

EFFECTO DE LA PROTEÍNA E2 DEL VIRUS DE HEPATITIS C SOBRE LA ACTIVACIÓN DE CÉLULAS NK.

Delia Velásquez*, Michael Mijares**, Félix Toro***, Isaac Blanca****, Juan B. De Sanctus****.

Instituto de Inmunología. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela.

RESUMEN: *En estudios previos, se ha descrito una disminución de la activación y actividad citotóxica de las células NK en los pacientes infectados con hepatitis C; sin embargo, se desconoce el mecanismo por el cual éste fenómeno ocurre. En el presente reporte se estudió el efecto de la proteína E2 de la envoltura del virus o de la estimulación de su receptor con el anticuerpo anti-CD81 sobre la fosforilación de tirosinas, serinas, las enzimas: proteína quinasa C y fosfoinositol 3 quinasa, el factor de transcripción Nfkb y el intercambiador de nucleótidos VAV de células NK de controles normales estimulados con anti-CD16. Ambos, la proteína E2 y anti-CD81, combinado o por separado inducen una disminución de la fosforilación de tirosinas y serinas, así como una marcada disminución de la fosforilación de PKC, Nfkb, PI3K y en menor grado VAV. Se concluye que la proteína E2 sola y en conjunto con anti-CD81 inducen señales inhibitorias responsables de la disminución en la activación de las células NK de pacientes infectados por el VHC y que éste fenómeno puede ser responsable de la cronicidad que se reporta en dicha enfermedad.*

Palabras clave: *Células NK, Virus de hepatitis C, CD16, CD81, Proteína E2, Proteína quinasa C (PKC), Proteína inositol quinasa 3 (PI3K), Nfkb, VAV.*

ABSTRACT: *The decrease in NK cell activation and cytotoxic activity in patients infected with hepatitis C virus has been described; however, the mechanism by which this phenomenon occurs is not known. In the present report, the effect of the E2 protein of the virus envelope or the stimulation of its receptor CD81 with the antibody anti-CD81 on the phosphorylation of tyrosines, serine, the enzymes protein kinase C, phosphoinositol kinase 3 (PI3K), the transcription factor Nfkb and the nucleotide exchange protein VAV was assessed in NK cells from normal controls stimulated with anti-CD16. Both the protein E2 and anti-CD81 by themselves or combined, generated a decrease in tyrosine, serine, and a marked decrease in the phosphorylation of PKC, Nfkb, PI3k and in less extent in VAV. It is concluded that the E2 protein alone and combined with anti-CD81 induce inhibitory signals responsible for the decrease in the activation of NK cells of infected HCV patients and it could be responsible for the chronicity observed in this disease.*

Key words: *NK cells, Hepatitis C virus, CD16, CD81, E2 protein, Protein kinase C (PKC), Inositol protein kinase 3 (PI3K), Nfkb, VAV.*

INTRODUCCIÓN

El virus de la hepatitis C (VHC) infecta a aproximadamente el 3% del mundo latino y es actualmente la principal causa de hepatitis crónica, cirrosis hepática y hepatocarcinoma¹⁻³. El VHC pertenece a la familia Flaviviridae; posee una envoltura glico y lipo proteica y una cadena positiva de ARN⁴. Su genoma codifica para una única poliproteína de unos 3.000 aminoácidos, que se escinde con la ayuda de proteasas celulares y virales para producir al menos 10 productos⁴. Dentro de los productos de hidrólisis, se encuentran las glicoproteínas E1 y E2 que son proteínas transmembrana (TM) tipo I y contienen dominios altamente glicosilados en el N-terminal y C-terminal³⁻⁵. Durante la síntesis de ésta pro-

* Estudiante de la Maestría del postgrado en inmunología básica.

** Profesor Agregado. Facultad de Farmacia adscrito al Instituto de Inmunología.

*** Profesor Agregado, Instituto de Inmunología, Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela.

**** Profesor Titular. Instituto de Inmunología, Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela.

Recibido: 27-01-12.

