



Universidade de Brasília – UnB
Instituto de Biologia- IB
Departamento de Biologia Celular- CEL
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

Caracterização do papel do sistema de secreção do tipo VI bacteriano sobre a resposta imunológica inata de células de mamíferos infectados por *Escherichia coli*

Raquel das Neves Almeida

Brasília – DF

Fevereiro/ 2016



Universidade de Brasília – UnB
Instituto de Biologia- IB
Departamento de Biologia Celular- CEL
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

Raquel das Neves Almeida

Caracterização do papel do sistema de secreção do tipo VI bacteriano sobre a resposta imunológica inata de células de mamíferos infectados por *Escherichia coli*

Dissertação apresentada à Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Título de Mestre em Biologia Molecular.

Orientadora: Profa. Dra. Kelly Grace Magalhães

Brasília – DF

Fevereiro/ 2016

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: Almeida, Raquel das Neves

Título: Caracterização do papel do sistema de secreção do tipo VI bacteriano sobre a resposta imunológica inata de células de mamíferos infectados por *Escherichia coli*

Dissertação apresentada à
Universidade de Brasília, como parte
dos requisitos necessários para
obtenção do Título de Mestre em
Biologia Molecular. Área de
Concentração: Imunologia.

DATA: 22 de Fevereiro de 2016

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr: _____ **Instituição:** _____

Julgamento: _____ **Assinatura:** _____

Prof. Dr: _____ **Instituição:** _____

Julgamento: _____ **Assinatura:** _____

Prof. Dr: _____ **Instituição:** _____

Julgamento: _____ **Assinatura:** _____

Dedico aos meus pais, Romana e Edilberto, minha irmã Leonara e minha tia Lusia por todo apoio, amor, paciência, dedicação prestados a mim e principalmente por acreditarem na minha capacidade. E também dedico a todos que incentivaram.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me carregar em seu colo, sempre me surpreender em cada conquista e me fortalecer em cada luta renovando minhas forças. À mãe do céu que sempre levou minhas orações a Deus.

À Dra. Kelly Grace Magalhães, que é mais que uma orientadora, sempre acreditando no meu potencial e me ensinando a cada momento. Obrigada por ser um grande exemplo a ser seguido como pessoa, profissional na pesquisa científica e orientadora. Muito obrigada por todos os momentos, pela paciência e por me aceitar em seu laboratório me dando liberdade e confiança para executar esse projeto.

Aos meus grandes amigos Rafael Corrêa e Miguel Andrade, que sempre caminharam comigo para a realização desse sonho, que é a defesa do mestrado. Obrigada por todos os momentos desde a graduação, que sempre buscamos dar o melhor de nós. Sou muito grata a vocês, meus companheiros inseparáveis, cúmplices e grandes amigos.

Aos meus amigos do Laboratório de Imunologia e Inflamação: Lívia, Adrielle, Larissa, Bia, Erika, Gabriel, Tiago, Luís e Luís Felipe por todo apoio, todo ensinamento e companheirismo. Em especial à Dalila por estar ao meu lado todo dia realizando tantas metodologias. Muito obrigada por ser mais que uma companheira de bancada. Sem vocês eu não faria meus experimentos tão bem, obrigada por sempre acreditarem em mim.

À minha família, minha mãe Romana, meu pai Edilberto e minha irmã Leonara que me auxiliaram nos meus dias de cansaço, de noites em claro e sempre me apoiaram. Sem vocês nada disso seria possível. Aos meus familiares, meus tios, primos e avós que sempre me entenderam e me auxiliaram a cada passo. Em especial à tia Lusía, a senhora “novidade” que sempre me cuidou e ajudou em vários momentos; também à avó Júlia, avô Pedro e avó Maria que me desejaram muita força, vitória e sucesso e ao avô Geraldo que mesmo não estando mais aqui, tenho certeza que está muito orgulhoso dessa conquista.

À comunidade católica Fidelidade da Cruz, seus membros, por estarem comigo e me levarem a Deus, me mostrando que eu posso ir além quando Deus está comigo. Obrigada aos meus amigos Taynã, Tiago, Monaliza, Ana, Raíssa, Alessa, Kaio, Andréia, Daniel, Priscilla, Carolina, Larissa, Rennan, Isabela Corrêa, Cecília Farinasso, Misha, e aos demais que me apoiaram psicologicamente e espiritualmente para realizar meu mestrado. Obrigada pelas risadas, pelo companheirismo e por cada lágrima enxugada.

Ao meu namorado Pedro por me fazer mais leve, por me dar suporte e sempre ser um excelente companheiro. Obrigada pelos conselhos, pelos momentos juntos e por vários dias de estudo comigo. Sou muito grata a você por não medir nenhum esforço para me ajudar e me acompanhar.

A todos os professores que passaram na minha trajetória estudantil, agradeço a cada profissional que me ensinou, incentivou e me fez ser uma pessoa mais capacitada. E todos os auxiliares de educação que proporcionaram um melhor ambiente de aprendizado. Em especial ao técnico Chiquinho e às secretárias Luciana e Ana.

Aos meus colegas do Laboratório de Imunologia Aplicada, Luiza Lozada, Márcio Jerônimo, Ana Camila, Isaque, Pedro Burguel e Yasmin por todas as conversas, auxílios e disponibilidade. Em especial ao Raffael Castro que me direcionou ao LIMI, me impulsionou quando eu estava perdida e que me ajuda sempre no que preciso.

Aos meus colaboradores e colegas do Laboratório de Interação Patógeno Hospedeiro- LAMP por toda paciência, auxílio e disposição em me ajudar. Em especial gostaria de agradecer à Dra Tatiana, ao Dr. Vicente e ao Luís por me ensinarem sempre e me apoiarem na execução dos experimentos. À Dra. Miriam Werneck pelo auxílio e colaboração nos experimentos. Ao Dr. Wanderley Dias da Silveira pelo fornecimento das bactérias. Ao Dr. José Raimundo Corrêa por ser sempre muito prestativo em várias etapas. Ao Dr. Fernando Lucas, do laboratório de virologia por todos os conselhos e ensinamentos. À Universidade de Brasília pela oportunidade de aprendizado e crescimento profissional. À agência de fomento CNPq e FAPDF pelo auxílio financeiro.

“Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e de repente você estará fazendo o impossível.” São Francisco de Assis.

SUMÁRIO

RESUMO.....	10
ABSTRACT	11
LISTA DE ABREVIACÕES.....	12
LISTA DE FIGURAS	14
1- INTRODUÇÃO.....	15
1.1 <i>Escherichia coli</i>	15
1.2 Sistema de Secreção do tipo VI (SST6)	16
1.3 Constituição do Sistema de Secreção tipo VI.....	17
1.4 Resposta imunológica nas infecções bacterianas	19
1.5 Apresentação de antígenos proteicos.....	21
1.6 Apresentação de antígenos lipídicos	26
2 – JUSTIFICATIVA.....	30
3 – OBJETIVOS.....	30
4 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
5–MATERIAL E MÉTODOS.....	31
5.1- Cultivo bacteriano.....	31
5.6- Estimulação com a bactéria <i>E. coli</i>	33
As células de mamíferos foram infectadas pelas bactérias na multiplicidade de infecção (MOI) de 1:10 e 1:100. Após 2 horas de estimulação as células foram lavadas três vezes com a solução tampão PBS 1X e, em seguida, adicionado meio RPMI com 1% de penicilina-estreptomicina e gentamicina. As células foram incubadas em estufa a 37 °C com 5% de CO2 por diferentes períodos de infecção (6h, 18h, 24h, 48h).....	33
5.7- Análise por microscopia confocal	33
5.8- Análise por microscopia eletrônica de varredura	33
6- RESULTADOS	35
6.1 SST6 participa da redução da viabilidade celular ocorrida em macrófagos infectados por <i>E. coli</i> após 48 horas de infecção.	35
6.2 <i>E. coli</i> deve estar viável e com estrutura morfológica preservada para que ocorra diminuição da viabilidade celular de macrófagos infectados: produtos da composição	

e secreção bacteriana também não influenciam na viabilidade celular de macrófagos.	38
6.3 SST6 possui um papel crucial na adesão, internalização e viabilidade das bactérias <i>E. coli</i> no interior de macrófagos.....	43
6.4 SST6 participa da indução de NO e na biogênese de corpúsculo lipídicos de macrófagos infectados por <i>E. coli</i>	45
6.5 SST6 participa da indução da secreção de IL-6 em macrófagos infectados por <i>E. coli</i>	47
6.6 <i>E. coli</i> induziu a expressão do fator de transcrição PPAR γ em macrófagos de maneira dependente da presença do SST6 e não induziu a translocação de NF κ B para o núcleo de macrófagos infectados.....	48
6.7 SST6 e a inibição de PPAR γ participam da redução de secreção de citocinas IL-6 e IL-12 em macrófagos infectados por <i>E. coli</i>	51
6.8 A presença do fator de transcrição PPAR γ promove uma menor capacidade microbicida de macrófagos infectados por <i>E. coli</i>	53
6.9 SST6 participa da modulação da expressão de moléculas CD1 do grupo I e II em células infectadas com <i>E. coli in vivo e in vitro</i>	55
6.10 SST6 está relacionado com a inibição da expressão de moléculas MHC II em células infectadas com <i>E. coli in vitro e in vivo</i>	58
6.11 SST6 participa na modulação da expressão de moléculas co-estimulatórias CD40 e CD80 em células do lavado peritoneal <i>in vivo</i>	61
6.12 A infecção por <i>E. coli</i> induz recrutamento de macrófagos ao peritônio de animais infectados de maneira dependente da presença do SST6.....	63
6.13 A infecção de animais por 72h com <i>E. coli</i> induz um aumento do tamanho do fígado e baço de maneira dependente da presença do SST6.....	65
6.14 SST6 participa da migração de <i>E. coli</i> para o fígado de animais infectados.....	67
7- DISCUSSÃO.....	69
8- CONCLUSÕES.....	77
9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79

RESUMO

Escherichia coli é uma bactéria gram-negativa, que apresenta uma alta diversidade genética e fenotípica. Muitas linhagens de *E. coli* são inofensivas, mas algumas apresentam fatores de patogenicidade. Muitos produtos, estruturas e propriedades bacterianas podem ser utilizadas para evadir as defesas do hospedeiro através de sistemas de secreção. O sistema de secreção de tipo VI (SST6) é considerado como um potencial fator de virulência que tem a capacidade de translocar substratos efetores para o interior de vários tipos de células, tanto procarióticas quanto eucarióticas. O SST6 tem sido descrito como uma importante maquinaria celular envolvido principalmente na competição entre células procarióticas. No entanto, o papel do SST6 na imunidade da célula hospedeira eucariótica é pouco compreendida. Portanto, o objetivo deste estudo foi investigar o papel do SST6 bacteriano na apresentação de antígenos e sobre a indução da ativação da resposta inflamatória em células de mamíferos infectados por *E. coli*. Nós avaliamos a modulação de alguns mecanismos da imunidade inata durante a infecção causada pela bactéria *E. coli* SEPT362 e a linhagem mutante para o gene IcmF. Aqui demonstramos que SST6 beneficia a *E. coli*, promovendo sua sobrevivência no interior das células do hospedeiro participando da adesão, internalização e viabilidade da bactéria no interior de macrófagos. Nossos resultados mostraram que *E. coli* selvagem inibe a expressão das moléculas CD1 dos grupos I e II e conseqüentemente, a apresentação de antígenos lipídicos. Diferentemente, a linhagem mutante para IcmF desencadeou uma regulação positiva dessas moléculas, mostrando a participação do SST6 nesse processo. Além disso, SST6 está associada à inibição da expressão de moléculas de MHC II, indicando provável bloqueio na apresentação de antígenos peptídicos e uma possível forma de escape imunológico pelo patógeno. Ademais, os nossos resultados mostraram que, SST6 participa na modulação negativa da expressão de moléculas co-estimulatórias CD40 e CD80 em macrófagos. Também verificamos que, *E. coli* SEPT362 induz a expressão aumentada do receptor nuclear PPAR γ dependente de SST6 em macrófagos e não induz a translocação do fator de transcrição NF- κ B durante a infecção. A infecção por *E. coli* também induziu o aumento da biogênese de corpúsculos lipídicos de forma dependente de SST6. Nós identificamos que SST6 participa na redução da viabilidade das células de macrófagos, recrutamento de macrófagos para a cavidade peritoneal e favorece o estabelecimento do patógeno no fígado. Finalmente, observamos que SST6 participa na indução da secreção de óxido nítrico e a da citocina IL-6 em macrófagos, no entanto, a regulação positiva da secreção de IL-10 é independente do SST6. Todos estes resultados mostram um novo papel para o papel do SST6 na imunidade inata dos hospedeiros e no progresso da patogênese.

Palavras-chave: *Escherichia coli*, SST6, apresentação de antígenos, CD1, MHC II, PPAR γ , resposta inflamatória.

ABSTRACT

Escherichia coli is Gram-negative bacteria that exhibit a high genetic and phenotypic diversity. Many products, structures and bacterial properties can be used to overcome host defenses, mainly through a mechanism mediated by secretion systems. The type VI secretion system (T6SS) is considered a potential virulence factor capable of translocating substrate effectors into largest cell types, both prokaryotic and eukaryotic cells. T6SS has been described as important cell machinery involved mainly in competition among prokaryotic cells. However, the role of T6SS in eukaryotic host cell immunity is poorly understood. Therefore, the aim of this study was investigate the role of bacterial T6SS on the antigen presentation and modulation of inflammatory response in mammalian cells infected by *E. coli*. We evaluated the modulation of different mechanisms involved in innate immune during the infection caused by *E. coli* wild type strain (SEPT362) and the knockout strains IcmF-deficient (delta IcmF). Here we demonstrate that, T6SS is beneficial to survival advantage of *E. coli* into host cells, since it participates in adherence, internalization and viability of *E. coli* bacteria within macrophages. Our results showed that *E. coli* wild type inhibits the expression of CD1 group I and group II molecules, and consequently the lipids antigens presentation. In contrast, the knockout strain delta IcmF triggered an upregulation of these molecules, showing the participation of T6SS in this process. Moreover, T6SS is associated with inhibition of expression of MHC II molecules, indicating participation in peptide antigen presentation and a possible form of immune escape by the pathogen. Furthermore, our results showed that T6SS participates in the modulation of expression of co-stimulatory molecules CD40 and CD80 on macrophages. In addition, we also found that *E. coli* SEPT362 induces an increased expression of the nuclear receptor PPAR γ in macrophage dependent of T6SS and did not induce the translocation of the transcription factor NF-kB during the infection. The infection by *E. coli* SEPT362 also induced a T6SS dependent increase of lipid droplets biogenesis. Moreover, we identified that T6SS participates in the reduction of macrophage cell viability, macrophages recruitment to mice peritoneal cavity and establishment of the pathogen in the liver. Finally we observed that T6SS participates in the induction of secretion of nitric oxide and IL-6 cytokine in macrophage, however the upregulation of IL-10 secretion is T6SS independent. Taken together, our results present a new T6SS role in innate immune host response and progress of *E. coli* pathogenesis.

Key words: *Escherichia coli*, T6SS, antigen presentation, CD1, MHC II, PPAR γ , inflammatory response.

LISTA DE ABREVIações

AP: Proteínas adaptadoras

APC: Célula apresentadora de antígeno

APEC: *E.coli* patogênica aviária

BMDM: Macrófago derivado da medula óssea

BSA: Albumina do soro bovino

CD: Grupo de diferenciação (cluster of differentiation)

CFU: Unidade Formadora de Colônia

CLIP: Peptídeo associado a MHC II de cadeia invariante

ClpV: Protease dependente de ATP-V

CO₂: Dióxido de carbono

CXCL12: Quimicina quimiostática para linfócitos T 12

DDM: Dihidroxemicobactina

ELISA: Ensaio imunoenzimático

ERAP: Peptidases associadas ao retículo endoplasmático

GM-CSF: Fator estimulante de colônias de macrófagos-granulócito

Hcp : Proteínas co-reguladoras de hemolisinas

IcmF: Fator de multiplicação intracelular

IFN- γ : Interferon- gama

IL: Interleucina

LAM: lipoarabinomanana

LCCM: Meio condicionado de células L929

LPS: Lipopolissacarídeo

MAPK: Proteína quinase ativada por mitógenos

MEV: Microscopia Eletrônica de varredura

MHC: Complexo principal de histocompatibilidade

MIIC: Compartimento de MHC II

MOI: Multiplicidade de infecção

MTP: Proteína de transferência de lipídeos

MyD88: Fator de diferenciação mielóide 88

NF- κ B: Fator nuclear κ B

NK: Células matadoras naturais

NO: Óxido nítrico

PAMP: Padrão molecular associado a patógeno

PBMC: Células mononucleares do sangue periférico

PBS: Salina tamponada com fosfato

PIMs: Fosfatidil-myo-inositol manosidase

PPAR: Receptor ativado por proliferadores de peroxissomos

PRR: Receptor de reconhecimento de padrão

SFB: Soro Bovino Fetal

SST3: Sistema de secreção tipo III

SST4: Sistema de secreção tipo IV

SST6: Sistema de secreção tipo VI

TAP: transportadoras associadas ao processamento de antígenos

TCR: Receptores de células T

TLR: Receptor do tipo toll

TNF- α : Fator de necrose tumoral – alfa

VgrG: Proteínas G de repetições em valina e glicina

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Microscopia eletrônica de varredura da bactéria <i>E. coli</i> SEPT362	Página 16
Figura 02. Modelo de montagem do SST6.	Página 19
Figura 03. Esquema da via básica de apresentação de antígenos de MHC de classe I e de MHC de classe II.	Página 25
Figura 04. Esquema do tráfego intracelular das diferentes isoformas de CD1.	Página 29
Figura 05. O SST6 desempenha um importante papel na redução da viabilidade de macrófagos peritoneais durante a infecção por <i>E. coli</i> .	Página 37
Figura 06. Teste de validação experimental.	Página 40
Figura 07. Análise de viabilidade pelos produtos de bacterianos.	Página 42
Figura 08. SST6 possui um papel crucial na adesão, internalização e viabilidade das bactérias <i>E. coli</i> no interior de macrófagos.	Página 44
Figura 09. Análise do papel do SST6 sobre a secreção de óxido nítrico de macrófagos infectados por <i>E. coli</i> .	Página 45
Figura 10. SST6 participa da indução da biogênese de corpúsculo lipídico em macrófagos infectados por <i>E. coli</i> .	Página 46
Figura 11. Análise do papel de SST6 sobre a secreção de citocinas de macrófagos infectados por <i>E. coli</i> .	Página 47
Figura 12. Análise da participação do SST6 na modulação do fator de transcrição NF- κ B induzido por <i>E. coli</i> em macrófagos.	Página 49
Figura 13. Análise do papel de SST6 na modulação do fator de transcrição PPAR γ em macrófagos infectados por <i>E. coli</i> .	Página 50
Figura 14. SST6 e a inibição de PPAR γ participam da redução de secreção de citocinas IL-6 e IL-12 em macrófagos infectados por <i>E. coli</i> .	Página 52
Figura 15. Análise do papel do fator nuclear PPAR γ sobre a capacidade microbicida de macrófagos infectados por <i>E. coli</i> .	Página 54
Figura 16. Análise da participação de SST6 na modulação da expressão de CD1a e CD1d em células infectadas por <i>E. coli</i> .	Página 57
Figura 17. Análise da participação do SST6 na modulação da expressão de MHC II em células infectadas por <i>E. coli</i> .	Página 60
Figura 18. Análise da modulação da expressão de moléculas co-estimulatórias por SST6 de <i>E. coli</i> .	Página 62
Figura 19. Análise do recrutamento de macrófagos por SST6 de <i>E. coli</i> .	Página 64
Figura 20. Análise da modulação do peso dos órgãos induzida por SST6 de <i>E. coli</i> .	Página 66
Figura 21. Análise do papel do SST6 na migração e viabilidade de <i>E. coli</i> para o fígado de animais infectados.	Página 68
Esquema 01. Modelo proposto para o papel do SST6 no metabolismo lipídico, apresentação de antígenos lipídicos, apresentação de antígenos proteicos, moléculas co-estimulatórias e os mecanismos associados a essa via.	Página 78
Esquema 02. Modelo proposto para o papel do SST6 e PPAR γ na capacidade microbicida de macrófagos peritoneais.	Página 79

1- INTRODUÇÃO

1.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli é uma espécie de bactéria caracterizada por ser um bacilo gram-negativo, anaeróbio facultativo pertencente à família *Enterobacteriace* (Kaper et al., 2004). Essa bactéria é comumente encontrada na microbiota intestinal de vários animais e também nos seres humanos. Entretanto, algumas cepas de *E. coli* patogênicas podem causar desde distúrbios gastrointestinais até mesmo sepse (Wachi et al., 2005).

Nesse contexto, as cepas de *E. coli* podem ser classificadas em três grupos baseados em critérios genéticos e clínicos: 1. Comensal. 2. Patogênica intestinal 3. Patogênica extraintestinal (Russo & Johnson 2000). As patogênicas intestinais podem, ainda, se dividir em: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) e *E. coli* difusamente aderente (DAEC). As patogênicas extraintestinais em *E. coli* uropatogênica (UPEC), *E. coli* associada a meningite (MNEC) e aviária patogênica *E. coli* (APEC) (Kaper, et al., 2004).

O grupo APEC, consiste em bactérias causadoras de doenças extra-intestinais e septicemia em aves, gerando grandes e perdas econômicas quando infectam aves (Dho-Moulin & Fairbrother 1999; Dias da Silveira et al. 2002). Além disso, estas bactérias possuem significativa importância zoonótica, pois são capazes de infectar mamíferos e causar meningite (Tivendale et al. 2010). De fato, já foi demonstrado que cepas de *E. coli* APEC são potenciais patógenos humanos (Moulin-Schouleur et al. 2006; Sadeyen et al. 2014, 201). Também, já foi demonstrado que estas bactérias podem induzir a morte celular por apoptose em macrófagos (Bastiani et al., 2005). Isso ocorre pelo fato destas bactérias apresentarem alguns fatores de virulência, desencadeando então uma resposta imunológica no hospedeiro. Dentre os vários fatores de virulência podemos destacar o sistema de secreção do tipo VI (SST6).

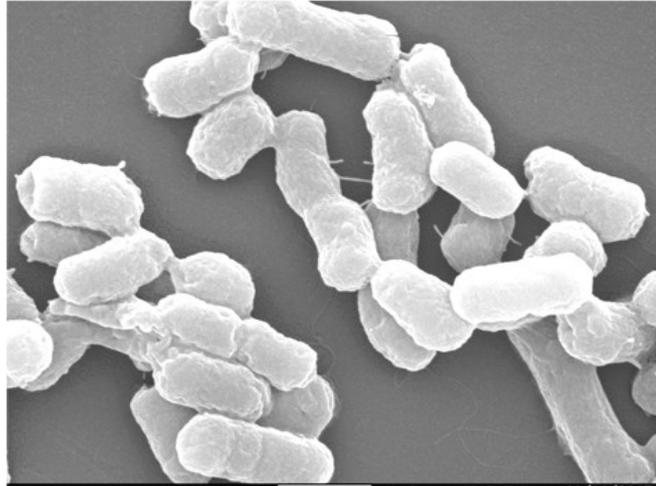


Figura 01. Microscopia eletrônica de varredura da bactéria *E. coli* SEPT362. Imagem feita no microscópio da marca JEOL modelo JSM- 7001F, 17.000x, 1um, 10.0kV

1.2 Sistema de Secreção do tipo VI (SST6)

A secreção de toxinas é um fator importante em processos de patogênese. Essas toxinas podem exercer diversas funções biológicas, de modo a favorecer e promover a infectividade da bactéria (Bleves et al. 2010). Nesse contexto, bactérias gram-negativas possuem sistemas de secreção que são responsáveis por transportar substratos, incluindo essas toxinas, para o meio extracelular. Nessas bactérias gram-negativas os sistemas de secreção podem variar do sistema de secreção tipo I (SST1) ao sistema de secreção do tipo VII (SST7) sendo o SST6, um dos mais recente descrito na literatura (Pukatzki et al. 2006).

O SST6 tem a estrutura similar a um bacteriófago, apresentando a capacidade de translocar substratos efetores diretamente no citoplasma de células adjacentes devido à presença de um nanotúbulo em formato de agulha (Zoued et al. 2014). O SST6 é constituído por cerca de treze proteínas conservadas, um conjunto de proteínas não conservadas que apresentam funções acessórias e regulatórias, as quais são codificadas por cerca de quinze a vinte genes (Filloux, et al., 2008).

Considerado como um potencial fator de virulência, o SST6 já foi descrito como importante fator na interação procarioto-procarioto e procarioto-eucarioto (Jani & Cotter 2010; Schwarz, et al., 2010). Já foi descrito que o SST6 apresenta um papel crucial na virulência em várias infecções, como em *Burkholderia mallei* (Burtnick et al.

2010), *Francisella tularensis* (Barker et al. 2009), *Pseudomonas aeruginosa* (Bleves et al. 2010; Jiang et al. 2014) *Burkholderia cenocepacia* (Aubert, et al., 2015; Rosales-Reyes et al. 2012) e, também *Escherichia coli* (de Pace et al. 2010; J. Ma et al. 2014).

A secreção via o SST6 é um mecanismo importante no processo de patogênese. Contudo, sabe-se que muitas bactérias que apresentam SST6 não são conhecidas por serem patogênicas, sugerindo então que a secreção por esse sistema pode funcionar em interações não patogênicas entre bactérias e hospedeiro. Diante disso, existe uma atribuição dual para esse sistema, participando de processos de patogênese e em relações comensais (Jani & Cotter, 2010).

Quanto à interação entre procariotos, o SST6 está descrito como participante da formação de biofilme em *Pseudomonas aeruginosa*, na formação de corpos de frutificação em *Myxococcus xanthus* e tem sua ação regulada pelo *quorum sensing* entre outras bactérias gram-negativas (Gode-Potratz & McCarter 2011; Hood et al. 2010; Konovalova, et al., 2010), mostrando então a relevância desse sistema de secreção em relações intraespecíficas e interespecíficas.

1.3 Constituição do Sistema de Secreção tipo VI

Algumas proteínas que compõem o SST6 já foram caracterizadas e são conservadas em várias espécies. As proteínas constituintes do SST6 que mais se destacam são: VgrG, (proteínas G de repetições em valina e glicina) Hcp (Proteínas Co-reguladoras de Hemolisinas), ClpV (Protease dependente de ATP-V) e IcmF (fator de multiplicação intracelular) (Silverman et al. 2012).

A proteína VgrG está localizada na extremidade do nanotúbulo, e forma trímeros que juntamente com a proteína Hcp constituem uma estrutura que se assemelha a um complexo do bacteriófago T4 (Kanamaru et al. 2002; Leiman et al. 2009). Essas proteínas não são apenas componentes essenciais do sistema, pois além de formarem o nanotúbulo, que é requerido para o aparato funcional do SST6, elas são secretadas juntas para o interior da célula adjacente. Com isso, há a indicação de uma dupla função tanto como componente estrutural quanto como substrato do SST6 (Silverman et al. 2012).

A proteína ClpV hidrolisa o ATP e era reconhecida como a ATPase que geraria a energia suficiente para a translocação de proteínas. Entretanto, foi descoberto que a proteína ClpV não é necessária para o “*killing*” bacteriano dependente de SST6,

servindo somente para aumentar a eficiência do SST6 (Basler et al. 2012; Zheng, et al., 2011). Além disso, o real papel da ClpV estaria relacionado às proteínas VipA e VipB (proteína de interação de ClpV), que auxiliam na formação tubular do SST6. Com isso, a real função da ClpV seria o reconhecimento, desagregação e reciclagem de VipA e VipB por um processo dependente de hidrólise de ATP (Pietrosiuk et al. 2011). Desta forma, a ClpV participa como ATPase no remodelamento das subunidades do SST6 deixando-as então disponíveis no citosol (Kapitein et al. 2013). Nesse contexto, toda a energia requerida para a secreção e translocação de proteínas estaria então contida intrinsecamente nas proteínas da montagem da estrutura do SST6.

Já a IcmF é uma proteína estrutural que fornece energia ao SST6 e está associada à membrana interna da bactéria. Uma das particularidades desta proteína é que tem atividade de ATPase, ação que é crucial para o recrutamento da proteína Hcp (L.-S. Ma, et al., 2012). A proteína IcmF contém vários domínios transmembrana e participa do processo de translocação de proteínas para o interior das células alvo. Tal proteína está relacionada a vários processos celulares incluindo motilidade bacteriana, formação do biofilme, e aumento da frequência de conjugação (Das et al. 2002; de Pace et al. 2011). Quanto aos processos de patogênese, a IcmF está relacionada à aderência a células epiteliais, ao aumento da replicação do patógeno em macrófagos, à fagocitose, à inibição da fusão fago-lisossomo e a indução da apoptose (Purcell & Shuman 1998; Zink et al. 2002). Esses trabalhos demonstram a importância dessa proteína em processos de patogênese e sua influência em alguns mecanismos da resposta imunológica da célula eucariótica hospedeira.

