

Cíntia Raquel Bombardieri

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

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

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
(Imunologia)

São Paulo

2007

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

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Bombardieri, Cíntia Raquel.

O circuito p38MAPK/MSK1 influencia o período inicial de diferenciação Th1/2 / Cíntia Raquel Bombardieri. -- São Paulo, 2007.

Orientador: Maristela Martins de Camargo.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Imunorregulação molecular.

Versão do título para o inglês: The p38MAPK/MSK1 circuit influences the early stages of differentiation of Th1/2 cells.

Descritores: 1. Linfócitos 2. Diferenciação celular 3. Quinase 4. IFN- γ 5. IL-4 6. Imunologia I. Camargo, Maristela Martins de II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia. III. Título.

ICB/SBIB172/2007

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIENCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Cíntia Raquel Bombardieri.

Título da Tese: O circuito p38MAPK/MSK1 influencia o período inicial de diferenciação Th1/2.

Orientador(a): Maristela Martins de Camargo.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

Aos meus pais e meus irmãos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que me apoiaram nessa caminhada.

À Deus, o Ser que me dá forças para vencer os obstáculos e alcançar meus objetivos.

À Professora Dra. Maristela Martins de Camargo que abriu as portas do seu laboratório para uma estagiária sem a menor experiência em imunologia, me dando a oportunidade de ingressar neste misterioso e fascinante mundo.

Ao professor Volnei Teixeira, do Departamento de Biologia e Química da UNIJUÍ. Obrigada pelo incentivo e por acreditar tanto em mim. Sem o teu incentivo eu não teria vindo para São Paulo.

Aos membros da minha banca de qualificação, Dr José Alexandre Marzagão Barbuto, Dr. Ricardo Tostes Gazinelli e Dra Carla Roberta de Oliveira pela análise criteriosa do trabalho.

As enfermeiras do Centro Obstétrico pela presteza e auxílio na coleta das amostras.

Agradeço a todos os pacientes que gentilmente concordaram em participar deste estudo e aos camundongos que contribuíram para a realização deste trabalho.

À Luciana Marti e a Daiane Donna Guilhen que me auxiliaram o FACS Aria e me auxiliaram no *sorting*.

À FAPESP por possibilitar a minha dedicação exclusiva a este projeto!

À Juliana Sayuri Kuribayashi por ser minha amiga de todas as horas, por ser minha companhia em todos os momentos, me ajudando sempre e me estimulando.

Aos meus queridos amigos e colegas de laboratório de Imunorregulação Molecular: Juliana Sayuri Kuribayashi, Nicolle Gilda Teixeira Queiroz, André Moreno, Fernanda Fidelis Gonzales Guimarães, Aldacilene Silva e Mônica Zandoná Meleiro por todos os momentos compartilhados, pelas risadas, pelo apoio e pelo incentivo.

À Claudia Cunha pela presteza e boa vontade em ajudar sempre que necessário.

Aos colegas de cursão pelos momentos de descontração que tornaram as aulas mais divertidas!

Aos funcionários do departamento de Imunologia, sempre educados, atenciosos e alertas.

Aos companheiros do departamento pela amizade e presteza em compartilhar conhecimentos e experiências. Difícil lembrar-se de todos aqui, em especial à Claudia Pantaleão, Mariane Tami Amano, Juliana Botolatto, Érica Nogueira Borducchi, Rafael Assumpção Larocca, Márcio Tomiyoshi, Welbert Pereira Oliveira, Julieta Genre, Luiz Sardinha, Patrícia Carneiro, Luciana Carvalho, Luciana Peters, Clara Maciel Cavalcanti, Gabriela Menezes, Mateus Ferracini e Joilson Martins.

Às gurias da república, Luciane Capelo e Camila Leindecker Stumm, por estarem sempre ao meu lado, por ser a família que eu tive aqui nesta cidade de asfalto e concreto e tornarem a minha estada em Sampa mais leve.

Ao Ricardo pelo nosso respeito, pela nossa grande amizade e à estrada que se abre a nossa frente. Obrigada pelo carinho e por estar sempre ao meu lado.

*"Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui
Sê todo em cada coisa. Pões quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive."*

Ricardo Reis

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.

Lista de Abreviaturas

APC – do inglês *antigen-presenting cell*
ATF-1/2 – do inglês *activating transcription factor 1/2*
Cdc42 – do inglês *CDC42-specific guanine nucleotide exchange factor*
C/EBP – do inglês *CCAAT/enhancer-binding protein*
CHOP/GADD153 – do inglês *stress-inducible transcription factor*
CHOP/gadd153
c-Maf – do inglês fator de transcrição da região básica/leucina zipper
CNTF – do inglês *ciliary neurotrophic factor*
CREB – do inglês *cAMP response element-binding protein*
CXCR3 – do inglês *chemokine, CXC motif, receptor 3*
CCR4 – do inglês *chemokine, CC motif, receptor 4*
CCR7 – do inglês *chemokine, CC motif, receptor 7*
Dicer – do inglês RNAse III like
DC – do inglês *dendritic cell*
ELISA – do inglês Enzyme linked immunosorbent assay
Elk-1 – do inglês ELK1 – *member of ets oncogene family*
Eomes – do inglês *eomesodermin*
ERK1/p44MAPK – do inglês *extracellular signal-regulated kinase 1*
ERK2/p42MAPK – do inglês *extracellular signal-regulated kinase 2*
GATA-3 – do inglês *GATA-binding protein 3*
GM-CSF – do inglês *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*
Hlx – do inglês *homeobox gene*
HMG-14 – do inglês *high mobility group nucleosomal binding protein-14*
Hog– do inglês *p38MAPK homolog*
ICC – do inglês *intracellular cytokine staining*
ITAM – do inglês *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*
IFN- γ – do inglês *interferon gamma*
IFN- α – do inglês *interferon alpha*
IFN- β – do inglês *interferon beta*
IFN- ω – do inglês *interferon omega*
IFNGR1/2– do inglês *interferon, gamma, receptor 1/2*
IL – do inglês *interleukin*
IL-4R – do inglês *interleukin 4 receptor*
IL-12R β 1/2 – do inglês *interleukin 12 receptor, beta-1/2*
IL-13R α/α' – do inglês *interleukin 13 receptor, alpha/alpha'*
IL-12R β 1/2 – do inglês *interleukin 12 receptor, beta-1/2*
Jak – do inglês *Janus quinase*
JNK – do inglês Jun NH₂-terminal quinases
JunB – do inglês *oncogene JUN-B*
kDa – quilo Dalton

LAT – do inglês *linker for activation of T cells*
LCK – do inglês *lymphocyte-specific protein-tyrosine kinase*
LCR – do inglês *locus control region*
LPS – do inglês *lipopolysaccharide*
MAPK – do inglês *mitogen-activated protein kinase*
MAPKAP quinase 2 – do inglês *mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2*
MAPKAP quinase 3 – do inglês *mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 3*
MAPKK, MAP2K, MKK ou MEK – do inglês *mitogen-activated protein kinase kinase*
MAPKKK, MAP3K ou MEKK – do inglês *mitogen-activated protein kinase kinase kinase*
MBP – do inglês *myelin basic protein*
MEF-2C – do inglês *nuclear receptor coactivator 2*
MKP-1 – do inglês *dual-specificity phosphatase 1*
Mnk1/2 – do inglês *mapk-interacting kinase 1*
MSK1/2 – do inglês *mitogen- and stress-activated protein kinase 1/2*
NK – do inglês *natural killer cell*
NKT – do inglês *NKT cell*
nor 1 – do inglês *oxidored-nitro domain-containing protein 1*
nur 77 – do inglês *nuclear receptor subfamily 4, group a, member 1*
nurr 1 – do inglês *nuclear receptor subfamily 4, group a, member 2*
OSM – do inglês *oncostatin M*
p38MAPK (p38 α , β , γ e δ) – do inglês *mitogen-activated protein kinase*
PCR – do inglês *polymerase chain reaction*
PMA – fitohematoglutina (1)
Q-PCR – do inglês *quantitative polymerase chain reaction*
PMSF – do inglês *Protease inhibitor cocktail tablets*
PRAK – do inglês *p38-regulated/activated kinase*
Raf – do inglês
Rac – do inglês *GTPase-activating protein*
Ras – do inglês *RAS-GTPase-activating protein*
RSK-B – do inglês *ribosomal protein S6 kinase* ou MSK2
RISC – do inglês *RNA-induced silencing complexes*
SAP-1 – do inglês *sphingolipid activator protein 1*
STAT – do inglês *signal transducer and activator of transcription*
T-bet – do inglês *T box transcription factor*
TCR – do inglês *T-cell receptor*
TGF- β - do inglês *transforming growth factor β*
Th0 – do inglês *helper T cell*
Th1 – do inglês *helper T cell 1*
Th2 – do inglês *helper T cell 2*

T_{CM} – do inglês *central memory T cell*

T_{EM} – do inglês *effector memory T cell*

Thr180 – treonina na posição 180

TNF- α - do inglês *tumor necrosis factor α*

Tyr182 – tirosina na posição 182

Tyr323 – tirosina na posição 323

WB – do inglês *western blot*

WIP1 – do inglês *protein phosphatase, magnesium-dependent*

Zap70 – do inglês *zeta-chain-associated protein kinase*

Sumário

1. Introdução	18
1.1. Vias de sinalização MAPKs	18
1.1.1. p38MAPK	19
1.1.2. MSK1/MSK2	22
1.2. Receptores de citocinas	23
1.2.1. Receptor da IL-12	24
1.2.2. Receptor da IL-4	25
1.2.3. Receptor do IFN- γ	26
1.3. Linfócitos Th1/Th2	27
1.3.1. Ativação e Diferenciação dos linfócitos T CD ₄ ⁺ naíve	28
2. Objetivos	32
3. Material e Métodos	33
3.1. Animais	33
3.1.1. Isolamento de linfócitos T CD ₄ ⁺ naíve murinos	34
3.1.2. Reconstituição de linfócitos T do camundongo RAG 1 deficiente	35
3.2. Amostras humanas	35
3.2.1. Isolamento de linfócitos T CD ₄ ⁺ naíve de cordão umbilical humano	36
3.2.2. Isolamento das células mononucleares do sangue periférico	36
3.2.3. Marcação dos linfócitos para separação celular por citometria de fluxo	37
3.3. Diferenciação de linfócitos T CD ₄ ⁺ naíve murinos ou humanos	37
3.4. Detecção de citocinas intracitoplasmáticas	38
3.5. ELISA	38
3.6. siRNA MSK1	38
3.7. Western Blot	40
3.8. Q-PCR	41
3.8.1. Extração do RNA total	41
3.8.2. Preparação do DNA complementar e reação em cadeia da polimerase (PCR)	42
3.8.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real	42
4. Resultados	44
4.1. Diferenciação dos linfócitos T CD ₄ ⁺ naíve <i>in vitro</i>	45
4.1.1. Diferenciação dos linfócitos T CD ₄ ⁺ murinos	45
4.1.2. Diferenciação dos linfócitos T CD ₄ ⁺ humanos	46
4.2. Papel da p38MAPK durante o período inicial de ativação e diferenciação dos linfócitos T	49
4.2.1. Influência da p38MAPK no período inicial de ativação de linfócitos T CD ₄ ⁺ naíve murinos sob condições polarizantes	50
4.2.2. Influência da p38MAPK no período inicial de ativação de linfócitos T CD ₄ ⁺ naíve humanos sob condições polarizantes	50
4.3. Influência da MSK1 no período inicial de ativação de linfócitos T CD ₄ ⁺ naíve humanos sob condições polarizantes	52
4.3.1. Silenciamento da MSK1	52
4.3.2. Análise da produção de citocinas pelas células em que a MSK1 foi silenciada	54
4.3.3. Influência da MSK1 no período inicial de ativação de linfócitos T CD ₄ ⁺ naíve de camundongos MSK1 knockout	59
4.4. Expressão dos receptores de quimiocinas	61
4.4.1. Expressão da cadeia β 2 do receptor da IL-12	62
4.4.2. Expressão da cadeia α do receptor da IL-4	64
4.4.3. Expressão da cadeia α do receptor do IFN- γ	65

4.5. Plasticidade dos linfócitos T CD ₄ ⁺	66
4.5.1. Separação dos linfócitos T CD ₄ ⁺ pela expressão dos receptores de quimiocinas	66
5. Discussão dos Resultados	71
6. Conclusões	85
7. Bibliografia	86

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).

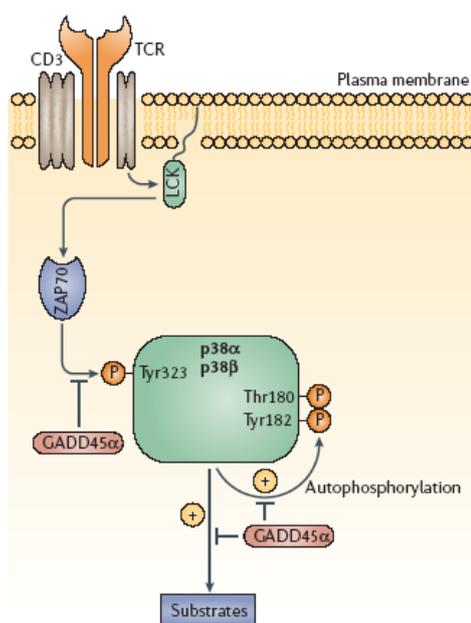


Figura 1 – A estimulação via TCR resulta na ativação de LCK e na ZAP70, que fosforila a p38 no resíduo de tirosina 323, que induz a autofosforilação e a atividade dos seus substratos. Figura: Ashwell, 2006.

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 mielóides. 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 β 1 e a β 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 β 1 e IL12R β 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 β 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 β 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 β 1 é constitutivamente expressa nas células Th1 e Th2. Tanto em humanos quanto em camundongos, a cadeia β 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 β 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 β 2 do receptor da IL-12. Nas células estimuladas na presença da IL-4, há a menor expressão do IL12R β 2 (62). Além disso, tanto a fosforilação de Stat4 (65) como a expressão de T-bet (*T box transcription*

factor), que induz a fosforilação de Stat1 (66), parecem ser importantes para a expressão da cadeia $\beta 2$ do receptor da IL-12. Assim, a expressão de ambas as cadeias se faz necessária para que a IL-12 possa induzir a produção de IFN- γ .

Após a ativação do linfócito T via TCR, ocorre à expressão da IL12R $\beta 2$, e a presença da IL-4 e IFN- γ influenciam a expressão desta cadeia do receptor da IL-12 (63). A estimulação via IL-12 resulta na ativação da Janus quinase 2 (Jnk2) e Tyk2, que fosforilam o IL12R, promovendo a alteração conformacional que possibilita a ligação de Stat4 (67, 68). O papel de Stat4 na sinalização parece ser importante, pois o camundongo deficiente em Stat4, apresenta um fenótipo concordante com a deficiência de IL-12 e IL-12R, que possuem a produção de IFN- γ e a diferenciação para o fenótipo Th1 alterada (69, 70). Stat4 é fosforilado na tirosina 693 pelas Jaks, que induzem a dimerização de Stat e a sua translocação para o núcleo, regulando a expressão gênica (68). Ainda não foi elucidado se Stat4 contribui diretamente para a regulação gênica do IFN- γ , embora tenham sido descritos sítios potenciais para a ligação de Stat4 próximo ao gene de IFN- γ (71).

A IL-12 ativa a via MKK6/p38MAPK de duas maneiras: I) dependente de Stat4, induzindo a fosforilação da serina 721 (65, 72, 73), ou II) independente de Stat4 (72). Ambas as vias de ativação propostas induzem a produção de IFN- γ .

1.2.2. Receptor da IL-4

A IL-4 produzida por diversas células do sistema imune, entre as quais as células Th2, basófilos, mastócitos (74), eosinófilos (75), células NKT (76) e linfócitos $\gamma\delta$ (77). Esta citocina possui diversas funções e, embora não seja um fator de crescimento, prolonga substancialmente a vida de linfócitos T e B em cultura (78). Sua presença induz a expressão do seu receptor (79). Há dois tipos de receptores para a IL-4. O receptor do tipo I da IL-4 consiste em uma cadeia IL4R α de 140KDa que se liga com alta afinidade a IL-4, e uma cadeia IL4R γ comum (cadeia γ -c) que foi inicialmente identificada como um componente do receptor da IL-2, mas também faz parte dos receptores da IL-

7, 9, 15 e 21 (80-83). Embora a cadeia IL4R γ apresenta baixa afinidade com a IL-4, ela é necessária para que ocorra a ativação das vias de sinalização (84).

Nas linhagens celulares onde a cadeia γ -c não é expressa há um segundo tipo de receptor da IL-4, o receptor do tipo II, que consiste na cadeia IL4R α e a cadeia IL13R α ou IL13R α' (84), sendo que a IL13R α' é o principal componente do complexo IL4R em tecidos não hematopoiéticos (85). Esta cadeia é um membro da superfamília dos receptores da hematopietina e faz parte do receptor da IL-13, juntamente com as cadeias IL13R α e IL13R α' (84). A IL-13 também possui dois tipos de receptores, e se liga com alta afinidade ao receptor do tipo I, formado pela IL4R α e a IL13R α , que é idêntico ao receptor do tipo II da IL-4. A IL-13 se liga com afinidade maior ainda ao seu receptor do tipo II que consiste na cadeia IL13R α' , mas este receptor falha na indução do sinal, agindo como um *decoy receptor* (86). Apesar de ambas citocinas se ligarem ao mesmo receptor, não está claro se a resposta funcional resultante é a mesma (83). Além disso, o receptor do tipo II, que é comum a IL-4 e IL-13 é expresso somente em linhagens celulares onde a cadeia γ comum não é expressa, o que não inclui os linfócitos T humanos (87).

1.2.3. Receptor do IFN- γ

A molécula de IFN- γ é um homodímero ligado não covalentemente que consiste em duas cadeias polipeptídicas idênticas de 17kDa (88). Durante a biossíntese das cadeias polipeptídicas, os peptídeos são N-glicosilados resultando na forma madura que possui o peso molecular predominante de 50kDa (89).

O receptor do IFN- γ possui duas cadeias α , também denominada CDw119 ou IFNGR1 e duas cadeias β do receptor de IFN- γ , também denominadas fator acessório 1 (AF-1) ou IFNGR2 (90). A expressão das duas subunidades difere significativamente. A subunidade α é expressa na superfície de quase todas as células, enquanto a subunidade β é expressa em níveis muito baixos, mas sua expressão pode ser induzida em certos

tipos celulares por estímulos externos. A sinalização de IFN- γ induz a fosforilação da cadeia α do receptor que leva a modificação conformacional do receptor ativado que se liga a Stat1 (91).

Inicialmente foi demonstrado que células Th1 e Th2 mantêm padrões opostos de responsividade a IL-12 e IFN- γ , sendo que células Th1 respondem somente a IL-12 (92) e células Th2 respondem somente a IFN- γ , pois somente estas células mantêm a expressão da cadeia β do receptor do IFN- γ , (93). Esta diferente responsividade às citocinas afeta significativamente a estabilidade destas populações.

A cadeia β possui expressão baixa, e à medida que os linfócitos T se comprometem com o perfil Th1 eles deixam de expressar esse receptor (93). A perda da cadeia β do receptor ocorre após as células T CD4 *naïve* serem mantidas por cinco dias em condições diferenciadoras Th1 (94). Entretanto, a perda da expressão da cadeia β não está relacionada com o processo de diferenciação dos linfócitos para o perfil Th1. Para que as células T possam diferenciar-se, elas devem possuir um receptor funcional para IFN- γ , o que ocorre como uma resposta das células ao ligante (94). As células Th2 que expressam inicialmente a cadeia β , porém, quando expostas ao IFN- γ deixam de expressar esta subunidade. Desta forma, a presença de IFN- γ parece regular a expressão da cadeia beta do receptor (94).

Células T que são estimuladas via TCR e expandidas na presença de IL-2 são irresponsivas ao IFN- γ devido a falta da expressão da cadeia β . No entanto, estas células ainda expressam a cadeia alfa deste receptor, e a presença da cadeia β pode ser restaurada quando estas células são re-estimuladas com anti-CD3 ou PMA (fitohematoglutininina – PHA) (95).

1.3. Linfócitos Th1/Th2

Linfócitos T *naïve* podem diferenciar-se após o encontro com o antígeno em duas sub-populações distintas caracterizadas pela regulação transcricional recíproca dos *loci* dos genes das citocinas IFN- γ e IL-4. A IL-12 coopera na diferenciação para o perfil Th1 que produz IFN- γ , enquanto a IL-4 induz a diferenciação para o fenótipo Th2 e a produção de IL-4, IL-5 e IL-13.

A resposta Th1 é importante para a eliminação de patógenos intracelulares enquanto a resposta Th2 é efetiva contra patógenos extracelulares. No entanto a resposta Th1 inapropriada pode resultar em doenças autoimunes, enquanto reações atópicas, incluindo a asma, relacionam-se com o desbalanço da resposta Th2 (96).

Ambas as populações celulares parecem derivar de um precursor comum, as células Th precursoras, que são células T CD_4^+ *naïve* que passaram pela seleção tímica e emergem na periferia, mas que ainda não encontraram o antígeno (97). Essas células diferenciam-se em células Th0 que são capazes de produzir uma gama variada de citocinas (inclusive IL-4 e $IFN-\gamma$), e dão origem às diferentes sub-populações de linfócitos T.

A ativação via TCR é necessária, mas não suficiente, para a diferenciação e células previamente estimuladas retêm a capacidade de diferenciar-se em Th1 ou Th2 após o encontro secundário com o antígeno. A combinação do reconhecimento do antígeno via TCR e as citocinas presentes no meio ativam as vias de sinalização e fatores de transcrição que agem sinergicamente de modo a induzir a diferenciação celular, promovendo a expressão gênica diferenciada nas diferentes sub-populações (98).

Vários fatores contribuem para a diferenciação das células T. Dentre os fatores determinantes encontram-se as citocinas presentes no meio (99), o número de divisões celulares (100, 101), o tipo de célula apresentadora de antígenos (APC), a dose e a natureza do antígeno (102-104), bem como fatores epigenéticos e o remodelamento da cromatina.

1.3.1 Ativação e Diferenciação dos linfócitos T CD_4^+ *naïve*

O processo pelo qual as células diferenciam-se em Th1 e/ou Th2 está associado com a abertura da cromatina dos genes das citocinas características de cada sub-população (98).

Nas células T *naïve* os genes responsáveis por codificar as citocinas efetoras como o $IFN-\gamma$ e IL-4, IL-5 e IL-13 apresentam-se não acetilados, em uma condição restritiva da cromatina que não é completamente silenciada e que pode ser reposicionada, tornando-se ativa após a estimulação pelo

antígeno através da acetilação das histonas H3 e H4 (105, 106). Nestas células o *ifng* parece ser remodelado na presença de T-bet e Hlx, e *il4* parece ser remodelado na presença dos fatores de transcrição GATA-3 e c-Maf (107-109). Durante a diferenciação para Th1 há o reposicionamento dos *loci* de GATA-3 e c-maf da eucromatina para a heterocromatina, enquanto que na diferenciação para Th2 o gene do T-bet é metilado, sendo assim silenciado (110, 111). No entanto, estes fatores de transcrição (T-bet e GATA-3) parecem ser requeridos para o estabelecimento, mas não para a manutenção da estrutura permissiva da cromatina dos *loci ifng* e *il4*, respectivamente.

Células CD₄⁺ mantidas em condições polarizantes Th1 (presença de IL-12 recombinante e anticorpo neutralizante de IL-4) apresentam a repressão de GATA-3, enquanto nas células diferenciadas em condições polarizantes Th2 (presença de IL-4 recombinante e anticorpo neutralizante de IFN- γ) ocorre a inibição de T-bet. A expressão de T-bet e GATA-3 ocorre de maneira independente do ciclo celular, enquanto que a expressão de ativadores e as modificações pós-traducionais das histonas que potencializam o remodelamento da cromatina parecem ser dependentes do ciclo celular (112).

A transcrição de citocinas parece depender de fatores adicionais específicos para cada sub-população, além de modificações pós-traducionais da histona e descondensação local da cromatina. Durante a diferenciação, um grupo de genes deve ser epigeneticamente ativado, enquanto outros devem ser silenciados. Células Th1 transcrevem IFN- γ em quantidades 100 vezes maiores que células T *naïve*, enquanto silenciam IL-4. Já as células Th2 apresentam um padrão inverso de ativação e silenciamento (113).

4. Plasticidade dos linócitos T CD₄⁺ e linfócitos T de memória

A heterogeneidade é uma característica dos linfócitos T antígeno-específicos (114). Os linfócitos T CD₄⁺ podem diferenciar-se em células Th1, Th2, Th17 ou células reguladoras antígeno-específicas (Treg) (113, 115). A heterogeneidade também pode ser observada pelos marcadores de *homing*

que distinguem as sub-populações de linfócitos T de memória efetora (116) (116) e os linfócitos T de memória central (T_{CM}) (117).

Os receptores de quimiocinas parecem ser marcadores do comprometimento celular dos linfócitos T. CXCR3 é o receptor para as quimiocinas CXCL9-11 e é principalmente expresso pelas células Th1, que podem ser T_{EM} ou T_{CM} (117, 118). CXCR6 e CCR5 também são preferencialmente expressos pelas células T_{EM} Th1 (119). A sub-população T_{EM} Th2 por sua vez, expressa preferencialmente CCR3, CCR4, CCR8 e o receptor da prostaglandina D2, CRTh2 (117, 118, 120). Linfócitos T_{CM} também expressam CXCR3 e CCR4 e representam as células pré efetoras Th1 e Th2 respectivamente (120).

