjugados) foram revestidos em placas de ELISA e a ligação de DC-SIGN-Fc solúvel (1 µg/mL em TSM) foi determinada por um ELISA anti-

Ig humana-Fc. Quando indicado, a DC-SIGN-Fc foi pré-incubada com 20 ug/mL de mAb, 200 ug/mL de manano ou EDTA 5 mM durante 10 min à temperatura ambiente.

Imuno-histoquímica

Após consentimento informado pelos doentes, foram recolhidas 2 biopsias antrais durante gastroscopia. Criossecções de tecido foram fixas em acetona e incubadas com AZN-D1 seguido de anti-rato-HRP. A revelação foi realizada com o kit ABC-AP Vectastain e AEC (Vetor Laboratories, Burlingame, CA) e secções foram submetidas a revelação de contraste com hematoxilina. Em paralelo, a outra biopsia foi analisada quanto à infeção por *H. pylori* por incubação em meio de urease durante 12 h. Não foram observadas diferenças na morfologia e revelação entre indivíduos não infetados e infetados.

Ativação de DC e diferenciação Th1/Th2

A fim de analisar a maturação, as DC (180 000 células) foram incubadas com *H. pylori* durante 1 h a uma multiplicidade de infeção (M.O.I) de 1, 5, 10, 20, lavadas e cultivadas durante 20 h. As células foram analisadas quanto aos marcadores de maturação (CD80, CD86, CD83, HLA-DR) por citometria de fluxo e o sobrenadante foi recolhido para ELISA de citocinas²². Para diferenciação das células T, as DC foram cocultivadas com *H. pylori* (M.O.I de 10) durante 2 dias, lavadas e incubadas com células T CD45RA+, CD4+ (5 000 células T/20 000 DC). Em paralelo, as DC foram analisadas quanto aos marcadores de maturação, descritos acima, e à produção de citocinas após estimulação com J558 transfetadas com CD40L (oferta generosa de P. Lane, University of Birmingham, UK) na presença ou ausência de IFN- γ (1000 U/mL).

As células T quiescentes foram novamente estimuladas com PMA (10 ng/mL, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) e ionomicina (1 µg/mL, Sigma-Aldrich) durante 6 h, as últimas 5 h na presença de brefeldina A (10 µg/mL, Sigma-Aldrich). A produção de células únicas de IL-4 e IFN-γ foi determinada por citometria de fluxo intracelular⁴³.

Resultados

Foi demonstrado que a DC-SIGN tem uma especificidade de hidratos de carbono para hidratos de carbono que contêm manose, antigénios de Lewis e estruturas que contêm GlcNAc (Figura 33, 34, 63-66). Nós demonstrámos que a especificidade de hidratos de carbono da L-SIGN é diferente, uma vez que não reconhece estruturas de hidratos de carbono de antigénios de Lewis enquanto reconhece estruturas com teores elevados de manose (Figura 33 e 34). O homólogo murídeo mSIGNR1 reconhece, de forma semelhante à DC-SIGN, antigénios com alto teor de manose e antigénios de Lewis, mas tem também especificidade para antigénios de Lewis sialilados em contraste com DC-SIGN e L-SIGN (Figura 33 e 34).

A DC-SIGN é uma lectina de tipo C em particular altamente expressa em Células dendríticas. A sua função é reconhecer antigénios e processá-los e apresentá-los muito eficientemente em moléculas MHC de classe I e II.

Julga-se desde há muito que a DC-SIGN é um recetor de reconhecimento de agentes patogénicos que reconhece agentes patogénicos para ativar o sistema imunitário, mas como parece agora, a longa lista de agentes patogénicos que visam a DC-SIGN persistem todos e escapam à imunidade por diferentes mecanismos. Nós temos agora quatro exemplos de

agentes patogénicos que visam a DC-SIGN para sobreviver no hospedeiro.

1. HIV-1 e HCV visam a DC-SIGN para se 'esconderem' dentro das DC e escaparem ao encaminhamento intracelular para o compartimento lisossómico.
2. A secreção de ManLam por micobactérias visa a DC-SIGN para induzir a modulação negativa da maturação das DC induzida pelos TLR, e indução de IL-10.
3. o agente patogénico gástrico humano *Helicobacter pylori* persiste: Variantes de fase de lipopolissacáridos modulam o equilíbrio Th1/Th2 através da interação com a célula dendrítica lectina DC-SIGN.
4. Os lactobacilos visam a DC-SIGN nas DC e induzem células T reguladoras, a inibição do reconhecimento de lactobacilos pela DC-SIGN reduz o estado regulador das células T. Por conseguinte, é suposto que a DC-SIGN seja um recetor que reconhece 'normalmente' auto-antígenios a tolerar (Annual Review Immunology, 2004). Nós demonstrámos aqui que a abordagem de DC-SIGN por lactobacilos pode, de facto, induzir células T reguladoras. Além disso, parece que a DC-SIGN pode reconhecer também o antígeno tumoral CEA (CD66e) em particular Lewis X e Y. Estes antígenios tumorais podem ser segregados e suprimem a ativação de DC de uma maneira semelhante ao ManLam das micobactérias da tuberculose.

A interação de DC com granulócitos é elucidada pelo facto de a DC-SIGN reconhecer os CD66a e CD11b em granulócitos. Em particular, é reconhecido o antígeno Lewis X nestas moléculas. Dessa maneira, a DC-SIGN atua como um recetor de adesão celular que medeia as interações celulares dos granulócitos com DC. Esta função adesiva celular entre granulócitos e células dendríticas nunca foi descrita mas é provável que a interação granulócitos-DC seja essencial para formar uma ponte entre a resposta imunológica inata e

a resposta imunológica adaptativa, de tal forma que o granulócito passa os agentes infecciosos às DC construindo uma resposta imunológica adequada. Em particular, o granulócito ativa e matura as DC, induzindo a regulação positiva de citocinas e moléculas co-estimuladoras que são necessárias para a migração das DC e iniciação da resposta imunológica adaptativa. A interação das DC com os granulócitos é também observada in vivo no caso da doença de Crohn. Um novo agente patogénico que interage com a DC-SIGN nas DC é a *Neisseria Meningitidis*. As estirpes variantes demonstram que, em particular, uma estirpe mutante IgtB interage, a qual contém um resíduo de GlcNAc na posição final. Outras experiências (Figura 66) demonstram que a DC-SIGN também reconhece a GlcNAc.

Referências

1. Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y. J. Liu, B. Pulendran, e K. Palucka. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18:767-811.
2. Banchereau, J. e R. M. Steinman. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245-52.
3. Lanzavecchia, A. e F. Sallusto. 2001. Regulation of T cell immunity by dendritic cells. *Cell* 106:263-6.
4. Steinman, R. M. 1991. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 9:271-96.
5. Palucka, K. e J. Banchereau. 2002. How dendritic cells and microbes interact to elicit or subvert protective immune responses. *Curr Opin Immunol* 14:420-31.
6. Underhill, D. M. e A. Ozinsky. 2002. Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr Opin Immunol* 14:103-10.
7. Thoma-Uszynski, S., S. Stenger, O. Takeuchi, M. T. Ochoa, M. Engele, P. A. Sieling, P. F. Barnes, M.

- Rollinghoff, P. L. Bolcskei, M. Wagner, S. Akira, M. V. Norgard, J. T. Belisle, P. J. Godowski, B. R. Bloom, e R. L. Modlin. 2001. Induction of direct antimicrobial activity through mammalian toll-like receptors. *Science* 291:1544-7.
8. Figdor, C. G., Y. van Kooyk, e G. J. Adema. 2002. C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. *Nature Rev Immunol* 2:77-84.
9. Mahnke, K., M. Guo, S. Lee, H. Sepulveda, S. L. Swain, M. Nussenzweig, e R. M. Steinman. 2000. The dendritic cell receptor for endocytosis, DEC-205, can recycle and enhance antigen presentation via major histocompatibility complex class II-positive lysosomal compartments. *J Cell Biol* 151:673-84.
10. Engering, A., T. B. Geijtenbeek, S. J. van Vliet, M. Wijers, E. van Liempt, N. Demaurex, A. Lanzavecchia, J. Fransen, C. G. Figdor, V. Piguet, e Y. van Kooyk. 2002. The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells. *J Immunol* 168:2118-26.
11. Drickamer, K. 1999. C-type lectin-like domains. *Curr Opin Struct Biol* 9:585-90.
12. Geijtenbeek, T. B. H., D. S. Kwon, R. Torensma, S. J. van Vliet, G. C. F. van Duijnhoven, J. Middel, I. L. Cornelissen, H. S. Nottet, V. N. KewalRamani, D. R. Littman, C. G. Figdor, e Y. van Kooyk. 2000. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* 100:587-97.
13. Astarie-Dequeker, C., E. N. N'Diaye, V. Le Cabec, M. G. Rittig, J. Prandi, e I. Maridonneau-Parini. 1999. The mannose receptor mediates uptake of pathogenic and nonpathogenic mycobacteria and bypasses bactericidal responses in human macrophages. *Infect Immun* 67:469-77.
14. Geijtenbeek, T. B. H., R. Torensma, S. J. van Vliet, G. C. F. van Duijnhoven, G. J. Adema, Y. van Kooyk, e C. G. Figdor. 2000. Identification of DC-SIGN, a novel dendritic

cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* 100:575-85.

15. Geijtenbeek, T. B. H., Krooshoop, D. J. E. B., Bleijs, D. A., van Vliet, S. J., vanDuijnhoven, G. C. F., Grabovsky, V., Alon, R., Figdor, C. G., e vanKooyk, Y. DC-SIGN/ICAM-2 interaction mediates dendritic cell trafficking. *Nature Immunology* 1(4), 353-357. 2000.

16. van Remoortere, A., Hokke, C. H., van Dam, G. J., van Die, I., Deelder, A. M., e van den Eijnden, D. H. (2000) *Glycobiology* 10, 601-609

17. Nyame, A. K., Leppanen, A. M., Debose-Boyd, R., e Cummings, R. D. (1999) *Glycobiology* 9, 1029-1035

18. Nyame, K. A., Leppanen, A., Bogitsh, B. J., e Cummings, R. D. (2000) *Exp Parasitol* 96, 202-212

19. Geijtenbeek, T. B. H., van Kooyk, Y., van Vliet, S. J., Renes, M. H., Raymakers, R. A. P., e Figdor, C. G. (1999) *Blood* 94, 754-764

20. Appelmelk, B. J., M. A. Monteiro, S. L. Martin, A. P. Moran, e C. M. Vandenbroucke-Grauls. 2000. Why *Helicobacter pylori* has Lewis antigens. *Trends Microbiol* 8:565-70.

21. Srivatsan, J., Smith, D. F., e Cummings, R. D. (1992) *J Biol Chem* 267, 20196-20203

22. Alvarez, C. P., F. Lasala, J. Carrillo, O. Muniz, A. L. Corbi, e R. Delgado. 2002. C-Type Lectins DC-SIGN and L-SIGN Mediate Cellular Entry by Ebola Virus in cis and in trans. *J Virol* 76:6841-4.

23. Geijtenbeek, T. B. H., van Duijnhoven, G. C. F., van Vliet, S. J., Krieger, E., Vriend, G., Figdor, C. G., e van Kooyk, Y. (2002) *J Biol Chem* 277, 11314-11320

24. Kudryashov, V., P. W. Glunz, L. J. Williams, S. Hintermann, S. J. Danishefsky, e K. O. Lloyd. 2001. Toward optimized carbohydrate-based anticancer vaccines: epitope clustering, carrier structure, and adjuvant all influence antibody responses to Lewis(y) conjugates in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:3264-9.

25. Keizer, G.D., J. Borst, C.G. Figdor, H. Spits, F. Miedema, C. Terhorst, e J.E. De Vries. 1985. Biochemical and functional characteristics of the human leukocyte membrane antigen family LFA-1, Mo-1 and p150,95. *Eur J Immunol* 15:1142-8.
26. Caligaris-Cappio, F., G. Pizzolo, M. Chilosi, L. Bergui, G. Semenzato, L. Tesio, L. Morittu, F. Malavasi, M. Gobbi, R. Schwarting, e a.l. et. 1985. Phorbol ester induces abnormal chronic lymphocytic leukemia cells to express features of hairy cell leukemia. *Blood* 66:1035-42.
27. Negrini, R., L. Lisato, I. Zanella, L. Cavazzini, S. Gullini, V. Villanacci, C. Poiesi, A. Albertini, e S. Ghielmi. 1991. *Helicobacter pylori* infection induces antibodies cross-reacting with human gastric mucosa. *Gastroenterology* 101:437-45.
28. Sallusto, F. e A. Lanzavecchia. 1994. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 179:1109-18.
29. Hed, J., G. Hallden, S.G. Johansson, e P. Larsson. 1987. The use of fluorescence quenching in flow cytometry to measure the attachment and ingestion phases in phagocytosis in peripheral blood without prior cell separation. *J Immunol Methods* 101:119-25.
30. Colmenares, M., A. Puig-Kroger, O.M. Pello, A.L. Corbi, e L. Rivas. 2002. Dendritic Cell (DC)-specific Intercellular Adhesion Molecule 3 (ICAM-3)-grabbing Nonintegrin (DC-SIGN, CD209), a C-type Surface Lectin in Human DCs, Is a Receptor for *Leishmania Amastigotes*. *J Biol Chem* 277:36766-9.
31. Chatterjee, D. e K.H. Khoo. 1998. Mycobacterial lipoarabinomannan: an extraordinary lipoheteroglycan with profound physiological effects. *Glycobiology* 8:113-20.

32. Redpath, S., P. Ghazal, e N.R. Gascoigne. 2001. Hijacking and exploitation of IL-10 by intracellular pathogens. *Trends Microbiol* 9:86-92.
33. Demangel, C., A.G. Bean, E. Martin, C.G. Feng, A.T. Kamath, e W.J. Britton. 1999. Protection against aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection using *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette Guerin-infected dendritic cells. *Eur J Immunol* 29:1972-9.
34. Henderson, R.A., S.C. Watkins, e J.L. Flynn. 1997. Activation of human dendritic cells following infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 159:635-43.
35. Inaba, K., M. Inaba, M. Naito, e R.M. Steinman. 1993. Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including bacillus Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens in vivo. *J Exp Med* 178:479-88.
36. Tsuji, S., M. Matsumoto, O. Takeuchi, S. Akira, I. Azuma, A. Hayashi, K. Toyoshima, e T. Seya. 2000. Maturation of human dendritic cells by cell wall skeleton of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin: involvement of toll-like receptors. *Infect Immun* 68:6883-90.
37. Geijtenbeek, T.B., G.C. van Duijnhoven, S.J. van Vliet, E. Krieger, G. Vriend, C.G. Figdor, e Y. van Kooyk. 2002. Identification of different binding sites in the dendritic cell- specific receptor DC-SIGN for intercellular adhesion molecule 3 and HIV- 1. *J Biol Chem* 277:11314-20.
38. Bashirova, A.A., T.B.H. Geijtenbeek, G.C.F. van Duijnhoven, S.J. van Vliet, J.B. Eilering, M.P. Martin, L. Wu, T.D. Martin, N. Viebig, P.A. Knolle, V.N. KewalRamani, Y. van Kooyk, e M. Carrington. 2001. A dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin (dc-sign)-related protein is highly expressed on human liver sinusoidal endothelial cells and promotes hiv-1 infection. *J Exp Med* 193:671-8.

39. Geijtenbeek 2000 como proporcionado noutra parte nesta lista.

40. Alvarez, C.P., F. Lasala, J. Carrillo, O. Muniz, A.L. Corbi, e R. Delgado. 2002. C-type lectins DC-SIGN and L-SIGN mediate cellular entry by Ebola virus in cis and in trans. J Virol 76:6841-4.

Lisboa, 24 de novembro de 2015

REIVINDICAÇÕES

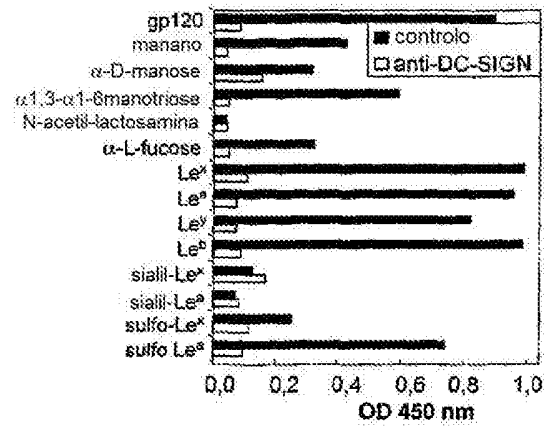
1. Utilização de um glicoconjugado que compreende um antigénio tumoral e um antigénio Lewis X não sialilado capaz de se ligar à DC-SIGN numa célula apresentadora de antigénios para a preparação de uma composição para estimular uma resposta imunológica contra o antigénio tumoral num indivíduo.
2. Utilização de acordo com a reivindicação 1 em que o antigénio tumoral é um péptido ou glicolípido capaz de ser apresentado no contexto de MHC de classe I ou classe II ou C1 b.
3. Composição para ser utilizada na estimulação de uma resposta imunológica contra um antigénio tumoral num indivíduo, em que a referida composição compreende um glicoconjugado do antigénio tumoral e um antigénio Lewis X não sialilado capaz de se ligar à DC-SIGN numa célula apresentadora de antigénios.
4. Composição para ser utilizada de acordo com a reivindicação 3 em que o antigénio tumoral é um péptido ou glicolípido capaz de ser apresentado no contexto de MHC de classe I ou classe II ou C1b.

Lisboa, 24 de novembro de 2015

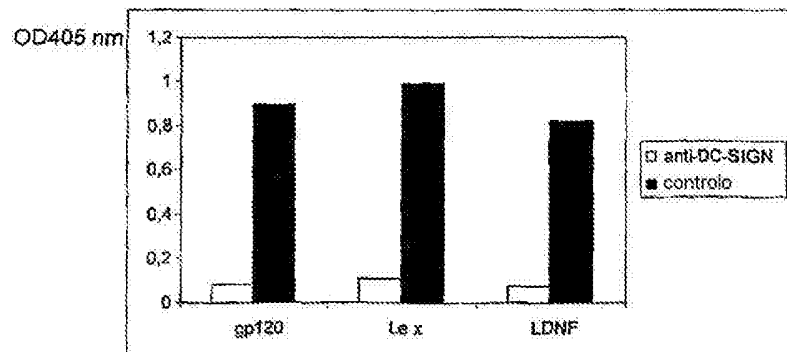
Fig. 1

A É tabela de estruturas

B



C



D

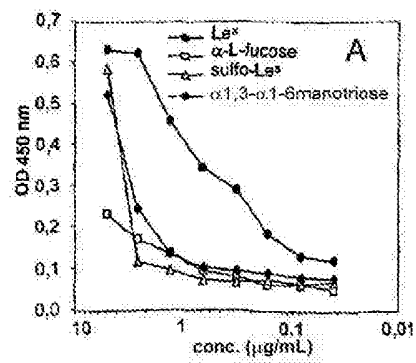
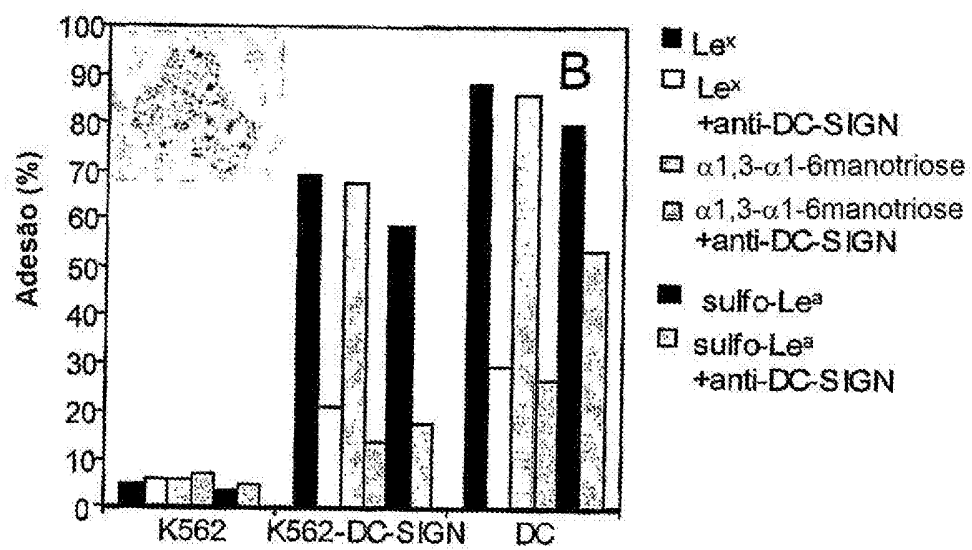