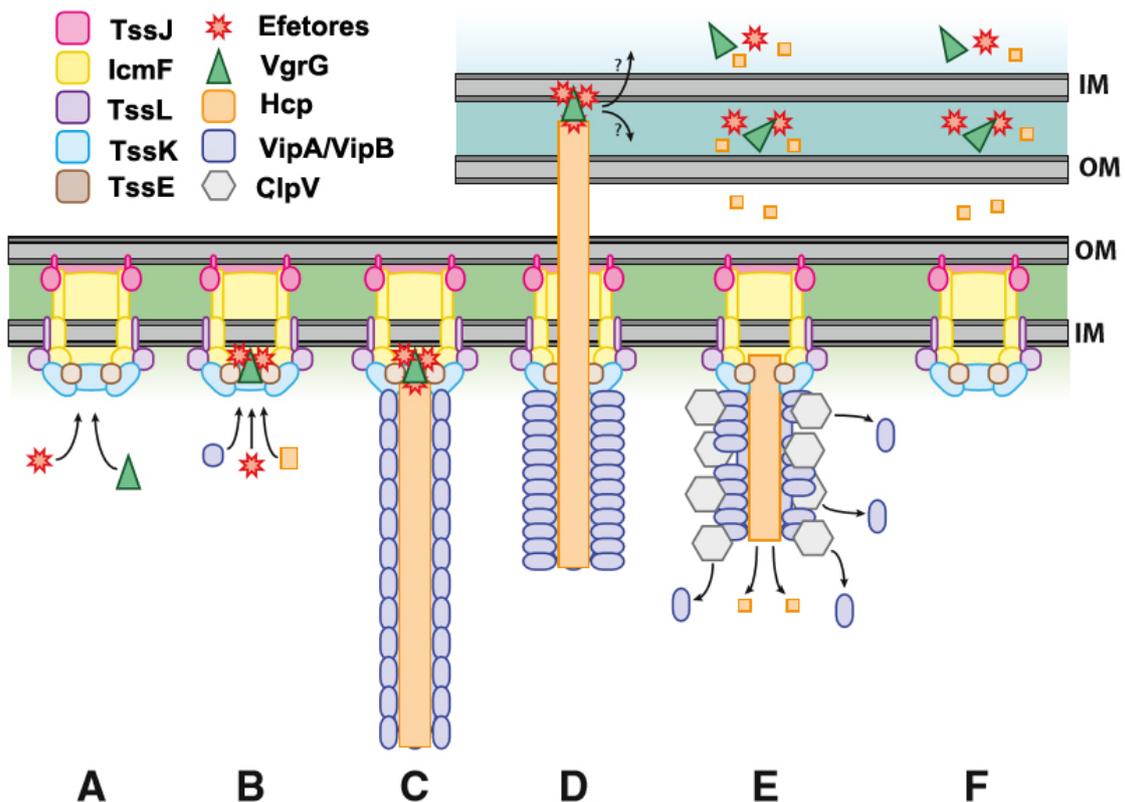


Figura 02. Modelo de montagem do SST6. (A) Reciclagem de algumas moléculas estruturais como IcmF, TssJ, TssL, Tssk, TssE; (B) VgrG e algumas proteínas efetoras são recrutadas provavelmente contribuindo para uma estabilidade maior do sistema; (C) A proteína Hcp é polimerizada no centro do sistema abaixo de um trímero VgrG e em seguida, a VipA / VipB é polimerizada e formam uma bainha em torno do tubo Hcp crescente; (D) Analogamente ao fago, ocorre uma alteração de conformação na estrutura de bainha que resulta numa contração onde lança o tubo formado pela proteína Hcp para fora da célula atravessando a membrana alvo da célula alvo; (E) A proteína ClpV usa ATP para remodelar a bainha formada por VipA / VipB, deixando essas subunidades disponíveis no citosol; (F) O complexo permanece pronto para ser reciclado ou desmontado, dependendo do seu estado de ativação para o SST6.

Fonte: de: Ho et al., *A View to a Kill: The Bacterial Type VI Secretion System*, *Cell Host & Microbe* (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2013.11.008> Figura com adaptações.

1.4 Resposta imunológica nas infecções bacterianas

O processo de patogênese tem a característica de ser multifatorial, dependendo da interação entre o sistema imunológico do hospedeiro e o patógeno, e pode resultar ou

não em doenças infecciosas, sendo dependente da eficiência da resposta imunológica do hospedeiro para a contenção da infecção e da capacidade de virulência do patógeno.

A primeira linha de defesa do hospedeiro é tida como a barreira epitelial, além dela existem outros mecanismos para a contenção do patógeno como a produção de agentes antimicrobianos, pH ácido, presença de microbiota comensal, e outros mecanismos que podem também desencadear algum tipo de resposta imunológica.

A resposta imunológica é dividida em duas: resposta imune inata e resposta imune adaptativa. Na resposta inicial, a resposta imune inata, ocorre o reconhecimento de diversos microorganismos por meio de seus receptores de reconhecimento padrão (PRR) que identificam os padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs), os quais são conservados em muitos agentes patogênicos e podem ser secretados ou estarem presentes na membrana (Seider et al. 2010). Nesse sentido, no curso da evolução algumas bactérias evoluíram e desenvolveram formas de escape, como por exemplo, a cápsula que podem ocultar alguns desses PAMPs bacterianos (Seitz et al. 2014 ; Sharma et al. 2012).

O reconhecimento de PAMPs pelos PRRs desencadeiam uma resposta celular e com consequente secreção de citocinas, quimiocinas, ativação celular, ativação de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK), e translocação de fatores de transcrição para o núcleo, como o NF- κ B (McGuire & Arthur 2015). Todavia, o sistema imune inato apresenta algumas limitações para o reconhecimento de uma pluralidade de antígenos e geração de memória imunológica. Essas limitações são supridas pela resposta imune adaptativa. As células da imunidade adaptativa são linfócitos B que produzem anticorpos específicos, células T CD8⁺ que tem atividade citotóxica, e células T CD4⁺ que também produzem citocinas efetoras.

Mesmo com essa pluralidade de mecanismos da resposta imunológica, alguns microorganismos podem subverter ação do sistema imunológico como, por exemplo, a *E. coli* ExPEC que consegue sobreviver no interior de neutrófilos sem sofrer o processo de fagocitose (Nazareth, et al., 2007). Além disso, produtos de *E. coli* patogênicas podem inibir seletivamente a secreção de algumas citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-1b, IL-6, IL-8, IL-12, e inibir seletivamente a ativação de linfócitos (Klapproth et al. 1995).

Em infecção por *Shigella* foi demonstrado que essa bactéria gram-negativa consegue invadir linfócitos TCD4⁺ ativados, e que para isso é requerido o sistema de

secreção tipo III (T3SS). Além disso, essa invasão resulta na inibição da secreção da quimocina CXCL12 que induz migração de células T (Konradt et al. 2011). *Coxiella burnetii* também consegue se estabelecer bem, crescendo e se replicando dentro da célula do hospedeiro via sistema de secreção tipo IV (T4SS) (Beare et al. 2011 ; Carey et al. 2011)

Os sistemas de secreção têm sido demonstrados como importantes fatores de virulência do patógeno relacionados à resposta imunológica. Nesse contexto, componentes estruturais de sistemas de secreção podem ser potenciais indutores de patogênese como, por exemplo, o componente estrutural do T3SS, IpaB, que é capaz de induzir a formação de poros iônicos, destruir o fagossomo e induzir as células imunes a necrose ou apoptose em infecção por *Shigella* (Yang et al. 2015).

Assim, alguns patógenos utilizam de seus sistemas de secreção para entregar substratos efetores no citoplasma da célula hospedeira para alterar processos celulares em seu benefício. Podemos citar como exemplo o substrato Cbu1314 de T4SS que pode modular a transcrição de vários genes do hospedeiro relacionados à sinalização celular, apoptose e resposta imune, em infecção por *Coxiella burnetii* (Weber et al. 2016). Além desse, o efector NleA, dependente de T3SS é usado por *E. coli* para inibir a formação do complexo proteico mais importante da inflamação, o inflamassoma, em macrófagos (Yen et al., 2015). E em *Vibrio cholerae* o efector VopE dependente de T3SS modula a dinâmica mitocondrial e a sinalização imune inata (Suzuki et al. 2014). Sendo em *Brucella* spp. VirB dependente de T4SS regula a resposta inflamatória e consegue manipular o tráfego de vesículas dentro das células do hospedeiro (Ke et al. 2015). Com isso, nota-se a participação de alguns sistemas de secreção e seus substratos na modulação de vários processos celulares do hospedeiro para evasão do patógeno.

Patógenos podem ser selecionados ao longo da evolução por apresentar mecanismos de evasão altamente especializados em modular a resposta imunológica do hospedeiro, evitando sua detecção e eliminação. Dentre os diversos mecanismos de detecção de patógenos pelo sistema imunológico destaca-se a apresentação de antígenos proteicos e lipídicos do patógeno pelo hospedeiro, a qual é essencial para a indução e ativação da resposta imunológica adaptativa e controle da infecção.

1.5 Apresentação de antígenos proteicos

Dentro da análise da resposta imunológica um dos pontos importantes é a apresentação antigênica. Macrófagos e células dendríticas são células com alta

capacidade fagocítica, um evento essencial não só para permitir a internalização do patógeno, como possibilitar a degradação do patógeno e a apresentação de seus antígenos ao receptor de células T (TCR), o qual reconhece antígenos específicos. Nesse processo juntamente com citocinas, moléculas co-estimulatórias, quimiocinas e sinais metabólicos há a geração de células T com diferentes fenótipos e ações (Daniels & Teixeira 2015).

O produto gerado pelo processo de fagocitose pode resultar em vários peptídeos que serão apresentados por moléculas específicas e que levarão ao desencadeamento da resposta imune adaptativa. Nesse contexto, se tem estudado a apresentação de antígenos proteicos via molécula MHC de classe I e de MHC de classe II. Sendo então a apresentação de MHC classe I por via endógena e a de MHC de classe II via exógena.

O perfil de peptídeos apresentados vai variar de acordo com a fenda da molécula de MHC (Neefjes et al. 2011). A via clássica de apresentação de antígenos proteicos é a que o MHC I apresenta antígenos endógenos e leva à ativação de linfócitos TCD8+, enquanto que MHC II apresenta antígenos exógenos para linfócitos TCD4+ (Cresswell 1994; Heemels & Ploegh 1995). Contudo, MHC I pode apresentar antígenos exógenos por um processo chamado apresentação cruzada (Joffre et al. 2012).

Classicamente os peptídeos que se ligam ao MHC I são gerados no citosol, onde são ubiquitinados e sofrem a ação do proteassoma. Esses peptídeos são importados para o lúmen do Retículo endoplasmático pelo transportador associado com o processamento de antígenos (TAP). Ocorre então o dobramento da molécula MHC I e o acoplamento do peptídeo à molécula de MHC I com o auxílio de algumas chaperonas, como a calnexina que confere estabilidade à molécula de MHC (Wearsch & Cresswell 2008). Além disso, a ação em conjunto de calreticulina, Erp57 e tapasina possibilita a inserção do peptídeo de forma correta na molécula de MHC e peptídeos associadas ao retículo endoplasmático (ERAP) ajustam o tamanho ideal do peptídeo (Basu & Srivastava 1999; Belicha-Villanueva et al. 2008; Lorente et al. 2013). Finalmente, a molécula de MHC I, contendo o antígeno peptídico, vai ser exportada para superfície celular através do Aparato de Golgi para apresentação aos linfócitos TCD8+. Esse tipo de apresentação de antígenos pela via endógena é muito importante para a resposta imunológica em infecções virais (Dolan et al. 2012; Murat & Tellam 2015).

A saída da molécula MHC de classe I do retículo endoplasmático é feita após a ligação com o peptídeo e assim é exportada para a superfície celular, diferentemente, a molécula MHC II se associa a uma cadeia invariante Ii que possui sequências proteicas de endereçamento para o compartimento endossomal e para o compartimento de MHC II (MIIC). Assim a molécula de MHC II possui um tráfego de endereçamento intracelular que é mediado pela ação de proteínas adaptadoras (AP) (Hofmann et al. 1999). Ao chegar ao compartimento MIIC, o complexo MHCII/Ii sofre a ação de catépsina S, com isso ocorre a degradação da cadeia invariante Ii e permanece apenas um peptídeo associado de cadeia invariante (CLIP) (Riese et al. 1996).

O peptídeo CLIP bloqueia a região da fenda do MHC II para não ocorrer ligação de nenhum peptídeo prematuramente. Com isso, no compartimento MIIC a molécula HLA-DM interage com o complexo MHC II/CLIP, induzindo alterações conformacionais, as quais diminuirão a afinidade de CLIP com MHCII, nesse processo, vai haver a dissociação e a possibilidade de ligação de antígenos peptídicos na fenda do MHC II (Busch et al. 2000). Ocorre então a fusão do fagolissoma com o MIIC, assim, peptídeos de patógenos serão acoplados a molécula de MHCII a qual será direcionada a membrana plasmática para apresentação a linfócitos TCD4 (Mosyak, et al 1998; Inaba et al. 2000). Esse tipo de apresentação de antígenos pela via exógena é muito importante para a resposta imunológica em infecções por patógenos extracelulares.

Quanto à regulação, as moléculas de MHC são reguladas pelo fator de transcrição NF- κ B. Tal fator de transcrição por ser ativado pelo reconhecimento do patógeno nos receptores Toll (TLR) e pela proteína adaptadora Myd88 (Forloni et al. 2010; Kissner et al. 2011). A expressão do gene de MHC pode ser modulada por estímulos inflamatórios e imunológicos, com isso, citocinas como IFN- γ estimulam a transcrição de genes de MHC II (Lee et al. 2006). Em contrapartida, IL-10 modula negativamente a expressão de MHC I (Terrazzano et al. 2000). E ainda um grande imuno ativador, o LPS, bem como DNA de bactérias, podem aumentar a expressão de genes de MHC II. (Barrachina,, et al. 1999). Tais modulações exercem um efeito direto na ativação de linfócitos T.

Entretanto, para a ativação de linfócito T naive além da ligação do MHC ao TCR é necessário a participação de moléculas co-estimulatórias e a presença de citocinas pró-inflamatórias (Curtsinger & Mescher 2010). A expressão de moléculas co-

estimulatórias em células APCs é fundamental no desenvolvimento da resposta imunológica.

Várias são as moléculas co-estimulatórias, dentre elas CD80, CD83, CD40, CD86 presentes na superfície de células APCs e CD28, CTLA-4, CD40L e OX40 presentes na superfície de linfócitos T. O nível de expressão dessas moléculas pode desempenhar um papel importante no decorrer da doença ou na sua remissão. Além disso, a expressão das moléculas co-estimulatórias pode direcionar dois eventos distintos: 1. A proliferação de linfócitos T e a diferenciação de células efetoras; 2. apoptose (Jenkins 1994). Já foi descrito que a ligação das moléculas co-estimulatórias CD80/CD86 a CD28 é essencial para a prevenção da apoptose em células T, além disso a ligação de CD40/CD40L resulta em uma eficiente produção de citocina IL-12, que regulam positivamente as outras moléculas co-estimulatórias (Cella et al. 1996; Orabona et al. 2004; Boise et al. 2010).

Vista a importância imunológica da apresentação de antígeno proteico e das moléculas co-estimulatórias para o hospedeiro, alguns patógenos podem fazer a modulação dessas moléculas ajudando na sua permanência dentro da célula. Por exemplo, em infecções por *Chlamydia trachomatis*, sabe-se que ela pode inibir moléculas MHC I a nível transcricional (Hornef et al. 2002; Stenger, et al 1998). A *Mycobacteria tuberculosis* consegue exercer essa mesma inibição, podendo também diminuir a expressão de CD80, CD86 e CD40 em APCs, indicando uma forma de escape imunológico (Schreiber et al. 2010; Bonato et al. 2001). Em infecções por *Salmonella enterica* também foi visto que essa bactéria consegue interferir na via de processamento da apresentação de antígenos (Cheminay, et al. 2005). A enterotoxina termolábil de *E. coli* participa na redução da expressão de MHC II e as moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86. (Ji et al. 2015) Além de infecções, alguns processos celulares como autofagia, trogocitose e transferência intracelular de exossomos contribuem para a apresentação de antígenos (Duraes et al. 2015; Wakim & Bevan 2011; Théry et al. 2001).

Nas últimas décadas estudou-se majoritariamente a apresentação de antígenos somente com características proteicas através das moléculas MHC I e MHC II, os quais apresentam peptídeos na membrana de células APC. Porém, uma nova família de moléculas descobertas na década de 90 mostrou que é possível apresentar antígenos de

cunho lipídico, denominadas proteínas CD1 (Beckman et al. 1994). Isso mudou de forma significativa o entendimento de apresentação de antígeno tanto no campo da imunidade inata quanto adaptativa.

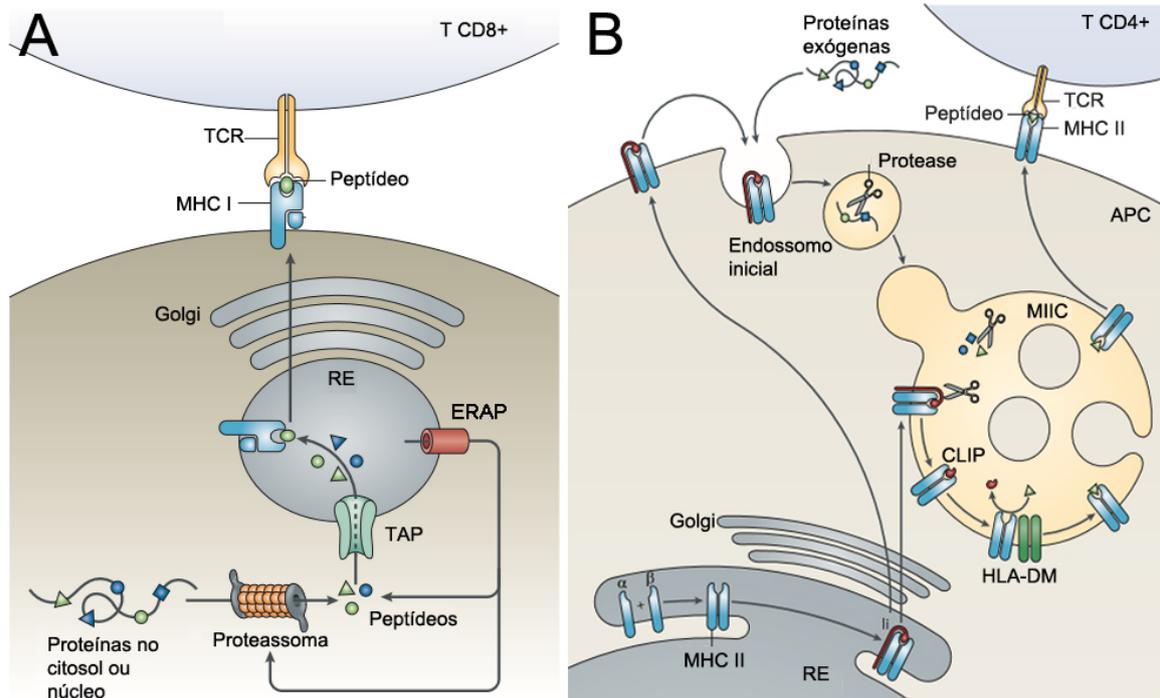


Figura 03. Esquema da via básica de apresentação de antígenos de MHC de classe I e de MHC de classe II. (A) Apresentação antígenos peptídicos intracelulares por MHC de classe I. Os antígenos são degradados no proteassoma. Após isso, os peptídeos são translocados via transportador associado com o processamento de antígenos (TAP) para o lúmen do retículo endoplasmático (RE). No RE os peptídeos se ligam ao MHC I, formando um complexo que será encaminhado para o Golgi. Com isso, via Golgi será transportado para a membrana plasmática para apresentar antígenos a linfócitos TCD8. **(B)** Apresentação antígenos peptídicos extracelulares por MHC de classe II As cadeias α - e β - são montadas no RE e formam um complexo com a cadeia invariante (Ii). O heterodímero de MHC II-Ii é transportado via Golgi para o compartimento de MHC de classe II (MIIC). O fragmento de peptídeo associado de classe II (CLIP) permanece impedindo a ligação prematura de peptídeos antigênicos ao MHC II. Proteínas endocitadas e Ii são degradadas por proteases residentes no MIIC. O fragmento de peptídeo associado de classe II (CLIP) é retirado da fenda de MHC II pelo peptídeo antigênico com a ajuda da chaperona HLA-DM. As moléculas de MHC II são transportadas para a membrana plasmática para apresentar peptídeos aos linfócitos

TCD4. Fonte: Neefjes et al. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. (2011) <http://www.nature.com/nri/journal/v11/n12/full/nri3084.html>. Figura com adaptações.

1.6 Apresentação de antígenos lipídicos

A descoberta de apresentadores de antígenos lipídicos, pela molécula CD1 modificou o ponto de vista sobre o papel dos lipídeos no controle da resposta imune (Porcelli, Morita, and Brenner 1992; Beckman et al. 1994). A estrutura da molécula CD1 se assemelha ao MHC I, possuindo também a microglubulina $\beta 2$ ancorada na membrana (Zeng et al. 1997)

Assim como ocorre nas moléculas de MHC I e II, os genes que codificam CD1 estão presentes no genoma de várias células de mamíferos (Nei & Rooney 2005). Existem cinco genes que codificam as isoformas da molécula CD1 em células apresentadoras de antígenos, as quais são classificadas em famílias sendo o grupo I: CD1a, CD1b e CD1c; grupo II: CD1d e o CD1e é tido como um intermediário. Os grupos I e II são expostos na superfície celular e formam complexos com antígenos lipídicos. Nos seres humanos encontram-se todas as isoformas de CD1, enquanto que em murinos encontram-se apenas a isoforma CD1d (Van Rhijn & Moody 2015a).

As isoformas CD1a, CD1b, CD1c e CD1d são moléculas apresentadoras de antígenos ancoradas na membrana que se diferenciam quanto a sua estrutura da fenda de ancoragem de lipídeo, padrões do tráfico intracelular e os padrões de expressão em diferentes tecidos (Van Rhijn & Moody 2015a). Em contrapartida, a molécula CD1e é uma proteína solúvel encontrada no lúmen e em compartimentos extracelulares, sendo que uma de suas funções consistem em auxiliar na transferência de lipídeos de membrana para outras proteínas CD1 (Facciotti et al. 2011; de la Salle et al. 2005).

Assim como para proteínas, os glicolipídeos são parcialmente degradados no endossomo tardio, sendo reduzidos a pequenas moléculas que serão compatíveis com a fenda hidrofóbica na estrutura da molécula CD1. Entretanto, cada proteína CD1 apresenta vias secretoras e caminhos endossomais distintos, que são baseados em sequências padrões de proteínas na cauda citoplasmática das proteínas CD1 (Van Rhijn & Moody ,2015). Essa sequência de proteínas padrões contém tirosina (Y), seguida por algum aminoácido (X) e um resíduo hidrofóbico (Z), portanto, essa sequencia proteica

YXXZ é responsável por se ligar a proteínas adaptadoras que irão encaminhar os compartimentos endossomais e lisossomais na maturação (Jayawardena-Wolf et al. 2001; Sugita et al. 1996). Nesse contexto, cada sequência padrão YXXZ se liga a dois (CD1b, CD1d), um (CD1c) ou zero (CD1a) tipos de complexos de proteínas adaptadoras (AP). CD1b se liga tanto a AP2 quanto AP3, sendo assim mais eficiente a sua chegada a endossomas tardios (Moody & Porcelli 2001) CD1c e CD1d pode se ligar a AP2 e não em AP3, mostrando menos penetração em endossomas tardios (Sugita et al. 1996) (Sugita et al. 1999). Entretanto, alguns estudos mostram que o tráfego de CD1d para endossomas tardios é debilitado na ausência de AP3, indicando que CD1d pode interagir com AP3 (Elewaut et al. 2003). Nesse aspecto a montagem da molécula CD1a ocorre independente de proteínas adaptadoras, sendo então, a molécula internalizada via endocitose mediada por clatrina, reciclada em endossomas iniciais, e posteriormente, de forma dependente do fator ADP de ribosilação-6 (ARF6), é encaminhada para superfície celular (Sugita, et al. 2000).

Como citado, a montagem de CD1b, CD1c e CD1d ocorre em endossomas tardios, as quais apresentam um pH ácido, que induz um desdobramento parcial das moléculas e possibilita a ligação ao antígeno lipídico. Sendo assim, verifica-se que a molécula de CD1a consegue se ligar aos antígenos sem o requisito de um pH ácido, indicando que não necessita de um desdobramento completo para se ligar aos lipídeos. Isso ocorre por essa molécula apresentar uma maior abertura na fenda de ligação ao antígeno quando comparado às outras isoformas (Manolova et al. 2006; Sugita, et al. 2000; Ernst et al. 1998). Portanto, grandes são as diferenças na montagem, função e apresentação de antígenos lipídicos entre as isoformas de CD1.

De modo particular, a montagem da molécula CD1d apresenta também algumas particularidades. Essa molécula consiste em um polipeptídeo transmembrana complexado com a microglobulina $\beta 2$ (Sugita et al. 1997). Após a síntese e translocação para o retículo endoplasmático, a molécula CD1d é estabilizada por interações com lecitina, calreticulina e calnexina (Neefjes et al. 2011). A ligação dessas chaperonas fazem com que haja recrutamento de ERp57 que facilita o dobramento final da molécula CD1d, com isso, pode haver a ligação a uma proteína que facilita a aquisição de lipídeos, a proteína de transferência de lipídeos (MTP) (Kang and Cresswell 2002; Brozovic et al. 2004; Kang & Cresswell 2002). Após isso, moléculas CD1d se associam ao fosfatidilinositol no retículo endoplasmático e rapidamente são translocadas do Golgi para superfície celular pela via secretória (De Silva et al. 2002).

Essas moléculas na superfície celular podem ser internalizadas por endocitose mediada por clatrina e reciclada várias vezes pela via endocítica. Algumas moléculas acessórias facilitam a troca de lipídeos na via endocítica, sendo então importante para a aquisição de antígenos lipídicos. Após isso, uma pequena fração de moléculas CD1d pode se associar com complexos da cadeia invariante de MHC II e com isso, serem desviados para o endossomo tardio ou compartimentos de MHCII (MIIC) (Sullivan, et al. 2005).

As moléculas CD1 são reconhecidas pelo receptor $\alpha\beta$ do TCR, sendo assim, as moléculas CD1 do grupo I apresentam antígenos para os linfócitos TCD8⁺ desencadeando um fenótipo primariamente inflamatório com a expressão de IFN- γ e atividade citotóxica. A molécula CD1c é capaz de apresentar antígenos os linfócitos T $\gamma\delta$ (Spada et al. 2000). Em contrapartida as moléculas CD1 do grupo II apresentam antígenos para linfócitos T e células NKT (Brigl & Brenner 2004).

Proteínas CD1 apresentam aos linfócitos uma variedade de lipídeos derivados de patógenos *in vitro*. Existe uma variedade de lipídeos que são apresentadas pelas moléculas CD1 como: I) dihidroxemicobactina (DDM), um lipopeptídeo mycobateriano ligante de CD1a, II) lipoarabinomanana (LAM), ácido micólico, fosfatidil-myo-inositol manosidase (PIMs), ligantes de CD1b; III) manofosfoisoprenoides ligante de CD1c; e IV) α -galactosilceramida e fosfatidilinositol manosidade (PIM) de mycobacteria, ligantes de CD1d (Young et al. 2009 ;Van Rhijn & Moody 2015), mostrando então a pluralidade de ligantes lipídicos das moléculas CD1.

Para que haja essa ligação entre lipídeo e CD1, é necessário o tráfico da molécula CD1 ao endossomo tardio, que juntamente com o pH baixo proporcionam um ambiente adequado para a montagem da molécula ao ligante. Quanto à regulação do CD1, foi demonstrado que as moléculas CD1 do grupo I são expressas apenas em níveis insignificantes em monócitos circulantes, entretanto na presença de GM-CSF mais IL-4 ocorre a indução da sua expressão (Kasinrerk et al. 1993; Thomssen, Kahan, and Londei 1996).

Alguns estudos mostram que a expressão de moléculas CD1 é modulada pelo receptor de ativados por proliferação de peroxissomo γ (PPAR- γ) (Szatmari et al. 2007; Szatmari et al. 2006 ;Gogolak et al. 2007). PPAR- γ é um fator de transcrição que regula a expressão de genes que estão relacionados ao metabolismo lipídico. Esse fator reside no citoplasma em um estado de inativação até ser ativado por um ligante específico. Depois de ativado, ele é translocado para o núcleo promovendo a transcrição de vários

genes, entre eles a molécula CD1. Agonistas de PPAR, regulam positivamente a expressão de CD1d em células dendríticas, o que leva a uma maior atividade de células NKT (Szatmari et al. 2004). PPAR leva a uma maior ativação celular de macrófagos sendo importante para o combate de várias infecções (Zhang & Chawla 2004). *M. tuberculosis* é capaz de modular negativamente a via de ativação do PPAR a fim de promover sua sobrevivência no interior de macrófagos (Mahajan et al. 2012a).

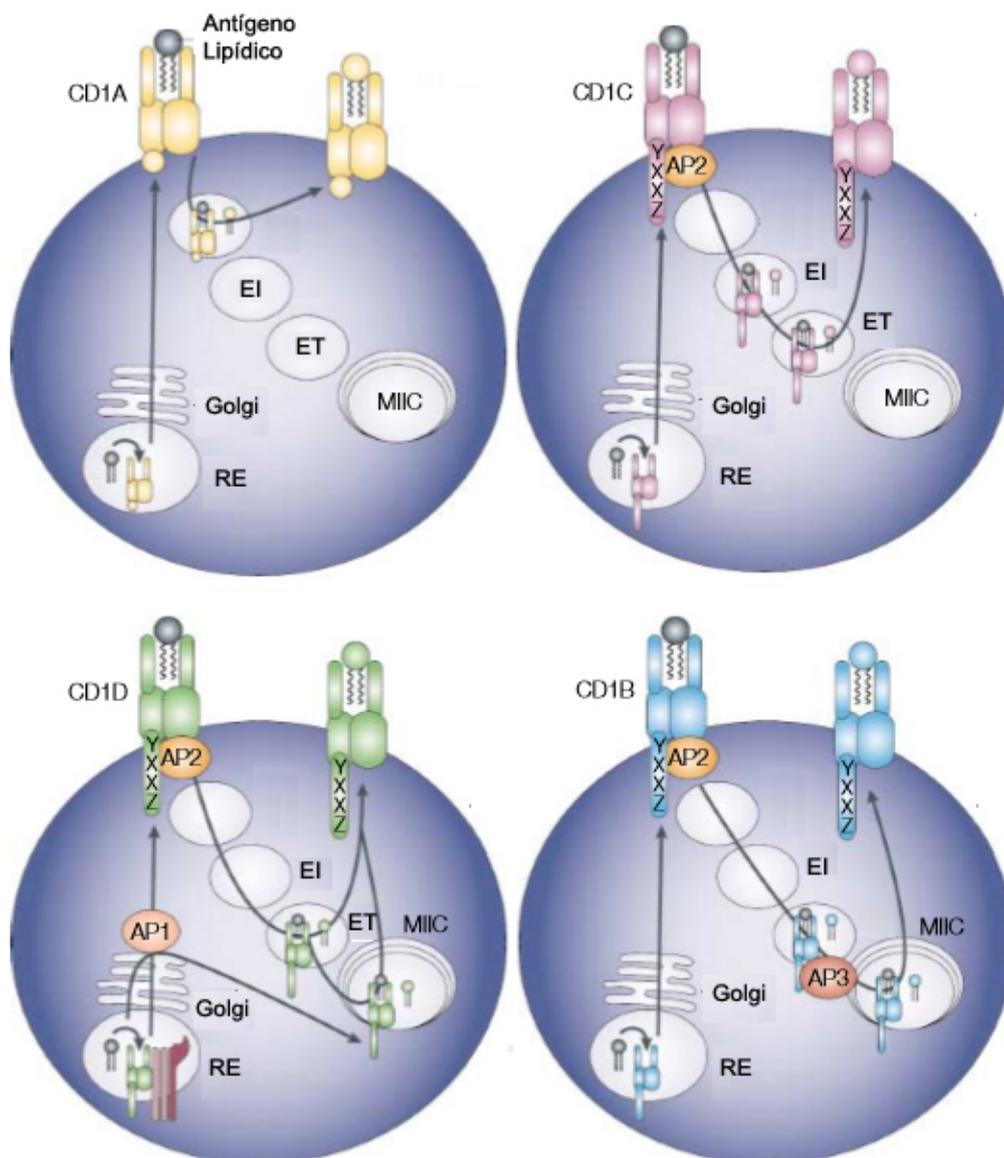


Figura 04. Esquema do tráfego intracelular das diferentes isoformas de CD1. Depois de exportado para a superfície celular, a molécula CD1a é internalizada por endocitose media por clatrina depois é exportada para a superfície dependente de ARF6.