Aceptado: 20-04-12.

teína, los ectodominios E1 y E2 se translocan en el interior del lumen del retículo endoplásmico (RE) y sus dominios TM se insertan en la membrana de este compartimiento³⁻⁵. En el procesamiento final del virus, los segmentos de RE que contienen los heterodímeros E1 y E2 quedan ensamblados en la envoltura viral³⁻⁵ que al interactuar con receptores celulares que anclan y promueven la entrada del virus y la fusión del virus con las membranas celulares⁶⁻⁷. La proteína de la familia de las tetraspaninas, CD81, el receptor remanentes (scavenger) BI (SR-BI) y las proteínas de la zona ocludens, claudina 1 y ocludina, han sido identificadas como esenciales para la entrada del virus a la células⁶⁻⁷. Sin embargo, la unión directa del heterodímero E1E2 se ha confirmado sólo para CD81⁶⁻⁷. La estructura general y las funciones del heterodímero E1E2 no difieren significativamente entre los siete genotipos del VHC³.

La respuesta inmune contra el VHC ha sido estudiada extensamente⁸; sin embargo, todavía persisten muchas dudas sobre las razones que conllevan a la cronicidad de la infección. Corado y colaboradores⁹ demostraron la disminución de la actividad citotóxica de las células NK como un posible mecanismo de la persistencia viral.

Las células NK son activadas e inhibidas por múltiples receptores¹⁰⁻¹¹. Los receptores activadores poseen secuencias de activación basados en tirosina (ITAM) que activan las señal vía tirosina quinasas y receptores inhibidores de la activación de tirosinas (ITIM) que activan las fosfatasa inhibiendo las señales celulares. El receptor Fc de baja afinidad para la IgG (CD16) posee una secuencia ITAM y por tanto produce la activación de la célula¹¹. El receptor CD16 está involucrado en la actividad citotóxica asociada a anticuerpos (ADCC). Por ello, los procesos que inducen la reducción de la activación producida por la activación vía CD16 son debido a un reclutamiento de secuencias ITIM. Dentro de las múltiples vías de activación, la vía de la activación de las quinasas C (PKC), inositol 3 quinasas (PI3K), el factor de transcripción NFκB (promotor de las citoquinas proinflamatorias) y el intercambiador de nucleótidos de la familia Dbl, VAV puede ser importante para analizar el peso de señales activadoras e inhibidoras¹⁰⁻¹². La inhibición de PKC y NFκB son críticas para disminuir la actividad lítica¹⁰⁻¹² a diferencia del efecto en PI3K como inductora de proliferación y sobrevivencia de VAV que puede ser reclutado por receptores inhibidores. Por ello, el objetivo del presente trabajo fue analizar el posible efecto de la proteína E2 del VHC y de CD81 sobre las vías de señalización en linfocitos NK de individuos controles sanos estimulados con anti-CD16.

MÉTODOS

Las células NK fueron obtenidas a partir de 50 ml de sangre periférica de donantes voluntarios sanos (protocolo y consentimientos aprobados por el Comité de Ética del Instituto

de Inmunología) usando el estuche comercial de aislamiento celular RosetteSept® (Stem Cell, Canadá) para células NK. El estuche consiste en una serie de anticuerpos modificados con dos Fab, una de unión a glicoforina (antígeno expresado en los glóbulos rojos) y otro a diversos antígenos de interés expresados en las poblaciones celulares que se desea eliminar; en nuestro caso las células positivas para CD3, CD19, CD14. La sangre se mezcla con el cóctel de anticuerpos según protocolo descrito por el fabricante y luego la población celular es centrifugada a 550 x g por 30 min sobre un gradiente de densidad de Ficoll-hypaque quedando en la interfase plasma/Ficoll-hypaque las células de interés y en el fondo del tubo la mezcla de glóbulos rojos y los otros leucocitos.

