



MEMORIA FINAL DE ACTIVIDADES PROYECTO:

Óxido nítrico en la señalización mediada por el receptor de la célula T: Regulación de los procesos de diferenciación celular.

Ayuda Fundación Domingo Martínez a la Investigación 2015 en el área de Biomedicina y Salud.

Investigador Principal:

Dr. Juan Manuel Serrador Peiró

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO), CSIC-UAM

Miembros del Equipo Investigador:

Dr. Miguel Ángel Íñiguez

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO), CSIC-UAM

Dra. Almudena García Ortiz

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO), CSIC-UAM



Septiembre 2016



RESUMEN

Los niveles de óxido nítrico (NO) alcanzan concentraciones muy elevadas (μM) en los procesos inflamatorios, jugando un importante papel en la patogénesis de las enfermedades crónicas de origen autoinmune y alérgico, enfermedades de gran importancia socioeconómica que afectan aproximadamente al 5% de la población mundial y entre las que cabe destacar la artritis reumatoide, la esclerosis múltiple, el lupus eritematoso sistémico o el asma. Nuestro trabajo de investigación se ha centrado en el estudio del papel que desempeña el NO en la activación y diferenciación de los linfocitos T, elementos reguladores de la respuesta inmune adaptativa subyacente a este tipo de enfermedades. Con esta finalidad hemos estudiado en células T humanas la acción que ejerce el NO procedente de eNOS sobre su activación. Hemos encontrado que, durante las interacciones antígeno-específicas con las células presentadoras de antígeno (APC), la actividad de eNOS en la sinapsis inmune favorece la activación de NF- κ B de los linfocitos T, así como su actividad transcripcional, induciendo la expresión de genes relacionados con programas de diferenciación Th1 (c-Rel, el factor de crecimiento CSF2 o los factores de transcripción TBX21 y Bcl-6), Th2 (las citoquinas IL-3, -4 y -13) y Th17 (CSF2 y los factores de transcripción SOCS1, EGR y c-Rel); algunos de ellos con elementos de respuesta κ B en sus promotores (p.e. CSF2 e IL-3). Además, en experimentos de diferenciación “in vitro” de linfocitos T tratados con un agente donador de NO que posee actividad transnitrosilante (Cys-NO) o inhibidores de la actividad óxido nítrico sintasa (NOS) (L-NIO), hemos obtenido resultados que sugieren que la actividad NOS regula la generación de células Th17 y Th2, aunque la de estas últimas en menor medida. También hemos explorado el mecanismo por el que el NO procedente de eNOS puede favorecer la activación de NF- κ B en los linfocitos T, encontrando que eNOS regula la localización y activación de PKC- Θ en la zona central de la sinapsis inmune (c-SMAC) a través de la nitrosilación de β -actina en la Cys374. Es dicha activación la que podría regular positivamente la actividad transcripcional de NF- κ B, puesto que se ve acompañada de una mayor fosforilación de CARMA1, IKK e I κ B, elementos reguladores importantes de la cascada de activación de NF- κ B. En su conjunto, nuestros resultados sugieren que, durante las interacciones antígeno-específicas entre células T y APCs, el NO procedente de eNOS regula la actividad transcripcional de NF- κ B mediante la activación de PKC- Θ en la sinapsis inmune, un mecanismo que transcurre a través de la nitrosilación de β -actina en la Cys374 y la reorganización de microfilamentos. Nuestros hallazgos ponen de manifiesto un nuevo mecanismo por el que el NO puede regular la respuesta inmune adaptativa en las enfermedades de origen autoinmune y alérgico.