Fig. 2



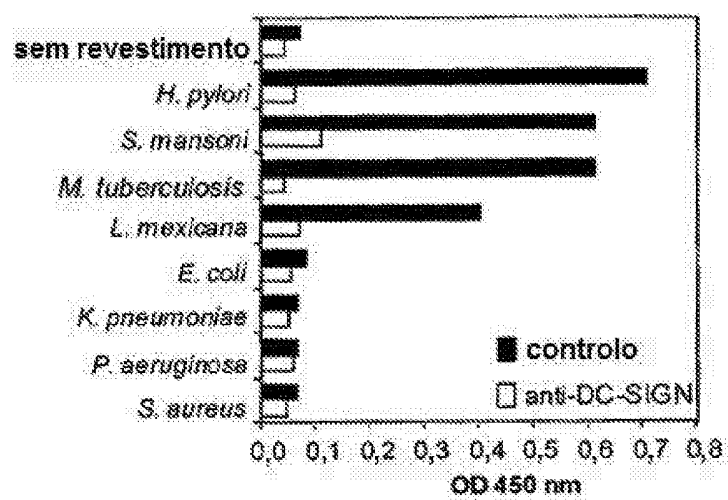


Fig. 3A

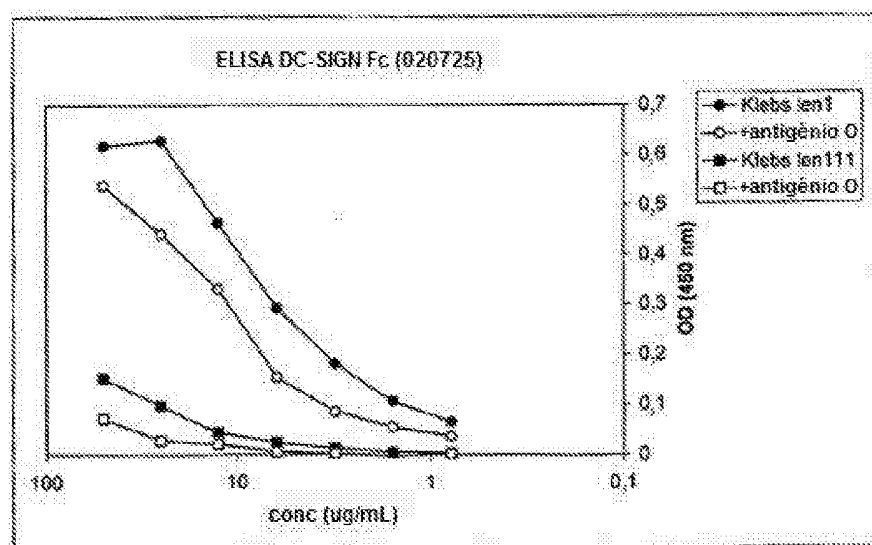


Fig. 3B

Fig. 4

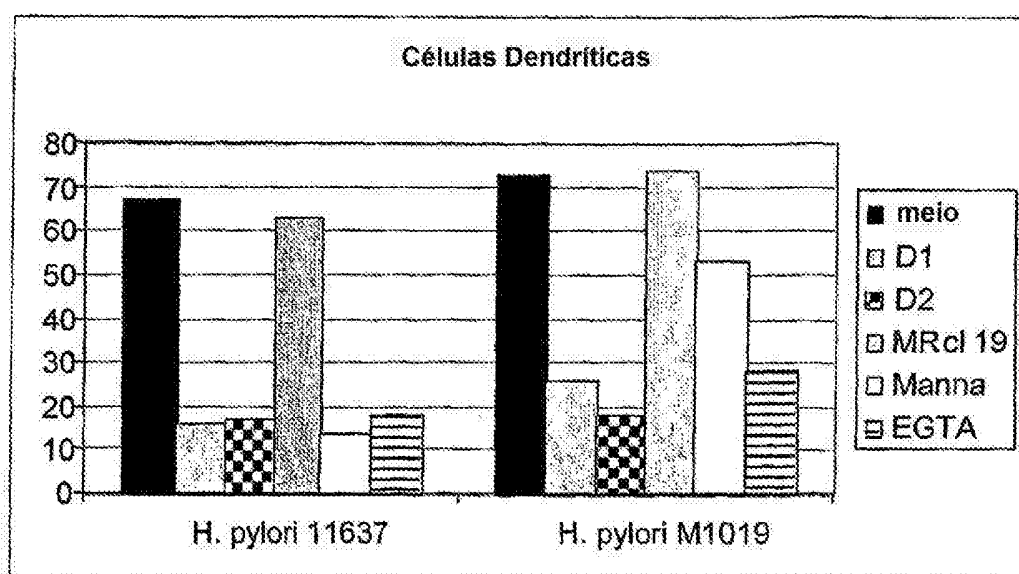


Fig. 5

Verde: CD107a
Vermelho: Le^x-PAA-bio

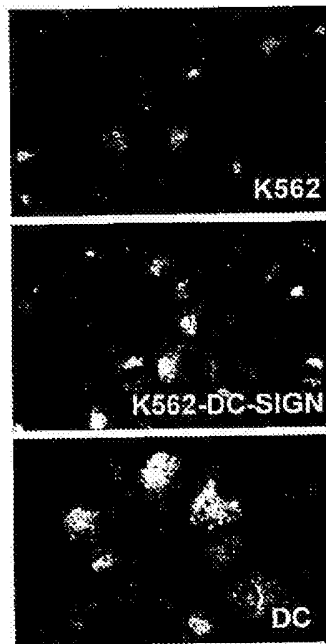


Fig. 6

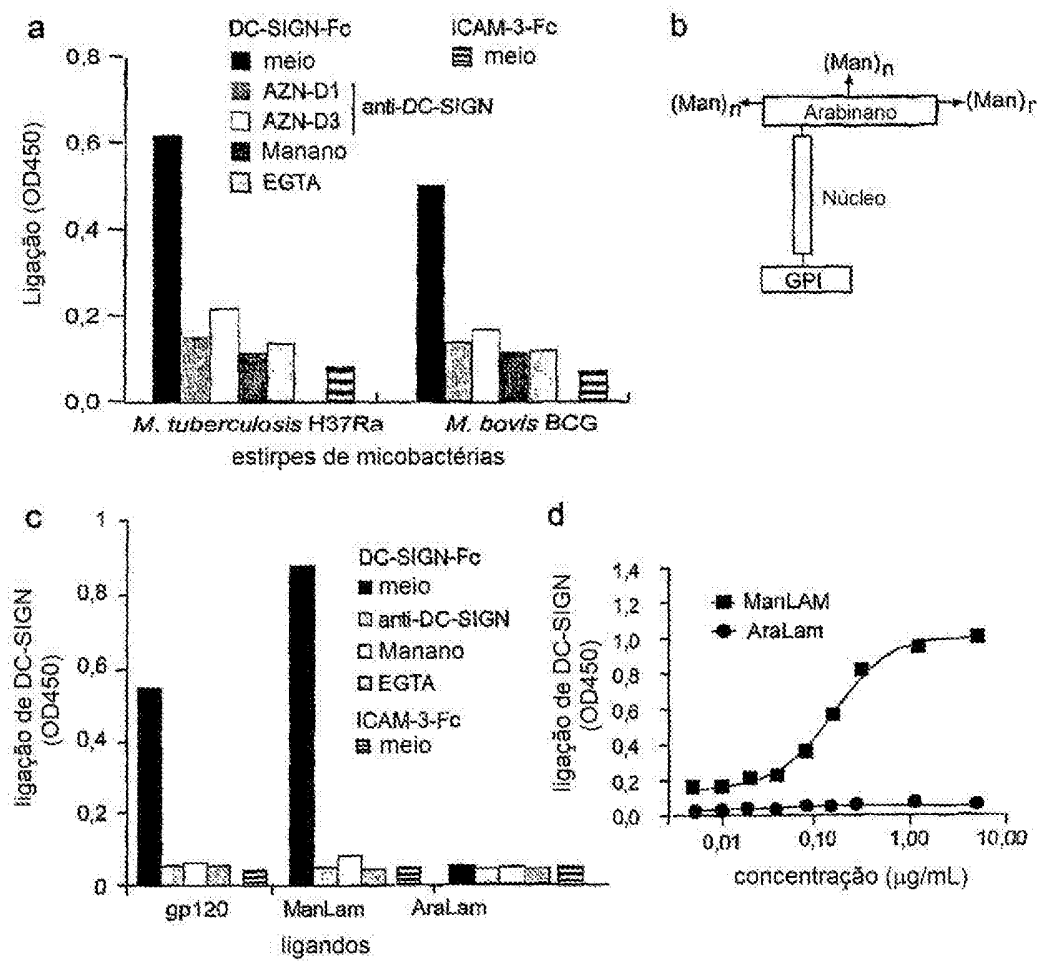


Fig. 7

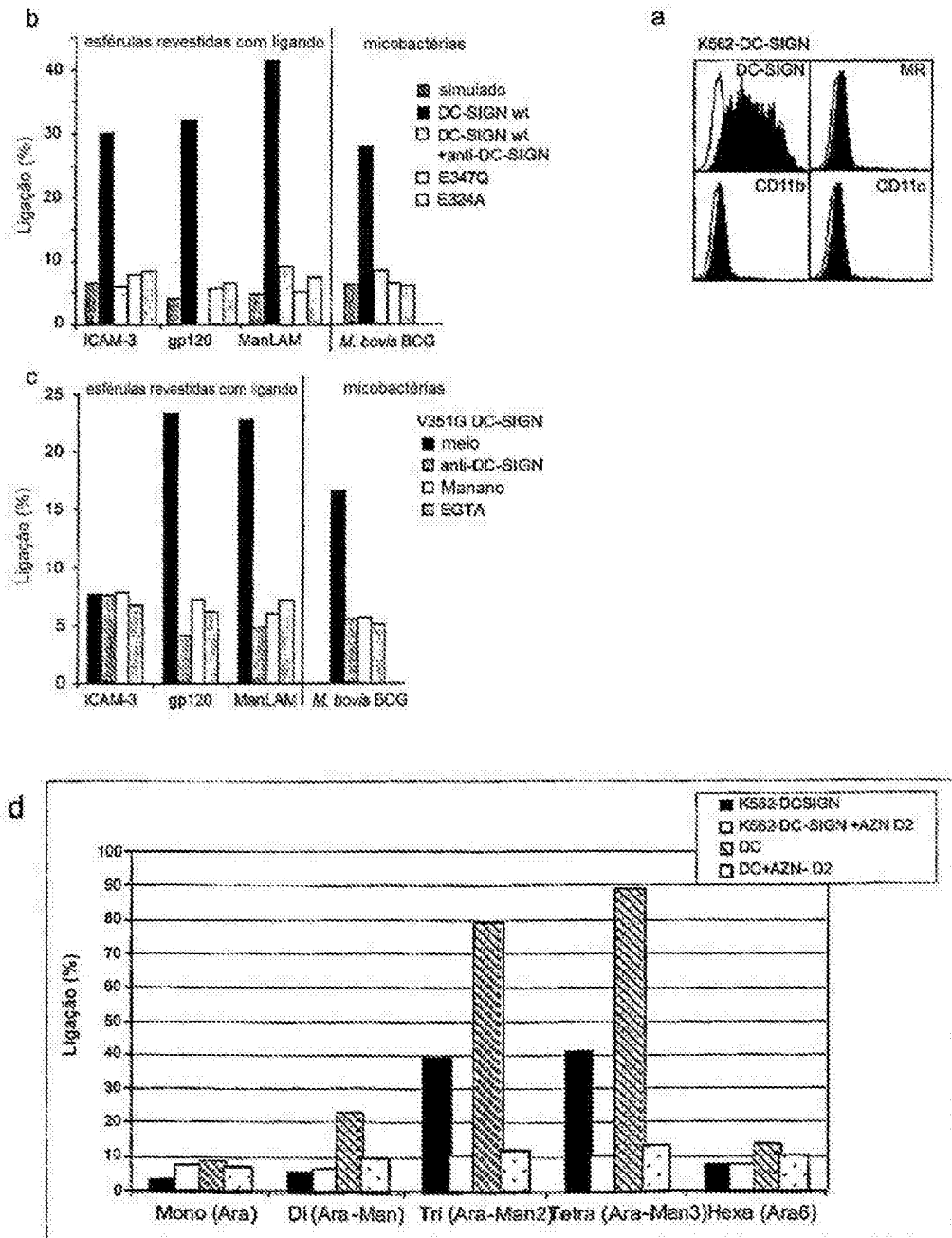


Fig. 8

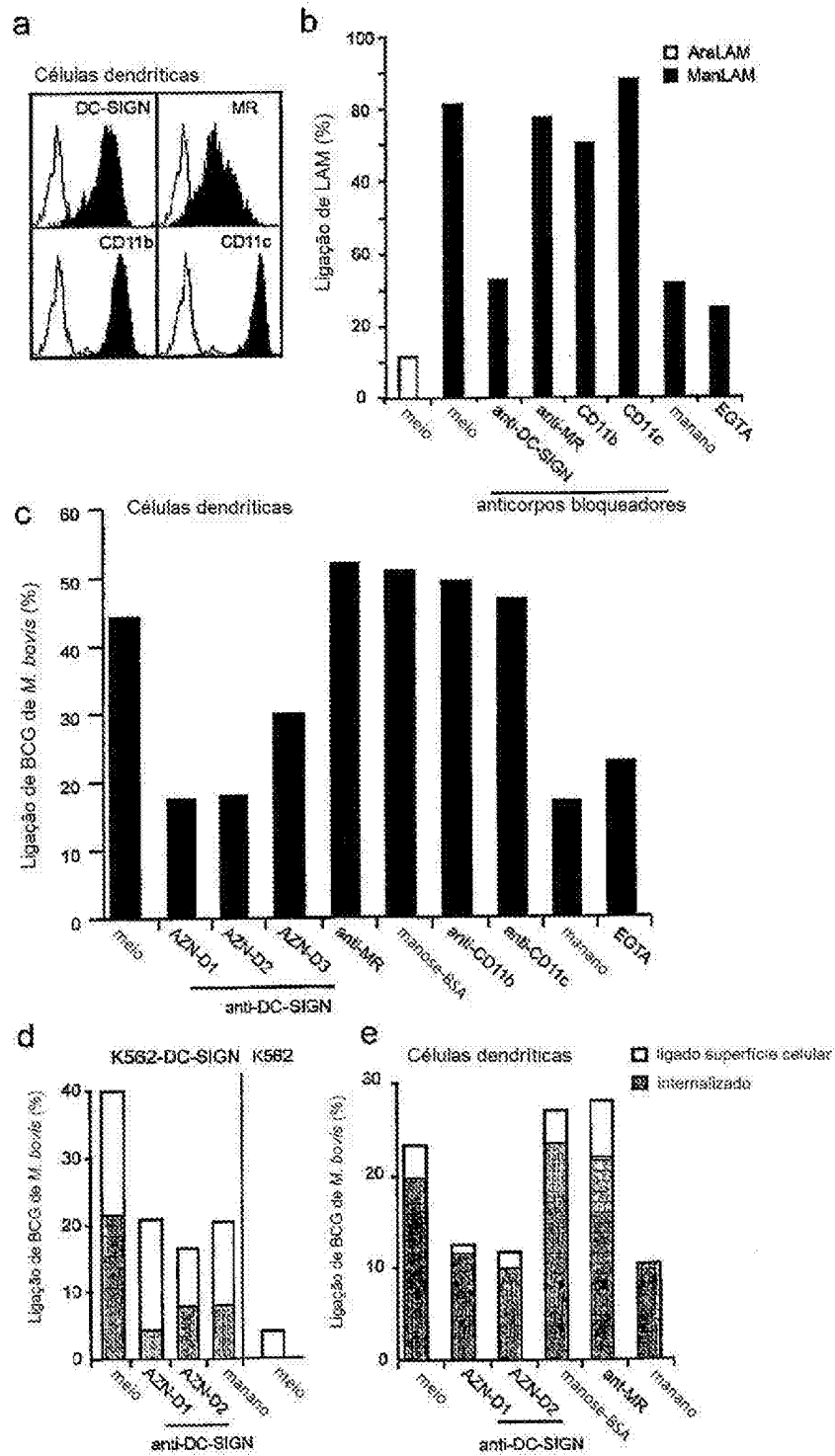


Fig. 9

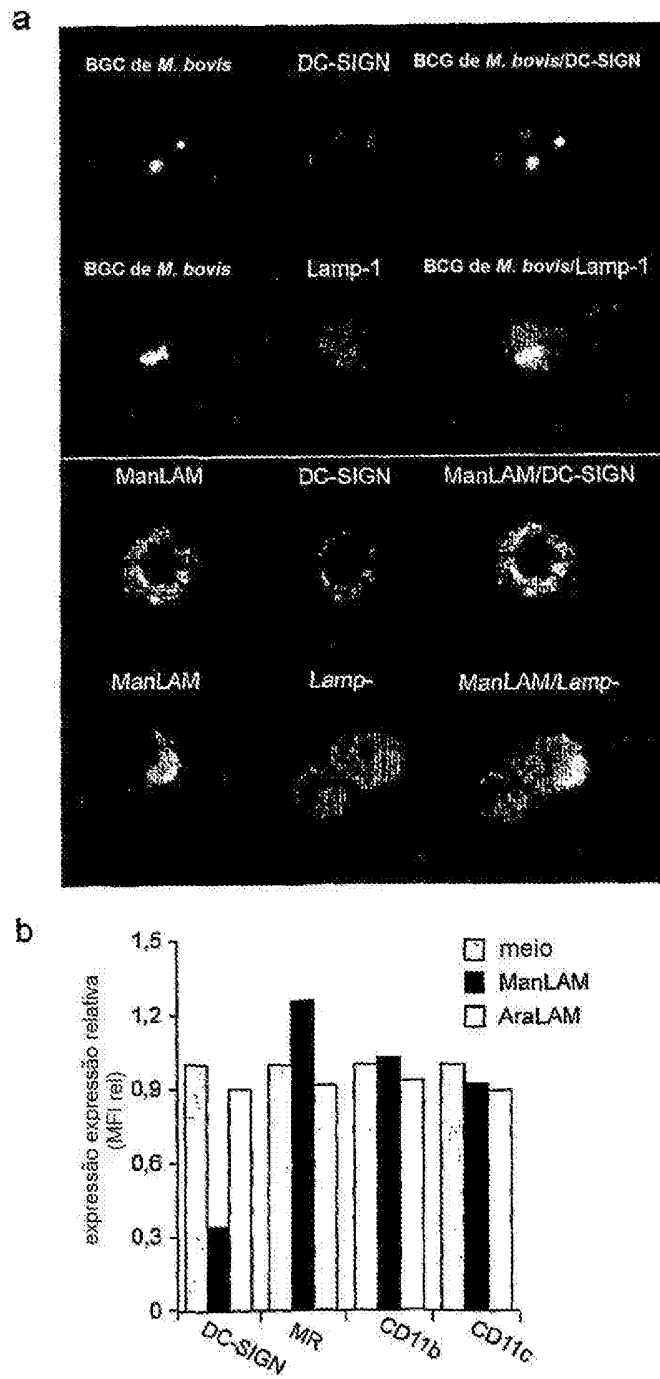


Fig. 10

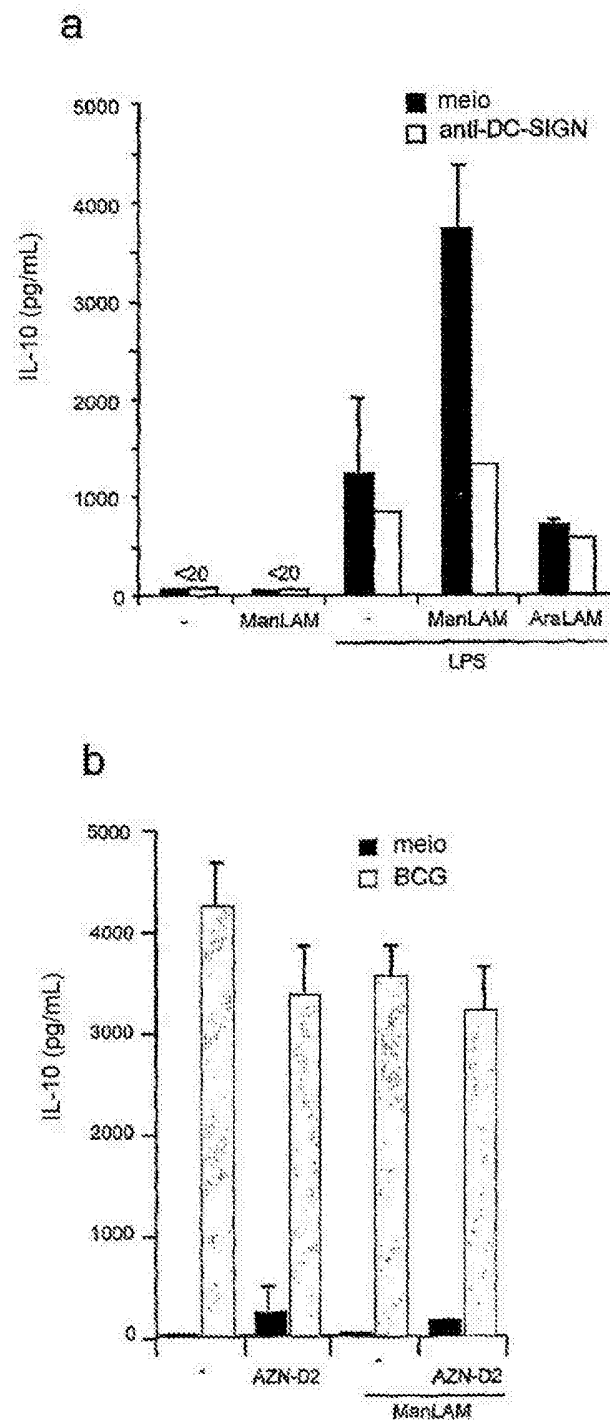


Fig. 11

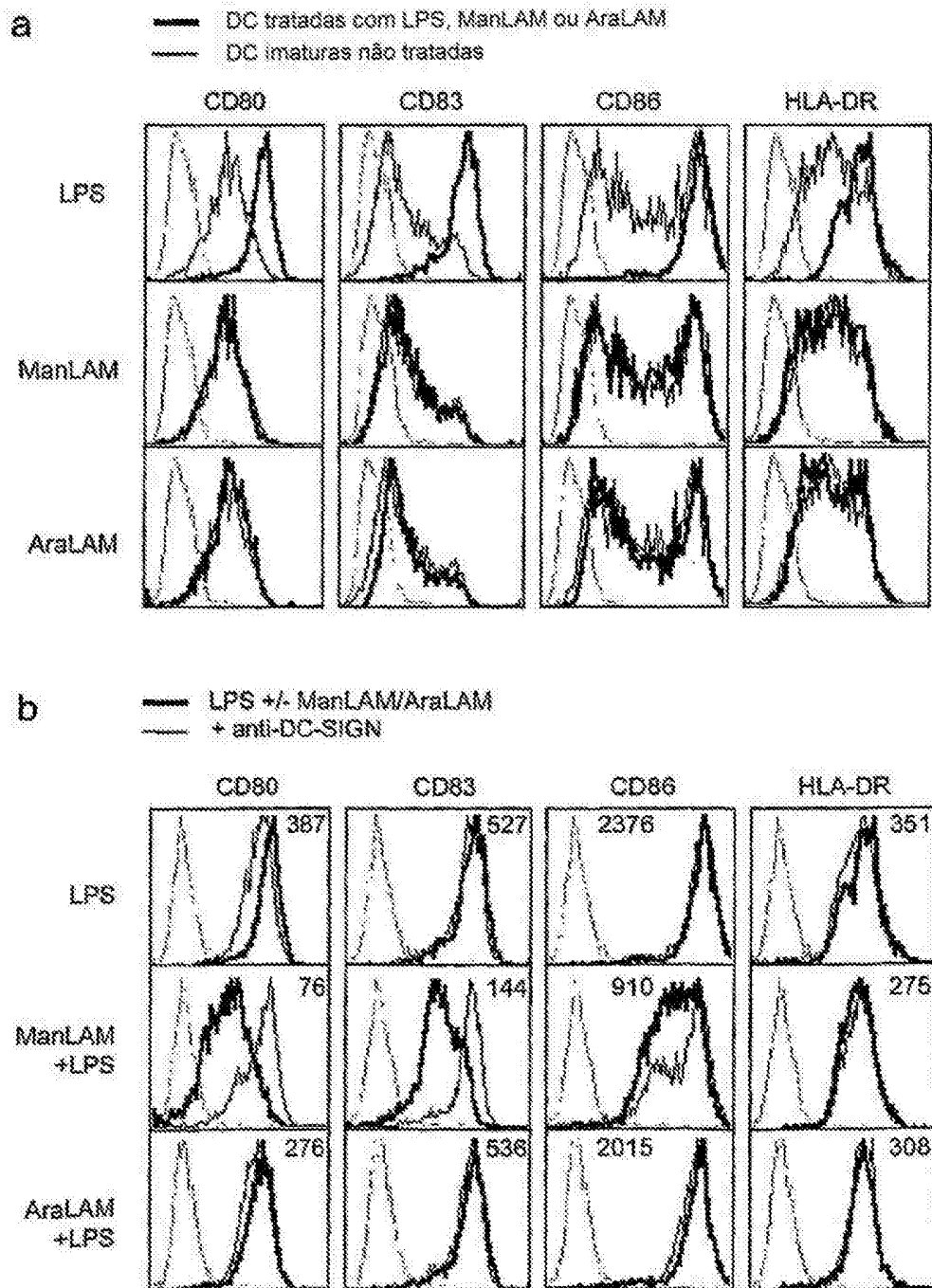


Fig. 12

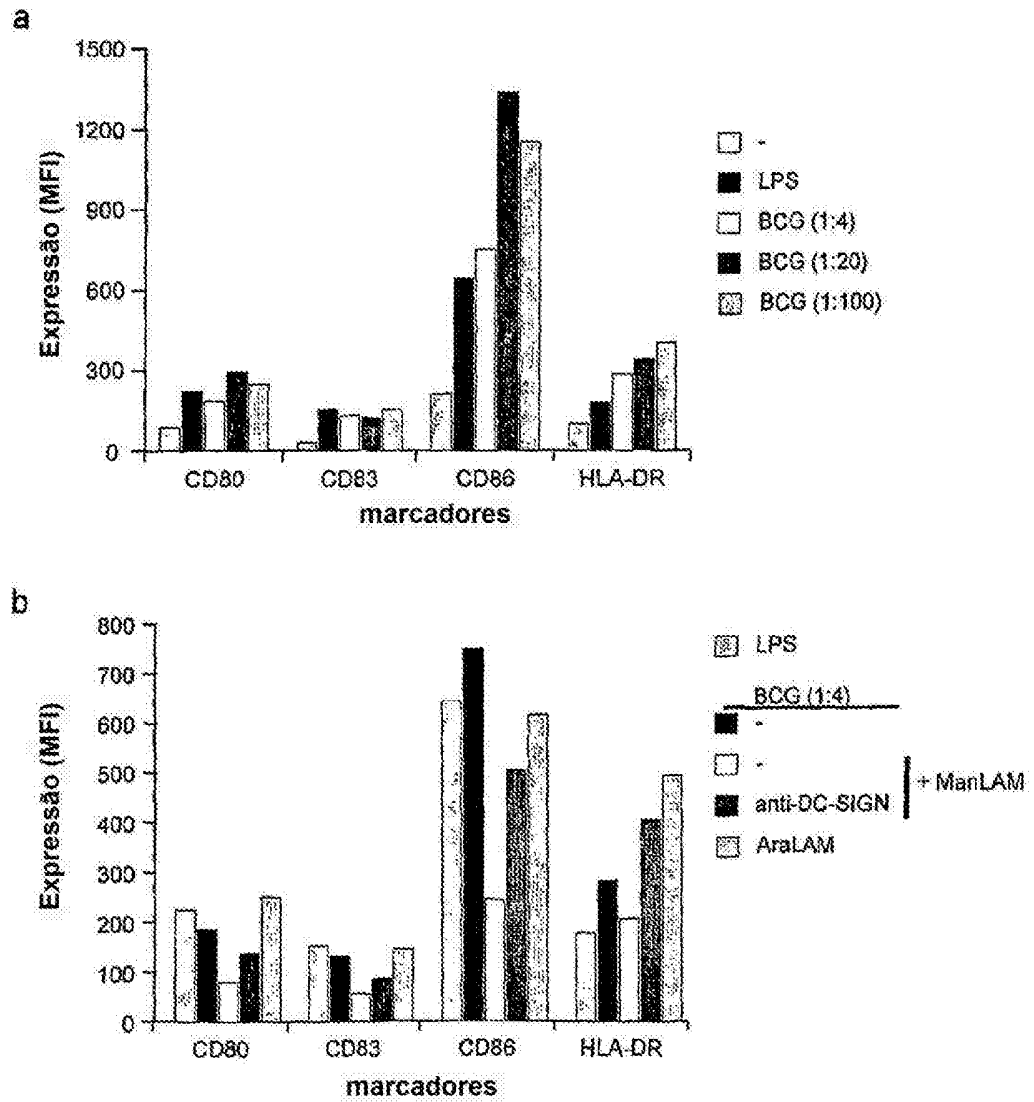
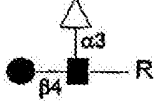
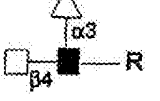
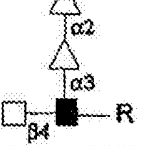
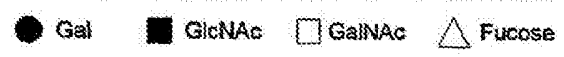


Fig. 13

Antígenos de hidratos de carbono no SEA de *S. mansoni*

Epítipo de hidrato de carbono	Abreviatura	MAB anti-glicano
	Lewis-X	CB10 (32)
	LDN	SMLDN1.1 (31)
	LDNF	SMLDNF1 (4)
	LDN-DF	114-5B1-A (12)
		

