

CÍNTIA RAQUEL BOMBARDIERI

O CIRCUITO p38MAPK-MSK1 INFLUENCIA
O PERÍODO INICIAL DE DIFERENCIAÇÃO
Th1/2

Tese de Doutorado Direto
apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Doutor em
Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientadora: Prof. Dr. Maristela Martins de Camargo

São Paulo

2007

Resumo

BOMBARDIERI, C. R. **O circuito p38MAPK/MSK1 influencia o período inicial de diferenciação Th1/2.** Tese (Doutorado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Palavras chave: linfócito, quinase, IFN- γ , IL-4.

O sistema imune dos mamíferos forma uma complexa rede de populações celulares especializadas e vias de sinalização extremamente reguladas. Linfócitos T *naïve* podem diferenciar-se após encontro com o antígeno em pelo menos duas sub-populações distintas, Th1 ou Th2, sendo que o papel do circuito p38MAPK/MSK1 durante este período inicial de ativação não é completamente entendido. Linfócitos T CD₄⁺ *naïve* humanos foram estimulados *in vitro* em condições não-polarizantes (Tnp), Th1 ou Th2, na presença de inibidor específico da p38MAPK. As células ativadas e mantidas em condições diferenciadoras Th1 ou Th2 na presença do inibidor SB203580, apresentaram menor produção de IFN- γ e maior produção de IL-4. Através do bloqueio do RNAm da MSK1 por siRNA, observamos o mesmo efeito resultante da inibição da p38MAPK, fato que foi confirmado em experimentos com linfócitos T de camundongos MSK1-deficientes. A alteração da produção das citocinas características de cada população parece ser decorrente da alteração da expressão da IL12R β 2 e IL4R α dos receptores de citocinas da IL-12 e IL-4, respectivamente. Desta forma, os nossos dados sugerem que o circuito p38MAPK/MSK1 participa do processo de ativação dos linfócitos T mantidos em condições diferenciadoras Th1/2.

Abstract

BOMBARDIERI, C. R. **The p38MAPK/MSK1 circuit influences the early stages of differentiation of Th1/2 cells.** [Thesis] Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, 2007.

Key words: lymphocyte, kinase, IFN- γ , IL-4.

The mammalian immune system form a complex network of highly regulated signaling pathways and populations of specialized cells. After meeting with the antigen naïve T cells differentiate into at least two distinct sub-populations, Th1 or Th2, and the role of the circuit p38MAPK/MSK1 during this initial period of activation is not completely understood. Human CD₄⁺ T lymphocytes were stimulated in vitro under non-polarized, Th1 or Th2 conditions, in the presence of a specific p38MAPK inhibitor. The cells activated and differentiated under Th1 or Th2 condition in the presence of inhibitor SB203580, had decreased production of IFN- γ and increased IL-4. By silencing MSK1 through siRNA, we observed the same effect due to inhibition of p38MAPK, an observation that was confirmed in experiments with T lymphocytes from mice deficient of MSK1. The change in the production of cytokines appears to be a result of altered expression of IL12R β 2 and IL4R α receptors of the cytokines IL-12 and IL-4, respectively. Taken together, our data suggest that the circuit p38MAPK/MSK1 plays a key role in the activation of human T cells maintained under Th1/2 differentiation conditions.

1 - Introdução

1.1. Vias de sinalização MAPKs

As vias de sinalização MAPKs (do inglês *mitogen-activated protein kinases*) conectam os receptores de superfície celular aos elementos regulatórios das células. MAPKs podem ser ativadas em resposta ao estresse químico ou físico e podem fosforilar diversas proteínas, regulando diversas funções celulares, incluindo a mitose, o metabolismo, influxo de íons transmembrana, diferenciação, apoptose, migração/quimioatração, desenvolvimento dos linfócitos e produção de mediadores inflamatórios. Além disso, algumas proteínas quinases podem fosforilar outras quinases alvo (2, 3).