INTRODUCCION

El óxido nítrico (NO) es un mediador de inflamación de gran importancia en el mantenimiento de la homeostasis celular y tisular, regulando entre otros muchos procesos fisiopatológicos como la vasoconstricción, la agregación plaquetaria, la actividad neuronal, la motilidad gastrointestinal o la secreción gástrica (1). En las células, el NO se sintetiza enzimáticamente a través de la acción de óxido nítrico sintasas (neuronal: nNOS/NOS1, inducible: iNOS/NOS2 y endotelial: eNOS/NOS3) las cuales utilizan como sustrato L-Arg. En los procesos inflamatorios, los niveles de NO alcanzan concentraciones muy elevadas (μM) como consecuencia del aumento de la expresión de iNOS, jugando un importante papel en la patogénesis de las enfermedades cardiovascular, neurodegenerativa, y de origen autoinmune y alérgico (2). En el sistema inmune se ha detectado producción de NO en líneas celulares T de origen tumoral y linfocitos T primarios. La activación de la célula T requiere la interacción sostenida entre su receptor (TCR) y el complejo MHC-II-péptido antigénico en la sinapsis inmunológica. Nuestro grupo ha demostrado con anterioridad que, durante las interacciones antígeno-específicas, eNOS se activa en las proximidades de la sinapsis inmune, regulando la fosforilación de elementos proximales al TCR (3). Estudios previos y otros más recientes llevados a cabo por nuestro grupo indican que el NO puede ejercer un papel activador sobre los linfocitos T, facilitando la señalización de la ruta de las MAPKs ERK1/2 a través de la S-nitrosilación compartimentalizada de N-Ras en el Golgi (4). Durante el transcurso de la selección de la respuesta inmune adaptativa, alteraciones en la diferenciación de los linfocitos T hacia fenotipos Th1, Th2 o Th17 son responsables de muchas de las enfermedades inflamatorias de origen autoinmune y alérgico de mayor impacto en salud pública, entre las que cabe destacar el asma, la esclerosis múltiple o la artritis reumatoide. Estudios previos demuestran que la quinasa PKC- θ también es importante para la diferenciación de los linfocitos T, siendo esencial para el desarrollo de respuestas Th2 y Th17 (5-6). PKC- θ es una quinasa perteneciente a la familia de las PKC "noveles" que se expresa predominantemente en las células T, localizándose en el área central señalizadora (c-SMAC) de la sinapsis inmune durante las interacciones antígeno-específicas con APCs. La localización y activación de PKC- θ en la sinapsis inmune depende, entre otras, de la asociación con diacil-glicerol (DAG) y la molécula co-estimuladora CD28, de la fosforilación en la Thr538 por la MAP4K de centro germinal (GLK) y de la reorganización del citoesqueleto de actina; desempeñando un importante papel en la activación del factor de transcripción NF- κB (7).

En este proyecto de investigación hemos estudiado las acciones ejercidas por el NO sobre la activación y diferenciación de linfocitos T humanos. Nuestros hallazgos, resultantes del estudio de las acciones ejercidas por el NO sobre la señalización celular y la expresión génica, y en particular sobre PKC- θ y la activación y función del factor de transcripción NF- κB , podrían contribuir al mayor conocimiento de los mecanismos por los que el NO regula la respuesta inmune en las enfermedades inflamatorias de origen autoinmune y alérgico.

RESULTADOS OBTENIDOS

A continuación se exponen los resultados obtenidos para cada uno de los objetivos de estudio propuestos en el proyecto.

1.- Estudiar las acciones ejercidas por el NO sobre la activación de los linfocitos T humanos.

Basándonos en resultados generados con anterioridad en nuestro grupo, los cuales indicaban que tras la estimulación vía TCR las células T producen NO procedente de eNOS, enzima que se transloca junto con el Golgi a la sinapsis inmune y cuya sobreexpresión aumenta la activación de CD3 y de la MAPK ERK e impide la coalescencia de CD3 en la zona central (c-SMAC) de contacto de la célula T con la APC (3), quisimos profundizar en la acción que el NO ejercía sobre la activación de otros componentes señalizadores de importancia para la activación y diferenciación de los linfocitos T, centrándonos en la cascada de activación de NF- κ B. Para ello utilizamos células T humanas CH7C17 de la línea celular Jurkat que expresan un TCR-V β 3 específico para el reconocimiento de superantígeno B (SEB), y están establemente transfectadas con eNOS-GFP (a las que denominamos eNOS) o con G2A-GFP, un mutante de eNOS defectivo en la miristoilación de la Gly2 y en consecuencia también en localización celular, fosforilación, producción de NO y activación de ERK (a las que denominamos G2A) (**Figura 1A-E**).