Luego de separar las células NK, las mismas fueron estimuladas como fue descrito por Márquez y colaboradores¹³. Brevemente, un millón de células NK se incubaron con IgG de ratón anti CD16 humano (clone 3G8, Santa Cruz Biotechnology) en frío por 30 minutos. Los anticuerpos no fijados se eliminaron por centrifugación en frío por 10 min. Las moléculas de anti-CD16 fueron entrecruzadas mediante incubación con 10 µg/ml de anti IgG de ratón (Santa Cruz Biotechnology), por 30 minutos a 37°C. El control del experimento refiere el mismo esquema de incubación en ausencia de anticuerpos.

Las células estimuladas vía anti CD16, fueron incubadas por 5 minutos a 37°C con: 1) PBS (control), b) anti-CD81 (Ansell Corporation), c) con la proteína recombinante de 70 Kd E2, del virus (Immunodiagnosics, Inc), d) con la mezcla de ambos (anti CD81 y la proteína E2). Al finalizar la incubación, las células fueron lisadas y las proteínas fueron separadas por electroforesis y transferidas a membranas de Nytran® por Western blot como se describió anteriormente¹³.

Para el análisis de las proteínas totales y fosforiladas se empleó el esquema de incubación usando los anticuerpos anti fosfo tirosina total G410 y anti Fosfo serina total de la casa comercial Sigma Chemical Corporation. Para los específicos se usaron anti PI3K total y anti fosfo-PI3K p85 (Tir458)/p55 (Tir199), anti p65 NFκB total y anti fosfo p65 NFκB (Ser 536), anti PKC total y anti PKC fosforilado (Ser 660) y anti VAV total y anti VAV fosforilado (Tir 174) de la empresa generados en ratón de la empresa Cell Signaling. Los anticuerpos secundarios de cabra anti IgG de ratón peroxidasa se usaron de la compañía Calbiochem a una relación 1:1000. La detección de las bandas se realizó utilizando el kit de luminiscencia de Pierce para detección de picogramos de proteína con el papel fotográfico de alta definición de Kodak. Las bandas visualizadas en las placas fotográficas fueron analizadas por un densitómetro para determinar la relación entre la cantidad de proteína fosforilada vs. Total en cada caso. Se analizaron tres concentraciones de la proteína E2, dos de anti CD81 y tres de la mezcla anti CD81/proteína E2 en tres ensayos independientes.

Relación de densidad espectrofotométrica de las proteínas fosforiladas vs totales.

Tratamiento	NFκβ	PKC	PI3K	VAV
Control	0,1±0,1	0,05±0,1	0,1±0,1	0,3±0,1
Anti CD16	0,7±0,2	0,8±0,2	0,8±0,2	0,8±0,2
E2				
50 ng	0,6±0,2	0,6±0,1	0,5±0,2	0,5±0,1
100 ng	0,5±0,1	0,4±0,1*	0,4±0,1*	0,4±0,2*
200 ng	0,4±0,1	0,3±0,1*	0,4±0,1*	0,4±0,2*
Anti CD81				
100 ng	0,4±0,1*	0,4±0,1*	0,3±0,1*	0,4±0,1*
1000 ng	0,3±0,2*	0,2±0,2*	0,2±0,1*	0,3±0,1*
Anti CD81 + 1 µg+E2				
50	0,2±0,1*	0,2±0,1*	0,2±0,1*	0,6±0,2
100	0,1±0,1*	0,1±0,1**	0,3±0,1*	0,4±0,1*
200	0,05±0,1**	0,05±0,1**	0,2±0,1*	0,4±0,1*

Leyenda: Relación de proteína fosforilada vs. Total de las diferentes señales estudiadas. Las relaciones se realizaron con los valores obtenidos de los ensayos densitométricos obtenidos de los resultados de los diferentes experimentos promediados (n=3). Las diferencias estadísticas se resantan * P < 0,05 y ** P < 0,01 por ensayos estadísticos no paramétricos (prueba de Fisher).