A atividade das MAPKs é regulada segundo uma organização característica, composta pela seguinte sequência: *MAPKK kinase ou MEK kinase* (do inglês *mitogen-activated protein kinase kinase kinase*, também denominada MAPKKK, MAP3K ou MEKK), *MAPK kinase* (do inglês *mitogen-activated protein kinase kinase*, denominada MAPKK, MAP2K, MKK ou MEK) e uma MAPK(2). Elas são ativadas pela fosforilação de um motivo conservado de treonina e tirosina "TXY" (onde X é E para ERK, G para p38MAPK, ou P para JNK). Há três principais famílias de MAPKs: *extracellular signal regulated protein kinases*, consistindo em ERK1 e 2, as p38MAPK (p38 α , β , γ e δ) e Jun NH₂-terminal quinases (JNK1, 2, 3 e Tyk2). Cada família de MAPK possui no mínimo duas MAP2K cognatas e múltiplas MAP3K. A ERK1/2, também denominadas p44 e p42MAPK podem ser ativadas pela MAPKK1 ou MAPKK2. As p38MAPKs são ativadas pela MKK3, MKK4 e MKK6, enquanto a JNK é ativada pela MKK4 e a MKK7 (2). Estas MAP2K são ativadas por diversas MAP3K que são ativadas por diferentes sinais *upstream*. Desta forma, a via de ERK pode ser ativada através de Ras (do inglês *RAS-GTPase-activating protein*) através do grupo Raf da MAP3K. Já as vias da p38MAPK e JNK são ativadas pela família Rho de GTPases, incluindo Rac (do inglês *GTPase-activating protein*) e Cdc42 (do inglês *CDC42-specific guanine nucleotide exchange factor*) (2).

1.1.1. p38MAPK

A p38MAPK foi inicialmente identificada por diferentes grupos utilizando abordagens diferentes. Primeiramente ela foi reconhecida como uma proteína de 38kDa, sendo a principal proteína fosforilada quando linhagens celulares de macrófagos murinos eram estimulados com LPS (*lipopolysaccharide*) (4). Ela também foi identificada como a proteína quinase ativada pela IL-1 que ativa a proteína quinase MAPKAP quinase 2 (do inglês *mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2*)(5, 6), e como sendo o alvo de drogas antiinflamatórias que inibem a síntese de IL-1 e TNF- α por monócitos humanos (7). Subseqüentemente, descreveu-se que a p38MAPK e o seu homólogo Hog1 (do inglês *p38MAPK homolog*) em *Saccharomyces cerevisiae*, eram responsivos a estímulos de estresse (4).

A atividade da p38MAPK é induzida principalmente por estímulos de estresse (como o choque osmótico, hipóxia, proteínas de choque térmico e radiação ultravioleta), além de ser ativada por estímulos pró-inflamatórios e citocinas, como a IL-1, TGF- β (do inglês *transforming growth factor β*) e TNF- α (do inglês *tumor necrosis factor α*) (5, 6, 8, 9).

A p38MAPK é uma quinase conservada evolutivamente. Em *Drosophila*, há duas isoformas da p38MAPK que parecem regular a expressão gênica imune (10). Nos mamíferos existem quatro isoformas da p38MAPK, cada uma codificada por um gene em separado. A p38 α e a p38 β apresentam 74% de similaridade na sua seqüência de aminoácidos e são amplamente expressas (11). Elas possuem substratos comuns *in vitro*, como a MBP (do inglês *myelin basic protein*), ATF-2 (do inglês *activating transcription factor-2*) e MAPKAPK2, mas diferem na atividade. Por exemplo, a p38 β (11) é mais ativa na fosforilação da ATF-2. A p38 γ apresenta 63% de similaridade na seqüência de aminoácidos com a p38 α , e sua distribuição é restrita aos músculos esqueléticos (12). A p38 γ possui a capacidade de fosforilar apenas a MBP, mas não a ATF-2 ou a MAPKAPK2 (13). A p38 δ por sua vez, comparando-se com a p38 α , possui 61% de similaridade na

seqüência de aminoácidos, e está presente nas células T CD₄⁺, nos testículos, pâncreas e no intestino delgado (14, 15).