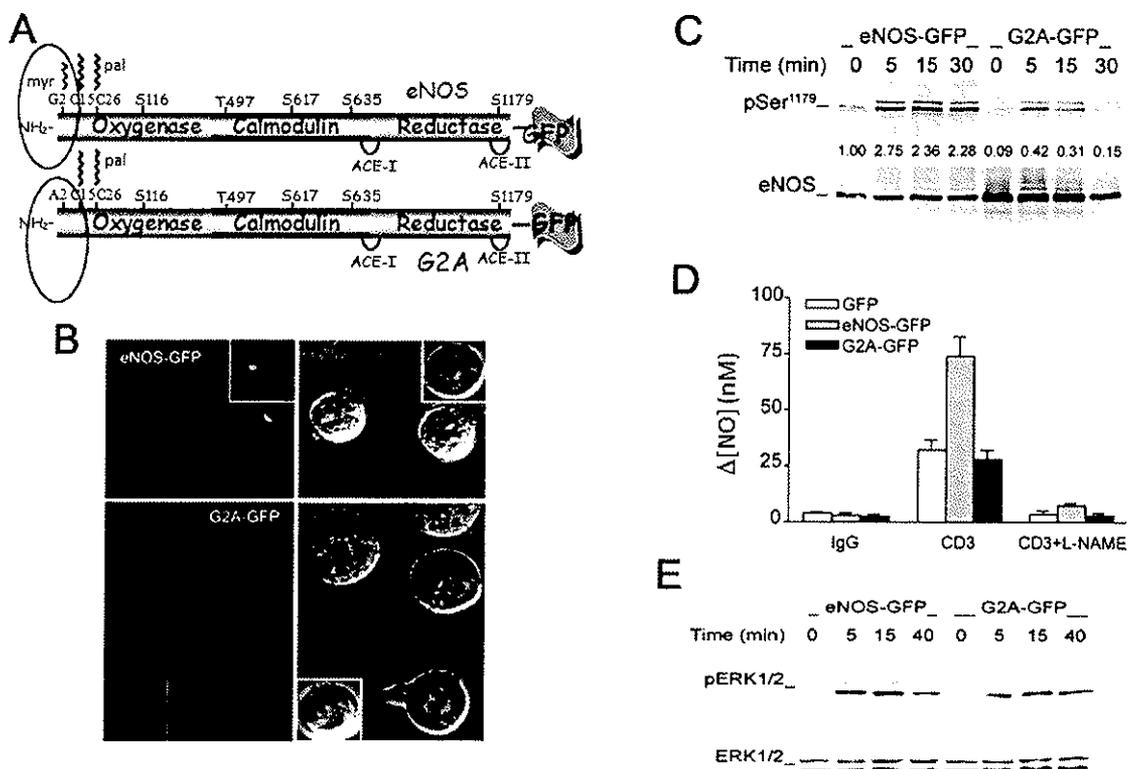


Figura 1: Caracterización de las células T Jurkat CH7C17 transfectadas con eNOS- o G2A-GFP, las formas wild type (WT) y defectiva de eNOS, respectivamente. A) representación esquemática de eNOS- y G2A-GFP en la que se muestran los dominios estructurales, el sitio de unión a calmodulina, las Ser y Thr susceptibles de fosforilación y las Cys susceptibles de miristoilación y palmitoilación. En rojo se resalta la mutación puntual G→A en la Gly2 de eNOS que impide la miristoilación del mutante G2A. B) Microscopía confocal e interferencial de Nomarski de células eNOS- y G2A-GFP vivas marcadas con la sonda vital de Golgi Bodipy-TR-ceramide (no mostrado). En el recuadro correspondiente puede observarse la reconstrucción 3D de eNOS y de G2A. C) Cinética de fosforilación de eNOS- y G2A-GFP en células estimuladas con células Raji (APC) pulsadas con SEB durante el tiempo que se indica. Por inmunoblot se detectó la fosforilación de eNOS y G2A en la Ser1179 así como la proteína total. Se muestra un experimento representativo de tres. D) Detección electroquímica de la producción de NO en células eNOS-, G2A-GFP y células GFP control estimuladas durante 30 min con Ac anti-CD3 entrecruzado. En los controles, las células fueron pretratadas con el inhibidor de eNOS L-NAME (500 μ M) o con un Ac IgG inespecífico. E) Cinética de activación de ERK en células T eNOS y G2A estimuladas durante los tiempos indicados con células Raji fijadas con paraformaldehído y pulsadas con SEB. Fofó-ERK y ERK total se detectaron mediante inmunoblot. Se muestra un experimento representativo de tres.