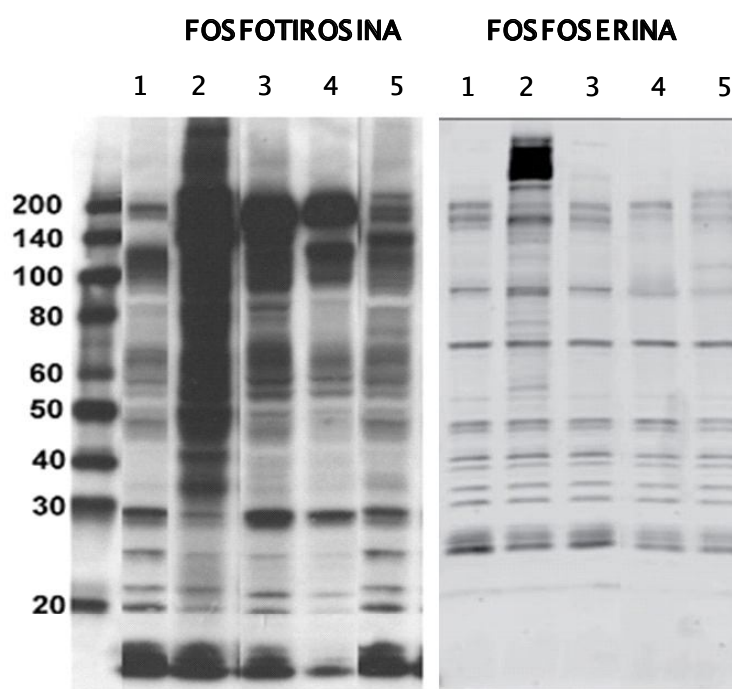
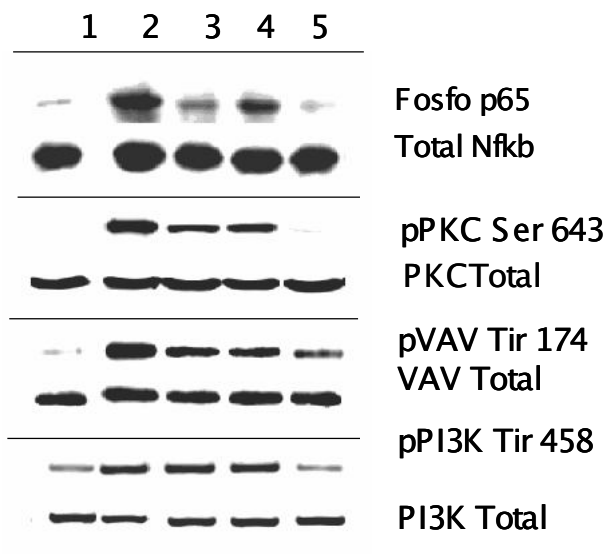


Figura 1. Inhibición de las células NK estimuladas vía anti-CD16 por la proteína E2 del VHC y anti CD81. Los números de la izquierda representan los pesos moleculares y los números en la parte superior son: 1) control sin estimular, 2) anti-CD16, 3) proteína E2 (200 ng), 4) anti-CD81 (1 µg/ml), 5) proteína E2 (200 ng) más anti-CD81 (1 µg/ml),

Figura 2. Efecto de la proteína E2 del VHC y anti CD81 sobre las diversas proteínas de señales celulares. Representación de un experimento típico.. Los números en la parte superior son: 1) control sin estimular, 2) anti-CD16, 3) proteína (E2 200 ng), 4) anti-CD81 (1 µg/ml), 5) proteína E2 (200 ng) más anti-CD81 (1 µg/ml),



RESULTADOS

El análisis de la proteínas fosforiladas en los amino ácidos tirosina y serina está representado en la primera figura. Se puede evidenciar que la activación con anti CD16 incrementa la fosforilación de los dos tipos de amino ácidos y que en presencia tanto de la proteína E2, como anti CD81 y la mezcla de ambas y una disminución apreciable de los patrones de fosforilación en la mayoría de las bandas. Sin embargo, la disminución de las proteínas fosforiladas en la tirosina es mucho más evidente que en las fosforiladas en la serina.