A cauda citoplasmática de CD1c e CD1d contém uma sequência peptídica padrão baseada em tirosina, que se liga a proteína adaptadora 2 (AP2) que direciona a vesícula endoplasmática contendo CD1c e CD1d ao endossomo tardio (ET). Além disso, uma pequena fração de CD1d pode se associar com complexos da cadeia invariante de MHC II e com isso, serem desviados para o endossomo tardio ou compartimentos de MHCII (MIIC). CD1b é a única isoforma de CD1 que possui a capacidade de se ligar a AP3, promover a triagem para o compartimento de MHCII. Entretanto, alguns estudos mostram que AP3 também influencia a localização intracelular de CD1d. ER:Reticulo endoplasmático; EI: endossomo inicial. **Fonte: Moody e Porcelli. Intracellular pathways of CD1 antigen presentation(2003) http://www.nature.com/nri/journal/v3/n1/fig_tab/nri979_F2.html. Figura com adaptações.**

2 – JUSTIFICATIVA

O papel do SST6 de *E. coli* sobre a resposta imune inata dos hospedeiros eucariotos ainda é fracamente descrito, não se conhecendo a função deste sistema de secreção bacteriano sobre as moléculas apresentadoras de antígenos e co-estimulatórias. Assim, o estudo neste campo pode gerar um melhor entendimento sobre os mecanismos de patogênese de *E. coli* patogênica que podem ocasionar até mesmo a sepse. Portanto, o presente projeto visou caracterizar o papel do SST6 bacteriano sobre a apresentação antigênica e indução da resposta inflamatória em células de mamíferos. Espera-se que os resultados gerados aqui possam auxiliar no melhor entendimento sobre os fatores de virulência bacteriano, e seu papel na patogenicidade de linhagem de APEC, via SST6, e possibilitando também, a geração de novos alvos farmacológicos antimicrobianos.

3 – OBJETIVOS

Caracterizar o papel do sistema de secreção do tipo VI bacteriano sobre a apresentação antigênica e indução da ativação da resposta inflamatória de células de mamíferos infectadas por *E. coli* *in vitro* e *in vivo*.

4 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar o papel do SST6 sobre:

1. Viabilidade celular de macrófagos;
2. A adesão, internalização e viabilidade das bactérias *E. coli* no interior de macrófagos;
3. A ativação de macrófagos, analisando a biogênese de corpúsculos lipídicos;
4. A secreção de citocinas e óxido nítrico;
5. A regulação do PPAR γ e do fator de transcrição NF-kB;
6. Analisar o papel de PPAR γ sobre a atividade microbicida de macrófagos em *E. coli*;
7. A expressão de moléculas CD1a e CD1d;
8. A expressão de moléculas MHC de classe II;
9. A expressão de moléculas co-estimulatórias ;
10. O Recrutamento de células imunológicas ao local da infecção;
11. A colonização pela bactéria *E. coli* no baço e no fígado;

5-MATERIAL E MÉTODOS

5.1- Cultivo bacteriano

Neste trabalho foram utilizadas as cepas: SEPT 362, que é a cepa selvagem de *E. coli* APEC e a mutante para a proteína IcmF do SST6 (Δ IcmF). O cultivo das linhagens patogênica SEPT362 (SOROTIPO OR:H10) e Δ IcmF foi realizado em meio LB líquido a 37 °C por 24 horas, acrescido dos seguintes antibióticos: Estreptomicina (100 μ g/ml), Ampicilina (100 μ g/ml) e Tetraciclina (50 μ g/ml). Todas as bactérias foram opsonizadas com IgG murina (Invitrogen® 10410), em uma concentração de 20%, por 15min previamente à infecção de células de mamíferos. Para as infecções foram utilizadas monócitos humanos de linhagem THP-1 e monócitos humanos primários de sangue periférico, bem como macrófagos murinos derivados de medula óssea (BMDM) e macrófagos peritoniais, ambos provenientes de camundongos C57/BL6.

5.2 – Manutenção da linhagem THP-1

A linhagem celular THP-1 (Monócitos Humanos) foi obtida do banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ). As células foram mantidas em garrafas contendo meio de cultura RPMI com 10% de soro fetal bovino, em incubadora com uma atmosfera contendo 5% de CO₂ e uma temperatura de 37°C.

5.3 – Isolamento das células mononucleares do sangue periférico

Monócitos humanos primários foram obtidos a partir do sangue periférico de doadores saudáveis separados a partir de um gradiente de densidade obtido através de Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich). As células serão mantidas em meio RPMI suplementado com 10% de SFB e em estufa a 37°C com 5 % de CO₂.

5.4 – Diferenciação de macrófagos murinos derivados de medula óssea

Células BMDM foram obtidas a partir de camundongos C57/BL6 com aproximadamente 8 a 12 semanas. Durante o processo de diferenciação as células foram plaqueadas em placas de petri com meio de cultura R20/30 (50% RPMI 1640-Gibco®, 20% de Soro Fetal Bovino-Gibco®, e 30% LCCM, 1% de gentamicina). Após o 8º dia as células diferenciadas foram contadas e plaqueadas em placas de 24 poços tendo 5x10⁵ células por poço com 500 µL de meio de cultura R 10/ 5 (50% de RPMI 1640, 10% SFB , 5 % LCCM) sem antibiótico e mantidas overnight a 37°C com 5 % de CO₂.

5.5 – Coleta de macrófagos peritoneais

Macrófagos peritoneais foram obtidos a partir de camundongos C57/BL6 com aproximadamente 8 a 12 semanas. Foi realizada a coleta das células a partir de um lavado peritoneal em que as células foram plaqueadas em placas de 24 poços, tendo 5x10⁵ células por poço com 500 µL de meio de cultura (RPMI 1640 e 10% SFB) e mantidas a 37°C com 5 % de CO₂.

5.6- Estimulação com a bactéria *E. coli*

As células de mamíferos foram infectadas pelas bactérias na multiplicidade de infecção (MOI) de 1:10 e 1:100. Após 2 horas de estimulação as células foram lavadas três vezes com a solução tampão PBS 1X e, em seguida, adicionado meio RPMI com 1% de penicilina-estreptomicina e gentamicina. As células foram incubadas em estufa a 37 °C com 5% de CO₂ por diferentes períodos de infecção (6h, 18h, 24h, 48h).

5.7- Análise por microscopia confocal

Para a análise da expressão de microscopia confocal as células foram permeabilizadas com Triton X100 (Sigma-Aldrich) 0,2% por 20 minutos, bloqueadas com PBS 2% BSA por 30min, incubadas com anticorpo primário anti-NFκB e anti-PPARγ na concentração 1/300 durante aproximadamente 16h a 4°C e posteriormente, com os anticorpos secundários anti-rabbit Alexa 546 (Life Technologies) e anti-rabbit Alexa 488 (Life Technologies) por 1h. O núcleo foi visualizado através da marcação com DAPI (Life Technologies) na concentração de 1/5000. As lâminas foram montadas em meio anti-fading Prolong (Life technologies) e as imagens obtidas no Microscópio Leica com aumento de 63x e zoom 4.

5.8- Análise por microscopia eletrônica de varredura

Para a análise da interação foi utilizada microscopia eletrônica de varredura. Macrófagos BMDM foram estimulados com as *E. coli* SEPT 362 e ΔIcmF e após 30 minutos de infecção feita a fixação do material com fixador karnovsky e tampão cacodilato. As amostras foram submetidas ao recobrimento metálico com ouro com espessura de 8nm sob atmosfera de argônio, utilizando o equipamento da marca Balzers modelo SCD 050 Sputter Coater. Logo depois foram analisadas no microscópio da marca JEOL modelo JSM-7001F. Além disso, o detector de elétrons secundários e o equipamento operou com a potência de 15 a 20 kW.

5.9– Análise da expressão de moléculas MHC II e sua via de sinalização *in vitro*

A análise das moléculas de superfície responsáveis pela apresentação de antígenos proteica foi feita através de imunomarcação com anticorpos conjugados a moléculas

fluorescentes (Ebioscience) para citometria de fluxo. Macrófagos peritoneais, BMDMs e PBMCs foram infectados com *E. coli* SEPT 362 e Δ IcmF, e após 24 e 48 horas de infecção foi feita a análise da molécula MHC II.

5.10– Análise da expressão de moléculas CD1 e sua via de sinalização *in vitro*

A análise das moléculas de superfície responsáveis pela apresentação de antígenos lipídicos foi feita através de imunomarcação com anticorpos conjugados a moléculas fluorescentes para citometria de fluxo. Macrófagos peritoneais, BMDMs e PBMCs foram infectados com *E. coli* SEPT 362 e Δ IcmF e após 24 e 48 horas de infecção foi feita a análise da molécula CD1a (Ebioscience) quantificadas em modelo humano na infecção de células PBMCs, enquanto a CD1d (Ebioscience) foi quantificada em modelo murinho em macrófagos peritoneais, e macrófagos derivados de medula. A expressão do fator nuclear PPARg (Santa Cruz) normalmente envolvido na regulação da expressão de moléculas CD1 foi analisada por microscopia confocal e citometria após 6 e 18 horas após a infecção com *E. coli* SEPT 362 e Δ IcmF. Além disso, foi utilizado GW 9669 (Sigma) para inibição de PPARg.

5.11– Análise da super expressão de PPARg

O plasmídeo GS56450-1 pcDNA3.1(+)-seq1 que confere a super expressão de PPARg, foi transfectado em células THP-1 e macrófagos derivados da medula óssea. Para a transfecção foi utilizado o reagente Viomer red, um análogo da lipofectamina (Rao et al. 2015). A transfecção foi feita em placa de 96 poços com a confluência em aproximadamente 70% de densidade. A quantidade de pDNA e dos reagentes utilizados foram utilizadas de acordo com o fabricante, sendo 100ng de pDNA diluído em Buffer E para a concentração de 100mg/ μ l e 0,5 ul de viomer por poço, sendo então misturados e permanecidos 15 min de interação à temperatura ambiente. Vinte e quatro horas após a transfecção as células foram infectadas com *E. coli* SEPT 362 e Δ IcmF e após 24 horas de interação foi feita a análise de formação de unidades de colônias (CFU). Para a verificação de superexpressão foi realizada a análise da expressão de PPAR por citometria de fluxo nas células transfectadas com os diferentes vetores analisados.

5.12 – Análises *in vivo*

Camundongos C57BL/6 foram infectados com a *E. coli* SEPT 362 e Δ IcmF. Todos os procedimentos seguiram as normas de manuseio e uso de animais recomendado pelo Comitê de Uso e Ética de Animais (CEUA). Para a infecção as bactérias foram preparadas em uma concentração de 10^7 bactérias por 100 μ l de salina e foram inoculadas intraperitonealmente nos camundongos. Após 24 e 48 horas de infecção os camundongos foram sacrificados e foram coletados o sangue, soro e lavado peritoneal destes animais para a dosagem de citocinas por ELISA, quantificação de moléculas CD1d, quantificação de moléculas MHC II e moléculas co-estimulatórias.

5.13 - Análise da biogênese de corpúsculo lipídico

Para a quantificação de corpúsculos lipídicos, após as infecções, as células foram marcadas com a sonda BODIPY (Life Technologies) na diluição de 1/300 por 30 minutos e analisadas por microscopia confocal e na diluição 1/5000 e analisadas por citometria de fluxo.

5.14 - Análise dos dados

Os dados de citometria foram obtidos no FACSVerse e FACSCalibur (BD Bioscience) e foram analisados com o software Flowjo (Tree Star Inc.). As microscopias de fluorescência confocal foram plotadas em pranchas. A análise estatística foi feita pelo software GraphPadPrism, utilizando o teste anova e pós-teste de Turkey.

6- RESULTADOS

6.1 SST6 participa da redução da viabilidade celular ocorrida em macrófagos infectados por *E. coli* após 48 horas de infecção.

O SST6 de patógenos participa em várias modulações celulares em macrófagos como, por exemplo: escape da fusão fagolisossomo, aderência do patógeno, rearranjo do citoesqueleto (de Pace et al. 2010; Aubert, et al. 2015). Desta forma, inicialmente, buscamos tentar entender o efeito do SST6 na viabilidade celular de macrófagos infectados com *E. coli*. Através do método de MTT, verificamos a viabilidade celular de macrófagos infectados com a cepa selvagem SEPT362 e a cepa deletada para a proteína IcmF do SST6 (Δ IcmF). O ensaio de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-

diphenyltetrazolium bromide) (Mosmann 1983) é um método colorimétrico que mensura a viabilidade das células, e se baseia na conversão do MTT em cristais de formazan por enzimas desidrogenases presentes em mitocôndrias de células viáveis. Esses cristais têm a coloração azul e são solubilizados para análise por espectrofotometria. Conclui-se então que, quanto menor a viabilidade celular, menor será o sinal no espectrofotômetro e a redução do MTT.

Inicialmente, observamos que a viabilidade de macrófagos infectados com a bactéria SEPT362 diminuiu de forma estatisticamente significativa, quando comparado ao não estimulado após 24h de infecção. Entretanto, macrófagos infectados pela bactéria deficiente para a IcmF não apresentaram redução de viabilidade celular no mesmo período de infecção, quando comparado com o não estimulado (Figura 5A). Foi ainda observado que a viabilidade de macrófagos infectados pela bactéria SEPT362, também diminuiu de forma significativa após 48 horas de infecção quando comparado tanto aos macrófagos não estimulados, quanto aos macrófagos infectados com a cepa deficiente para IcmF (Figura 5B). Portanto, estes resultados demonstram que o SST6 participa da indução da perda da viabilidade celular de macrófagos causada pela bactéria *E. coli* após 48h de infecção.

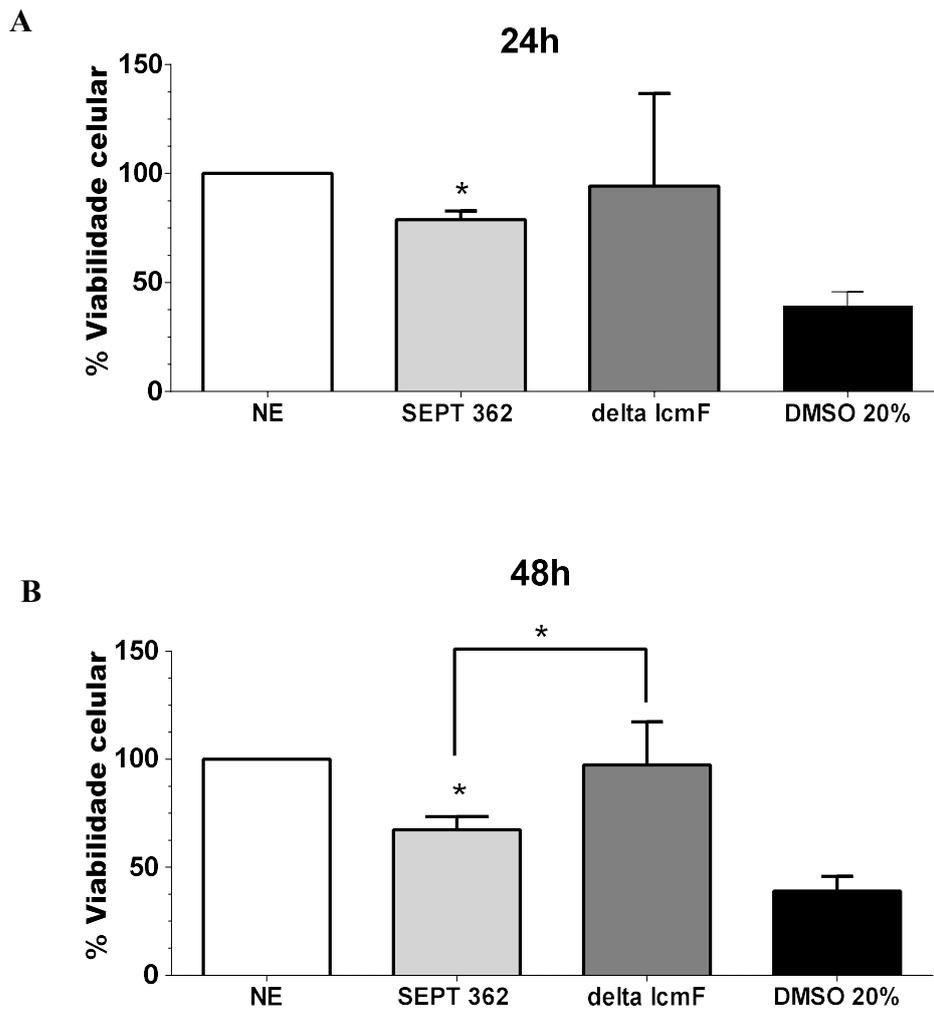


Figura 05. O SST6 desempenha um importante papel na redução da viabilidade de macrófagos peritoneais durante a infecção por *E. coli*. O ensaio MTT foi realizado no período de 24 horas (A) e 48 horas (B) pós-infecção com a bactéria SEPT362 e delta IcmF com o MOI 1:100. A taxa de sobrevivência foi calculada pela referência no valor de 100% de sobrevivência da cultura de macrófagos sem infecção (NE), e o controle de morte celular foi DMSO a 20% no meio RPMI. Esse ensaio é referente a duas repetições experimentais, sendo a análise estatística realizada por Anova, o e asterisco(*) representa $p < 0,05$.

6.2 *E. coli* deve estar viável e com estrutura morfológica preservada para que ocorra diminuição da viabilidade celular de macrófagos infectados: produtos da composição e secreção bacteriana também não influenciam na viabilidade celular de macrófagos.

Para saber a influência dos produtos da secreção ou da composição bacteriana na viabilidade de macrófagos, foi realizado o teste MTT com as seguintes condições:

- A. Macrófago não estimulado (NE);
- B. Macrófago infectado com a bactéria selvagens (SEPT362) e deficientes para a proteína IcmF (delta IcmF) e análise com 24 horas pós infecção ;
- C. Macrófago infectado com a bactéria selvagens (SEPT362 48h) e deficientes para a proteína IcmF (delta IcmF 48h) e análise com 48 horas pós infecção;
- D. Macrófagos estimulados com o sobrenadante (livre de células) de uma cultura de macrófagos peritoneais infectados com a bactéria selvagens (SEPT362) e deficientes para a proteína IcmF (delta IcmF) por 24h.
- E. Macrófagos estimulados com as bactérias selvagens (SEPT362) e deficientes para a proteína IcmF (delta IcmF) mortas pelo calor (HK). Nesta condição, as bactérias foram tratadas com *cocktail* inibidor de proteases por 10 minutos, após esse período foram fervidas a 65°C por 10 minutos, e utilizadas para estimulação de macrófagos.
- F. Macrófagos estimulados com as bactérias selvagens (SEPT362) e deficientes para a proteína IcmF (delta IcmF) com desestruturação morfológica. Nesta condição, as bactérias foram sonicadas por 40kHz por 15 minutos e utilizadas para estimulação de macrófagos.
- G. Macrófagos foram estimulados com o meio de cultivo (LB) onde as bactérias selvagens (SEPT362) e deficientes para a proteína IcmF (delta IcmF) foram cultivadas.
- H. Macrófagos foram estimulados com o meio de cultivo (RPMI) onde as bactérias selvagens (SEPT362) e deficientes para a proteína IcmF (delta IcmF) foram cultivadas.

Para comprovar que nenhuma bactéria estaria viável após a execução das condições testadas (HK, sonicação, crescimento em RPMI, crescimento em LB e transferência de sobrenadante pós-interação) nós filtramos todos os substratos

remanescentes com filtro de 0,22 μ m e realizamos o ensaio de unidade formadora de colônias (CFU). Após 48 horas de ensaios não identificamos o crescimento de nenhuma bactérias nas condições acima, sendo observado crescimento somente na condição SEPT362 (Figura 06) e delta IcmF (Dado não mostrado). Após esta análise, as bactérias das condições citadas acima bem como as amostras de sobrenadante filtradas foram utilizadas para infectar os macrófagos. Após 24 horas desses estímulos, foi realizado o ensaio de MTT a fim de verificarmos a viabilidade celular.

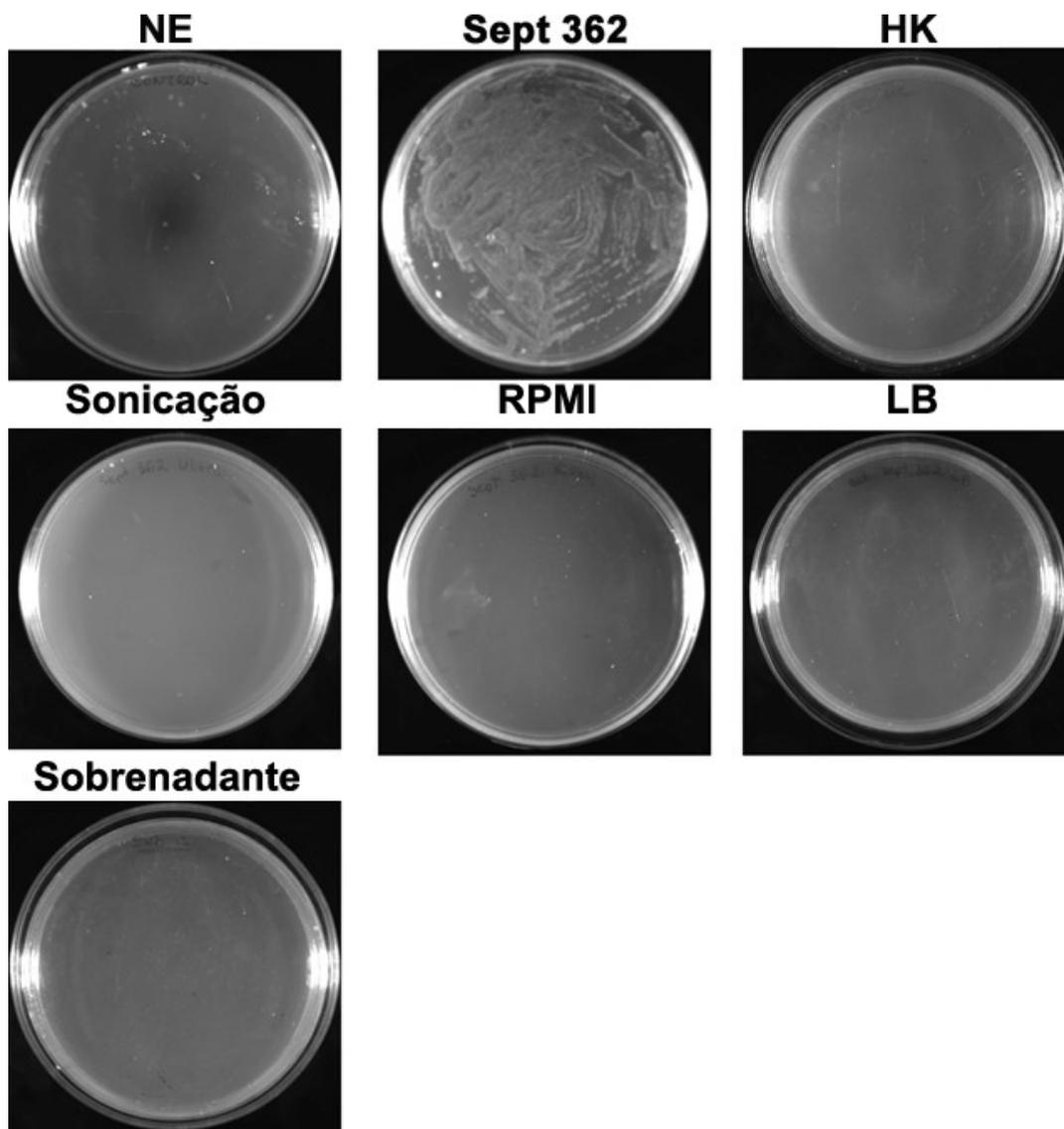


Figura 06. Teste de validação experimental. Após o preparo de todas as condições foi realizado o experimento para a verificação de unidade formadora de colônias.

De maneira geral, mais uma vez foi observada a redução da viabilidade de macrófagos pela bactéria SEPT362 após 24h e 48h comparado ao não estimulado. Entretanto quando os macrófagos foram infectados com a mesma bactéria morta pelo calor (HK) ou sem a sua estrutura morfológica preservada (sonicada) não foi observada diminuição da viabilidade celular de macrófagos, sugerindo que a bactéria deve estar viável para a indução da citotoxicidade observada nestas células (Figura 7A). De maneira similar, nenhum dos sobrenadantes e produtos de cultivo de bactérias selvagens testados foram capazes de induzir uma diminuição da viabilidade celular em macrófagos (Figura 7A). Além disso, a bactéria deficiente para a proteína IcmF, bem como todas as condições relativas a esta bactéria testadas, induziram qualquer perda de viabilidade celular em macrófagos (figura 7B). Estes dados sugerem que a presença da proteína IcmF do SST6, com integridade estrutural bem como funcional, é essencial para a indução da citotoxicidade de *E. coli* sobre macrófagos.

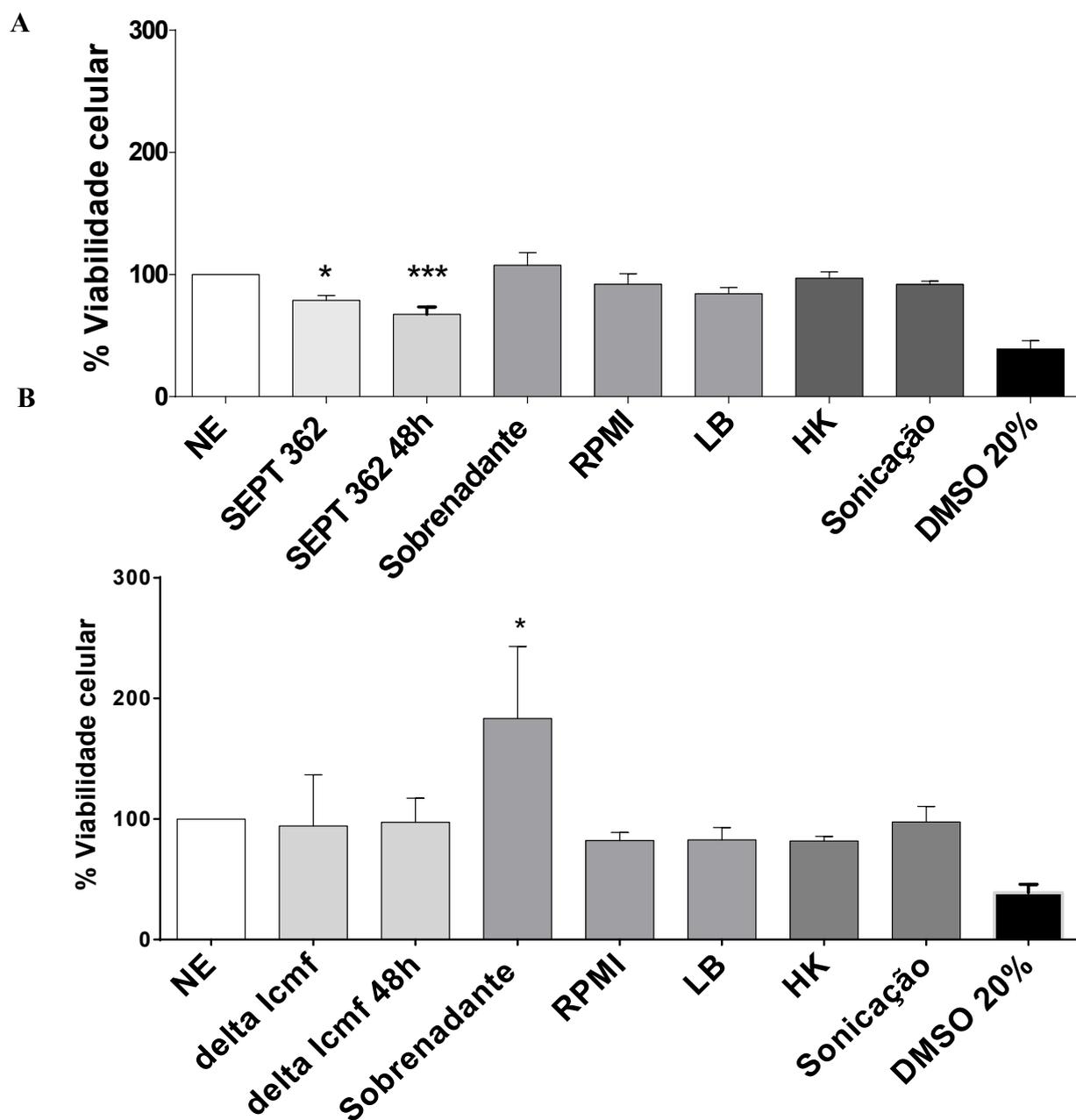


Figura 07. Análise de viabilidade pelos produtos de bacterianos. O ensaio MTT foi realizado no período de 24 horas pós infecção com a bactéria SEPT362 (A) e delta IcmF (B) com o MOI 1:100. A taxa de sobrevivência foi calculada pela referência no valor de 100% de sobrevivência da cultura de macrófagos sem infecção (NE), e o controle de morte celular foi DMSO a 20% no meio RPMI. Esse ensaio é referente a uma repetição experimental sendo a análise estatística realizada por Anova, e o asterisco (*) representa $p < 0,05$.