Nuestro primer abordaje fue estimular dichas células con Ac anti-CD3 entrecruzados y estudiar la activación de IKK e I κ B, dos importantes elementos reguladores de la activación del factor de transcripción NF- κ B (Figura 2A). La fosforilación de IKK e I κ B era mayor en las células eNOS que en las G2A, sugiriendo que eNOS podría facilitar la activación del factor de transcripción NF- κ B. A continuación, estudiamos si dicha activación podía incrementar la actividad transcripcional de NF- κ B; para ello células eNOS y G2A transfectadas con una construcción NF- κ B-Luc, que contiene tres repeticiones en tándem del sitio de unión a NF- κ B del promotor de H-2Kb el cual a su vez está localizado *upstream* de un promotor mínimo de timidina quinasa que controla el gen de luciferasa, fueron estimuladas con células B Raji pulsadas con SEB (Figura 2B). Los resultados muestran que, en respuesta a activación con SEB, la actividad transcripcional de NF- κ B es mayor en eNOS que en células G2A o CH7C17 control, sugiriendo que en los linfocitos T el NO derivado de eNOS puede regular positivamente la actividad transcripcional de NF- κ B.

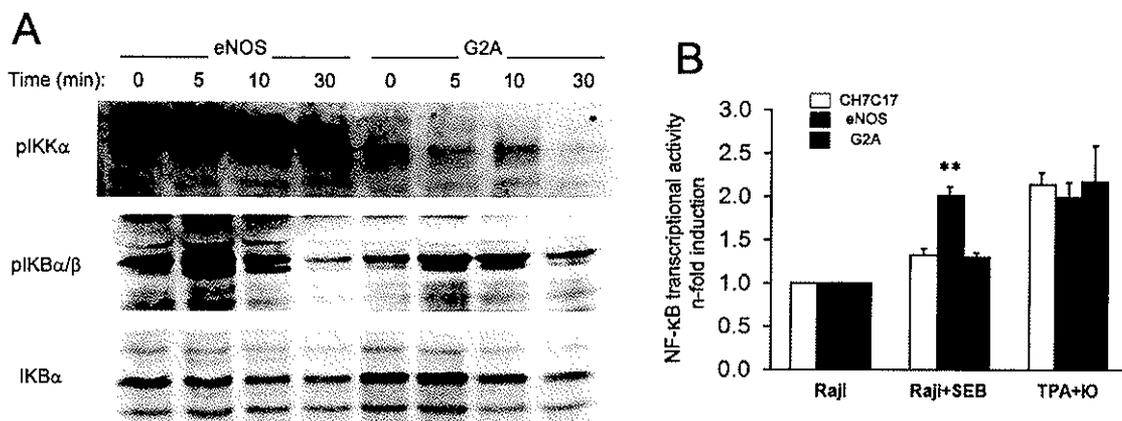


Figura 2: Regulación de la actividad NF- κ B por eNOS. A) Activación de la cascada de señalización de NF- κ B. Células T eNOS y G2A fueron estimuladas mediante Ac anti-CD3 durante los tiempos indicados. Fosfo-IKK α/β así como I κ B total y fosforilado fueron detectados por inmunoblot. Se muestra un experimento representativo de tres. B) Regulación por eNOS de la inducción transcripcional de NF- κ B. Células T CH7C17 parentales o transfectadas con eNOS o G2A, fueron co-transfectadas con la construcción reportera de luciferasa NF- κ B-Luc y estimuladas durante 6 h con células Raji (APC) pulsadas con SEB o en presencia del éster de forbol TPA + ionoforo de calcio. Se muestra



la media \pm SEM de la inducción de cada muestra respecto de células control conjugadas con células Raji en ausencia de estímulos. ** $p < 0.01$. $n = 3$.

