



Papel das Yops secretadas por *Yersinia* sobre a resposta imune do hospedeiro

Medeiros, B.M.M.^{1*}; Maia, J.M.L.¹; Monnazzi, L.G.S.¹

¹Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP

Recebido 03/10/05 / Aceito 03/11/05

RESUMO

O gênero *Yersinia* compreende três espécies patogênicas para humanos: *Y. pestis*, *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis*. A patogenicidade de *Yersinia* está ligada à presença do plasmídeo de 70-kb (pYV) que é comum às três espécies e codifica um sistema de secreção do tipo III e um conjunto de proteínas de virulência, incluindo aquelas conhecidas como Yops (*Yersinia outer proteins*), que são exportadas por este sistema quando as células do hospedeiro são infectadas pela bactéria. Duas Yops translocadoras (YopB e YopD) se inserem na membrana plasmática e funcionam no transporte de seis efetoras (YopO, YopH, YopM, YopJ e YopT) para o citosol da célula do hospedeiro. As Yops efetoras funcionam interferindo em múltiplas vias de sinalização da célula infectada. Como consequência, a resposta imune inata e adaptativa do hospedeiro fica afetada. Este trabalho enfoca o papel das Yops na modulação da resposta imune do hospedeiro.

Palavras-chave: *Yersinia*; Yops, fagocitose, citocinas, anticorpos.

INTRODUÇÃO

O gênero *Yersinia* compreende três espécies patogênicas para humanos: *Y. pestis*, *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis*. *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis* são enteropatógenos que causam infecções auto-limitadas do trato gastrointestinal (Bottone, 1997). *Y. pestis* é o agente da peste, uma infecção aguda, frequentemente fatal, que é transmitida por picadas de pulgas ou por aerossóis (Perry & Fetherston, 1997).

Y. enterocolitica e *Y. pseudotuberculosis* são capazes de se multiplicar no meio ambiente, e quando introduzidas no homem, podem causar um largo espectro de doenças gastrointestinais, desde enterite até linfadenite mesentérica. A infecção é geralmente iniciada pela ingestão de água ou alimentos contaminados. O microrganismo inicialmente atinge o intestino delgado e invade a barreira intestinal passando através das células M, as células especializadas do epitélio associado aos folículos que funcionam na captura de antígenos. Após invasão do epitélio intestinal, a bactéria

se replica dentro das placas de Peyer e também se espalha para os linfonodos mesentéricos, resultando em linfadenite mesentérica, um evento característico de infecção intestinal por *Yersinia*. *Y. pseudotuberculosis* pode atingir a corrente circulatória e causar septicemia, mas este evento ocorre muito raramente em humanos. Entretanto, o desenvolvimento de artrite reativa (ReA) em humanos como seqüela da infecção por *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis* tem sido descrito. (Hannu et al., 2003).

Embora existam diferenças no modo de entrada no hospedeiro e na severidade das doenças causadas, todas as três espécies patogênicas de *Yersinia* apresentam em comum um tropismo pelos tecidos linfóides e uma notável capacidade de resistir à resposta imune primária do hospedeiro. Além disso, vários fatores de virulência comuns às espécies patogênicas de *Yersinia* foram identificados, e dentre estes incluem-se fatores que promovem resistência ao soro, expressão coordenada de genes e aquisição de ferro. Além disso, todas as três bactérias possuem um plasmídeo de aproximadamente 70-kb (pYV) que é essencial para a replicação da bactéria nos tecidos do hospedeiro, uma vez que codifica um sistema de secreção do tipo III (TTSS) e numerosas proteínas secretadas (Yops e LcrV), quando a bactéria cresce a 37°C (Perry & Fetherston, 1997, Cornelis et al., 1998).

Após serem exportadas pelo TTSS, várias Yops são liberadas diretamente no interior dos fagócitos, onde agem inibindo a fagocitose e a produção de citocinas pró-inflamatórias, e ativando a apoptose (Cornelis, 2002). O antígeno LcrV é uma proteína secretada de 37kDa que, quando no meio extracelular, funciona inibindo a inflamação através de interação com receptores Toll do tipo 2 (TLR-2) (Brubaker, 2003). Marenne et al. (2003) mostraram a necessidade do LcrV, juntamente com a YopB e YopD, na formação de poros em membranas de macrófagos. Enquanto algumas Yops são efetoras intracelulares outras, como a YopB e a YopD, são secretadas no meio extracelular e têm como função translocar as efetoras para o interior das células eucarióticas. Pelo menos seis proteínas efetoras seriam ativas na célula do hospedeiro: YopH, YopE, YopJ/YopP, YpkA/YopO, YopM e YopT. Os efeitos destas Yops foram estudados inicialmente em macrófagos e linhagens de células epiteliais (Cornelis & Wolf-Watz, 1997; Cornelis et al., 1998).

*Autor Correspondente: Beatriz Maria Machado de Medeiros - Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP. Rodovia Araraquara-Jaú, km 1, 14801-902, Araraquara, SP, Brasil. E-mail: medeiros@fcar.unesp.br, Fone: (16) 3301 6949, Fax: (16) 3301 6940.

Influência das Yops sobre a resposta imune inata

O papel das Yops sobre a resposta imune do hospedeiro foi primeiramente estudado com relação à resposta imune inata.