Os linfócitos T_{CM} expressam o marcador CD45RO⁺ e expressam CCR7 e CD62L, dois receptores que também são característicos de células naïve, e que são necessários para o extravasamento celular pelas vênulas endoteliais altas (78) e migração para os linfonodos (120, 121). Possuem função efetora limitada, mas proliferam e tornam-se células efetoras após a estimulação antigênica secundária e são menos dependentes da co-estimulação (120). As T_{CM} superexpressam CD40L, estimulando de maneira eficaz células dendríticas (122) e linfócitos B (120, 121). Após a estimulação via TCR os T_{CM} produzem IL-2, mas após a estimulação antigênica são capazes de produzir IL-4 e IFN- γ . As T_{EM} , por sua vez, migram para os tecidos periféricos, pois perdem a expressão de CCR7 e são heterogêneas para a expressão de CD62L. Estas células possuem a habilidade de produzir rapidamente citocinas efetoras como o IFN- γ , mas possuem capacidade limitada de proliferação (121). Além disso, as células desempenham funções distintas. As T_{CM} estão envolvidas com a resposta imune secundária e a proteção de longa duração, enquanto as T_{EM} estão envolvidas na proteção imediata. Embora algumas destas propriedades pareçam estar relacionadas com o estado de ativação celular, a maioria parece representar escolhas distintas dos linfócitos T e são estáveis após a expansão clonal (114).

A ontogenia dos linfócitos T de memória é controversa. Alguns estudos sugerem o desenvolvimento progressivo das células de memória a partir das células efetoras, enquanto outros estudos sugerem uma divisão inicial de

comprometimento entre as células efetoras e de memória (117, 123-125). Não há um consenso se o processo de diferenciação é determinístico ou estocástico. Uma das hipóteses é que durante o processo de diferenciação das células T CD₄⁺ naïve para células efetoras e de memória não parece haver uma determinada seqüência de eventos (126). Ao contrário, coexistem vias em paralelo que resultam em populações altamente heterogêneas e multifuncionais que expressam um ou ambos os perfis terminais e podem ser encontradas co-expressando os marcadores naïve.

Foi demonstrado que, conforme a expressão de CXCR3 e CCR4, os linfócitos T_{CM} são capazes de se diferenciar espontaneamente em células Th1 e Th2 respectivamente, na ausência de condições polarizantes (127). Além disso, a maioria dos linfócitos T_{EM} (tanto Th1 como Th2) quando estimulados in vitro sob condições polarizantes opostas retêm a capacidade de produzir as citocinas que já estavam sendo produzidas e passam a produzir as citocinas dos genes opostos (128). Além disso, no modelo murino as células T de memória efetora – T_{EM} – permanecem comprometidas com a produção das citocinas características da sua linhagem (128). Células Th1 T_{EM} possuem a capacidade de produzir IL-4 quando mantidas em condições diferenciadoras Th2 e mantêm a capacidade de produzir IFN- γ . Contudo, células Th2 T_{EM} são menos flexíveis quanto à produção de citocinas e não passam a produzir IFN- γ prontamente quando mantidas em condições diferenciadoras Th1. Assim, achados demonstram que há um potencial diferencial de produção de citocinas entre as diferentes populações de linfócitos T, indicando um comprometimento diferenciado entre as várias populações de linfócitos de memória (129).

Neste estudo, nós analisamos o papel do circuito p38MAPK/MSK1 durante o período inicial de ativação de linfócitos T naïve mantidos em condições diferenciadoras Th1/2. Os dados sugerem que o circuito p38MAPK/MSK1 participa do processo de ativação dos linfócitos T mantidos em condições diferenciadoras Th1/2 como resultado da alteração da expressão das cadeias IL12R β 2 e IL4R α dos receptores de citocinas da IL-12 e IL-4, respectivamente.

2. OBJETIVOS

- Verificar o papel da p38MAPK no período inicial do processo de ativação dos linfócitos T mantidos sob condições diferenciadoras Th1/2;
- Verificar o papel da proteína quinase MSK1/2, que é ativada pela p38MAPK, no período inicial de diferenciação das células T CD4⁺ naïve;
- Verificar se a p38MAPK e a MSK1 estão relacionadas com a modulação da expressão dos receptores de citocinas IL12R β 2 e IL4R α ;
- Verificar se as células duplo-positivas são as células responsáveis pela plasticidade dos linfócitos T.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os protocolos utilizados no desenvolvimento desta tese foram aprovados pelos Comitês de Ética em Pesquisa de Experimentação Animal e Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos do ICB/USP (732/CEP). Como as amostras de sangue de cordão umbilical foram coletadas no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (HU/USP), o projeto também foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do HU/USP (414/03).

3.1. Animais

Foram utilizados camundongos C57Bl/6, com idade entre 4 e 6 semanas, obtidos do Biotério de Camundongos Isogênicos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo e/ou do biotério da Escola Paulista de Medicina, Unifesp (doados pelo Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara). Os animais foram mantidos, tratados e manipulados conforme as normas estabelecidas pelo “Guide for the care and use of laboratory animals” (NIH, *National Institute of Health*). Em alguns experimentos foram utilizadas células do camundongo deficiente para MSK1, com *background* genético C57Bl/6. As células desses animais nos foram gentilmente concedidas pelo Dr. Simon Arthur, da Universidade de Dundee – Escócia. As células do baço e da medula óssea foram retiradas desses animais, congeladas em soro fetal bovino e DMSO e enviadas em gelo seco. Após 5 dias de transporte, as células chegaram ao Brasil (ainda congeladas) e foram imediatamente utilizadas nos experimentos.

Foram utilizados ainda camundongos RAG1 deficientes, na tentativa de expandir as células dos camundongos MSK1 deficientes. As células expandidas foram utilizadas em experimentos similares aos realizados com as células dos animais MSK1 deficientes doados.

3.1.1 Isolamento de linfócitos T CD4⁺ naíve murinos

Os linfócitos T CD4⁺ foram isolados a partir de suspensão unicelular do baço e linfonodos inguinais superficiais e poplíteos dos camundongos, por seleção negativa utilizando *MACS Beads* e colunas magnéticas, conforme instruções do fabricante (Miltenyi Biotec Inc. – Auburn, CA, EUA). Células totais do baço e dos linfonodos foram ressuspensas em tampão MACS (PBS pH 7,2 0,5%BSA 2 mM EDTA) 1×10^7 células em 40 μ l de tampão foram marcadas magneticamente com um coquetel de anticorpos monoclonais conjugados a biotina (CD8⁺, CD11b, CD45R, DX5 e Ter-119). Foram adicionados 10 μ l do coquetel biotina-anticorpo para cada 1×10^7 células. Foi feita a incubada a 4°C por 10 minutos. Após a incubação, adicionou-se 30 μ l de tampão MACS e 20 μ l de anticorpos secundários anti-biotina conjugados a pérolas magnéticas (*microbeads*) para cada 1×10^7 células. Foi feita uma segunda incubação a 4°C por 15 minutos. Após este período, adicionou-se 2 ml de tampão MACS para cada 1×10^7 células. A suspensão celular foi centrifugada a 300g por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 500 μ l de tampão MACS. As células não-CD4⁺ marcadas magneticamente foram depletadas pela sua retenção através da passagem da suspensão de células por coluna sob campo magnético, enquanto as células não marcadas (CD4⁺) passam pela coluna livremente. Em seguida as células não-CD4⁺ foram eluídas após a retirada da coluna do campo magnético por meio de pressão. O grau de pureza das células isoladas foi avaliado por citometria de fluxo (FACS Calibur ou FACS Vantage SE – Becton, Dickinson and Company – Franklin Lakes, NJ, USA). Alíquotas de 2×10^5 células em 500 μ l de PBS contendo 1% de soro bovino fetal (Invitrogen Corporation – Carlsbad, CA, EUA) e 0,1% de azida sódica foram incubadas com os seguintes anticorpos monoclonais: anti-CD3 Cy-Chrome (17^A2), anti-CD4 PE (GK1.5), anti-CD8 FITC (53-6.7), anti-CD11b FITC (M1/70) e anti-CD19 PE (1D3) (BD-Pharmingen). As células foram incubadas durante 30 minutos a 4° em local protegido da luz. Em seguida, foram efetuadas duas lavagens em PBS contendo 1% de soro bovino fetal (Invitrogen) e 0,1% de azida sódica. As células foram ressuspensas em 500 μ l desta mesma solução e submetidas à análise em citômetro de fluxo (FACS

Calibur). Os dados obtidos foram analisados com o auxílio do software FlowJo (Tree Star, Inc. – Ashland, OR, EUA). Todos os anticorpos utilizados eram da BD Biosciences.

3.1.2. Reconstituição de linfócitos T do camundongo RAG 1 deficiente

Parte das células da medula óssea das células dos camundongos deficientes em MSK1, enviados pelo Dr. Simon J. Arthur da Universidade de Dundee foram injetadas nos camundongos RAG1 deficientes. Para tanto, 1×10^4 células foram ressuspensas em PBS e injetadas por via intraperitoneal em animais RAG1^{-/-}. Após três semanas, aproximadamente, foram coletados 100µl de sangue do plexo ocular do animal com o auxílio de um capilar de vidro estéril. As hemácias foram lisadas com 10 ml de tampão ACK (1.5M NH₄Cl, 100mM KHCO₃, Na₂EDTA – pH 7.2) e as células foram marcadas com os seguintes anticorpos monoclonais: anti-CD3 Cy-Chrome (17^A2), anti-CD4 PE (GK1.5), anti-CD8 FITC (53-6.7) (BD/PharMingen). As células foram visualizadas por citometria de fluxo (FACS Calibur) e analisadas através do FlowJo (Tree Star) para aferição da efetividade do protocolo.

3.2. Linfócitos humanos

O sangue do cordão umbilical foi coletado após o parto, no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, mediante a autorização do paciente através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O protocolo para obtenção do sangue de cordão umbilical e sua utilização nestes estudos foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisas envolvendo Seres Humanos do Instituto de Ciências Biomédicas – USP (732/CEP). Como as amostras de sangue de cordão umbilical são coletadas no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (HU/USP), o projeto também foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do HU/USP (414/03). Os certificados estão em anexo.

Os critérios para a coleta de sangue foram: a mãe deveria ter mais de 18 anos e não ser portadora de HIV ou hepatite C.

3.2.1. Isolamento de linfócitos T CD4⁺ naïve de cordão umbilical humano

Linfócitos T CD4⁺ naïve foram obtidos do sangue proveniente do cordão umbilical de doadoras saudáveis com idade entre 18 e 35 anos através de separação por RosetteSep (Stem Cell Technologies). Resumidamente, as amostras de sangue foram misturadas com *Rosette Sep antibody cocktail* de modo que as células indesejadas foram ligadas às hemácias em complexos tetraméricos com os anticorpos ligados à superfície destas células. O sangue foi diluído com PBS contendo 2% de soro bovino fetal na proporção 1:1 e colocadas sobre Ficoll-Paque (GE Healthcare – Uppsala, Suécia). Após centrifugação a 1200 g por 20 minutos a 20°C, as células T CD4⁺ foram coletadas da interface, lavadas 2 vezes em Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS – Cambrex Bio Science – Walkersville, MD, EUA) por meio de centrifugação a 300g por 10 minutos a 20°C. As células foram quantificadas e a viabilidade verificada pela utilização de azul de Trypan (Cambrex Bio Science). Posteriormente, as células foram mantidas sob condições diferenciadoras.

O grau de pureza das células isoladas foi avaliado por citometria de fluxo (FACS Calibur ou FACS Vantage SE). Alíquotas de 2×10^5 células em 500 µl de PBS contendo 1% de soro bovino fetal (Invitrogen) e 0,1% de azida sódica foram incubadas com anticorpos monoclonais: anti-CD3 FITC (UCHT1), anti-CD4 Cy Chrome (RPA-T4), anti-CD8 PE (HIT8a), anti-CD11b/Mac-1 Cy-Chrome (ICRF44) e anti-CD19 FITC (HIB19) (BD/Pharmingen). As células foram incubadas durante 30 minutos a 4° em local protegido da luz. Em seguida foram efetuadas duas lavagens em PBS contendo 1% de soro bovino fetal (Invitrogen) e 0,1% de azida sódica. As células foram ressuspensas em 500 µl desta mesma solução e submetidas à análise em citômetro de fluxo (FACS Calibur – BD Biosciences). Os dados obtidos foram analisados com o auxílio do *software* FlowJo (Tree Star). Todos os anticorpos utilizados eram da BD Biosciences.

3.2.2. Isolamento das células mononucleares do sangue periférico

Sangue periférico (PBMCs – *peripheral mononuclear blood cells*) foram obtidas de doadores saudáveis e as células mononucleares foram isoladas por

centrifugação em gradiente Ficoll-Paque (GE Healthcare). Após centrifugação a 900g por 30 minutos a 20°C, as células mononucleares do sangue periférico foram coletadas na interface e lavadas três vezes em HBSS (Cambrex Bio Science) por meio de centrifugação a 400g por 10 minutos a 20°C. As células foram quantificadas e a viabilidade verificada pela utilização de azul de Trypan (Cambrex Bio Science).

3.2.3. Marcação dos linfócitos de sangue periférico para separação celular por citometria de fluxo

Alíquotas de 1×10^6 células em 500 μ l de PBS contendo 1% de soro bovino fetal (Invitrogen) e 0,1% de azida sódica foram incubadas com anticorpos monoclonais anti-CD4 Cy Chrome (RPA-T4), anti-CXCR3 FITC, anti-CCR4 APC (BD/Pharmingen). As células foram incubadas durante 30 minutos a 4° em local protegido da luz. Em seguida foram efetuadas duas lavagens em PBS contendo 1% de soro bovino fetal (Invitrogen) e 0,1% de azida sódica. As células foram ressuspensas em 500 μ l desta mesma solução e submetidas à separação celular em citômetro de fluxo (FACS Aria – BD Biosciences). Os dados obtidos foram analisados com o auxílio do software FlowJo (Tree Star).

3.3. Diferenciação dos linfócitos T murinos ou humanos

Linfócitos T CD_4^+ naïve (0.5×10^6 /mL) foram estimulados com anti-CD28 solúvel (1 μ g/mL) e anti-CD3 ligado a placa de cultura (1 μ g/mL) na presença de rIL-2 (10 U/mL – BD Pharmingen) e, quando indicado, sob condições diferenciadoras Th1 (rIL-12p70, BD Pharmingen e anti-IL-4) ou Th2 (rIL-4, BD Pharmingen, e anti-IFN- γ). Quando apropriado, o inibidor das isoformas α e β da p38MAPK (SB203580, Calbiochem, San Diego, CA, EUA). O inibidor foi adicionado 30 minutos antes das células serem submetidas às condições diferenciadoras. O inibidor foi utilizado nas seguintes concentrações: 5 μ M, 10 μ M e 20 μ M. Após esse período, transferimos as células para o poço onde o anti-CD3 estava ligado a placa e adicionamos o meio com as citocinas e anticorpos neutralizantes das respectivas condições de diferenciação,

mantendo as células na presença do inibidor durante todo o período de diferenciação.

3.4. Detecção de citocinas intracitoplasmáticas

Após períodos pré-determinados de incubação em condições diferenciadoras, as células murinas e/ou humanas foram recuperadas, lavadas e fixadas conforme as instruções do fabricante com o kit *Cytofix/Cytoperm Plus™* com *Golgiplug™*. Resumidamente, as células foram centrifugadas a 300g por 10 minutos a temperatura ambiente, o sobrenadante foi coletado e a viabilidade foi verificada com Trypan blue. As células foram ressuspensas em meio completo e 2×10^5 células foram estimuladas em meio completo contendo com 40 ng/ml PMA (fitohematoaglutinina – PHA/Sigma – Aldrich), 10 mM ionomicina (Sigma – Aldrich) e BD *Golgiplug™* (90% DMSO e 10% brefeldina A) por 4 horas a 37°C 5% CO₂. Após a incubação, as células foram centrifugadas a 300g por 10 minutos a temperatura ambiente, o sobrenadante foi descartado e as células foram permeabilizadas com 100 µl de *Cytofix/Cytoperm solution* (4% paraformaldeído) e incubadas por 20 minutos a 4°C. Foram acrescentados 150 µl de *BD Perm/Wash solution*, as células foram centrifugadas a 300g por 10 minutos a temperatura ambiente, ressuspensas em 250 µl de *BD Perm/Wash solution* e incubadas com anticorpos específicos para as citocinas IL-4 (PE) e IFN-γ (APC) (Pharmingen – BD Biosciences). Em seguida foram efetuadas duas lavagens em PBS contendo 1% de soro bovino fetal (Invitrogen) e 0,1% de azida sódica. As células foram ressuspensas em 500 µl desta mesma solução e submetidas à análise em citômetro de fluxo (FACS Vantage SE ou FACS Calibur – BD Biosciences) sendo seu padrão de citocinas intracitoplasmáticas qualificado e quantificado.

3.5. ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay)

Após períodos pré-determinados de diferenciação o sobrenadante foi coletado e a produção de citocinas (IL-5 para as células murinas e IFN-γ para

as células humanas) foi mensurado por ELISA (OptEIA mouse IL-5 ELISA kit ou OptEIA human IFN- γ ELISA kit – Pharmigen/BD Biosciences). A leitura e análise foram feitas em espectrofotômetro Spectramax 190 a 450nm.

3.6. siRNA MSK1

A transfecção com siRNA para MSK1 foi realizada utilizando o siRNA específico para MSK1 (Santa Cruz Biotechnology – Santa Cruz, CA, EUA). Os linfócitos T CD₄⁺ naive foram isolados com Rosette Sep (Stem Cell Technologies) e mantidos em cultura por 24h em meio sem antibiótico. Após 24 horas foi feita a transfecção do siRNA utilizando o DMRIE-C (Invitrogen). As células foram incubadas por 4 horas a 37°C a 5% CO₂ em meio sem soro e sem antibiótico. Em seguida, as células foram lavadas em meio completo e mantidas em meio complementado com citocina recombinante e anticorpos neutralizantes conforme as condições diferenciadoras Th1 ou Th2.

Esta técnica consiste no silenciamento da expressão do RNA mensageiro da MSK1. Primeiramente, duplas fitas longas de RNA (aproximadamente 200 pares de bases) são inseridas nas células por lipossomas. Após a introdução das duplas fitas nas células, elas entram na via comumente referida como via do RNA de interferência. Primeiramente as duplas fitas de RNA são processadas por uma enzima RNase like chamada Dicer (que é da própria célula) em pequenos RNAs interferência com 19-21 pares de bases com dois nucleotídeos fita simples 3' em cada extremidade. Posteriormente, os siRNAs se anelam com complexos contendo a endoribonuclease conhecida como complexos silenciadores conhecidos induzidos pelo RNA (RNA-induced silencing complexes - RISCs), de maneira ainda desconhecida. Subseqüentemente, a RISC ativada liga-se aos transcritos complementares através de interações de pareamentos de bases entre a fita siRNA anti-sense e o RNAm complementar. O RNAm ligado é clivado e ocorre a degradação da seqüência específica do RNAm, resultando assim no silenciamento do gene. O pool de oligonucleotídeos utilizados estão listados abaixo:

Fita A – GGAUGCAGAAGAAUCAA, nuc. 1066

Fita B – CUCCAUCUAUUCUCUCAA, nuc. 1281

Fita C – GGAAGCCAAUACUCAGAAA, nuc. 1528

Estes siRNA silenciam o RNAm da MSK1 (NM_153587). A seqüência da proteína resultante do RNA mensageiro da MSK1 está representada a seguir:

>|ribosomal protein S6 kinase, polypeptide 5 (sinônimo da MSK1)

MEGEGGGSGGAGTSGDSGDGGEQLLTVKHELRTANLTGHAEKVGIENFELL
KVLGTGAYGKVFLVRKISGHDAGKLYAMKVLKKATIVQKAKTTEHTRTERQVL
EHIRQSPFLVTLHYAFQTETKLHLILDYINGGELFTHLSQRERFTEHEVQIYVGE
IVLALEHLHKLGIYRDIKLENILLDSNGHVVLTDGFLSKEFVADETERAYSFCGT
IEYMAPDIVRGGDSGHDKAVDWWSLGVLMYELLTGASPFTVDGEKNSQAEIS
RRILKSEPPYPQEMSTVAKDLLQRLLMKDPKRLGCGPRDAEEIKEHLFFEKIK
WDDLAAKKVPAPFKPVIRDELVDVSNFAEEFTEMDPTYSPAALPQSSERLFQGY
SFVAPSILFKRNAVIDPLQFHMGVDRPGVTNVARSAAMMKDSPFYQHYDLDL
KDKPLGEGSFSICRKC VHKKTNQAF AVKIISKRMEANTQKEITALKLCEGHPNI
VKLHEVFHDQVAASAQPPGQVVLCSLLLLLALLFNRSLTRKPVTWTWLVHSTS
QLPPLPPPMPEIVL FILLSDNGQLHTFLVMELLNGGELFERIKRKKHFSETEASY
IMRKLVS AVSHMHDVGVVHRDLKPENLLFTDENDNLEIKVIDFGFARLKPPDN
QPLKTPCFTLHYAAPPELLTHNGYDESCDLWSLGVILYTMLSGQVPFQSHDRSL
TCTSAVEIMKKIKKGD F SFEGEAWKNVSQEAKDLIQGLLTVDPNKRLKMSGLR
YNEWLQDGSQLSSNPLMTPDILGSSGA AVHTCVKATFHAFNKYKREGFCLQN
VDKAPLAKRRKMKRTSTSTETRSSSSSESSRSSSSSQSHGKTTPTKTLQPSNPT
EGSNPDTL FQFSD

3.7. Western Blot

Para verificar o bloqueio da MSK-1 *in vitro*, 2×10^6 células foram lisadas em 100 μ l de tampão (50 mM Tris-HCl, 2,5% β -mercaptoetanol, 0,1% azul de bromofenol e 10% glicerol) suplementado com inibidores de protease (Complete Mini Cocktail, Roche Diagnostic Co – Mannheim, Alemanha). Foram quantificadas a concentração total de proteínas (kit BCA – Pierce Biotechnology, Rockford IL/USA) e 10 μ g de proteínas foram separadas em gel de poliacrilamida 10% desnaturante (SDS-PAGE) e transferidas para uma membrana PVDF (*Polyvinylidene Fluoride* – GE Healthcare) por transferência semi-seca. A proteína MSK-1 foi detectada usando anticorpos anti-MSK-1

(Santa Cruz) e anti-camungongo-HRP (GE Healthcare). Como controle positivo, foi utilizado o lisado celular da linhagem HeLa irradiada de modo a assegurar que a proteína visualizada corresponde a MSK-1 (Santa Cruz). As membranas foram ensaiadas também com anti- β -actina humana (Oncogene – San Diego, CA, EUA) como controle interno. O sistema ECL (GE Healthcare) foi utilizado conforme as instruções do fabricante para a visualização das bandas por auto-radiografia. As auto-radiografias foram digitalizadas e analisadas através do software ImageQuant (GE Healthcare) por densitometria.

3.8. Q-PCR

3.8.1. Extração do RNA total

Dois milhões de linfócitos T de sangue periférico foram precipitadas por centrifugação a 300g por 10 minutos e ressuspensas em 1 ml de Trizol® (Invitrogen) em tubos de 1,5 ml de acordo com as instruções do fabricante. Foram adicionados 200 μ l de clorofórmio (Amresco – Solon, OH, EUA) a cada tubo e todas as amostras foram agitadas por inversão durante 15 segundos e incubadas por 3 minutos à temperatura ambiente. Após a incubação, os tubos foram centrifugados a 12.000g a 4°C por 10 minutos. A fase superior aquosa foi recuperada e incubada com 500 μ l de isopropanol (Sigma) por 10 minutos a temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 12.000g a 4°C por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. Os precipitados foram ressuspensos em 1 ml de etanol 75% gelado e as amostras foram centrifugadas a 7.500g por 5 minutos a 4°C. O RNA total precipitado foi ressuspendido em água livre de DNase e RNase e a concentração de cada amostra foi determinada pela leitura da densidade óptica (λ = 260 nm) no espectrofotômetro GeneQuant *pro* (GE Healthcare). As amostras de RNA foram tratadas com DNase I (Deoxirribonuclease I livre de RNase – GE Healthcare) (5 unidades de enzima para cada 1 μ g de RNA) no tampão da enzima (100 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 10 mM dithiothreitol) por 15 minutos a 37°C.

3.8.2. Preparação do DNA complementar e reação em cadeia da polimerase (PCR)

A síntese de cDNA foi realizada utilizando o kit SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) e 1µg de RNA total. O RNA foi incubado com 10mM dNTPs e 0,5 µg/ml oligo(dT)₁₂₋₁₈ por 5 minutos a 65°C. Em seguida a reação foi transferida para o gelo e acrescentou-se 2µl do tampão da enzima (200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl), 25 mM MgCl₂, 0,1M DTT (dithiothreitol) e 40 unidades de inibidor de RNase. As amostras foram incubadas a 42°C por 2 minutos, em seguida acrescentou-se 50 unidades da transcriptase reversa SuperScript™ II RT e incubou-se a 42°C por 50 minutos. Todas as amostras foram submetidas a uma incubação final a 70°C por 15 minutos para inativação da reação.

As reações de PCR foram montadas com volume final de 20 µl contendo 0,8 mM dNTP mix, 1,5 mM MgCl₂, 0,5 mM de cada oligonucleotídeo, 2,5 unidades de Taq DNA Polimerase (Invitrogen) e 2 µl do cDNA sintetizado. Para verificar se a síntese do cDNA foi eficiente, os cDNAs foram amplificados para determinada seqüência do G3PDH em 35 ciclos como descrito a seguir: 1 min a 94°C, 1 min a 50°C e um 1 min a 72°C. Todas as reações foram submetidas a um passo final de extensão de 10 min a 72°C em condições não-saturadas para permitir uma análise semi-quantitativa dos diferentes produtos.

As seqüências dos oligonucleotídeos utilizados estão no **Quadro 1**. Os sinais dos produtos amplificados foram capturados em géis de agarose corados com brometo de etídeo.