Con el objetivo de obtener una visión global del papel desempeñado por eNOS en el programa de expresión génica resultante de la activación de las células T, y en particular sobre genes regulados por NF- κ B, estudiamos mediante microarrays de DNA los patrones de expresión génica de células T eNOS y G2A en condiciones basales o estimuladas durante 90 min con Ac anti-CD3 entrecruzados. Tras analizar los RNAs correspondientes a dichas células, seleccionamos aquellos genes cuyos valores de hibridación alcanzaban al menos 6×10^3 UA sobre un máximo observado de 14×10^3 UA con la finalidad de estudiar genes cuya expresión celular fuese significativa.

Siguiendo este criterio encontramos que en 218 genes la inducción cambiaba 1.5 veces como consecuencia de la sobreexpresión de eNOS; de éstos, en 199 aumentaba, mientras que en sólo 19 disminuía. De los 199 genes en los que se observaba un aumento en la inducción, 79 mostraban un aumento ≥ 2 y 13 ≥ 4 . En cuanto a los grupos de genes regulados por eNOS en colaboración con estímulos desencadenados desde el TCR, estos pertenecían a citoquinas y quimioquinas, factores de crecimiento, factores de transcripción, receptores de membrana y moléculas de adhesión, señalización y apoptosis. Uno de los genes cuya inducción se veía incrementada por eNOS es c-Rel, un factor de transcripción perteneciente a la familia NF- κ B cuya expresión aumenta en linfocitos T activados y se cree participa en el mantenimiento tardío de la activación. Por tanto, encontramos que eNOS no sólo favorecía la ruta de activación de NF- κ B a nivel postraducciona sino que, incrementando la expresión de c-Rel, también podía favorecerla a nivel transcripcional. De los 218 genes resultantes de nuestro análisis, seleccionamos tres grupos atendiendo a su posible interacción directa o indirecta con c-Rel (**Figura 3**). Dentro de este grupo, cabe destacar la presencia de genes importantes para la diferenciación Th1, como es el caso del propio c-Rel, el factor de crecimiento CSF2 o los factores de transcripción TBX21 y Bcl-6, éste último, junto con el receptor de IL-21, también de importancia para la diferenciación de las células T foliculares (Tfh). También se identificaron genes Th2 (citoquinas IL-3, -4 y -13), Th17 (CSF2 y los factores de transcripción SOCS1, EGR y c-Rel) y Treg (la cadena α del receptor de IL2, o los factores de transcripción SOCS1 y TRIB1, este último un factor de unión a FOXP3).

Con la finalidad de explorar qué genes de los seleccionados podrían estar regulados por el factor de transcripción NF- κ B, buscamos dichos genes en una base de datos de genes diana de NF- κ B generada por el Dr. Thomas Gilmore, y que se encuentra disponible on-line en la página web del Departamento de Biología de la Universidad de Boston (<http://www.bu.edu/nf-kb/gene-resources/target-genes>). Mediante dicha herramienta informática, encontramos que un tercio de los genes agrupados por interacción directa o indirecta con c-Rel (**Figura 3**) podían estar regulados por la actividad NF- κ B. Entre dichos genes cabe destacar el receptor de IL2 (IL2RA); los factores solubles IL-3, CSF2, GZMB y CX3CL1; los factores de apoptosis FASL y BCL-2A1; proteínas de señalización como GADD45B, TRAIL y PIM1; o el factor de transcripción NR4A1, pudiendo todos ellos estar relacionados de una u otra forma con la regulación que el NO ejerce sobre la activación y diferenciación de los linfocitos T.