A atividade de YopE, uma proteína de 25 kDa, está associada com despolimerização do citoesqueleto da célula do hospedeiro, prevenindo assim a ingestão da bactéria (Rosqvist et al., 1991). A YopE é um determinante de virulência essencial que contém um domínio efetor carbóxi-terminal (Sory et al., 1995; Schesser et al., 1996) que compartilha um alto grau de similaridade com o domínio amino-terminal da exoenzima S (ExoS) de *Pseudomonas aeruginosa* e SptP de *Salmonella typhimurium*. Recentemente foi demonstrado que YopE e ExoS possuem atividade GAP (Proteínas Ativadoras de GTP-ases) sobre as GTP-ases da família Rho (RhoA, Rac e Cdc42) *in vitro*, e que esta atividade GAP é essencial para a citotoxicidade mediada por YopE (Goehring et al., 1999; Black & Bliska, 2000; von Pawell-Rammingen et al., 2000). Estudos bastante recentes apontaram um novo papel para a YopE na modulação da resposta inflamatória durante infecção de macrófagos *in vitro*; demonstrou-se o envolvimento de Rho GTPases, em particular Rac1, na regulação da ativação da caspase-1 (Schotte et al., 2004).

As funções de YopT (35,5 kDa) não são muito claras, porém, tem sido demonstrado que suas funções muito se assemelham às da YopE (Iriarte & Cornelis, 1998), embora seja secretada em quantidades bem menores. A YopE e a YopT podem afetar diferentes vias de sinalização a fim de sinergizar o efeito citotóxico e assegurar a sobrevivência do patógeno no tecido linfóide (Juris et al., 2002). Shao et al. (2002), identificaram a YopT como um membro da nova família das cisteína-proteases que contêm resíduos invariantes de Cys, His e Asp. Além disso, eles demonstraram que a YopT cliva as Rho GTPases, liberando-as da membrana. Em um outro estudo, eles mostraram que a YopT cliva as Rho GTPases RhoA, Rac e Cdc42 diretamente na cisteína da porção C-terminal (Shao et al., 2003).

A YopH é uma tirosina fosfatase com 51 kDa que desfosforiliza p130^{Cas}, p125^{FAK}, paxilina e a proteína ligante de Fyn (FBP), todas elas proteínas tirosina-fosforiladas encontradas nos complexos de adesão focal (FA). A atividade de YopH parece causar a desunião de FA, o que diminui a entrada da bactéria nas células HeLa ou sua fagocitose pelos macrófagos (Black & Bliska, 1997; Persson et al., 1997; Black et al., 1998; Hamid et al., 1999) e inibe também o “burst” oxidativo. Além disso, YopH pode funcionar cooperativamente com YopE na inibição da fagocitose por neutrófilos (Ruckdeschel et al., 1996). Sauvonnnet et al. (2002a) evidenciaram a possível atuação da YopH na inativação da via do fosfatidilinositol-3 quinase com conseqüente supressão, nos macrófagos, da expressão da proteína 1 quimioatraente de monócitos (MCP-1).

A YpkA (“*Yersinia* protein kinase A”, YopO em *Y. enterocolitica*) é outra Yop com 81 kDa que apresenta

extensa homologia com proteínas eucarióticas, mais propriamente com a família PSK das proteínas serina/treonina quinases. Ela se autofosforila e, assim como a Yop H, interfere com a transdução de sinais nas células do hospedeiro por interferir com os níveis celulares de fosforilação (Hakansson et al., 1996; Hartland & Robins-Browne, 1998). Juris et al. (2000) relataram que a YpkA é inicialmente produzida como uma kinase inativa que é posteriormente ativada pela actina, durante a translocação para dentro da célula do hospedeiro. A interação entre YpkA e actina sugeriu que mudanças morfológicas induzidas pela YpkA poderiam ser causadas por mudanças no citoesqueleto de actina (Juris et al., 2000), e que o rompimento deste pela YpkA poderia ser mediado devido à sua habilidade em interagir com a pequena GTPase RhoA (Barz et al., 2000; Dukuzumuremyi et al., 2000). Embora a actina possa ser fosforilada *in vitro* (Juris et al., 2000), seu substrato *in vivo* não é conhecido. Através dessa habilidade em romper o citoesqueleto de actina, YpkA pode prejudicar a fagocitose da *Yersinia* por macrófagos e também a movimentação dessas células em direção às áreas de infecção (Juris et al., 2002).

A proteína YopM (41 kDa) possui uma função enigmática até o momento. Ela consiste quase inteiramente de seqüências semelhantes às repetições ricas em leucinas (LRRs) (Evdokimov et al., 2001) e tem se mostrado essencial para a virulência em modelos murinos de infecção (Leung et al., 1990). Acredita-se que o domínio LRR seja um motivo funcional de interação entre proteínas numa variedade de vias de sinalização no interior da célula e também no meio extracelular, e exatamente esta diversidade tem dificultado a descoberta da via exata que a YopM poderia afetar (Juris et al., 2002). Estudos têm demonstrado que a YopM não é apenas translocada dentro das células HeLa durante infecção com *Yersinia*, mas também se localiza no núcleo dessas células, trafegando através de uma via associada a vesículas (Skrzypek et al., 1998). McDonald et al. (2003), demonstraram que a YopM se liga e promove a atividade quinase da proteína quinase C2-like e da proteína quinase-1 ribossomal S6, o que poderia explicar o efeito da YopM sobre a expressão de genes envolvidos na progressão do ciclo celular e crescimento celular (Sauvonnnet et al., 2002b). A YopM pode ter muitos efeitos patogênicos, e um deles pode ocorrer no núcleo, modulando a expressão gênica do hospedeiro em benefício do patógeno (Skrzypek et al., 2003). Recentemente foi demonstrado que YopM de *Y. pestis* interfere com a imunidade inata causando depleção de células NK, possivelmente por afetar a expressão do receptor α da IL-15 e da própria IL-15 (Kerschen et al., 2004).