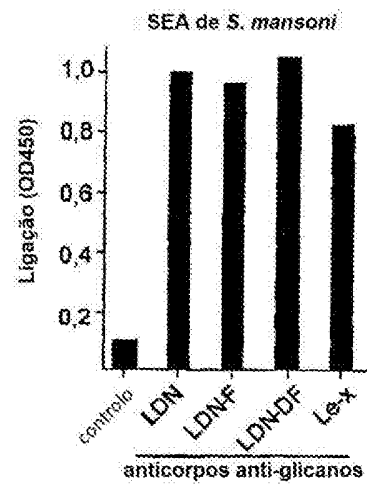


Fig. 14

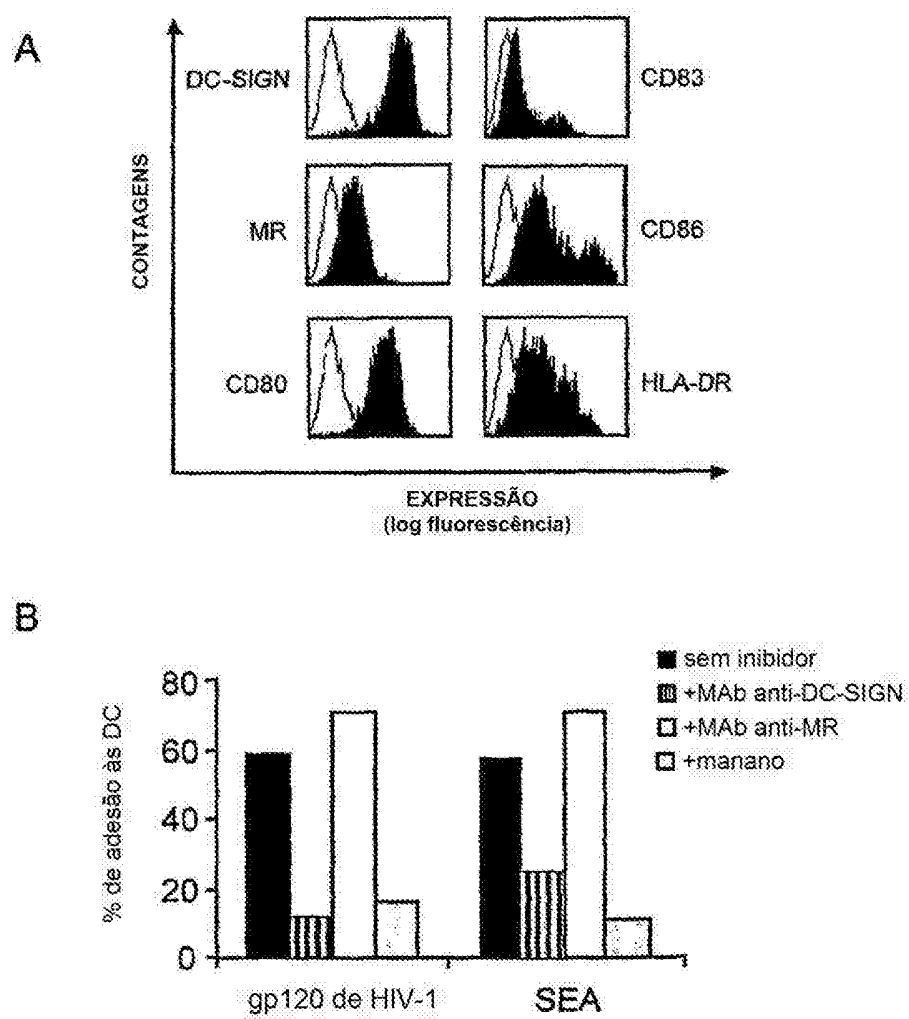


Fig. 15

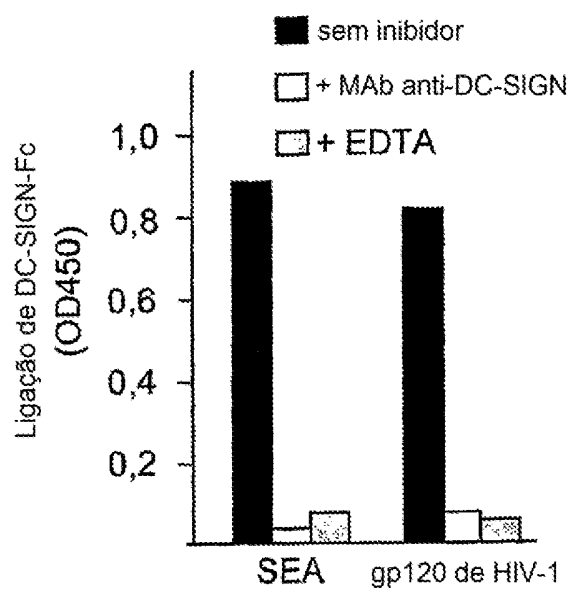


Fig. 16

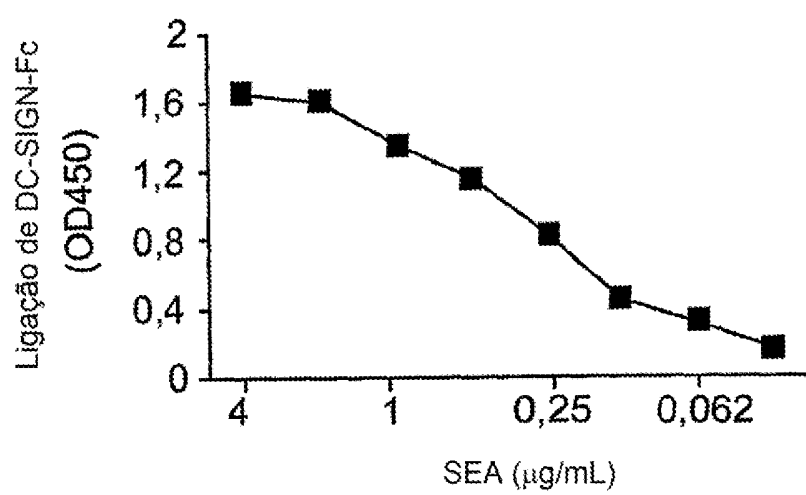


Fig. 17

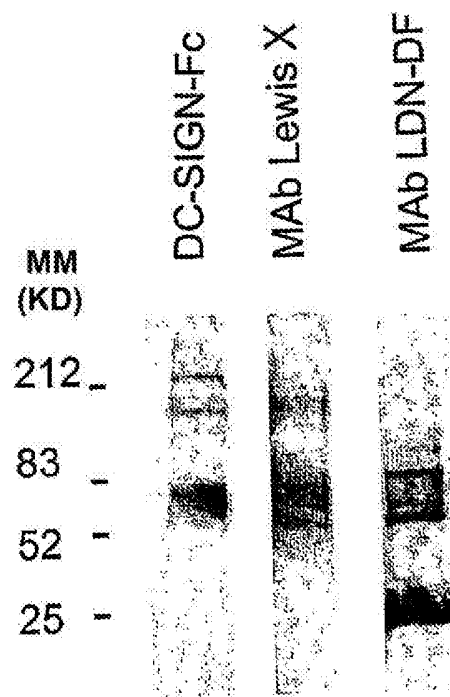
SEA de *S. mansoni*

Fig. 18

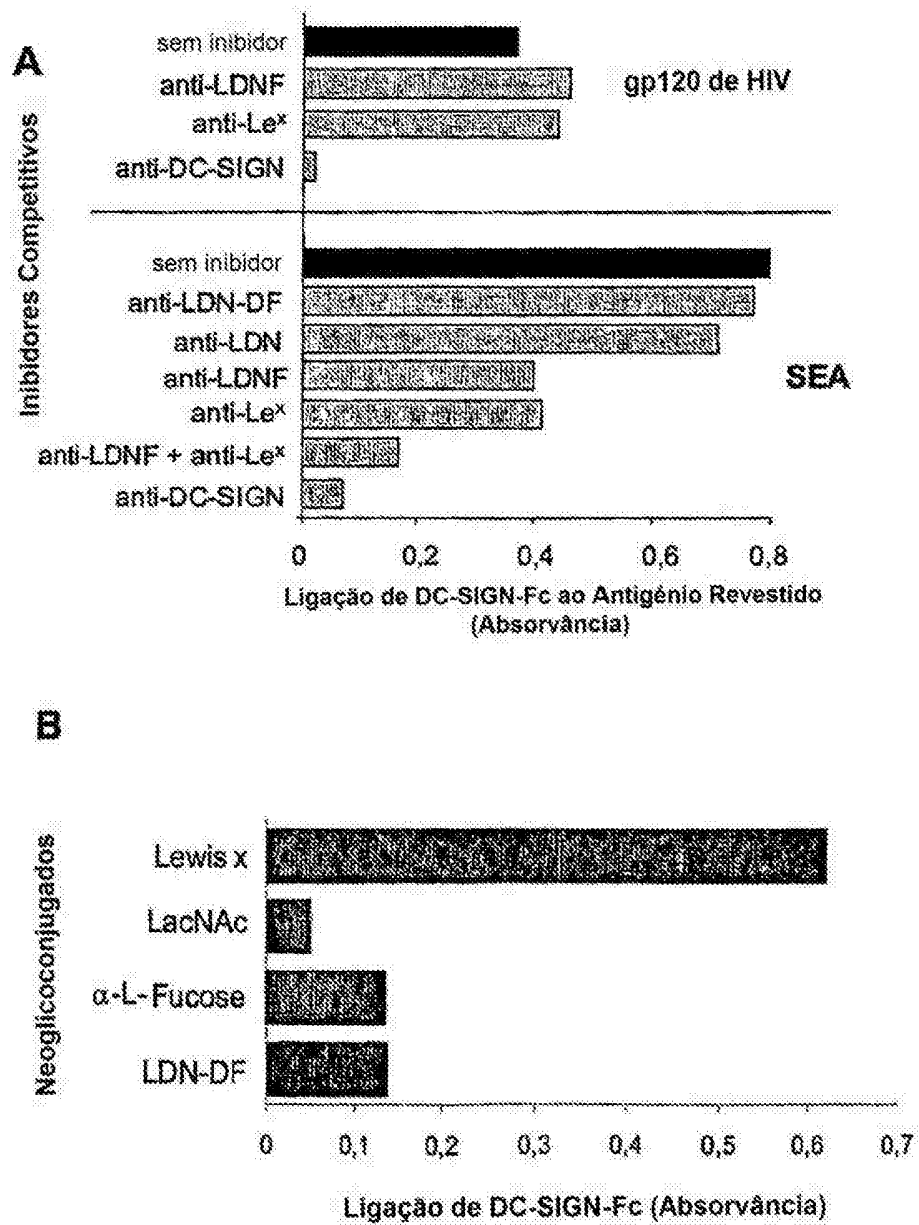


Fig. 19

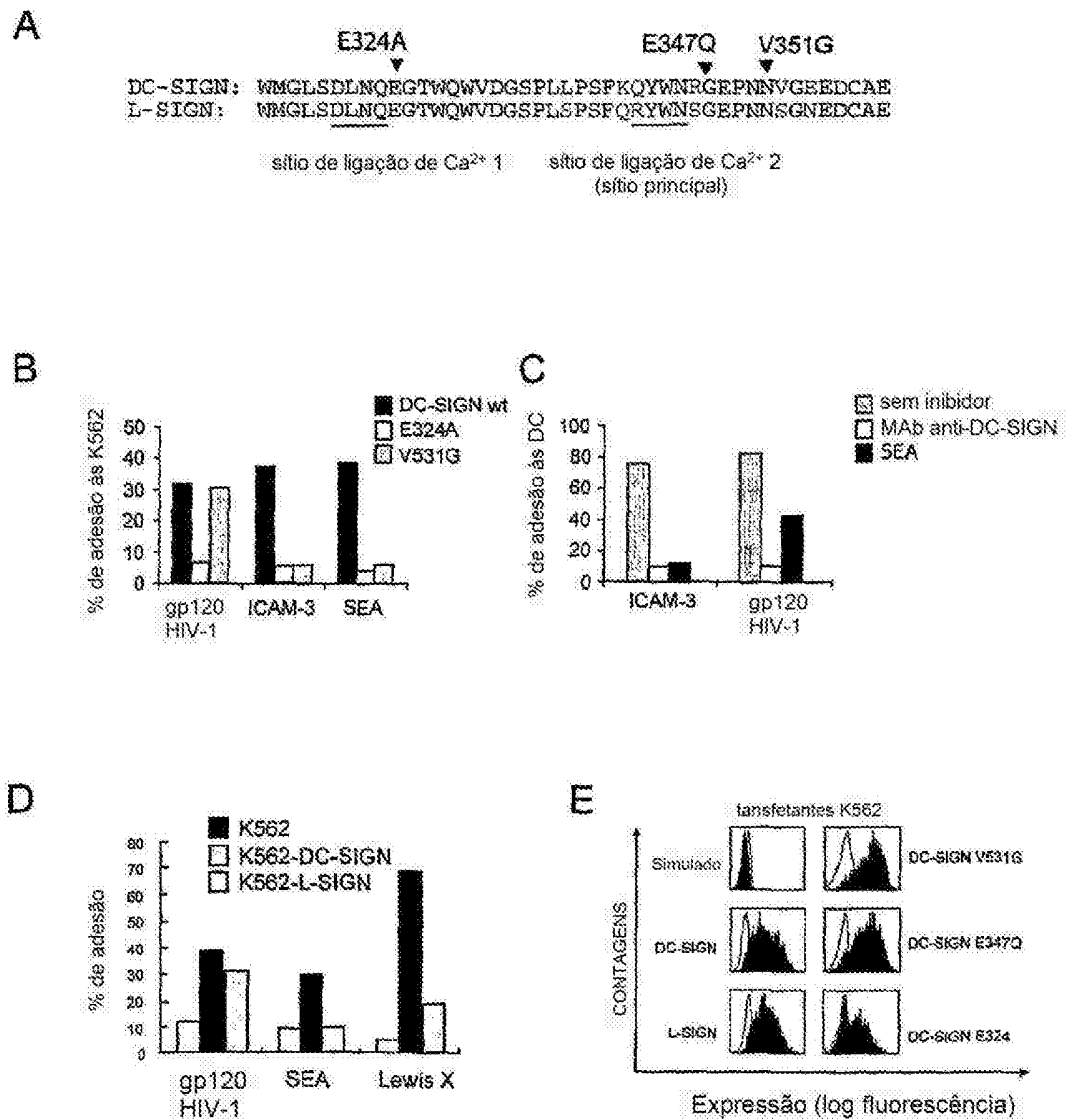


Fig. 20A

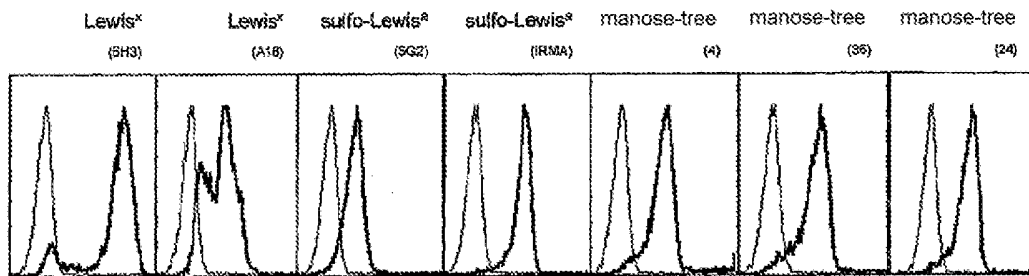


Fig. 20B

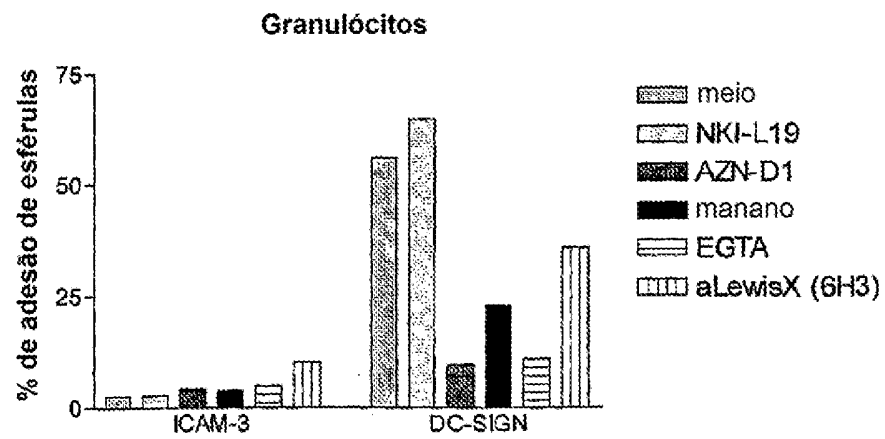


Fig. 21

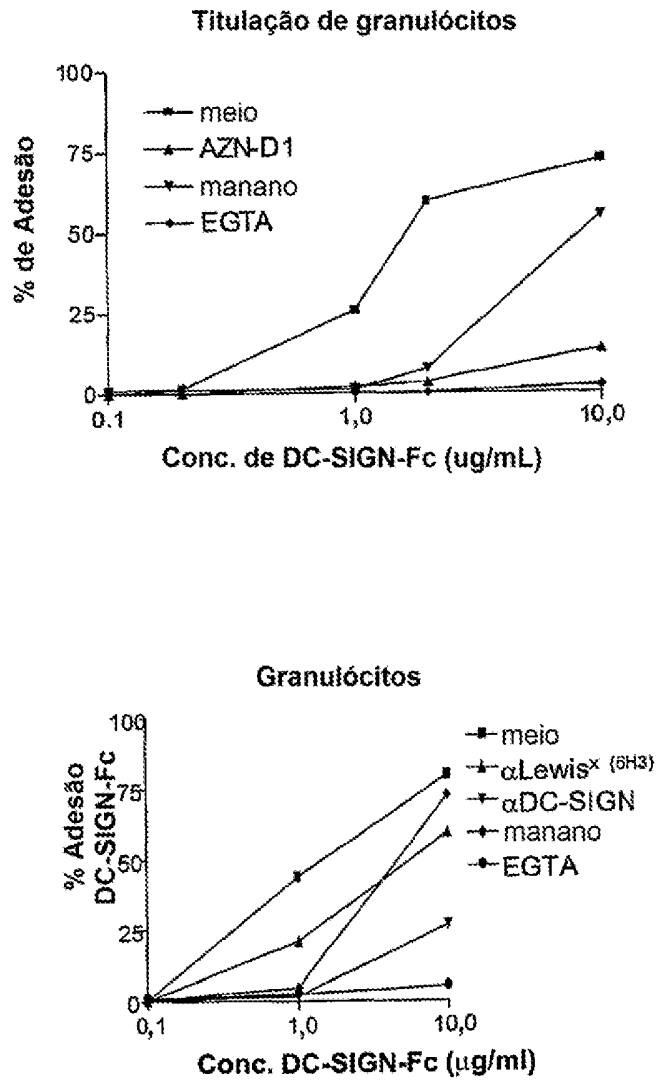


Fig. 22A

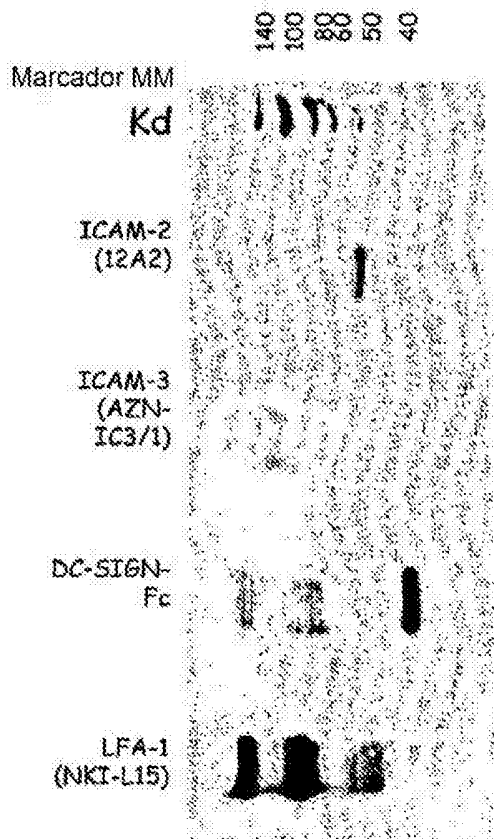


Fig. 22B

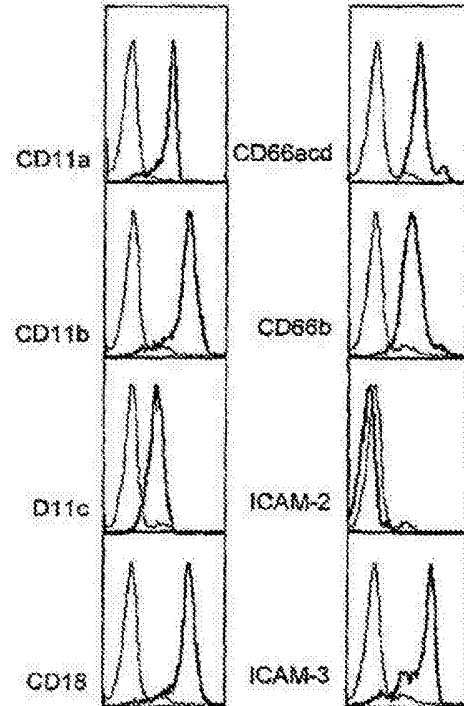


Fig. 22C

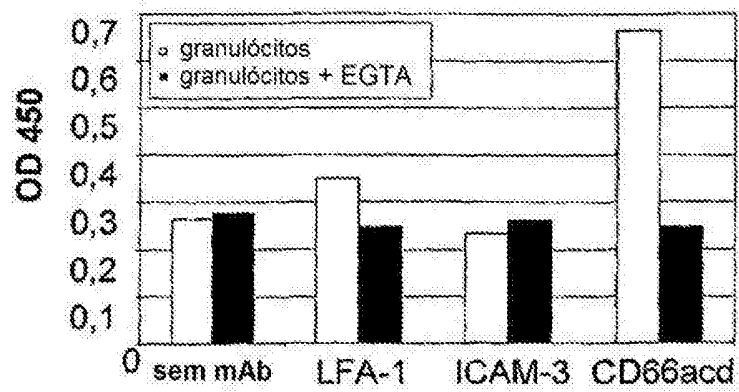


Fig. 23

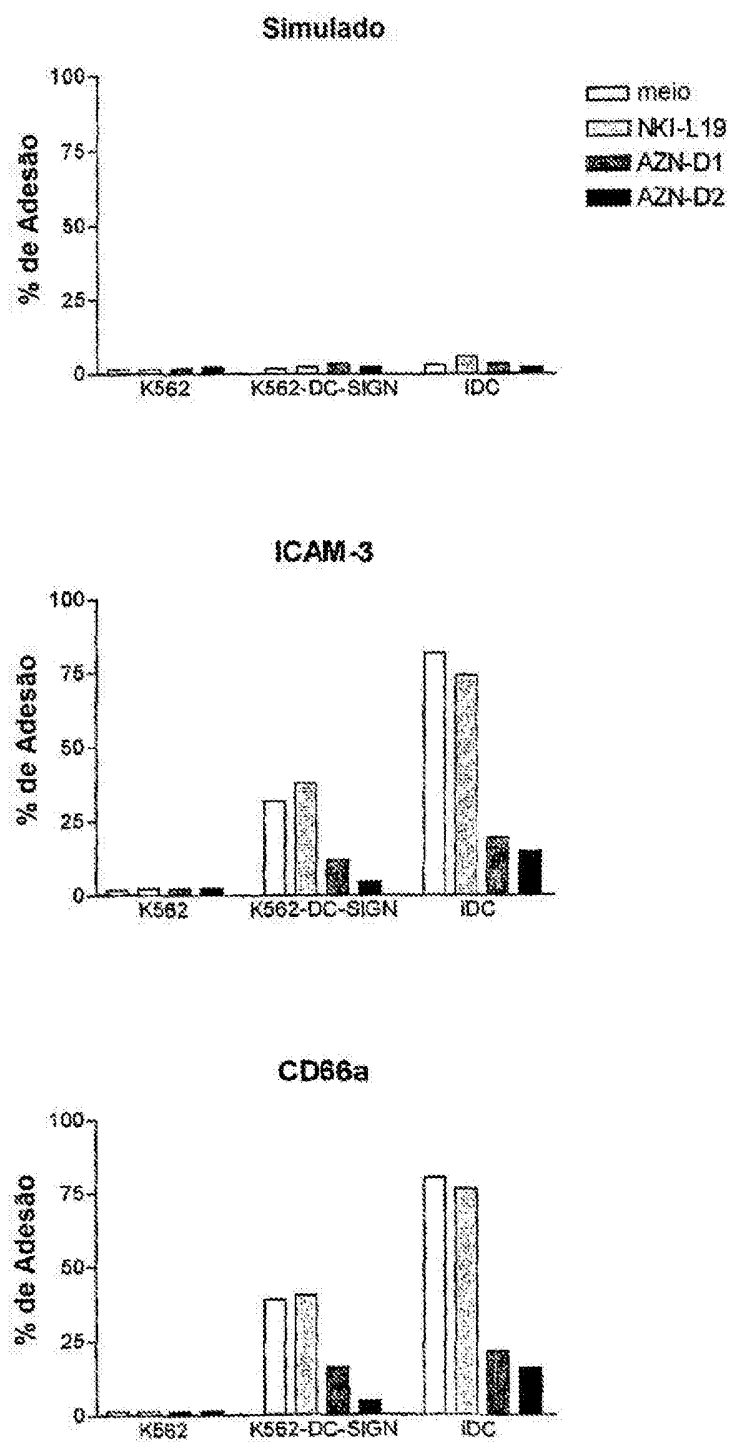


Fig. 24

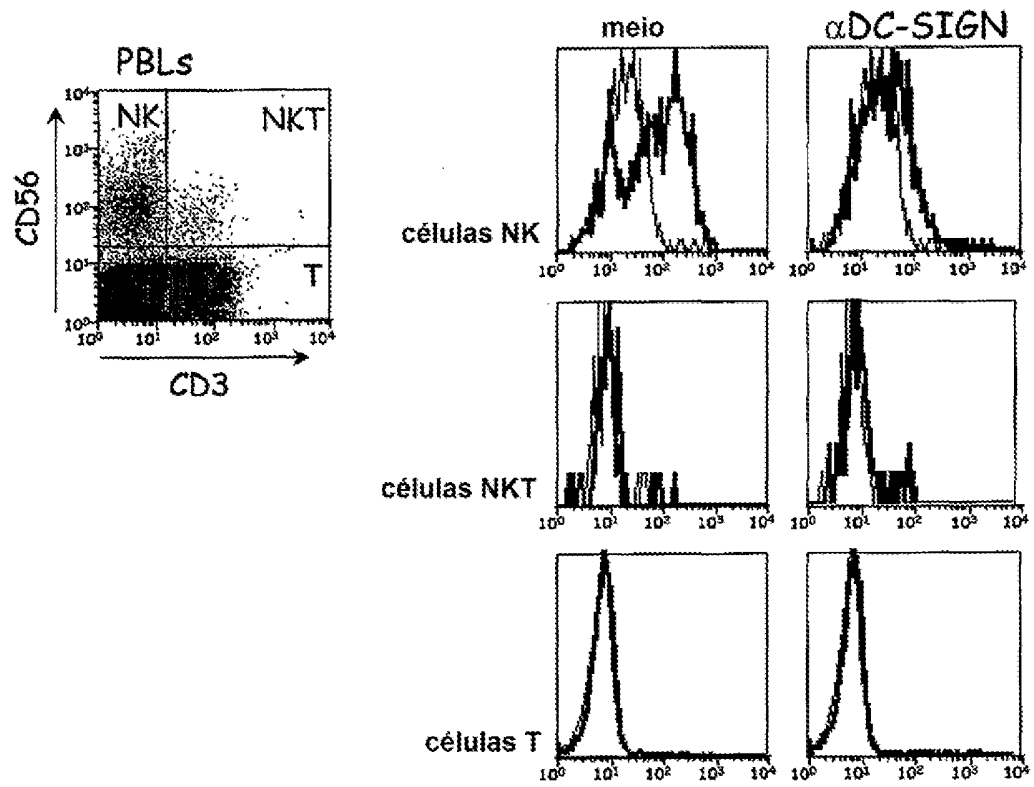


Fig. 25

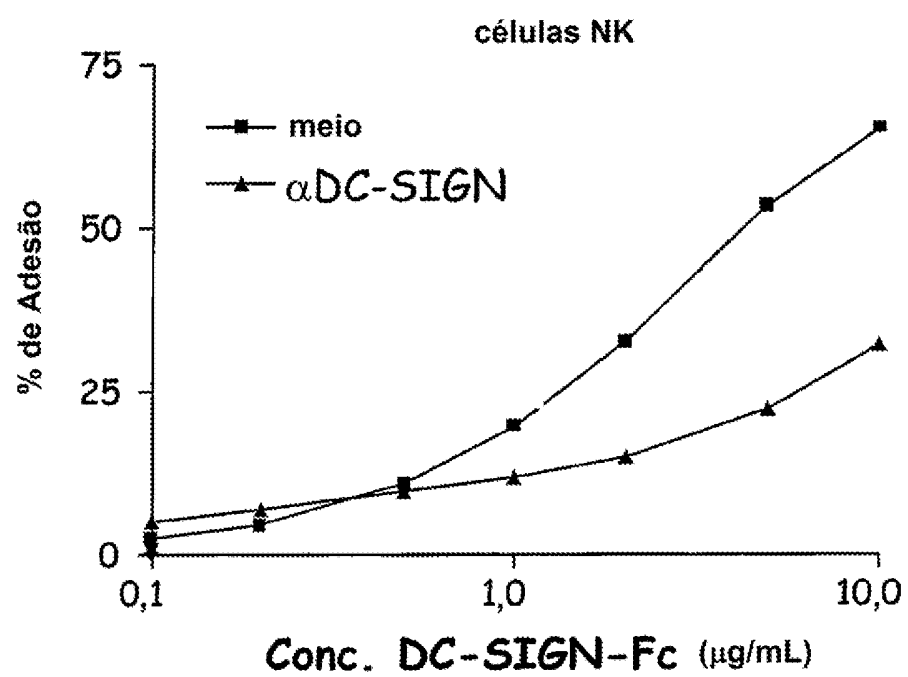


Fig. 26

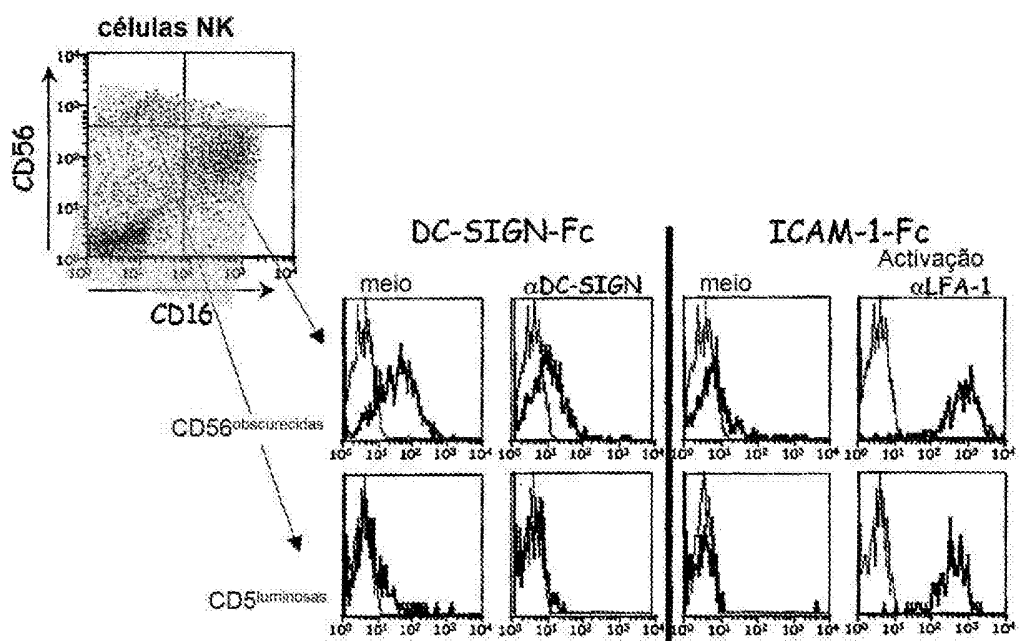


Fig. 27

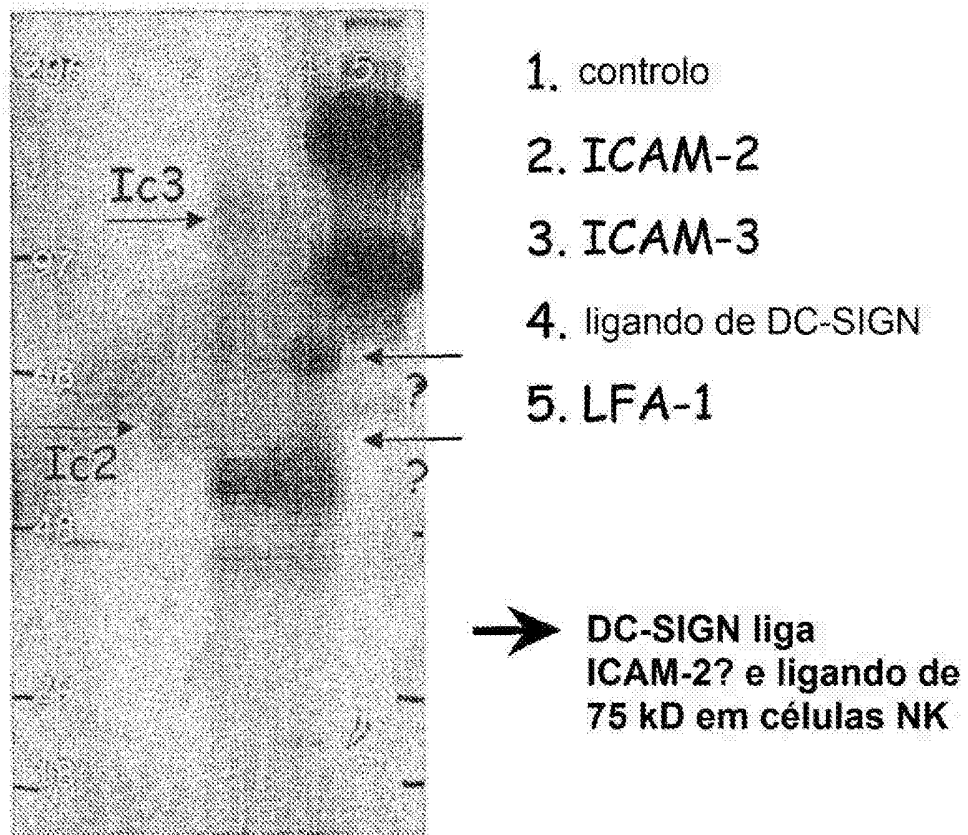


Fig. 28

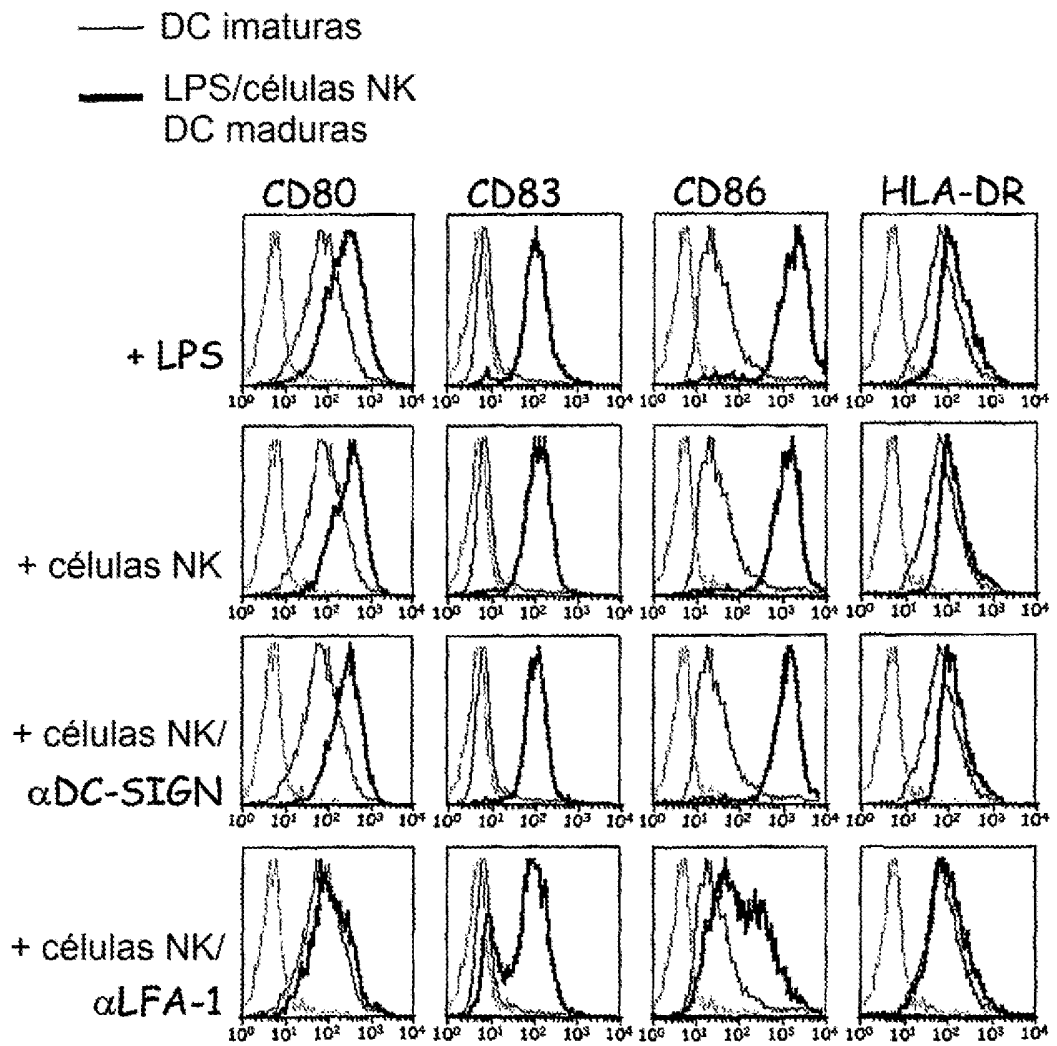


Fig. 29

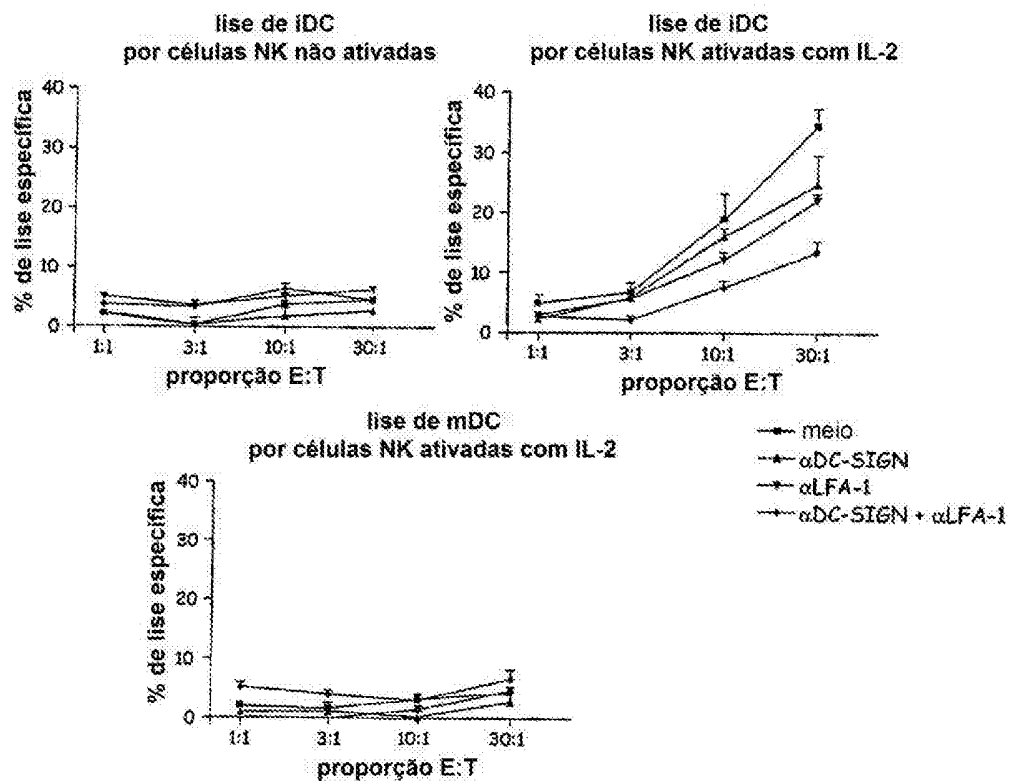


Fig. 30

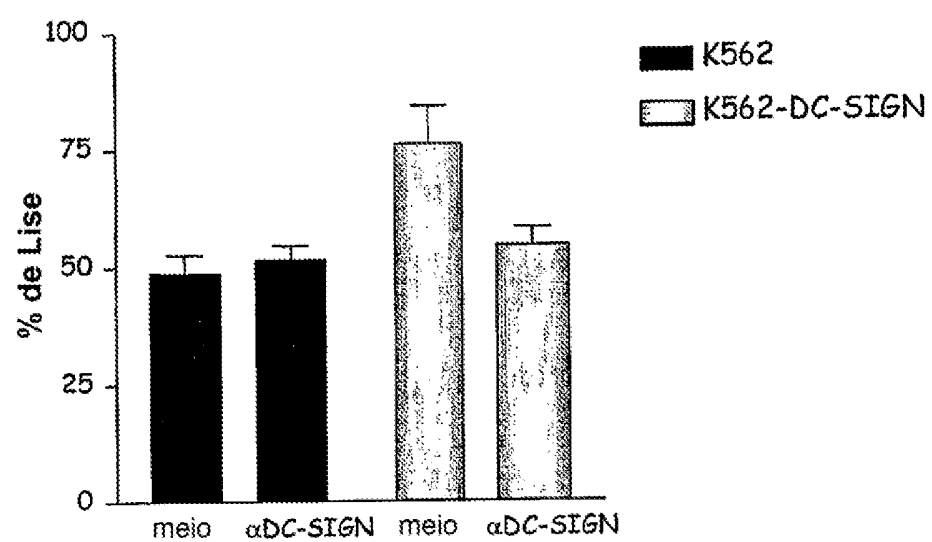
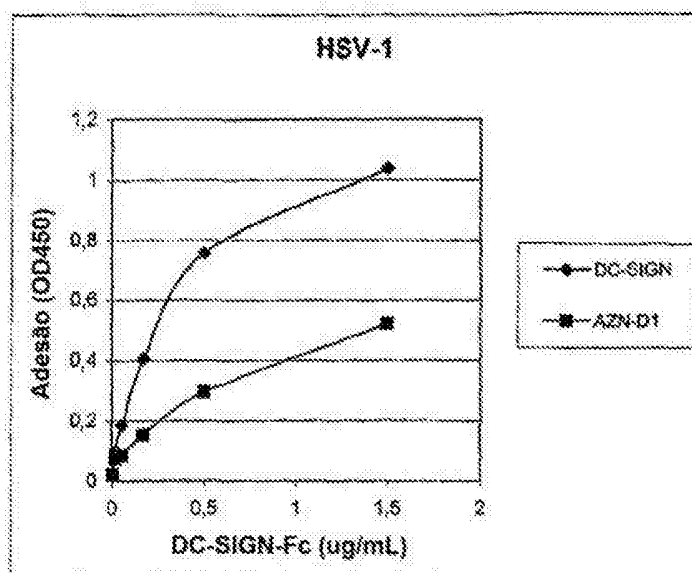


Fig. 31

ligação de HSV-1



ligação de HSV-2