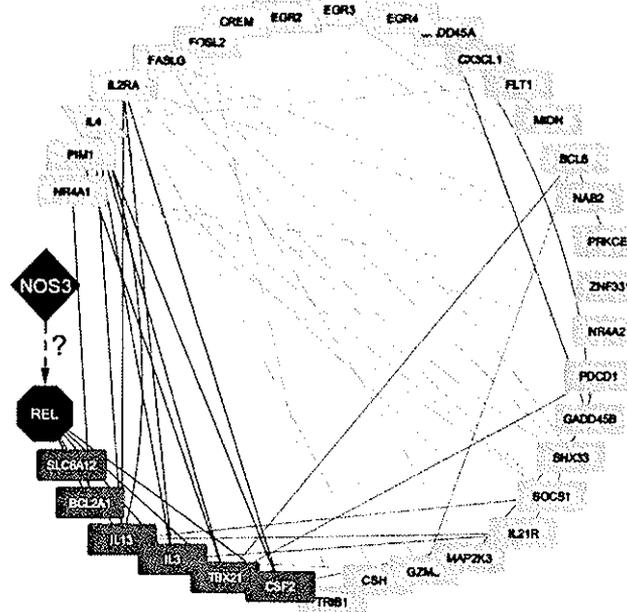


Figura 3: "Network" circular de interacciones moleculares en una selección de genes regulados diferencialmente por eNOS en las células T CH7C17. Células T transfectadas con eNOS o G2A fueron activadas con Ac anti-CD3 entrecruzado durante 90 min y sus RNAs analizados mediante microarrays de expresión génica. Se representa un grupo de genes cuya diferencia en la inducción entre eNOS y G2A resultó ≥ 1.5 . En azul oscuro se representan genes que interactúan directamente con el factor de transcripción Rel (perteneciente a la familia NF- κ b); en azul claro, aquellos genes que establecen interacción indirecta (de segundo orden) con Rel; y, en verde, genes que interactúan con los dos grupos de genes anteriores (las líneas magenta y verde conectan con genes que interactúan con Rel directa e indirectamente, respectivamente). El análisis del network de interacción génica ha sido llevado a cabo mediante uso del software bioinformático Cytoscape 3.3.0.

2.- Determinar el impacto que ejerce el NO sobre la diferenciación de los linfocitos T humanos.

El NO es un radical libre altamente reactivo frente a metales en grupos prostéticos, así como frente a Cys y Tyr de proteínas cuya actividad puede ser regulada por nitración y nitrosilación. Como molécula de señalización, el NO puede desempeñar importantes funciones en las células T. Se ha descrito que en sistemas murinos, bajos niveles de NO favorecen los procesos de diferenciación Th1 a través de un mecanismo dependiente de GMPc, mientras que altos niveles de NO previenen las respuestas Th1 y Th17 (8-9). Por el contrario, en humanos la inducción y estabilidad de las células Th17 se ha asociado con la producción de NO por iNOS (10), poniendo de manifiesto las profundas diferencias existentes entre las acciones ejercidas por el NO en ratón y humanos (11). Por tanto estudiamos si la capacidad señalizadora del NO podía regular la diferenciación in vitro de linfocitos T humanos hacia fenotipos Th1, Th2 y Th17. Para ello, durante el proceso de diferenciación, tratamos los linfocitos T con el agente transnitrosilante Cys-NO o con L-NIO, este último un inhibidor de óxido nítrico sintasas (NOS) constitutivas, entre las que se encuentra eNOS (Figura 4-6). Los resultados indican que, en las condiciones in vitro en las que se llevaron a cabo los cultivos celulares, la diferenciación Th1 (células productoras de IFN- γ) no resultaba modificada ni por el tratamiento con Cys-NO ni por la inhibición de la actividad NOS (Figura 4).