A YopJ (32,5 kDa, YopP em *Y. enterocolitica*) é a única Yop efetora que tem função anti-inflamatória e é responsável pela indução de apoptose em macrófagos *in vitro* e *in vivo* (Mills et al., 1997; Monack et al., 1997; Monack et al., 1998). Após a indução transitória de múltiplas vias de sinalização (MAPK e NF- κ B) pelo lipopolissacarídeo (LPS), a infecção por *Yersinia* resulta

numa severa inibição das vias MAPK (Erk, JNK e p38) nos macrófagos (Ruckdeschel et al., 1997) e também num bloqueio da ativação do fator nuclear κ B (NF- κ B). Estudos sobre as possíveis funções da YopJ têm sugerido, também, que a mesma seja capaz de inibir a produção de citocinas como TNF- α e IL-8 graças à presença de um domínio SH2-like, que constitui um traço comum de muitas proteínas sinalizadoras eucarióticas (Schesser et al., 1998; Boland & Cornelis, 1998; Palmer et al., 1998). Considerando que os promotores do TNF- α e da IL-8 possuem sítios de ligação para o NF- κ B e AP-1 (Roebuck, 1999; Liu et al., 2000), e que os sinais MAPK e NF- κ B convergem para os fatores de transcrição AP-1 e NF- κ B, a inibição da produção de citocinas é provavelmente resultado do rompimento da ativação da MAPK e NF- κ B (Juris et al., 2002). A apoptose de macrófagos causada pela YopJ, muito provavelmente, também resulta da inativação do NF- κ B (Pagliari et al., 2000). Artigos de Orth et al. (2000) revelaram que a YopJ pode funcionar como uma cisteína protease. Esses autores também sugerem que a YopJ possa ser uma protease ubiquitina-like, a qual tem sido envolvida na modulação de várias vias de sinalização de células eucarióticas (Yeh et al., 2000).

Estudos recentes propõem a existência de um mecanismo de patogenicidade conservado no gênero *Yersinia*, importante nos estágios iniciais do processo infeccioso, que consiste numa fase de sobrevivência e crescimento dentro dos macrófagos onde a bactéria consegue alterar as funções antibacterianas destas células (Pujol & Bliska, 2005).

Dados de estudos realizados em nosso laboratório (Carlos et al., 2004) demonstraram que *in vitro* as Yops de *Y. enterocolitica* exercem um papel inibitório na produção de óxido nítrico e H₂O₂ por macrófagos de camundongos cultivados na presença destas proteínas. A citocina TNF- α foi detectada no sobrenadante destas culturas, porém em quantidades bem menores do que quando os macrófagos eram estimulados com LPS de *Y. enterocolitica*.

Vários estudos têm demonstrado a importância de citocinas pró-inflamatórias como, por exemplo, TNF- α , IFN- γ e IL-12 durante a resposta imune contra *Yersinia*. A neutralização destas citocinas foi capaz de eliminar a resistência a este patógeno, sugerindo que macrófagos ativados por células T são importantes células efetoras na resposta protetora à *Yersinia* (Autenrieth & Heeseman, 1992; Bohn et al., 1994; Bohn & Autenrieth, 1996).

Nosso grupo (Monnazzi et al., 2004) estudou a influência que as diferentes Yops secretadas por *Y. pseudotuberculosis* exercem sobre os macrófagos quanto à produção das citocinas pró-inflamatórias IL-12 e TNF- α , e NO. Para tanto, camundongos foram infectados com diferentes amostras de *Y. pseudotuberculosis*, mutantes para determinadas Yops. Verificamos que as Yops podem suprimir a produção de IL-12, TNF- α e NO e que as principais proteínas envolvidas nesta inibição são a YopE e a YopH.

Influência das Yops sobre a resposta imune adaptativa

Embora as observações anteriores sugiram possíveis mecanismos para *Yersinia* diminuir a resposta imune inata do hospedeiro, o efeito das Yops sobre os componentes do sistema imune adaptativo não está claro.

Uma das mais importantes respostas inflamatórias após infecção é a produção de IL-1 β , uma citocina pleiotrópica que está envolvida na regulação tanto da resposta imune inata quanto da adaptativa. Schotte et al. (2004) concluíram que a YopE, devido sua atividade GAP, é responsável pela inibição da maturação e secreção de IL-1 β em macrófagos infectados com *Yersinia*.

Yao et al. (1999) relataram que *Y. pseudotuberculosis* pode interferir diretamente na ativação mediada por receptor de antígeno na célula B e T e que os efeitos inibitórios sobre os linfócitos são dependentes da produção de YopH. As células T expostas transitoriamente à *Yersinia* foram incapazes de influxionar cálcio e produzir citocinas. Também células B primárias, expostas transitoriamente a *Yersinia*, foram incapazes de regular positivamente a molécula co-estimuladora, B7.2, em resposta à estimulação antigênica. Como resultado, uma grande variedade de respostas imunes mediadas por células T ou B podem ser profundamente afetadas durante a infecção.

O papel de YopH na inativação da via do fosfatidilinositol-3 quinase com conseqüente supressão da proliferação de células T foi estudado por Sauvonnnet et al. (2002a). Alonso et al. (2004), mostraram que a YopH inibe a sinalização pelo TCR uma vez que promove a desfosforilação de Lck na posição Tyr-394 e conseqüentemente paralisa as células T e portanto previne o desenvolvimento de uma resposta imune adaptativa.

Nossa experiência (Crespo et al., 2002) mostrou que existem diferenças na capacidade imunomoduladora das proteínas Yops secretadas por *Y. pseudotuberculosis* ou *Y. enterocolitica*. O aspecto estudado foi a capacidade de ativação policlonal das Yops sobre os linfócitos B de camundongos. Verificou-se que Yops secretadas por *Y. enterocolitica* sorotipo O:3, de baixa virulência para camundongos, provocavam forte ativação, logo no início da infecção, com predomínio de células secretoras de IgM. Já as Yops secretadas por amostra virulenta de *Y. pseudotuberculosis* não provocaram ativação policlonal dos linfócitos B. O número de linfócitos secretores dos outros isotipos de Igs foi semelhante aos controles, com exceção de IgA, que sofreu uma diminuição. Portanto, o contato dos linfócitos B com as Yops de *Y. pseudotuberculosis* afetou a resposta destas células impedindo sua ativação e, conseqüentemente, a produção aumentada de Igs policlonais (Medeiros et al., 2003).