3.8.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real

Os cDNAs foram amplificados para IL12Rβ₂, IL4Rα, IFNGR1 e β-actina utilizando o termociclador Mx 3005P™ QPCR Systems (Stratagene, Cedar Creek, TX, EUA). As reações foram realizadas utilizando Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen). Primeiramente as reações foram aquecidas a 50°C por 2 minutos para eliminar qualquer produto contaminante que contenha uracil e a 95°C por 15 minutos. Em seguida, as reações foram

submetidas a 50 ciclos de amplificação como descrito a seguir: 30 seg a 95°C, 25 seg a 58°C e 30 seg a 72°C. Todas as reações foram submetidas a um passo final de 1 min a 95°C, 30 seg a 55°C e 30 seg a 95°C para geração da curva de dissociação.

Os dados foram analisados no programa MxPro™ QPCR Software (Stratagene). A quantificação relativa dos produtos foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (130) utilizando a β -actina como controle interno.

As seqüências dos oligonucleotídeos utilizados estão no Quadro 1.

Quadro 1 – Oligonucleotídeos utilizados nas reações em cadeia da polimerase (PCR)

Nome	Seqüência
F – IL12R β 2	5'-GAGAGGCGATGTGACTGTGA-3'
R – IL12R β 2	5'-TACCAAGGGAAGACCTGTG-3'
F – IL4R α	5'-CGTCTCCGACTACATGAGCA-3'
R – IL4R α	5'-AGCCACAGGTCCAGTGTAT-3'
F – IFNGR1/IFNGR α	5'-GGCAGCATCGCTTTAAACTC-3'
R – IFNGR1/IFNGR α	5'-GGAGGTGGGGGCTTTTATTA-3'
F – β -actina	5'-GCCCTGAGGCACTCTTCCA-3'
R – β -actina	5'-CCAGGGCAGTGATCTCCTTCT-3'
F - GAPDH	5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'
R - GAPDH	5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'

F- forward; R - reverse

4. Resultados

Para avaliar a participação do circuito da p38MAPK/MSK1 durante o período inicial de ativação dos linfócitos T naïve, os linfócitos T foram isolados. Quando utilizamos células murinas, as células foram isoladas do baço e linfonodos inguinais superficiais e poplíteos. Os linfócitos foram purificados por seleção negativa com colunas magnéticas e o grau de pureza foi avaliado por citometria de fluxo (Figura 2 A). A frequência relativa das células purificadas foi sempre superior a 92% das células isoladas. Todos os experimentos foram realizados com animais não sensibilizados e células indiferenciadas (naïve). As análises indicadas na figura 2 são representativas de todos os experimentos realizados.

Nos experimentos que utilizamos linfócitos T humanos, as células foram isoladas por *Rosette Sep*. O grau de pureza foi avaliado por citometria de fluxo (Figura 2 B). A frequência relativa dos linfócitos após a purificação foi sempre igual ou superior a 90%. As análises representadas na figura 2 são representativas dos experimentos realizados.

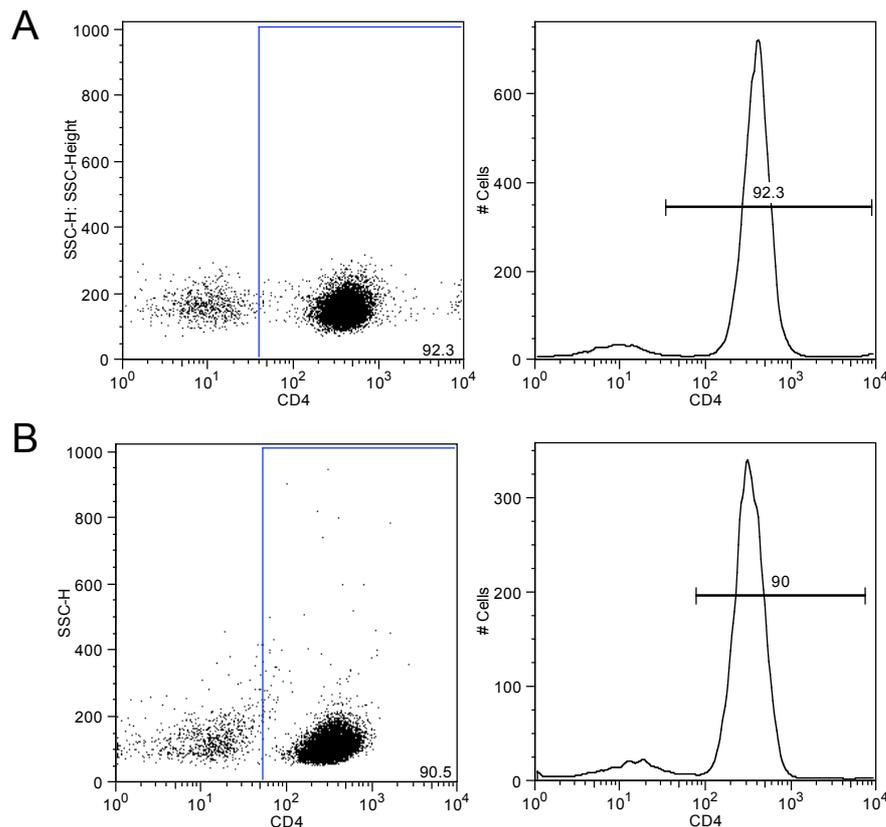


Figura 2 – Frequência celular dos linfócitos T CD_4^+ isolados. A. Linfócitos murinos - Linfócitos T CD_4^+ isolados do baço e linfonodos inguinais superficiais e poplíteos. As células foram isoladas com colunas magnéticas por seleção negativa e, em seguida, marcadas para avaliar o grau de pureza. **B. Linfócitos humanos** – as células foram isoladas de sangue de cordão umbilical de doadores saudáveis por Rosette Sep e, em seguida, marcadas para avaliar o grau de pureza. Os números indicados representam as frequências celulares relativas de cada quadrante. Os resultados são representativos de todos os experimentos realizados.

4.1. Diferenciação dos linfócitos T CD_4^+ naíve *in vitro*

4.1.1. Diferenciação dos linfócitos T CD_4^+ murinos

Linfócitos T CD_4^+ naíve murinos isolados foram cultivados em condições diferenciadoras Th1 e Th2. Após certos períodos, a produção de IFN- γ e IL-4 foram analisadas por marcação intracelular de citocinas. A Figura 3 é representativa do perfil obtido em nossos experimentos. Após uma semana em cultura na condição Th0 (anti-CD3, anti-CD28 e rIL-2) a proporção de células produtoras de IFN- γ foi de aproximadamente 11,3% e a proporção de células produtoras de IL-4 foi de 0,62%. Na população cultivada em condições Th1

(anti-CD3, anti-CD28, rIL-2, rIL-12 e anti-IL-4), a proporção de células produtoras de IFN- γ foi de aproximadamente 47,1% e a proporção de células que produzem IL-4 foi de 0,19%. Após seis dias em cultura, entre as células T mantidas em condições diferenciadoras Th2 (anti-CD3, anti-CD28, rIL-2, rIL-4 e anti-IFN- γ), a proporção de células que secretam IFN- γ e IL-4 foi de aproximadamente 6,78% e 0,77%, respectivamente. A proporção de células produtoras de IFN- γ mantidas em condições Th2 é menor que aquelas células mantidas em meio Th0.

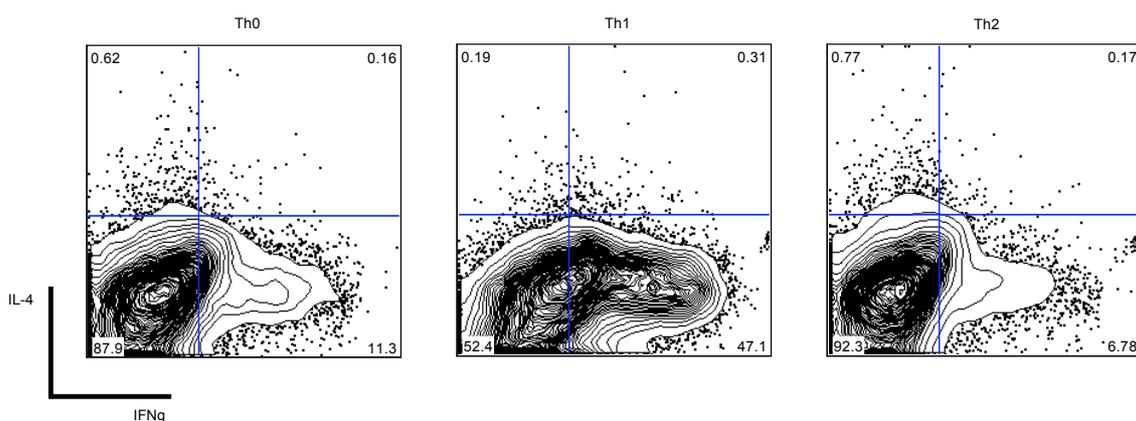


Figura 3 – Produção de IFN- γ e IL-4 por linfócitos T CD $_4^+$ murinos mantidos em condições diferenciadoras *in vitro*. Os linfócitos T foram isolados do baço e linfonodos inguinais superficiais e poplíteos, isolados por seleção negativa com MACS e cultivados em condições diferenciadoras de Th0, Th1 ou Th2 por seis dias. Após este período foi verificada a polarização destas células através da marcação intracelular das citocinas IFN- γ e IL-4. Os quadrantes foram determinados após a análise do controle negativo e de isotipo. A porcentagem das células em cada quadrante está indicada em cada figura.

4.1.2. Diferenciação dos linfócitos T CD $_4^+$ humanos

A figura 4 é representativa de um dos experimentos de diferenciação utilizando linfócitos T CD $_4^+$ *naïve* humanos em condições diferenciadoras Th1/2. Os linfócitos T *naïve* foram mantidos em condições polarizantes Th1 (anti-CD3, anti-CD28, rIL-2, rIL-12 e anti-IL-4) ou Th2 (anti-CD3, anti-CD28, rIL-2, rIL-4 e anti-IFN- γ) por seis dias. Pode-se observar que aproximadamente 48,9% das células estimuladas sob a condição diferenciadora Th1 produziu IFN γ . Além disso, aproximadamente 6,41% das células mantidas em meio Th1 produziram IL-4 e 21,4% das células produziram ambas as citocinas.

Entre as células estimuladas sob condições diferenciadoras Th2, a produção de IL-4 foi de aproximadamente 13,9%, sendo que 23,9% das células produziram IFN- γ . Porém, este número é menor do que o observado sob condições diferenciadoras Th1. Dentre as células mantidas em meio Th2, aproximadamente 14,3% produziram tanto IFN- γ como IL-4.

Cabe ressaltar que após seis dias em condições diferenciadoras Th1 ou Th2 as células ainda não estavam totalmente polarizadas. Em ambas as condições polarizantes, houve ainda um grande número de células que produzem tanto IFN- γ como IL-4. Tais células não estão diferenciadas.

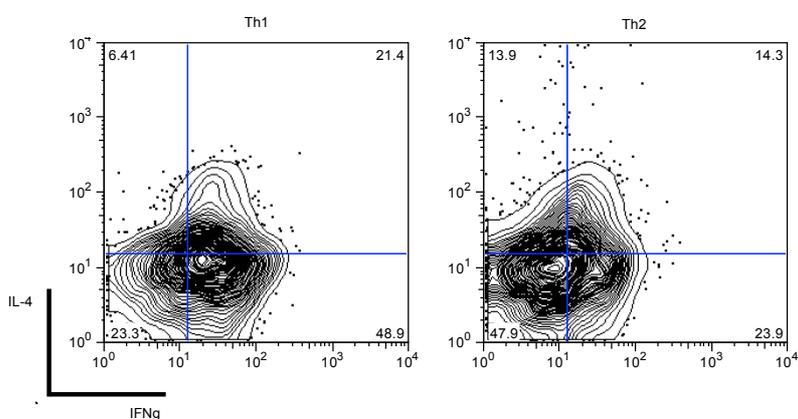


Figura 4 – Linfócitos T CD₄⁺ naïve humanos mantidos em condições polarizantes Th1/Th2. As células foram isoladas por Rosette Sep e estimuladas por seis dias com anti-CD3, anti-CD28 e IL-2. As células foram estimuladas com IL-12 e anti-IL-4 na condição Th1 e IL-4 e anti-IFN γ na condição Th2. Após este período foi verificada a ativação destas células através da marcação intracelular das citocinas IFN- γ e IL-4. Os quadrantes foram determinados após a análise do controle negativo e de isotipo. A porcentagem das células está indicada em cada quadrante.

4.2. Papel da p38MAPK durante o período inicial de ativação e diferenciação dos linfócitos T CD4⁺ naïve

4.2.1. Influência da p38MAPK no período inicial de ativação de linfócitos T CD₄⁺ naïve murinos sob condições polarizantes

As MAPKs normalmente são ativadas por uma série de eventos de fosforilação onde uma quinase fosforila a outra (2). A p38MAPK é uma exceção a este paradigma, pois ela pode ser ativada via TCR (29). As vias de ativação MAPK são importantes na ativação dos linfócitos T durante a resposta imune.

No entanto, o modo como estas vias participam na ativação dos linfócitos T CD4⁺ mantidos em condições diferenciadoras Th1/Th2 ainda não foi elucidado.

Na tentativa de identificar se a via da p38MAPK participa dos estágios iniciais de ativação e/ou diferenciação dos linfócitos T CD4⁺ naive ativados e mantidos em condições diferenciadoras Th1/2, linfócitos T CD4⁺ foram cultivados por seis dias em condições diferenciadoras na presença do inibidor pirimidilimidazólico da p38MAPK (SB203580). Após este período, a produção de IL-4 e IFN- γ foram determinadas por marcação intracelular.

O SB203580 é específico para as isoformas α e β da p38MAPK. Ele inibe a atividade catalítica da p38MAPK por competir pelo sítio de ligação do ATP (25). Quando as células T naive murinas foram ativadas sob condições polarizantes Th1 na presença do SB203580, observou-se a diminuição da produção de IFN- γ em todas as concentrações do inibidor, de maneira dose dependente. A produção de IFN- γ foi reduzida de 43,6% para 37,8% na concentração de 5 μ M; para 33,2% na concentração de 10 μ M e para 28,2% na concentração de 20 μ M (Figura 5). A produção de IL-4 também aumentou moderadamente em todas as concentrações. A produção de IL-4 em condições diferenciadoras Th1 foi de 0,85% para 2,05%; 3,06% e 3,58% conforme a concentração do inibidor foi aumentando, de 5, 10 e 20 μ M, respectivamente.

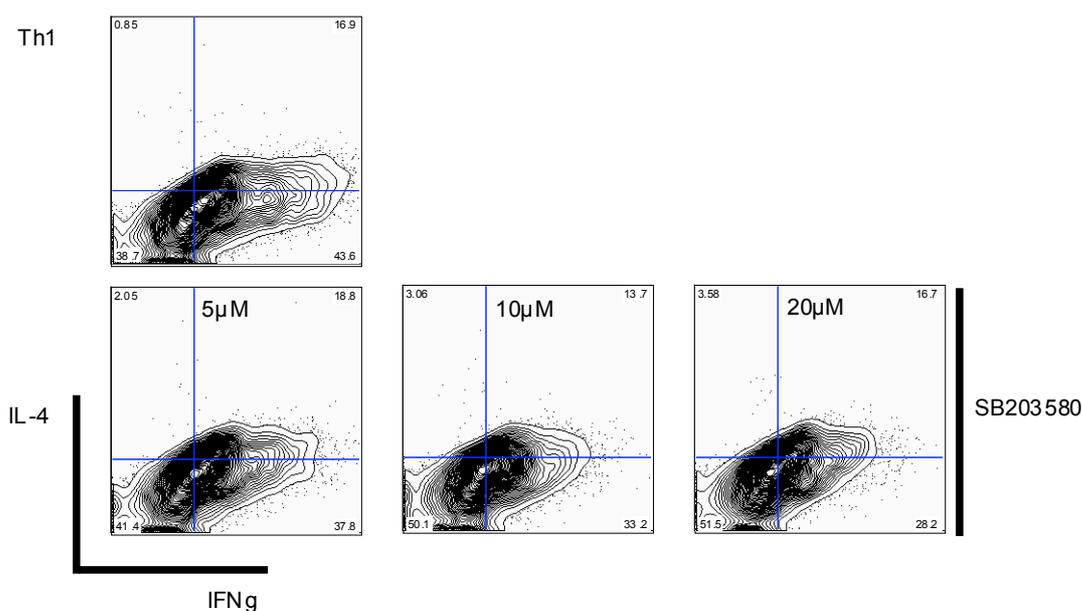


Figura 5 – Células T CD4⁺ murinas mantidas em condições diferenciadoras Th1 na presença de diferentes concentrações do inibidor SB203580. Na primeira linha estão

representadas as células mantidas em condições diferenciadoras Th1. Na segunda linha estão representadas as células mantidas em meio Th1 sob diferentes concentrações do inibidor. As concentrações estão listadas em cada gráfico.

As células murinas ativadas e mantidas sob condições polarizantes Th2 na presença do inibidor SB203580, apresentaram maior produção de IL-4 nas concentrações de 5 e 10 μ M. Na concentração de 20 μ M a produção foi similar. Foi observada a menor produção de IFN- γ em todas as concentrações utilizadas do inibidor. A produção de IFN- γ foi reduzida de 13,4% para 7,52% na concentração de 5 μ M; para 10,7% na concentração de 10 μ M e para 12,2% na concentração de 20 μ M (Figura 6).

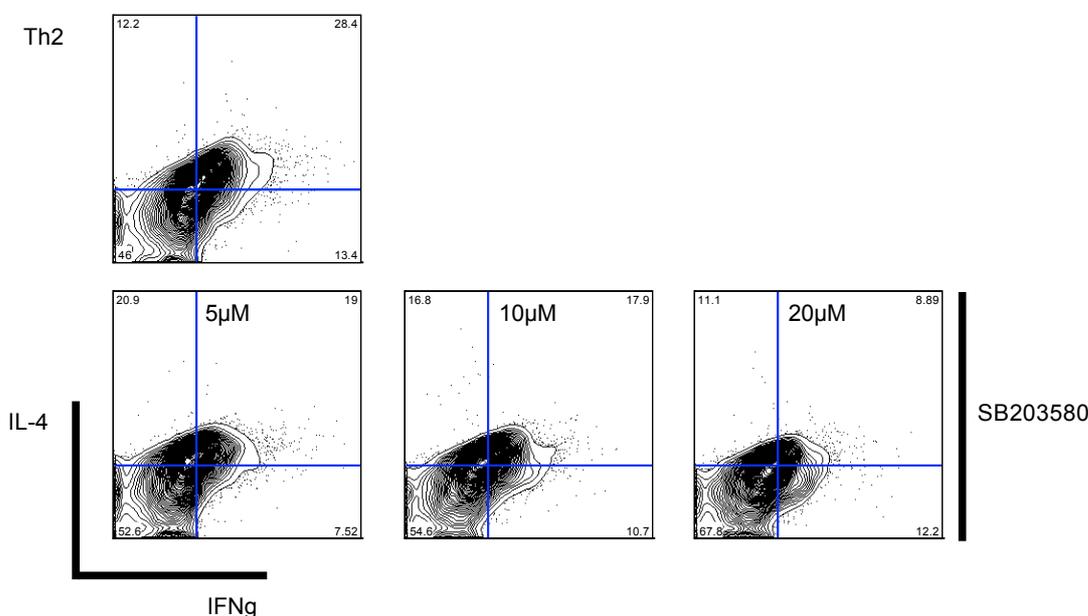


Figura 6 – Produção de citocinas das células T CD $_4^+$ murinas mantidas em condições diferenciadoras Th2 na presença de diferentes concentrações do inibidor SB203580. Na primeira linha estão representadas as células mantidas em condições diferenciadoras Th2. Na segunda linha estão representadas as células mantidas sob diferentes concentrações do inibidor. As concentrações estão listadas em cada gráfico.

A figura 7 demonstra a produção de IL-5 pelas células T CD $_4^+$ murinas nas quais a p38MAPK foi inibida e que foram mantidas em meio Th1 ou Th2 durante seis dias. Após este período o sobrenadante foi coletado e a produção desta citocina foi quantificada. A IL-5 é uma citocina característica do perfil Th2

e conforme foi aumentada a dose do inibidor (SB203580), a produção de IL-5 diminuiu de maneira dose-dependente no perfil Th2.

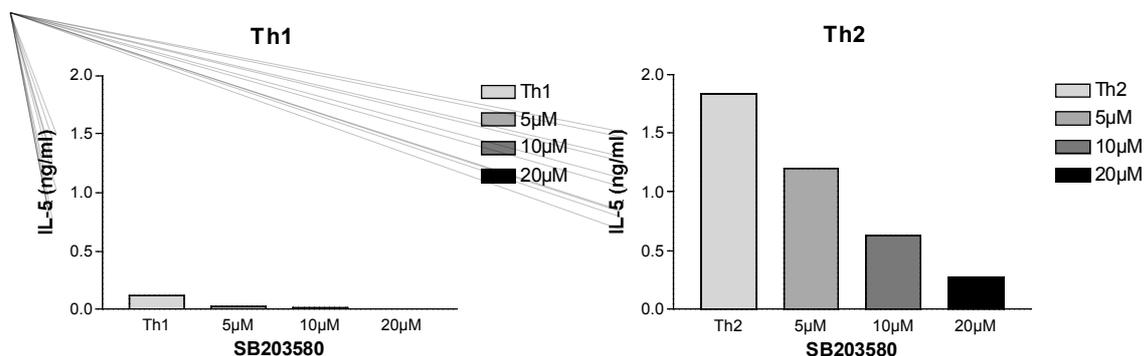


Figura 7 – Produção de IL-5 pelas células T CD4+ murinas. As células T foram isoladas por seleção negativa por colunas magnéticas e as células foram ativadas e mantidas em condições diferenciadoras Th1 ou Th2 na presença do inibidor da p38MAPK. Após seis dias o sobrenadante foi coletado e a produção de IL-5 foi mensurada por ELISA.

4.2.2. Influência da p38MAPK no período inicial de ativação de linfócitos T CD4⁺ naïve humanos sob condições polarizantes

Este mesmo experimento de ativação dos linfócitos T através da manutenção das células em condições diferenciadoras Th1 ou Th2 na presença do inibidor também foram feitos com linfócitos naïve provenientes do sangue do cordão umbilical. As células T CD4⁺ foram isoladas por Rosette Sep e mantidas em condições diferenciadoras Th1, na presença do SB203580. Observou-se a alteração da produção de IFN- γ de 32,9% para 27,9; 43,4 e 29,1% nas concentrações de 5, 10 e 20 μ M, respectivamente (Figura 8).

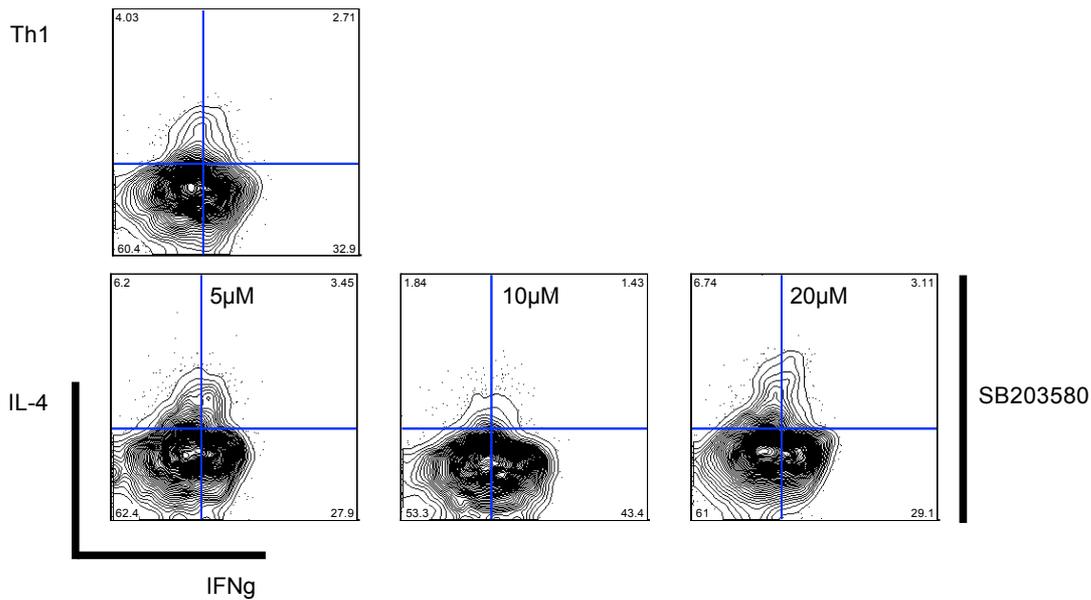


Figura 8 – Células T CD₄⁺ mantidas em condições diferenciadoras Th1 na presença de diferentes concentrações do inibidor SB203580. Na primeira linha estão representadas as células mantidas em condições diferenciadoras Th1. Na segunda linha estão representadas as células mantidas sob diferentes concentrações do inibidor. As concentrações estão listadas em cada gráfico.

Na figura abaixo estão representados os linfócitos T CD₄⁺ humanos mantidos sob condições diferenciadoras Th2. Alternativamente, estas células foram estimuladas na presença de diferentes concentrações do inibidor da p38MAPK (SB203580). Como a IC₅₀ deste inibidor corresponde à concentração de 10 μM (131), nos experimentos subseqüentes utilizaremos esta concentração.