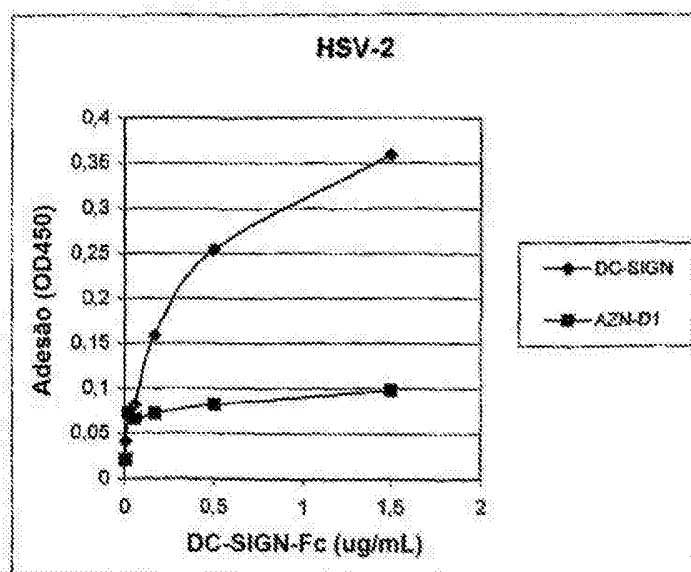
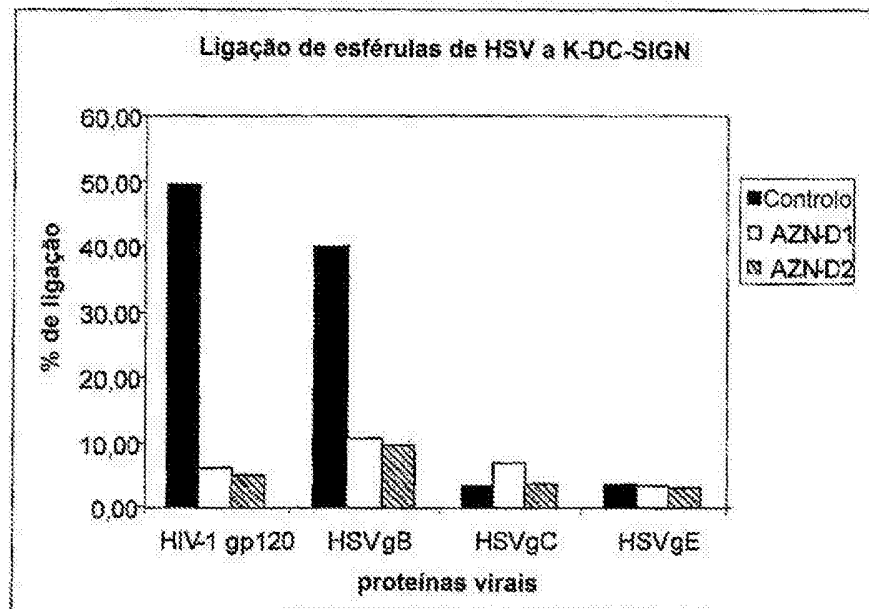


Fig. 32

A



B

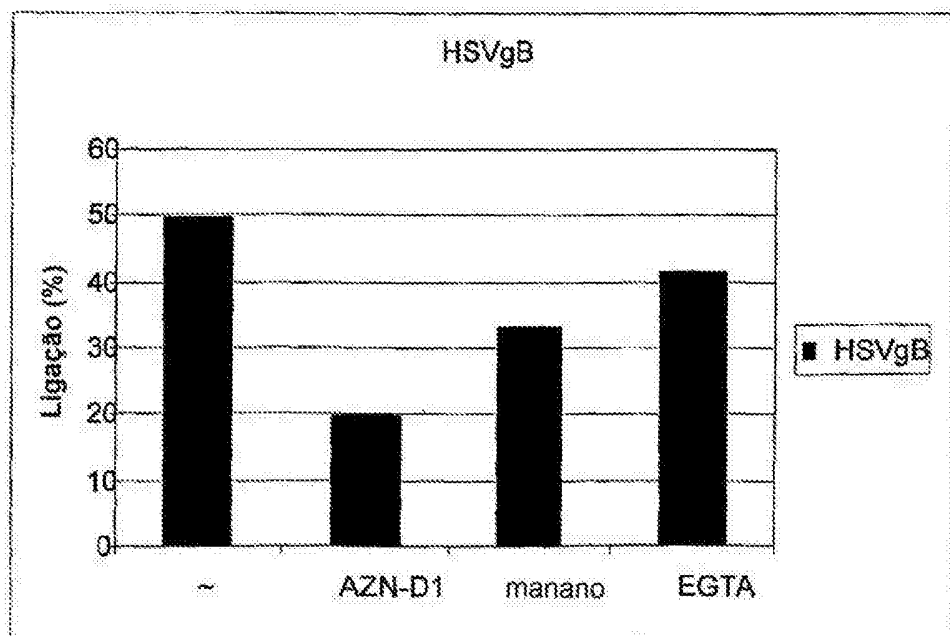
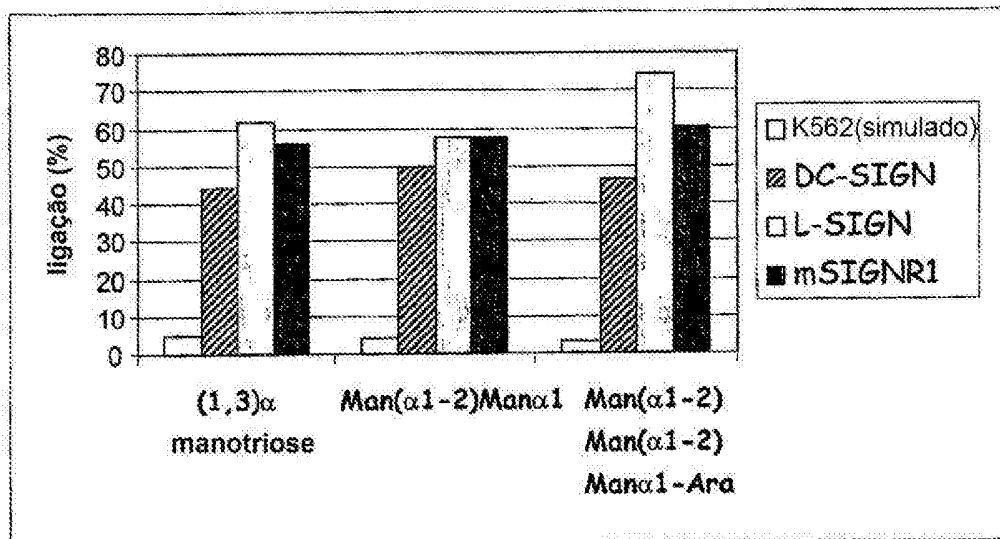


Fig. 33A

**mSIGNR1 liga hidratos de carbono
que contêm manose
de forma semelhante à DC-SIGN e L-SIGN**



DC-SIGN, L-SIGN e mSIGNR1 ligam-se
de forma diferente aos antígenos de Lewis

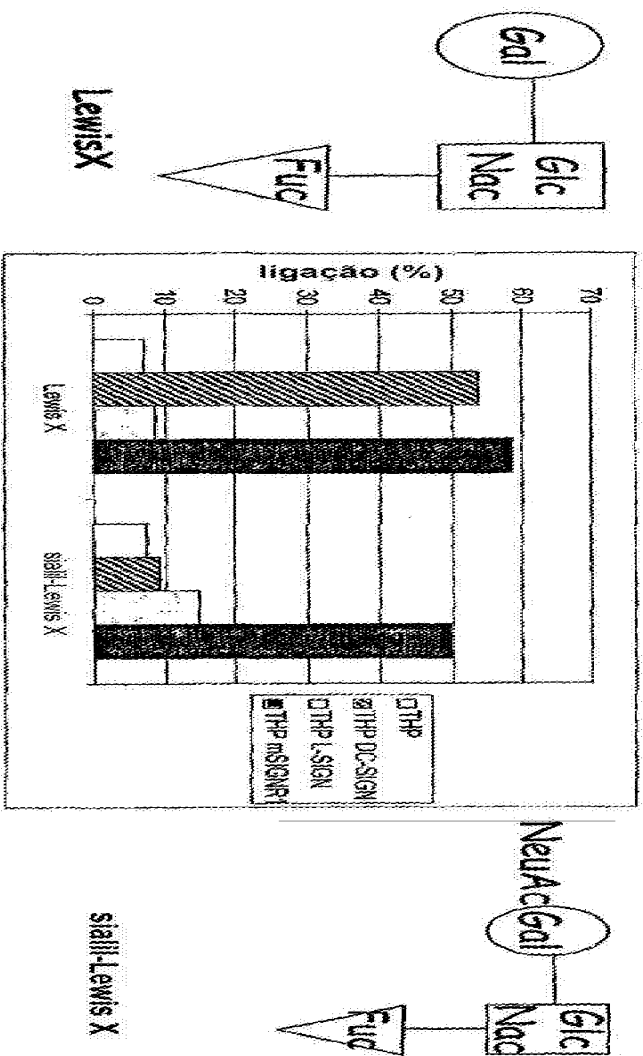


Fig. 33B

Fig. 33C

**Especificidade para hidratos de carbono de DC-SIGN,
L-SIGN e mSIGNR1**

	DC-SIGN	L-SIGN	mSIGNR1
LewisX	+	-	+
sialil Lewis X	-	-	+
sulfo LewisX	+	-	+
LewisY	+	+	+
LewisA	+	+	+
sialil Lewis A	-	-	+
sulfo LewisA	+	+	+
LewisB	+	+	+

Fig. 34

**agentes patogénicos com hidratos de carbono
que contêm manose ligam mSIGNR1**

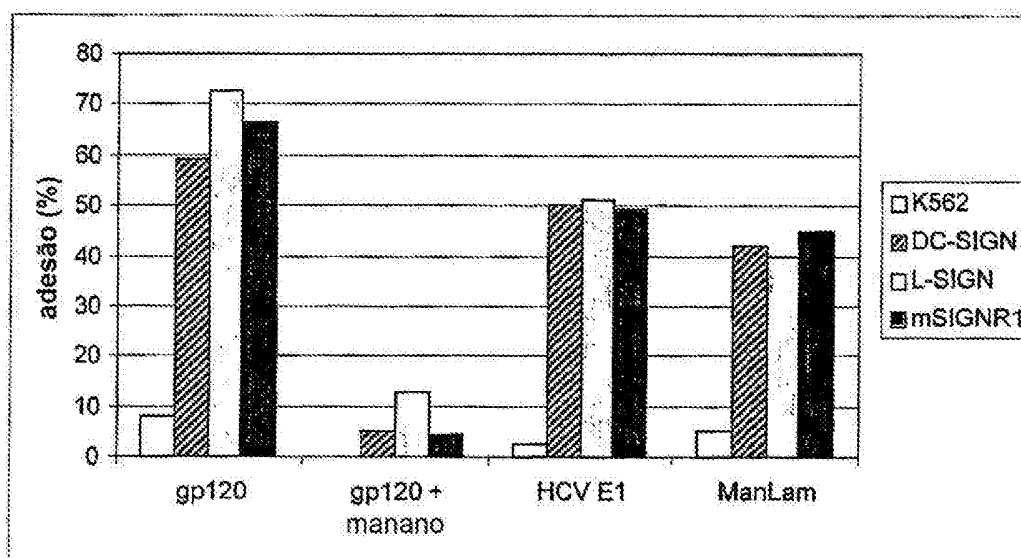


Fig. 35

DC-SIGN-FC liga proteínas do envelope de HCV

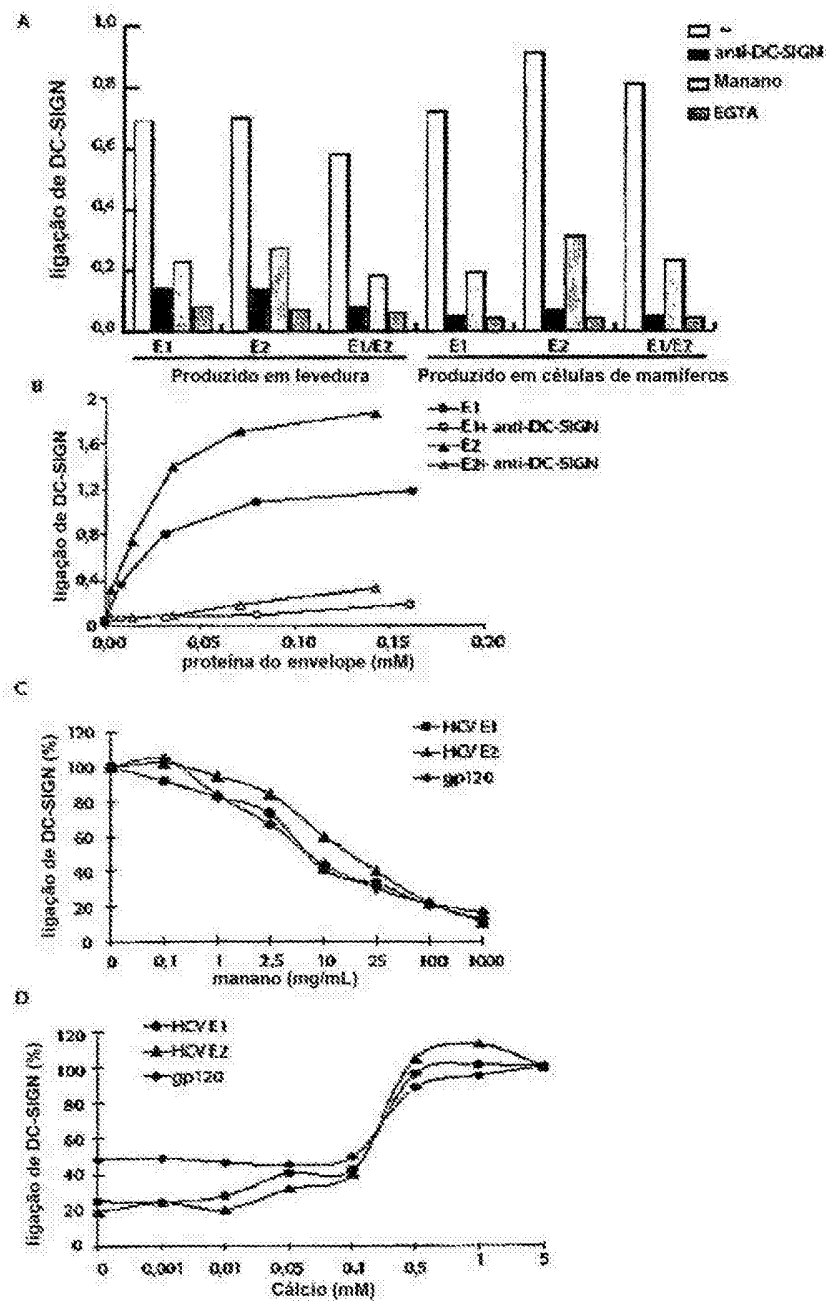


Fig. 36

DC-SIGN e L-SIGN celulares ligam as proteínas E1 e E2 de HCV

DC-SIGN tem sítio de ligação semelhante para
gp120 e HCV

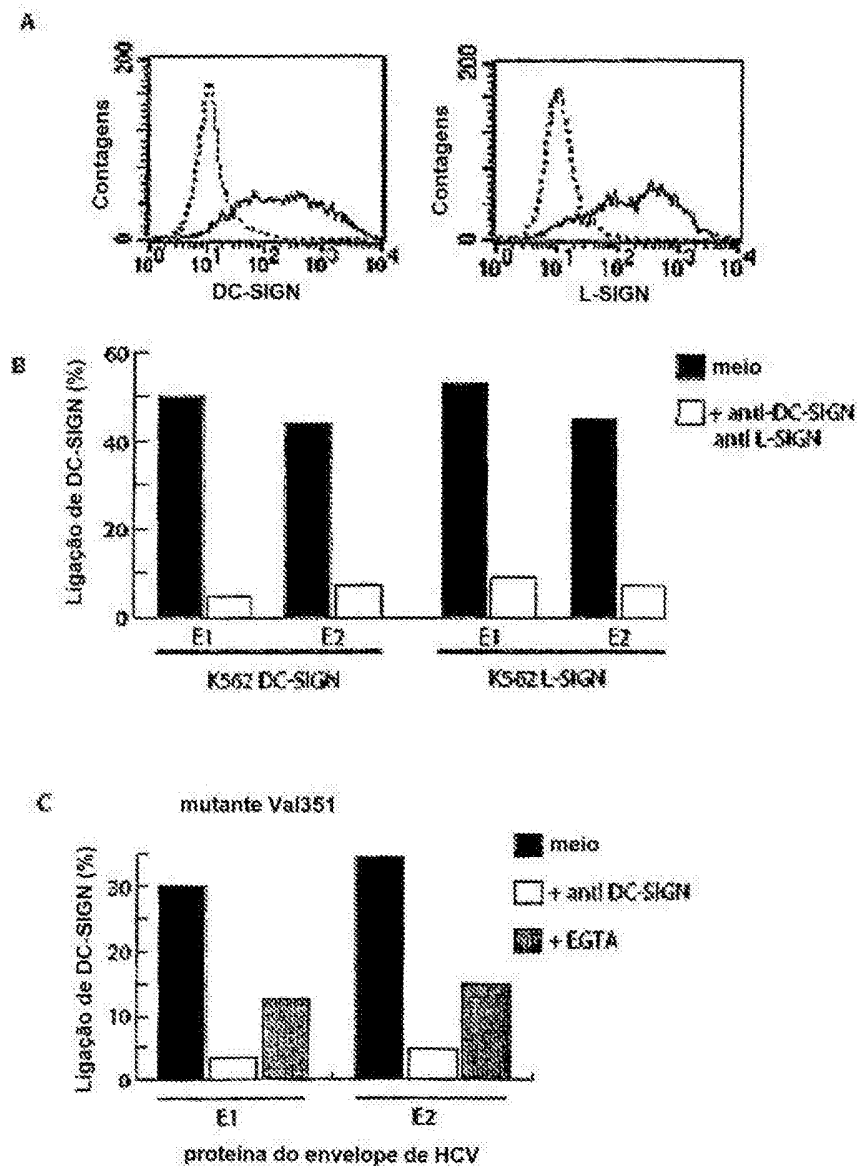


Fig. 36D

Resíduos de aminoácidos essenciais na ligação de DC-SIGN aos seus
ligandos gp120 e proteínas do envelope de HCV