Comparações de seqüências mostraram que YopE, YopH, YopB e YopD são mais do que 95% conservadas entre as diferentes espécies de *Yersinia* (Michiels et al., 1990). Em contraste, foi relatada alguma heterogeneidade entre espécies e amostras para LcrV (Roggenkamp et al., 1997). Também a YopM, ao contrário das outras Yops, pode

apresentar polimorfismo de tamanho entre as amostras patogênicas de *Yersinia* (Boland et al., 1998b). Estas pequenas diferenças entre as Yops de diferentes espécies poderiam ser responsáveis pela alteração na virulência das amostras. A YopM, por exemplo, é essencial para virulência, uma vez que mutantes para *yopM* de *Y. pestis* e *Y. pseudotuberculosis* são avirulentas quando inoculadas por via intravenosa (Leung et al., 1990, Mulder et al., 1989).

Ruckdeschel et al. (2001a) demonstraram que existem diferenças funcionais entre membros geneticamente homólogos de YopP de diferentes sorotipos de *Y. enterocolitica*. YopPO3 e YopPO9, as quais induzem uma discreta apoptose em macrófagos, apresentam serina na posição 143. Por outro lado, YopPO8 e YopJ de *Y. pseudotuberculosis* e *Y. pestis* apresentam arginina na posição 143. No entanto, estas diferenças não estariam envolvidas no estabelecimento de um fenótipo de virulência para o camundongo, uma vez que mutantes *yopJ/yopP* negativos apresentam diferenças muito pequenas com relação à virulência em comparação com as respectivas amostras selvagens.

Um balanço entre as citocinas Th1 e Th2 pode influenciar o curso da infecção por *Yersinia*, principalmente na fase inicial da resposta imune do hospedeiro (Zhao et al., 2000).

As citocinas tipo Th1, como interferon- γ (IFN- γ) e fator de necrose tumoral (TNF- α) são necessárias para uma efetiva resposta imune celular contra bactérias intracelulares, enquanto células Th2 (secretoras de interleucina-4 [IL-4] e IL-5) são responsáveis pela indução da resposta humoral. Deste modo, as respostas Th1 são essenciais para a eliminação da bactéria, enquanto as Th2 estão associadas com a suscetibilidade e disseminação da infecção (Hermann-Märker & Höhler, 1998; Yin et al., 1997).

O IFN- γ , também envolvido na resposta contra *Yersinia*, constitui a principal citocina do perfil Th1. O TNF- α atua em sinergismo com o IFN- γ na ativação macrófágica. Camundongos BALB/c são maus produtores de IFN- γ , enquanto camundongos C57BL/6 são bons produtores dessa citocina. Administração de IFN- γ , IL-12, ou anticorpos anti-IL-4 tornam os camundongos BALB/c resistentes a *Yersinia*. Além disso, foi demonstrado que os níveis elevados de IFN- γ , predominantemente dependentes de IL-12, produzidos por células T CD4+ e células NK de camundongos C57BL/6 correlacionam-se com resistência contra *Yersinia*, comparados com os camundongos BALB/c (Bohn & Autenrieth, 1996).

Enquanto o IFN- γ se apresenta como a principal citocina do perfil Th1, a IL-4 constitui a principal do perfil Th2 possuindo funções tanto indutoras como efetoras.

O papel das citocinas Th2 tais como IL-4 ou IL-10 na infecção por *Yersinia* precisa ser melhor investigado (Hein et al., 2000).

A resposta inflamatória é eventualmente abolida por citocinas anti-inflamatórias, especialmente a IL-10. Um recente estudo mostrou que o antígeno V (LcrV) de *Y. pestis* regula negativamente o processo inflamatório durante a

doença, que é rápida e letal, por estimular a produção de IL-10 (Brubaker, 2003). A IL-10 parece agir de forma antagonista à IL-12 durante yersiniose em camundongos BALB/c, de modo que a adição de IL-10 às culturas de esplenócitos diminui a produção de IFN- γ induzida por *Yersinia*, enquanto que a adição de anticorpos anti-IL-10 aumentam a produção do mesmo. (Bohn & Autenrieth, 1996).

Especula-se que o TGF- β seja crítico para se obter uma ótima resposta imune contra *Yersinia*, já que, talvez, ele possa ser o responsável pelo balanço tanto das atividades tóxicas quanto das protetoras mediadas pela IL-12 (Bohn et al., 1998). O efeito imunossupressor do TGF- β parece ser causado por inibição da produção de IFN- γ , TNF- α , IL-1, IL-2 e IL-12 (Espevik et al., 1987, Ranges et al., 1987, Hunter et al., 1995). Na infecção experimental por *Yersinia*, a administração de TGF- β aumentou a resistência contra a bactéria em camundongos resistentes, mas não teve impacto no curso da infecção em camundongos BALB/c. Entretanto, o papel imunorregulatório do TGF- β ainda não está claro.

Também o papel das células T CD4+ na eliminação da infecção por *Yersinia*, embora primordial, parece ser ambíguo. As células T CD4+ promovem eliminação de *Y. enterocolitica* em camundongos C57BL/6, ao mesmo tempo que promovem exacerbação da infecção em camundongos BALB/c (Bohn & Autenrieth, 1996). Já a depleção de células NK ou células T CD8+ não tem impacto na eliminação da infecção por *Yersinia* em camundongos BALB/c. Entretanto, tanto células T CD8+ quanto células NK são cruciais na eliminação de infecção por *Yersinia* em camundongos BALB/c depletados de células T CD4+, sugerindo que células T CD4+ podem inibir as células T CD8+ e NK no que se refere à sua potencial capacidade de eliminar *Yersinia* (Bohn et al., 1998).