La figura 2 demuestra el efecto de los diferentes tratamientos sobre la fosforilación de Nfkb p65, PKC, VAV y PI3K. Se observa una marcada disminución de fosfo p65 Nfkb y fosfo PKC en comparación a la contraparte VAV y PI3K en presencia de la proteína E2 y anti CD81. Sin embargo, cuando se combinan anti CD81 y la proteína E2, la disminución de las señales celulares involucradas es evidente en todas.

Para demostrar el efecto combinado de los tres ensayos realizados, la tabla 3 ilustra la relación entre las proteínas fosforiladas y totales. La presencia de anti CD81 y proteína E2 produce inhibiciones significativas ($P < 0,05$ y $P < 0,01$) del grupo de proteínas fosforiladas. La mayor disminución se observa en Nfkb, PKC y PI3K y en menor grado en VAV.

DISCUSIÓN

La activación de las células NK es crítica en la respuesta inmune innata para la eliminación de infecciones virales. La disminución de la actividad de las células NK parece ser responsable de la condición de cronicidad característica en las

infecciones por HCV9 y ciertas proteínas virales en conjunto con receptores celulares son responsables de éste fenómeno⁸. Se ha propuesto que el heterodímero E1E2 en la envoltura del VHC es el responsable del fenómeno¹⁴⁻¹⁵; sin embargo, el papel de E2 como inhibidor de la actividad de las células NK ha sido parcialmente asociado con la expresión de CD81 (receptor que induce señales inhibitoras) sin dilucidar la presencia de otros receptores¹⁵. La importancia de la expresión de CD81 ha sido también analizada en células de pacientes VHC+; D'Agosto y colaboradores¹⁶ demostró que la expresión de CD81 en células B está asociado con cronicidad y a un incremento de la infección por VHC.

En el presente trabajo, se trató de demostrar que las señales inducidas por la proteína E2 y la señalización vía CD81 por el anticuerpo pueden afectar a la célula NK activada. Llamativamente, la co-incubación reduce preferencialmente la activación celular vía tirosina quinasa. La disminución en la actividad quinasa está relacionada con la marcada disminución de la actividad de la PKC, PI3K y Nfkb. La disminución de la fosforilación de estas proteínas está en concordancia con la reducida actividad lítica de las células de los pacientes VHC previamente reportada⁹. La disminución moderada del intercambiador de nucleótidos VAV sugiere que el mismo puede ser reclutado parcialmente por receptores inhibitoras¹⁰⁻¹².

El efecto sumatorio de anti-CD81 y de la proteína E2 sugiere que CD81 es un receptor inhibitorio importante, pero la proteína E2 puede interactuar con otro receptor inhibitorio celular. Del trabajo de D'Agosto se podría concluir que la sobre expresión de CD81 por parte de la célula infectada en conjunto con una expresión de E2 es responsable del escape viral y de la cronicidad descrita en ésta enfermedad. Aun

cuando se desconoce que tipo de receptor inhibitor, aparte de CD81, puede estar asociado con los efectos de la proteína E2 en ésta interacción, sería importante analizar el posible efecto de liposomas dentro de los efectos de fusión y reclutamiento de fosfatasa que inhiban los primeros pasos de la activación celular inducidas por secuencias ITAM.

Se concluye que dentro de los mecanismos de cronicidad en los pacientes infectados con VHC, la proteína E2 del virus y el antígeno celular CD81 reclutan señales inhibitorias que afectan la activación celular y posiblemente la actividad lítica de las células NK de éstos pacientes.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al CDCH, proyecto PG09.7282.2008-1 y al FONACIT, proyecto G-2005000395, el apoyo financiero para el presente trabajo.