DC-SIGN mutante	Adesão			
	gp120	HCV E1	HCV E2	HCV E1/E2
	%	%	%	%
Tipo selvagem	45	50	45	50
E347Q	4	3	7	7
N349D	0	5	9	7
N365D	0	5	9	9
D366A	3	4	5	6
D320A	7	4	6	5
E324A	0	4	7	6
N350A	1	4	8	5
D355A	2	4	8	7

Transfetantes K562 estáveis

Fig. 37

HCV é internalizado por DC-SIGN e L-SIGN;
via de internalização depende da linha celular

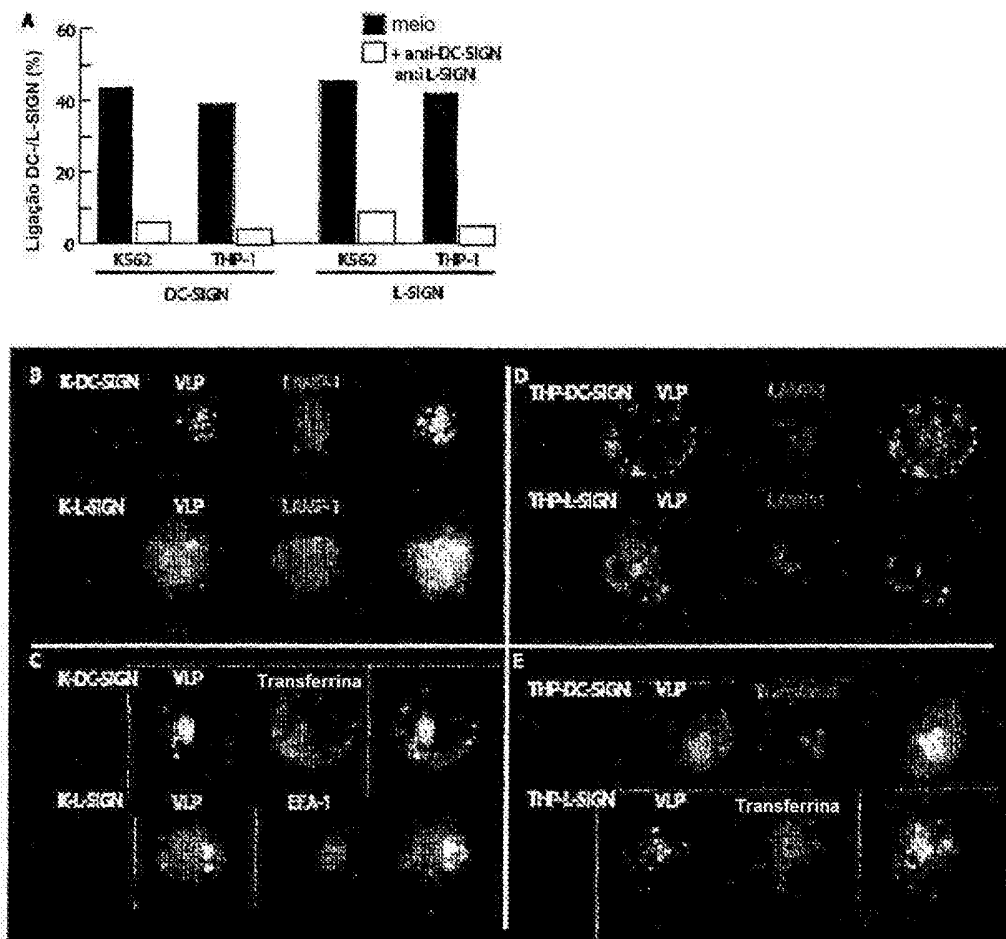


Fig. 38

DC imaturas e maduras ligam HCV através de DC-SIGN

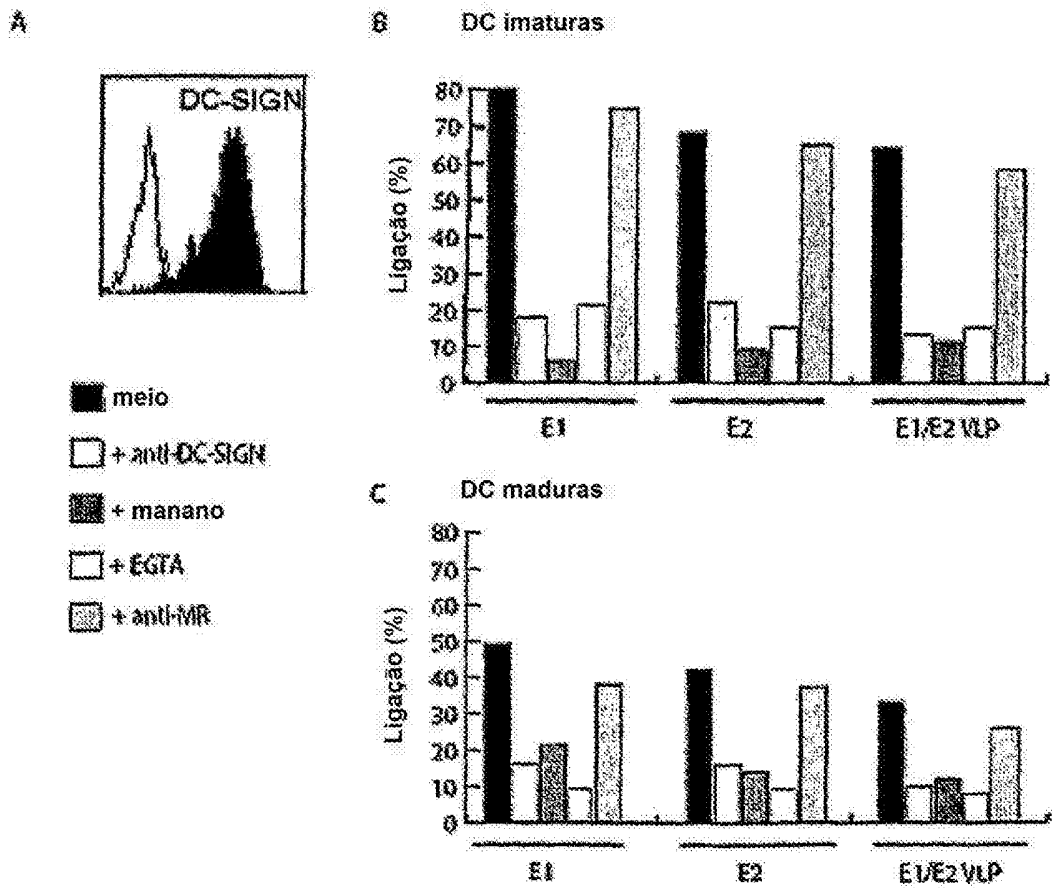


Fig. 39

DC imaturas capturam e internalizam HCV através de DC-SIGN; HCV é direcionado para os endossomos iniciais

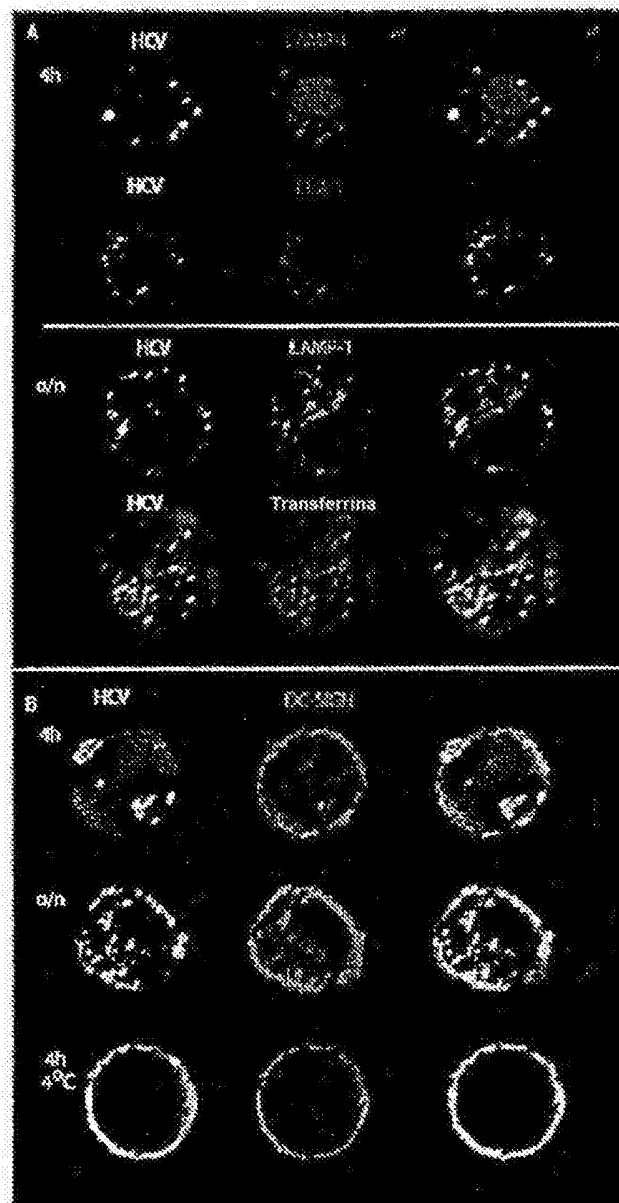


Fig. 40

DC imaturas internalizam os hidratos de carbono através de DC-SIGN

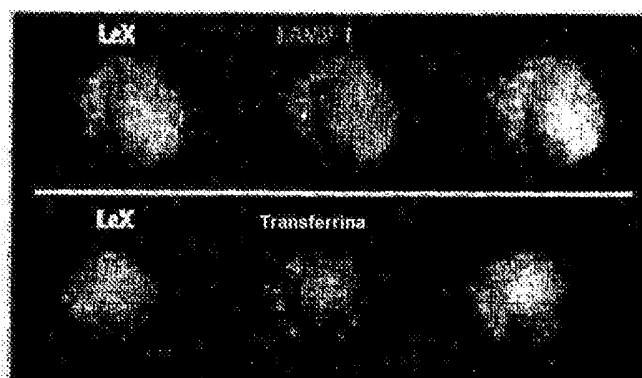


Fig. 41

Ligação de HCV a secções de Fígado

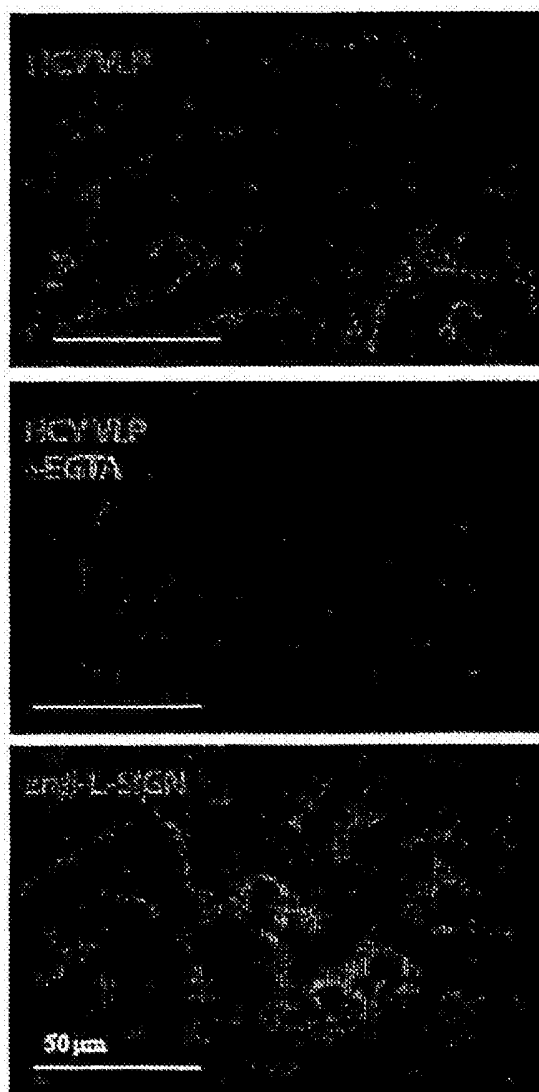


Fig. 42

Antigénios do grupo sanguíneo de Lewis e algumas das suas subestruturas ligam-se à DC-SIGN

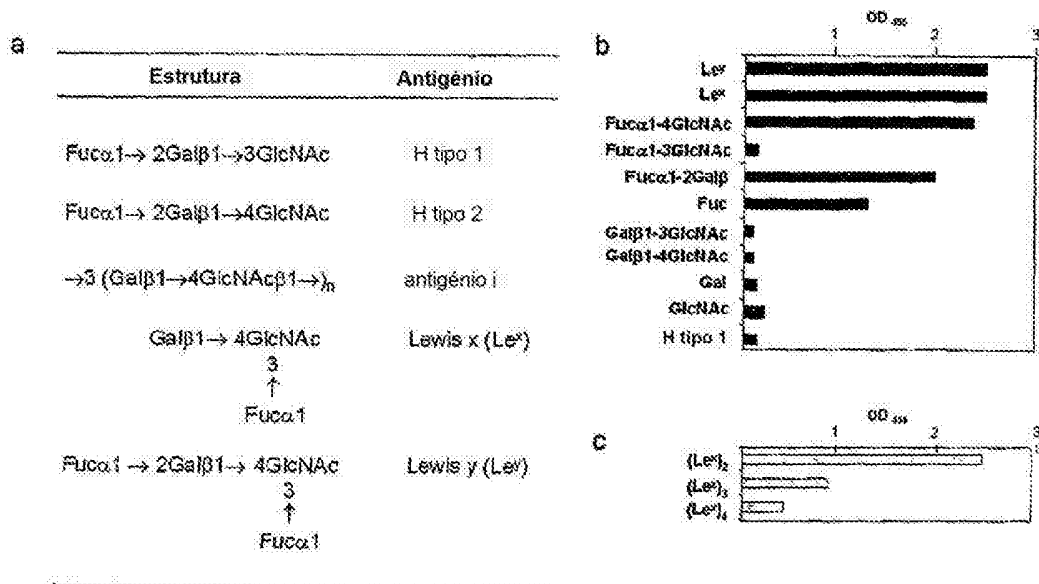


Fig. 43

Ligação de *H. pylori* é dependente da expressão dos antígenos de Lewis.

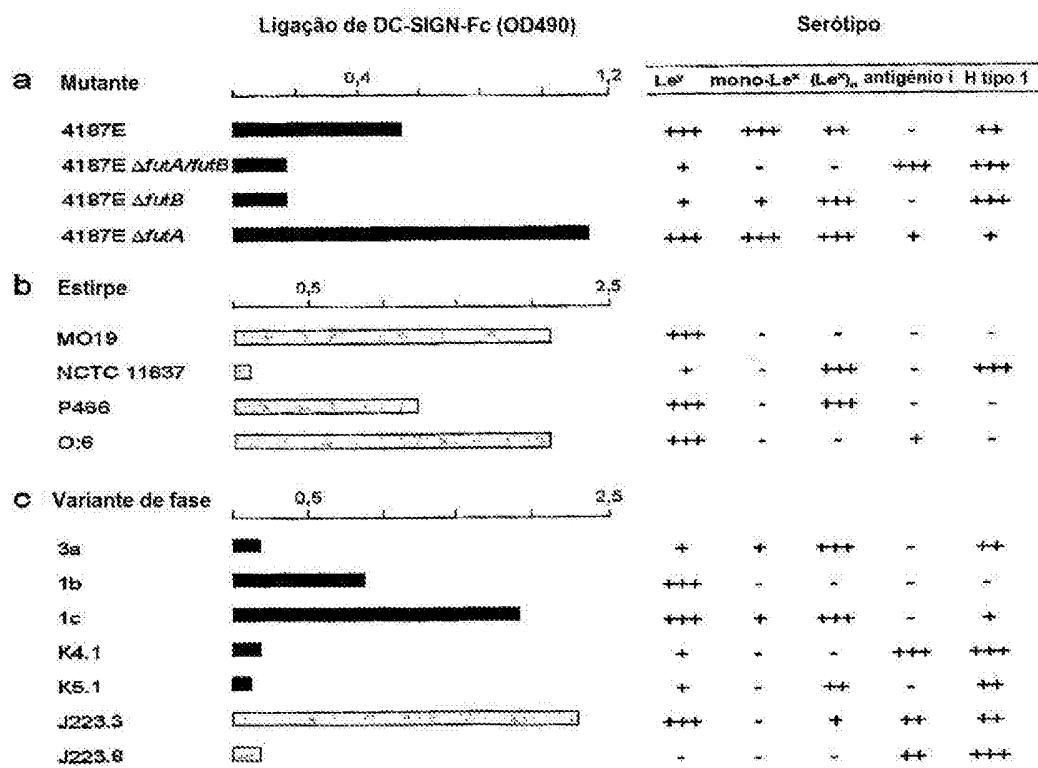


Fig. 44

Variação de fase de LPS em *H. pylori* ocorre in vivo.

a	Estirpe	Número de colónias (%)	Serótipo				
			Le ^y	mono-Le ^x	(Le ^x) _n	antígeno i	H tipo 1
	J223.3	6/30 (20)	+++	-	++	++	+++
	J223.8	24/30 (80)	-	-	-	+++	+++

b	Estirpe	Length of C-tract in gene		Serótipo				
		<i>futA</i>	<i>futB</i>	Le ^y	mono-Le ^x	(Le ^x) _n	antígeno i	H tipo 1
	J223.3	n=9 ("deslig")	n=10 ("lig")	+++	-	++	++	+++
	J223.8	n=9 ("deslig")	n=9 ("deslig")	-	-	-	+++	+++
	J223.3 Δ <i>futB</i>	N.D.	N.D.	-	-	-	+++	+++

c	J223.3			<i>futA</i>
	1	ATGTTCCAAC	CCCTATTAGA	CGCCTTCATA
		GAAAGCGCTT	CCATTGAAAA	AATGGCCTCT
	61	AAATCTCCCC	CCCCCTAA	(PARAGEM)
	J223.8			
	1	ATGTTCCAAC	CCCTATTAGA	CGCCTTCATA
		GAAAGCGCTT	CCATTGAAAA	AATGGCCTCT
	61	AAATCTCCCC	CCCCCTAA	(PARAGEM)

	J223.3			<i>futB</i>
	1	ATGTTCCAAC	CCCTATTAGA	CGCCTTCATA
		GAAAGCGCTT	CCATTGAAAA	AATGGCCTCT
	61	AAATCTCCCC	CCCCCTAA	AATC etc.
	J223.8			
	1	ATGTTCCAAC	CCCTATTAGA	CGCCTTCATA
		GAAAGCGCTT	CCATTGAAAA	AATGGCCTCT
	61	AAATCTCCCC	CCCCCTAA	(PARAGEM)

Fig. 45

DC-SIGN é expressa em DC gástricas e é o recetor principal para *H. pylori* positivas para Le

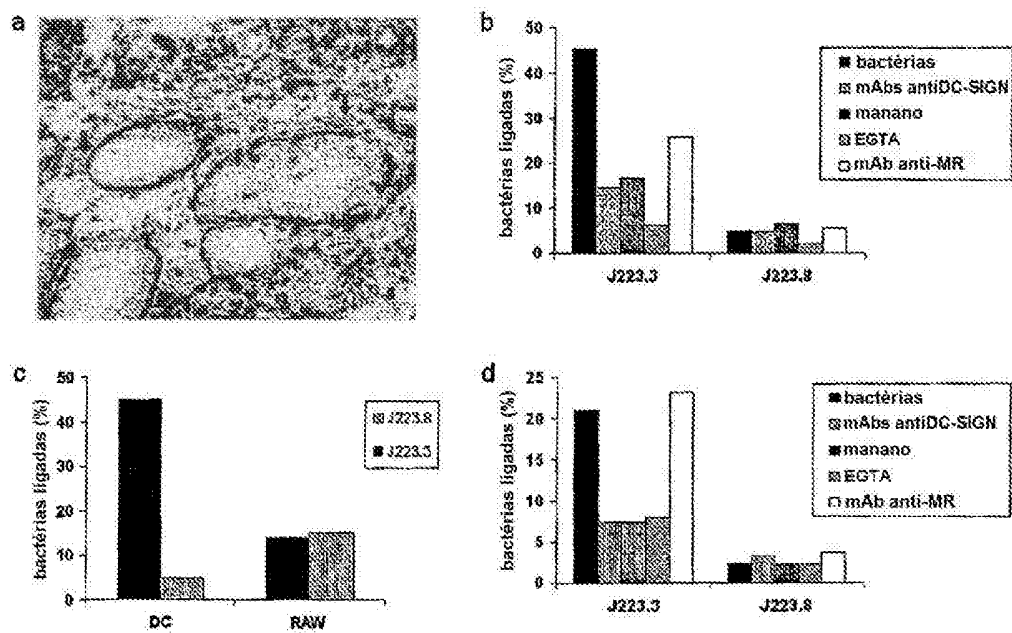


Fig. 46

Ligação de *H. pylori* induz aumento dependente de DC-SIGN na produção de IL-10 e IL-12, mas nenhuma alteração na IL12p70.

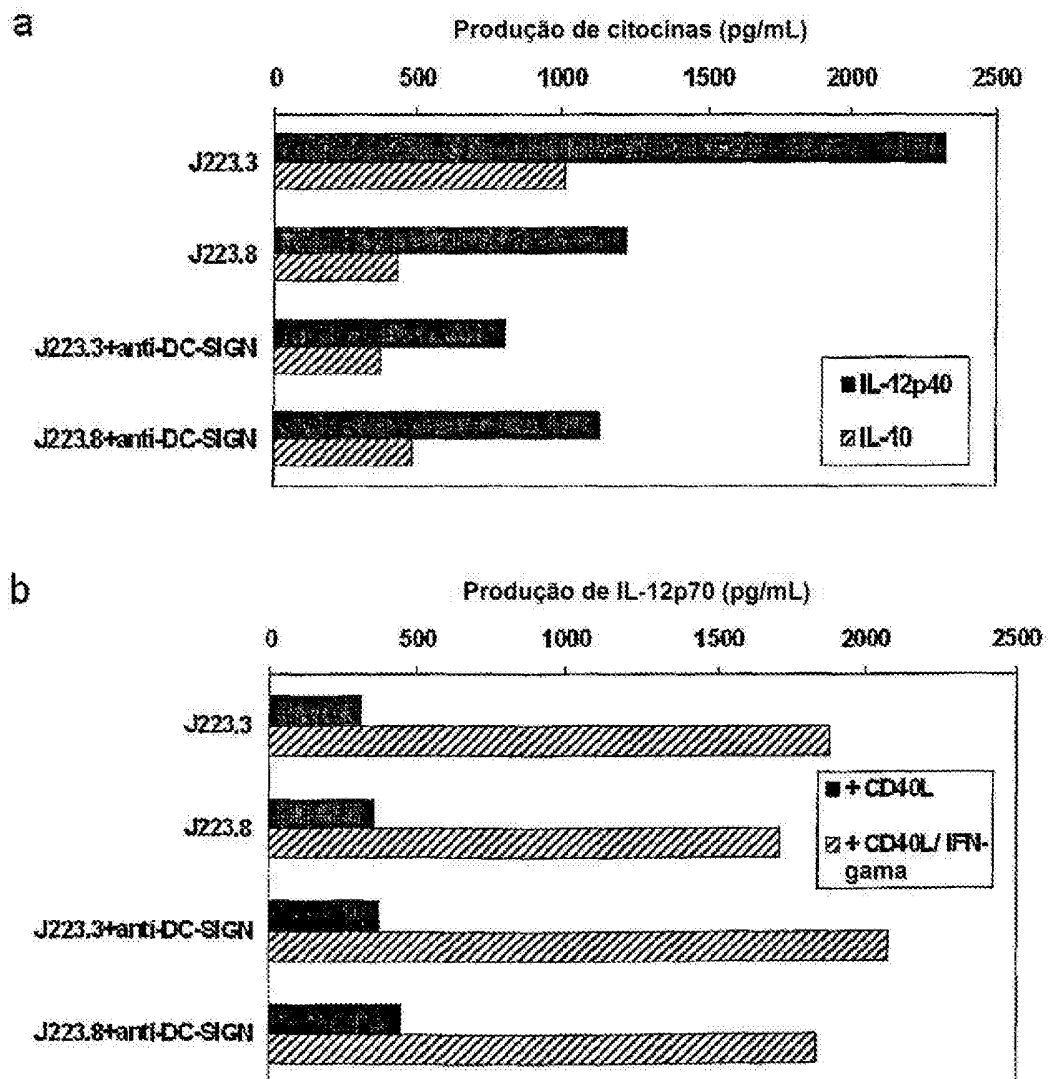
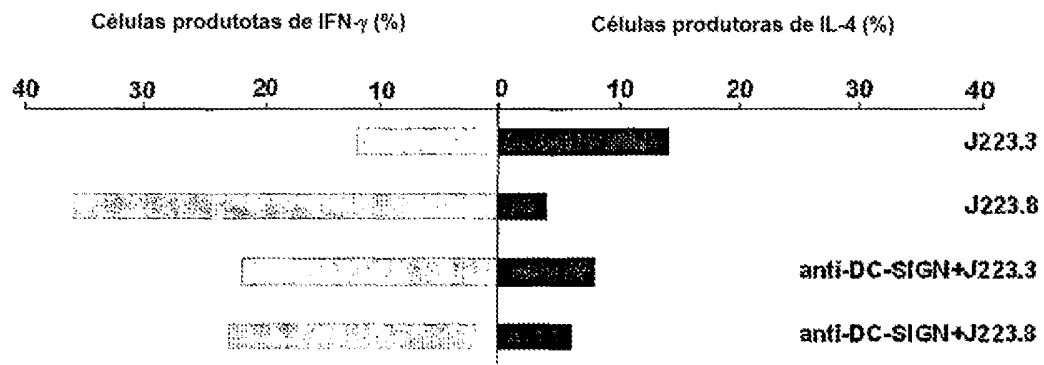


Fig. 47

Ligação de *H. pylori* a DC-SIGN induz a alteração de células T naïf em Th2.