Muito importante no que diz respeito à regulação do sistema imune, incluindo a expressão de genes de citocinas, é o grupo de proteínas pertencentes à família NF- κ B de fatores de transcrição. A invasão do hospedeiro por um patógeno está frequentemente associada com a ativação do NF- κ B, o qual coordena vários aspectos da função imune necessários para a resistência à infecção. No entanto, alguns microrganismos conseguem interferir com a ativação do NF- κ B evadindo da resposta imune do hospedeiro (Tato & Hunter, 2002) e sobrevivendo no interior do mesmo. *Yersinia enterocolitica* prejudica a ativação do NF- κ B em macrófagos peritoneais murinos e J774.1 e também nas células HeLa epiteliais humanas (Ruckdeschel et al., 1998).

A YopP de *Yersinia enterocolitica* é capaz de, simultaneamente, bloquear a via do NF- κ B e desencadear a apoptose em macrófagos (Ruckdeschel et al., 2001b). Ruckdeschel et al. (2001a) demonstraram que a arginina-143 da YopP de *Y. enterocolitica* é crucial na determinação da supressão do NF- κ B e na indução de apoptose em macrófagos. A YopJ de *Y. pseudotuberculosis* também causa inibição da ativação do NF- κ B e da expressão de citocinas (Schesser et al., 1998).

YopP não somente se contrapõe à defesa imune inata mas também inibe a resposta imune adaptativa, pois induz

apoptose em células dendríticas, as quais são as células apresentadoras de antígenos mais potentes (Erfurth et al., 2004). Trulzsch et al. (2005) demonstraram que, *in vitro*, YopP inibe a apresentação de antígenos restrita pelo MHC de classe I através da indução da morte programada de células dendríticas e da inibição da maturação destas células. Deve ser este o mecanismo através do qual YopP suprime o desenvolvimento de uma resposta efetiva de célula T CD8 num modelo murino.

Graças à capacidade que a bactéria *Yersinia* possui de interagir tanto com a resposta imune humoral quanto com a celular, e de sobreviver e multiplicar-se dentro do tecido linfóide do hospedeiro, têm-se realizado estudos no sentido de utilizar seu mecanismo de translocação como ferramenta para vacinação contra patógenos intracelulares. Igwe et al. (1999) mostraram que cepas de *Y. enterocolitica* O:8 atenuadas podem servir, no futuro, como vacinas seguras e efetivas, carreadoras de antígenos heterólogos. Mais recentemente, Rüssmann et al. (2003), demonstraram, pela primeira vez, que uma cepa atenuada de *Y. pseudotuberculosis* pode ser usada para induzir, simultaneamente, LT CD4 e CD8 em camundongos vacinados por via oral.

No entanto, os mecanismos através dos quais as Yops de *Yersinia* influenciam a resposta imune do hospedeiro precisam ser melhor explorados, para esclarecer a patogênese da bactéria e permitir a utilização destas proteínas na imunoterapêutica.

ABSTRACT

Role of Yops secreted by Yersinia in the host immune response

The genus *Yersinia* contains three species pathogenic to humans: *Y. pestis*, *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis*. The pathogenicity of *Yersinia* is linked to the presence of a 70-kb virulence plasmid (pYV) that is common to the three species and codifies a type III secretion system and a set of virulence proteins, including those known as *Yersinia* outer proteins (Yops), that are exported by this system when the bacteria encounter host cells. Two Yops translocators (YopB and YopD) are inserted into the host plasma membrane and transport six effectors (YopO, YopH, YopM, YopJ and YopT) across the membrane into the cytosol of the host cell. The Yops effectors interfere with multiple signaling pathways of the infected cell, affecting both the innate and adaptive immune responses. This article focuses on the role of Yops in the modulation of the host immune response.

Keywords: *Yersinia*, Yops, phagocytosis, cytokine, antibodies.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alonso A, Bottini N, Bruckner S, Rahmouni S, Williams S, Schoenberger SP, Mustelin T. Lck dephosphorylation

at Tyr-394 and inhibition of T cell antigen receptor signaling by *Yersinia* phosphatase YopH. *J Biol Chem* 2004; 279:4922-28.

Autenrieth IB, Heeseman J. In vivo neutralization of tumor necrosis factor alpha and interferon-gamma abrogates resistance to *Yersinia enterocolitica* in mice. *Med Microbiol Immunol* 1992; 181:333-8.

Barz C, Abahji TN, Trulzsch K, Heesemann J. The *Yersinia* Ser/Thr protein kinase YpkA/YopO directly interacts with the small GTPases RhoA and Rac-1. *FEBS Lett* 2000; 482:139-43.

Black DS, Bliska JB. Identification of p130Cas as a substrate of *Yersinia* YopH (Yop51), a bacterial protein tyrosine phosphatase that translocates into mammalian cells and targets focal adhesions. *EMBO (Eur Mol Biol Organ) J* 1997; 16:2730-44.

Black DS, Bliska JB. The RhoGAP activity of the *Yersinia pseudotuberculosis* cytotoxin YopE is required for antiphagocytic function and virulence. *Mol Microbiol* 2000; 37:515-27.

Black DS, Montagna LG, Zitsmann S, Bliska JB. Identification of an amino-terminal substrate-binding domain in the *Yersinia* tyrosine phosphatase that is required for efficient recognition of focal adhesion targets. *Mol Microbiol* 1998; 29:1263-74.

Bohn E, Autenrieth, IB. IL-12 is essential for resistance against *Yersinia enterocolitica* by triggering IFN- γ production in NK cells and CD4+ T cells. *J Immunol* 1996; 156:1458-68.