6.3 SST6 possui um papel crucial na adesão, internalização e viabilidade das bactérias *E. coli* no interior de macrófagos.

Descrevemos previamente a participação do SST6 de *E. coli* na viabilidade celular de macrófagos. Sabe-se que o SST6 e seus componentes proteicos (Hcp e ClpV) afetam a adesão bacteriana em células HEp-2 (linhagem de célula derivada de carcinoma humano) (Liu et al. 2015). Nesse contexto, verificamos por MEV a participação do SST6 na adesão aos macrófagos infectados por *E.coli*. Foi feita a interação das bactérias selvagens SEPT362 e deficientes para a proteína IcmF (delta IcmF) com macrófagos peritoneais por trinta minutos, em RPMI e na presença de 5% de CO₂. Constatou-se então, que nesse período, a maioria das bactérias selvagens estavam aderidas a membrana dos macrófagos, havendo então um maior contato com a célula (Figura 8A). Em contrapartida, observou-se que um número bem menor de bactérias delta IcmF encontravam-se aderidas aos macrófagos, sugerindo de fato uma menor capacidade de adesão aos macrófagos por estas bactérias (Figura 8B). Além disso, notou-se também que bactéria selvagem induziu a formação de poros na membrana dos macrófagos, o que não foi observado na infecção pela bactéria deficiente da proteína IcmF (Figura 8C e D). Provavelmente pela presença de hemolisina A que induz o aumento da permeabilidade da membrana de macrófagos (Menestrina et al. 1996).

Além da adesão do patógeno ser crucial, o processo de fagocitose é um fator importante para o desenvolvimento da resposta imune inata e adaptativa do hospedeiro. (Henneke & Golenbock 2004) No entanto, vários patógenos têm desenvolvido vários mecanismos de escape que incluem: a manipulação do tráfico do fagossomo (Dramsí & Cossart 2002); alteração da antigenicidade de moléculas de superfície para evitar a fagocitose (Seifert 1996). Assim, verificamos se a proteína IcmF desempenharia algum papel na fagocitose e analisamos a formação de colônias nos macrófagos infectados pela bactéria selvagem e deficiente para IcmF. Observamos que na infecção em macrófagos com a bactéria selvagem houve maior formação de colônias quando comparada à infecção pela bactéria delta IcmF, indicando que um maior número de bactérias selvagens são internalizadas por macrófagos e/ou que estas permanecem mais viáveis dentro dos macrófagos quando comparadas às bactérias deficientes para a proteína IcmF (Figura 8E).

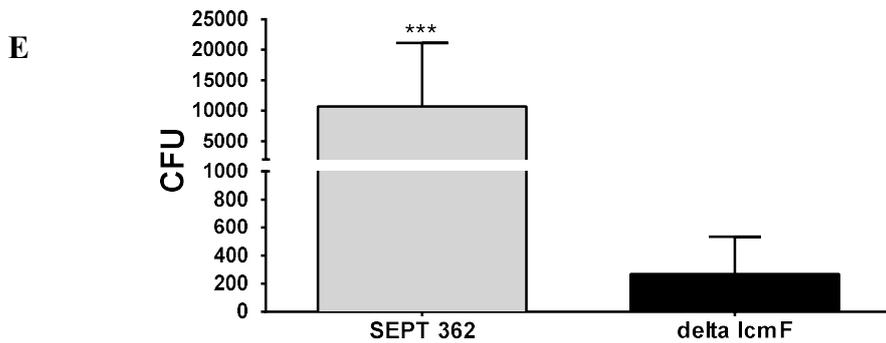
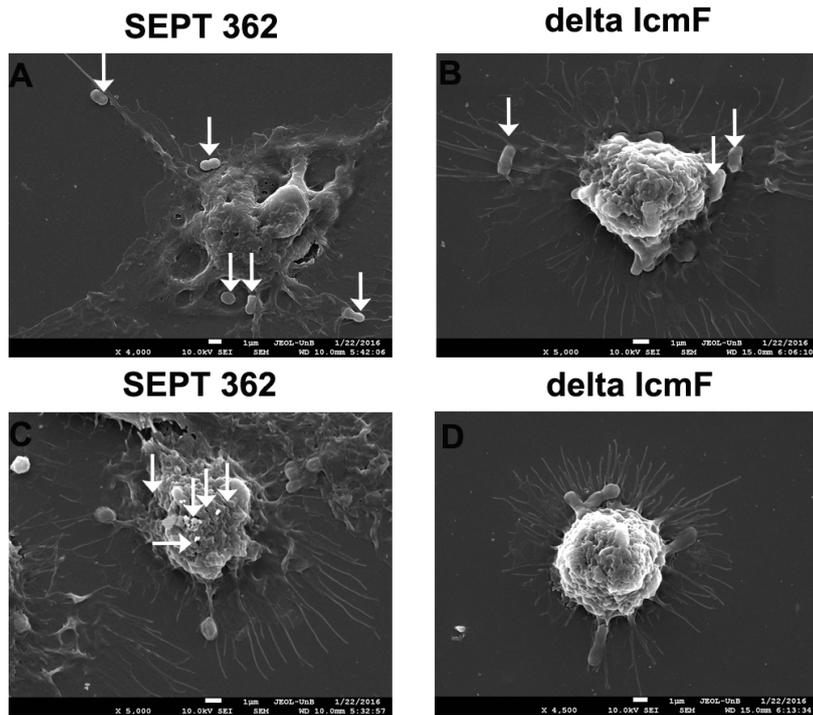


Figura 08. SST6 possui um papel crucial na adesão, internalização e viabilidade das bactérias *E. coli* no interior de macrófagos. Os macrófagos foram incubados a 37°C com as bactérias SEPT362 e delta IcmF MOI 1:10. Após 24 horas do tempo de infecção foi realizada a microscopia eletrônica de transmissão com 3500x a 5000x de ampliação da adesão diferencial da bactéria SEPT362 (A) e delta IcmF (B) e da indução de poros na membrana pelas bactérias bactéria SEPT362 (C) e delta IcmF (D) . Além da quantificação de unidade formadora de colônias (CFU) (E). As setas em (C) e (D) indicam os poros presentes na membrana. Esse ensaio é referente a duas repetições experimental sendo a análise estatística por teste t asterisco (*) representa $p < 0,1$.

6.4 SST6 participa da indução de NO e na biogênese de corpúsculo lipídicos de macrófagos infectados por *E. coli*.

Sabemos que óxido nítrico inibe o crescimento de várias bactérias e parasitas (Burgner et al,1999). Com isso, verificamos a participação do SST6 no potencial microbicida da célula. Analisamos a indução de secreção de óxido nítrico (NO) e verificamos que a bactéria SEPT362 induz o aumento da secreção de NO quando comparado ao não estimulado e a bactéria IcmF, indicando a participação do SST6 na indução da secreção de óxido nítrico (Figura 09). Além da avaliação da participação do SST6 na atividade microbicida da célula, nós investigamos também a participação do SST6 na ativação celular de macrófagos infectados por *E. coli*, através da análise da biogênese de corpúsculos lipídicos.

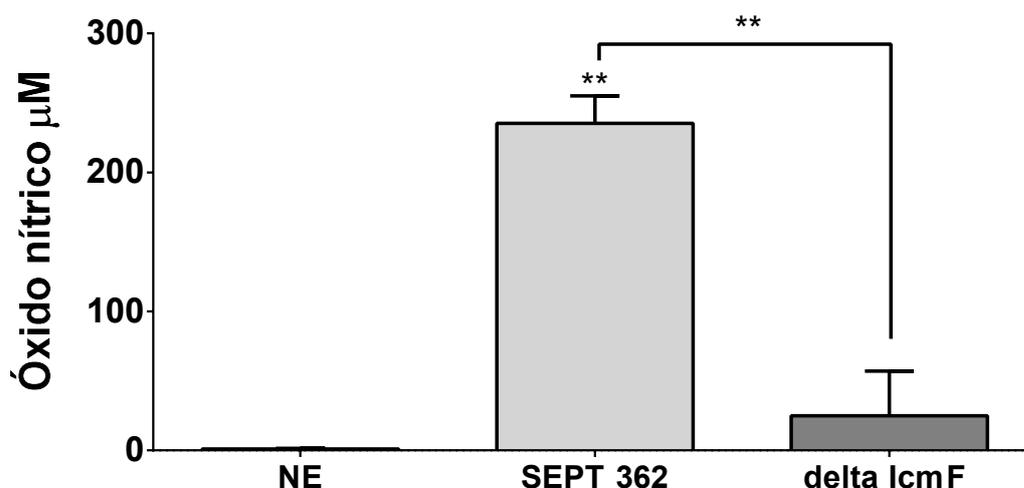


Figura 09. Análise do papel do SST6 sobre a secreção de óxido nítrico de macrófagos infectados por *E. coli*. As células BMDM foram incubados a 37°C com as bactérias SEPT 362 e delta IcmF . Após 24 horas de estímulo foi feita a coleta do sobrenadante e de óxido nítrico. Esse experimento é representativo de uma triplicata experimental. Asterisco (*) representa $p < 0.05$

Os corpúsculos lipídicos são marcadores de ativação celular e estão intrinsecamente ligados à resposta imunológica e inflamatória. Nesse sentido analisamos se o SST6 poderia participar da modulação da biogênese dessa organela. Nossos dados

mostraram que macrófagos infectados com a bactéria SEPT362 apresentaram uma maior quantidade dessa organela comparado ao não estimulado e os macrófagos infectados com delta IcmF, indicando então que o SST6 participa da indução do aumento da biogênese dessa organela celular (Figura 10).

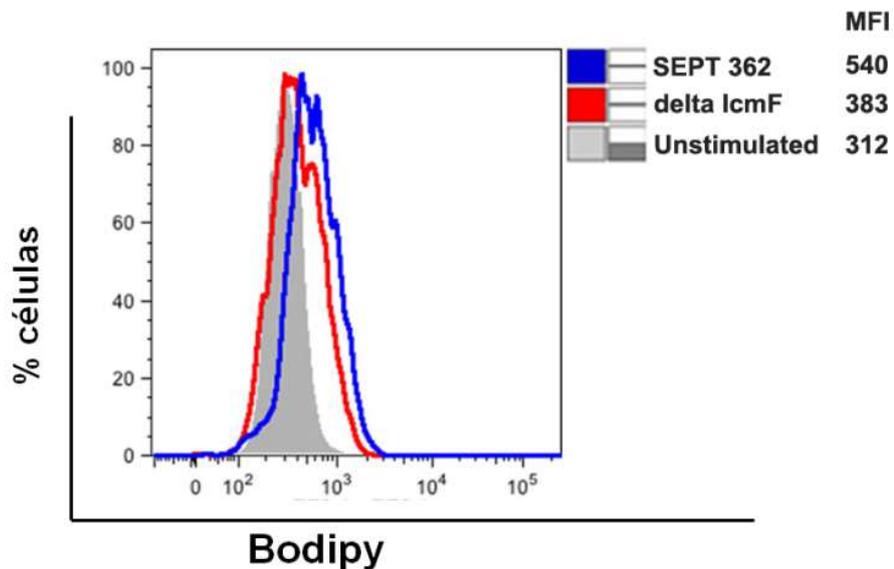


Figura 10. SST6 participa da indução da biogênese de corpúsculo lipídico em macrófagos infectados por *E.coli.* Os macrófagos foram incubados a 37°C com as bactérias SEPT362 e delta IcmF MOI 1:10. Após 24 horas do tempo de infecção foi realizada a marcação de Bodipy e posterior análise por citometria de fluxo. Esse experimento é representativo de uma duplicata experimental

6.5 SST6 participa da indução da secreção de IL-6 em macrófagos infectados por *E coli*.

Alguns artigos já mostraram a relação da organela celular corpúsculo lipídico com a secreção de citocinas (Cervia et al. 2010), apontando esta organela como sítio de síntese e armazenamento de diferentes citocinas. Foram então realizadas dosagens de citocinas do lavado peritoneal pelo método de ELISA de animais infectados com as bactérias selvagens e deficientes para IcmF durante 24h. Verificou-se que as bactérias selvagens e delta IcmF induzem a secreção das citocinas IL-10 (Figura 11A) e TNF- α (Figura 11B) de forma estatisticamente similar. Enquanto a secreção de IL-12 (Figura 11C) e IL-6 (Figura 11D) induzidas pela bactéria SEPT 362 é aumentada comparado ao não estimulado, mas não havendo diferença significativa entre a secreção induzida por delta IcmF e SEPT 362 (Figura 11). Com isso, decidimos investigar quais os fatores de transcrição que poderiam estar envolvidos nessa via.

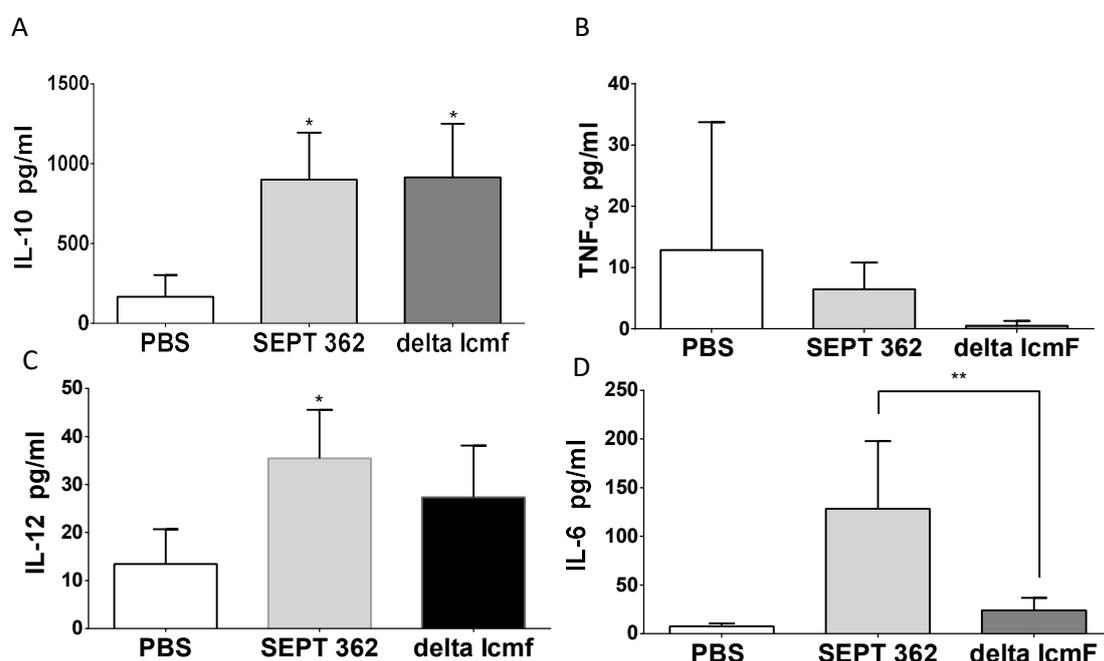


Figura 11. Análise do papel de SST6 sobre a secreção de citocinas de macrófagos infectados por *E coli*. Animais foram infectados intraperitonealmente com diferentes cepas de *E. coli* SEPT 362 e delta IcmF. Após 24 h, IL-10 (A), TNF- α (B), IL-12 (C) e IL-6(D) de lavado peritoneal foram analisados. Esse experimento é representativo de uma triplicata experimental. Asterisco (*) representa $p < 0.05$.

6.6 *E. coli* induziu a expressão do fator de transcrição PPAR γ em macrófagos de maneira dependente da presença do SST6 e não induziu a translocação de NF κ B para o núcleo de macrófagos infectados

Os dados apresentados até o momento indicam que o SST6 participa de vários processos cruciais da resposta imunológica relacionada à viabilidade celular do hospedeiro, potencial antimicrobiano e ativação celular. Então para se entender melhor os mecanismos envolvidos nessa via nós analisamos o fator de transcrição NF- κ B. Após o estímulo que pode ser derivado de patógeno, o NF- κ B ativo transloca para o núcleo e leva a produção de várias citocinas pró-inflamatórias (Inohara and Nuñez 2003; Hyldahl, Schwartz, and Clarkson 2013). Nossos dados indicaram que a infecção por SEPT362 e delta IcmF não induziram a translocação de NF- κ B para o núcleo (Figura 12). O fator de transcrição NF- κ B costuma apresentar uma ativação antagônica ao fator de transcrição PPAR γ . Com isso investigamos a expressão de PPAR γ induzida por SEPT362 e delta IcmF. Nossos resultados mostraram que macrófagos infectados com *E. coli* selvagem apresentaram um aumento da expressão de PPAR γ nos tempos de 6 horas (Figura 13B) e 18 horas (Figura 13A e 13C) pós infecção quando comparado ao não estimulado. Além disso, os macrófagos infectados pela bactéria deficiente para a proteína IcmF apresentaram níveis menores de expressão de PPAR γ quando comparados as células infectadas com a cepa selvagem desta bactéria. Estes dados sugerem que o SST6 participa da indução da expressão do fator de transcrição PPAR γ em macrófagos infectados por *E. coli*.

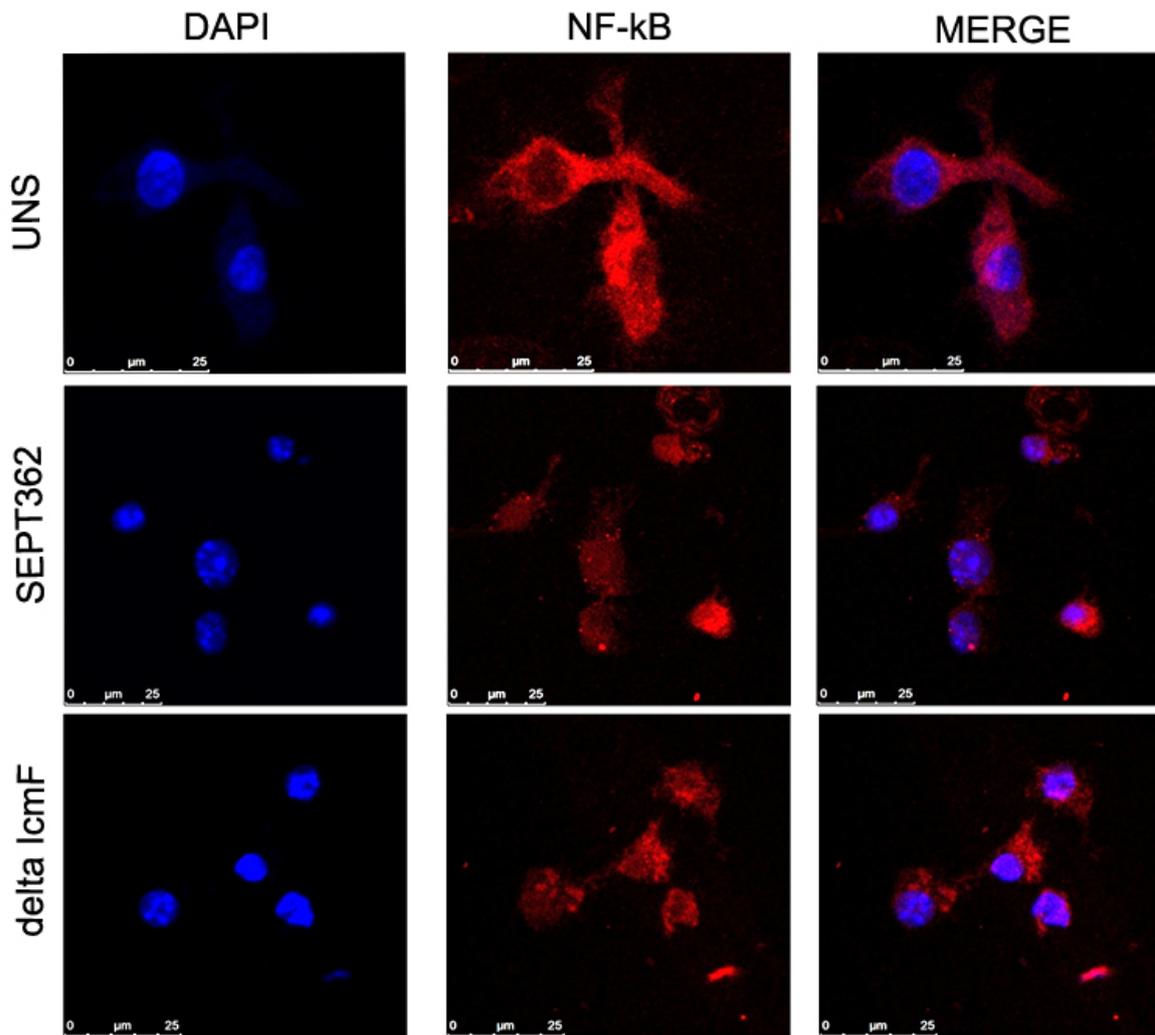


Figura 12. Análise da participação do SST6 na modulação do fator de transcrição NF-κB induzido por *E. coli* em macrófagos. As células BMDM foram incubados a 37°C com as bactérias SEPT362 e delta IcmF MOI 1:100. Após 24 horas de estímulo foi feita a marcação com DAPI e NF-κB (Alexa 546) e análise por microscopia confocal.

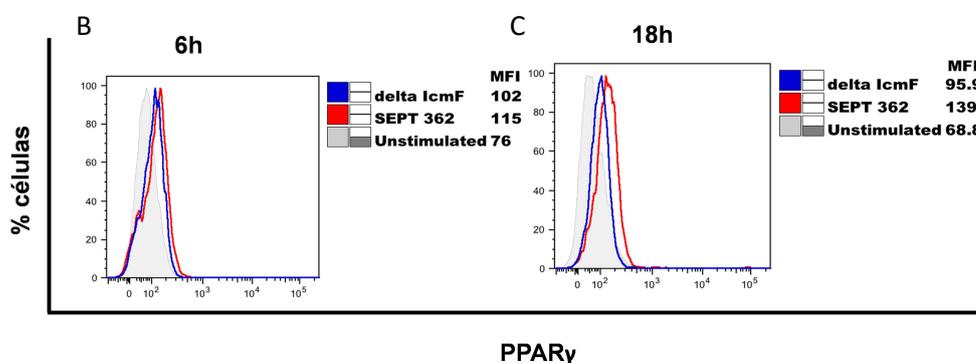
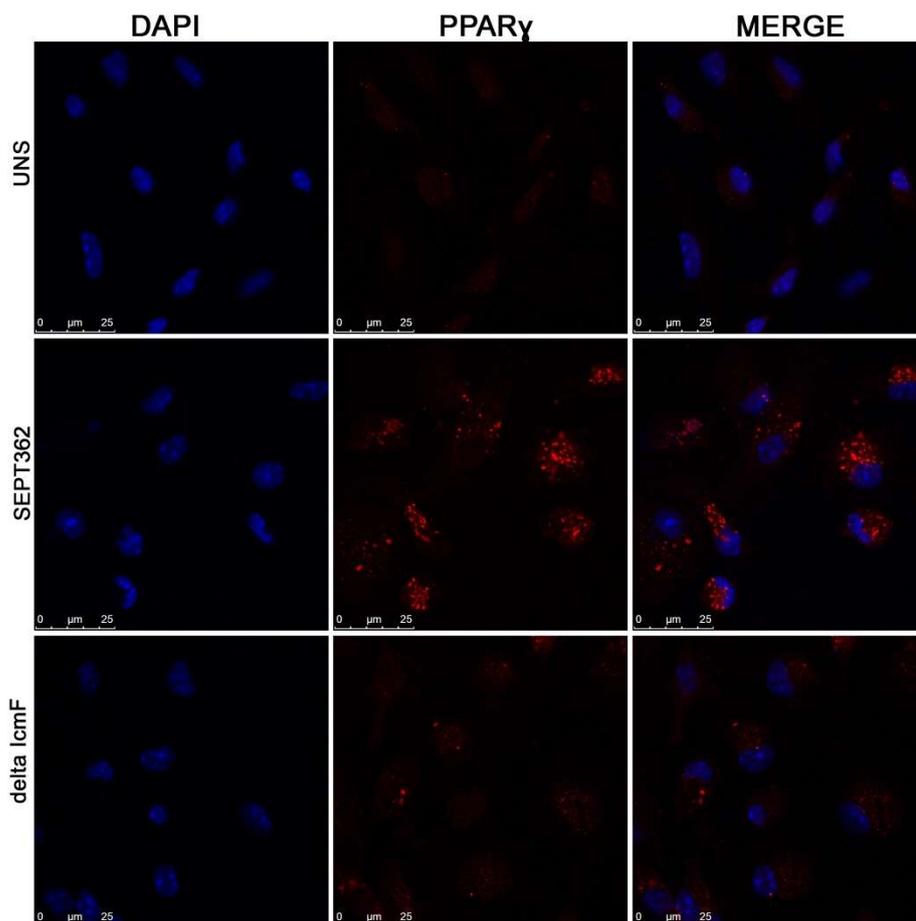


Figura 13. Análise do papel de SST6 na modulação do fator de transcrição PPAR γ em macrófagos infectados por *E coli*. As células BMDM foram incubados a 37°C com as bactérias SEPT362 e delta IcmF MOI 1:100. Após 18 horas de estímulo foi feita a marcação com DAPI e PPAR γ (Alexa 546) e análise por microscopia confocal (A); Após 6 horas e 18 horas após a infecção e a marcação de PPAR γ foi analisada para citometria (B e C). Esse experimento é representativo de uma triplicata experimental.

6.7 SST6 e a inibição de PPAR γ participam da redução de secreção de citocinas IL-6 e IL-12 em macrófagos infectados por *E. coli*.

Verificamos ainda que a inibição de PPAR γ reduz a capacidade dos macrófagos infectados com *E. coli* em secretar as citocinas IL-6 e IL-12, e não modula a secreção de TNF- α . Identificamos então que a bactéria SEPT362 induz uma maior secreção de citocinas IL-12 e IL-6 em macrófagos peritoneais sem tratamento do em células tratadas com GW 9662. Além disso, as células sem tratamento e tratadas com GW apresentaram o mesmo perfil de secreção de citocinas quando infectadas pela bactéria delta IcmF. Contudo, verificamos que macrófagos sem tratamento infectados com a bactéria SEPT362 e delta IcmF apresentam um perfil de secreção de TNF- α similar aos macrófagos tratados com GW9662 e infectados, indicando então que a secreção de TNF- α é independente de inibição de PPAR γ e do SST6 (Figura 14).

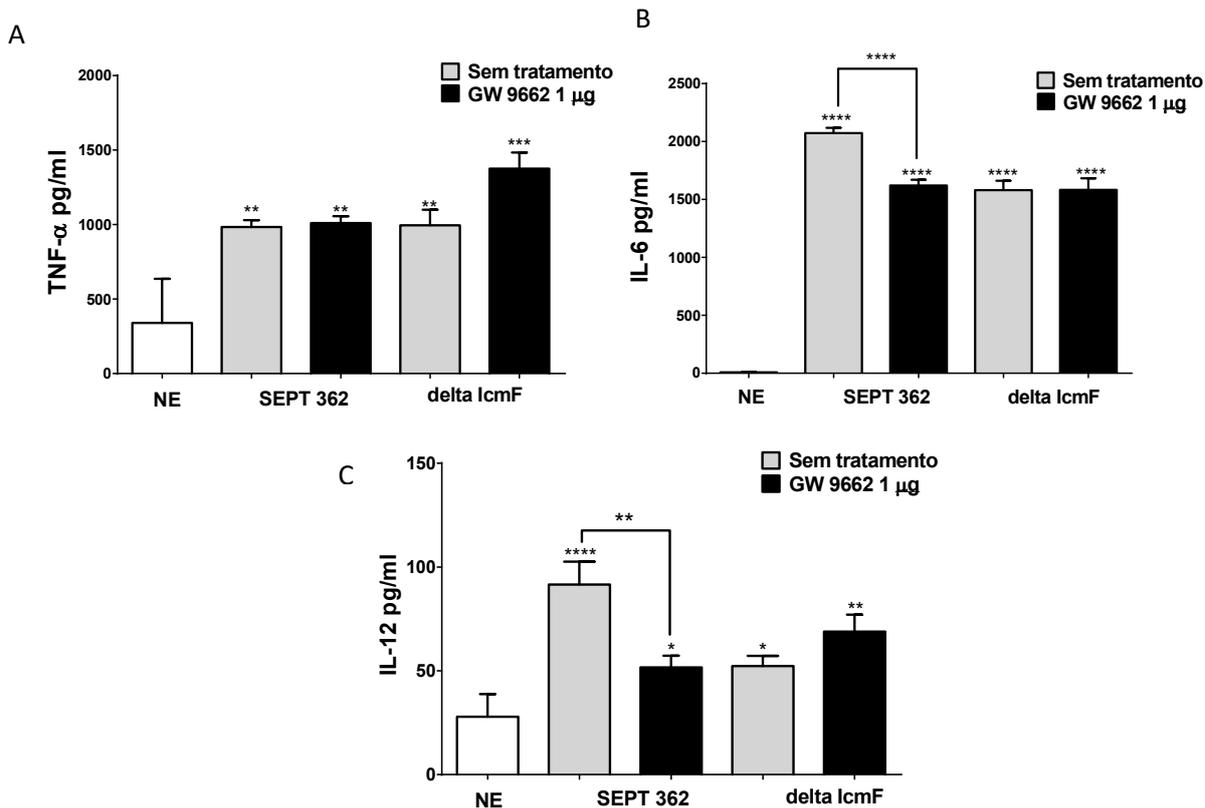


Figura 14. SST6 e a inibição de PPAR γ participam da redução de secreção de citocinas IL-6 e IL-12 em macrófagos infectados por *E. coli*. As células BMDM foram incubados a 37°C com as bactérias SEPT 362 e delta IcmF e com o inibidor GW9662 na concentração de 1μM. Após 18 horas de estímulo foi feita a coleta do sobrenadante e dosagem das citocinas TNF- α (A), IL-6 (B) e IL-12 (C). Esse experimento é representativo de uma triplicata experimental. Asterisco (*) representa $p < 0.05$.

6.8 A presença do fator de transcrição PPAR γ promove uma menor capacidade microbicida de macrófagos infectados por *E. coli*.

Para analisar o papel do fator de transcrição PPAR γ durante a infecção por *E. coli* utilizamos duas estratégias diferentes: 1) inibição farmacológica de PPAR γ com a droga GW9662 previamente à infecção com as diferentes cepas de *E. coli*; 2) indução da super-expressão do fator nuclear PPAR γ através da transfecção de macrófagos com o plasmídeo direcionado ao PPAR γ previamente à infecção com as diferentes cepas de *E. coli*. Após 24h de infecção a capacidade microbicida destes macrófagos foi analisada por CFU.