Apesar do alto grau de similaridade, e a mesma preferência pelos sítios de fosforilação – serinas e/ou treoninas que precedem prolinas – pelo menos *in vitro* as diferentes isoformas apresentam especificidades diferentes para os diversos substratos. Os substratos *in vitro* da p38MAPK incluem os fatores de transcrição ATF-2 (8), e CHOP/GADD153 (do inglês *stress-inducible transcription factor CHOP/gadd153*), um membro da família dos fatores de transcrição do C/EBP (do inglês *CCAAT enhancer binding protein*), que medeiam os efeitos de estresse celular nos processos de crescimento e diferenciação (16); Elk-1 (do inglês *member of ets oncogene family*)(8, 17), MEF-2C (do inglês *nuclear receptor coactivator 2*) (18), e SAP-1 (do inglês *sphingolipid activator protein 1*), que ativam *c-fos* e aumentam a ativação gênica (17), e proteínas quinases incluindo a MAPKAP quinase 2 e 3 (5, 6, 19, 20), Mnk1 e 2 (do inglês *mapk-interacting kinase 1/2*) (21, 22), PRAK (do inglês *p38-regulated/activated kinase*) (23) e RSK-B (do inglês *ribosomal protein S6 kinase* ou MSK2)(24).

Uma característica comum de todos os homólogos da p38MAPK é a presença de um sítio de ativação com 12 aminoácidos. Este sítio contém a seqüência “TGY” (25). Entre as quinases *upstreams*, foi demonstrado que a MKK3 fosforila seletivamente as isoformas α e γ (26), enquanto a MKK6 fosforila todos os homólogos (27, 28). A MKK4 por sua vez, pode ativar tanto a via de p38MAPK como a via da JNK (11).

Nos linfócitos T há uma via alternativa de ativação da p38MAPK, onde a estimulação do TCR (do inglês *T-cell receptor*) resulta ativação de Lck (do inglês *lymphocyte-specific protein-tyrosine kinase*), que fosforila as subunidades de ITAMs (do inglês *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) associados ao TCR, resultando na ativação de Zap70 (do inglês *zeta-chain-associated protein kinase*), no qual fosforila a p38MAPK na Tyr323 (tirosina na posição 323) (29). As células T estimuladas através do TCR utilizam um mecanismo alternativo de ativação, onde a fosforilação da Tyr323 possibilita a autofosforilação da p38MAPK nos resíduos Thr180 e Tyr182 (treonina na posição 180 e tirosina na posição 182), de maneira dependente da Zap70 e independente da proteína adaptadora LAT (do inglês *linker for*

activation of T cells) (30), possibilitando que a p38MAPK se autofosforile e ative os seus substratos (Figura 1).

A ativação da p38 MAPK pela autofosforilação nos resíduos Thr180 e Tyr182 mediada via estimulação do TCR pode ser inibida pelo SB203580 (31). Portanto a ativação é dependente da própria quinase. Este inibidor SB203580 é um componente pirimidil imidazólico amplamente usado que inibe especificamente as isoformas α e β da p38MAPK (32). O SB203580 inibe a produção de citocinas e a proliferação induzida por mitógenos pela estimulação via TCR, com ou sem a coestimulação mediada por CD28 (33-35).

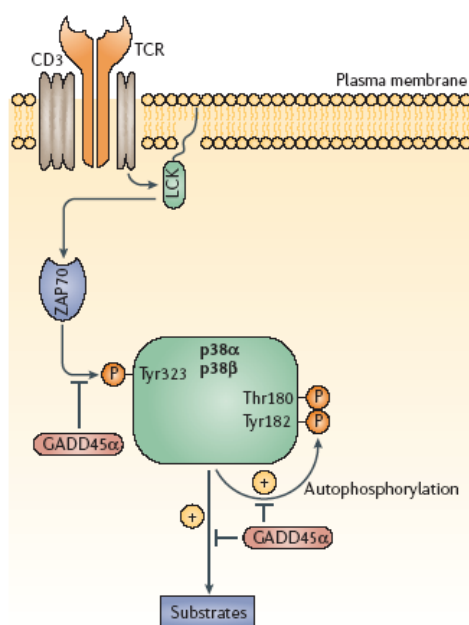


Figura 1 – A estimulação via TCR resulta na ativação de LCK e na ZAP70, que fosforila a p38 no resíduo de tirosina 323, que induz a autofosforilação e a atividade dos seus substratos. Figura: Ashwell, 2006.