Bohn E, Heesemann J, Ehlers S, Autenrieth IB. Early gamma interferon mRNA expression is associated with resistance of mice against *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun* 1994; 62:3027-32.

Bohn E, Schmitt E, Bielfeldt C, Noll A, Schuler R, Autenrieth IB. Ambiguous role of interleukin-12 in *Yersinia enterocolitica* infection in susceptible and resistant mouse strains. *Infect Immun* 1998; 66(5):2213-320.

Boland A, Cornelis GR. Role of YopP in suppression of tumor necrosis factor alpha release by macrophages during *Yersinia* infection. *Infect Immun* 1998; 66:1878-84.

Boland A, Havaux S, Cornelis GR. Heterogeneity of the *Yersinia* YopM protein. *Microb Pathog* 1998; 25:343-8.

Bottone, EJ. *Yersinia enterocolitica*: the charisma continues. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10(2):257-76.

Brubaker RR. Interleukin-10 and inhibition of innate immunity to *Yersinia*: roles of Yops and LcrV (V antigen). *Infect Immun* 2003; 71:3673-81.

Carlos IZ, Monnazzi LGS, Falcão DP, Medeiros, BMM.

- TNF- α , H₂O₂ and NO response of peritoneal macrophages to *Yersinia enterocolitica* O:3 derivatives. *Microbes Infect* 2004; 6:207-12.
- Cornelis GR, Wolf-Watz H. The *Yersinia* Yop virulon: a bacterial system for subverting eukariotic cells. *Mol Microbiol* 1997; 23:861-7.
- Cornelis GR, Boland A, Boyd AP, Geuijen C, Iriarte M, Neyt C, Sory, MP, Stainier I. The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998; 62:1315-52.
- Cornelis GR. *Yersinia* type III secretion: send in the effectors. *J Cell Biol* 2002; 264:401-8.
- Crespo AMC, Falcão DP, Araújo PMF, Medeiros BMM. Effects of *Yersinia enterocolitica* derivatives on B lymphocyte activation *in vivo*. *Microbiol Immunol* 2002; 46(2):95-100.
- Dukuzumuremyi JM, Rosqvist R, Hallberg B, Akerstrom B, Wolf-Watz H, Schesser K. The *Yersinia* protein kinase A is a host factor inducible RhoA/Rac-binding virulence factor. *J Biol Chem* 2000; 275:35281-90.
- Espevik T, Figari IS, Shalaby M R, Lackides GA, Lewis GD, Shepard H M, Palladino MA. Inhibition of cytokine production by cyclosporin A and transforming growth factor beta. *J Exp Med* 1987; 166:571-6.
- Evdokimov AG, Anderson DE, Routzahn KM, Waugh DS. Unusual molecular architecture of the *Yersinia pestis* cytotoxin YopM: a leucine-rich repeat protein with the shortest repeating unit. *J Mol Biol* 2001; 312:807-21.
- Goehring UM, Schmidt G, Pederson KJ, Aktories K, Barbieri JT. The N-terminal domain of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S is a GTPase-activating protein for Rho GTPases. *J Bio Chem* 1999; 274:36369-72.
- Hakansson S, Galyov EE, Rosqvist R, Wolf-Watz H. The *Yersinia* YpkA Ser/Thr kinase is translocated and subsequently targeted to the inner surface of HeLa plasma membrane. *Mol Microbiol* 1996; 20:593-603.
- Hamid N, Gustavsson A, Andersson K, McGee K, Persson C, Rudd CE, Fallman M. YopH dephosphorylates Cas and Fyn-binding protein in macrophages. *Microb Pathog* 1999; 27:231-42.
- Hannu T, Mattila L, Nuorti JP, Ruutu P, Mikkola J, Siitonen A, Leirisalo-Repo M. Reactive arthritis after an outbreak of *Yersinia pseudotuberculosis* serotype O:3 infection. *Ann Rheum Dis* 2003; 62:866-9.
- Hartland L, Robins-Browne R. Infections with enteropathogenic *Yersinia* species: paradigms of bacterial pathogenesis. *Rev Med Microbiol* 1998; 9:191-205.
- Hein J, Kempf V, Diebold J, Bucheler N, Preger S, Horak I, Sing A, Kramer U, Autenrieth IB. Interferon consensus sequence binding protein confers resistance against *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun* 2000; 68(3):1408-17.
- Hermann-Märker E, Höhler T. Pathogenesis of human leukocytes antigen B27- positive arthritis. *Rheum Dis Clin North Am*, 1998; 24:865-81.
- Hunter CA, Bermudez L, Beernink H, Waegell W, Remington JS. Transforming growth factor beta inhibits interleukin-12-induced production of interferon-gamma by natural killer cells: a role for transforming growth factor beta in the regulation of T cell-independent resistance to *Toxoplasma gondii*. *Eur J Immunol* 1995; 25:994-1000.
- Igwe EI, Russmann H, Roggenkamp A, Noll A, Autenrieth IB, Heesemann J. Rational live oral carrier vaccine design by mutating virulence-associated genes of *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun* 1999; 67:5500-7.
- Iriarte M, Cornelis GR. YopT, a new *Yersinia* Yop effector protein, affects the cytoskeleton of host cells. *Mol Microbiol* 1998; 29:915-29.
- Juris SJ, Shao F, Dixon JE. *Yersinia* effectors target mammalian signalling pathways. *Cell Microbiol* 2002; 4:201-11.
- Juris SJ, Rudolph AE, Huddler D, Orth K, Dixon, JE. A distinctive role for *Yersinia* protein kinase: actin binding, kinase activation, and cytoskeleton disruption. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:9431-6.
- Kerschen EJ, Cohen, DA, Kaplan, AM, Straley, SC. The plague virulence protein YopM targets the innate immune response by causing a global depletion of NK cells. *Infect Immun* 2004; 72(8):4589-602.
- Leung KY, Reisner BS, Straley SC. YopM inhibits platelet aggregation and is necessary for virulence of *Yersinia pestis* in mice. *Infect Immun* 1990; 58:3262-71.
- Liu H, Sidiropoulos P, Song G, Pagliari LJ, Birrer MJ, Stein B, Anrather J, Pope RM. TNF- α gene expression in macrophages: regulation by NF- κ B is independent of c-Jun or C/EBP beta. *J Immunol* 2000; 164:4277-85.
- Marenne MN, Journet L, Mota LJ, Cornelis GR. Genetic analysis of the formation of the Ysc-Yop translocation pore in macrophages by *Yersinia enterocolitica*: role of LcrV, YscF and YopN. *Microb Pathog* 2003; 35:243-58.
- McDonald C, Vacratsis PO, Bliska JB, Dixon JE. The *Yersinia* virulence factor YopM forms a novel protein complex with two cellular kinases. *J Biol Chem* 2003; 278:18514-23.
- Medeiros BMM, Souza CD, Higuti L, Maia JML, Silva, EEC. Papel das proteínas “Yops” de *Yersinia pseudotuberculosis* na ativação dos linfócitos B. *Rev Ciênc Farm* 2003; 24(1):53-60.