Nossos resultados mostraram que quando há inibição farmacológica de PPAR γ em macrófagos e há infecção, tanto pelas bactérias selvagens quanto pelas bactérias deficientes para a proteína IcmF, houve uma diminuição de formação de colônias quando comparada à infecção sem tratamento prévio (Figura 15A), indicando então que a ausência de PPAR γ favorece a capacidade microbicida de macrófagos frente a infecção pela bactéria *E. coli*. Além disso, observamos mais uma vez que bactérias deficientes para o SST6, através da deleção da proteína IcmF, são mais propícias a serem eliminadas e/ou serem menos internalizadas pelos macrófagos. Em contra partida, quando ocorre a super-expressão do fator nuclear PPAR γ ocorre uma diminuição da capacidade microbicida de macrófagos infectados pelas diferentes cepas de *E. coli* (Figura 15B).

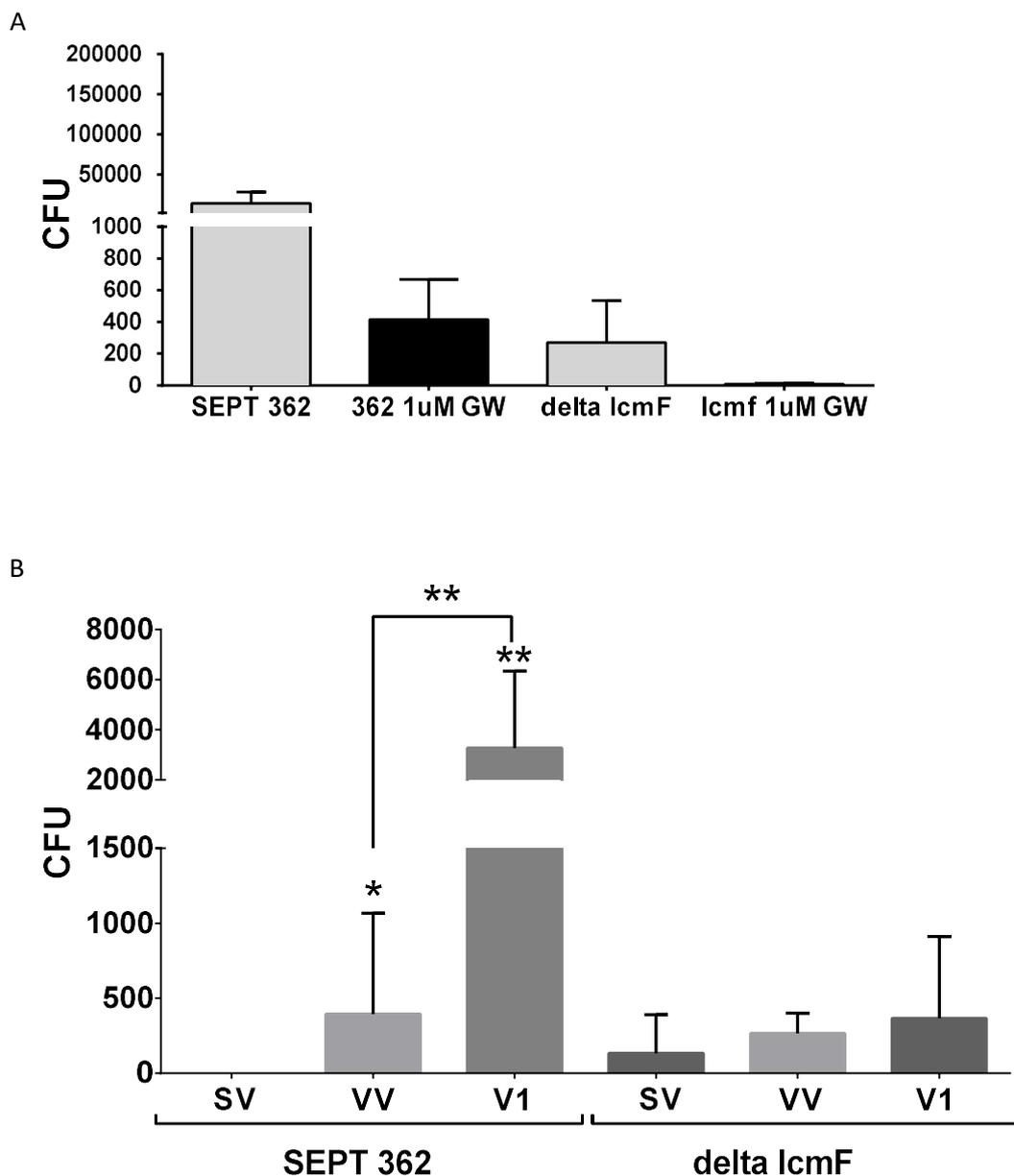


Figura 15. Análise do papel do fator nuclear PPAR γ sobre a capacidade microbicida de macrófagos infectados por *E. coli*. Células BMDM foram tratadas com 1uM do antagonista do PPAR γ por 1h (A) ou com o plasmídeo para super-expressão do PPAR γ (B) e posteriormente infectadas com as bactérias selvagens (SEPT362) e deficientes para a proteína IcmF (delta IcmF). Após 18 horas de infecção foi feita contagem da formação de colônias (CFU) nos macrófagos. (V1) transfectadas com o plasmídeo GS56450-1 pcDNA3.1(+)-seq1 (V1), o vetor vazio (VV), ou sem vetor (SV) e infectadas com as bactérias SEPT362 e delta IcmF, após 24 horas de estímulo foi feita contagem da formação de colônias (CFU) (B). Esse experimento é representativo de uma triplicata experimental. Asterisco (*) representa $p < 0.05$

6.9 SST6 participa da modulação da expressão de moléculas CD1 do grupo I e II em células infectadas com *E. coli* *in vivo* e *in vitro*.

O fator de transcrição PPAR γ está envolvido em várias vias metabólicas celulares, além de estar relacionado ao metabolismo lipídico e na regulação de moléculas CD1 (Ahmadian et al. 2013; Szatmari et al. 2006). As moléculas CD1 apresentam antígenos lipídicos que são reconhecidos por células T e NK (Roura-Mir et al. 2005). Portanto, analisamos o papel do SST6 na modulação da expressão de moléculas CD1.

Identificamos que após 24 e 48 horas de infecção em macrófagos pela bactéria SEPT362, ocorre a diminuição da expressão de moléculas CD1d comparado ao não estimulado. Além disso, verificamos ainda que macrófagos infectados pela bactéria delta IcmF no período de 24 horas, apresentam uma expressão de moléculas CD1d na superfície similar ao não estimulado, diferentemente do período de 48 horas pós-infecção onde os macrófagos apresentaram um aumento de expressão da molécula CD1 quando comparado ao não estimulado. Indicando surpreendentemente que o SST6 estaria participando também da modulação da apresentação de antígenos lipídicos *in vitro* (Figura 16A).

Para corroborar esses resultados, experimentos *in vivo* também foram realizados. Macrófagos de animais infectados com a cepa SEPT362 apresentaram uma redução da expressão de moléculas CD1d em sua superfície comparado ao animal sem infecção. Porém, macrófagos de animais infectados com a cepa delta IcmF apresentaram um perfil de maior expressão de CD1d comparado ao não estimulado e ao infectado pela *E. coli* selvagem SEPT362, sugerindo que o SST6 participa da modulação de apresentação de antígenos lipídicos (Figura 16B).

Analisamos, também, a modulação da expressão de moléculas CD1a, isoforma do grupo I encontrada em humanos mas não em camundongos, em PBMCs. Nossos resultados mostraram um perfil similar ao observado previamente na modulação da expressão de moléculas CD1d. PBMCs humanos infectados com a cepa selvagem de *E. coli* (SEPT362) apresentaram uma redução da expressão de moléculas CD1a em sua superfície quando comparados ao não estimulado. Em contrapartida, células infectadas

com a cepa delta IcmF apresentaram um aumento da expressão de moléculas CD1a em sua superfície quando comparados ao não estimulado e infectados com SEPT362.

Desta forma, estes resultados sugerem que também há participação do SST6 na modulação da apresentação de antígenos lipídicos pelas moléculas CD1a (Figura 16C). Também foram realizados testes para a verificação da modulação da apresentação de antígenos lipídicos em células dendríticas, entretanto não foi apresentado recrutamento de células dendríticas (Figura 19A).

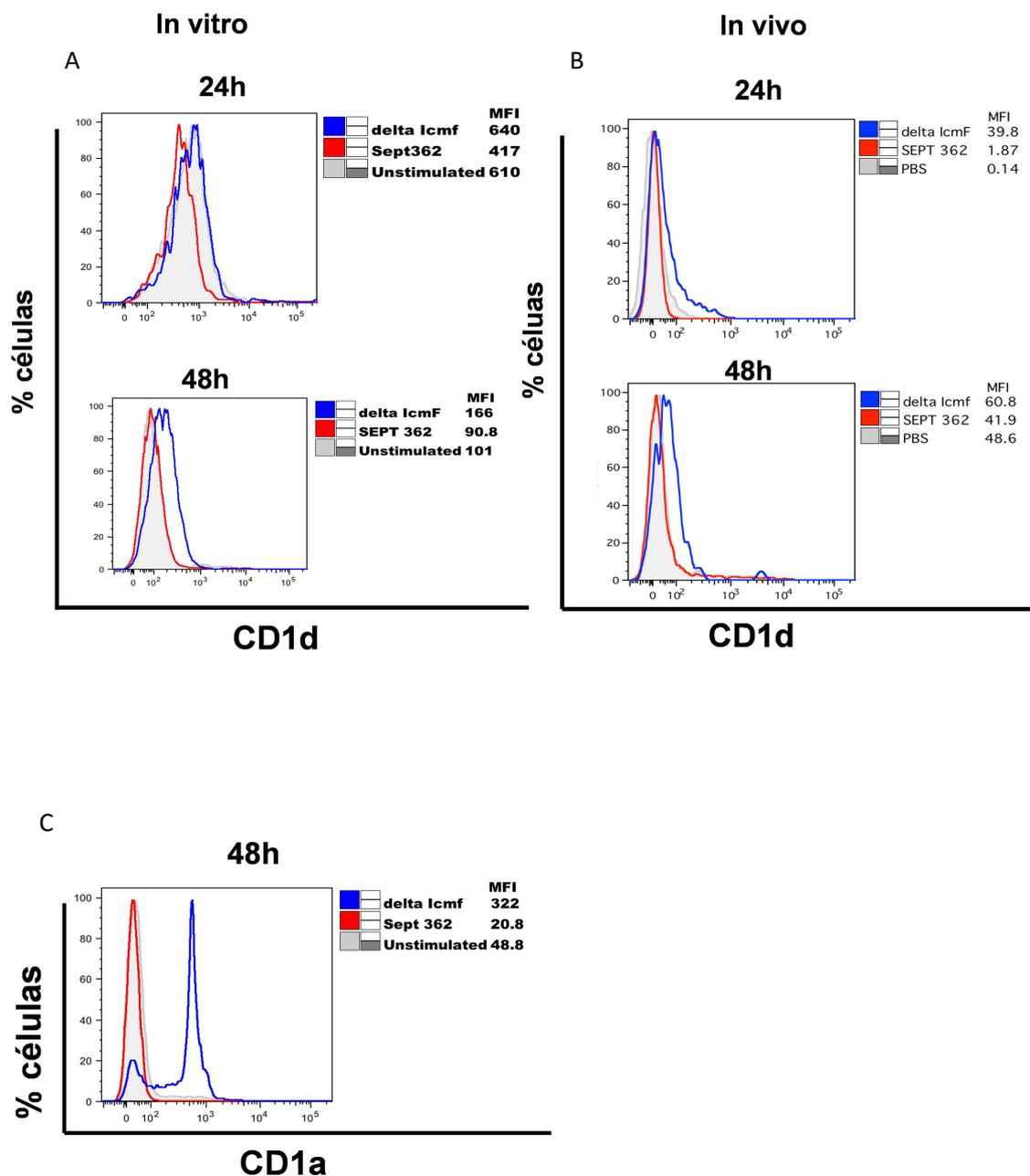


Figura 16. Análise da participação de SST6 na modulação da expressão de CD1a e CD1d em células infectadas por *E. coli*. As células PBMC e BMDM foram incubados a 37°C com as bactérias SEPT 362 e delta IcmF MOI 1:10. Após 24 horas e 48 horas de estímulo foi feita a marcação e análise das moléculas CD1d (A) em BMDM. Após 48 horas de estímulo foi feita análise de CD1a em PBMC. (C) Animais foram infectados intraperitonealmente com diferentes cepas de *E. coli* SEPT 362 e dekta IcmF .Após 24 horas e 48 horas de infecção foi realizada a marcação com CD11b e MHC II e analisadas por citometria de fluxo. Sendo os dados verificados na forma de histograma (B). Esse experimento é representativo de uma triplicata experimental.

6.10 SST6 está relacionado com a inibição da expressão de moléculas MHC II em células infectadas com *E. coli in vitro e in vivo*.

A apresentação de antígenos bacterianos pela célula hospedeira, bem como o desencadeamento da resposta inflamatória inicial são processos primordiais para que uma eficiente resposta imunológica. Alguns sistemas de secreção microbianos e seus produtos podem modular a apresentação de antígenos (Rüssmann et al. 2010; Xiao et al. 2013; Morse et al. 2012). Por esse motivo decidimos investigar o papel do SST6 na apresentação de antígenos proteicos. Para isso PBMCs isoladas de sangue periférico foram infectadas com a bactéria selvagem (SEPT362) e a bactéria deficiente para a proteína IcmF (delta IcmF), por 24 horas e 48 horas a 37°C. Após este período o nível de expressão de MHC II na superfície destas células foi quantificado por citometria de fluxo.

Os dados de 24 horas *in vitro* mostraram que a infecção pela bactéria SEPT362 e delta IcmF reduziu de forma semelhante a expressão de moléculas MHC II na superfície de PBMCs quando comparadas as células não estimuladas (Figura 17A). Porém, 48 horas pós-infecção não foi observada modulação na expressão de MHC de classe II na superfície de PBMC, onde macrófagos infectados tanto com SEPT362 quanto com delta IcmF apresentaram uma expressão semelhante de MHC II ao não estimulado (Figura 17A).

Para avaliar melhor o possível papel do SST6 na modulação da apresentação de antígenos proteicos, nós utilizamos o modelo murino para análises *in vivo*. Inicialmente, os animais foram infectados pelas bactérias SEPT362 e delta IcmF e após 24 horas e 48 horas de infecção, as células do lavado peritoneal destes animais foram coletadas e marcadas com MHC II e analisadas por citometria de fluxo. Divergentemente dos dados *in vitro*, os resultados *in vivo* indicaram que as células do lavado peritoneal dos animais infectados tiveram uma redução da expressão de moléculas MHC II quando infectados pela bactéria SEPT362 comparado ao não estimulado. Por outro lado, células do lavado peritoneal dos infectados com a bactéria delta IcmF apresentaram um aumento de moléculas MHC de classe II em sua superfície comparado ao não estimulado (Figura 17B).

Para confirmar se macrófagos seriam as células dentro do lavado peritoneal a sofrerem a modulação de expressão de moléculas MHC II observada, nós realizamos um experimento com dupla marcação CD11b e MHC II das células do lavado peritoneal dos camundongos infectados ou não pelas duas cepas de *E. coli*. Nossos resultados mostraram que os macrófagos peritoneais (CD11b+) de animais infectados com SEPT362 tem uma menor porcentagem de expressão de MHC II quando comparada ao animal sem infecção (PBS) e o animal infectado por delta IcmF (Figura 17C). Nesse contexto, denota-se a importância do SST6 na modulação da apresentação de antígenos proteicos em macrófagos no modelo *in vivo*.

Foram também realizados testes para a verificação da modulação da apresentação de antígenos peptídicos em células dendríticas, entretanto não foi apresentado recrutamento de células dendríticas ao peritônio. (Figura 19A).

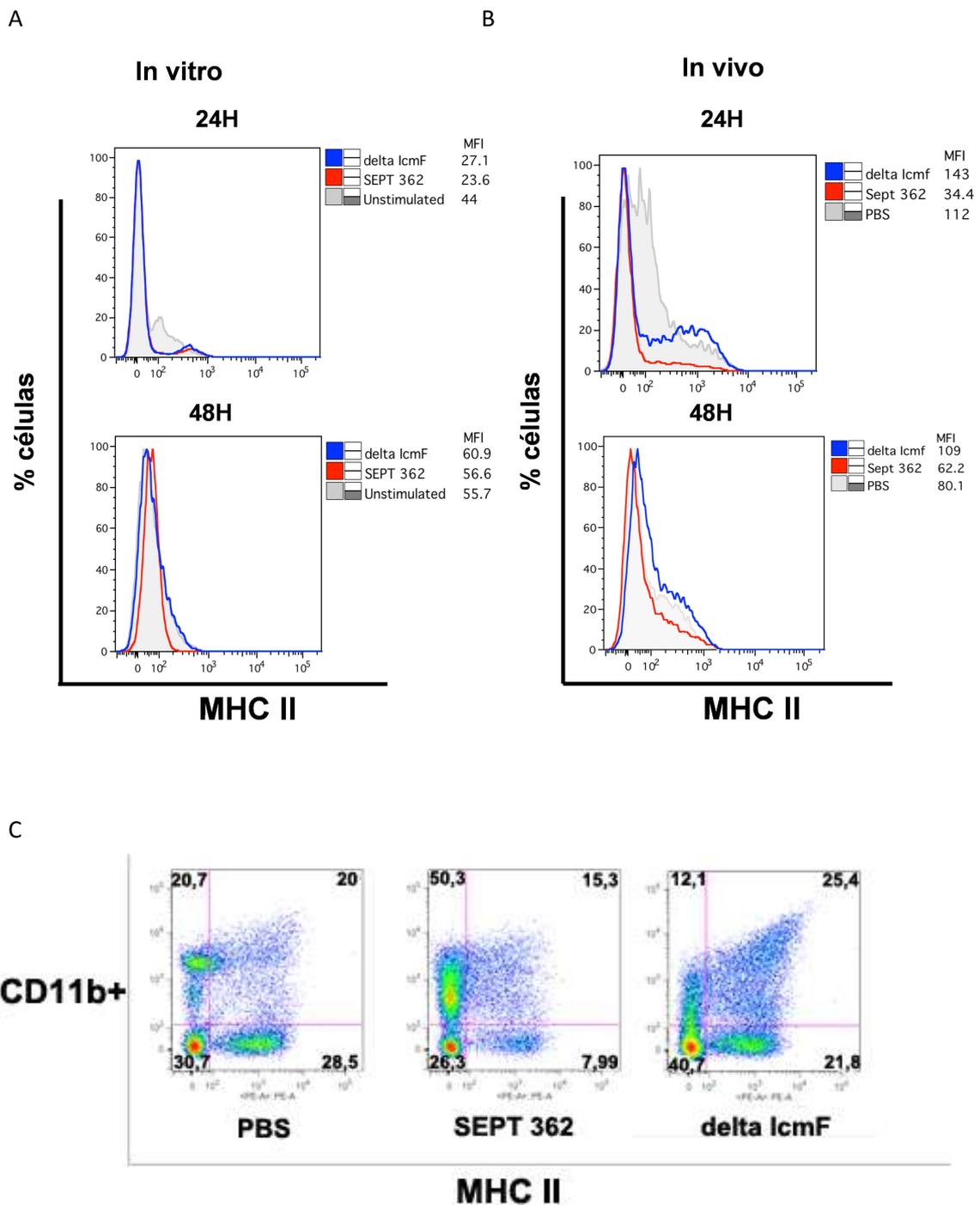


Figura 17. Análise da participação do SST6 na modulação da expressão de MHC II em células infectadas por *E. coli*. As células PBMC foram incubadas a 37°C com as bactérias SEPT 362 e delta IcmF MOI 1:10. Após 24 horas do tempo e 48 horas foi realizada a marcação e MHC II e analisado por citometria de fluxo. (A) Animais foram infectados intraperitonealmente com diferentes cepas de *E. coli* SEPT 362 e delta IcmF. Após 24 horas e 48 horas de infecção foi realizada a marcação com CD11b e MHC II e analisadas por citometria de fluxo. Sendo os dados verificados na forma de histograma (B) e dotplot (C). Esse experimento é representativo de uma triplicata experimental.

6.11 SST6 participa na modulação da expressão de moléculas co-estimulatórias CD40 e CD80 em células do lavado peritoneal *in vivo*.

Demonstramos previamente que o SST6 na infecção *in vivo* reduz a expressão de células MHC II na superfície de macrófagos. Entretanto, além do MHC ser importante para a ativação de linfócitos T é necessário a participação de moléculas co-estimulatórias. A expressão dessas moléculas em células APCs é fundamental para o desenvolvimento da resposta imunológica (Curtsinger and Mescher 2010).

Nesse contexto, analisamos o papel do SST6 na modulação de moléculas co-estimulatórias presentes na superfície de células APCs. Verificamos que após 24 de infecção intraperitoneal pelas bactérias SEPT362 e delta IcmF a expressão de moléculas CD83 (Figura 18C) e CD86 (Figura 18D) não foram moduladas pelas bactérias quando comparadas ao não estimulado. Contudo, macrófagos de animais infectados com a bactéria SEPT 362 apresentaram uma redução na expressão de moléculas CD80 (Figura 18A) e CD40 (Figura 18B) em sua superfície quando comparados aos do animal controle. Os macrófagos de animais infectados com a bactéria delta IcmF, apresentaram um comportamento diferencial, havendo então o aumento da expressão de CD40 e CD80 em sua superfície quando comparado aos macrófagos do animal controle. Os dados então sugerem que além da modulação da molécula de MHC II o SST6 participa na modulação da expressão das moléculas co-estimulatórias CD40 e CD80, podendo levar a uma posterior inibição da resposta imunológica.

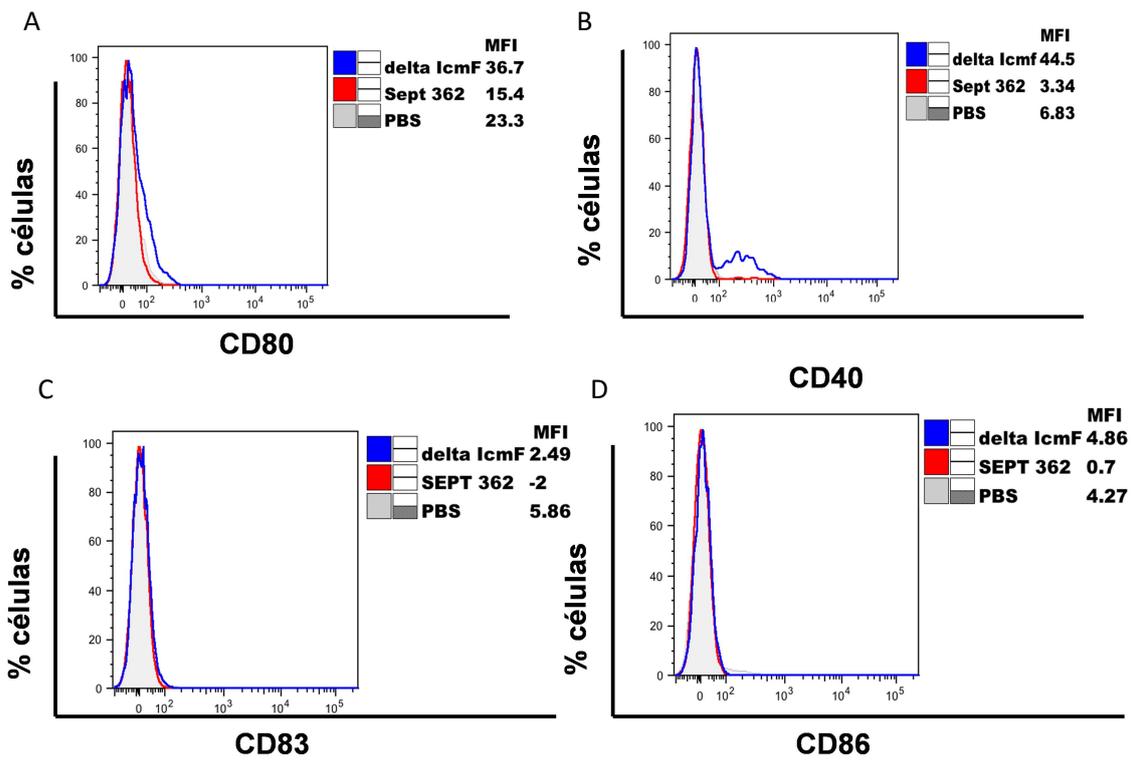


Figura 18. Análise da modulação da expressão de moléculas co-estimulatórias por SST6 de *E coli*. Animais foram infectados intraperitonealmente com diferentes cepas de *E. coli* SEPT 362 e delta IcmF. Após 24 horas de infecção foi realizada a marcação com CD11b, CD11c, CD80 (A), CD40 (B), CD83 (C) e CD86 (D) e analisadas por citometria de fluxo, sendo os dados verificados na forma de histograma.

6.12 A infecção por *E. coli* induz recrutamento de macrófagos ao peritônio de animais infectados de maneira dependente da presença do SST6.

Analisamos o recrutamento de células para o local de origem da infecção, o peritônio. Nossos dados relevam que, os animais infectados com SEPT362 após 24 horas de infecção tiveram um aumento na porcentagem de macrófagos comparado ao não estimulado. E os animais infectados com delta IcmF apresentaram uma porcentagem de macrófagos similar ao animal sem infecção. (Figura 19A).

Em contrapartida, no decorrer da infecção, no período de 48 horas os animais infectados com SEPT362 apresentam uma maior porcentagem de macrófagos comparados ao não estimulado. Concomitante a esse resultado, animais infectados com delta IcmF em 48 horas pós-infecção apresentam uma drástica redução na porcentagem de macrófagos quando comparados ao animal sem infecção. Entretanto, não houve detecção de uma população de células dendrítica para nenhum grupo experimental. (Figura 19B).

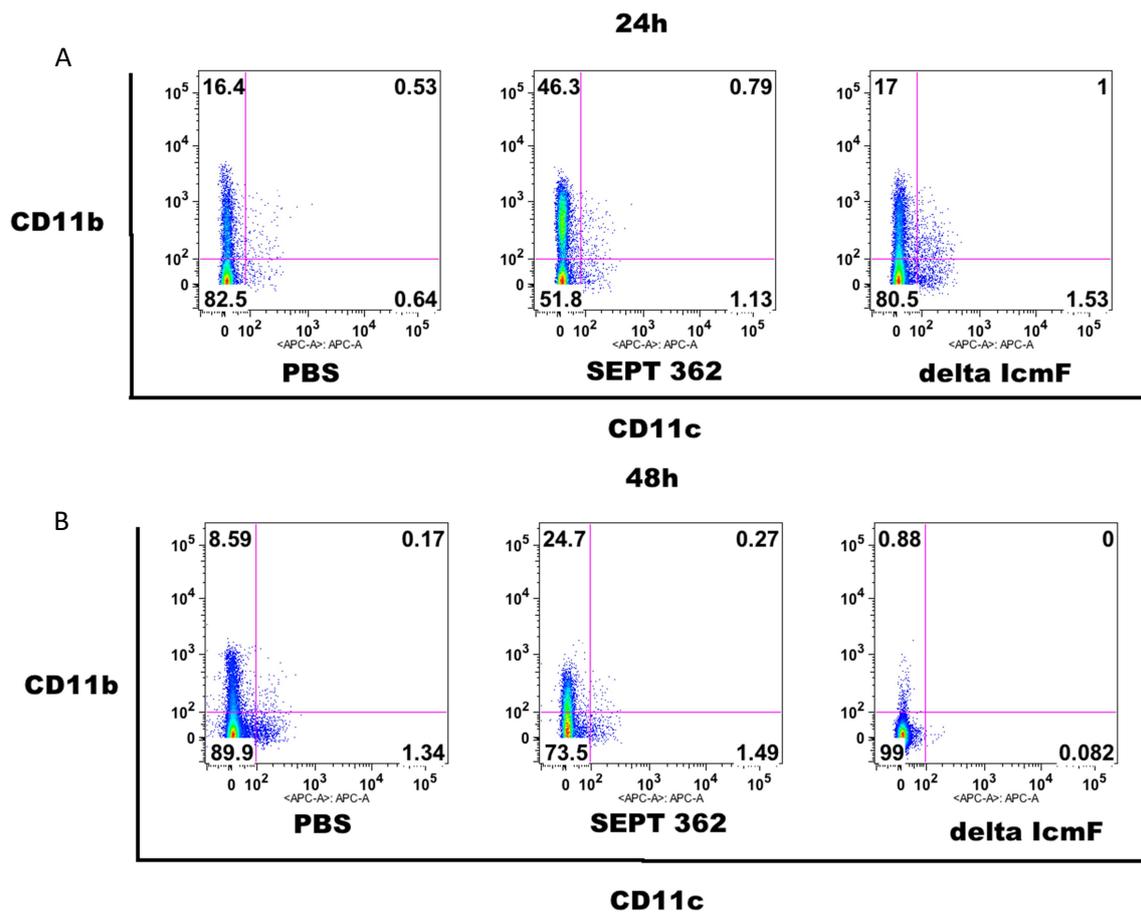


Figura 19. Análise do recrutamento de macrófagos por SST6 de *E. coli*. Animais foram infectados intraperitonealmente com diferentes cepas de *E. coli* SEPT 362 e delta IcmF. Após 24 horas (A) e 48 horas (B) de infecção foi realizada a marcação com CD11b e CD11c e analisadas por citometria de fluxo. Sendo os dados verificados na forma de dotplot. Esse experimento é representativo de uma triplicata experimental.

6.13 A infecção de animais por 72h com *E. coli* induz um aumento do tamanho do fígado e baço de maneira dependente da presença do SST6.

Além de recrutamento, verificamos o peso dos órgãos dos animais 24 horas, 48 horas e 72 horas pós-infecção. Identificamos o aumento do peso do baço e do fígado pós infecção pelas bactérias SEPT362 e delta IcmF comparado ao animal controle no período de 24 horas. No período de 48 horas de infecção não houve modificação de peso nos animais infectados com as bactérias SEPT362 e delta IcmF comparando com o grupo de animais sem infecção. Entretanto, no período de 72 horas houve redução do peso do baço de animais infectados com delta IcmF quando comparados aos infectados com SEPT362 e os animais sem infecção. Nesse mesmo tempo de infecção houve aumento do peso do fígado de animais infectos com SEPT362 quando comparados ao peso do fígado dos animais infectados com delta IcmF e dos animais sem infecção (Figura 20).