REFERENCIAS

1. Kershenovich D, Razavi HA, Sánchez-Avila JF, Bessone F, Coelho HS, Dagher L, Gonçalves FL, Quiroz JF, Rodríguez-Pérez F, Rosado B, Wallace C, Negro F, Silva M. Trends and projections of hepatitis C virus epidemiology in Latin America. *Liver Int.* 2011; 31 Suppl 2:18-29.
2. Kershenovich D, Razavi HA, Cooper CL, Alberti A, Dusheiko GM, Pol S, Zuckerman E, Koike K, Han KH, Wallace CM, Zeuzem S, Negro F. Applying a system approach to forecast the total hepatitis C virus-infected population size: model validation using US data. *Liver Int.* 2011; 31 Suppl 2:4-17.
3. Lemon SM, Walker C, Alter MJ, Yi M. Hepatitis virus, en el libro *Fields virology* editado por Knipe DM, Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE. 5ta edición, 2007 Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA. pp 1253-1304
4. Appel N, Schaller T, Penin F, Bartenschlager R. From structure to function: new insights into hepatitis C virus RNA replication. *J Biol Chem.* 2006; 281(15):9833-6.
5. Cocquerel L, Voisset C, Dubuisson J. Hepatitis C virus entry: potential receptors and their biological functions. *J Gen Virol.* 2006; 87(Pt 5):1075-84.
6. Popescu C I, Dubuisson J. Role of lipid metabolism in hepatitis C virus assembly and entry. *Biol. Cell* 2010; 102:63-74.
7. Rothwangl K B, Manicassamy B, Uprichard SL, Rong L. Dissecting the role of putative CD81 binding regions of E2 in mediating HCV entry: putative CD81 binding region 1 is not involved in CD81 binding. *Viol. J.* 2008; 5:46.
8. Irshad M, Khushboo I, Singh S, Singh S. Hepatitis C virus (HCV): a review of immunological aspects. *Int Rev Immunol.* 2008;27(6):497-517.
9. Corado J, Toro F, Rivera H, Bianco NE, Deibis L, De Sanctis JB. Impairment of natural killer (NK) cytotoxic activity in hepatitis C virus (HCV) infection. *Clin Exp Immunol.* 1997; 109(3):451-7.
10. Bryceson YT, Chiang SC, Darmanin S, Fauriat C, Schlums H, Theorell J, Wood SM. Molecular mechanisms of natural killer cell activation. *J Innate Immun.* 2011;3(3):216-26
11. Long EO. Negative signaling by inhibitory receptors: the NK cell paradigm. *Immunol Rev.* 2008; 224:70-84.
12. Graham DB, Cella M, Giurisato E, Fujikawa K, Miletic AV, Kloepfel T, Brim K, Takai T, Shaw AS, Colonna M, Swat W. Vav1 controls DAP10-mediated natural cytotoxicity by regulating actin and microtubule dynamics. *J Immunol.* 2006; 177(4):2349-55.
13. Márquez ME, Millet C, Stekman H, Conesa A; Deglesne PA, Toro F, De Sanctis J, Blanca I. CD16 cross-linking induces increased expression of CD56 and production of IL-12 in peripheral NK cells. *Cellular Immunology.* 2010. *Cell Immunol.* 2010; 264(1):86-92.
14. Tseng CT, Klimpel GR. Binding of the hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 inhibits natural killer cell functions. *J Exp Med.* 2002 ; 195(1):43-9.
15. Crotta S, Stilla A, Wack A, D'Andrea A, Nuti S, D'Oro U, Mosca M, Filliponi F, Brunetto RM, Bonino F, Abrignani S, Valiante NM. Inhibition of natural killer cells through engagement of CD81 by the major hepatitis C virus envelope protein. *J Exp Med.* 2002; 195(1):35-41.
16. D'Agosto G, Trento E, Nosotti L, Bordignon V, Battista M, Prignano G, Pimpinelli F, Biolcati G, Macri A, Palamara G, Migliorini L, Morrone A, Di Carlo A, Cordiali-Fei P, Ensoli F. CD81 expression on CD19+ peripheral blood lymphocytes is associated with chronic HCV disease and increased risk for HCV infection: a putative role for inflammatory cytokines. *J Biol Regul Homeost Agents.* 2009; 23(3):155-64.

CORRESPONDENCIA: Dr. Juan B. De Sanctis. Instituto de Inmunología, Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela. Apartado 50109. Sabana Grande. Caracas 1050-A. Venezuela. Correo electrónico: juan.desanctis@ucv.ve
Financiamiento: Proyectos CDCH PG09.7282.2008-1 y FONACIT G-2005000395.