Lactobacilos induzem maturação parcial das DC

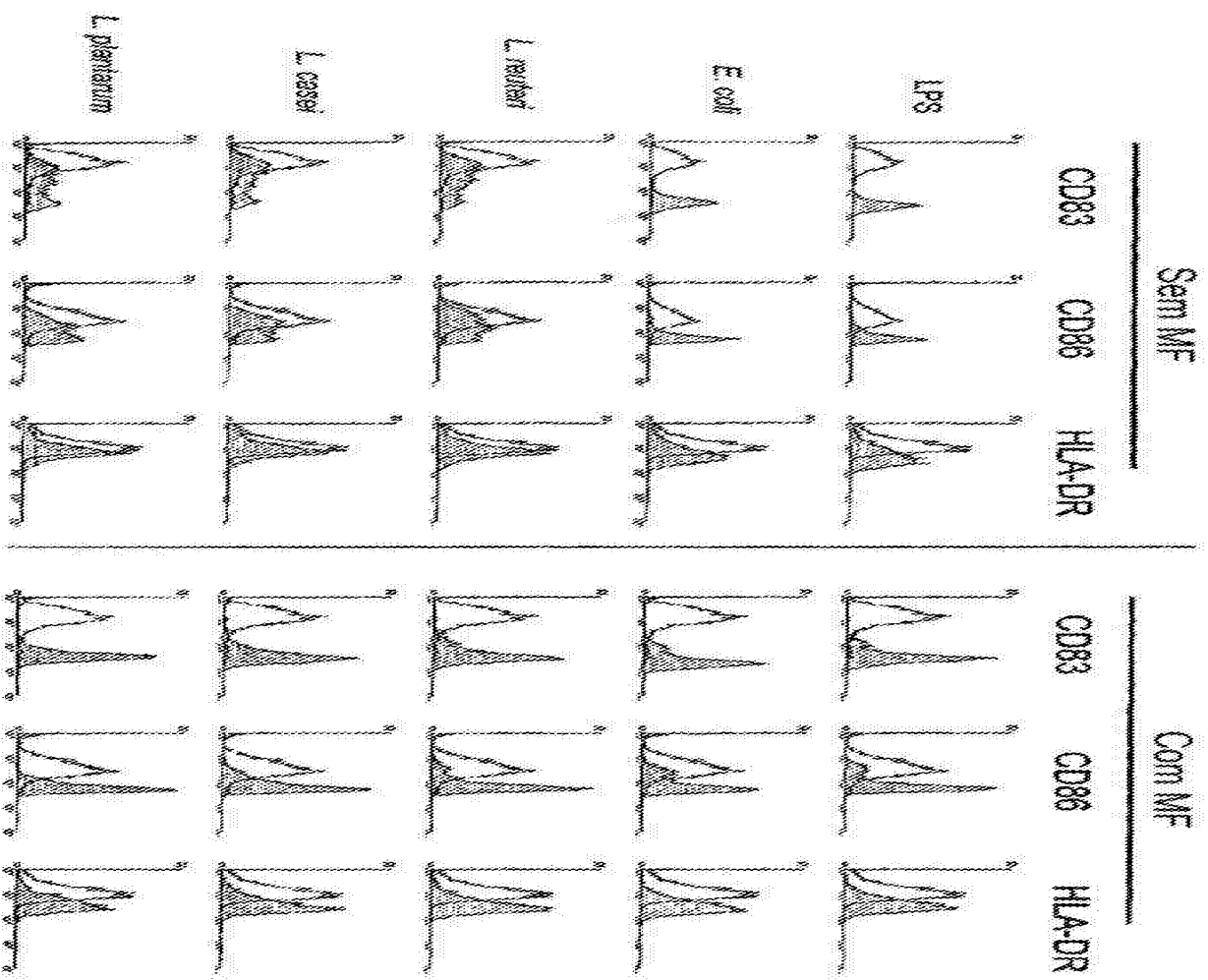


Fig. 48A

Perfis de citocinas induzidos em DC por lactobacilos

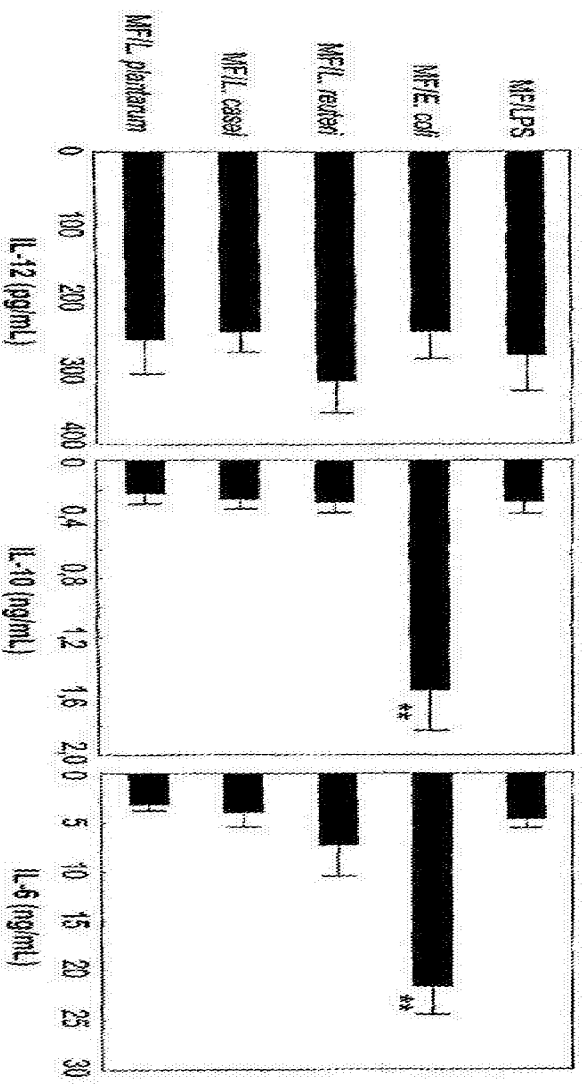


Fig. 48B

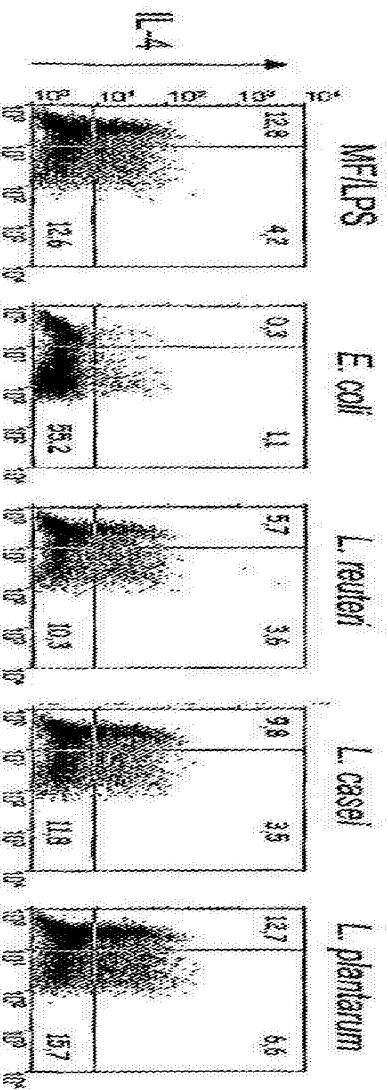


Fig. 49A

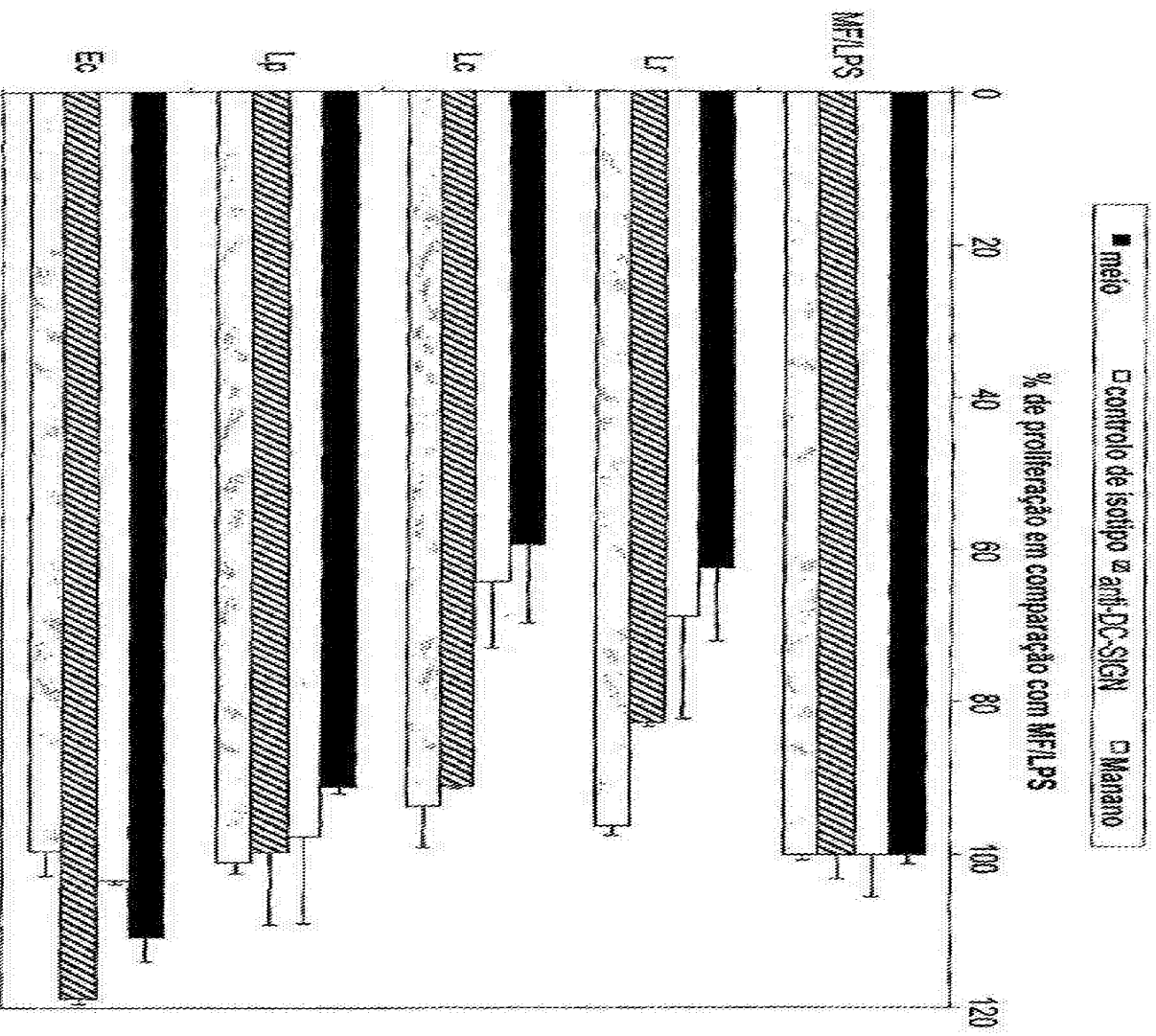


Fig. 49B

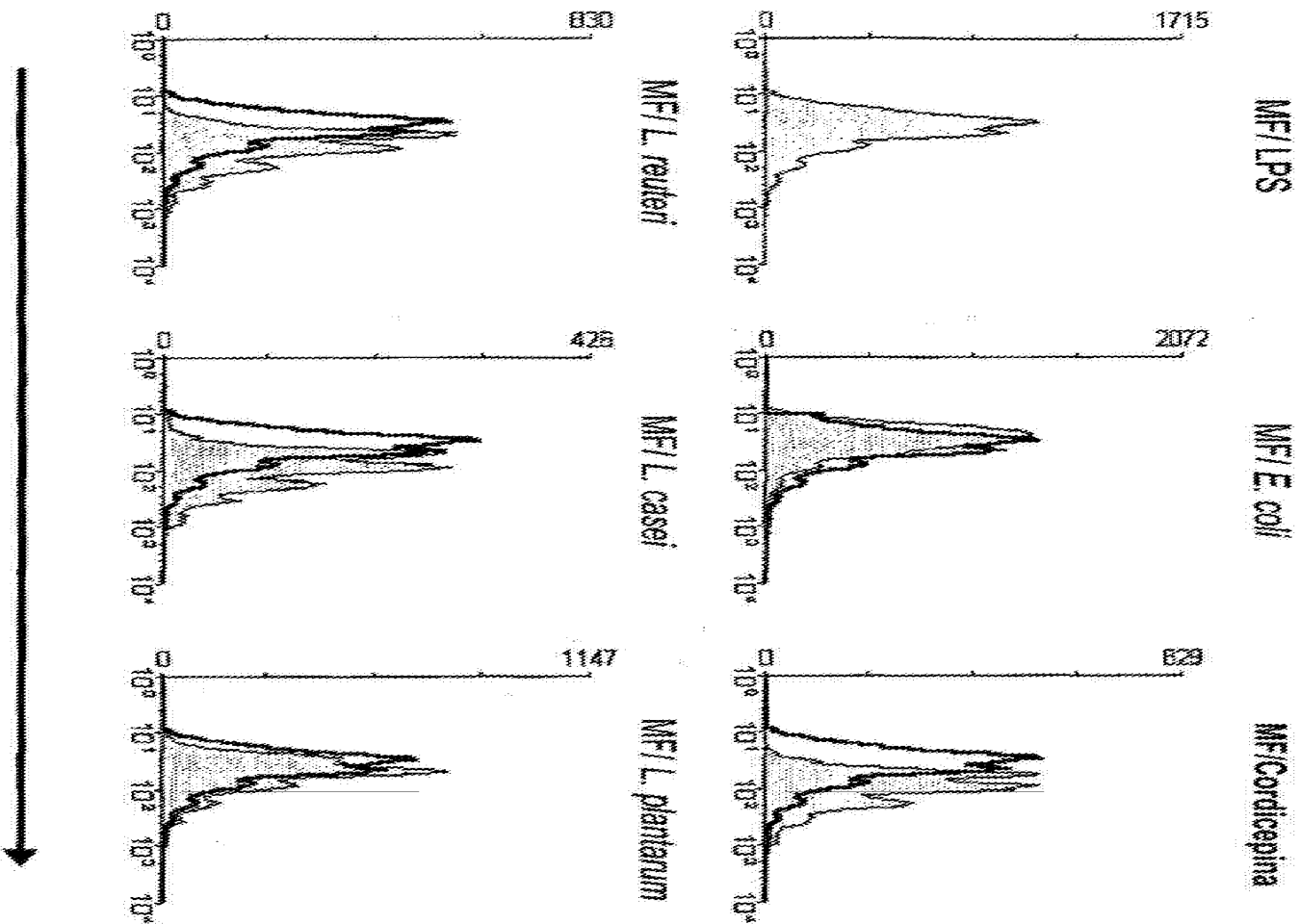


Fig. 49C

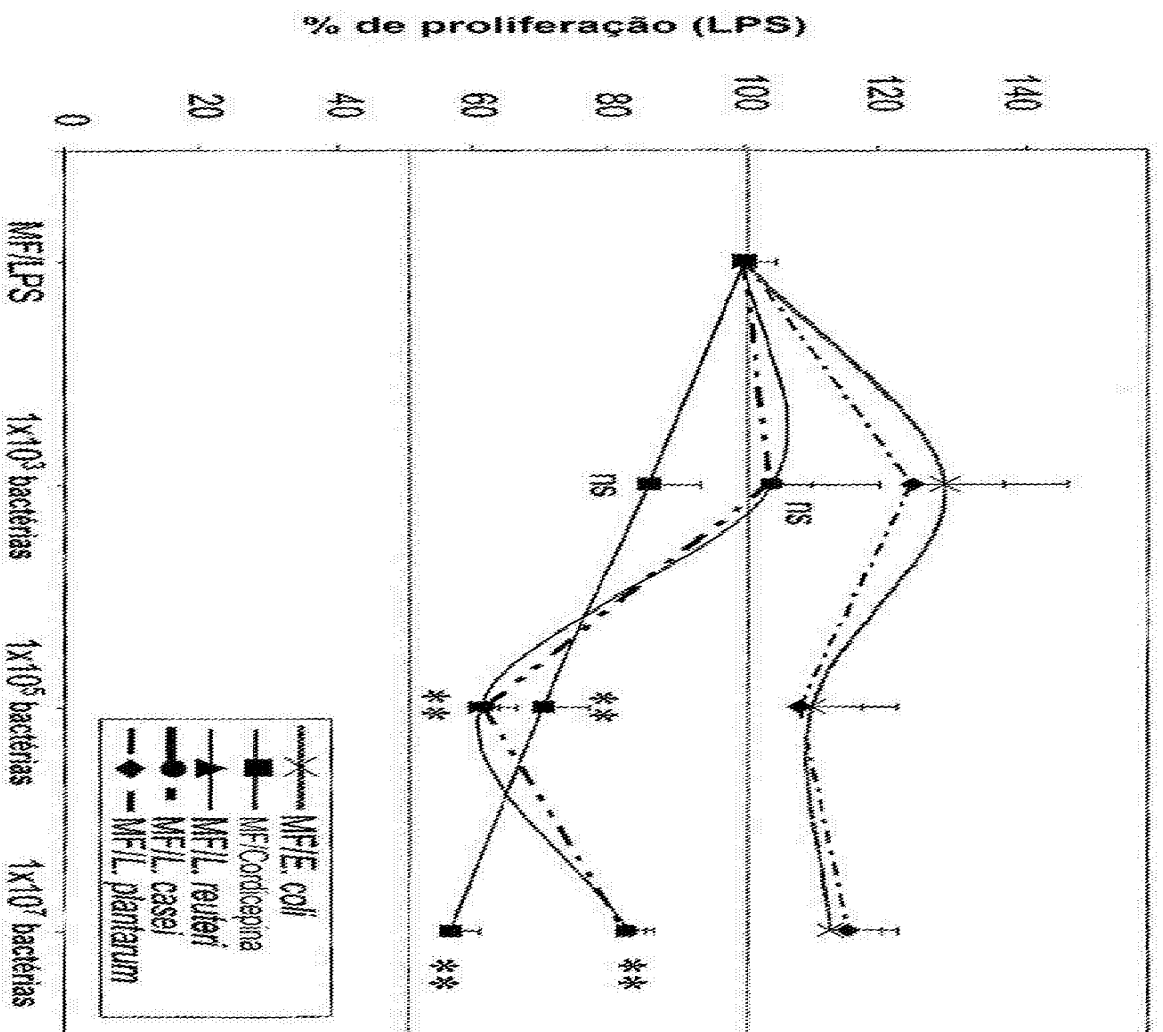


Fig. 49D

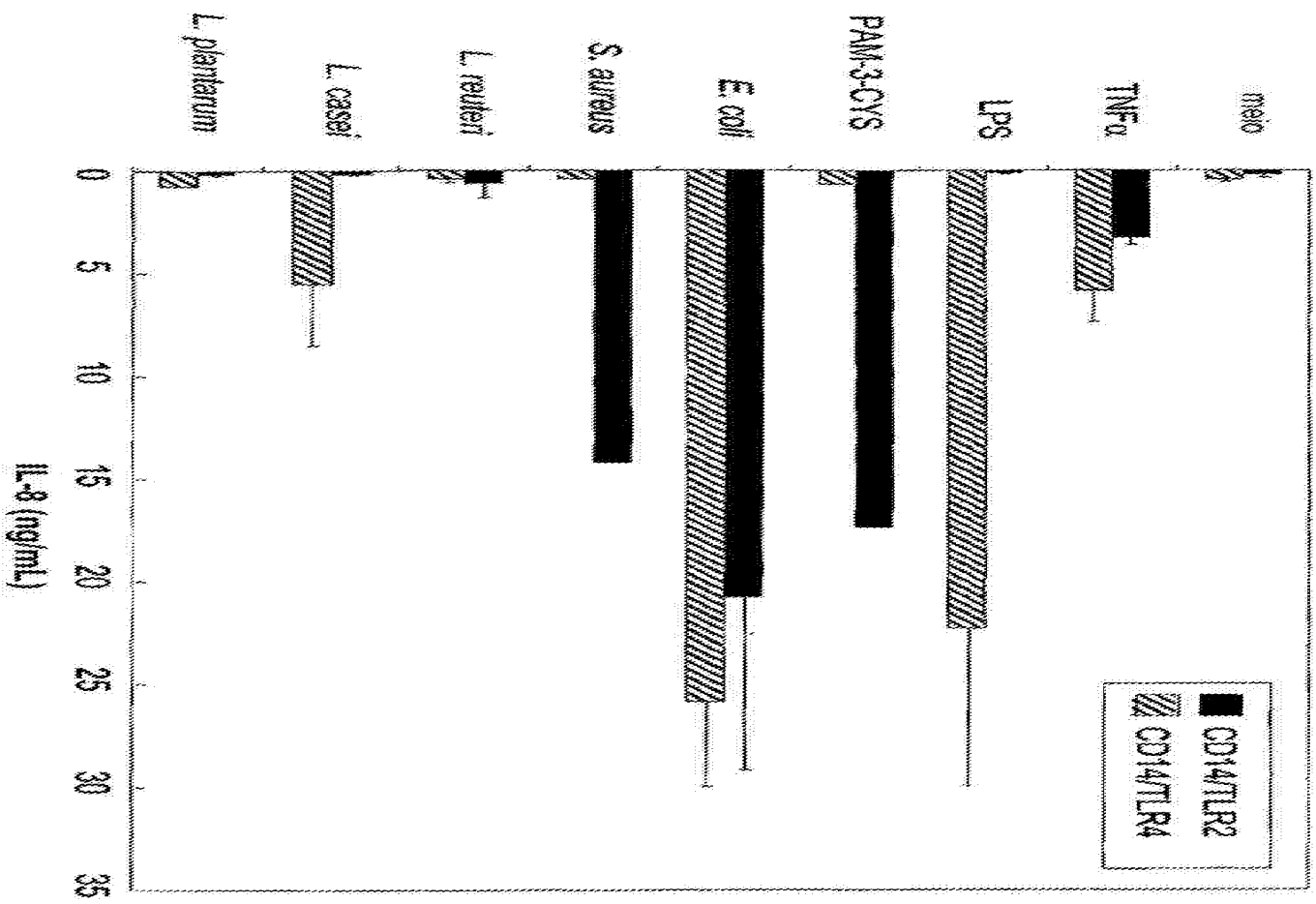


Fig. 50A

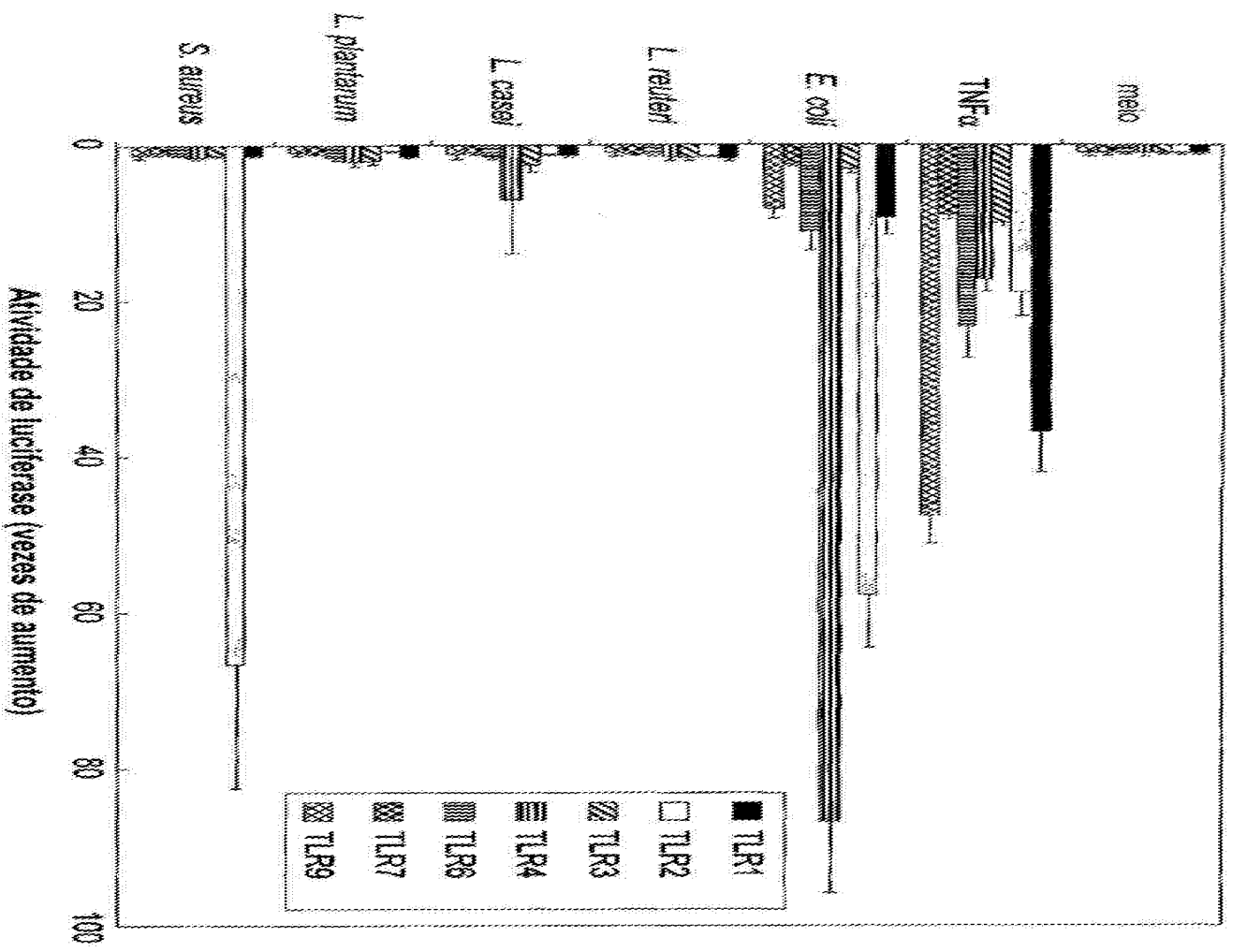


Fig. 508

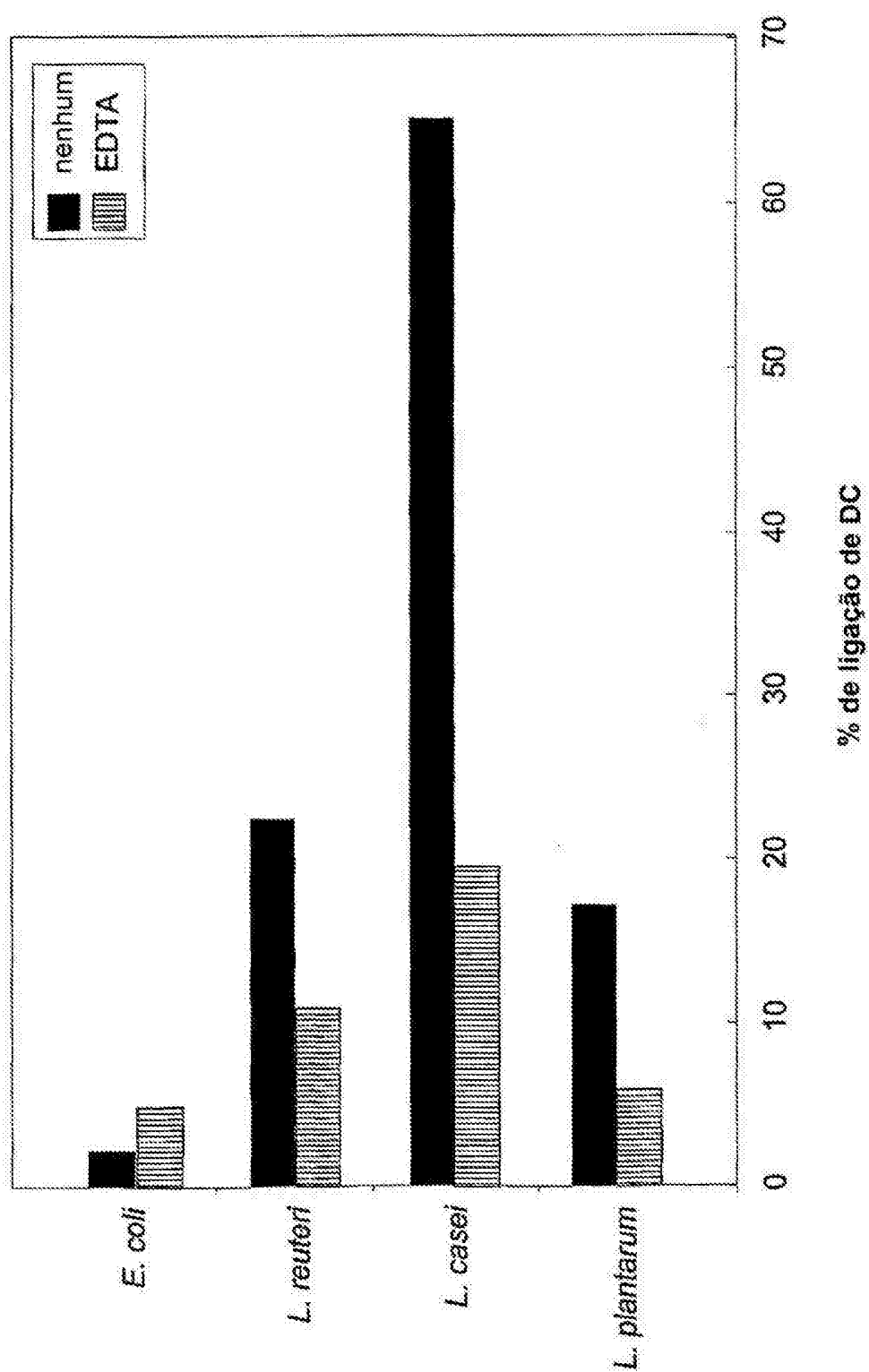


Fig. 51A

Ligação de bactérias probióticas a transferantes de DC-SIGN

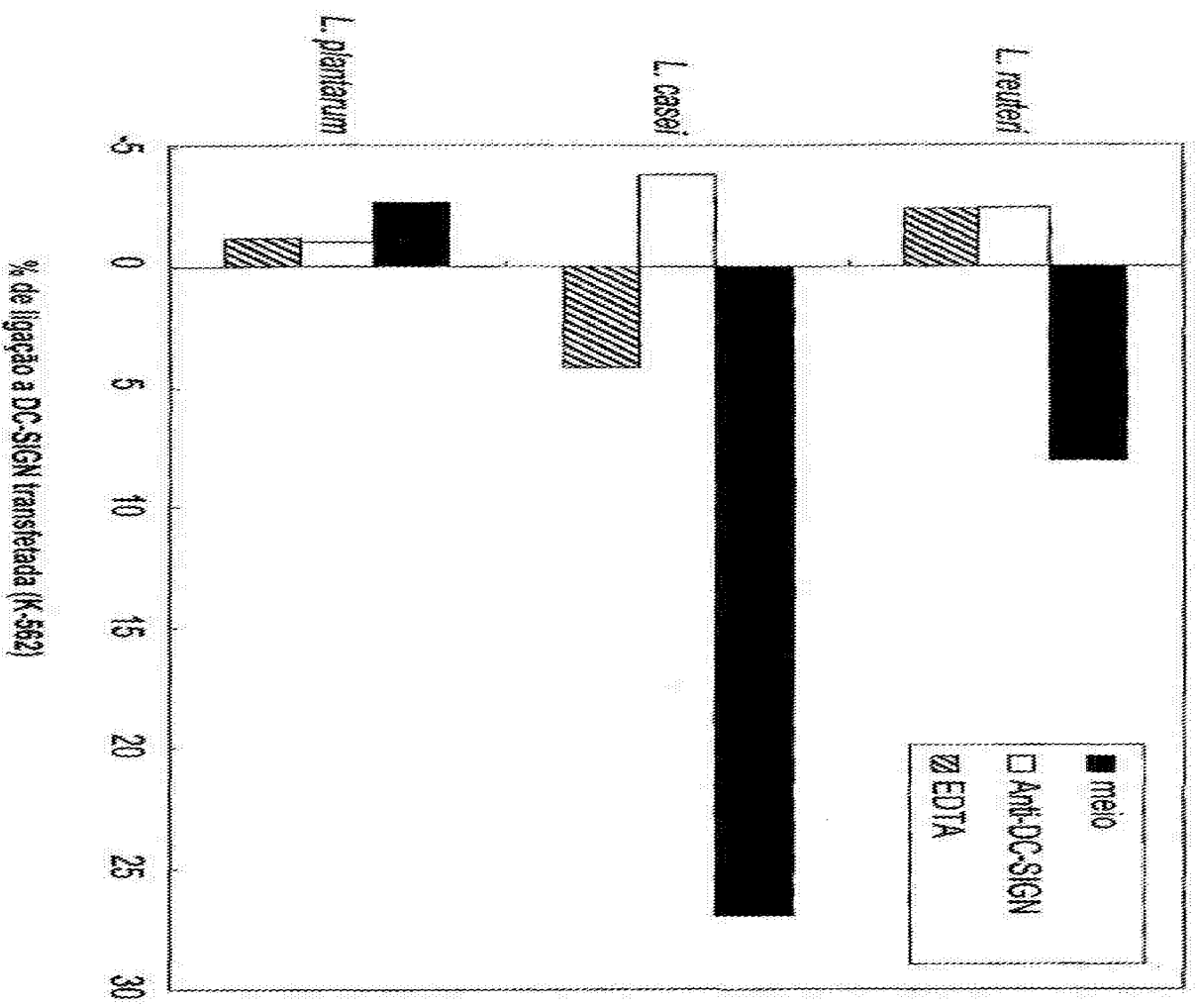


Fig. 51B