A ativação da p38MAPK pode ser terminada pela ação de fosfatases como a MAPK fosfatase 1 (36) através de retroalimentação negativa que envolve uma fosfatase com especificidade única (serina) WIP1 (do inglês *protein phosphatase, magnesium-dependent*). Esta fosfatase pode ser ativada pela via dependente de p38–p53 (37) ou por outros mecanismos reguladores (38).

1.1.2. MSK1/MSK2

Dentre as proteínas quinase ativadas pela p38MAPK está a MSK1 (do inglês *mitogen- and stress-activated protein kinase*) e a sua isoforma MSK2, que apresenta 75% de similaridade na sequência de aminoácidos. Estas quinases foram recentemente descritas e são ativadas tanto pela p38MAPK como pelas ERK-1/2 (24, 39, 40). As MSKs parecem ser expressas constitutivamente no núcleo das células (40), sendo as únicas proteínas quinase descritas capazes de fosforilar histona H3 (41, 42), além de fosforilar alguns fatores de transcrição como o CREB (do inglês *cAMP response element-binding protein*) e ATF1 (do inglês *activating transcription factor 1*) (43, 44) e HMG-14 (do inglês *high-mobility group protein 14*) (41) em resposta a estímulos de estresse e mitose. As MSKs são requeridas na indução de vários *immediate early genes*, incluindo o *c-fos*, *junB* (do inglês *oncogene JunB*), *mkp-1* (do inglês *MAPK phosphatase-1*) (45), *nurr 1* (do inglês *nuclear receptor subfamily 4, group a, member 2*), *nor 1* (do inglês *oxidored-nitro domain-containing protein 1*) e *nur 77* (do inglês *nuclear receptor subfamily 4, group a, member 1*) (46).

A MSK1 possui uma sequência de 802 aminoácidos com peso molecular de 89.9kDa (40). A MSK1 possui dois domínios quinase, cada domínio possui os 11 subdomínios característicos de todas as proteínas quinase (47). A sequência de aminoácidos da MSK2 murina e humana apresenta 90% de similaridade (40). Em camundongos o gene codificante da MSK1 localiza-se no cromossomo 12F, enquanto o da MSK2 está localizado no cromossomo 19B (43).

A regulação negativa da atividade das MAPKs é feita primariamente pelas *MAPK fosfatases* (MKPs), que são um grupo de 11 fosfatases específicas que desfosforilam as MAPKs nos seus resíduos regulatórios de Treonina e Tirosina (48). MKP-1 é um membro desta família, e foi clonada inicialmente como um *early response gene* induzido por fatores de crescimento (49, 50). MKP-1 localiza-se no núcleo através de sua extremidade N-terminal (51) e desfosforila preferencialmente a p38MAPK, JNK e em menor extensão ERK1/2 (52). Utilizando células deficientes em MKP-1, diversos grupos têm demonstrado que a deficiência desta fosfatase

resulta na maior ativação de p38MAPK e JNK em resposta a diferentes estímulos (51, 53, 54). Nos camundongos deficientes de MKP-1, observou-se a ativação sustentada de p38MAPK e JNK. Desta forma, a MKP-1 atenua a atividade de p38MAPK e JNK na regulação da produção de citocinas pró e antiinflamatórias (55). Assim sendo, MAPKs e MKP devem apresentar uma inter-relação dinâmica no controle do balanço da resposta imune, através da regulação dos diversos aspectos da resposta imune e na regulação gênica.