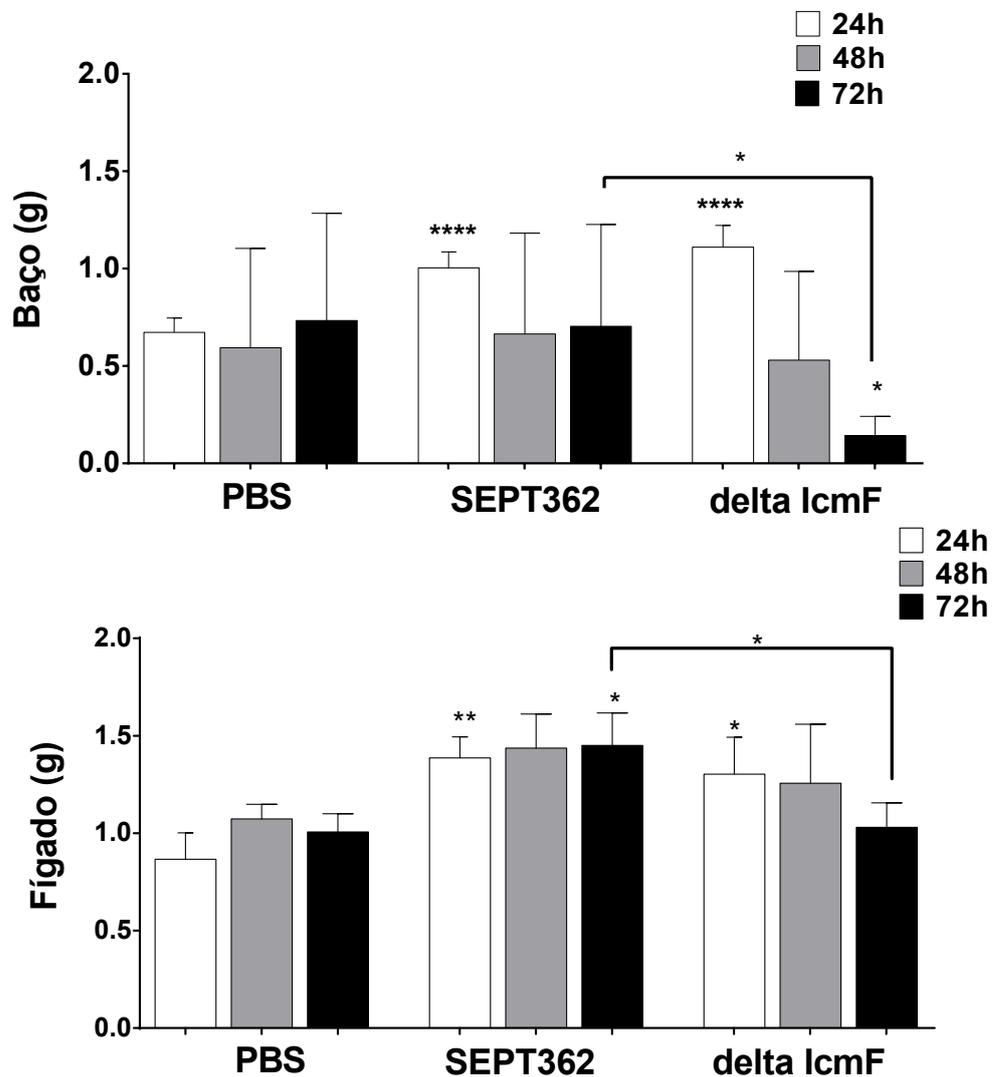


Figura 20. Análise da modulação do peso dos órgão induzida por SST6 de *E. coli*. A raias foram infectados intraperitonealmente com diferentes cepas de *E. coli* SEPT362 e delta IcmF. Após 24 horas (A, B) , 48 horas (C, D) e 72 horas (E, F) foi feita a pesagem do fígado e do baço . Esse experimento é representativo de uma triplicata experimental. Asterisco (*) representa $p < 0.05$.

6.14 SST6 participa da migração de *E. coli* para o fígado de animais infectados

Os nossos dados mostrados até agora indicam que a participação do SST6 de alguma forma influencia o peso do fígado e do baço. Para verificar a presença e viabilidade de bactérias no fígado dos animais infectados, foi realizado o CFU desses órgãos após 24 horas de infecção com as bactérias SEPT362 e delta IcmF em que as células hepáticas foram lisadas e as colônias formadas (CFU) pelas bactérias foram quantificadas.

Verificamos a presença de um número maior de bactérias selvagens no fígado em relação ao observado com as bactérias delta IcmF (Figura 21A). Além disso, não observamos diferença significativa quanto ao número de bactérias quando comparado a selvagem e a bactéria delta IcmF (Figura 21 B). Isso sugere que as bactérias selvagens poderiam possuir maior capacidade de migração para o fígado ou estariam menos propícias a serem eliminadas pelos mecanismos microbicidas do hospedeiro.

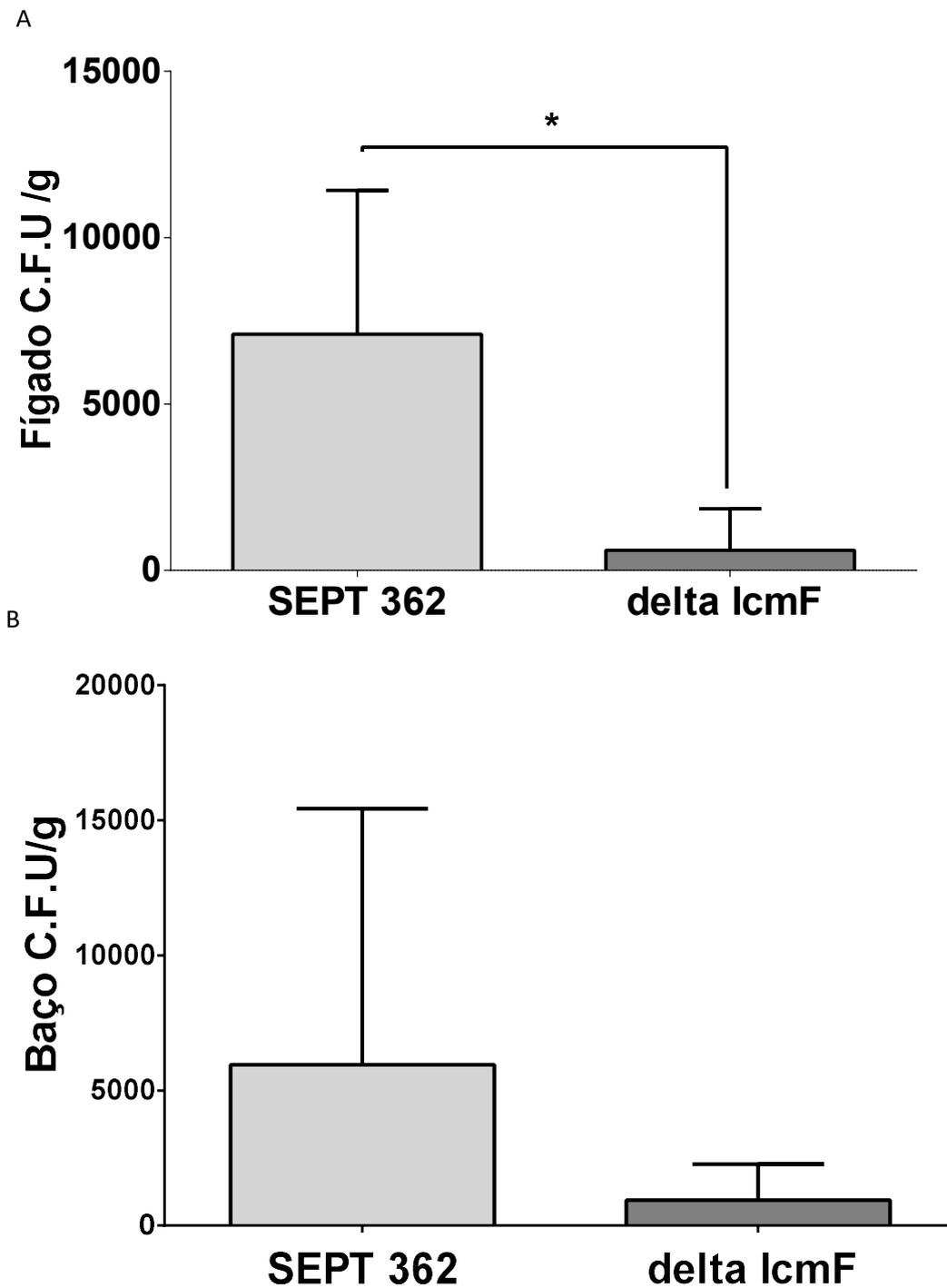


Figura 21. Análise do papel do SST6 na migração e viabilidade de *E. coli* para o fígado de animais infectados. Animais foram infectados intraperitonealmente com diferentes cepas de *E. coli* SEPT362 e delta lcmF Após 24 foi feito CFU do fígado. Esse experimento é representativo de uma duplicata experimental. Asterisco (*) representa $p < 0.05$.

7- DISCUSSÃO

Neste trabalho visamos caracterizar o papel do SST6 de *E. coli* na modulação da resposta inflamatória e imunológica inata de células de mamíferos. Descrevemos aqui pela primeira vez diferentes mecanismos pelos quais o SST6 da bactéria *E. coli* pode ser usado com um dos fatores de virulência bacteriano e mecanismo de escape desta bactéria patogênica, em infecções de células imunológicas de mamífero. A cepa SEPT362 da *E. coli* foi escolhida neste trabalho como modelo, por apresentar apenas o SST6 como sistema de secreção. Entre as proteínas constituintes do SST6, destaca-se a proteína IcmF. Pace e colaboradores (2010, 2011) demonstraram um importante papel de IcmF na motilidade bacteriana, na aderência e invasão em células HeLa, bem como na capacidade de formar biofilme. Portanto, a proteína IcmF deve possuir significativo papel na patogênese induzida durante a infecção por *E. coli*. Adicionalmente, dentre as proteínas constituintes do SST6, somente a ausência da proteína IcmF é capaz de desativar funcionalmente este sistema de secreção. Desta forma, o uso da cepa delta IcmF de *E. coli* se apresenta com um modelo de excelência para o estudo da função do SST6 bacteriano.

Inicialmente, verificamos a capacidade citotóxica do SST6 de *E. coli* em macrófagos. Em experimentos *in vitro*, identificamos que a infecção por *E. coli* induziu redução da viabilidade celular de macrófagos, e observamos que o SST6 exerce um papel crucial nesse processo. Estes dados estão de acordo com o observado por Suarez e colaboradores (2010) que identificaram que a proteína estrutural do SST6, VgrG1, induz toxicidade na célula do hospedeiro eucariótico. De maneira semelhante, Montaner e colaboradores (2000) descreveram que, os produtos secretados pelos sistemas de secreção, possuem a capacidade de induzir morte celular por apoptose. Nesse contexto, buscamos ainda verificar se os produtos da composição e secreção bacteriana através do SST6 poderiam ser os indutores de citotoxicidade celular em célula eucariótica. Identificamos que esses produtos não exerceram modulação na viabilidade celular de macrófagos, indicando a necessidade de mais estudos nessa área para o entendimento dos produtos do SST6 na citotoxicidade das células do hospedeiro.

No presente trabalho identificamos que SST6 exerce um papel crucial na adesão e internalização das bactérias *E. coli* em macrófagos. Este dado corrobora o descrito por Pace e colaboradores (2011) que demonstraram que proteína IcmF do SST6 é necessária

para que ocorra aderência de *E. coli* à superfície de células epiteliais HeLa. Suarez (2010) e Liu (2015) e colaboradores demonstraram que proteínas Hcp e ClpV, componentes importantes do SST6, estariam participando na aderência do patógeno à célula hospedeira (Giovanni Suarez et al. 2010; Liu et al. 2015). Sendo assim, nossos dados ressaltam a importância do SST6 na adesão e internalização de *E. coli* em macrófagos murinos peritoneais, corroborando com o demonstrado na literatura.

Além da adesão do patógeno ser crucial, o processo de fagocitose é um fator importante para o desenvolvimento da resposta imune inata e adaptativa do hospedeiro. (Henneke & Golenbock 2004). No entanto, vários patógenos têm desenvolvido diferentes mecanismos de escape que incluem: a manipulação do tráfico do fagossomo alteração da antigenicidade de moléculas de superfície para evitar a fagocitose (Dramsí & Cossart 2002; Seifert 1996). Nesse sentido, decidimos avaliar outro importante mecanismo que é a viabilidade de *E. coli* no interior de macrófagos. Caracterizamos a participação do SST6 nesse processo e verificamos que a deleção da proteína IcmF está intimamente relacionada a viabilidade da bactéria *E. coli* no interior de macrófagos. de maneira similar, Zink (2002) e Purcell (1998) e colaboradores demonstraram com outro patógeno, a *Legionella pneumophila*, que a proteína IcmF é essencial para a fagocitose, a replicação da bactéria em macrófagos, e a inibição da fusão fagossomo-lisossomo. Ademais, foi demonstrado que bactérias com deleção para vasH e vasK são facilmente fagocitadas quando comparadas a bactéria selvagem, demonstrando um papel importante do SST6 no processo de fagocitose (Giovanni Suarez et al. 2010). Nesse contexto, acreditamos que o SST6 possa estar participando da inibição da fusão fagolisossomo, promovendo o escape da fagocitose e o estabelecimento do patógeno no interior da célula hospedeira mediado pela proteína IcmF.

Kwuan e colaboradores (2013) demonstraram o impacto da formação de poros na membrana de macrófagos causados pelo SST3 em infecção por *Yesinia pseudotuberculosis*. No presente trabalho, demonstramos a participação do SST6, mediado pela presença da proteína IcmF, na formação de poros na membrana de macrófagos. Esses trabalhos ilustram a importância dos sistemas de secreção na permeabilidade da membrana da célula do hospedeiro. Além disso, foi demonstrado que substratos efetores secretados por sistemas de secreção, como a hemolisina A, podem proporcionar o mesmo fenômeno de permeabilidade na membrana em macrófagos.

(Menestrina et al. 1996). O que demonstra mais uma vez a ação que os sistemas de secreção tem para o desenvolvimento da patogênese.

Sabe-se ,ainda que, produtos microbianos podem a levar ativação de macrófagos desencadeando a ativação de genes envolvidos na produção de citocinas e o desenvolvimento de uma capacidade microbicida celular baseada na secreção de óxido nítrico (NO). Nesse sentido, verificamos que SST6 participa da indução da secreção de NO e da citocina IL-6. A citocina IL-6 é um importante modulador da resposta imunológica, a qual apresenta uma função dual na indução de citocinas Th1 e também Th2, inibindo a produção de IFN γ e aumentando a produção da citocina IL-10 pela indução de SOCS (Jin,et al 2013; Dong et al. 2009; Diehl & Rincón 2002).

Corroborando com os dados de Brauner (2001) e colaboradores, em que foi demonstrado que *E. coli* induz a secreção de IL-6, identificamos que a bactéria selvagem SEPT362 induz altos níveis de citocina IL-6 na cavidade peritoneal de camundongos. Além disso, descrevemos que SST6 participa desse processo, uma vez que a bactéria deletada para a proteína IcmF induziu níveis significativamente menores de IL-6. Também caracterizamos que *E. coli* da cepa SEPT362 induz significantes níveis da citocina anti-inflamatória IL-10, dado que corrobora o já descrito por Hessle e colaboradores (2000). Contudo, descrevemos no presente trabalho que a secreção de IL-10 induzida por *E. coli* não é mediada pelo SST6 Hessle e colaboradores (2000) destacaram ainda que a produção de IL-10 pelo sistema imune inato em infecção por *E. coli* pode levar a uma inibição da geração da resposta imune adaptativa, inibindo a secreção de IFN γ , geração de memória imunológica e proliferação de linfócitos T. Estes dados indicam que a indução da citocina IL-10 pela bactéria *E. coli* pode ser mais um mecanismo de escape ao promover uma desativação da resposta imune adaptativa do hospedeiro.

Para melhor entender os mecanismos celulares que estão associados à patogênese pelo SST6, analisamos o fator de transcrição NF-kB que exerce um fator central na resposta do hospedeiro a agentes infecciosos (Rahman & McFadden 2011). Esse fator de transcrição está relacionado à transcrição de vários genes relacionados a apoptose, proliferação, migração, inflamação e várias citocinas (Baeuerle & Henkel 1994). Savkovic e colaboradores (1997) demonstraram que *E. coli* enteropatogênica consegue induzir a ativação de NF-kB no epitélio intestinal. Vossenkämper e

colaboradores (2010) mostraram que o sistema de secreção tipo 3 (SST3) e seu efetor, a proteína NleE, inibem a ativação de NF- κ B e a produção de citocinas IL-8, IL-6 e TNF- α , indicando que o T3SS utiliza da injeção de substratos efetores para inibir importantes fatores da imunidade do hospedeiro. Contudo, diferentemente da ação do SST3, nossos dados indicam que o SST6 através da função da proteína IcmF, não modula a ativação do fator de transcrição NF- κ B.

Verificamos também que, a infecção por *E. coli* induziu o aumento da expressão de PPAR γ , corroborando com alguns dados da literatura que demonstram que outras bactérias também induzem o aumento da expressão dessa molécula (Mahajan et al. 2012; Almeida et al. 2012). Neste trabalho, demonstramos que o SST6 participa da indução do aumento da expressão de PPAR γ em macrófagos. Adicionalmente verificamos que a presença de PPAR γ diminui a capacidade microbicida de macrófagos durante a infecção por *E. coli*. Similarmente, a super-expressão de PPAR γ promove um aumento na capacidade microbicida destas células. Portanto, no presente trabalho demonstramos, pela primeira vez na literatura, a relação entre o fator nuclear PPAR γ em macrófagos com um sistema de secreção bacteriano, e propomos um importante mecanismo de escape de *E. coli*, uma vez que esta bactéria induz o aumento da expressão de PPAR γ , o que conseqüentemente leva a uma diminuição da capacidade microbicida de macrófagos. Interessantemente, a modulação da capacidade microbicida do macrófago durante a infecção por *E. coli* parece não ser mediada pela produção de NO e seu mecanismo precisa ser mais profundamente investigado. Estes dados estão de acordo com os achados de Philipson e colaboradores (2013) que demonstraram que o PPAR γ favorece o estabelecimento de *E. coli* enteroagregativa no hospedeiro, sendo proposto até mesmo o seu bloqueio de PPAR γ como novo alvo terapêutico para o combate da infecção.

O PPAR γ é uma molécula que exerce controle no metabolismo lipídico e consegue de forma indireta modificar o fenótipo da resposta imunológica, estando relacionado com uma potencial atividade anti-inflamatória (Smith 2002; Martin 2010; Clark 2002). Além disso, a expressão de PPAR γ está intrinsecamente associada a biogênese de corpúsculo lipídicos que é uma organela marcadora de ativação celular (Ahmadian et al. 2013; Melo et al. 2011). Essa organela está relacionada a diversos processos inflamatórios. E também vários patógenos podem interagir com essa

organela. (Luo, et al. 2005), e utilizá-la com um dos mecanismos de obtenção de energia através da captação de nutrientes ou de modulação da resposta inflamatória da célula hospedeira. Neste trabalho, nós descrevemos que a bactéria SEPT362 é capaz de induzir significativamente a biogênese dos corpúsculos lipídicos e que o SST6 participa dessa indução através da proteína IcmF ou SST6 íntegro. Portanto demonstramos pela primeira vez a participação do SST6 e da proteína IcmF na biogênese de corpúsculo lipídico durante a infecção pela bactéria *E. coli*, e propomos que esta organela possa constituir mais um importante mecanismo de favorecimento da permanência da *E. coli* no interior da célula hospedeira.

O reconhecimento antigênico é um fator muito importante para o desenvolvimento da resposta imunológica frente à infecções. Alguns patógenos utilizam da redução da expressão das moléculas apresentadoras de antígenos para evadir a imunovigilância de linfócitos TCD4+ e TCD8+, promovendo assim uma infecção crônica (Tobian et al. 2003; Antoniou & Powis 2008).

A molécula CD1 é responsável por apresentar antígenos lipídicos a linfócitos TCD8+ e células NK para desenvolver a resposta imunológica do tipo citotóxica. Estas moléculas são agrupadas em 2 grupos distintos: as isoformas do grupo I (CD1a, CD1b, CD1c, CD1e) e do grupo II (CD1d). Cada isoforma apresenta uma montagem diferente no endossomo, o que garante a oportunidade de apresentação de antígenos lipídicos microbianos.

As moléculas CD1 também participam de importantes fenômenos da resposta imunológica. Kassianos e colaboradores (2012) identificaram que células dendríticas CD1c+ ativadas por *E. coli* suprimem a proliferação de linfócitos T pela secreção de IL-10. De Libero e colaboradores (2005) demonstraram que *E. coli* induz aumento da síntese de lipídeos próprios em células APCs que adquirem a capacidade de estimular células T pela apresentação de glicolipídeos próprios via CD1, indicando então que este auto-reconhecimento induzido por *E. coli*, via CD1, leva a eficiente estimulação de linfócitos T reativos, o que pode contribuir para repostas auto-ímmunes.

Portanto a participação da molécula CD1 na infecção por *E. coli* é de extrema importância. Nesse aspecto, verificamos que a infecção por *E. coli* induziu a redução da expressão de moléculas CD1a e CD1d na superfície celular de monócitos e macrófagos, respectivamente, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Adicionalmente, nossos dados

demonstraram que o SST6 participa dessa redução. Sabemos que vários patógenos conseguem modular a apresentação de antígenos lipídicos pela molécula CD1 (Stenger, et al 1998; Roura-Mir et al. 2005; Lang & Glatman-Freedman 2006). Entretanto é a primeira vez que se demonstra que o SST6 atua na modulação negativa da apresentação de antígenos lipídicos durante a infecção por *E. coli*. Portanto, acreditamos que por esse mecanismo a *E. coli* possa estar evadindo a resposta imune adaptativa, tendo em vista que a redução da expressão de moléculas CD1 levará a uma possível diminuição da ativação de linfócitos TCD8+, células NK e o desenvolvimento de uma reposta citotóxica. Entretanto para essas conclusões são necessários mais estudos que elucidem melhor o papel do SST6 durante a resposta imunológica adaptativa.

Na busca por entendermos o papel do SST6 na imunidade inata, investigamos a expressão de moléculas apresentadoras de peptídeos – MHC II. Figueira e colaboradores (2013) identificaram que uma cepa de *Salmonella enterica* via T3SS entrega antígenos peptídicos à molécula MHC I para a ativação de linfócitos T. Também foi demonstrado que em infecções por *E. coli* ocorre a apresentação de antígenos peptídicos via MHC II de produtos produzidos pelo patógeno (Altman, et al 1993). Além disso, componentes do T4SS de VirB2, VirB7, VirB11, e VirD4 de *Anaplasma marginale* geram imunogenicidade mediada pela MHC II (Sutten et al. 2010). Assim, investigamos o papel do SST6 na modulação da expressão de apresentação de antígenos peptídicos via MHC II. Neste trabalho, identificamos que a infecção por *E. coli* induziu a redução da expressão de molécula MHC II na superfície celular de macrófagos *in vivo*. Nossos dados demonstraram que o SST6 participa dessa redução, sendo um dado inédito, mostrando a participação do SST6 na modulação da apresentação de antígenos peptídicos e lipídicos durante a infecção por *E. coli*. Tendo em vista que a redução da expressão de moléculas MHC II levará a uma possível diminuição da ativação de linfócitos TCD4+, este pode ser mais um mecanismo de escape da bactéria *E. coli* ao infectar macrófagos. Entretanto, são também necessários mais estudos que elucidem melhor o papel do SST6 durante a resposta imunológica adaptativa.

Para uma ativação ideal de linfócitos T naive é necessário o sinal de ligação de moléculas co-estimulatórias além da ligação de moléculas MHC ou CD1 ao TCR. A expressão de moléculas co-estimulatórias na superfície de células APCs um fator crucial para o desenvolvimento de uma resposta imunológica. (Khan et al. 2012). Muitos

patógenos utilizam da modulação da expressão de moléculas co-estimulatórias para o estabelecimento de infecções crônicas como observado em infecções por *Mycobacterium tuberculosis* (Bonato et al. 2001; Schreiber et al. 2010). Produtos bacterianos também podem modular a expressão de moléculas co-estimulatórias como é o caso da enterotoxina termo lábil de *E. coli*, a qual promove a expressão de CD80 e CD86 na superfície de células dendríticas (Brereton et al. 2011). Similarmente, Lipopolisacarídeo (LPS) bacteriano pode induzir a expressão de genes de CD40 em macrófagos (Qin et al. 2005). No presente trabalho, identificamos que *E. coli* inibe a expressão de moléculas CD40 e CD80 na superfície de macrófagos, de maneira dependente do SST6, o que conseqüentemente prejudicará a apresentação antigênica de peptídeos de *E. coli* aos linfócitos T. Portanto, este parece ser mais um mecanismo de escape imunológico que pode estar sendo mediado pelo SST6 de *E. coli*.

A interferência na inibição da expressão dessas moléculas é extremamente prejudicial ao hospedeiro. A interação da molécula CD40 de células APCs com seu ligante CD40L de linfócitos T resulta em uma eficiente produção de citocina IL-12 e uma incrível regulação positiva de outras moléculas co-estimulatórias (Cella et al. 1996). Além disso, a ligação da molécula co-estimulatória CD80 ao receptor CD28 de linfócitos T é essencial para a prevenção da apoptose em células T (Orabona et al. 2004; Boise et al. 2010). Essa importante atuação do SST6 na imunidade do hospedeiro na modulação de moléculas co-estimulatórias, nunca havia sido demonstrada na literatura, indicando então a importância desse sistema de secreção no processo de patogênese.

SST6 pode, então, estar modulando o tráfego vesicular intracelular, acidificação e formação de endossomos nas células do hospedeiro, inviabilizando a montagem da molécula MHCII, CD1 e as co-estimulatórias, e inibindo sua exposição na superfície celular. Este é um mecanismo similar ao desenvolvido por *Mycobactéria* que reduz a acidez do endossomo pela retirada da ATPase H⁺, e altera a sua composição proteica para viabilizar a sua sobrevivência (Sturgill-Koszycki et al. 1994; Ferrari et al. 1999). Entretanto, mais estudos precisam ser realizados para melhor elucidar este mecanismo.

O recrutamento de células da imunidade ao local da injúria pelo patógeno é um importante mecanismo da resposta imunológica. Abtin e colaboradores (2014) demonstraram que o recrutamento de neutrófilos na infecção por *Staphylococcus aureus* é mediado por macrófagos perivascular. Balamayooran e colaboradores (2011)

identificaram a quimiocina MCP-1 como importante molécula para defesa pulmonar do hospedeiro através do recrutamento de leucócitos na infecção por *E. coli*. Além disso, LPS de bactéria gram-negativa modula o recrutamento e polarização de células da imunidade inata (Chakraborty et al. 2015). Assim, fomos investigar se o SST6 poderia estar participando no recrutamento de macrófagos ao local inicial da infecção. Verificamos que a bactéria *E. coli* induz o recrutamento de macrófagos e que o SST6 participa significativamente deste processo, tendo em vista que a bactéria deletada para a proteína IcmF quase não apresentou recrutamento de macrófagos. Pouco havia sido descrito na literatura sobre o papel de sistemas de secreção sobre o recrutamento de células imunológicas.

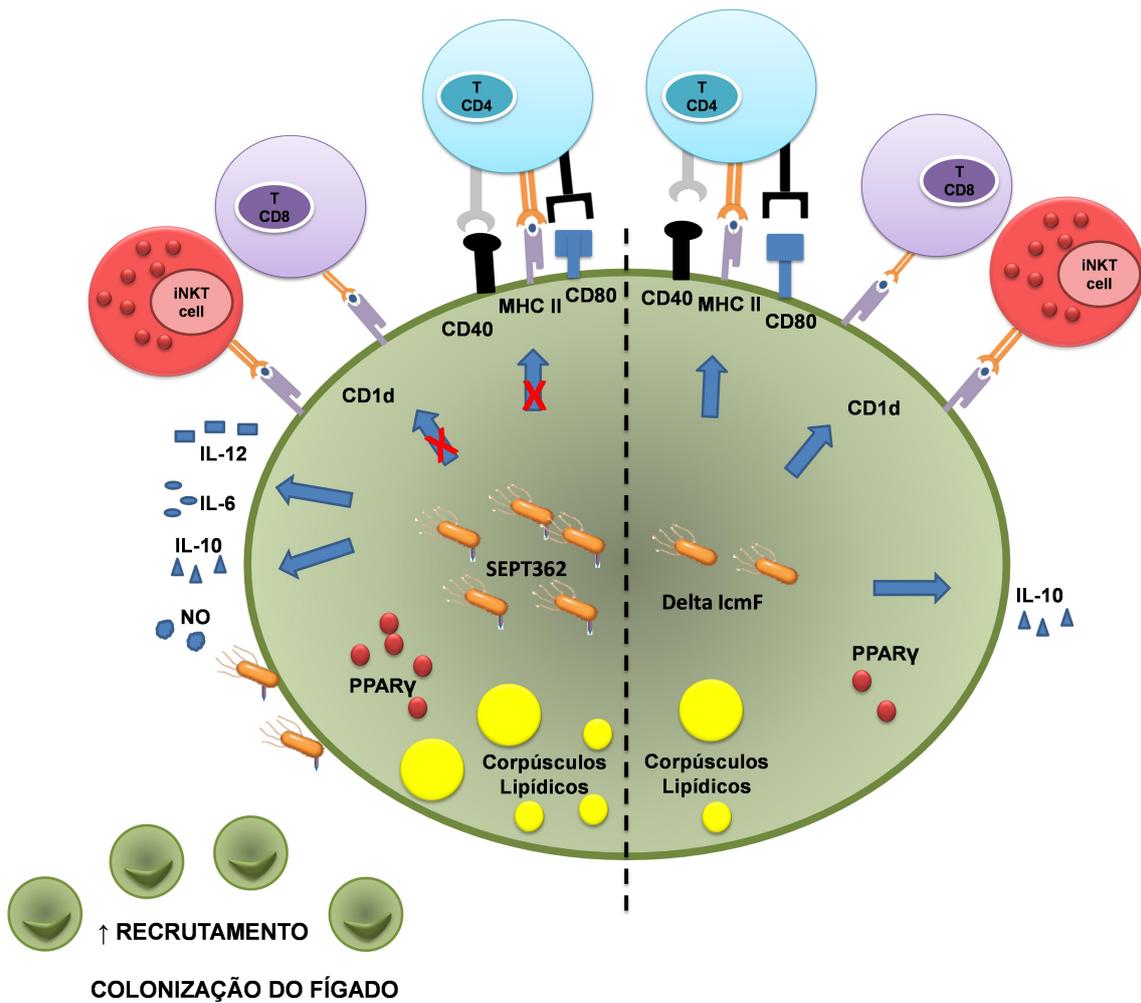
Todo os nossos dados de verificação de modulação pelo SST6 são relacionados a função e presença da proteína IcmF. Essa proteína apresenta um papel crucial na motilidade bacteriana, aderência a células ao aumento da replicação do patógeno em macrófagos, a fagocitose, a inibição da fusão fago-lisossomo e a indução da apoptose (Purcell & Shuman 1998; Zink et al. 2002). Além disso, tem atividade de ATPase, com ação que é crucial para a montagem do SST6 (L.-S. Ma, et al., 2012). Nesse trabalho nós identificamos a participação da função ou da presença da proteína IcmF na modulação da expressão da apresentação de antígenos, na modulação da expressão de moléculas co-estimulatórias, na secreção de NO e IL-6, na modulação do PPAR γ e metabolismo lipídico.