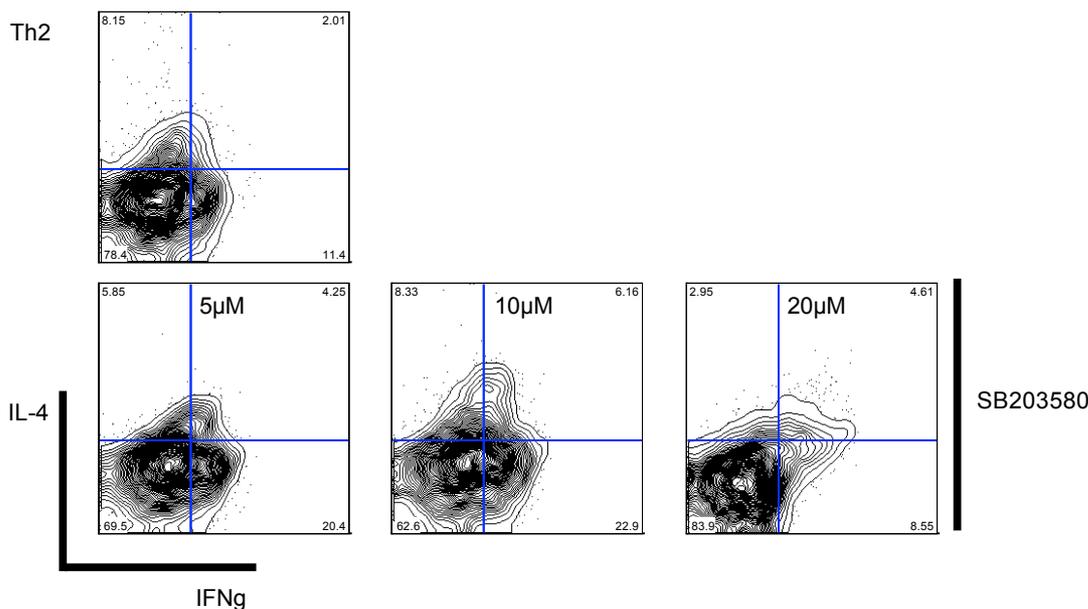


Figura 9 – Produção de citocinas das células T CD4+ humanas mantidas em condições diferenciadoras Th2 na presença de diferentes concentrações do inibidor SB203580. Na primeira linha estão representadas as células mantidas em condições diferenciadoras Th2. Na segunda linha estão representadas as células mantidas sob diferentes concentrações do inibidor. As concentrações estão listadas em cada gráfico.

4.3. Influência da MSK1 no período inicial de ativação de linfócitos T CD4⁺ naïve humanos sob condições polarizantes

4.3.1 Silenciamento da MSK1

Após a realização dos experimentos com o inibidor pirimidil imidazólico SB203580, postulamos que a proteína quinase p38MAPK e a MSK1, sua quinase alvo participam do período inicial do processo de diferenciação de linfócitos T CD4⁺ naïve. No experimento anterior, de diferenciação na presença do inibidor da proteína quinase, observamos que as células mantidas em condições diferenciadoras Th1 na presença do inibidor SB203580 apresentaram menor proporção de células que produzem exclusivamente IFN- γ e aumento da produção de IL-4. Na concentração utilizada, este inibidor é específico para as isoformas α e β da p38MAPK. Desta forma, como as MSKs são quinases ativadas por p38MAPK e ERK1/2 e parecem ser expressas constitutivamente no núcleo das células (40), achamos que a produção destas citocinas pode estar sendo regulada por este circuito de sinalização. Além disso, as MSKs são as únicas quinases descritas capazes de fosforilar histona

H3 (41), modificação covalente que nós supomos estar relacionada com a abertura da cromatina nas regiões promotoras das citocinas características do fenótipo Th1 e Th2. Além disso, para alguns autores a fosforilação pode estar associada com a acetilação, que já foi descrita como uma modificação covalente presente quando há a abertura da cromatina nas regiões promotoras das citocinas características do perfil Th1 e Th2 (132).

Desta forma, esta proteína quinase poderia estar envolvida na fosforilação de histonas durante as fases iniciais do processo de diferenciação dos linfócitos T *naïve*. Este ponto pode ser importante no controle da diferenciação dos linfócitos T *naïve*, inter-relacionando o processo de diferenciação destas células nas suas sub-populações funcionais com as vias de sinalização das MAPK e a remodelagem da cromatina.

Na tentativa de avaliar a participação da MSK1 nos estágios iniciais da ativação da célula T mantidas em condições polarizantes Th1/2, os linfócitos T CD_4^+ foram transfectados com siRNA para MSK1. Células que tiveram a MSK1 silenciada foram estimuladas com anti-CD3 e anti-CD28 e mantidas em condições não polarizantes. Após 24 horas as células foram coletadas e a expressão protéica analisada por *western blot*. Na figura 10 observamos que o silenciamento da MSK1, no período de 24h, foi de 75%.

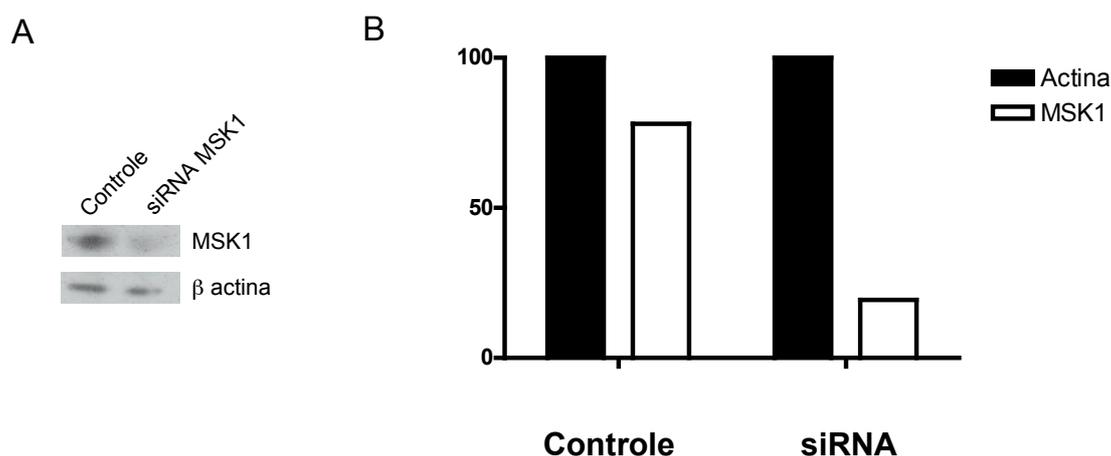


Figura 10 – Silenciamento da MSK1 em linfócitos T CD_4^+ isolados por RosetteSep. Os linfócitos T CD_4^+ foram isolados de sangue de cordão umbilical de doadores saudáveis. **A.** A MSK1 foi silenciada por siRNA para MSK1 e após 24h as células foram coletadas e o *western blot* foi realizado para verificar a expressão da proteína quinase MSK1. **B.** Análise densitométrica das bandas da figura A.

4.3.2. Análise da produção de citocinas pelas células em que a MSK1 foi silenciada

Após o silenciamento da MSK1, os linfócitos foram cultivados por seis dias em condições diferenciadoras e a produção de IL-4 e IFN- γ foi determinada por marcação intracelular das citocinas produzidas.

A figura 11 é representativa de um destes experimentos utilizando linfócitos T CD₄⁺ *naïve* humanos silenciados pelo siRNA MSK1 e estimulados em condições diferenciadoras Th1/2. Pode-se observar que aproximadamente 30% das células controle estimuladas sob a condição diferenciadora Th1 é produtora exclusivamente de IFN- γ . Quando consideramos conjuntamente as células que produzem exclusivamente IFN- γ e aquelas que estão produzindo tanto IL-4 quanto IFN- γ , aproximadamente 77% das células estão produzindo IFN- γ . Nas células controle estimuladas sob condições diferenciadoras Th2 a produção de IL-4 é de aproximadamente 20%, sendo que algumas células produzem IFN- γ , porém em quantidade inferior às células mantidas sob condições diferenciadoras Th1. Além disso, 44% das células produzem ambas as citocinas, as quais correspondem à população não comprometida terminalmente.

Após a transfecção com siRNA para MSK1, observa-se a redução das células produtoras exclusivamente de IFN- γ (de 38.4% para aproximadamente 10% sob condição Th1), manutenção da proporção de células produtoras de ambas as citocinas e aumento das células produtoras de IL-4 (de 1.93% para 17%). Nas células mantidas em condições diferenciadoras Th2 e que tiveram a MSK1 silenciada, também foi observada a redução das células que produzem exclusivamente o IFN- γ (de 24.6% para 8.66%). Além disso, houve aumento da proporção de células produtoras de ambas as citocinas, de 13.3% para 26% e discreto aumento das células comprometidas exclusivamente com a produção de IL-4 (de 13.9% para aproximadamente 22%) (Figura 11).

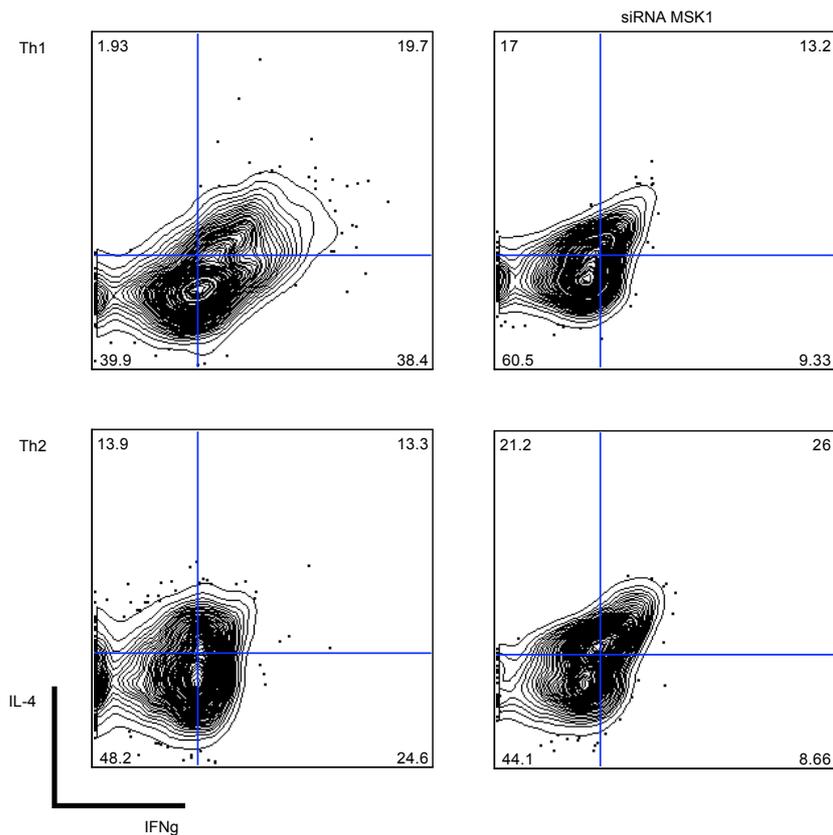


Figura 11 – Papel de MSK1 na ativação dos linfócitos T CD₄⁺ mantidos em condições polarizantes Th1 ou Th2. As células foram isoladas com Rosette Sep, transfectadas com siRNA para MSK1 e mantidas durante seis dias nas condições Th1 ou Th2. No painel superior esquerdo observamos as células Th1, e no painel superior direito estão as células transfectadas com siRNA MSK1 e diferenciadas sob condições diferenciadoras Th1. No painel inferior estão as células diferenciadas no perfil Th2, controle (inferior esquerdo) e transfectadas com siRNA MSK1 (painel inferior direito). Os quadrantes foram determinados após a análise do controle negativo e de isotipo. As porcentagens de cada população estão representadas nos respectivos quadrantes.

A figura 12 é a representação do mesmo experimento, em gráfico do tipo pizza, onde fica mais fácil visualizar as alterações no perfil da produção de citocinas das células diferenciadas em cada sub-população.

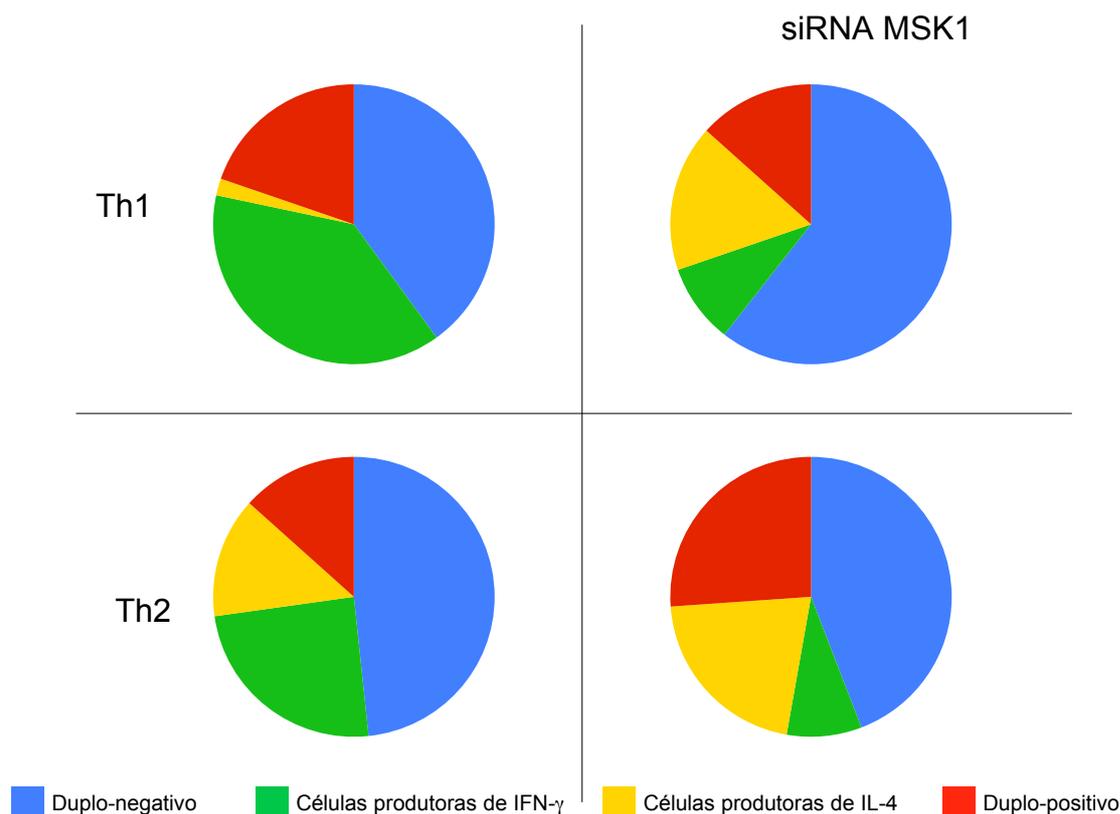


Figura 12 – Papel de MSK1 na diferenciação de linfócito T CD_4^+ . As células foram isoladas com Rosette Sep, transfectadas com siRNA para MSK1 e mantidas durante seis dias nas condições Th1 ou Th2. No painel superior esquerdo observamos as células Th1, e no painel superior direito estão as células transfectadas com siRNA MSK1 e diferenciadas sob condições diferenciadoras Th1. No painel inferior estão as células diferenciadas no perfil Th2, controle (inferior esquerdo) e transfectadas com siRNA MSK1 (painel inferior direito). As porcentagens de cada população são as mesmas representadas nos respectivos quadrantes da figura anterior.

A figura 13 é outra representação do mesmo experimento, demonstrando através da intensidade da fluorescência (mediana) que a MSK1 parece participar do processo de diferenciação para as sub-populações Th1/2. No painel superior esquerdo está representada a produção de IFN- γ pelas células silenciadas e controles mantidas em condições diferenciadoras Th1. Novamente podemos observar a menor produção de IFN- γ através da mediana, que passou de 20,1 para 11,5, indicando assim a menor produção desta citocina. No painel superior direito está representada a produção de IFN- γ pelas células silenciadas e controles mantidas em condições diferenciadoras Th2. Nestas células, a produção de IFN- γ também foi menor, porém de maneira

menos pronunciada (14,6 – controle – para 13,7 – células Th2 siRNA/MSK1). Nos painéis inferiores está representada a produção de IL-4 das células silenciadas e controles nas condições Th1 e Th2, à esquerda e a direita respectivamente. As células mantidas em condições diferenciadoras Th1 quando transfectadas com o siRNA apresentaram aumento na produção de IL-4 (15,5) quando comparadas com as células controle Th1 (10,9). O aumento da produção de IL-4 foi mais pronunciado nas células Th2, onde a intensidade da fluorescência passou de 13,8 (células controle Th2) para 22,3 quando estas células foram transfectadas com siRNA.

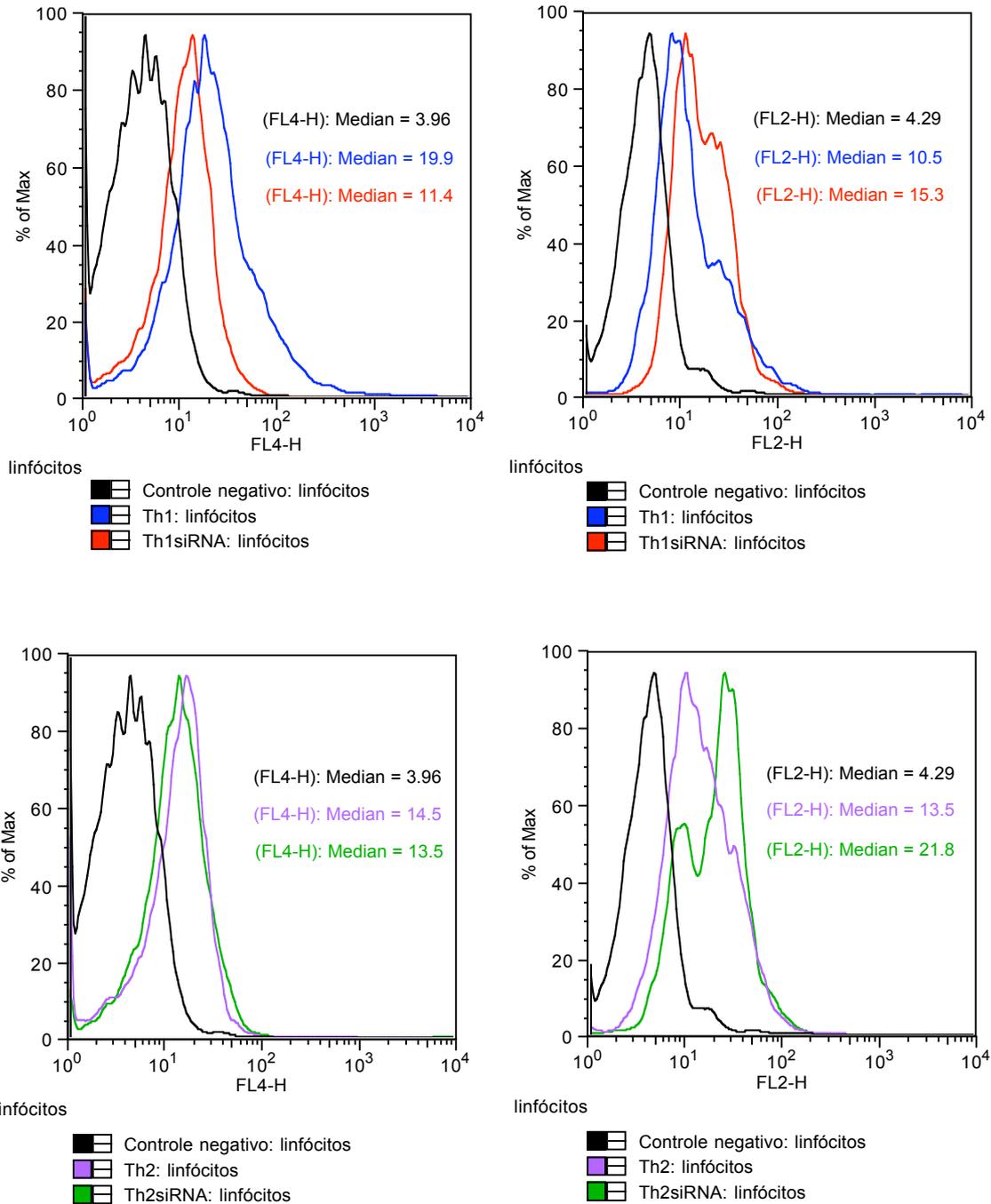


Figura 13 – Papel de MSK1 na diferenciação de linfócito T CD_4^+ . As células foram isoladas de cordão umbilical, transfectadas com siRNA para MSK1 e diferenciadas durante 6 dias nas condições Th1 ou Th2. No painel superior é representada a produção de IFN γ das células diferenciadas em ambos os perfis em comparação com as células transfectadas com siRNA MSK1. Os painéis inferiores representam a produção de IL-4 das células diferenciadas em Th1 e Th2 em comparação com as células transfectadas com siRNA MSK1. A mediana de cada população está representada no histograma.

4.3.3. Influência da MSK1 no período inicial de ativação de linfócitos T CD₄⁺ naive de camundongos MSK1 knockout

Para confirmar o fenômeno observado utilizando siRNA para MSK-1, realizamos a diferenciação dos linfócitos T naive de camundongos knockout para MSK1. As células CD₄⁺ foram isoladas por seleção negativa com MACS e mantidas em condições diferenciadoras Th1 ou Th2. As células CD₄⁻ foram utilizadas para o western blot, de modo a confirmar o silenciamento gênico da MSK1, conforme pode ser observado na figura 14 a seguir.

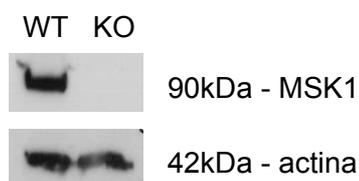


Figura 14 – Western blot das células CD₄⁺ para MSK1 e actina dos camundongos selvagem e *knockout* para MSK1 (KO).

Após seis dias de diferenciação foi feita a marcação intracelular para verificar a produção das citocinas IFN- γ e IL-4. Nas figuras 15 e 16, as células do camundongo *knockout* para MSK1 ainda produzem IFN- γ . A produção desta citocina pelos linfócitos T nestes camundongos deficientes em MSK1 é provavelmente o indicativo de que há, no mínimo, mais uma via de sinalização que influencia a produção de IFN- γ . Nos linfócitos T ativados mantidos em condições diferenciadoras.

Na Figura 15 podemos observar as células T CD₄⁺ do camundongo selvagem e do camundongo *knockout* para MSK1 mantidas em condições diferenciadoras Th1. Nas células do camundongo que teve a MSK1 silenciada, observa-se a redução das células produtoras de IFN- γ e aumento das células produtoras de IL-4. Além disso, nas células do camundongo *knockout* para MSK1 diferenciadas para MSK1 na presença do inibidor específico para as isoformas α e β da p38MAPK (SB203580), observou-se o efeito aditivo, pois houve uma diminuição das células comprometidas com a produção de IFN- γ e um pequeno aumento das células comprometidas com a produção de IL-4.

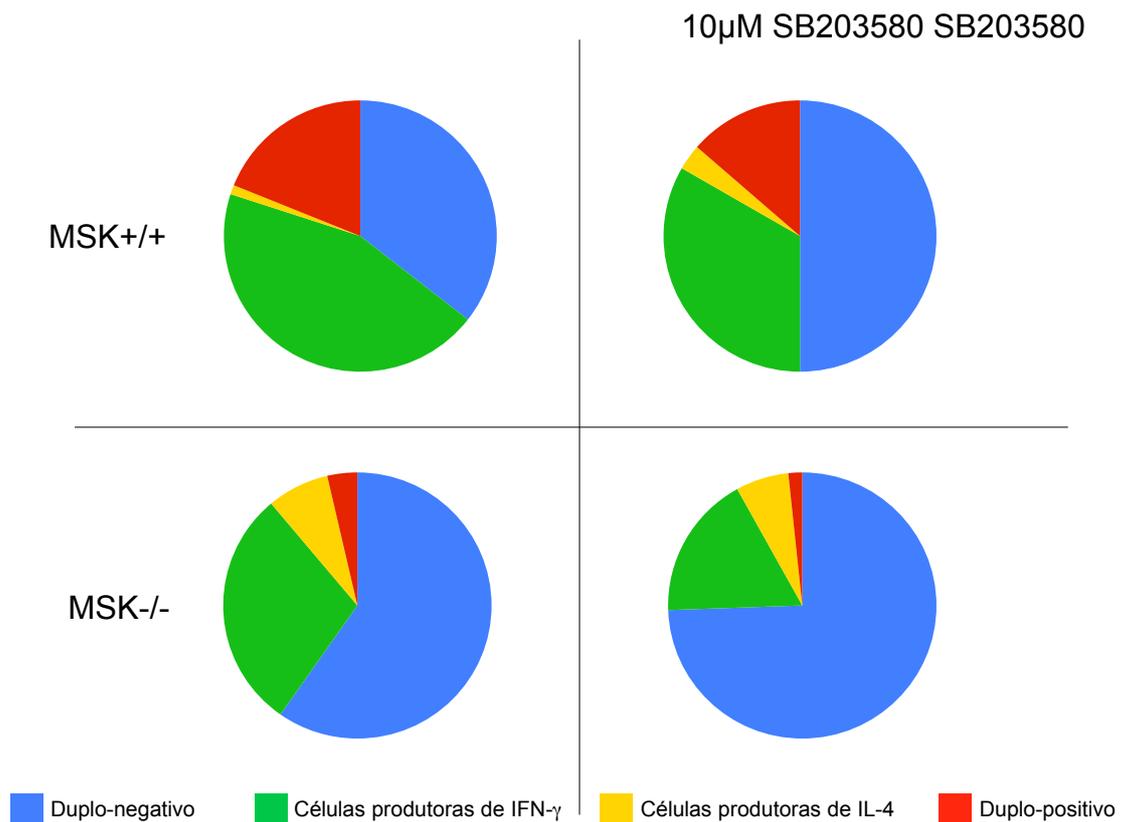


Figura 15 – Papel de MSK1 na diferenciação de linfócito T CD₄⁺. Linfócitos T CD₄⁺ de camundongo selvagem (painel superior) e *knockout* para MSK1 (painel inferior) foram mantidas sob condições diferenciadoras Th1 e representadas em gráfico tipo pizza. No painel superior esquerdo estão representadas as células diferenciadas no perfil Th1, e no painel superior direito estão as células mantidas sob condições diferenciadoras Th1 na presença do inibidor específico para p38MAPK. No painel inferior estão representadas as células do camundongo *knockout* para MSK1, controle (inferior esquerdo) e mantidas na presença do inibidor SB203580 – (painel inferior direito).