1.2. Receptores de citocinas

As citocinas possuem um papel fundamental no desenvolvimento, diferenciação e função das células linfóides e mieloides. Estes fatores estimulam a proliferação, diferenciação e induzem sinais de sobrevivência, bem como induzem funções especializadas em resposta aos patógenos (56).

As citocinas se ligam com alta afinidade aos seus receptores de citocinas, que são formados por homo ou heterodímeros, e a dimerização das subunidades do receptor de citocina é suficiente para iniciar a sinalização (57, 58). A via de sinalização envolve uma família de proteínas denominada Jaks (do inglês *Janus family tyrosine kinases*) e STATs (do inglês *signal transducers and activators of transcription*). Estas vias são importantes tanto para os interferons de tipo I e II, também conhecidas como citocinas do tipo II e incluem $IFN\alpha/\beta$, $IFN-\gamma$, $IFN-\omega$, IL-10, e seus novos membros, que ainda possuem funções desconhecidas: IL-19, IL-20, IL-22/IL-TIF, IL-24 (mda-7), e IL-26 (AK155) (59). Além disso, são importantes a todas as citocinas cujos receptores são membros da superfamília dos receptores de citocinas, também conhecidos como receptores de citocinas do tipo I. As citocinas do tipo I incluem as citocinas IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, GM-CSF, IL-7, IL-9, IL-13, IL-15, IL-6, IL-11, OSM, CNTF, CT-1, além do hormônio de crescimento, prolactina eritropoetina e trombopoetina. A via Jak-STAT representa uma via de sinalização extremamente rápida, que liga a superfície celular ao núcleo (56).

1.2.1. Receptor da IL-12

A IL-12 é uma citocina heterodimérica (p35/p40) produzida por monócitos ativados e células dendríticas e que possui um papel importante na indução da produção de IFN- γ . O receptor da IL-12 por sua vez, é composto por duas cadeias, a $\beta 1$ e a $\beta 2$ (60) e é expresso em linfócitos T e células NK. Ambas as cadeias possuem grande homologia com gp130, a cadeia β comum do receptor da superfamília da citocina IL-6 *like* (60, 61). As cadeias IL12R $\beta 1$ e IL12R $\beta 2$ são glicoproteínas transmembranas e a co-expressão de ambas as cadeias é necessária para que ocorra a formação de um sítio de ligação de alta afinidade a IL-12 e a sinalização seja eficiente (60). A ativação dos linfócitos T via TCR aumenta a transcrição e a expressão de ambas as cadeias, em especial da IL12R $\beta 2$, cuja expressão é aumentada pela presença da IL-12, IFN- γ , IFN- α , TNF- α , e pela co-estimulação do CD-28 (62, 63). A sinalização intracelular ocorre pela fosforilação de uma proteína de 85kDa que se encontra associada a IL12R $\beta 1$, em resposta a IL-12 (64). A sinalização via receptor da IL-12 induz a fosforilação da tirosina da Janus kinase 2 (Jak2) e Tyk-2, que fosforilam e ativam Stat1, 3, 4 e 5 (60). Os efeitos celulares específicos a IL-12 são decorrentes principalmente da ativação de Stat4.

A cadeia $\beta 1$ é constitutivamente expressa nas células Th1 e Th2. Tanto em humanos quanto em camundongos, a cadeia $\beta 2$ é preferencialmente expressa pelas células Th1, correlacionando a expressão desta subunidade com a responsividade destas células a IL-12 (62, 63). À medida que os linfócitos T *naïve* se comprometem com o fenótipo Th2, estas células expressam apenas a cadeia $\beta 1$, da mesma maneira que os linfócitos B (62, 63). Desta forma, a IL-12 induz a fosforilação de Stat4 em células Th1, mas não em células Th2. A sinalização dependente da IL-12 em linfócitos T humanos está correlacionada com a expressão seletiva dos transcritos que codificam o componente $\beta 2$ do receptor da IL-12. Nas células estimuladas na presença da IL-4, há a menor expressão do IL12R $\beta 2$ (62). Além disso, tanto a fosforilação de Stat4 (65) como a expressão de T-bet (*T box transcription*

Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