- Michiels T, Wattiau P, Brosseur R, Ruyschaert JM, Cornelis G. Secretion of Yop proteins by *Yersiniae*. *Infect Immun*, 1990; 9:2840-9.
- Mills SD, Boland A, Sory M-P, Smissen PVD, Kerbouch C, Finlay BB, Cornelis GR. *Yersinia enterocolitica* induces apoptosis in macrophages by a process requiring functional type III secretion and translocation mechanisms and involving YopP, presumably acting as an effector protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:12638-43.
- Monack DM, Meccas J, Bouley D, Falkow S. *Yersinia*-induced apoptosis in vivo aids in the establishment of a systemic infection of mice. *J Exp Med* 1998; 188:2127-37.
- Monack DM, Meccas J, Bouley D, Falkow S. *Yersinia* signals macrophages to undergo apoptosis and YopJ is necessary for his cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:10385-90.
- Monnazzi LGS, Carlos IZ, Medeiros B.M.M. Influence of *Yersinia pseudotuberculosis* outer proteins (Yops) on interleukin-12, tumor necrosis factor alpha and nitric oxide production by peritoneal macrophages. *Immunol Lett* 2004; 94:91-8.
- Mulder B, Michiels T, Simonet M, Sory MP, Cornelis GR. Identification of additional virulence determinants on the pYV plasmid of *Yersinia enterocolitica* W227. *Infect Immun* 1989; 57 (8):2534-41.
- Orth K, Xu Z, Mudgett MB, Bao ZQ, Palmer LE, Bliska JB, Mangel WF, Staskawicz B, Dixon JE. Disruption of signaling by *Yersinia* effector YopJ, a ubiquitin-like protein protease. *Science* 2000; 290:1594-7.
- Pagliari LJ, Perlman H, Liu H, Pope RM. Macrophages require constitutive NF-kappa B activation to maintain A1 expression and mitochondrial homeostasis. *Mol Cell Biol* 2000; 20:8855-65.
- Palmer LE, Hobbie S, Galan JE, Bliska JB. YopJ of *Yersinia pseudotuberculosis* is required for the inhibition of macrophage TNF- α production and downregulation of the MAP kinases p38 and JNK. *Mol Microbiol* 1998; 27:953-65.
- Persson C, Carballeira N, Wolf-Watz H, Fallman M. The PTPase YopH inhibits uptake of *Yersinia*, tyrosine phosphorylation of p130Cas and FAK, and the associated accumulation of these proteins in peripheral focal adhesions. *EMBO (Eur Mol Biol Organ) J*, 1997; 16:2307-18.
- Perry RD, Fetherston JD. *Yersinia pestis*-Etiologic agent of plague. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10: 35-66.
- Pujol C, Bliska JB. Turning *Yersinia* pathogenesis outside in: subversion of macrophage function by intracellular yersiniae. *Clin Immunol* 2005; 114:216-26.
- Ranges GE, Figari IS, Espevik T, Palladino MA. Inhibition of cytotoxic T cell development by transforming growth factor beta and reversal by recombinant tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med*, 1987; 166:991-8.
- Roebuck KA. Regulation of interleukin-8 gene expression. *J Interferon Cytokine Res* 1999; 19:429-38.
- Roggenkamp A, Geiger AM, Leitritz L, Kessler A, Heesemann J. Passive immunity to infection with *Yersinia* spp. Mediated by anti-recombinant V antigen is dependent on polymorphism of V antigen. *Infect Immun* 1997; 65(2):446-51.
- Rosqvist R, Forsberg A, Wolf-Watz H. Intracellular targeting of the *Yersinia* YopE cytotoxin in mammalian cells induces actin microfilament disruption. *Infect Immun* 1991;59:4562-9.
- Ruckdeschel K, Mannel O, Richter K, Jacobi CA, Heesemann J. Arginine-143 of *Yersinia enterocolitica* YopP crucially determines isotype-related NF- κ B suppression and apoptosis induction in macrophages. *Am Soc Microbiol*, 2001a; 69:7652-62.
- Ruckdeschel K, Richter K, Mannel O, Trulzsch K, Rouot B, Heesemann J. *Yersinia* outer protein P of *Yersinia enterocolitica* simultaneously blocks the nuclear factor-kappa B pathway and exploits lipopolysaccharide signaling to trigger apoptosis in macrophages. *J Immunol* 2001b; 166:1823-31.
- Ruckdeschel K, Roggenkamp A, Schubert S, Heesemann J. Differential contribution of *Yersinia enterocolitica* virulence factors to evasion of microbicidal action of neutrophils. *Infect Immun* 1996; 64:724-33.
- Ruckdeschel K, Harb S, Roggenkamp A, Hornef M, Zumbihl R, Kohler S, Heesemann J, Rouot B. *Yersinia enterocolitica* impairs activation of transcription factor NF- κ B: involvement in the induction of programmed cell death and in the suppression of the macrophage tumor necrosis factor alpha production. *J Exp Med* 1998;187:1069-79.
- Ruckdeschel K, Machold J, Roggenkamp A, Schubert S, Pierre J, Zumbihl R, Liautard J-P, Heesemann J, Rouot B. *Yersinia enterocolitica* promotes deactivation of macrophage mitogen-activated protein kinases extracellular signal-regulated kinase $\frac{1}{2}$, p38, and c-Jun NH₂-terminal kinase: correlation with its inhibitory effect on tumor necrosis factor alpha production. *J Biol Chem* 1997; 272:15920-7.
- Russmann H, Gerdemann U, Igwe EI, Panthel K, Heesemann J, Garbom S, Wolf-Watz H, Geginat G. Attenuated *Yersinia pseudotuberculosis* carrier vaccine for simultaneous antigen-specific CD4 and CD8 T-cell induction. *Infect Immun* 2003; 71:3463-72.
- Sauvonnet N, Lambermont I, van der Bruggen P, Cornelis GR. YopH prevents monocyte chemoattractant protein 1 expression in macrophages and T-cell proliferation through