Nas células do camundongo MSK1^{-/-} mantidas em condições diferenciadoras Th2, também foi observada a redução das células produtoras de IFN- γ . Além disso, houve aumento das células produtoras de IL-4, conforme pode ser observado na figura abaixo (Figura 16).

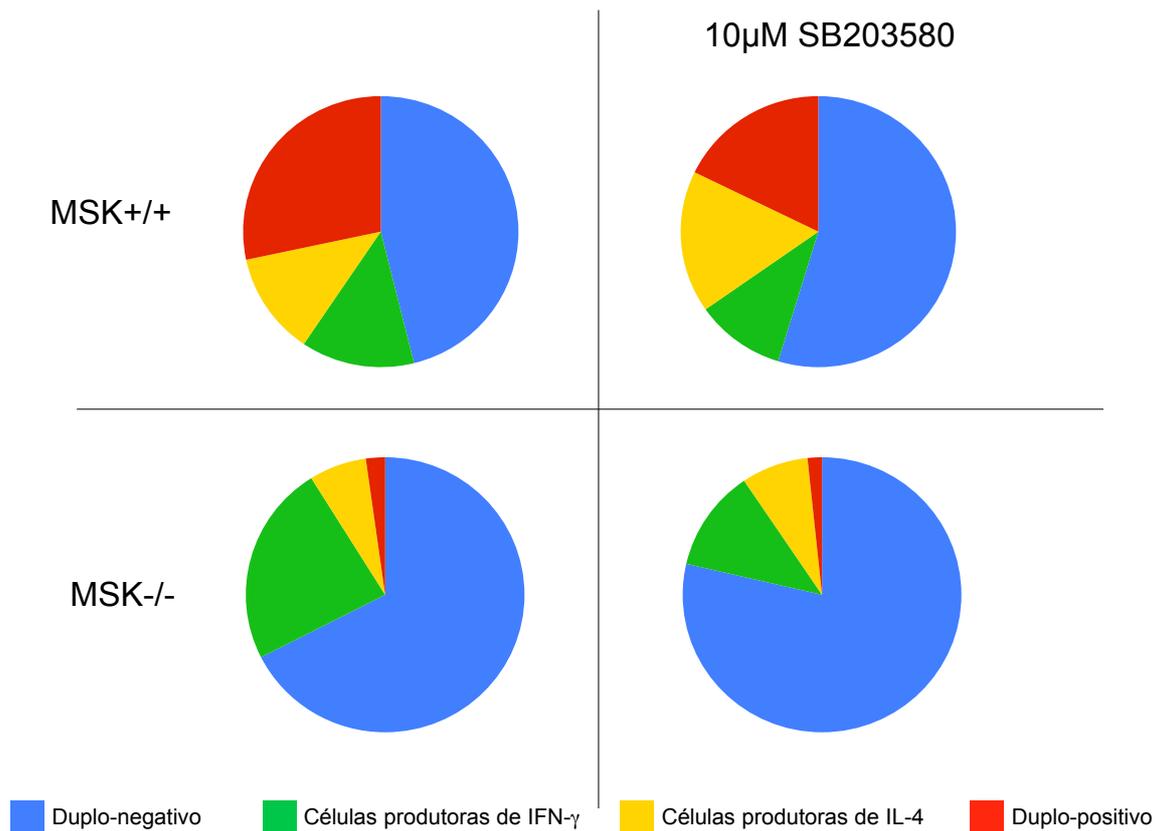


Figura 16 – Papel de MSK1 na diferenciação de linfócito T CD₄⁺. Linfócitos T CD₄⁺ de camundongo selvagem (painel superior) e *knockout* para MSK1 (painel inferior) foram mantidas sob condições diferenciadoras Th2 e representadas em gráfico tipo pizza. No painel superior esquerdo estão representadas as células diferenciadas no perfil Th2, e no painel superior direito estão as células mantidas sob condições diferenciadoras Th2 na presença do inibidor específico para p38MAPK. No painel inferior estão representadas as células do camundongo knockout para MSK1, controle (inferior esquerdo) e mantidas na presença do inibidor SB203580 – (painel inferior direito).

4.4. Expressão de receptores de citocinas

O próximo passo foi verificar se as células que tiveram as isoformas α e β da p38MAPK inibidas ou a MSK1 silenciada apresentam a expressão dos receptores de citocinas IL-4, IL-12 e IFN- γ alterada. A expressão diferencial dos receptores de quimiocinas em modificações na sinalização intracelular e conseqüentemente alterar o perfil da produção de citocinas por estas células.

4.4.1 Expressão da cadeia $\beta 2$ do receptor da IL-12

O receptor da IL-12 é composto por duas cadeias, a $\beta 1$ e a $\beta 2$ (60). A co-expressão de ambas as cadeias é necessária para que a sinalização seja eficiente (60). Quando o linfócito T é ativado há o aumento da 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 , fator de necrose tumoral (TNF), e pela co-estimulação do CD-28 (62, 63).

Após a ativação do linfócito T via TCR, ocorre à expressão da IL12R $\beta 2$, e a presença da IL-4 e IFN- γ influenciam a expressão desta cadeia do receptor da IL-12 (63). Na figura 17, as células que possuem a maior expressão do IL12R $\beta 2$ são as células mantidas em condições não polarizantes (Th0), que foram ativadas com anti-CD3/CD28. As células mantidas em condições diferenciadoras Th1 apresentam uma elevada expressão do receptor, enquanto as células mantidas em meio Th2 e os linfócitos T CD4+ naïve apresentam uma baixa expressão deste receptor.

Quando a MSK1 é silenciada por siRNA, pode-se observar a menor expressão deste receptor pelas células mantidas em meio Th0. Estas células passam a expressar o IL12R $\beta 2$ de maneira similar que os linfócitos naïve. As células mantidas em meio Th1 e em meio Th2 apresentam aumento na expressão deste receptor quando comparado aos linfócitos T naïve. Comparando-se as células mantidas em condições diferenciadoras Th1 com aquelas células em que a MSK1 foi silenciada e mantida sob as mesmas condições, observamos a maior expressão da IL12R $\beta 2$. Os linfócitos T naïve mantidos que a MSK1 foi silenciada e mantidos em meio Th2 por seis dias também apresenta a maior expressão da IL12R $\beta 2$ quando comparado aos linfócitos naïve estimulados por seis dias sob condições diferenciadoras Th2. Acompanhando o aumento da expressão da IL12R $\beta 2$, há o aumento da produção de IFN- γ .

Quando analisamos a expressão do IL12R $\beta 2$ nas células em que as isoformas α e β da p38MAPK foram silenciadas, observamos novamente a menor expressão do receptor pelas células mantidas em meio Th0, comparando-se os linfócitos que foram mantidos sob a mesma condição,

porém que a p38MAPK não foi inibida. A expressão é similar aos linfócitos T CD₄⁺ naïve. Nas células mantidas em meio Th1 foi observado o aumento da expressão do IL12Rβ2. As células que foram mantidas em meio Th2 por seis dias apresentaram um pequeno aumento na expressão do receptor, mas a sua expressão foi similar aquelas células mantidas em meio Th0.

Desta forma, quando os linfócitos T naïve são ativados ao mesmo tempo em que a p38MAPK ou a MSK1 apresenta função deficiente, observamos a manutenção destas células em um estado mais indiferenciado, onde os linfócitos produzem tanto IFN-γ como IL-4, independente do meio em que estas células estejam sendo mantidas. A manutenção da produção de ambas as citocinas, resulta na manutenção da expressão da IL12Rβ2 pelos linfócitos T ativados, mantendo estas células neste estado mais indiferenciado, onde tanto as células T mantidas em condições diferenciadoras Th1 como aquelas mantidas em condições diferenciadoras Th2 mantêm a expressão da IL12Rβ2.

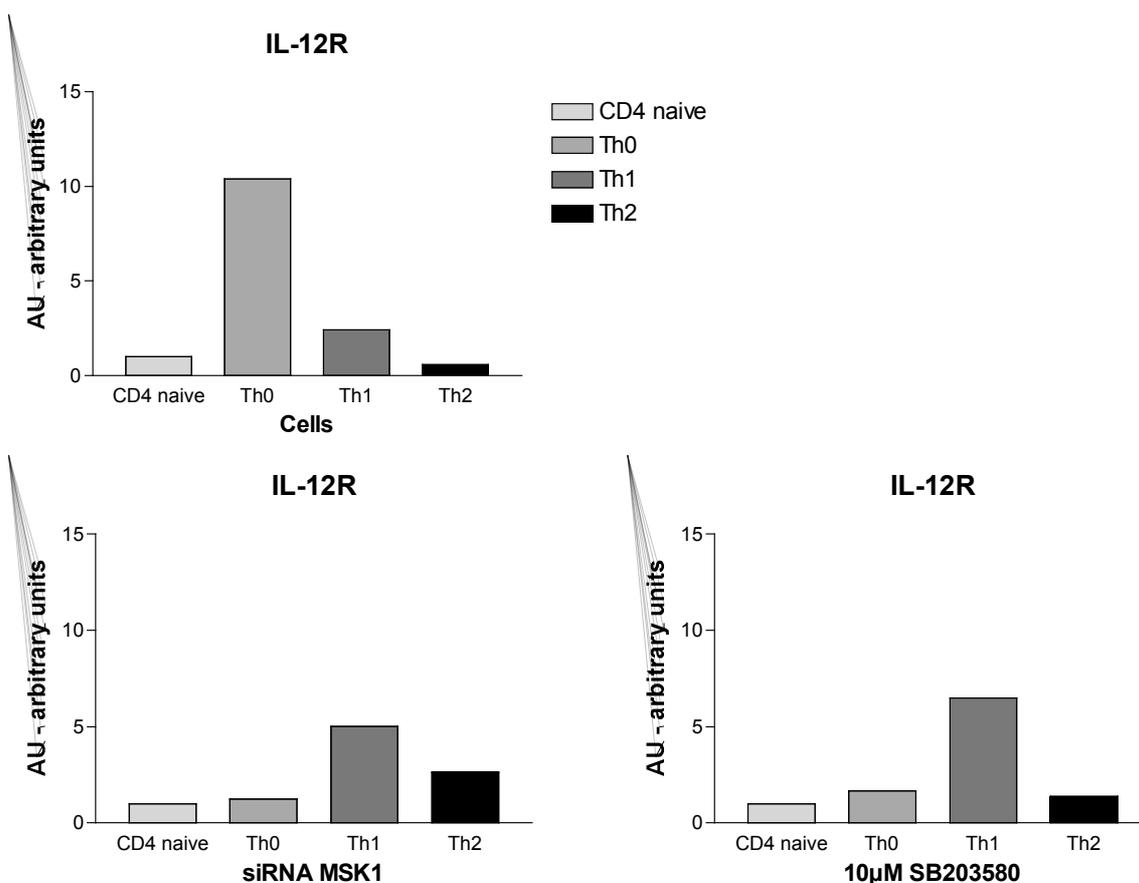


Figura 17 – Expressão IL12Rβ2 em linfócitos T CD₄⁺ Os linfócitos T CD₄⁺ foram isolados de sangue de cordão umbilical de doadores saudáveis. As células foram mantidas em condições

diferenciadoras Th1 ou Th2 e alternativamente mantidas na presença do inibidor SB203580 ou a MSK1 foi silenciada por siRNA. Após seis dias, as células foram coletadas e o RNA extraído, o cDNA sintetizado e realizado Q-PCR para verificar a expressão do IL12R β 2.

4.4.2 Expressão da cadeia α do receptor da IL-4

Escolhemos a cadeia IL4R α pois em linfócitos T esta sub-unidade é expressa exclusivamente pelo IL4R do tipo I. O receptor do tipo II, que é comum a IL-4 e IL-13 é expresso somente em linhagens celulares onde a cadeia γ comum não é expressa, o que não inclui os linfócitos T humanos (87). Logo os resultados aqui apresentados são relativos apenas a sinalização da IL-4.

Quando analisamos a expressão da cadeia IL4R α as células mantidas em meio Th0 ou Th1 apresentaram uma baixa expressão do receptor. Ambas as populações celulares expressam IL4R α de maneira similar. As células mantidas em meio Th2 por sua vez apresentam uma elevada expressão IL4R α , pois a IL-4 presente no meio induz a expressão do receptor. Nas células em que a MSK1 foi silenciada, não foi possível detectar a expressão da IL4R α nas células CD4 naíve e Th0. As células mantidas em meio Th1 mantêm a expressão deste receptor de maneira similar que as células mantidas em condições diferenciadoras Th1. As células mantidas em meio Th2 apresentam a expressão de IL4R α expressão deste receptor diminuída quando comparada com as células mantidas em meio Th2. Contudo, a expressão deste receptor foi menor que as células mantidas em condições diferenciadoras Th1.

Ao analisarmos a expressão do receptor na presença do inibidor SB203580, as células CD4⁺ naíve e os linfócitos mantidos em condições diferenciadoras Th0 apresentam a expressão de IL4R α inalterada. No entanto, pode-se observar o aumento pronunciado da expressão deste receptor em células mantidas em meio Th1, enquanto as células mantidas em meio Th2 apresentam uma diminuição da expressão do receptor. Na presença do inibidor, as células Th1 expressam IL4R α em maior proporção que as células mantidas em meio Th2.

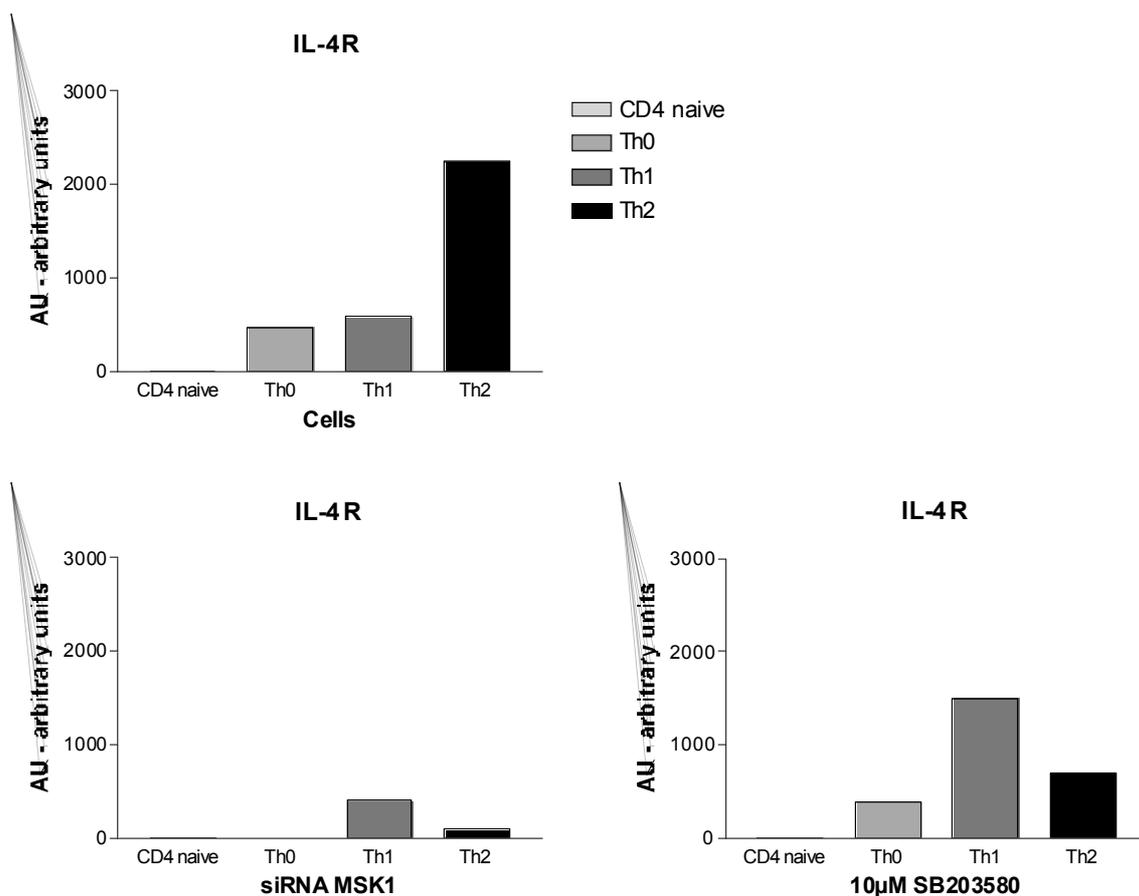


Figura 18 – Expressão IL14R α em linfócitos T CD4+. Os linfócitos T CD4+ foram isolados de sangue de cordão umbilical de doadores saudáveis. As células foram mantidas em condições diferenciadoras Th1 ou Th2 e alternativamente mantidas na presença do inibidor SB203580 ou a MSK1 foi silenciada por siRNA. Após seis dias, as células foram coletadas, o RNA foi extraído, sintetizado o cDNA e feito Q-PCR para verificar a expressão do IL14R α .

4.4.3 Expressão da cadeia α do receptor do IFN- γ

Quando analisamos a expressão da cadeia α do IFNGR (IFNGR1), todas as células apresentaram uma expressão similar desta cadeia do receptor. A expressão da cadeia α parece ser constitutiva e igualmente expressa tanto pelas células Th1 como Th2. Além disso, a magnitude da produção de IFN- γ não é dependente da expressão deste receptor de citocina (133), pois para que a sinalização seja eficaz é necessária a presença de ambas as cadeias do receptor.

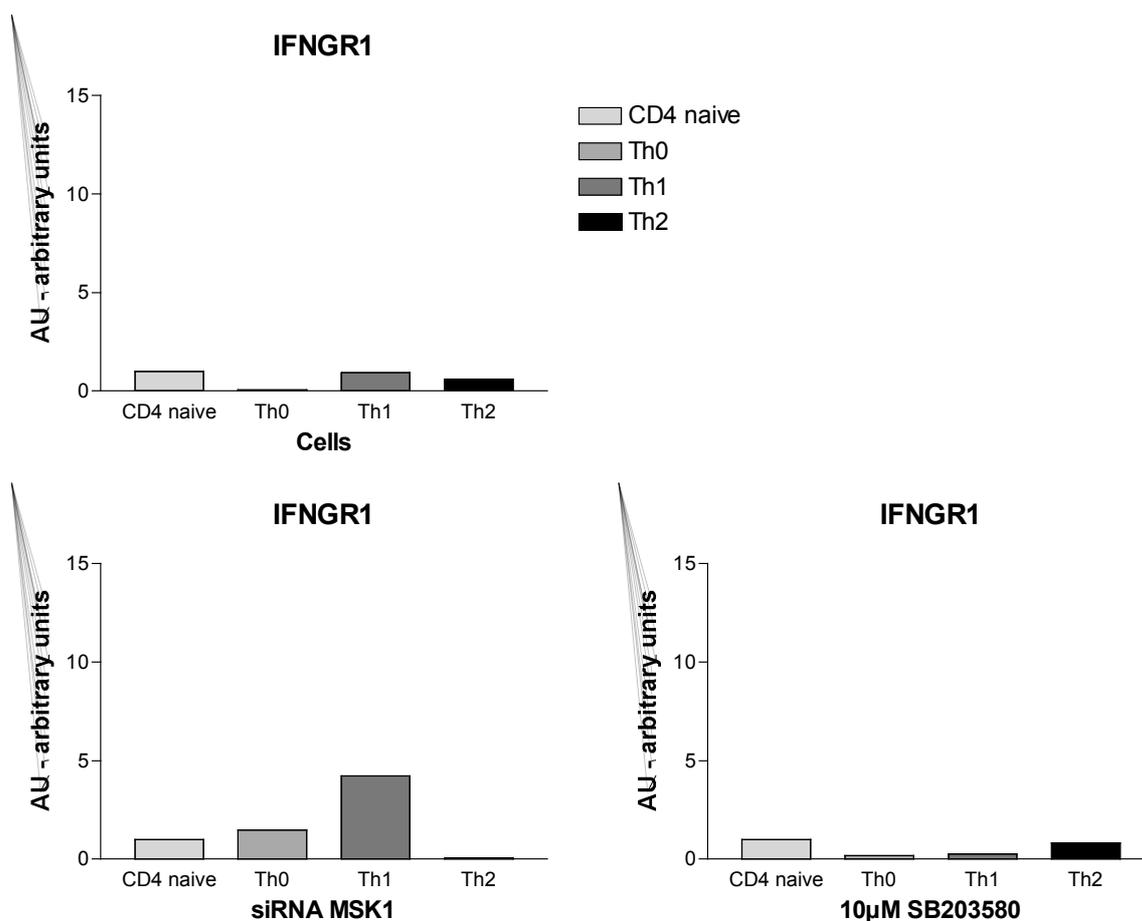


Figura 19 – Expressão IFNGR α /IFNGR1 em linfócitos T CD $_4^+$. Os linfócitos T CD $_4^+$ foram isolados de sangue de cordão umbilical de doadores saudáveis. As células foram mantidas em condições diferenciadoras Th1 ou Th2 e alternativamente mantida na presença do inibidor SB203580 ou a MSK1 foi silenciada por siRNA. Após seis dias, as células foram coletadas, o RNA foi extraído, sintetizado o cDNA e feito Q-PCR para verificar a expressão do IFNGR α .

4.5. Plasticidade dos linfócitos T CD $_4^+$

4.5.1 Separação de linfócitos T CD $_4^+$ pela expressão de receptores de quimiocinas

No decorrer dos nossos experimentos de diferenciação na presença do inibidor da p38MAPK observamos um menor número de células que produzem exclusivamente IFN- γ e um discreto aumento da produção de IL-4. Além disso, observou-se o aumento do número de células duplo-positivas, isto é, que produzem ambas as citocinas.

Imaginamos que as células duplo-positivas possam representar as células diferenciam-se para o perfil Th1 e que posteriormente voltam a um estágio anterior, onde elas voltam a produzir ambas as citocinas; ou pode ser que essas células possuem alguma dificuldade no processo de diferenciação e permanecem no estágio onde as células são duplo-positivas. Alternativamente estas células podem representar as células responsáveis pela plasticidade da resposta imune, e dependendo do estímulo recebido irão produzir ou IFN- γ ou IL-4.

Após o comprometimento com o fenótipo Th1 ou Th2, a remodelagem da cromatina da região promotora dos genes do IFN- γ e da IL-4 ocorre juntamente com o remodelamento do CXCR3 e CCR4, respectivamente (134). Baseando-se nestes achados, imaginamos que os linfócitos que podem produzir ambas as citocinas podem estar num estágio intermediário do processo de diferenciação. Assim, nos perguntamos se estas células poderiam ser representativas das células de memória central T_{CM}, e se possuem alguma plasticidade. Imaginamos que se linfócitos duplo-positivos, isto é, que produzem IFN- γ e IL-4, é representativo desta população, e quando re-estimuladas sob condições diferenciadoras Th1 ou Th2 podem possuir a capacidade de se diferenciar e comprometer-se com o fenótipo inverso.

Como não podemos separar as células através da produção de citocinas, pois quando é feita a marcação intracelular das citocinas produzidas as células são permeabilizadas e fixadas e não podem voltar a serem mantidas em cultura, separamos os linfócitos pela sua expressão de quimiocinas, pois linfócitos T_{CM} comprometidos com o fenótipo Th1 podem expressar CXCR3 e os comprometidos com o fenótipo Th2 expressam CCR4. Consideramos que os linfócitos que expressam ambos os receptores são aqueles que possuem a capacidade de produzir ambas as citocinas. Desta forma, neste trabalho, as células T CD₄⁺ foram separadas conforme a expressão diferencial dos receptores de quimiocinas CXCR3 e CCR4.

Para tanto, os linfócitos T CD₄⁺ foram previamente purificados por RosetteSep ou com o auxílio de hemácias de carneiro e posteriormente foram marcados com os seguintes anticorpos: antiCD4 CyCrome, antiCXCR3- FITC e antiCCR4-APC. As células foram separadas por citometria de fluxo. Obtivemos

a pureza de 97% nas células CCR4 positivas e de aproximadamente 80% nas células duplo positivas.

Conforme podemos observar na figura 20, as células foram separadas fazendo um *gate* nas células que expressavam CD₄⁺ (painel superior esquerdo, figura 20). Posteriormente, as células foram separadas pela expressão dos receptores de quimiocinas (painel superior direito).