Por fim, tomando todos nossos dados em conjunto, identificamos no presente trabalho uma importante função imunomoduladora para o SST6 de *E. coli* e caracterizamos diferentes mecanismos celulares e moleculares que podem estar envolvidos nos eventos de escape à resposta imunológica do hospedeiro, onde este sistema de secreção tem função crucial. Portanto, além de importante na relação de competição procarioto-procarioto, o SST6 possui um proeminente papel como fator de imunomodulação e, consiste assim num atrativo alvo para para o desenvolvimento de futuras terapias ou mesmo alvo de vacinas funcionais.

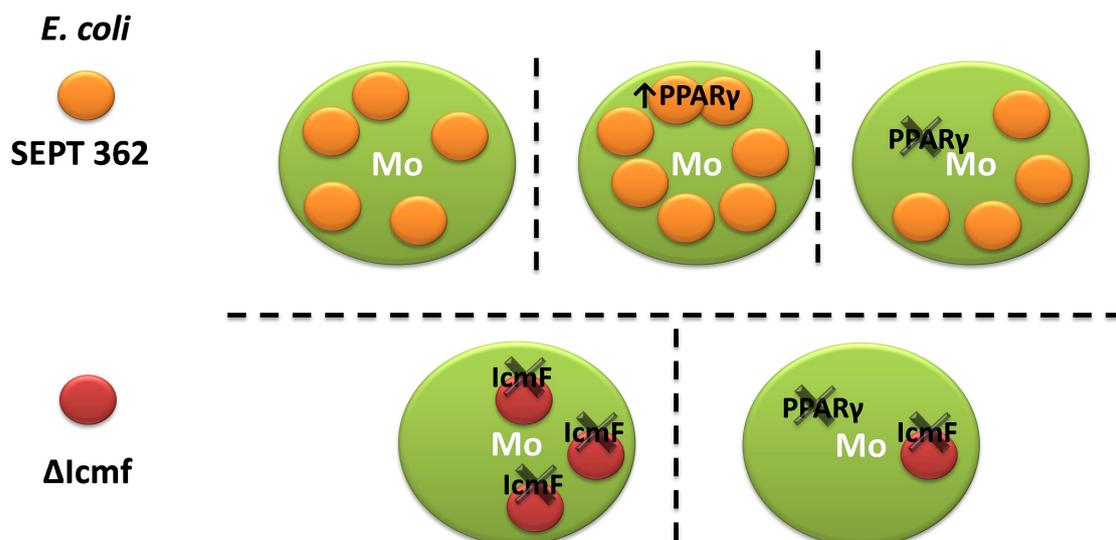
8- CONCLUSÕES

Tomados em conjunto nossos dados demonstram que:

- ✓ O SST6 pode ser usado por bactérias gram-negativas como um mecanismo para a evasão da resposta imune através da redução da apresentação de antígenos lipídicos pela molécula CD1, e com isso ,consequentemente, induzir a redução da ativação de linfócitos TCD8+ e células matadoras naturais.
- ✓ O SST6 pode ser usado como um mecanismo de escape da resposta imune pela redução da apresentação de antígenos proteicos pela molécula MCH de classe II, e com isso, reduzir consequentemente a ativação de linfócitos TCD4+.
- ✓ O SST6 modula positivamente o fator de transcrição PPAR γ e a biogênese de corpúsculo lipídico indicando a importância do metabolismo lipídico nesse processo de patogênese.
- ✓ O SST6 juntamente com PPAR γ favorecem o estabelecimento intracelular de *E. coli* em macrófagos
- ✓ O SST6 é relevante na resposta imunológica do hospedeiro, podendo ser um alvo interessante para o desenvolvimento de vacinas funcionais.



Esquema 01. Modelo proposto para o papel do SST6 no metabolismo lipídico , apresentação de antígenos lipídicos, apresentação de antígenos proteicos, moléculas co-estimulatórias e os mecanismos associados a essa via.



Esquema 02. Modelo proposto para o papel do SST6 e PPAR γ na capacidade microbicida de macrófagos peritoneais.

9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abtin, Arby, Rohit Jain, Andrew J. Mitchell, Ben Roediger, Anthony J. Brzoska, Shweta Tikoo, Qiang Cheng, et al. 2014. "Perivascular Macrophages Mediate Neutrophil Recruitment during Bacterial Skin Infection." *Nature Immunology* 15 (1): 45–53. doi:10.1038/ni.2769.
- Ahmadian, Maryam, Jae Myoung Suh, Nasun Hah, Christopher Liddle, Annette R. Atkins, Michael Downes, and Ronald M. Evans. 2013. "PPAR γ Signaling and Metabolism: The Good, the Bad and the Future." *Nature Medicine* 99 (5): 557–66. doi:10.1038/nm.3159.
- Almeida, Patricia E., Alan Brito Carneiro, Adriana R. Silva, Patricia T. Bozza, Patricia E. Almeida, Alan Brito Carneiro, Adriana R. Silva, and Patricia T. Bozza. 2012. "PPAR γ ; Expression and Function in Mycobacterial Infection: Roles in Lipid Metabolism, Immunity, and Bacterial Killing, PPAR γ ; Expression and Function in Mycobacterial Infection: Roles in Lipid Metabolism, Immunity, and Bacterial Killing." *PPAR Research, PPAR Research* 2012, 2012 (July): e383829. doi:10.1155/2012/383829, 10.1155/2012/383829.
- Altman, J. D., P. A. Reay, and M. M. Davis. 1993. "Formation of Functional Peptide Complexes of Class II Major Histocompatibility Complex Proteins from Subunits Produced in Escherichia Coli." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (21): 10330–34.
- Antoniou, Antony N, and Simon J Powis. 2008. "Pathogen Evasion Strategies for the Major Histocompatibility Complex Class I Assembly Pathway." *Immunology* 124 (1): 1–12. doi:10.1111/j.1365-2567.2008.02804.x.
- Aubert, Daniel F., Sherry Hu, and Miguel A. Valvano. 2015. "Quantification of Type VI Secretion System Activity in Macrophages Infected with Burkholderia Cenocepacia." *Microbiology (Reading, England)*, September. doi:10.1099/mic.0.000174.

- Baeuerle, P. A., and T. Henkel. 1994. "Function and Activation of NF-Kappa B in the Immune System." *Annual Review of Immunology* 12: 141–79. doi:10.1146/annurev.iy.12.040194.001041.
- Balamayooran, Gayathriy, Sanjay Batra, Theivanthiran Balamayooran, Shanshan Cai, and Samithamby Jeyaseelan. 2011. "Monocyte Chemoattractant Protein 1 Regulates Pulmonary Host Defense via Neutrophil Recruitment during Escherichia Coli Infection." *Infection and Immunity* 79 (7): 2567–77. doi:10.1128/IAI.00067-11.
- Barker, Jeffrey R., Audrey Chong, Tara D. Wehrly, Jieh-Juen Yu, Stephen A. Rodriguez, Jirong Liu, Jean Celli, Bernard P. Arulanandam, and Karl E. Klose. 2009. "The Francisella Tularensis Pathogenicity Island Encodes a Secretion System That Is Required for Phagosome Escape and Virulence." *Molecular Microbiology* 74 (6): 1459–70.
- Barrachina, M., E. Goñalons, and A. Celada. 1999. "LPS Upregulates MHC Class II I-A Expression in B Lymphocytes at Transcriptional and at Translational Levels." *Tissue Antigens* 54 (5): 461–70.
- Basler, M., M. Pilhofer, G. P. Henderson, G. J. Jensen, and J. J. Mekalanos. 2012. "Type VI Secretion Requires a Dynamic Contractile Phage Tail-like Structure." *Nature* 483 (7388): 182–86. doi:10.1038/nature10846.
- Bastiani, Michele, Marilda Carlos Vidotto, and Fabiana Horn. 2005. "An Avian Pathogenic Escherichia Coli Isolate Induces Caspase 3/7 Activation in J774 Macrophages." *FEMS Microbiology Letters* 253 (1): 133–40. doi:10.1016/j.femsle.2005.09.024.
- Basu, Sreyashi, and Pramod K. Srivastava. 1999. "Calreticulin, a Peptide-Binding Chaperone of the Endoplasmic Reticulum, Elicits Tumor- and Peptide-Specific Immunity." *The Journal of Experimental Medicine* 189 (5): 797–802.
- Beare, Paul A., Stacey D. Gilk, Charles L. Larson, Joshua Hill, Christopher M. Stead, Anders Omsland, Diane C. Cockrell, Dale Howe, Daniel E. Voth, and Robert A. Heinzen. 2011. "Dot/Icm Type IVB Secretion System Requirements for Coxiella Burnetii Growth in Human Macrophages." *mBio* 2 (4): e00175–11. doi:10.1128/mBio.00175-11.
- Beckman, E. M., S. A. Porcelli, C. T. Morita, S. M. Behar, S. T. Furlong, and M. B. Brenner. 1994. "Recognition of a Lipid Antigen by CD1-Restricted Alpha Beta+ T Cells." *Nature* 372 (6507): 691–94. doi:10.1038/372691a0.
- Belicha-Villanueva, Alan, Sarah McEvoy, Kelly Cycon, Soldano Ferrone, Sandra O Gollnick, and Naveen Bangia. 2008. "Differential Contribution of TAP and Tapasin to HLA Class I Antigen Expression." *Immunology* 124 (1): 112–20. doi:10.1111/j.1365-2567.2007.02746.x.
- Bleves, Sophie, Véronique Viarre, Richard Salacha, Gérard P. F. Michel, Alain Filloux, and Romé Voulhoux. 2010. "Protein Secretion Systems in Pseudomonas Aeruginosa: A Wealth of Pathogenic Weapons." *International Journal of Medical Microbiology: IJMM* 300 (8): 534–43. doi:10.1016/j.ijmm.2010.08.005.
- Boise, Lawrence H., Andy J. Minn, Patricia J. Noel, Carl H. June, Mary Ann Accavitti, Tullia Lindsten, and Craig B. Thompson. 2010. "CD28 Costimulation Can Promote T Cell Survival by Enhancing the Expression of Bcl-xL. *Immunity*. 1995. 3: 87-98." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 185 (7): 3788–99.
- Bonato, V. L., A. I. Medeiros, V. M. Lima, A. R. Dias, L. H. Faccioliti, and C. L. Silva. 2001. "Downmodulation of CD18 and CD86 on Macrophages and VLA-4 on Lymphocytes in Experimental Tuberculosis." *Scandinavian Journal of Immunology* 54 (6): 564–73.
- Brauner, A, M Söderhäll, S H Jacobson, J Lundahl, U Andersson, and J Andersson. 2001. "Escherichia Coli-Induced Expression of IL-1 α , IL-1 β , IL-6 and IL-8 in Normal Human Renal Tubular Epithelial Cells." *Clinical and Experimental Immunology* 124 (3): 423–28. doi:10.1046/j.1365-2249.2001.01533.x.
- Brereton, Corinna F., Caroline E. Sutton, Pádraig J. Ross, Yoichiro Iwakura, Mariagrazia Pizza, Rino Rappuoli, Ed C. Lavelle, and Kingston H. G. Mills. 2011. "Escherichia Coli Heat-Labile Enterotoxin Promotes Protective Th17 Responses against Infection by Driving

- Innate IL-1 and IL-23 Production." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 186 (10): 5896–5906. doi:10.4049/jimmunol.1003789.
- Brigl, Manfred, and Michael B. Brenner. 2004. "CD1: Antigen Presentation and T Cell Function." *Annual Review of Immunology* 22: 817–90. doi:10.1146/annurev.immunol.22.012703.104608.
- Brozovic, Suzana, Takashi Nagaishi, Masaru Yoshida, Stephanie Betz, Azucena Salas, Daohong Chen, Arthur Kaser, et al. 2004. "CD1d Function Is Regulated by Microsomal Triglyceride Transfer Protein." *Nature Medicine* 10 (5): 535–39. doi:10.1038/nm1043.
- Burgner, D., K. Rockett, and D. Kwiatkowski. 1999. "Nitric Oxide and Infectious Diseases." *Archives of Disease in Childhood* 81 (2): 185–88.
- Burtnick, Mary N., David DeShazer, Vinod Nair, Frank C. Gherardini, and Paul J. Brett. 2010. "Burkholderia Mallei Cluster 1 Type VI Secretion Mutants Exhibit Growth and Actin Polymerization Defects in RAW 264.7 Murine Macrophages." *Infection and Immunity* 78 (1): 88–99. doi:10.1128/IAI.00985-09.
- Busch, R., R. C. Doebele, N. S. Patil, A. Pashine, and E. D. Mellins. 2000. "Accessory Molecules for MHC Class II Peptide Loading." *Current Opinion in Immunology* 12 (1): 99–106.
- Carey, Kimberly L., Hayley J. Newton, Anja Lührmann, and Craig R. Roy. 2011. "The Coxiella Burnetii Dot/Icm System Delivers a Unique Repertoire of Type IV Effectors into Host Cells and Is Required for Intracellular Replication." *PLoS Pathogens* 7 (5): e1002056. doi:10.1371/journal.ppat.1002056.
- Cella, M., D. Scheidegger, K. Palmer-Lehmann, P. Lane, A. Lanzavecchia, and G. Alber. 1996. "Ligation of CD40 on Dendritic Cells Triggers Production of High Levels of Interleukin-12 and Enhances T Cell Stimulatory Capacity: T-T Help via APC Activation." *The Journal of Experimental Medicine* 184 (2): 747–52.
- Cervia, Joseph S., Caroline J. Chantry, Michael D. Hughes, Carmelita Alvero, William A. Meyer, Janice Hodge, Peggy Borum, Jack Moye, Stephen A. Spector, and PACTG 1010 Team. 2010. "Associations of Proinflammatory Cytokine Levels with Lipid Profiles, Growth, and Body Composition in HIV-Infected Children Initiating or Changing Antiretroviral Therapy." *The Pediatric Infectious Disease Journal* 29 (12): 1118–22. doi:10.1097/INF.0b013e3181ed9f4c.
- Chakraborty, Sanjukta, Scott D. Zawieja, Wei Wang, Yang Lee, Yuan J. Wang, Pierre-Yves von der Weid, David C. Zawieja, and Mariappan Muthuchamy. 2015. "Lipopolysaccharide Modulates Neutrophil Recruitment and Macrophage Polarization on Lymphatic Vessels and Impairs Lymphatic Function in Rat Mesentery." *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 309 (12): H2042–57. doi:10.1152/ajpheart.00467.2015.
- Cheminay, Cédric, Annette Möhlenbrink, and Michael Hensel. 2005. "Intracellular Salmonella Inhibit Antigen Presentation by Dendritic Cells." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 174 (5): 2892–99.
- Clark, Robert B. 2002. "The Role of PPARs in Inflammation and Immunity." *Journal of Leukocyte Biology* 71 (3): 388–400.
- Cresswell, P. 1994. "Assembly, Transport, and Function of MHC Class II Molecules." *Annual Review of Immunology* 12: 259–93. doi:10.1146/annurev.iy.12.040194.001355.
- Curtsinger, Julie M., and Matthew F. Mescher. 2010. "Inflammatory Cytokines as a Third Signal for T Cell Activation." *Current Opinion in Immunology* 22 (3): 333–40. doi:10.1016/j.coi.2010.02.013.
- Daniels, Mark A., and Emma Teixeira. 2015. "TCR Signaling in T Cell Memory." *T Cell Biology*, 617. doi:10.3389/fimmu.2015.00617.
- Das, Soumita, Amit Chakraborty, Rajat Banerjee, and Keya Chaudhuri. 2002. "Involvement of in Vivo Induced icmF Gene of Vibrio Cholerae in Motility, Adherence to Epithelial Cells, and Conjugation Frequency." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 295 (4): 922–28.

- de la Salle, Henri, Sabrina Mariotti, Catherine Angenieux, Martine Gilleron, Luis-Fernando Garcia-Alles, Dag Malm, Thomas Berg, et al. 2005. "Assistance of Microbial Glycolipid Antigen Processing by CD1e." *Science (New York, N.Y.)* 310 (5752): 1321–24. doi:10.1126/science.1115301.
- De Libero, Gennaro, Anthony P. Moran, Hans-Jürgen Gober, Emmanuel Rossy, Abdijapar Shamshiev, Olga Chelnokova, Zaima Mazorra, et al. 2005. "Bacterial Infections Promote T Cell Recognition of Self-Glycolipids." *Immunity* 22 (6): 763–72. doi:10.1016/j.immuni.2005.04.013.
- de Pace, Fernanda, Jacqueline Boldrin de Paiva, Gerson Nakazato, Marcelo Lancellotti, Marcelo Palma Sircili, Eliana Guedes Stehling, Wanderley Dias da Silveira, and Vanessa Sperandio. 2011. "Characterization of IcmF of the Type VI Secretion System in an Avian Pathogenic Escherichia Coli (APEC) Strain." *Microbiology (Reading, England)* 157 (Pt 10): 2954–62. doi:10.1099/mic.0.050005-0.
- de Pace, Fernanda, Gerson Nakazato, Alline Pacheco, Jacqueline Boldrin de Paiva, Vanessa Sperandio, and Wanderley Dias da Silveira. 2010. "The Type VI Secretion System Plays a Role in Type 1 Fimbria Expression and Pathogenesis of an Avian Pathogenic Escherichia Coli Strain." *Infection and Immunity* 78 (12): 4990–98. doi:10.1128/IAI.00531-10.
- De Silva, A. Dharshan, J.-June Park, Naoto Matsuki, Aleksandar K. Stanic, Randy R. Brutkiewicz, M. Edward Medof, and Sebastian Joyce. 2002. "Lipid Protein Interactions: The Assembly of CD1d1 with Cellular Phospholipids Occurs in the Endoplasmic Reticulum." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 168 (2): 723–33.
- Dho-Moulin, M., and J. M. Fairbrother. 1999. "Avian Pathogenic Escherichia Coli (APEC)." *Veterinary Research* 30 (2-3): 299–316.
- Dias da Silveira, Wanderley, Alessandra Ferreira, Marcelo Brocchi, Luciana Maria de Hollanda, Antonio Fernando Pestana de Castro, Aureo Tatsumi Yamada, and Marcelo Lancellotti. 2002. "Biological Characteristics and Pathogenicity of Avian Escherichia Coli Strains." *Veterinary Microbiology* 85 (1): 47–53.
- Diehl, Sean, and Mercedes Rincón. 2002. "The Two Faces of IL-6 on Th1/Th2 Differentiation." *Molecular Immunology, Proceedings from the Autumn Immunology Conference (2001): Regulators of Immune Function*, 39 (9): 531–36. doi:10.1016/S0161-5890(02)00210-9.
- Dolan, Brian P., Aditi A. Sharma, James S. Gibbs, Tshaka J. Cunningham, Jack R. Bennink, and Jonathan W. Yewdell. 2012. "MHC Class I Antigen Processing Distinguishes Endogenous Antigens Based on Their Translation from Cellular vs. Viral mRNA." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (18): 7025–30. doi:10.1073/pnas.1112387109.
- Dong, Q., R. Fan, S. Zhao, and Y. Wang. 2009. "Over-Expression of SOCS-3 Gene Promotes IL-10 Production by JEG-3 Trophoblast Cells." *Placenta* 30 (1): 11–14. doi:10.1016/j.placenta.2008.10.008.
- Dramsi, Shaynoor, and Pascale Cossart. 2002. "Listeriolysin O." *The Journal of Cell Biology* 156 (6): 943–46. doi:10.1083/jcb.200202121.
- Duraes, Fernanda V., Jennifer Niven, Juan Dubrot, Stéphanie Hugues, and Monique Gannagé. 2015. "Macroautophagy in Endogenous Processing of Self- and Pathogen-Derived Antigens for MHC Class II Presentation." *Antigen Presenting Cell Biology*, 459. doi:10.3389/fimmu.2015.00459.
- Elewaut, Dirk, Anna P. Lawton, Niranjana A. Nagarajan, Emanuel Maverakis, Archana Khurana, Stefan Höning, Chris A. Benedict, et al. 2003. "The Adaptor Protein AP-3 Is Required for CD1d-Mediated Antigen Presentation of Glycosphingolipids and Development of Va14i NKT Cells." *The Journal of Experimental Medicine* 198 (8): 1133–46. doi:10.1084/jem.20030143.

- Ernst, W. A., J. Maher, S. Cho, K. R. Niazi, D. Chatterjee, D. B. Moody, G. S. Besra, et al. 1998. "Molecular Interaction of CD1b with Lipoglycan Antigens." *Immunity* 8 (3): 331–40.
- Facciotti, Federica, Marco Cavallari, Catherine Angénioux, Luis F. Garcia-Alles, François Signorino-Gelo, Lena Angman, Martine Gilleron, et al. 2011. "Fine Tuning by Human CD1e of Lipid-Specific Immune Responses." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (34): 14228–33. doi:10.1073/pnas.1108809108.
- Ferrari, Giorgio, Hanno Langen, Makoto Naito, and Jean Pieters. 1999. "A Coat Protein on Phagosomes Involved in the Intracellular Survival of Mycobacteria." *Cell* 97 (4): 435–47. doi:10.1016/S0092-8674(00)80754-0.
- Figueira, Rita, Kathryn G. Watson, David W. Holden, and Sophie Helaine. 2013. "Identification of Salmonella Pathogenicity Island-2 Type III Secretion System Effectors Involved in Intramacrophage Replication of *S. Enterica* Serovar Typhimurium: Implications for Rational Vaccine Design." *mBio* 4 (2): e00065. doi:10.1128/mBio.00065-13.
- Filloux, A., A. Hachani, and S. Bleves. 2008. "The Bacterial Type VI Secretion Machine: Yet Another Player for Protein Transport across Membranes." *Microbiology* 154 (6): 1570–83. doi:10.1099/mic.0.2008/016840-0.
- Forloni, Matteo, Sonia Albini, Maria Zaira Limongi, Loredana Cifaldi, Renata Boldrini, Maria Rita Nicotra, Giuseppe Giannini, Pier Giorgio Natali, Patrizio Giacomini, and Doriana Fruci. 2010. "NF- κ B, and Not MYCN, Regulates MHC Class I and Endoplasmic Reticulum Aminopeptidases in Human Neuroblastoma Cells." *Cancer Research* 70 (3): 916–24. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-2582.
- Gode-Potratz, Cindy J., and Linda L. McCarter. 2011. "Quorum Sensing and Silencing in *Vibrio Parahaemolyticus*." *Journal of Bacteriology* 193 (16): 4224–37. doi:10.1128/JB.00432-11.
- Gogolak, Peter, Bence Rethi, Istvan Szatmari, Arpad Lanyi, Balazs Dezso, Laszlo Nagy, and Eva Rajnavolgyi. 2007. "Differentiation of CD1a- and CD1a+ Monocyte-Derived Dendritic Cells Is Biased by Lipid Environment and PPAR γ ." *Blood* 109 (2): 643–52. doi:10.1182/blood-2006-04-016840.
- Heemels, M. T., and H. Ploegh. 1995. "Generation, Translocation, and Presentation of MHC Class I-Restricted Peptides." *Annual Review of Biochemistry* 64: 463–91. doi:10.1146/annurev.bi.64.070195.002335.
- Henneke, Phillip, and Douglas T. Golenbock. 2004. "Phagocytosis, Innate Immunity, and Host-Pathogen Specificity." *The Journal of Experimental Medicine* 199 (1): 1–4. doi:10.1084/jem.20031256.
- Hofmann, M. W., S. Höning, D. Rodionov, B. Dobberstein, K. von Figura, and O. Bakke. 1999. "The Leucine-Based Sorting Motifs in the Cytoplasmic Domain of the Invariant Chain Are Recognized by the Clathrin Adaptors AP1 and AP2 and Their Medium Chains." *The Journal of Biological Chemistry* 274 (51): 36153–58.
- Hood, Rachel D., Pragma Singh, FoSheng Hsu, Tüzün Güvener, Mike A. Carl, Rex R. S. Trinidad, Julie M. Silverman, et al. 2010. "A Type VI Secretion System of *Pseudomonas Aeruginosa* Targets a Toxin to Bacteria." *Cell Host & Microbe* 7 (1): 25–37. doi:10.1016/j.chom.2009.12.007.
- Hornef, Mathias W., Mary Jo Wick, Mikael Rhen, and Staffan Normark. 2002. "Bacterial Strategies for Overcoming Host Innate and Adaptive Immune Responses." *Nature Immunology* 3 (11): 1033–40. doi:10.1038/ni1102-1033.
- Hyl Dahl, Robert D., Lawrence M. Schwartz, and Priscilla M. Clarkson. 2013. "NF- κ B Activity Functions in Primary Pericytes in a Cell- and Non-Cell-Autonomous Manner to Affect Myotube Formation." *Muscle & Nerve* 47 (4): 522–31. doi:10.1002/mus.23640.
- Inaba, K., S. Turley, T. Iyoda, F. Yamaide, S. Shimoyama, C. Reis e Sousa, R. N. Germain, I. Mellman, and R. M. Steinman. 2000. "The Formation of Immunogenic Major Histocompatibility Complex Class II-Peptide Ligands in Lysosomal Compartments of

- Dendritic Cells Is Regulated by Inflammatory Stimuli." *The Journal of Experimental Medicine* 191 (6): 927–36.
- Inohara, Naohiro, and Gabriel Nuñez. 2003. "NODs: Intracellular Proteins Involved in Inflammation and Apoptosis." *Nature Reviews. Immunology* 3 (5): 371–82. doi:10.1038/nri1086.
- Jani, Andrea J., and Peggy A. Cotter. 2010. "Type VI Secretion: Not Just for Pathogenesis Anymore." *Cell Host & Microbe* 8 (1): 2–6. doi:10.1016/j.chom.2010.06.012.
- Jayawardena-Wolf, J., K. Benlagha, Y. H. Chiu, R. Mehr, and A. Bendelac. 2001. "CD1d Endosomal Trafficking Is Independently Regulated by an Intrinsic CD1d-Encoded Tyrosine Motif and by the Invariant Chain." *Immunity* 15 (6): 897–908.
- Jenkins, M. K. 1994. "The Ups and Downs of T Cell Costimulation." *Immunity* 1 (6): 443–46.
- Jiang, Feng, Nicholas R. Waterfield, Jian Yang, Guowei Yang, and Qi Jin. 2014. "A *Pseudomonas Aeruginosa* Type VI Secretion Phospholipase D Effector Targets Both Prokaryotic and Eukaryotic Cells." *Cell Host & Microbe* 15 (5): 600–610. doi:10.1016/j.chom.2014.04.010.
- Ji, Jing, Kristin L. Griffiths, Peter J. Milburn, Timothy R. Hirst, and Helen C. O'Neill. 2015. "The B Subunit of *Escherichia Coli* Heat-Labile Toxin Alters the Development and Antigen-Presenting Capacity of Dendritic Cells." *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 19 (8): 2019–31. doi:10.1111/jcmm.12599.
- Jin, Jun-O., Xiaozhe Han, and Qing Yu. 2013. "Interleukin-6 Induces the Generation of IL-10-Producing Tr1 Cells and Suppresses Autoimmune Tissue Inflammation." *Journal of Autoimmunity* 40 (February): 28–44. doi:10.1016/j.jaut.2012.07.009.
- Kanamaru, Shuji, Petr G. Leiman, Victor A. Kostyuchenko, Paul R. Chipman, Vadim V. Mesyanzhinov, Fumio Arisaka, and Michael G. Rossmann. 2002. "Structure of the Cell-Puncturing Device of Bacteriophage T4." *Nature* 415 (6871): 553–57. doi:10.1038/415553a.
- Kang, Suk-Jo, and Peter Cresswell. 2002. "Calnexin, Calreticulin, and ERp57 Cooperate in Disulfide Bond Formation in Human CD1d Heavy Chain." *The Journal of Biological Chemistry* 277 (47): 44838–44. doi:10.1074/jbc.M207831200.
- Kaper, James B., James P. Nataro, and Harry L. Mobley. 2004. "Pathogenic *Escherichia Coli*." *Nature Reviews. Microbiology* 2 (2): 123–40. doi:10.1038/nrmicro818.
- Kapitein, Nicole, Gabriele Bönemann, Aleksandra Pietrosiuk, Fabian Seyffer, Ingrid Hausser, Jacomine Krijnse Locker, and Axel Mogk. 2013. "ClpV Recycles VipA/VipB Tubules and Prevents Non-Productive Tubule Formation to Ensure Efficient Type VI Protein Secretion." *Molecular Microbiology* 87 (5): 1013–28. doi:10.1111/mmi.12147.
- Kasinrerk, W., T. Baumruker, O. Majdic, W. Knapp, and H. Stockinger. 1993. "CD1 Molecule Expression on Human Monocytes Induced by Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 150 (2): 579–84.
- Kassianos, Andrew J., Melinda Y. Hardy, Xinsheng Ju, Dipti Vijayan, Yitian Ding, Annelie J. E. Vulink, Kylie J. McDonald, et al. 2012. "Human CD1c (BDCA-1)+ Myeloid Dendritic Cells Secrete IL-10 and Display an Immuno-Regulatory Phenotype and Function in Response to *Escherichia Coli*." *European Journal of Immunology* 42 (6): 1512–22. doi:10.1002/eji.201142098.
- Ke, Yuehua, Yufei Wang, Wengfeng Li, and Zeliang Chen. 2015. "Type IV Secretion System of *Brucella* Spp. and Its Effectors." *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 5 (October). doi:10.3389/fcimb.2015.00072.
- Khan, Nargis, Uthaman Gowthaman, Susanta Pahari, and Javed N. Agrewala. 2012. "Manipulation of Costimulatory Molecules by Intracellular Pathogens: Veni, Vidi, Vici!!" *PLoS Pathog* 8 (6): e1002676. doi:10.1371/journal.ppat.1002676.
- Kissner, Teri L., Gordon Ruthel, Shahabuddin Alam, Robert G. Ulrich, Stefan Fernandez, and Kamal U. Saikh. 2011. "Activation of MyD88 Signaling upon Staphylococcal Enterotoxin