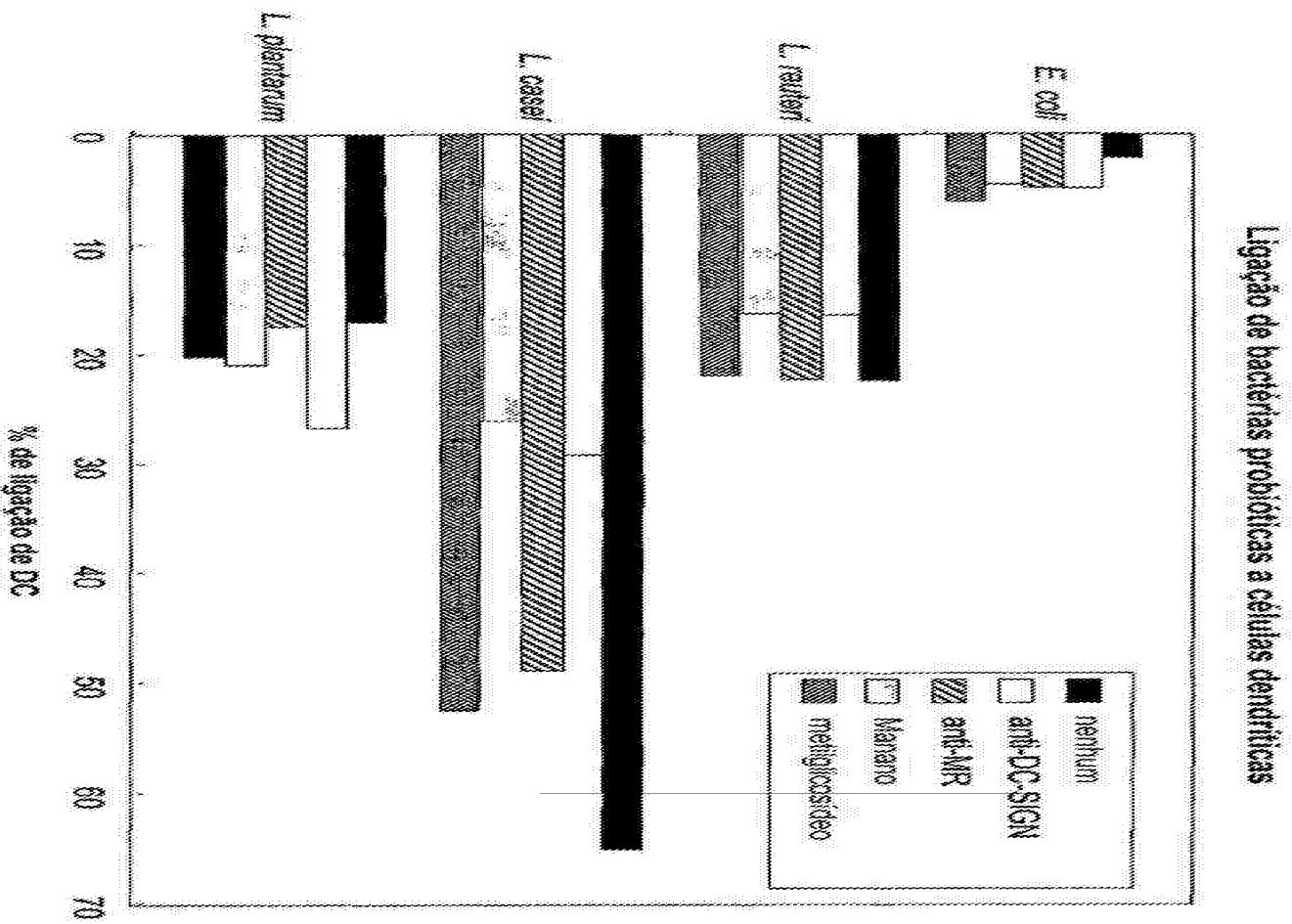


Fig. 51C

Indução de células T reg através da abordagem de DC-SIGN por células próbóticas

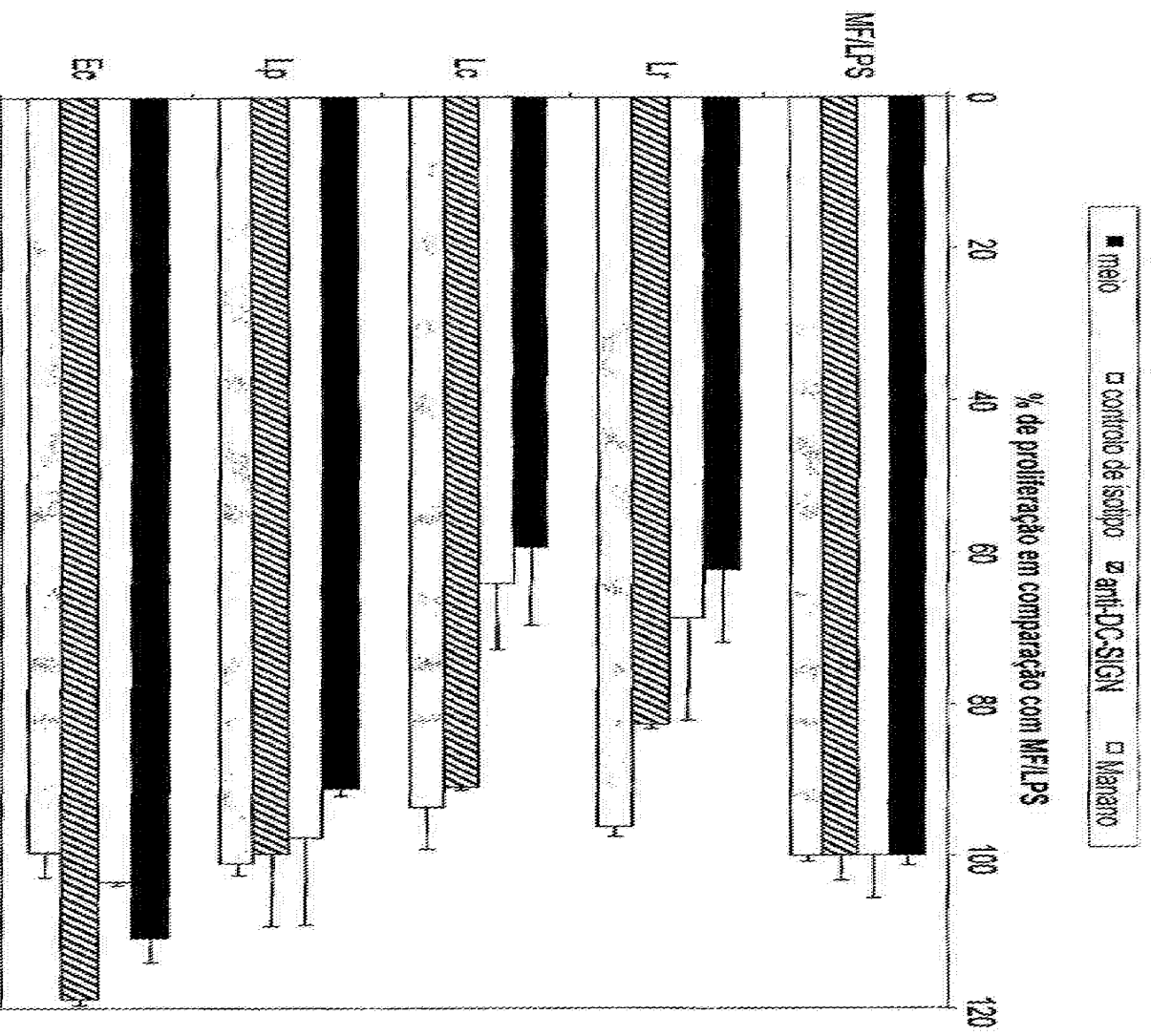


Fig. 52

Fig. 53

PMN expressam o ligando de DC-SIGN Lewis^x e ligam-se com alta afinidade à DC-SIGN recombinante.

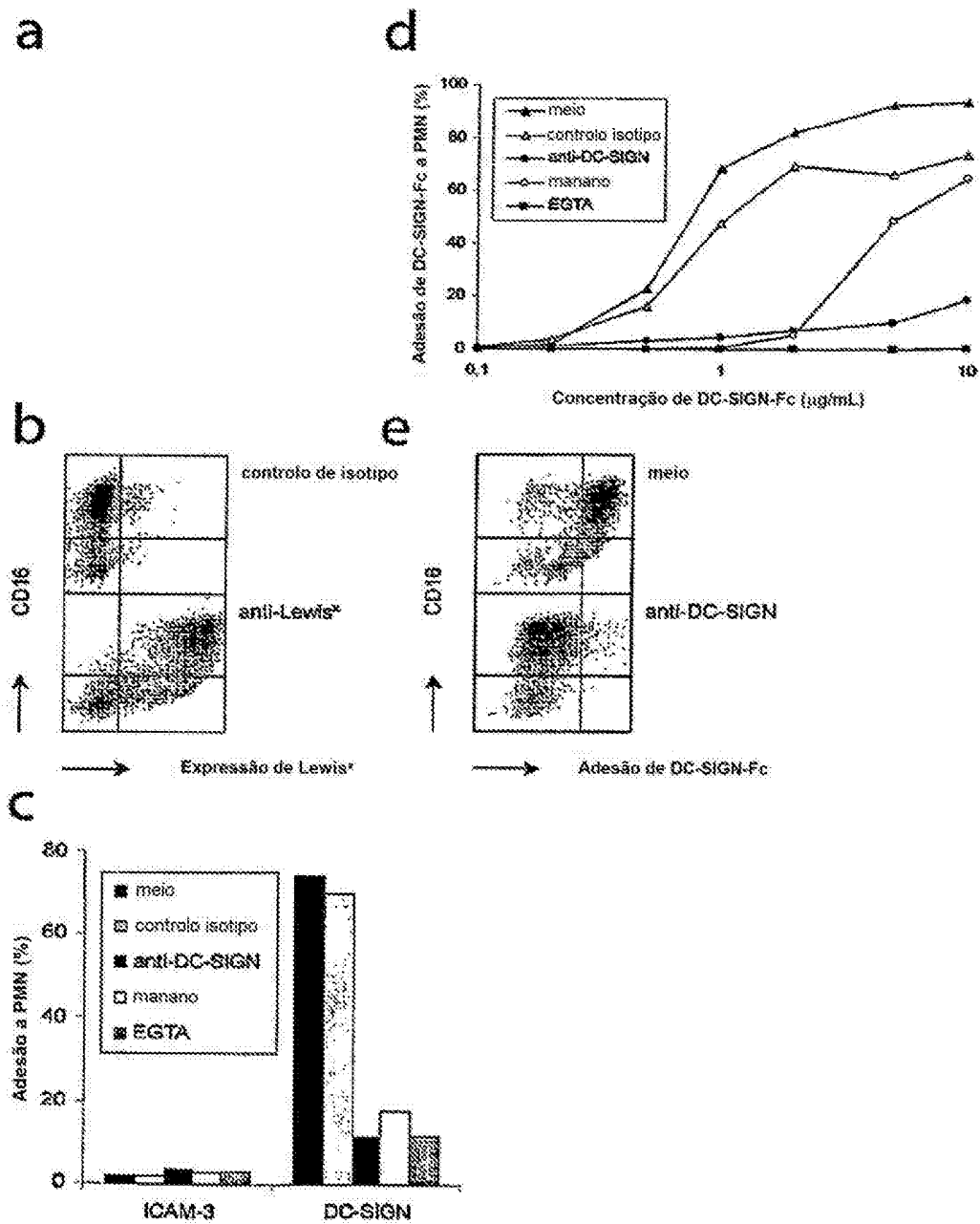


Fig. 54

CEACAM1 expressa em PMN é um ligando de DC-SIGN
e liga-se através das suas unidades de Lewis^x.

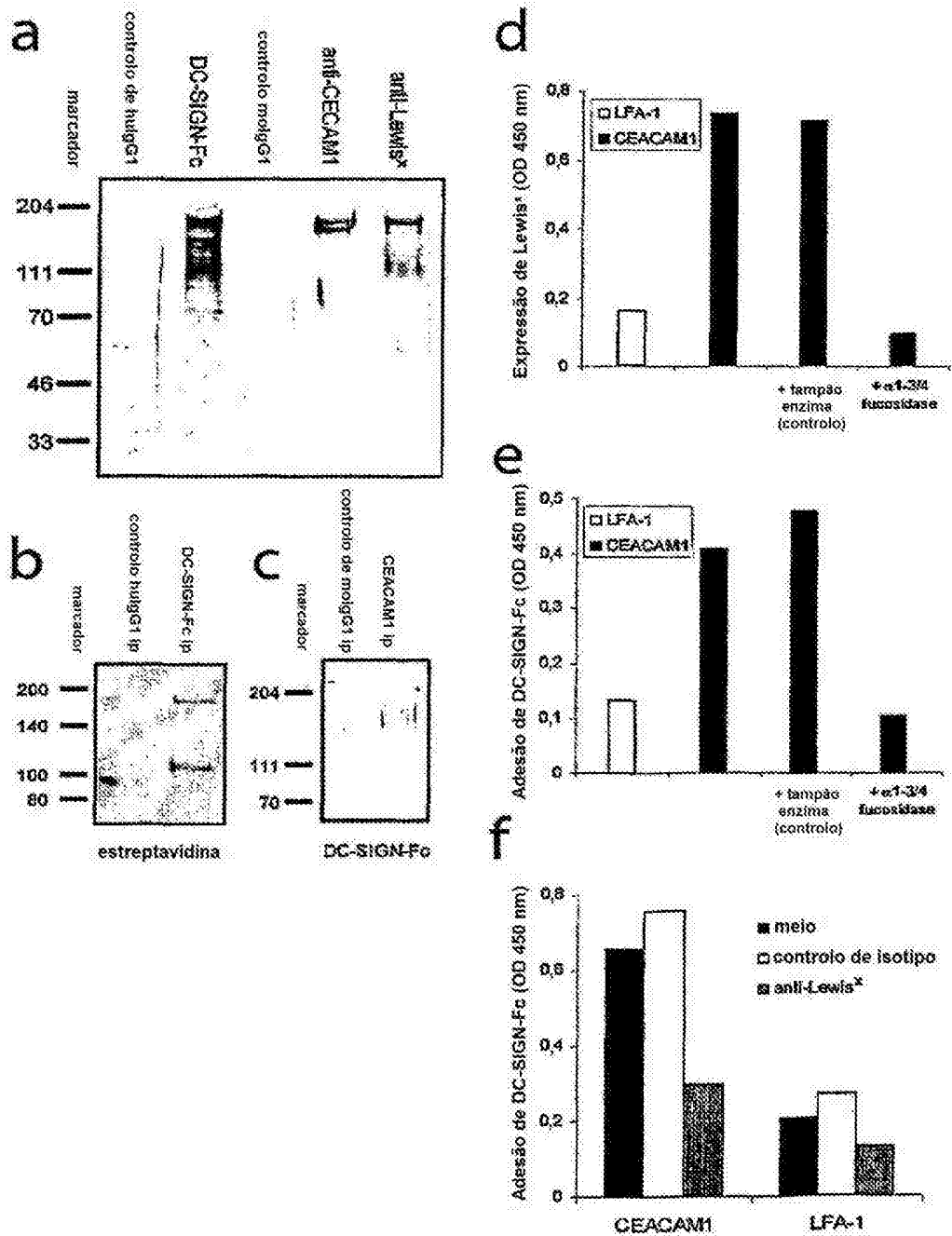


Fig. 55

DC-SIGN celular expressa em transfetantes K562 e DC imaturas liga CEACAM1 nativa de PMN.

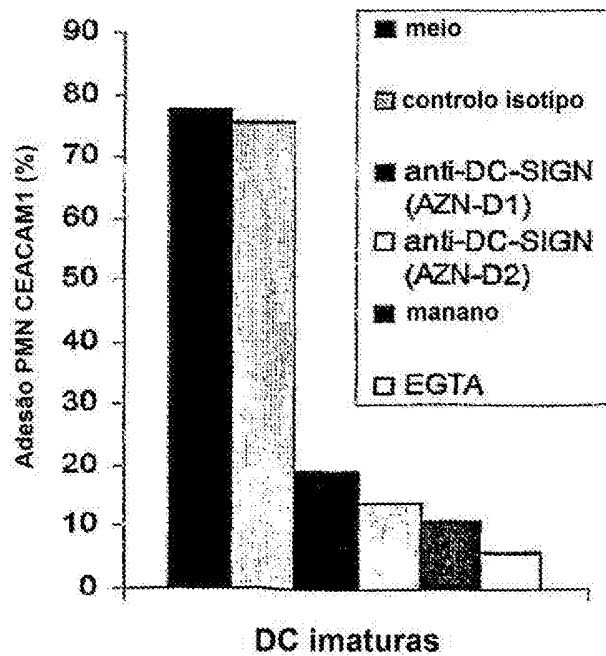
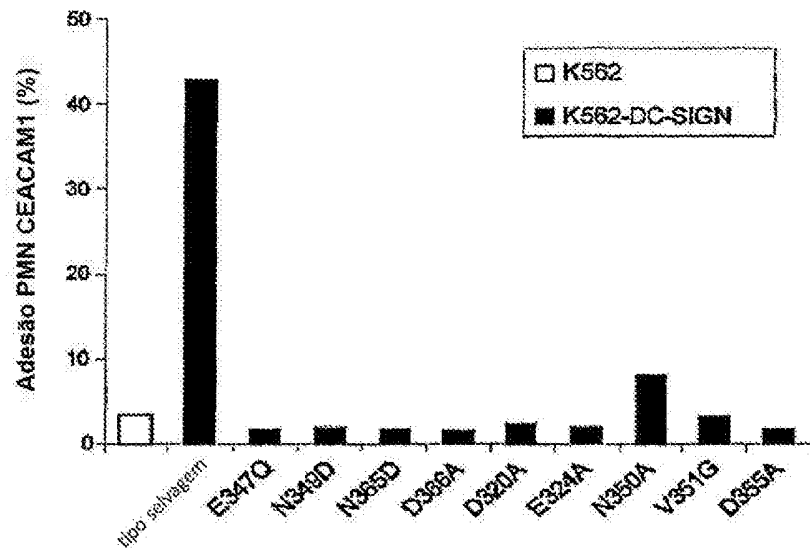


Fig. 56

DC-SIGN está envolvida no agrupamento de DC e PMN.