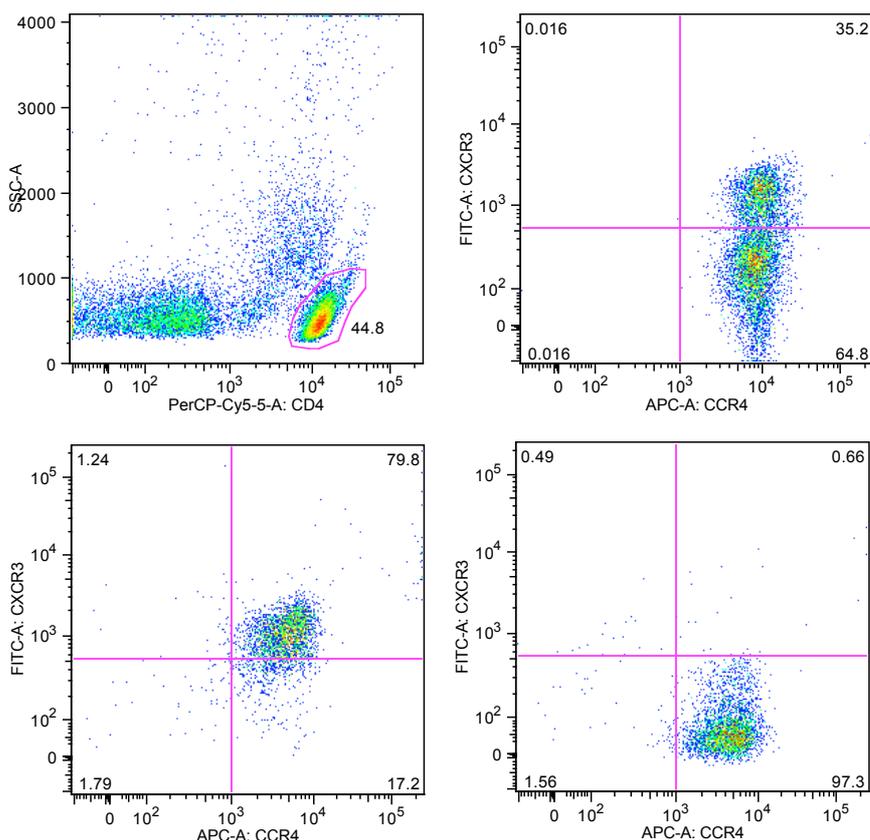


Figura 20 – Separação dos linfócitos T CD₄⁺ pela expressão dos receptores de quimiocinas. Os linfócitos T CD₄⁺ foram isolados de sangue periférico de doadores saudáveis e marcados para a separação celular por citometria de fluxo (painéis superiores) e avaliação da pureza (painéis inferiores). Os números indicados representam as freqüências celulares relativas de cada quadrante.

Nos painéis inferiores da figura está representada a pureza das células após a separação das mesmas. As células duplo-positivas, que expressam CXCR3 e CCR4 representavam aproximadamente freqüência de 35% entre o total de células e a pureza da separação celular por citometria foi de aproximadamente 80% (painel inferior esquerdo). Já as células CCR4

positivas, que são as células que expressam este marcador típico de células Th2 apresentavam uma frequência de aproximadamente 65% do total de células (painel superior direito) e a pureza do sorting foi de aproximadamente 97%. Cabe ressaltar que este não é um experimento representativo e que cada doador tem um perfil característico na expressão dos receptores de quimiocinas e que a maioria dos doadores parece possuir células polarizadas para o perfil Th2 e pouca ou nenhuma célula polarizada em Th1.

Após o sorting, as células duplo-positivas (CXCR3/CCR4) foram contadas e submetidas a condições diferenciadoras Th1 ou Th2 por seis dias. Após este período foi feita a marcação intracelular para IFN- γ e IL-4. Conforme podemos observar na figura 21, não houve alteração na produção de citocinas pelas células separadas por citometria de fluxo e mantidas em meio Th1 ou Th2 por seis dias.

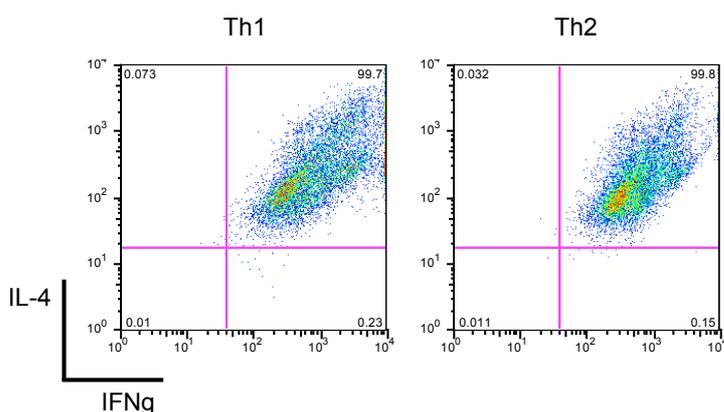


Figura 21 – Produção de citocinas pelas células CCR4⁺ mantidas em condições diferenciadoras Th1 ou Th2 por seis dias. Os linfócitos T CD₄⁺ foram isolados de sangue periférico de doadores saudáveis e marcados para a separação celular por citometria de fluxo. Após a separação celular as células foram mantidas em condições diferenciadoras Th1 ou Th2 por seis dias e posteriormente foi feita a marcação intracelular para IFN- γ e IL-4. Os números indicados representam as frequências celulares relativas de cada quadrante.

As células CCR4 também foram contadas e submetidas a condições diferenciadoras não polarizantes (Thp), Th1 ou Th2 por seis dias. Após este período foi feita a marcação intracelular para IFN- γ e IL-4. Conforme podemos observar na figura 22, não houve alteração na produção de citocinas pelas células separadas por citometria de fluxo e mantidas sob diferentes condições polarizantes por seis dias.

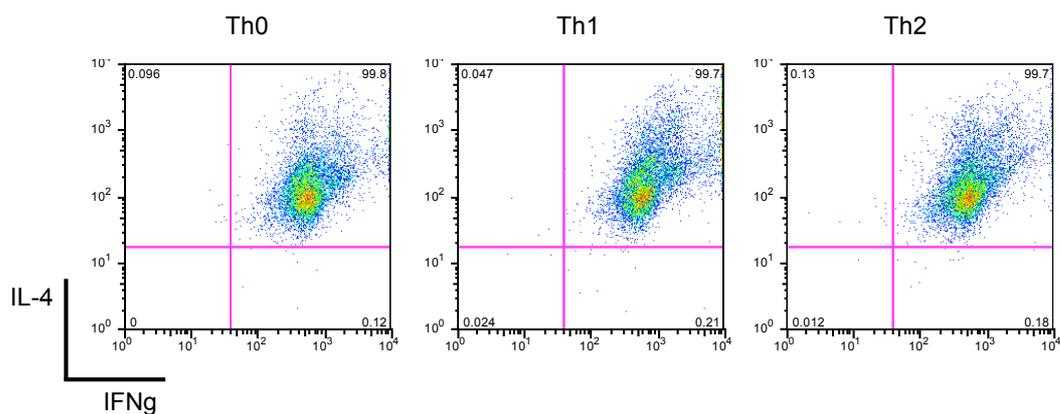


Figura 22 – Produção de citocinas pelas células CXCR3/CCR4+ mantidas em condições diferenciadoras Th1 ou Th2 por seis dias. Os linfócitos T CD₄⁺ foram isolados de sangue periférico de doadores saudáveis e marcados para a separação celular por citometria de fluxo. Após a separação celular as células foram mantidas em condições diferenciadoras Th1 ou Th2 por seis dias e posteriormente foi feita a marcação intracelular para IFN- γ e IL-4. Os números indicados representam as frequências celulares relativas de cada quadrante.

Independente da expressão de determinado receptor de quimiocina ou do meio no qual as células foram mantidas, todas as condições foram capazes de produzir ambas as citocinas. Tais experimentos devem ser repetidos para verificar se as células de diferentes doadores saudáveis apresentam resultados similares.

7. Discussão

A diferenciação das células T CD₄⁺ naïve é direcionada por células do sistema imune inato que induzem a uma série de sinais positivos e negativos que favorecem a diferenciação dos linfócitos Thp em células Th1 ou Th2 (135). Diversos fatores influenciam o processo de diferenciação dos linfócitos T, dentre os quais as MAPK, que estão envolvidas em diversos aspectos da resposta imune, da fase de iniciação da resposta imune inata, a ativação da imunidade adaptativa e a morte celular quando a função imune está completa (2)

As MAPK normalmente são ativadas por uma cascata de eventos de fosforilação onde uma quinase ativa a outra. A p38MAPK é uma exceção a esse paradigma, pois além da via clássica de ativação das MAPKs ela também pode ser ativada através da estimulação do TCR nos linfócitos (31). O papel da p38MAPK na diferenciação dos linfócitos T CD₄⁺ naïve ativados e mantidos em condições diferenciadoras Th1 ou Th2 é bastante controverso. A participação desta quinase no processo de ativação e diferenciação das células murinas e humanas são divergentes, e variam conforme as células e o modelo de diferenciação *in vitro* utilizado.

Quando ativamos os linfócitos T CD₄⁺ naïve murinos na presença do inibidor da p38MAPK (SB203580), foi observado a diminuição da produção de IFN- γ pelas células comprometidas com a produção exclusiva desta citocina, o que está em concordância com o fenômeno anteriormente descrito pelos demais autores. No modelo murino foi descrito que a p38MAPK está envolvida na regulação da produção de IFN- γ pelos linfócitos T CD₄⁺ (33, 136). Nestas células, a IL-12 ativa a p38MAPK, mas não Erk1/2, e a fosforilação de p38MAPK é necessária para a indução da produção de IFN- γ (72).

Estes autores não observaram nenhum efeito significativo na síntese de IL-4 associada ao bloqueio da via p38MAPK. Em contraste, nós observamos um aumento moderado da produção de IL-4. A alteração da produção de IL-4 pode ser resultante da menor produção de IFN- γ , pois foi demonstrado que a presença desta citocina e o IFN- α regulam negativamente a IL-4 em nível pós-transcricional através da diminuição da estabilidade do RNA mensageiro do IL-

4R, tanto em células B como monócitos, suprimindo desta forma a resposta a IL-4, devido à menor disponibilidade deste receptor (137).

Além disso, observamos a diminuição da produção de IL-5 nas células ativadas e mantidas em condições polarizantes Th2 por seis dias de maneira dose-dependente, quando mensuramos a produção desta citocina no sobrenadante coletado após seis dias de cultura por ELISA. Uma possibilidade é que a produção de IL-5 também seja modulada conforme a quantidade de IFN- γ presente no meio.

Tanto a IL-4 como a IL-5 são citocinas Th2, e a regulação destas citocinas parece ocorrer em conjunto por outros elementos regulatórios como o LCR e o Rad50 (138). No entanto, em nossos experimentos observamos efeito contrário na produção de IL-4 e IL-5, tal fato pode ser decorrente aos diferentes métodos utilizados para mensurar a produção de citocinas. Nos linfócitos T murinos deficientes em MSK1, a produção de IL-4 varia conforme o tempo que os linfócitos estão sendo estimulados, isto é, no momento inicial há uma menor produção de IL-4 e posteriormente a produção desta citocina aumenta. Assim, como estimulamos as células por seis dias e a técnica utilizada (ICC) mensura a produção de citocina produzida por cada célula, observamos a produção de IL-4 neste determinado momento, enquanto a IL-5 foi mensurada por ELISA, que mede toda a produção de citocina produzida durante os dias em que as células ficaram em cultura.

Nas células humanas naïve, ativando as células T CD₄⁺ com anti-CD3 e anti-CD28 na presença do inibidor SB203580 na concentração final de 2 μ M, e mantendo as células alternativamente na presença de IL-12 ou IL-4 por cinco dias e reestimulando estas células por mais seis dias, demonstrou-se que a p38MAPK está envolvida na regulação da expressão de IFN- γ induzida pela IL-12, mas não na produção de IFN- γ induzida diretamente pela ativação celular via TCR. A p38MAPK também controla a produção das citocinas características do perfil Th2: IL-4, IL-5 e IL-13 (139).

Nos nossos experimentos, ativamos os linfócitos T CD₄⁺ humanos naïve com anti-CD3 e anti-CD28 na presença de IL-2 e 10 μ M do inibidor SB203580, e mantivemos estas células por seis dias em condições diferenciadoras Th1 (rIL-12p70 e anti-IL-4) ou Th2 (rIL-4, e anti-IFN- γ). Escolhemos esta dose do

inibidor por ser a IC_{50} (32), e também por ser a dose utilizada nos estudos realizados no modelo murino. O inibidor SB203580 inibe a p38MAPK de maneira específica pela ligação competitiva ao sítio de ATP (25). No entanto, as propriedades bioquímicas e a sensibilidade ao inibidor das quatro isoformas da p38MAPK são distintas (25). O SB203580 inibe de maneira equivalente (mesma IC_{50}) as isoformas α e β da p38MAPK. Já as isoformas γ e δ não são inibidas na concentração utilizada (32). Assim, a isoforma δ continuou na sua forma ativa. Os linfócitos não expressam o homólogo γ , pois a sua expressão é restrita aos músculos esqueléticos (12).

Sob esta condição experimental, observamos a menor produção de IFN- γ pelas células que estavam produzindo exclusivamente IFN- γ . Do mesmo modo que nas células murinas, foi observado um discreto aumento na produção de IL-4 por estas células. Cabe ressaltar que após manter os linfócitos T por seis dias em condições diferenciadoras Th1 ou Th2 as células ainda não estão totalmente polarizadas. Em ambos os grupos celulares mantidos em condições polarizantes, há ainda um grande número de células que produzem tanto IFN- γ como IL-4. Tais células não estão diferenciadas. É importante salientarmos que em todos os experimentos foi considerado apenas o percentual de células produzindo uma ou outra citocina. Consideramos que as células produtoras das duas citocinas simultaneamente não estão ainda comprometidas com os fenótipos Th1 ou Th2.

A inibição das isoformas α e β da p38MAPK induz a menor produção de IFN- γ das células mantidas em condições diferenciadoras Th1. No entanto, estas células ainda produzem IFN- γ . Alternativamente, pode-se sugerir que outra via de sinalização esteja envolvida na sinalização para a produção de IFN- γ . Uma via alternativa envolvida na produção destas citocinas é a via MEK-ERK (quinase ativada por sinais extracelulares-1), pois já foi demonstrado anteriormente que a ativação dos linfócitos T via TCR induz a produção de IFN- γ e TNF- α por uma via independente da sinalização através da p38MAPK (140, 141).

Outro fato interessante é que há um grande número de células duplo-positivas quando a p38MAPK é inibida. Estas células se mantêm em um estado mais indiferenciado e são capazes de produzir IFN- γ e IL-4. Estas

células parecem precisar de um tempo maior ou maior número de divisões celulares para adquirir o fenótipo de uma célula Th1 ou Th2. Diversos trabalhos utilizando inibidores da p38MAPK corroboram com esta hipótese demonstrando que a p38 α possui um papel importante na regulação da proliferação, diferenciação e apoptose de células imunes e não-imunes (142), entre os quais monócitos, cardiomiócitos, adipócitos, neurônios e linfócitos B (143-146).

Quatro grupos descreveram a geração do camundongo deficiente na isoforma α da p38 (147-150). Todos os casos resultaram na morte do embrião provavelmente devido à má vascularização da placenta. Os fetos que se desenvolvem a termo morrem logo após o nascimento devido a problemas pulmonares. Posteriormente verificou-se que esta isoforma é importante no processo de diferenciação das *stem cells* pulmonares. Quando esta proteína quinase é silenciada, há aumento no número de divisões celulares e o processo de diferenciação torna-se deficiente (151). Nas células hematopoiéticas e nos fibroblastos embrionários deficientes em p38MAPK α há aumento da proliferação devido à ativação persistente da via c-Jun N-terminal quinase (JNK) (152).

A p38MAPK também controla a proliferação das células musculares por antagonizar a ativação da via JNK. Durante a miogênese, as células deficientes na isoforma α apresentam atraso na saída do ciclo celular e contínua proliferação em condições diferenciadoras (153).

A MSK1 é uma quinase ativada por p38MAPK e Erk1/2 (40). Os camundongos deficientes em MSK1 e MSK2 são viáveis e férteis, da mesma forma que o camundongo deficiente em ambas as quinases (43). Estes camundongos apresentam número normal de células T no timo, e o desenvolvimento destas células parece normal, havendo a manutenção da proporção entre os linfócitos CD4 e CD8 (43). No entanto, o número de células T no baço apresenta-se reduzido quando comparado ao camundongo selvagem e a proliferação destas células em resposta a IL-2 é diminuída (154).

A estimulação via TCR em linfócitos T murinos leva a ativação da MSK1 via p38MAPK e Erk1/2 (154). O silenciamento da MSK1 utilizando siRNA em células T humanas ou a diferenciação dos linfócitos murinos deficientes nesta

quinase resultam na menor produção de IFN- γ e um moderado aumento da produção de IL-4 em ambos os tipos celulares. O silenciamento da MSK1 apresentou resultado similar a inibição da p38MAPK, indicando que esta via de sinalização participa do processo de ativação dos linfócitos T e posteriormente da produção das citocinas características de perfil Th1 ou Th2.

A inibição da MSK1 resultou na diminuição da produção de IFN- γ , mas da mesma maneira que a inibição da p38MAPK, não aboliu a produção desta citocina. Além disso, os linfócitos T dos camundongos deficientes em MSK1 ainda retêm a capacidade de produzir IFN- γ quanto estimulados sob condições diferenciadoras Th1 ou Th2. Em ambas as situações, a MSK2 pode ser a quinase responsável pela manutenção da produção de citocinas por estas células, pois as isoformas da MSK possuem 75% de homologia na sua seqüência de aminoácidos (40). Alternativamente, outra via de sinalização redundante pode garantir a sinalização necessária para a produção destas citocinas (140, 141).

Nos linfócitos murinos, a fosforilação da MSK1 resultante da ativação do TCR e estimulação das células na presença da IL-2 foram suficientes para fosforilar CREB (154). O papel de CREB nos linfócitos T permanece desconhecido, mas estudos que utilizaram camundongos deficientes em CREB e ATF-1, ou que utilizaram a super-expressão do dominante negativo de CREB indicam a participação desta molécula na proliferação (155, 156). Esta pode ser uma via indireta pela qual p38MAPK e MSK1 controlam a proliferação celular e, conseqüentemente, a inibição de ambas as quinases podem resultar em alterações na proliferação. A MSK1 também possui um papel no controle da proliferação de alguns tipos celulares. O silenciamento da MSK1 induz a diminuição da proliferação em queratinócitos HaCaT humanos e na linhagem de carcinoma epidermóide humana A431 (157). Apesar de apresentar papel oposto a p38MAPK na proliferação celular, a MSK1 pode ser responsável pelo alteração do processo de diferenciação resultando na manutenção das células duplo-positivas quando os linfócitos T são ativados e mantidos sob condições polarizantes por seis dias.

A polarização dos linfócitos T é um processo gradual que ocorre durante diversas divisões celulares onde os genes das citocinas são epigeneticamente modificados de modo a favorecer a sua expressão contínua, enquanto os

genes das citocinas da linhagem alternativa são epigeneticamente silenciados (158). A MSK1 é a única quinase descrita capaz de fosforilar a Serina 10 da histona H3 (41), modificação covalente relacionada com a acetilação e a remodelagem da cromatina. Assim, nós havíamos suposto que a p38MAPK e a MSK1 poderiam estar envolvidas na fosforilação de histonas H3, resultando no remodelamento da cromatina na região promotora dos genes *ifng* e *il4* durante o processo de diferenciação dos linfócitos T.

A fosforilação da porção N-terminal da serina 10 da histona H3 foi primeiramente descrita como sendo importante na condensação cromossomal e no ciclo celular. No entanto, estudos recentes têm demonstrado a importância desta modificação na ativação da transcrição gênica de vários genes em diferentes organismos (42). A fosforilação da serina 10 pode induzir a ativação de *immediate early genes* (EI), postulando assim a relação entre a fosforilação e a ativação transcricional (159). Demonstrou-se que a estimulação ocasionada pela fosforilação da histona H3 promove uma ativação rápida e transitória. Como estas células parecem ser mais suscetíveis à acetilação (160), supõem-se que a fosforilação e a acetilação podem estar correlacionadas durante a ativação transcricional via ativação da cascata MAPK (161). Posteriormente foi demonstrado que a acetilação não está obrigatoriamente associada à fosforilação (41). Um argumento plausível é que a fosforilação poderia ocorrer e após a acetilação ela desaparecer. Em fibroblastos dos animais MSK1/2 deficiente foi observado a redução da fosforilação da histona H3 e de HMG14 (41). Nestes camundongos deficientes dessas proteínas quinase, a acetilação da histona H3 não foi prejudicada e os *immediate early genes* podem ser induzidos com eficiência reduzida (41).

Desta forma, a MSK1 poderia estar envolvida na fosforilação da histona H3 no período inicial do processo de diferenciação dos linfócitos T naive nas sub-populações Th1/2. Este ponto pode ser importante no controle da diferenciação dos linfócitos T naive, inter-relacionando o processo de diferenciação destas células nas suas sub-populações funcionais com as vias de sinalização MAPKs e a remodelagem da cromatina das citocinas características de cada perfil. No entanto, após realizar diversos experimentos de imunoprecipitação de cromatina (ChIP), não conseguimos observar a fosforilação da serina 10 na histona H3. Tal fato pode ser decorrente da

fosforilação ser uma modificação transitória, ou pelo fato das células utilizadas para a realização do CHIP representarem uma população heterogênea de células que estão em processo de diferenciação.

A segunda hipótese a ser testada para elucidar o mecanismo pelo qual a p38MAPK e a MSK1 estão envolvidas na regulação da produção das citocinas características das células Th1 e Th2 é a modulação da expressão do receptor das citocinas IL-4 e IL-12. Durante o processo de diferenciação, os linfócitos T passam a expressar de maneira diferenciada as cadeias IL12R β 2 e IL4R α dos receptores da IL-12 e IL-4 respectivamente. Desta forma, a responsividade celular a determinada citocina depende dos receptores celulares expressos, demonstrando que os receptores de citocina participam ativamente do conjunto de fatores que influenciam o processo de diferenciação dos linfócitos T murinos e humanos.

A modulação do receptor da IL-12 pode influenciar o processo de diferenciação dos linfócitos T. Este receptor possui duas subunidades que ligam a IL-12 com baixa afinidade e juntas formam o receptor de alta afinidade para esta citocina, o IL-12R β 1 (162) e IL-12R β 2 (60). Os linfócitos T *naïve* expressam os receptores para IFN- γ , mas induzem e mantêm a expressão da subunidade IL-12R β 2 do IL-12R somente após a ativação na presença do IFN- γ (60, 63). Desta forma, o IFN- γ promove a expressão da cadeia IL-12R β 2, enquanto a IL-4 tem papel oposto (63). Além disso, o fator de transcrição T-bet, característico das células comprometidas com o perfil Th1 (109), é induzido pela sinalização via IFN- γ e STAT1 durante a ativação das células T e desta maneira modula a expressão da cadeia IL-12R β 2 (66).

Observamos a expressão da subunidade IL-12R β 2 do IL-12R nos linfócitos mantidos em condições diferenciadoras Th1, conforme descrito na literatura (60, 63). As células T mantidas em condições diferenciadoras Th2 apresentam menor expressão deste receptor. Provavelmente ainda observamos a expressão deste receptor nas células mantidas em meio Th2, pois estas células não se encontram totalmente polarizadas, e representam uma população que apresenta uma produção heterogenia de citocinas.

Além disso, demonstrou-se no modelo murino, que apenas a expressão ectópica da IL12R β 2 não é suficiente para alterar a produção de IL-4 ou induzir

a produção de IFN- γ , mesmo quando a via de sinalização via Stat4 foi restaurada (163), é necessário que ocorra um estímulo que induza de maneira eficiente a sinalização intracelular. Posteriormente, também no modelo murino, demonstrou-se que a fosforilação de Stat4 é necessária para a indução da produção de IFN- γ pela via de sinalização da IL-12 (65). Assim, a fosforilação de Stat4 pode ser um componente de integração das vias de sinalização da p38MAPK que parece estar envolvida na produção de IFN- γ e a via de sinalização da IL-12, que também é necessária para a produção desta citocina.

A fosforilação de Stat4 pode ser o ponto de convergência destas vias de sinalização, pois a estimulação via IL-12 resulta na ativação da Janus quinase 2 (Jnk2) e Tyk2, que fosforilam o IL12R, promovendo a alteração conformacional que possibilita a ligação de Stat4 (67, 68). O papel de Stat4 na sinalização parece ser importante, conforme pode ser observado no camundongo deficiente em Stat4, que apresenta um fenótipo concordante com a deficiência de IL-12 e IL-12R em camundongos e humanos, que possuem a produção de IFN- γ e a diferenciação para o fenótipo Th1 alterada (69, 70). Stat4 é fosforilado na tirosina 693 pelas Jaks, que induzem a dimerização de Stat e a sua translocação para o núcleo, regulando a expressão gênica (68). Ainda não foi elucidado se Stat4 contribui diretamente para a regulação gênica do IFN- γ , embora tenham sido descritos sítios potenciais para a ligação de Stat4 próximo ao gene do IFN- γ (71).

A IL-12 ativa a via MKK6/p38MAPK de duas maneiras: I) dependente de Stat4, induzindo a fosforilação da serina 721 (65, 72, 73), ou II) independente de Stat4 (72). Ambas as vias de ativação propostas induzem a produção de IFN- γ . Apesar de não estar descrito na literatura qual via induz a ativação de p38MAPK, a inibição desta proteína quinase resulta na menor produção de IFN- γ pelas células comprometidas exclusivamente com a produção desta citocina e aumento moderado da produção de IL-4.

O receptor da IL-4 está presente em diversos tecidos e também influencia a produção de citocinas pelas células T. Existem dois tipos de receptor da IL-4. O IL-4R do tipo I, que consiste na cadeia- α que forma um homodímero com a cadeia- γ comum, que foi primeiramente identificada como o receptor da IL-2. O receptor do tipo II é composto pelo IL-4R mais o IL-13R (84). A modulação do

receptor das citocinas envolvidas durante o processo de diferenciação é um evento importante durante a transdução de sinal das citocinas.

Nos nossos experimentos, observamos a tendência em aumentar o número de células produtoras de IL-4 quando as células Th1 ou Th2 foram diferenciadas na presença do inibidor da p38MAPK ou quando o gene da MSK1 foi silenciado. Tal fato provavelmente é decorrente da menor produção de IFN- γ e pela maior estabilidade do RNA mensageiro deste receptor resultando na modulação positiva da expressão para IL-4R, resultando na produção de IL-4 por estas células (137).