- Binding to MHC Class II Molecules." *PloS One* 6 (1): e15985. doi:10.1371/journal.pone.0015985.
- Klapproth, J. M., M. S. Donnenberg, J. M. Abraham, H. L. Mobley, and S. P. James. 1995. "Products of Enteropathogenic Escherichia Coli Inhibit Lymphocyte Activation and Lymphokine Production." *Infection and Immunity* 63 (6): 2248–54.
- Konovalova, Anna, Tobias Petters, and Lotte Søggaard-Andersen. 2010. "Extracellular Biology of Myxococcus Xanthus." *FEMS Microbiology Reviews* 34 (2): 89–106. doi:10.1111/j.1574-6976.2009.00194.x.
- Konradt, Christoph, Elisabetta Frigimelica, Katharina Nothelfer, Andrea Puhar, Wilmar Salgado-Pabon, Vincenzo di Bartolo, Daniel Scott-Algara, Cristina D. Rodrigues, Philippe J. Sansonetti, and Armelle Phalipon. 2011. "The Shigella Flexneri Type Three Secretion System Effector IpgD Inhibits T Cell Migration by Manipulating Host Phosphoinositide Metabolism." *Cell Host & Microbe* 9 (4): 263–72. doi:10.1016/j.chom.2011.03.010.
- Kwuan, Laura, Walter Adams, and Victoria Auerbuch. 2013. "Impact of Host Membrane Pore Formation by the Yersinia Pseudotuberculosis Type III Secretion System on the Macrophage Innate Immune Response." *Infection and Immunity* 81 (3): 905–14. doi:10.1128/IAI.01014-12.
- Lang, Mark L., and Aharon Glatman-Freedman. 2006. "Do CD1-Restricted T Cells Contribute to Antibody-Mediated Immunity against Mycobacterium Tuberculosis?" *Infection and Immunity* 74 (2): 803–9. doi:10.1128/IAI.74.2.803-809.2006.
- Lee, Keun-Wook, Younghee Lee, Doo-Sik Kim, and Hyung-Joo Kwon. 2006. "Direct Role of NF- κ B Activation in Toll-like Receptor-Triggered HLA-DRA Expression." *European Journal of Immunology* 36 (5): 1254–66. doi:10.1002/eji.200535577.
- Leiman, Petr G., Marek Basler, Udipi A. Ramagopal, Jeffrey B. Bonanno, J. Michael Sauder, Stefan Pukatzki, Stephen K. Burley, Steven C. Almo, and John J. Mekalanos. 2009. "Type VI Secretion Apparatus and Phage Tail-Associated Protein Complexes Share a Common Evolutionary Origin." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (11): 4154–59. doi:10.1073/pnas.0813360106.
- Liu, Liyun, Shuai Hao, Ruiting Lan, Guangxia Wang, Di Xiao, Hui Sun, and Jianguo Xu. 2015. "The Type VI Secretion System Modulates Flagellar Gene Expression and Secretion in Citrobacter Freundii and Contributes to Adhesion and Cytotoxicity to Host Cells." *Infection and Immunity* 83 (7): 2596–2604. doi:10.1128/IAI.03071-14.
- Lorente, Elena, Alejandro Barriga, Carolina Johnstone, Carmen Mir, Mercedes Jiménez, and Daniel López. 2013. "Concerted in Vitro Trimming of Viral HLA-B27-Restricted Ligands by Human ERAP1 and ERAP2 Aminopeptidases." *PloS One* 8 (11): e79596. doi:10.1371/journal.pone.0079596.
- Luo, Minkui, Evgeny A. Fadeev, and John T. Groves. 2005. "Mycobactin-Mediated Iron Acquisition within Macrophages." *Nature Chemical Biology* 1 (3): 149–53. doi:10.1038/nchembio717.
- Mahajan, Sahil, H. Kitdorlang Dkhar, Vemika Chandra, Sandeep Dave, Ravikanth Nanduri, Ashok Kumar Janmeja, Javed N. Agrewala, and Pawan Gupta. 2012a. "Mycobacterium Tuberculosis Modulates Macrophage Lipid-Sensing Nuclear Receptors PPAR γ and TR4 for Survival." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 188 (11): 5593–5603. doi:10.4049/jimmunol.1103038.
- . 2012b. "Mycobacterium Tuberculosis Modulates Macrophage Lipid-Sensing Nuclear Receptors PPAR γ and TR4 for Survival." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 188 (11): 5593–5603. doi:10.4049/jimmunol.1103038.
- Ma, Jiale, Yinli Bao, Min Sun, Wenyang Dong, Zihao Pan, Wei Zhang, Chengping Lu, and Huochun Yao. 2014. "Two Functional Type VI Secretion Systems in Avian Pathogenic Escherichia Coli Are Involved in Different Pathogenic Pathways." *Infection and Immunity* 82 (9): 3867–79. doi:10.1128/IAI.01769-14.

- Ma, Lay-Sun, Franz Narberhaus, and Erh-Min Lai. 2012. "IcmF Family Protein TssM Exhibits ATPase Activity and Energizes Type VI Secretion." *The Journal of Biological Chemistry* 287 (19): 15610–21. doi:10.1074/jbc.M111.301630.
- Manolova, Vania, Magdalena Kistowska, Samantha Paoletti, Gabriel M. Baltariu, Huguette Bausinger, Daniel Hanau, Lucia Mori, and Gennaro De Libero. 2006. "Functional CD1a Is Stabilized by Exogenous Lipids." *European Journal of Immunology* 36 (5): 1083–92. doi:10.1002/eji.200535544.
- Martin, Harry. 2010. "Role of PPAR-Gamma in Inflammation. Prospects for Therapeutic Intervention by Food Components." *Mutation Research* 690 (1-2): 57–63.
- McGuire, Victoria A., and J. Simon C. Arthur. 2015. "Subverting Toll-Like Receptor Signaling by Bacterial Pathogens." *Microbial Immunology*, 607. doi:10.3389/fimmu.2015.00607.
- Melo, Rossana C. N., Heloisa D'Avila, Hsiao-Ching Wan, Patrícia T. Bozza, Ann M. Dvorak, and Peter F. Weller. 2011. "Lipid Bodies in Inflammatory Cells." *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 59 (5): 540–56. doi:10.1369/0022155411404073.
- Menestrina, G., C. Pederzoli, M. Dalla Serra, M. Bregante, and F. Gambale. 1996. "Permeability Increase Induced by Escherichia Coli Hemolysin A in Human Macrophages Is due to the Formation of Ionic Pores: A Patch Clamp Characterization." *The Journal of Membrane Biology* 149 (2): 113–21.
- Moody, D. Branch, and Steven A. Porcelli. 2001. "CD1 Trafficking: Invariant Chain Gives a New Twist to the Tale." *Immunity* 15 (6): 861–65. doi:10.1016/S1074-7613(01)00250-3.
- Morse, Kaitlyn, Junzo Norimine, Jayne C. Hope, and Wendy C. Brown. 2012. "Breadth of the CD4+ T Cell Response to Anaplasma Marginale VirB9-1, VirB9-2 and VirB10 and MHC Class II DR and DQ Restriction Elements." *Immunogenetics* 64 (7): 507–23. doi:10.1007/s00251-012-0606-4.
- Mosmann, T. 1983. "Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays." *Journal of Immunological Methods* 65 (1-2): 55–63.
- Mosyak, Lidia, Dennis M. Zaller, and Don C. Wiley. 1998. "The Structure of HLA-DM, the Peptide Exchange Catalyst That Loads Antigen onto Class II MHC Molecules during Antigen Presentation." *Immunity* 9 (3): 377–83. doi:10.1016/S1074-7613(00)80620-2.
- Moulin-Schouleur, Maryvonne, Catherine Schouler, Patrick Tailliez, Mu-Rong Kao, Annie Brée, Pierre Germon, Eric Oswald, Jacques Mainil, Miguel Blanco, and Jorge Blanco. 2006. "Common Virulence Factors and Genetic Relationships between O18:K1:H7 Escherichia Coli Isolates of Human and Avian Origin." *Journal of Clinical Microbiology* 44 (10): 3484–92. doi:10.1128/JCM.00548-06.
- Murat, Pierre, and Judy Tellam. 2015. "Effects of Messenger RNA Structure and Other Translational Control Mechanisms on Major Histocompatibility Complex-I Mediated Antigen Presentation." *Wiley Interdisciplinary Reviews. RNA* 6 (2): 157–71. doi:10.1002/wrna.1262.
- Nazareth, Helen, Stacy A. Genagon, and Thomas A. Russo. 2007. "Extraintestinal Pathogenic Escherichia Coli Survives within Neutrophils." *Infection and Immunity* 75 (6): 2776–85. doi:10.1128/IAI.01095-06.
- Neefjes, Jacques, Marlieke L. M. Jongsma, Petra Paul, and Oddmund Bakke. 2011. "Towards a Systems Understanding of MHC Class I and MHC Class II Antigen Presentation." *Nature Reviews. Immunology* 11 (12): 823–36. doi:10.1038/nri3084.
- Nei, Masatoshi, and Alejandro P. Rooney. 2005. "Concerted and Birth-and-Death Evolution of Multigene Families." *Annual Review of Genetics* 39: 121–52. doi:10.1146/annurev.genet.39.073003.112240.
- Orabona, Ciriana, Ursula Grohmann, Maria Laura Belladonna, Francesca Fallarino, Carmine Vacca, Roberta Bianchi, Silvia Bozza, et al. 2004. "CD28 Induces Immunostimulatory Signals in Dendritic Cells via CD80 and CD86." *Nature Immunology* 5 (11): 1134–42. doi:10.1038/ni1124.

- Philipson, Casandra W., Josep Bassaganya-Riera, Monica Viladomiu, Mireia Pedragosa, Richard L. Guerrant, James K. Roche, and Raquel Hontecillas. 2013. "The Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ in Immune Responses to Enterogastric Escherichia Coli Infection." *PloS One* 8 (2): e57812. doi:10.1371/journal.pone.0057812.
- Pietrosiuk, Aleksandra, Esther D. Lenherr, Sebastian Falk, Gabriele Bönemann, Jürgen Kopp, Hanswalter Zentgraf, Irmgard Sinning, and Axel Mogk. 2011. "Molecular Basis for the Unique Role of the AAA+ Chaperone ClpV in Type VI Protein Secretion." *The Journal of Biological Chemistry* 286 (34): 30010–21. doi:10.1074/jbc.M111.253377.
- Porcelli, S., C. T. Morita, and M. B. Brenner. 1992. "CD1b Restricts the Response of Human CD4-8- T Lymphocytes to a Microbial Antigen." *Nature* 360 (6404): 593–97. doi:10.1038/360593a0.
- Pukatzki, Stefan, Amy T. Ma, Derek Sturtevant, Bryan Krastins, David Sarracino, William C. Nelson, John F. Heidelberg, and John J. Mekalanos. 2006. "Identification of a Conserved Bacterial Protein Secretion System in *Vibrio Cholerae* Using the *Dictyostelium* Host Model System." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (5): 1528–33. doi:10.1073/pnas.0510322103.
- Purcell, M., and H. A. Shuman. 1998. "The *Legionella Pneumophila icmGCDJBF* Genes Are Required for Killing of Human Macrophages." *Infection and Immunity* 66 (5): 2245–55.
- Qin, Hongwei, Cynthia A. Wilson, Sun Jung Lee, Xueyan Zhao, and Ety N. Benveniste. 2005. "LPS Induces CD40 Gene Expression through the Activation of NF-kappaB and STAT-1alpha in Macrophages and Microglia." *Blood* 106 (9): 3114–22. doi:10.1182/blood-2005-02-0759.
- Rahman, Masmudur M., and Grant McFadden. 2011. "Modulation of NF-kB Signalling by Microbial Pathogens." *Nature Reviews. Microbiology* 9 (4): 291–306. doi:10.1038/nrmicro2539.
- Rao, Sudheendra, Alejo A. Morales, Damien D. Pearse, Sudheendra Rao, Alejo A. Morales, and Damien D. Pearse. 2015. "The Comparative Utility of Viromer RED and Lipofectamine for Transient Gene Introduction into Glial Cells, The Comparative Utility of Viromer RED and Lipofectamine for Transient Gene Introduction into Glial Cells." *BioMed Research International, BioMed Research International* 2015, 2015 (October): e458624. doi:10.1155/2015/458624, 10.1155/2015/458624.
- Riese, R. J., P. R. Wolf, D. Brömme, L. R. Natkin, J. A. Villadangos, H. L. Ploegh, and H. A. Chapman. 1996. "Essential Role for Cathepsin S in MHC Class II-Associated Invariant Chain Processing and Peptide Loading." *Immunity* 4 (4): 357–66.
- Rosales-Reyes, Roberto, Daniel F. Aubert, Jennifer S. Tolman, Amal O. Amer, and Miguel A. Valvano. 2012. "Burkholderia Cenocepacia Type VI Secretion System Mediates Escape of Type II Secreted Proteins into the Cytoplasm of Infected Macrophages." *PloS One* 7 (7): e41726. doi:10.1371/journal.pone.0041726.
- Roura-Mir, Carme, Lisheng Wang, Tan-Yun Cheng, Isamu Matsunaga, Christopher C. Dascher, Stanford L. Peng, Matthew J. Fenton, Carsten Kirschning, and D. Branch Moody. 2005. "Mycobacterium Tuberculosis Regulates CD1 Antigen Presentation Pathways through TLR-2." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 175 (3): 1758–66.
- Rüssmann, Holger, Klaus Panthel, Brigitte Köhn, Stefan Jellbauer, Sebastian E. Winter, Sara Garbom, Hans Wolf-Watz, Sigrid Hoffmann, Silke Grauling-Halama, and Gernot Geginat. 2010. "Alternative Endogenous Protein Processing via an Autophagy-Dependent Pathway Compensates for Yersinia-Mediated Inhibition of Endosomal Major Histocompatibility Complex Class II Antigen Presentation." *Infection and Immunity* 78 (12): 5138–50. doi:10.1128/IAI.00155-10.
- Russo, T. A., and J. R. Johnson. 2000. "Proposal for a New Inclusive Designation for Extraintestinal Pathogenic Isolates of *Escherichia Coli*: ExPEC." *The Journal of Infectious Diseases* 181 (5): 1753–54. doi:10.1086/315418.

- Sadeyen, Jean-Rémy, Pete Kaiser, Mark P. Stevens, and Francis Dziva. 2014. "Analysis of Immune Responses Induced by Avian Pathogenic Escherichia Coli Infection in Turkeys and Their Association with Resistance to Homologous Re-Challenge." *Veterinary Research* 45: 19. doi:10.1186/1297-9716-45-19.
- Savkovic, S. D., A. Koutsouris, and G. Hecht. 1997. "Activation of NF-kappaB in Intestinal Epithelial Cells by Enteropathogenic Escherichia Coli." *The American Journal of Physiology* 273 (4 Pt 1): C1160–67.
- Schreiber, Heidi A., Paul D. Hulseberg, JangEun Lee, Jozsef Prechl, Peter Barta, Nora Szlavik, Jeffrey S. Harding, Zsuzsanna Fabry, and Matyas Sandor. 2010. "Dendritic Cells in Chronic Mycobacterial Granulomas Restrict Local Anti-Bacterial T Cell Response in a Murine Model." *PLoS One* 5 (7): e11453. doi:10.1371/journal.pone.0011453.
- Schwarz, Sandra, Rachel D. Hood, and Joseph D. Mougous. 2010. "What Is Type VI Secretion Doing in All Those Bugs?" *Trends in Microbiology* 18 (12): 531–37. doi:10.1016/j.tim.2010.09.001.
- Seider, Katja, Antje Heyken, Anja Lüttich, Pedro Miramón, and Bernhard Hube. 2010. "Interaction of Pathogenic Yeasts with Phagocytes: Survival, Persistence and Escape." *Current Opinion in Microbiology* 13 (4): 392–400. doi:10.1016/j.mib.2010.05.001.
- Seifert, H. S. 1996. "Questions about Gonococcal Pilus Phase- and Antigenic Variation." *Molecular Microbiology* 21 (3): 433–40.
- Seitz, Maren, Andreas Beineke, Alena Singpiel, Jörg Willenborg, Pavel Dutow, Ralph Goethe, Peter Valentin-Weigand, Andreas Klos, and Christoph G. Baums. 2014. "Role of Capsule and Sulfolysin in Mucosal Infection of Complement-Deficient Mice with Streptococcus Suis." *Infection and Immunity* 82 (6): 2460–71. doi:10.1128/IAI.00080-14.
- Sharma, Pradeep, Divya Dube, Mau Sinha, Sharmistha Dey, Punit Kaur, Sujata Sharma, and Tej P. Singh. 2012. "Structural Basis of Heparin Binding to Camel Peptidoglycan Recognition Protein-S." *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 3 (1): 86–94.
- Silverman, Julie M., Yannick R. Brunet, Eric Cascales, and Joseph D. Mougous. 2012. "Structure and Regulation of the Type VI Secretion System." *Annual Review of Microbiology* 66 (1): 453–72. doi:10.1146/annurev-micro-121809-151619.
- Smith, S. A. 2002. "Peroxisome Proliferator-Activated Receptors and the Regulation of Mammalian Lipid Metabolism." *Biochemical Society Transactions* 30 (Pt 6): 1086–90. doi:10.1042/.
- Spada, F. M., E. P. Grant, P. J. Peters, M. Sugita, A. Melián, D. S. Leslie, H. K. Lee, et al. 2000. "Self-Recognition of CD1 by Gamma/delta T Cells: Implications for Innate Immunity." *The Journal of Experimental Medicine* 191 (6): 937–48.
- Stenger, S., K. R. Niazi, and R. L. Modlin. 1998. "Down-Regulation of CD1 on Antigen-Presenting Cells by Infection with Mycobacterium Tuberculosis." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 161 (7): 3582–88.
- Sturgill-Koszycki, S., P. H. Schlesinger, P. Chakraborty, P. L. Haddix, H. L. Collins, A. K. Fok, R. D. Allen, S. L. Gluck, J. Heuser, and D. G. Russell. 1994. "Lack of Acidification in Mycobacterium Phagosomes Produced by Exclusion of the Vesicular Proton-ATPase." *Science (New York, N.Y.)* 263 (5147): 678–81.
- Suarez, Giovanni, Johanna C. Sierra, Michelle L. Kirtley, and Ashok K. Chopra. 2010. "Role of Hcp, a Type 6 Secretion System Effector, of Aeromonas Hydrophila in Modulating Activation of Host Immune Cells." *Microbiology* 156 (Pt 12): 3678–88. doi:10.1099/mic.0.041277-0.
- Suarez, G., J. C. Sierra, T. E. Erova, J. Sha, A. J. Horneman, and A. K. Chopra. 2010. "A Type VI Secretion System Effector Protein, VgrG1, from Aeromonas Hydrophila That Induces Host Cell Toxicity by ADP Ribosylation of Actin." *Journal of Bacteriology* 192 (1): 155–68. doi:10.1128/JB.01260-09.

- Sugita, M., E. P. Grant, E. van Donselaar, V. W. Hsu, R. A. Rogers, P. J. Peters, and M. B. Brenner. 1999. "Separate Pathways for Antigen Presentation by CD1 Molecules." *Immunity* 11 (6): 743–52.
- Sugita, M., R. M. Jackman, E. van Donselaar, S. M. Behar, R. A. Rogers, P. J. Peters, M. B. Brenner, and S. A. Porcelli. 1996. "Cytoplasmic Tail-Dependent Localization of CD1b Antigen-Presenting Molecules to MHCs." *Science (New York, N.Y.)* 273 (5273): 349–52.
- Sugita, M., P. J. Peters, and M. B. Brenner. 2000. "Pathways for Lipid Antigen Presentation by CD1 Molecules: Nowhere for Intracellular Pathogens to Hide." *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 1 (4): 295–300.
- Sugita, M., S. A. Porcelli, and M. B. Brenner. 1997. "Assembly and Retention of CD1b Heavy Chains in the Endoplasmic Reticulum." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 159 (5): 2358–65.
- Sullivan, Barbara A., Niranjana A. Nagarajan, and Mitchell Kronenberg. 2005. "CD1 and MHC II Find Different Means to the Same End." *Trends in Immunology* 26 (5): 282–88. doi:10.1016/j.it.2005.03.002.
- Sutten, Eric L., Junzo Norimine, Paul A. Beare, Robert A. Heinzen, Job E. Lopez, Kaitlyn Morse, Kelly A. Brayton, Joseph J. Gillespie, and Wendy C. Brown. 2010. "Anaplasma Marginale Type IV Secretion System Proteins VirB2, VirB7, VirB11, and VirD4 Are Immunogenic Components of a Protective Bacterial Membrane Vaccine." *Infection and Immunity* 78 (3): 1314–25. doi:10.1128/IAI.01207-09.
- Suzuki, Masato, Olga Danilchanka, and John J. Mekalanos. 2014. "Vibrio Cholerae T3SS Effector VopE Modulates Mitochondrial Dynamics and Innate Immune Signaling by Targeting Miro GTPases." *Cell Host & Microbe* 16 (5): 581–91. doi:10.1016/j.chom.2014.09.015.
- Szatmari, Istvan, Peter Gogolak, Jin Seol Im, Balazs Dezso, Eva Rajnavolgyi, and Laszlo Nagy. 2004. "Activation of PPARgamma Specifies a Dendritic Cell Subtype Capable of Enhanced Induction of iNKT Cell Expansion." *Immunity* 21 (1): 95–106. doi:10.1016/j.immuni.2004.06.003.
- Szatmari, Istvan, Attila Pap, Ralph Rühl, Jiang-Xing Ma, Petr A. Illarionov, Gurdyal S. Besra, Eva Rajnavolgyi, Balazs Dezso, and Laszlo Nagy. 2006. "PPARgamma Controls CD1d Expression by Turning on Retinoic Acid Synthesis in Developing Human Dendritic Cells." *The Journal of Experimental Medicine* 203 (10): 2351–62. doi:10.1084/jem.20060141.
- Szatmari, Istvan, Daniel Töröcsik, Maura Agostini, Tibor Nagy, Mark Gurnell, Endre Barta, Krishna Chatterjee, and Laszlo Nagy. 2007. "PPARgamma Regulates the Function of Human Dendritic Cells Primarily by Altering Lipid Metabolism." *Blood* 110 (9): 3271–80. doi:10.1182/blood-2007-06-096222.
- Terrazzano, G., M. F. Romano, M. C. Turco, S. Salzano, A. Ottaiano, S. Venuta, S. Fontana, C. Manzo, S. Zappacosta, and E. Carbone. 2000. "HLA Class I Antigen Downregulation by Interleukin (IL)-10 Is Predominantly Governed by NK-kappaB in the Short Term and by TAP1+2 in the Long Term." *Tissue Antigens* 55 (4): 326–32.
- Théry, C., M. Boussac, P. Véron, P. Ricciardi-Castagnoli, G. Raposo, J. Garin, and S. Amigorena. 2001. "Proteomic Analysis of Dendritic Cell-Derived Exosomes: A Secreted Subcellular Compartment Distinct from Apoptotic Vesicles." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 166 (12): 7309–18.
- Thomssen, H., M. Kahan, and M. Londei. 1996. "IL-3 in Combination with IL-4, Induces the Expression of Functional CD1 Molecules on Monocytes." *Cytokine* 8 (6): 476–81. doi:10.1006/cyto.1996.0064.
- Tivendale, Kelly A., Catherine M. Logue, Subhashinie Kariyawasam, Dianna Jordan, Ashraf Hussein, Ganwu Li, Yvonne Wannemuehler, and Lisa K. Nolan. 2010. "Avian-Pathogenic Escherichia Coli Strains Are Similar to Neonatal Meningitis E. Coli Strains and Are Able to Cause Meningitis in the Rat Model of Human Disease." *Infection and Immunity* 78 (8): 3412–19. doi:10.1128/IAI.00347-10.

- Tobian, Aaron A. R., Nicholas S. Potter, Lakshmi Ramachandra, Rish K. Pai, Marilyn Convery, W. Henry Boom, and Clifford V. Harding. 2003. "Alternate Class I MHC Antigen Processing Is Inhibited by Toll-like Receptor Signaling Pathogen-Associated Molecular Patterns: Mycobacterium Tuberculosis 19-kDa Lipoprotein, CpG DNA, and Lipopolysaccharide." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 171 (3): 1413–22.
- Van Rhijn, Ildiko, and D. Branch Moody. 2015a. "CD1 and Mycobacterial Lipids Activate Human T Cells." *Immunological Reviews* 264 (1): 138–53. doi:10.1111/imr.12253.
- . 2015b. "CD1 and Mycobacterial Lipids Activate Human T Cells." *Immunological Reviews* 264 (1): 138–53. doi:10.1111/imr.12253.
- Vossenkämper, Anna, Olivier Marchès, Peter D. Fairclough, Gary Warnes, Andrew J. Stagg, James O. Lindsay, Paul C. Evans, et al. 2010. "Inhibition of NF- κ B Signaling in Human Dendritic Cells by the Enteropathogenic Escherichia Coli Effector Protein NleE." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 185 (7): 4118–27. doi:10.4049/jimmunol.1000500.
- Wachi, Keiko, Kazuhiro Tateda, Yoshihiro Yamashiro, Miki Takahashi, Tetsuya Matsumoto, Nobuhiko Furuya, Yoshikazu Ishii, Yoshikiyo Akasaka, Keizo Yamaguchi, and Kou Uchida. 2005. "Sepsis Caused by Food-Borne Infection with Escherichia Coli." *Internal Medicine (Tokyo, Japan)* 44 (12): 1316–19.
- Wakim, Linda M., and Michael J. Bevan. 2011. "Cross-Dressed Dendritic Cells Drive Memory CD8+ T-Cell Activation after Viral Infection." *Nature* 471 (7340): 629–32. doi:10.1038/nature09863.
- Wearsch, Pamela A., and Peter Cresswell. 2008. "The Quality Control of MHC Class I Peptide Loading." *Current Opinion in Cell Biology* 20 (6): 624–31. doi:10.1016/j.ceb.2008.09.005.
- Weber, Mary M., Robert Faris, Juanita McLachlan, Andres Tellez, William U. Wright, Gloria Galvan, Zhao-Qing Luo, and James E. Samuel. 2016. "Modulation of the Host Transcriptome by Coxiella Burnetii Nuclear Effector Cbu1314." *Microbes and Infection / Institut Pasteur*, January. doi:10.1016/j.micinf.2016.01.003.
- Xiao, Jingfan, Tao Chen, Bing Liu, Weizheng Yang, Qiyao Wang, Jiangbo Qu, and Yuanxing Zhang. 2013. "Edwardsiella Tarda Mutant Disrupted in Type III Secretion System and Chorismic Acid Synthesis and Cured of a Plasmid as a Live Attenuated Vaccine in Turbot." *Fish & Shellfish Immunology* 35 (3): 632–41. doi:10.1016/j.fsi.2013.05.022.
- Yang, Shih-Chun, Chi-Feng Hung, Ibrahim A. Aljuffali, and Jia-You Fang. 2015. "The Roles of the Virulence Factor IpaB in Shigella Spp. in the Escape from Immune Cells and Invasion of Epithelial Cells." *Microbiological Research* 181 (December): 43–51. doi:10.1016/j.micres.2015.08.006.
- Yen, Hilo, Nakaba Sugimoto, and Toru Tobe. 2015. "Enteropathogenic Escherichia Coli Uses NleA to Inhibit NLRP3 Inflammasome Activation." *PLoS Pathog* 11 (9): e1005121. doi:10.1371/journal.ppat.1005121.
- Young, David C., Anne Kasmar, Garrett Moraski, Tan-Yun Cheng, Andrew J. Walz, Jingdan Hu, Yanping Xu, et al. 2009. "Synthesis of Dideoxymycobactin Antigens Presented by CD1a Reveals T Cell Fine Specificity for Natural Lipopeptide Structures." *The Journal of Biological Chemistry* 284 (37): 25087–96. doi:10.1074/jbc.M109.000802.
- Zeng, Z., A. R. Castaño, B. W. Segelke, E. A. Stura, P. A. Peterson, and I. A. Wilson. 1997. "Crystal Structure of Mouse CD1: An MHC-like Fold with a Large Hydrophobic Binding Groove." *Science (New York, N.Y.)* 277 (5324): 339–45.
- Zhang, Lina, and Ajay Chawla. 2004. "Role of PPAR γ in Macrophage Biology and Atherosclerosis." *Trends in Endocrinology & Metabolism* 15 (10): 500–505. doi:10.1016/j.tem.2004.10.006.
- Zheng, Jun, Brian Ho, and John J. Mekalanos. 2011. "Genetic Analysis of Anti-Amoebae and Anti-Bacterial Activities of the Type VI Secretion System in Vibrio Cholerae." *PLoS ONE* 6 (8): e23876. doi:10.1371/journal.pone.0023876.

- Zink, Steven D., Lisa Pedersen, Nicholas P. Cianciotto, and Yousef Abu-Kwaik. 2002. "The Dot/Icm Type IV Secretion System of *Legionella Pneumophila* Is Essential for the Induction of Apoptosis in Human Macrophages." *Infection and Immunity* 70 (3): 1657–63.
- Zoued, Abdelrahim, Yannick R. Brunet, Eric Durand, Marie-Stéphanie Aschtgen, Laureen Logger, Badreddine Douzi, Laure Journet, Christian Cambillau, and Eric Cascales. 2014. "Architecture and Assembly of the Type VI Secretion System." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1843 (8): 1664–73. doi:10.1016/j.bbamcr.2014.03.018.