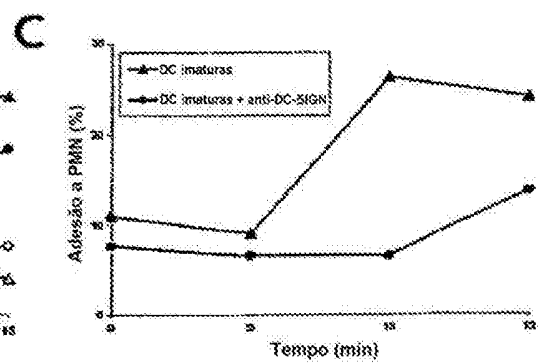
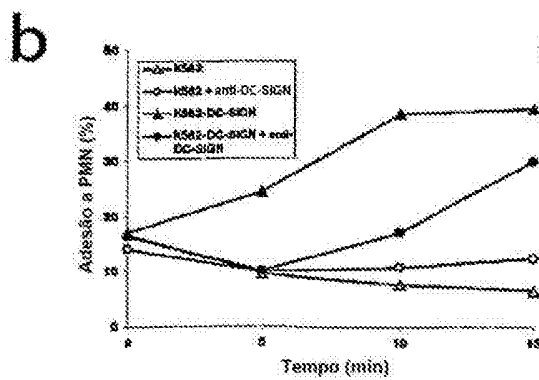
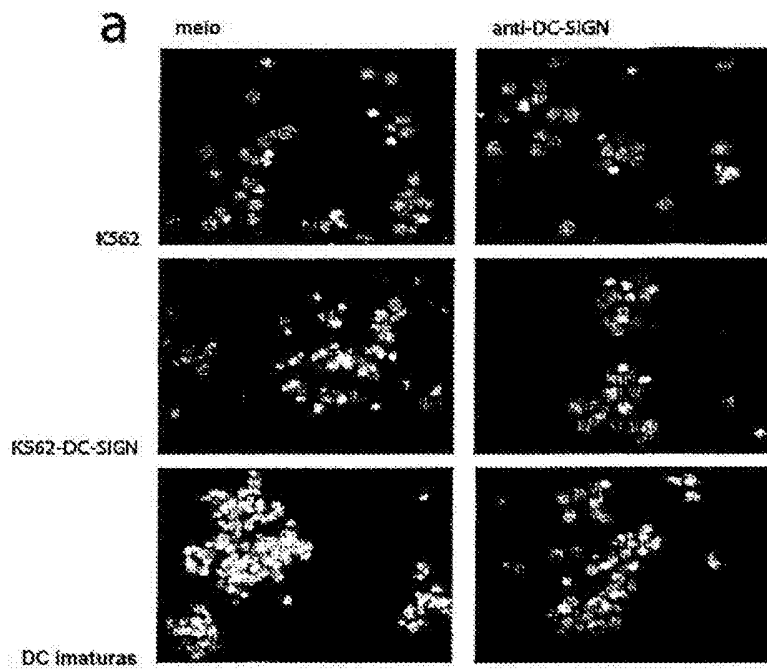


Fig. 57

Localização de PMN e DC na mucosa do cólon de doentes com doença de Crohn.

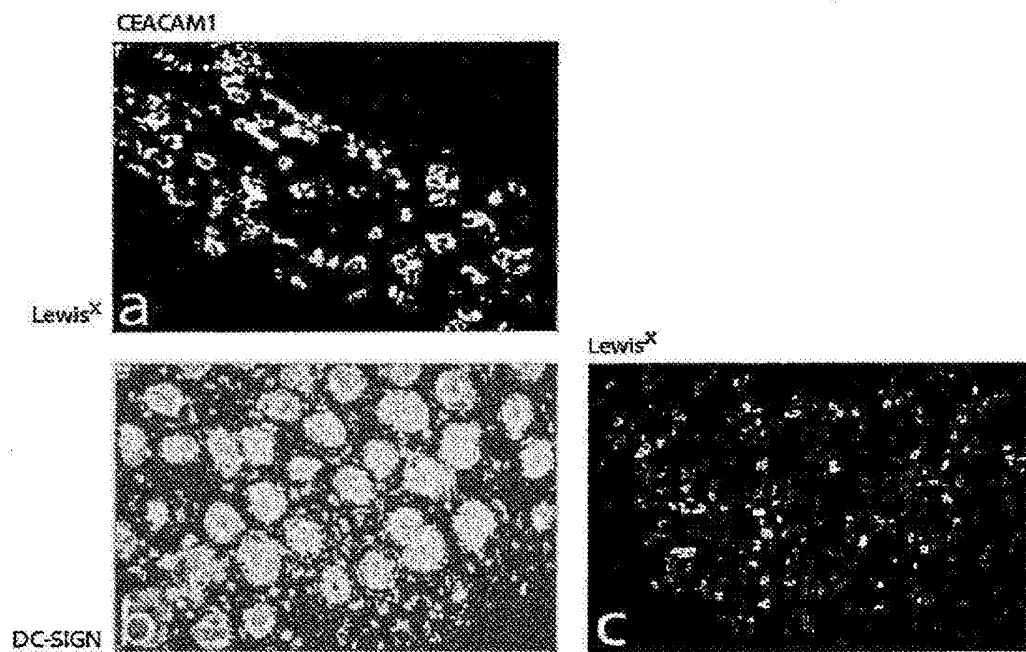
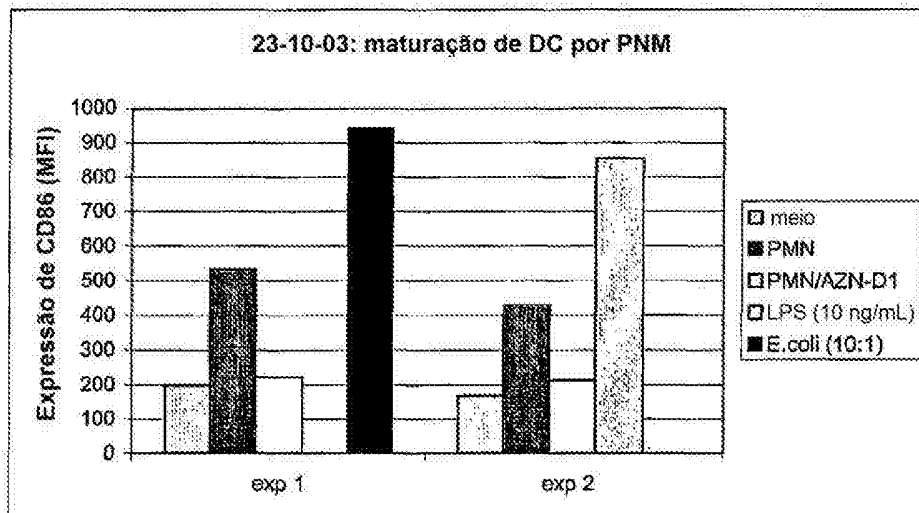


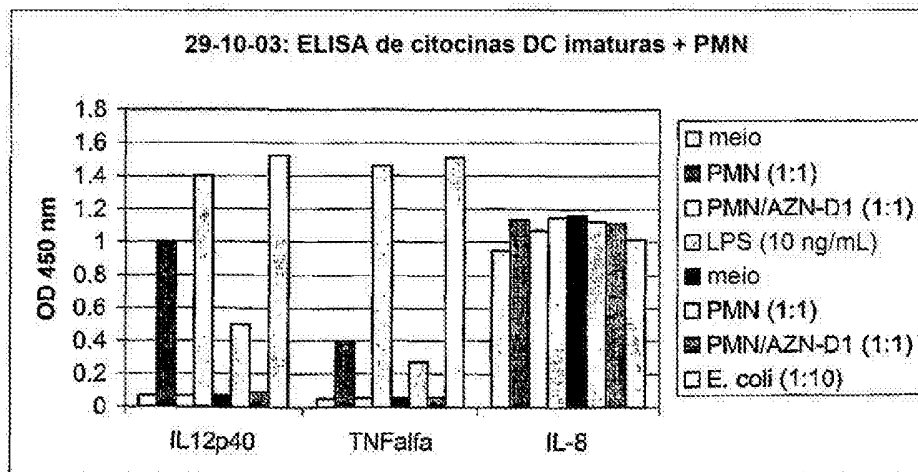
Fig. 58

PMN ativam as DC imaturas através de ligação da DC-SIGN.



A

PMN induzem a regulação positiva de CD86 coestimulador em DC, a qual é independente da ligação de DC-SIGN



B

PMN induzem a secreção de citocinas inflamatórias pelas DC, a qual é independente da ligação de DC-SIGN

Fig. 59

DC-SIGN liga Lex que expressa CD11b presentes em neutrófilos

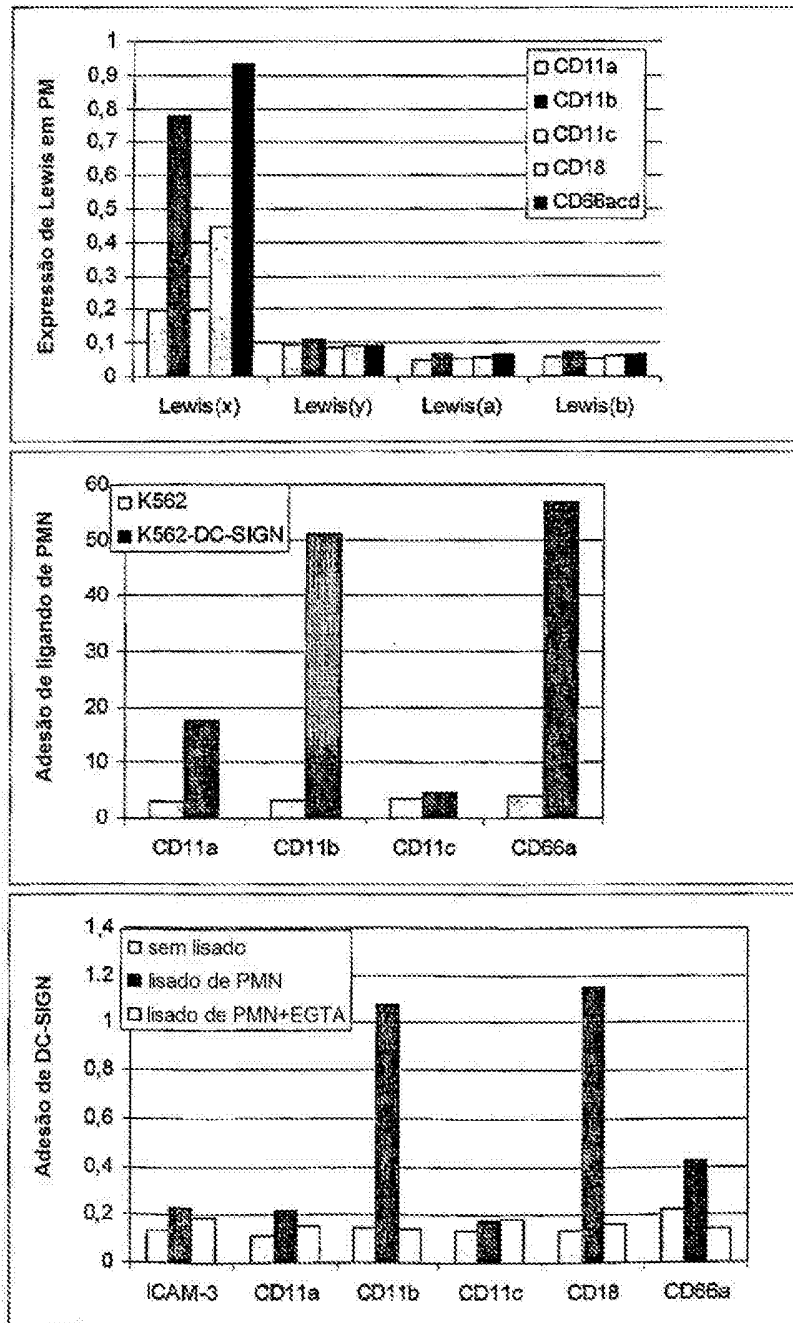
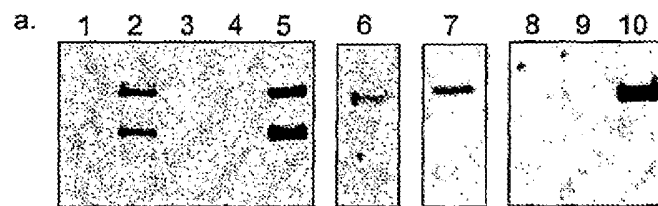


Fig. 59D

DC-SIGN liga CD66acd e CD11b em PMN

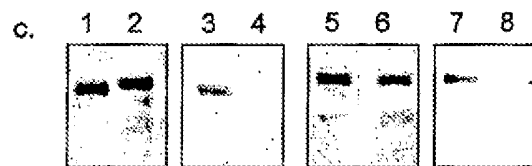
, PMN Biotinilado:

1. ICAM-3-Fc IP, estreptavidina IB
2. DC-SIGN-Fc IP, estreptavidina IB
3. anti-DC-SIGN IP, estreptavidina IB
4. anti-CD66acd IP, estreptavidina IB
5. anti-CD11b IP, estreptavidina IB
6. DC-SIGN-Fc IP, anti-CD66acd IB
7. DC-SIGN-Fc IP, anti-CD11b IB
8. anti-DC-SIGN IP, DC-SIGN-Fc IB
9. anti-CD66acd IP, DC-SIGN-Fc IB
10. anti-CD11b IP, DC-SIGN-Fc IB

IB, imunotransferência (deteção/ligação)

IP, imunoprecipitação (captura)

Fig. 60

DC-SIGN liga Lewis em CD11b

PMN biotinilados, anti-CD11b IP, estreptavidina IB:

- 1. controle
- 2. PNGaseF

SW948 biotinilado, anti-CD11b IP, DC-SIGN-Fc IB:

- 3. controle
- 4. PNGaseF

PMN biotinilados, anti-CD11b IP, estreptavidina IB:

- 5. controle
- 6. α -1,3/4-Fucosidase

PMN biotinilados, anti-CD11b IP, DC-SIGN-Fc IB:

- 7. controle
- 8. α -1,3/4-Fucosidase

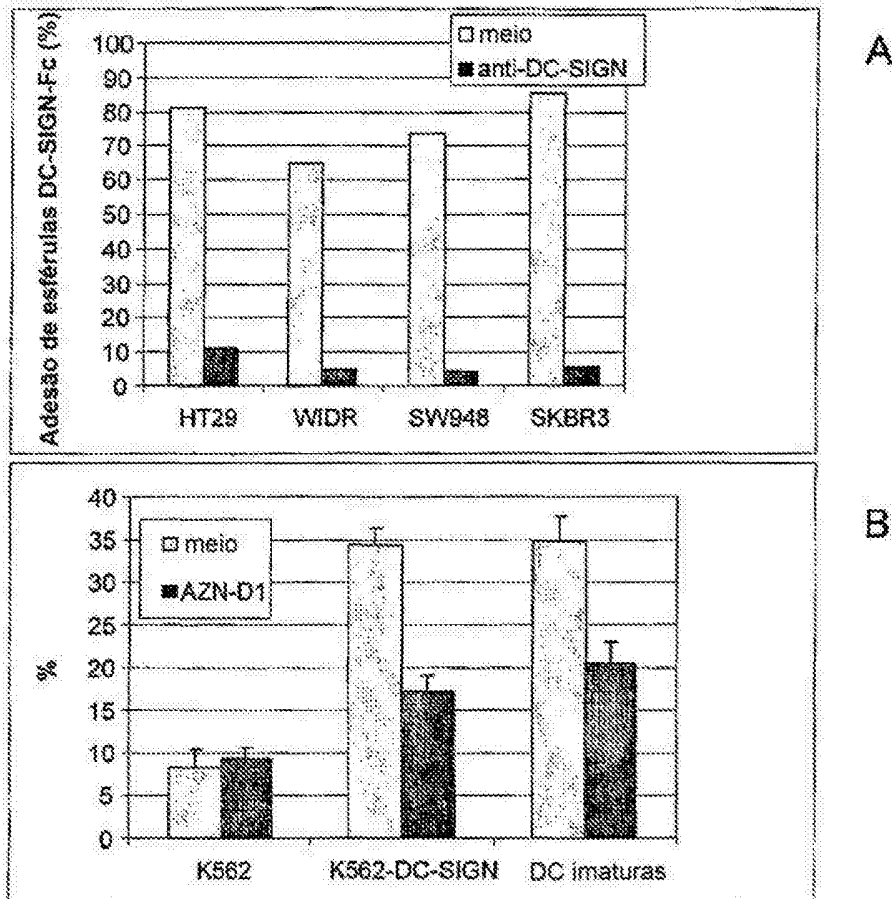
IB, imunotransferência (deteção/ligação)

IP, imunoprecipitação (captura)

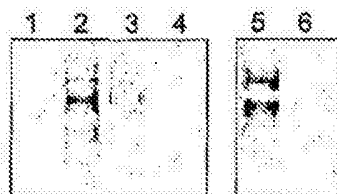
Fig. 61

DC-SIGN liga células tumorais que expressam CD66e

DC-SIGN liga o antígeno tumoral CD66e=CEA



C



b. SW948 Biotinilado:

1. ICAM-3-Fc IP, estreptavidina IB,
2. DC-SIGN-Fc IP, estreptavidina IB
3. anti-CD66ae IP, estreptavidina IB
4. anti-CD11b IP, estreptavidina IB
5. anti-CD66ae IP, DC-SIGN-Fc IB
6. anti-CD11b IP, DC-SIGN-Fc IB

IB, imunotransferência (detecção/ligação)
IP, imunoprecipitação (captura)

DC-SIGN reconhece Le^xLe^y em CD66e em células tumorais

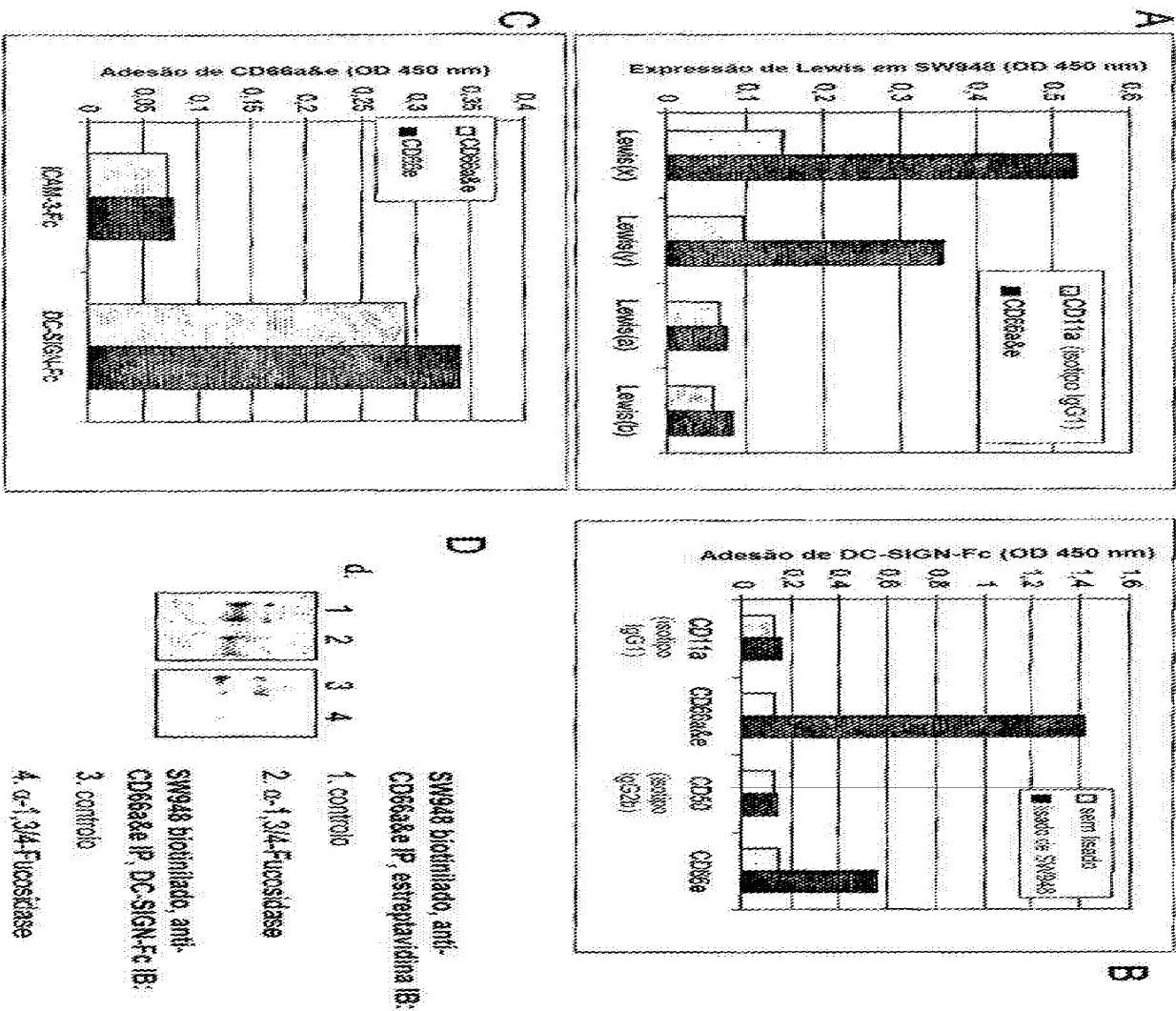


Fig. 62

Ligação de *Neisseria Meningitidis* a transfectantes 293T (100703)

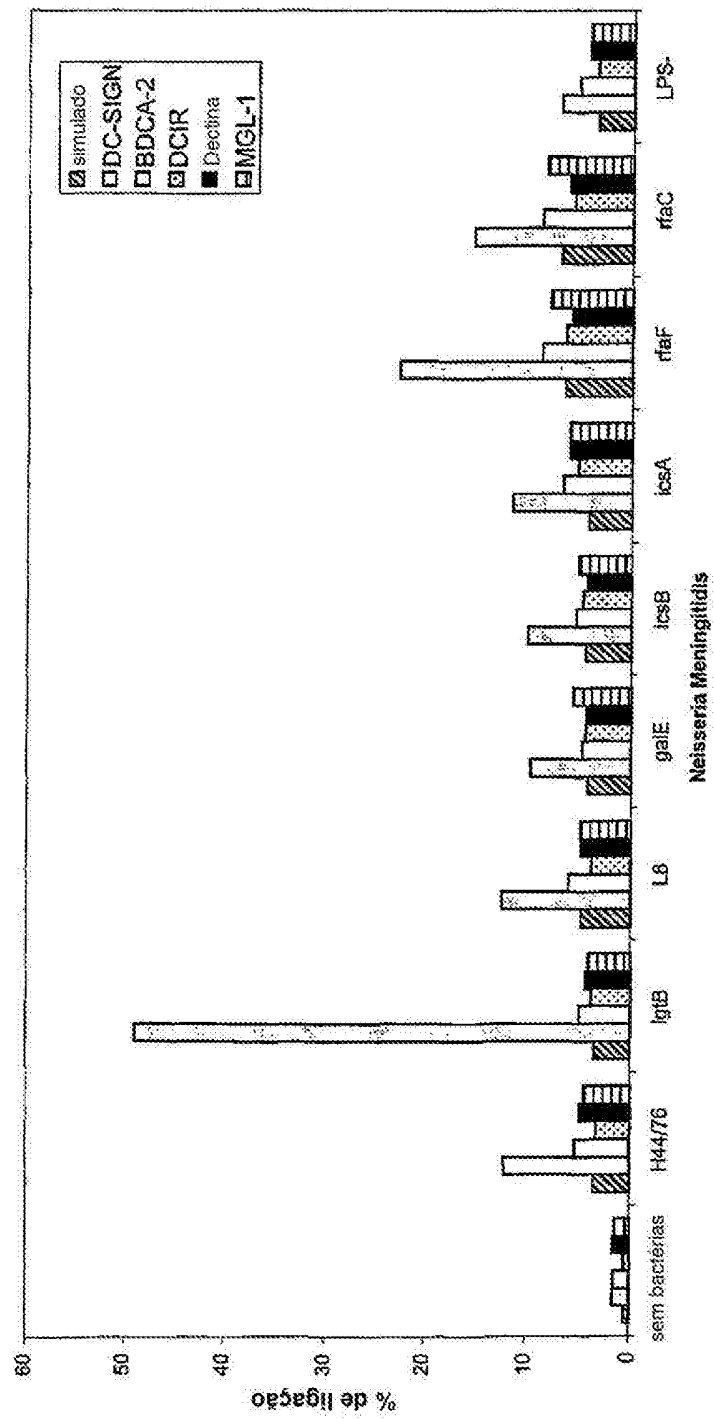


Fig. 64

Ligação de *Neisseria Meningitidis* a DC (100703)

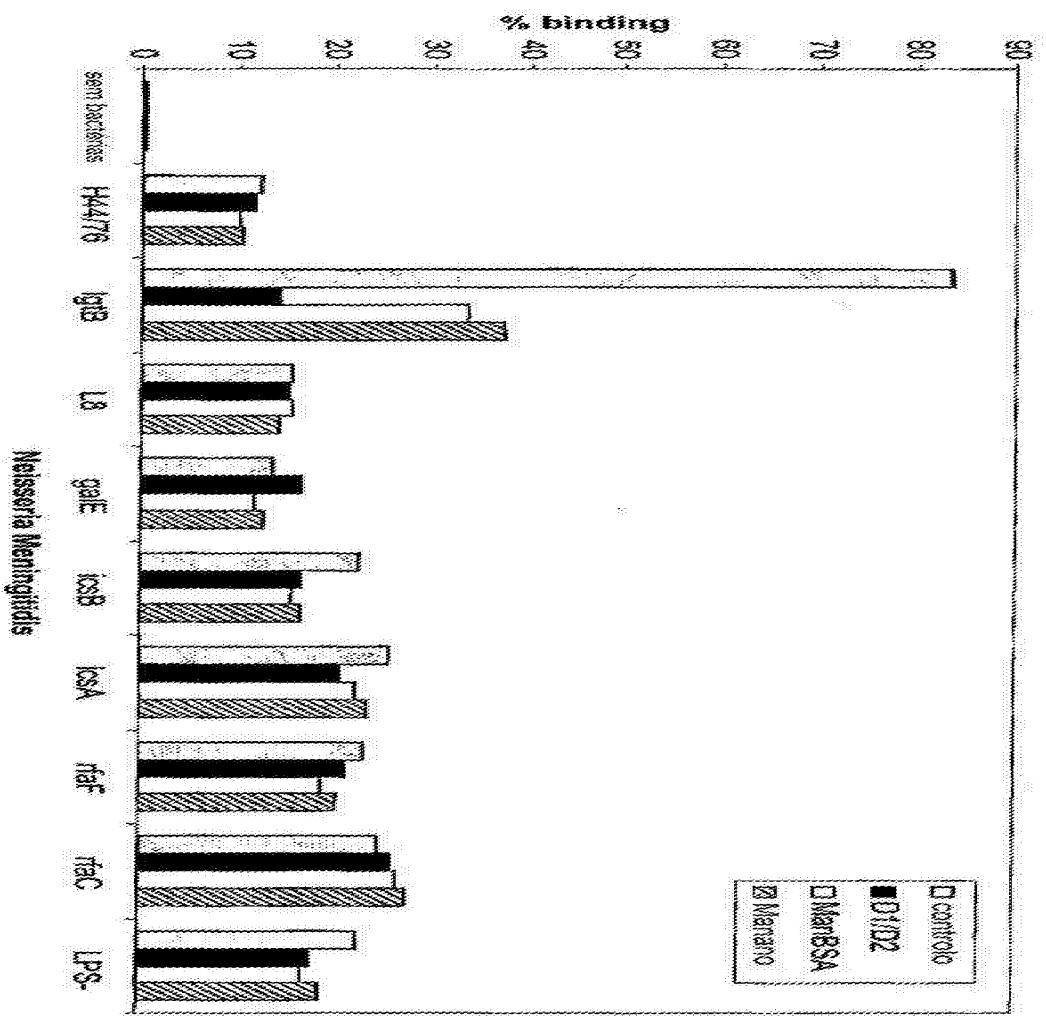


Fig. 65

Fig. 66