As células Th1 retêm a capacidade de responder tanto a IL-12 como a IL-4, pois as células Th1 diferenciadas *in vitro* mantêm a integridade da via de sinalização da IL-4 (92). Desta forma, observamos que na presença do inibidor das isoformas α e β da p38MAPK há diminuição da produção de IFN- γ pelas células comprometidas exclusivamente com a produção desta citocina e foi observado um moderado aumento da produção de IL-4. A manutenção da produção de IL-4 pelas células T ativadas e mantidas em condições diferenciadoras Th1 pode induzir a expressão do seu receptor da cadeia IL4R α . O aumento da expressão da IL4R α resulta na manutenção da produção de IL-4 bem como na manutenção da produção de IFN- γ , pois ambas as vias de sinalização estão sendo estimuladas, o que mantém estas células em um estado indiferenciado. Provavelmente, a inibição da p38MAPK influencia o processo de diferenciação dos linfócitos T alterando o processo de diferenciação de maneira similar ao que ocorre com as células tronco pulmonares deficientes na isoforma α da p38MAPK (151). Neste modelo, a deficiência desta proteína resulta no aumento da proliferação celular e o processo de diferenciação passa a ser deficiente (151).

Nas células em que a MSK1 foi silenciada, também observamos a expressão da IL4R α tanto nas células Th1 como Th2, resultando em um fenótipo similar ao das células em que a p38MAPK foi inibida. Porém, quando comparamos a expressão da IL4R α , nas células em que a MSK1 foi silenciada, com as células em que a MSK1 não foi silenciada e mantida sob as mesmas condições, observamos que a IL4R α está diminuída nas células que passaram pelo silenciamento da MSK1. Tal fato pode ser resultante do processo de

silenciamento da MSK1, que é uma quinase que pode influenciar o processo de divisão celular. A expressão do IFNGR1 não foi alterada nas condições experimentais utilizadas, com exceção das células mantidas em meio Th1 em que a MSK1 foi silenciada. Como a subunidade α é expressa na superfície de quase todas as células, era esperado que todas as condições experimentais apresentassem expressão similar deste receptor de citocina (91).

A alteração da expressão dos receptores de citocinas parece ser um fenômeno biológico importante, onde a inibição do circuito da p38MAPK/MSK1 resulta na alteração da produção das citocinas dos linfócitos T ativado e mantido em meio Th1 ou Th2. A inibição desta via pode resultar na ativação de vias alternativas de sinalização (140, 141). Além disso, parece haver alterações no ciclo celular e também na expressão dos receptores. Esses processos são extremamente complexos e parecem estar intimamente relacionados. Não se sabe se o processo de diferenciação celular é algo determinístico ou estocástico (164), mas não parece haver um único fator que determine o fenótipo celular resultante, mas sim vários fatores, que em conjunto resultam em determinado fenótipo celular.

Não há um modelo definitivo de diferenciação e comprometimento celular, acredita-se que o comprometimento celular ocorre durante o período inicial de diferenciação dos linfócitos T (111). Acreditamos em um modelo no qual as diversas vias coexistem em paralelo resultando em populações heterogêneas e multifuncionais que expressam um ou ambos os perfis terminais e podem ser encontradas co-expressando os marcadores naïve. Neste modelo proposto, o processo de comprometimento e diferenciação celular não segue uma determinada seqüência de eventos. Desta forma a partir de um mesmo ponto inicial, pode haver diversos caminhos ou vias que podem resultar em diferentes fenótipos celulares (126).

Inicialmente a resposta imune e conseqüentemente o processo de divisão celular era tido como um processo linear e uniforme, onde cada célula precursora naïve era estimulada de uma maneira única, resultando em uma progênie homogênea. Contudo, a seleção clonal dos linfócitos T está intimamente associada à divisão celular, e uma célula pode ser estimulada de tal maneira que a divisão dê origem a células filhas com receptores de superfície idênticos que se adaptem e resultem em diferentes fenótipos. Além

disso, há outro modelo de diferenciação proposto, onde uma única célula pode resultar em células filhas que expressam de maneira diferencial os receptores de citocinas. Neste modelo, um mecanismo possível para gerar a heterogeneidade da população dos linfócitos pode ser a divisão assimétrica das células (124).

Além disso, diversos fatores contribuem em conjunto para o processo de diferenciação dos linfócitos T. O tipo de estimulação que a célula recebe resulta nas diferentes vias de sinalização que são ativadas, e inclui a concentração do antígeno, as moléculas co-estimulatórias presentes, as citocinas presentes no meio, a frequência das células respondedoras, bem como a densidade das células apresentadoras de antígenos (165).

No momento que inibimos a p38MAPK ou silenciemos a MSK1 provavelmente não alteramos apenas o processo de sinalização celular, mas também o processo de diferenciação, pois ambas as quinases parecem participar do controle da proliferação de diversos tipos celulares (142-146, 151-153, 157). Assim, a alteração da produção de citocinas pelas células T naíve estimuladas sob condições diferenciadoras Th1/2, onde a p38MAPK foi inibida ou a MSK1 foi silenciada, parece ser resultante da alteração da expressão das cadeias IL12R β 2 e IL4R α , modificando o processo de sinalização celular e a responsividade a IL-12 e IL-4.

A diferenciação das células T CD $_4^+$ naíve para células efetoras e de memória não segue uma determinada seqüência de eventos (126). Foi demonstrado no modelo murino que os linfócitos que permanecem duplo-positivos estão num estágio intermediário de diferenciação e esta população é estável e persiste *in vivo*. Assim, imaginamos que as células duplo-positivas podem ser representativas dos linfócitos responsáveis pela plasticidade dos linfócitos T humanos e quando re-estimuladas sob condições diferenciadoras Th1 ou Th2 podem ser responsáveis pela produção tanto IFN- γ e IL-4.

Foi feita a separação celular destas células baseando-se na expressão dos receptores de quimiocinas CXCR3 e CCR4, pois foi demonstrado que a expressão destes receptores ocorre num estágio inicial do desenvolvimento dos linfócitos T CD $_4^+$ aparentemente naíve. Estas células expressam os receptores de quimiocinas CXCR3 e CCR4 e demonstra padrões de expressão gênica e resposta funcional característica dos linfócitos T de memória (126).

Como a remodelagem da cromatina da região promotora dos genes do IFN- γ está acoplada com a remodelagem da cromatina do gene do receptor de quimiocina CXCR3, enquanto o remodelamento da região promotora da IL-4 está associado à remodelagem da cromatina do gene do CCR4 (134), consideramos que os linfócitos que expressam ambos os receptores de quimiocinas são aqueles que possuem a capacidade de produzir tanto IFN- γ como IL-4. Desta forma, neste trabalho, as células T CD₄⁺ foram separadas conforme a expressão diferencial dos receptores de quimiocinas CXCR3 e CCR4. Assim, foram separadas as células pré-Th2 (células que expressam exclusivamente CCR4) e as células que não estavam comprometidas (células duplo-positivas para CXCR3 e CCR4). As células pré-Th1 (células que expressam apenas CXCR3) não foram separadas, pois em todas as amostras utilizadas o número de células foi extremamente baixo, impossibilitando a separação celular.

Apesar da pequena porcentagem das células que expressavam CCR4 ou CCR4/CXCR3, a pureza das células isoladas foi elevada. Após a separação celular essas células foram mantidas por seis dias sob condições não-polarizantes, Th1 ou Th2. No entanto, independente do tipo de receptor de quimiocina expresso na superfície e independente do meio no qual as células foram mantidas, elas foram capazes de produzir ambas as citocinas. Estes dados estão em concordância com aqueles obtidos no modelo murino, onde as células duplo-positivas, isto é, capazes de produzir tanto IFN- γ como IL-4 persistem e permanecem como células duplo-positivas (129).

As células CCR4 positivas, independente do estímulo recebido também continuam produzindo IFN- γ e IL-4, em divergência do observado no modelo murino (129). Essas diferenças podem ser resultantes dos parâmetros utilizados para separar estas populações celulares. Nós nos baseamos na expressão dos receptores de quimiocinas para determinar as células que seriam separadas. Contudo, apesar da pureza do processo de separação celular ter sido elevada, a população celular estudada é heterogênea, pois não apenas os linfócitos T_{CM} expressam CXCR3 ou CCR4, mas os linfócitos T_{EM} também expressam esses receptores. No modelo murino estes tipos celulares T_{CM} e T_{EM} possuem habilidade diferente na produção de citocinas (129).

Apesar da heterogeneidade na expressão desses receptores de quimiocinas escolhemos este parâmetro para a separação celular, pois a expressão de CD62 também não ser um bom parâmetro para isolar estas populações celulares, visto que apesar das células T_{CM} expressarem o marcador CD62L^{high}, e, este também é um marcador de células naíve. Além disso, as células T_{EM} apresentam a expressão heterogênea do marcador CD62. No estudo utilizando células murinas, as células foram separadas baseando-se apenas na expressão de CD62L (129). As células CD62L^{high} foram consideradas como T_{CM} e as células CD62^{low} foram consideradas T_{EM} (129).

Além da heterogeneidade das células separadas, estimulamos as células isoladas por citometria *in vitro*, e pode haver outros fatores determinantes na plasticidade e polarização destas células. Desta forma, para elucidar se as células duplo-positivas são aquelas responsáveis pela plasticidade dos linfócitos T devemos utilizar um conjunto de parâmetros que resulte na obtenção de uma população homogênea após a separação celular por citometria, o que dificulta ainda mais o processo de separação celular. Uma alternativa seria separar a população baseando-se nos parâmetros já utilizados (CD4, CXCR3, CCR4), acrescidos da marcação para CD62 e CCR7.

Em sumário, os nossos dados demonstram que a p38MAPK está envolvida na produção de IFN- γ no período de diferenciação inicial das células Th1/2 das células murinas e humanas. Além disso, a MSK1, que é ativada pela p38MAPK, também está envolvida na regulação da produção de citocinas no período de diferenciação inicial dos linfócitos T. Observamos que a presença de SB203580 foi aditiva a ausência do gene MSK na inibição da produção de IFN- γ e também foi observada a tendência de elevar o número de células que produzem IL-4. Em conjunto, os nossos dados sugerem que a MSK1 e p38MAPK agem em conjunto. No entanto, os nossos resultados onde a p38MAPK foi inibida ou a MSK1 silenciada indicam que há no mínimo mais uma via alternativa regulando a produção das citocinas características das células Th1/2.

Um dos mecanismos pelo qual o circuito p38MAPK/MSK1 influenciam a produção de citocinas dos linfócitos T ativados e mantidos em condições diferenciadoras Th1/2 parece ser a modulação das cadeias IL12R β 2 e IL4R α .

dos receptores de citocinas da IL-12 e da IL-4. Esses receptores são modulados conforme as citocinas presentes no meio, assim, a alteração da sinalização da p38MAPK/MSK1 altera a sinalização intracelular, que resulta na produção alterada de citocinas e como resultado há a alteração da expressão das cadeias IL12R β 2 e IL4R α dos receptores de citocinas da IL-12 e da IL-4.

6. Conclusões

* A p38MAPK está envolvida na produção de IFN- γ no período de diferenciação inicial das células Th1/2.

* As quinases MSK1/2, ativadas pela p38MAPK, estão envolvidas no período de diferenciação inicial das células Th1/2.

* A presença de SB203580 foi aditiva a ausência do gene MSK na inibição da produção de IFN- γ . A tendência de elevar o número de células que produzem IL-4 também foi observada.

* MSK1 e p38MAPK agem em conjunto, mas nossos resultados indicam que há no mínimo mais uma via alternativa regulando a produção das citocinas características das células Th1/2.

* 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.

* Os nossos dados sugerem que o circuito p38MAPK/MSK1 participa do processo de diferenciação dos linfócitos T ativados e mantidos em condições diferenciadoras Th1/2.

7. Bibliografia

1. Macdonald, N., Welburn, J.P., Noble, M.E., Nguyen, A., Yaffe, M.B., Clynes, D., Moggs, J.G., Orphanides, G., Thomson, S., Edmunds, J.W., Clayton, A.L., Endicott, J.A., Mahadevan, L.C. (2005) Molecular basis for the recognition of phosphorylated and phosphoacetylated histone h3 by 14-3-3. *Mol Cell*, **20**, 199-211.
2. Dong, C., Davis, R.J., Flavell, R.A. (2002) MAP kinases in the immune response. *Annu Rev Immunol*, **20**, 55-72.
3. Chang, L.K., M. (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*, **410**, 37-40.
4. Han, J., Lee, J.D., Bibbs, L., Ulevitch, R.J. (1994) A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science*, **265**, 808-811.
5. Freshney, N.W., Rawlinson, L., Guesdon, F., Jones, E., Cowley, S., Hsuan, J., Saklatvala, J. (1994) Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27. *Cell*, **78**, 1039-1049.
6. Rouse, J., Cohen, P., Trigon, S., Morange, M., Alonso-Llamazares, A., Zamanillo, D., Hunt, T., Nebreda, A.R. (1994) A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell*, **78**, 1027-1037.
7. Lee, J.C., Laydon, J.T., McDonnell, P.C., Gallagher, T.F., Kumar, S., Green, D., McNulty, D., Blumenthal, M.J., Heys, J.R., Landvatter, S. W. et al., (1994) A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature*, **372**, 739-746.
8. Raingeaud, J., Whitmarsh, A.J., Barrett, T., Derijard, B., Davis, R.J. (1996) MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Mol Cell Biol*, **16**, 1247-1255.
9. Hannigan, M., Zhan, L., Ai, Y., Huang, C.K. (1998) The role of p38 MAP kinase in TGF-beta1-induced signal transduction in human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun*, **246**, 55-58.
10. Han, Z.S., Enslin, H., Hu, X., Meng, X., Wu, I.H., Barrett, T., Davis, R.J., Ip, Y.T. (1998) A conserved p38 mitogen-activated protein kinase pathway regulates Drosophila immunity gene expression. *Mol Cell Biol*, **18**, 3527-3539.
11. Jiang, Y., Chen, C., Li, Z., Guo, W., Gegner, J.A., Lin, S., Han, J. (1996) Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38beta). *J Biol Chem*, **271**, 17920-17926.
12. Li, Z., Jiang, Y., Ulevitch, R.J. and Han, J. (1996) The primary structure of p38 gamma: a new member of p38 group of MAP kinases. *Biochem Biophys Res Commun*, **228**, 334-340.
13. Ashwell, J.D. (2006) The many paths to p38 mitogen-activated protein kinase activation in the immune system. *Nat Rev Immunol*, **6**, 532-540.
14. Kumar, S., Orsini, M.J., Lee, J.C., McDonnell, P.C., Debouck, C., Young, P.R. (1996) Activation of the HIV-1 long terminal repeat by cytokines and

- environmental stress requires an active CSBP/p38 MAP kinase. *J Biol Chem*, **271**, 30864-30869.
15. Hale, K.K., Trollinger, D., Rihaneck, M., Manthey, C.L. (1999) Differential expression and activation of p38 mitogen-activated protein kinase alpha, beta, gamma, and delta in inflammatory cell lineages. *J Immunol*, **162**, 4246-4252.
 16. Wang, X.Z.R., D. (1996) Stress-induced phosphorylation and activation of the transcription factor CHOP (GADD153) by p38 MAP Kinase. *Science*, **272**, 1347-1349.
 17. Whitmarsh, A.J., Yang, S.H., Su, M.S., Sharrocks, A.D., Davis, R.J. (1997) Role of p38 and JNK mitogen-activated protein kinases in the activation of ternary complex factors. *Mol Cell Biol*, **17**, 2360-2371.
 18. Han, J., Jiang, Y., Li, Z., Kravchenko, V.V., Ulevitch, R.J. (1997) Activation of the transcription factor MEF2C by the MAP kinase p38 in inflammation. *Nature*, **386**, 296-299.
 19. McLaughlin, M.M., Kumar, S., McDonnell, P.C., Van Horn, S., Lee, J.C., Livi, G.P., Young, P.R. (1996) Identification of mitogen-activated protein (MAP) kinase-activated protein kinase-3, a novel substrate of CSBP p38 MAP kinase. *J Biol Chem*, **271**, 8488-8492.
 20. Ludwig, S., Engel, K., Hoffmeyer, A., Sithanandam, G., Neufeld, B., Palm, D., Gaestel, M., Rapp, U.R. (1996) 3pK, a novel mitogen-activated protein (MAP) kinase-activated protein kinase, is targeted by three MAP kinase pathways. *Mol Cell Biol*, **16**, 6687-6697.
 21. Fukunaga, R.H., T. (1997) MNK1, a new MAP kinase-activated protein kinase, isolated by a novel expression screening method for identifying protein kinase substrates. *Embo J*, **16**, 1921-1933.
 22. Waskiewicz, A.J., Flynn, A., Proud, C.G., Cooper, J.A. (1997) Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. *Embo J*, **16**, 1909-1920.
 23. New, L., Jiang, Y., Zhao, M., Liu, K., Zhu, W., Flood, L.J., Kato, Y., Parry, G.C., Han, J. (1998) PRAK, a novel protein kinase regulated by the p38 MAP kinase. *Embo J*, **17**, 3372-3384.
 24. Pierrat, B., Correia, J.S., Mary, J.L., Tomas-Zuber, M., Lesslauer, W. (1998) RSK-B, a novel ribosomal S6 kinase family member, is a CREB kinase under dominant control of p38alpha mitogen-activated protein kinase (p38alphaMAPK). *J Biol Chem*, **273**, 29661-29671.
 25. Lee, J.C., Kassis, S., Kumar, S., Badger, A., Adams, J.L. (1999) p38 mitogen-activated protein kinase inhibitors--mechanisms and therapeutic potentials. *Pharmacol Ther*, **82**, 389-397.
 26. Enslin, H., Raingeaud, J., Davis, R. J. (1998) Selective activation of p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase isoforms by the MAP kinase kinases MKK3 and MKK6. *J Biol Chem*, **273**, 1741-1748.
 27. Goedert, M., Cuenda, A., Craxton, M., Jakes, R., Cohen, P. (1997) Activation of the novel stress-activated protein kinase SAPK4 by cytokines and cellular stresses is mediated by SKK3 (MKK6); comparison of its substrate specificity with that of other SAP kinases. *Embo J*, **16**, 3563-3571.
 28. Cuenda, A., Cohen, P., Buee-Scherrer, V., Goedert, M. (1997) Activation of stress-activated protein kinase-3 (SAPK3) by cytokines and cellular

- stresses is mediated via SAPKK3 (MKK6); comparison of the specificities of SAPK3 and SAPK2 (RK/p38). *Embo J*, **16**, 295-305.
29. Salvador, J.M., Mittelstadt, P.R., Guszczynski, T., Copeland, T.D., Yamaguchi, H., Appella, E., Fornace, A. J., Ashwell, J.D. (2005) Alternative p38 activation pathway mediated by T cell receptor-proximal tyrosine kinases. *Nat Immunol*, **6**, 390-395.
 30. Salvador, J.M., Mittelstadt, P.R., Belova, G.I., Fornace, A.J., Jr., Ashwell, J.D. (2005) The autoimmune suppressor Gadd45alpha inhibits the T cell alternative p38 activation pathway. *Nat Immunol*, **6**, 396-402.
 31. Mittelstadt, P.R., Salvador, J.M., Fornace, A.J., Jr. and Ashwell, J.D. (2005) Activating p38 MAPK: new tricks for an old kinase. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*, **4**, 1189-1192.
 32. Kumar, S., McDonnell, P.C., Gum, R.J., Hand, A.T., Lee, J.C., Young, P.R. (1997) Novel homologues of CSBP/p38 MAP kinase: activation, substrate specificity and sensitivity to inhibition by pyridinyl imidazoles. *Biochem Biophys Res Commun*, **235**, 533-538.
 33. Rincon, M., Enslin, H., Raingeaud, J., Recht, M., Zpton, T., Su, M. S., Penix, L. A., Davis, R. J., Flavell, R. A. (1998) Interferon-gamma expression by Th1 effector T cells mediated by the p38 MAP kinase signaling pathway. *Embo J*, **17**, 2817-2829.
 34. Zhang, D.H., Yang, L., Ray, A. (1998) Differential responsiveness of the IL-5 and IL-4 genes to transcription factor GATA-3. *J Immunol*, **161**, 3817-3821.
 35. Haeryfar, S.M.H., D.W. (2001) Selective pharmacological inhibitors reveal differences between Thy-1- and T cell receptor-mediated signal transduction in mouse T lymphocytes. *Int Immunopharmacol*, **1**, 689-698.
 36. Wu, J.J.B., A.M. (2005) Essential role for mitogen-activated protein (MAP) kinase phosphatase-1 in stress-responsive MAP kinase and cell survival signaling. *J Biol Chem*, **280**, 16461-16466.
 37. Takekawa, M., Adachi, M., Nakahata, A., Nakayama, I., Itoh, F., Tsukuda, H., Taya, Y., Imai, K. (2000) p53-inducible wip1 phosphatase mediates a negative feedback regulation of p38 MAPK-p53 signaling in response to UV radiation. *Embo J*, **19**, 6517-6526.
 38. Cheung, P.C., Campbell, D.G., Nebreda, A.R., Cohen, P. (2003) Feedback control of the protein kinase TAK1 by SAPK2a/p38alpha. *Embo J*, **22**, 5793-5805.
 39. New, L., Zhao, M., Li, Y., Bassett, W.W., Feng, Y., Ludwig, S., Padova, F.D., Gram, H., Han, J. (1999) Cloning and characterization of RLPK, a novel RSK-related protein kinase. *J Biol Chem*, **274**, 1026-1032.
 40. Deak, M., Clifton, A.D., Lucocq, L.M., Alessi, D.R. (1998) Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB. *Embo J*, **17**, 4426-4441.
 41. Soloaga, A., Thomson, S., Wiggin, G. R., Rampersaud, N., Dyson, M. H., Hazzalin, C. A., Mahadevan, L. C., Arthur, J. S. (2003) MSK2 and MSK1 mediate the mitogen- and stress-induced phosphorylation of histone H3 and HMG-14. *Embo J*, **22**, 2788-2797.
 42. Nowak, S.J.C., V.G. (2004) Phosphorylation of histone H3: a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation. *Trends Genet*, **20**, 214-220.

43. Wiggin, G.R., Soloaga, A., Foster, J.M., Murray-Tait, V., Cohen, P., Arthur, J.S. (2002) MSK1 and MSK2 are required for the mitogen- and stress-induced phosphorylation of CREB and ATF1 in fibroblasts. *Mol Cell Biol*, **22**, 2871-2881.
44. Arthur, J.S.C., P. (2000) MSK1 is required for CREB phosphorylation in response to mitogens in mouse embryonic stem cells. *FEBS Lett*, **482**, 44-48.
45. Schuck, S., Soloaga, A., Schrott, G., Arthur, J.S., Nordheim, A. (2003) The kinase MSK1 is required for induction of c-fos by lysophosphatidic acid in mouse embryonic stem cells. *BMC Mol Biol*, **4**, 6.
46. Darragh, J., Soloaga, A., Beardmore, V.A., Wingate, A.D., Wiggin, G.R., Peggie, M., Arthur, J.S. (2005) MSKs are required for the transcription of the nuclear orphan receptors Nur77, Nurr1 and Nor1 downstream of MAPK signalling. *Biochem J*, **390**, 749-759.
47. Hanks, S.K.Q., A.M. (1991) Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members. *Methods Enzymol*, **200**, 38-62.
48. Farooq, A.Z., M.M. (2004) Structure and regulation of MAPK phosphatases. *Cell Signal*, **16**, 769-779.
49. Charles, C.H., Abler, A.S. & Lau, L.F. (1992) cDNA sequence of a growth factor-inducible immediate early gene and characterization of its encoded protein. *Oncogene*, **7**, 187-190.
50. Lau, L.F.N., D. (1985) Identification of a set of genes expressed during the G0/G1 transition of cultured mouse cells. *Embo J*, **4**, 3145-3151.
51. Wu, J.J., Zhang, L. & Bennett, A.M. (2005) The noncatalytic amino terminus of mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 directs nuclear targeting and serum response element transcriptional regulation. *Mol Cell Biol*, **25**, 4792-4803.
52. Franklin, C.C.a.K., A.S. (1997) Conditional expression of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase MKP-1 preferentially inhibits p38 MAPK and stress-activated protein kinase in U937 cells. *J Biol Chem*, **272**, 16917-16923.
53. Nimah, M., Zhao, B., Denenberg, A.G., Bueno, O., Molkenin, J., Wong, H.R., Shanley, T.P. (2005) Contribution of MKP-1 regulation of p38 to endotoxin tolerance. *Shock*, **23**, 80-87.
54. Zhao, Q., Shepherd, E.G., Manson, M.E., Nelin, L.D., Sorokin, A., Liu, Y. (2005) The role of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in the response of alveolar macrophages to lipopolysaccharide: attenuation of proinflammatory cytokine biosynthesis via feedback control of p38. *J Biol Chem*, **280**, 8101-8108.
55. Chi, H., Barry, S.P., Roth, R.J., Wu, J.J., Jones, E.A., Bennett, A.M., Flavell, R. A. (2006) Dynamic regulation of pro- and anti-inflammatory cytokines by MAPK phosphatase 1 (MKP-1) in innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 2274-2279.
56. Leonard, W.J. and O'Shea, J.J. (1998) Jaks and STATs: biological implications. *Annu Rev Immunol*, **16**, 293-322.
57. Nakamura, Y., Russell, S.M., Mess, S.A., Friedmann, M., Erdos, M., Francois, C., Jacques, Y., Adelstein, S. and Leonard, W.J. (1994) Heterodimerization of the IL-2 receptor beta- and gamma-chain cytoplasmic domains is required for signalling. *Nature*, **369**, 330-333.