- inactivation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Mol Microbiol* 2002a; 45:805-15.
- Sauvonnet N, Pradet-Balade B, Garcia-Sanz JA, Cornelis GR. Regulation of mRNA expression in macrophages after *Yersinia enterocolitica* infection. Role of different Yop effectors. *J Biol Chem* 2002b ; 277:25133-42.
- Schesser K, Frihzh-Lindsten E, Wolf-Watz H. Delineation and mutational analysis of the *Yersinia pseudotuberculosis* YopE domains which mediate translocation across bacterial and eukaryotic cellular membranes. *J Bacteriol* 1996; 178:7227-33.
- Schesser K, Spiik AK, Dukuzumuremyi JM, Neurath MF, Pettersson S, Wolf-Watz H. The YopJ locus is required for *Yersinia*-mediated inhibition of NF- κ B activation and cytokine expression: YopJ contains a eukariotic SH2-like domain that is essential for its repressive activity. *Mol Microbiol* 1998; 28:1067-79.
- Schotte P, Denecker G, Van Den Broeke A, Vandenabeele P, Cornelis GR, Beyaert R. Targeting Rac1 by the *Yersinia* effector protein YopE inhibits caspase-1-mediated maturation and release of interleukin-1beta. *J Biol Chem* 2004; 279:25134-42.
- Shao F, Merritt PM, Bao Z, Innes RW, Dixon JE. A *Yersinia* effector and a *Pseudomonas* avirulence protein define a family of cysteine proteases functioning in bacterial pathogenesis. *Cell* 2002; 109:575-88.
- Shao F, Vacratsis PO, Bao Z, Bowers KE, Fierke CA, Dixon JE. Biochemical characterization of the *Yersinia* YopT protease: cleavage site and recognition elements in Rho GTPases. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:904-9.
- Skrzypek E, Cowan C, Straley SC. Targeting of the *Yersinia pestis* YopM protein into HeLa cells and intracellular trafficking to the nucleus. *Mol Microbiol* 1998; 30:1051-65.
- Skrzypek E, Myers-Morales T, Whiteheart SW, Straley SC. Application of a *Saccharomyces cerevisiae* model to study requirements for trafficking of *Yersinia pestis* YopM in eucaryotic cells. *Infect Immun* 2003; 71:937-47.
- Skurnik M, Peippo A, Ervela E. Characterization of the O-antigen gene cluster of *Yersinia pseudotuberculosis* and the cryptic O-antigen gene cluster of *Yersinia pestis* shows that the plague bacillus is most closely related to and has evolved from *Y. pseudotuberculosis* serotype O:1b. *Mol Microbiol* 2000; 37:316-30.
- Sory MP, Boland A, Lambermont I, Cornelis GR. Identification of the YopE and YopH domains required for secretion and internalization into the cytosol of macrophages, using the *cyaA* gene fusion approach. *Proc Natl Acad Sci USA*.1995; 92:11998-2002.
- Tato CM, Hunter CA. Host-pathogen interactions: subversion and utilization of the NF-kappa B pathway during infection. *Infect Immun* 2002; 70:3311-7.
- Von Pawel-Rammingen U, Telepnev MV, Schmidt G, Aktories K, Wolf-Watz H, Rosqvist R. GAP activity of the *Yersinia* YopE cytotoxin specifically targets the Rho pathway: a mechanism for disruption of actin microfilament structure. *Mol Microbiol* 2000; 36:737-4..
- Yao T, Mecasas J, Healy JI, Falkow S, Chien Y. Supression of T and B lymphocyte activation by a *Yersinia pseudotuberculosis* virulence factor, YopH. *J Exp Med*, 1999; 190:1343-50.
- Yeh ET, Gong L, Kamitani T. Ubiquitin-like proteins: new wines in new bottles. *Gene* 2000; 248:1-14.
- Yin Z, Braun J, Neure L, Wu P, Liu L, Eggens U, Sieper J. Crucial role of interleukin-10/interleukin-12 balance in the regulation of the type 2 T helper cytokine response in reactive arthritis. *Arthritis Rheum* 1997; 40:1788-97.
- Zhao Y, Lajoie G, Zhang H, Chiu B, Payne U, Inman RD. Tumor necrosis factor receptor p55-deficient mice respond to acute *Yersinia enterocolitica* infection with less apoptosis and more effective host resistnace. *Infect Immun* 2000; 68(3):1243-51.