58. Walter, M.R., Windsor, W.T., Nagabhushan, T.L., Lundell, D.J., Lunn, C.A., Zauodny, P.J. and Narula, S.K. (1995) Crystal structure of a complex between interferon-gamma and its soluble high-affinity receptor. *Nature*, **376**, 230-235.
59. Blumberg, H., Conklin, D., Xu, W.F., Grossmann, A., Brender, T., Carollo, S., Eagan, M., Foster, D., Haldeman, B.A., Hammond, A. *et al.* (2001) Interleukin 20: discovery, receptor identification, and role in epidermal function. *Cell*, **104**, 9-19.
60. Presky, D.H., Yang, H., Minetti, L.J., Chua, A.O., Nabavi, N., Wu, C.Y., Gately, M.K., Gubler, U. (1996) A functional interleukin 12 receptor complex is composed of two beta-type cytokine receptor subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 14002-14007.
61. Trinchieri, G. (2003) Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*, **3**, 133-146.
62. Rogge, L., Barberis-Maino, L., Biffi, M., Presky, D. H., Gubler, U., Sinigaglia, F. (1997) Selective expression of an interleukin-12 receptor component by human T helper 1 cells. *J Exp Med*, **185**, 825-831.
63. Szabo, S.J., Dighe, A.S., Gubler, U., Murphy, K.M. (1997) Regulation of the interleukin (IL)-12R beta 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells. *J Exp Med*, **185**, 817-824.
64. Kawashima, T., Kawasaki, H., Kitamura, T., Nojima, Y. and Morimoto, C. (1998) Interleukin-12 induces tyrosine phosphorylation of an 85-kDa protein associated with the interleukin-12 receptor beta 1 subunit. *Cellular immunology*, **186**, 39-44.
65. Morinobu, A., Gadina, M., Strober, W., Visconti, R., Fornace, A., Montagna, C., Feldman, G.M., Nishikomori, R. and O'Shea, J.J. (2002) STAT4 serine phosphorylation is critical for IL-12-induced IFN-gamma production but not for cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 12281-12286.
66. Afkarian, M., Sedy, J. R., Yang, J., Jacobson, N. G., Cereb, N., Yang, S. Y., Murphy, T. L., Murphy, K. M. (2002) T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4+ T cells. *Nat Immunol*, **3**, 549-557.
67. Jacobson, N.G., Szabo, S.J., Weber-Nordt, R.M., Zhong, Z., Schreiber, R.D., Darnell, J.E., Jr. and Murphy, K.M. (1995) Interleukin 12 signaling in T helper type 1 (Th1) cells involves tyrosine phosphorylation of signal transducer and activator of transcription (Stat)3 and Stat4. *J Exp Med*, **181**, 1755-1762.
68. Bacon, C.M., McVicar, D.W., Ortaldo, J.R., Rees, R.C., O'Shea, J.J. and Johnston, J.A. (1995) Interleukin 12 (IL-12) induces tyrosine phosphorylation of JAK2 and TYK2: differential use of Janus family tyrosine kinases by IL-2 and IL-12. *J Exp Med*, **181**, 399-404.
69. Thierfelder, W.E., van Deursen, J.M., Yamamoto, K., Tripp, R.A., Sarawar, S.R., Carson, R.T., Sangster, M.Y., Vignali, D.A., Doherty, P.C., Grosveld, G.C. *et al.* (1996) Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells. *Nature*, **382**, 171-174.
70. Kaplan, M.H., Sun, Y.L., Hoey, T. and Grusby, M.J. (1996) Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice. *Nature*, **382**, 174-177.

71. Xu, X., Sun, Y.L. and Hoey, T. (1996) Cooperative DNA binding and sequence-selective recognition conferred by the STAT amino-terminal domain. *Science*, **273**, 794-797.
72. Zhang, S. and Kaplan, M.H. (2000) The p38 mitogen-activated protein kinase is required for IL-12-induced IFN-gamma expression. *J Immunol*, **165**, 1374-1380.
73. Visconti, R., Gadina, M., Chiariello, M., Chen, E.H., Stancato, L.F., Gutkind, J.S. and O'Shea, J.J. (2000) Importance of the MKK6/p38 pathway for interleukin-12-induced STAT4 serine phosphorylation and transcriptional activity. *Blood*, **96**, 1844-1852.
74. Seder, R.A. and Paul, W.E. (1994) Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. *Annu Rev Immunol*, **12**, 635-673.
75. Dubucquoi, S., Desreumaux, P., Janin, A., Klein, O., Goldman, M., Tavernier, J., Capron, A. and Capron, M. (1994) Interleukin 5 synthesis by eosinophils: association with granules and immunoglobulin-dependent secretion. *J Exp Med*, **179**, 703-708.
76. Ferrick, D.A., Schrenzel, M.D., Mulvania, T., Hsieh, B., Ferlin, W.G. and Lepper, H. (1995) Differential production of interferon-gamma and interleukin-4 in response to Th1- and Th2-stimulating pathogens by gamma delta T cells in vivo. *Nature*, **373**, 255-257.
77. Chen, H. and Paul, W.E. (1997) Cultured NK1.1+ CD4+ T cells produce large amounts of IL-4 and IFN-gamma upon activation by anti-CD3 or CD1. *J Immunol*, **159**, 2240-2249.
78. Hu-Li, J., Shevach, E. M., Mizuguchi, J., Ohara, J., Mosmann, T., Paul, W. E. (1987) B cell stimulatory factor 1 (interleukin 4) is a potent costimulant for normal resting T lymphocytes. *J Exp Med*, **165**, 157-172.
79. Ohara, J., Paul, W. E. (1988) Up-regulation of interleukin 4/B-cell stimulatory factor 1 receptor expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 8221-8225.
80. Noguchi, M., Nakamura, Y., Russell, S.M., Ziegler, S.F., Tsang, M., Cao, X. and Leonard, W.J. (1993) Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-7 receptor. *Science*, **262**, 1877-1880.
81. Russell, S.M., Keegan, A.D., Harada, N., Nakamura, Y., Noguchi, M., Leland, P., Friedmann, M.C., Miyajima, A., Puri, R.K., Paul, W.E. *et al.* (1993) Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-4 receptor. *Science*, **262**, 1880-1883.
82. Kondo, M., Takeshita, T., Ishii, N., Nakamura, M., Watanabe, S., Arai, K. and Sugamura, K. (1993) Sharing of the interleukin-2 (IL-2) receptor gamma chain between receptors for IL-2 and IL-4. *Science*, **262**, 1874-1877.
83. Kelly-Welch, A.E., Hanson, E.M., Boothby, M.R. and Keegan, A.D. (2003) Interleukin-4 and interleukin-13 signaling connections maps. *Science*, **300**, 1527-1528.
84. Nelms, K., Keegan, A.D., Zamorano, J., Ryan, J.J., Paul, W.E. (1999) The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. *Annu Rev Immunol*, **17**, 701-738.
85. Murata, T., Taguchi, J. and Puri, R.K. (1998) Interleukin-13 receptor alpha' but not alpha chain: a functional component of interleukin-4 receptors. *Blood*, **91**, 3884-3891.

86. Wood, N., Whitters, M.J., Jacobson, B.A., Witek, J., Sypek, J.P., Kasaian, M., Eppihimer, M.J., Unger, M., Tanaka, T., Goldman, S.J. *et al.* (2003) Enhanced interleukin (IL)-13 responses in mice lacking IL-13 receptor alpha 2. *J Exp Med*, **197**, 703-709.
87. Chomarat, P. and Banchereau, J. (1998) Interleukin-4 and interleukin-13: their similarities and discrepancies. *International reviews of immunology*, **17**, 1-52.
88. Ealick, S.E., Cook, W.J., Vijay-Kumar, S., Carson, M., Nagabhushan, T.L., Trotta, P.P. and Bugg, C.E. (1991) Three-dimensional structure of recombinant human interferon-gamma. *Science*, **252**, 698-702.
89. Kelker, H.C., Le, J., Rubin, B.Y., Yip, Y.K., Nagler, C. and Vilcek, J. (1984) Three molecular weight forms of natural human interferon-gamma revealed by immunoprecipitation with monoclonal antibody. *J Biol Chem*, **259**, 4301-4304.
90. Bach, E.A., Aguet, M., Schreiber, R. D. (1997) The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu Rev Immunol*, **15**, 563-591.
91. Greenlund, A.C., Farrar, M. A., Viviano, B. L., Schreiber, R. D. (1994) Ligand-induced IFN gamma receptor tyrosine phosphorylation couples the receptor to its signal transduction system (p91). *Embo J*, **13**, 1591-1600.
92. Szabo, S.J., Jacobson, N.G., Dighe, A.S., Gubler, U. and Murphy, K.M. (1995) Developmental commitment to the Th2 lineage by extinction of IL-12 signaling. *Immunity*, **2**, 665-675.
93. Pernis, A., Gupta, S., Gollob, K.J., Garfein, E., Coffman, R.L., Schindler, C. and Rothman, P. (1995) Lack of interferon gamma receptor beta chain and the prevention of interferon gamma signaling in TH1 cells. *Science*, **269**, 245-247.
94. Bach, E.A., Szabo, S. J., Dighe, A. S., Ashkenazi, A., Aguet, M., Murphy, K. M., Schreiber, R. D. (1995) Ligand-induced autoregulation of IFN-gamma receptor beta chain expression in T helper cell subsets. *Science*, **270**, 1215-1218.
95. Sakatsume, M. and Finbloom, D.S. (1996) Modulation of the expression of the IFN-gamma receptor beta-chain controls responsiveness to IFN-gamma in human peripheral blood T cells. *J Immunol*, **156**, 4160-4166.
96. Mosmann, T.R., & Coffman, R.L. (1989) Th1 and Th2 cells: Different Patterns of Lymphokine Secretion Lead to Different Functional Properties. *Ann. Rev. Immunol.*, **7**, 145 - 173.
97. O'Garra, A. (1998) Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity*, **8**, 275-283.
98. Ansel, K.M., Lee, D.U., Rao, A. (2003) An epigenetic view of helper T cell differentiation. *Nat. Immunol.*, **4**, 616 - 623.
99. Abbas, A.K., Murphy, K. M. & Sher, A. (1996) Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*, **133**, 787 - 793.
100. Gett, A.V.H., P.D. (1998) Cell division regulates the T cell cytokine repertoire, revealing a mechanism underlying immune class regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **95**, 9488 - 9493.
101. Bird, J.J., Brown, D.R., Mullen, A.C., Moskowitz, N.H., Mahowald, M.A., Sider, J.S., Gajewski, T.F., Wang, C., Reiner, S.L. (1998) Helper T cell differentiation is controlled by cell cycle. *Immunity*, **9**, 229 - 237.

102. Hosken, N.A., Shibuya, K., Heath, A.W., Murphy, K.M., O'Garra, A. (1995) The effect of antigen dose on CD4+ T helper cell phenotype development in a T cell receptor-alpha beta-transgenic model. *J. Exp. Med.*, **182**, 1579 - 1584.
103. Burstein, H.J.A., A.K. (1993) In vivo role of interleukin 4 in T cell tolerance induced by aqueous protein antigen. *J. Exp. Med.*, **177**, 457 - 463.
104. DeWit, D., Mechelen, M.V., Ryelandt, M., Figueiredo, A.C., Abramowicz, D., Goldman, M., Bazin, H., Urbain, J., Leo, O. (1992) The injection of deaggregated gamma globulins in adult mice induces antigen-specific unresponsiveness of T helper type 1 but not type 2 lymphocytes. *J. Exp. Med.*, **175**, 9 - 14.
105. Sallusto, F.a.R., S.L. (2005) Sliding doors in the immune response. *Nat Immunol.*, **6**, 10 - 12.
106. Fields, P.E., Kim, S.T. and Flavell, R. (2002) Cutting Edge: Changes in histone acetylation at the IL-4 and IFN γ loci accompany Th1/Th2 differentiation. *J Immunol*, **169**, 647 - 650.
107. Zheng, W.F., R.A. (1997) The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell*, **89**, 587 - 596.
108. Mullen, A.C., Hutchins, A.S., High, F.A., Lee, H.W., Sykes, K.J., Chodosh, L.A., Reiner, S.L. (2002) Hlx is induced by and genetically interacts with T-bet to promote heritable Th1 gene induction. *Nat. Immunol.*, **3**, 652 - 658.
109. Szabo, S.J., Kim, S.T., Costa, G.L., Zhang, X., Fathman, C.G., Glimcher, L.H. (2000) A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell*, **100**, 655 - 669.
110. Hewitt, S.L., High, F.A., Reiner, S.L., Ficher, A.G., Merckenschlager, M. (2004) Nuclear repositioning marks the selective exclusion of lineage-inappropriate transcription factor loci during T helper cell differentiation. *Eur. J. Immunol.*, **34**, 3604 - 3613.
111. Grogan, J.L., Mohrs, M., Harmon, B., Lacy, D.A., Sedat, J.W., Locksley, R.M. (2001) Early transcription and silencing of cytokine genes underlie polarization of T helper cell subsets. *Immunity*, **14**, 205 - 215.
112. Mullen, A.C., Hutchins, A.S., Villarino, A.V., Lee, H.W., High, F.A., Cereb, N., Yang, S.Y., Hua, X., Reiner, S.L. (2001) Cell cycle controlling the silencing and functioning of mammalian activators. *Curr Biol*, **11**, 1695-1699.
113. Murphy, K.M.R., S. L. (2002) The lineage decisions of T helper cell differentiation. *Nat. Rev. Immunol.*, **2**, 933 - 944.
114. Reiner, S.L., Sallusto, F. and Lanzavecchia, A. (2007) Division of labor with a workforce of one: challenges in specifying effector and memory T cell fate. *Science*, **317**, 622-625.
115. Sakaguchi, S. and Powrie, F. (2007) Emerging challenges in regulatory T cell function and biology. *Science*, **317**, 627-629.
116. Kalinski, P., Smits, H.H., Schuitemaker, J.H., Vieira, P.L., van Eijk. M., de Jong, E.C., Wierenga, E.A., Kapsenberg, M.L. (2000) IL-4 is a mediator of IL-12p70 induction by human Th2 cells: reversal of polarized Th2 phenotype by dendritic cells. *J. Immunol.*, **165**, 1877 - 1881.

117. Sallusto, F., Lenig, D., Forster, R., Lipp, M., Lanzavecchia, A. (1999) Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*, **401**, 708-712.
118. Yamamoto, J., Adachi, Y., Onoue, Y., Adachi, Y. S., Okabe, Y., Itazawa, T., Toyoda, M., Seki, T., Morohashi, M., Miyawaki, T. (2000) Differential expression of the chemokine receptors by the Th1- and Th2-type effector populations within circulating CD4+ T cells. *J Leukoc Biol*, **68**, 568-574.
119. Langenkamp, A., Messi, M., Lanzavecchia, A., Sallusto, F. (2000) Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of Th1, Th2 and nonpolarized T cells. *Nat Immunol.*, **1**, 311 - 316.
120. Sallusto, F., Geginat, J., Lanzavecchia, A. (2004) Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol*, **22**, 745-763.
121. Lanzavecchia, A. and Sallusto, F. (2005) Understanding the generation and function of memory T cell subsets. *Curr Opin Immunol*, **17**, 326-332.
122. Caenepeel, S., Charydczak, G., Sudarsanam, S., Hunter, T., Manning, G. (2004) The mouse kinome: discovery and comparative genomics of all mouse protein kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 11707-11712.
123. Catron, D.M., Rusch, L.K., Hataye, J., Itano, A.A. and Jenkins, M.K. (2006) CD4+ T cells that enter the draining lymph nodes after antigen injection participate in the primary response and become central-memory cells. *J Exp Med*, **203**, 1045-1054.
124. Chang, J.T., Palanivel, V.R., Kinjyo, I., Schambach, F., Intlekofer, A.M., Banerjee, A., Longworth, S.A., Vinup, K.E., Mrass, P., Oliaro, J. *et al.* (2007) Asymmetric T lymphocyte division in the initiation of adaptive immune responses. *Science*, **315**, 1687-1691.
125. Fearon, D.T., Manders, P. and Wagner, S.D. (2001) Arrested differentiation, the self-renewing memory lymphocyte, and vaccination. *Science*, **293**, 248-250.
126. Song, K., Rabin, R. L., Hill, B. J., De Rosa, S. C., Perfetto, S. P., Zhang, H. H., Foley, J. F., Reiner, J. S., Liu, J., Mattapallil, J. J., Douek, D. C., Roederer, M., Farber, J. M. (2005) Characterization of subsets of CD4+ memory T cells reveals early branched pathways of T cell differentiation in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 7916-7921.
127. Rivino, L., Messi, M., Jarrossay, D., Lanzavecchia, A., Sallusto, F., Geginat, J. (2004) Chemokine receptor expression identifies Pre-T helper (Th)1, Pre-Th2, and nonpolarized cells among human CD4+ central memory T cells. *J Exp Med*, **200**, 725-735.
128. Messi, M., Giacchetto, I., Nagata, K., Lanzavecchia, A., Natoli, G., Sallusto, F. (2003) Memory and flexibility of cytokine gene expression as separable properties of human T(H)1 and T(H)2 lymphocytes. *Nat Immunol.*, **4**, 78 - 86.
129. Krawczyk, C.M., Shen, H., Pearce, E. J. (2007) Functional plasticity in memory T helper cell responses. *J Immunol*, **178**, 4080-4088.
130. Livak, K.J., Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, **25**, 402-408.
131. Davies, S.P., Reddy, H., Caivano, M., Cohen, P. (2000) Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J*, **351**, 95-105.

132. Clayton, A.L.M., L.C. (2003) MAP kinase-mediated phosphoacetylation of histone H3 and inducible gene regulation. *FEBS Lett*, **546**, 51-58.
133. Farrar, M.A. and Schreiber, R.D. (1993) The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. *Annu Rev Immunol*, **11**, 571-611.
134. Singh, S.P.C., M.M.; Foley, J.F.; Zhang, H.H.; Farber, J.M. (2007) Epigenetics of chemokine receptor genes during differentiation of human CD4+ T cells: histone H3 modifications are related to the stability of gene expression, but not transcriptional activity or history. *Keystone meeting on Epigenetics: Regulation of chromatin structure in development and diseases*.
135. Kapsenberg, M.L. (2003) Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol*, **3**, 984-993.
136. Zhang, J., Salojin, K.V., Gao, J.X., Cameron, M.J., Bergerot, I., Delovitch, T.L. (1999) p38 mitogen-activated protein kinase mediates signal integration of TCR/CD28 costimulation in primary murine T cells. *J Immunol*, **162**, 3819-3829.
137. So, E.Y., Park, H.H., Lee, C.E. (2000) IFN-gamma and IFN-alpha posttranscriptionally down-regulate the IL-4-induced IL-4 receptor gene expression. *J Immunol*, **165**, 5472-5479.
138. Lee, G.R., Fields, P.E., Griffin, T.J. and Flavell, R.A. (2003) Regulation of the Th2 cytokine locus by a locus control region. *Immunity*, **19**, 145-153.
139. Dodeller, F., Skapenko, A., Kalden, J.R., Lipsky, P.E., Schulze-Koops, H. (2005) The p38 mitogen-activated protein kinase regulates effector functions of primary human CD4 T cells. *Eur J Immunol*, 3631-3642.
140. Dumont, F.J., Staruch, M.J., Fischer, P., DaSilva, C. and Camacho, R. (1998) Inhibition of T cell activation by pharmacologic disruption of the MEK1/ERK MAP kinase or calcineurin signaling pathways results in differential modulation of cytokine production. *J Immunol*, **160**, 2579-2589.
141. Schafer, P.H., Wang, L., Wadsworth, S.A., Davis, J.E. and Siekierka, J.J. (1999) T cell activation signals up-regulate p38 mitogen-activated protein kinase activity and induce TNF-alpha production in a manner distinct from LPS activation of monocytes. *J Immunol*, **162**, 659-668.
142. Ono, K. and Han, J. (2000) The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal*, **12**, 1-13.
143. Morooka, T. and Nishida, E. (1998) Requirement of p38 mitogen-activated protein kinase for neuronal differentiation in PC12 cells. *J Biol Chem*, **273**, 24285-24288.
144. Craxton, A., Shu, G., Graves, J.D., Saklatvala, J., Krebs, E.G. and Clark, E.A. (1998) p38 MAPK is required for CD40-induced gene expression and proliferation in B lymphocytes. *J Immunol*, **161**, 3225-3236.
145. Engel, F.B., Schebesta, M., Duong, M.T., Lu, G., Ren, S., Madwed, J.B., Jiang, H., Wang, Y. and Keating, M.T. (2005) p38 MAP kinase inhibition enables proliferation of adult mammalian cardiomyocytes. *Genes Dev*, **19**, 1175-1187.
146. Engelman, J.A., Lisanti, M.P. and Scherer, P.E. (1998) Specific inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase block 3T3-L1 adipogenesis. *J Biol Chem*, **273**, 32111-32120.
147. Adams, R.H., Porras, A., Alonso, G., Jones, M., Vintersten, K., Panelli, S., Valladares, A., Perez, L., Klein, R. and Nebreda, A.R. (2000)

- Essential role of p38alpha MAP kinase in placental but not embryonic cardiovascular development. *Mol Cell*, **6**, 109-116.
148. Mudgett, J.S., Ding, J., Guh-Siesel, L., Chartrain, N.A., Yang, L., Gopal, S. and Shen, M.M. (2000) Essential role for p38alpha mitogen-activated protein kinase in placental angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 10454-10459.
 149. Allen, M., Svensson, L., Roach, M., Hambor, J., McNeish, J. and Gabel, C.A. (2000) Deficiency of the stress kinase p38alpha results in embryonic lethality: characterization of the kinase dependence of stress responses of enzyme-deficient embryonic stem cells. *J Exp Med*, **191**, 859-870.
 150. Tamura, K., Sudo, T., Senftleben, U., Dadak, A.M., Johnson, R. and Karin, M. (2000) Requirement for p38alpha in erythropoietin expression: a role for stress kinases in erythropoiesis. *Cell*, **102**, 221-231.
 151. Ventura, J.J., Tenbaum, S., Perdiguero, E., Huth, M., Barbacid, M., Pasparakis, M., Nebreda, A.R. (2007) p38alpha MAP kinase is essential in lung stem and progenitor cell proliferation and differentiation. *Nature genetics*, **39**, 750-758.
 152. Hui, L., Bakiri, L., Mairhorfer, A., Schweifer, N., Haslinger, C., Kenner, L., Komnenovic, V., Scheuch, H., Beug, H. and Wagner, E.F. (2007) p38alpha suppresses normal and cancer cell proliferation by antagonizing the JNK-c-Jun pathway. *Nature genetics*, **39**, 741-749.
 153. Perdiguero, E., Ruiz-Bonilla, V., Gresh, L., Hui, L., Ballestar, E., Sousa-Victor, P., Baeza-Raja, B., Jardi, M., Bosch-Comas, A., Esteller, M. *et al.* (2007) Genetic analysis of p38 MAP kinases in myogenesis: fundamental role of p38alpha in abrogating myoblast proliferation. *Embo J*, **26**, 1245-1256.
 154. Kaiser, M., Wiggin, G.R., Lightfoot, K., Arthur, J.S., Macdonald, A. (2007) MSK regulate TCR-induced CREB phosphorylation but not immediate early gene transcription. *Eur J Immunol*, **37**, 2583-2595.
 155. Barton, K., Muthusamy, N., Chanyangam, M., Fischer, C., Clendenin, C. and Leiden, J.M. (1996) Defective thymocyte proliferation and IL-2 production in transgenic mice expressing a dominant-negative form of CREB. *Nature*, **379**, 81-85.
 156. Baumann, S., Kyewski, B., Bleckmann, S.C., Greiner, E., Rudolph, D., Schmid, W., Ramsay, R.G., Krammer, P.H., Schutz, G. and Mantamadiotis, T. (2004) CREB function is required for normal thymic cellularity and post-irradiation recovery. *Eur J Immunol*, **34**, 1961-1971.
 157. Schiller, M., Bohm, M., Dennler, S., Ehrchen, J.M. and Mauviel, A. (2006) Mitogen- and stress-activated protein kinase 1 is critical for interleukin-1-induced, CREB-mediated, c-fos gene expression in keratinocytes. *Oncogene*, **25**, 4449-4457.
 158. Ansel, K.M., Lee, D.U. & Rao, A. (2003) An epigenetic view of helper T cell differentiation. *Nat Immunol*, **4**, 616-623.
 159. Mahadevan, L.C., Willis, A.C. & Barratt, M.J. (1991) Rapid histone H3 phosphorylation in response to growth factors, phorbol esters, okadaic acid, and protein synthesis inhibitors. *Cell*, **65**, 775-783.
 160. Barratt, M.J., Hazzalin, C.A., Cano, E., Mahadevan, L.C. (1994) Mitogen-stimulated phosphorylation of histone H3 is targeted to a small

- hyperacetylation-sensitive fraction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 4781-4785.
161. Thomson, S., Mahadevan, L.C., Clayton, A.L. (1999) MAP kinase-mediated signalling to nucleosomes and immediate-early gene induction. *Semin Cell Dev Biol*, **10**, 205-214.
 162. Chua, A.O., Chizzonite, R., Desai, B.B., Truitt, T.P., Nunes, P., Minetti, L.J., Warriar, R.R., Presky, D.H., Levine, J.F., Gately, M.K. (1994) Expression cloning of a human IL-12 receptor component. A new member of the cytokine receptor superfamily with strong homology to gp130. *J Immunol*, **153**, 128-136.
 163. Heath, V.L., Showe, L., Crain, C., Barrat, F.J., Trinchieri, G. and O'Garra, A. (2000) Cutting edge: ectopic expression of the IL-12 receptor-beta 2 in developing and committed Th2 cells does not affect the production of IL-4 or induce the production of IFN-gamma. *J Immunol*, **164**, 2861-2865.
 164. Reiner, S.L., Sallusto, F., Lanzavecchia, A. (2007) Division of labor with a workforce of one: challenges in specifying effector and memory T cell fate. *Science*, **317**, 622-625.
 165. Gett, A.V., Sallusto, F., Lanzavecchia, A. and Geginat, J. (2003) T cell fitness determined by signal strength. *Nat Immunol*, **4**, 355-360.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)