Resultados similares se obtuvieron en el caso de diferenciar las células hacia fenotipos Th2 (células productoras de IL-4), aunque se observó que el tratamiento con L-NIO causaba una ligera disminución en el porcentaje de células polarizadas hacia fenotipo Th2, sugiriendo que la actividad NOS podría modular parcialmente los procesos de diferenciación Th2 (**Figura 5**). Por el contrario, el tratamiento con Cys-NO aumentaba el porcentaje de células Th17 (productoras de IL-17), mientras la inhibición de la actividad NOS con L-NIO lo disminuía (**Figura 6**). Aunque preliminares, estos resultados sugerirían que, a través de la regulación del factor de transcripción NF- κ B, el NO procedente de NOS constitutivas desempeñaría una función reguladora sobre los procesos de diferenciación Th2 y Th17. De acuerdo con esta hipótesis, se ha descrito que PKC- θ , una quinasa perteneciente a la familia de las PKC noveles, participa en desencadenar la cascada de activación de NF- κ B en los linfocitos T y juega un importante papel en los procesos de diferenciación Th2 y Th17 (11).

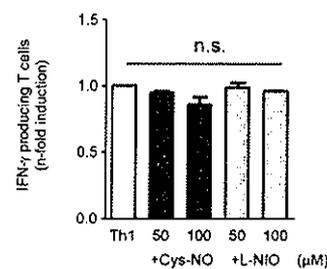
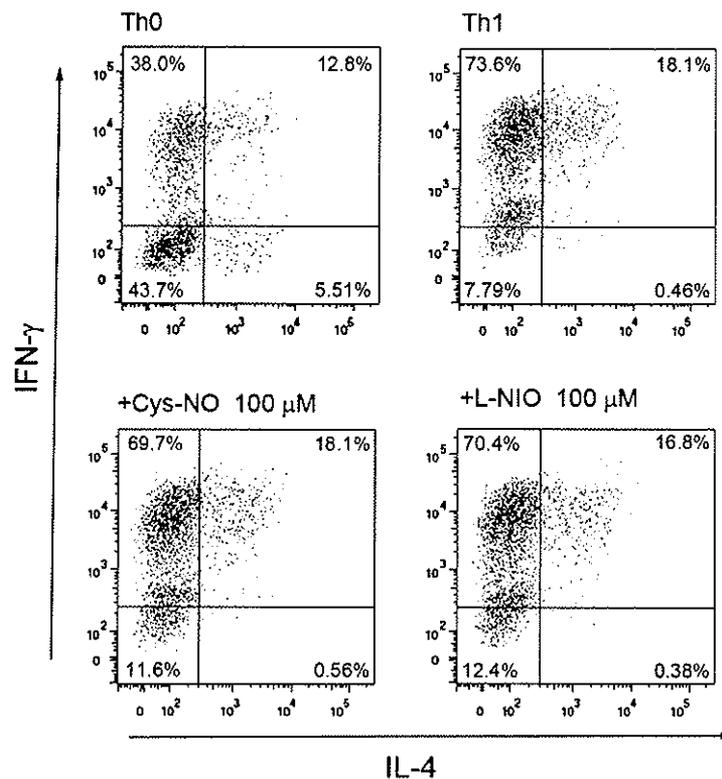


Figura 4: El NO no interfiere en la diferenciación Th1 "in vitro" de células T CD4+ vírgenes humanas. Células T vírgenes (CD4+/CD45RA), estimuladas en placa con Acs CD3 + CD28, fueron cultivadas en condiciones de polarización Th1 (IL-12, 25 ng/ml + Ac anti-IL4, 3 µg/ml) en presencia o ausencia de 50 y 100 µM de nitrosocisteína (Cys-NO) o L-NIO, analizándose mediante tinción intracelular la producción de IFN-γ e IL4 por Citometría de Flujo 8 h después de la estimulación con los Acs CD3 + CD28. Se indican los porcentajes de células en cada cuadrante. Como control (Th0), se incluye la diferenciación de células en presencia de Acs CD3 + CD28 pero ausencia de los agentes inductores de diferenciación Th1. En la parte inferior, la gráfica representa, para cada tratamiento, las veces que aumenta el número de células productoras de IFN-γ respecto de las células Th1 no tratadas. Se muestra la media±SEM de tres experimentos independientes. ns=no significativo.

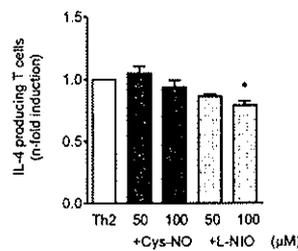
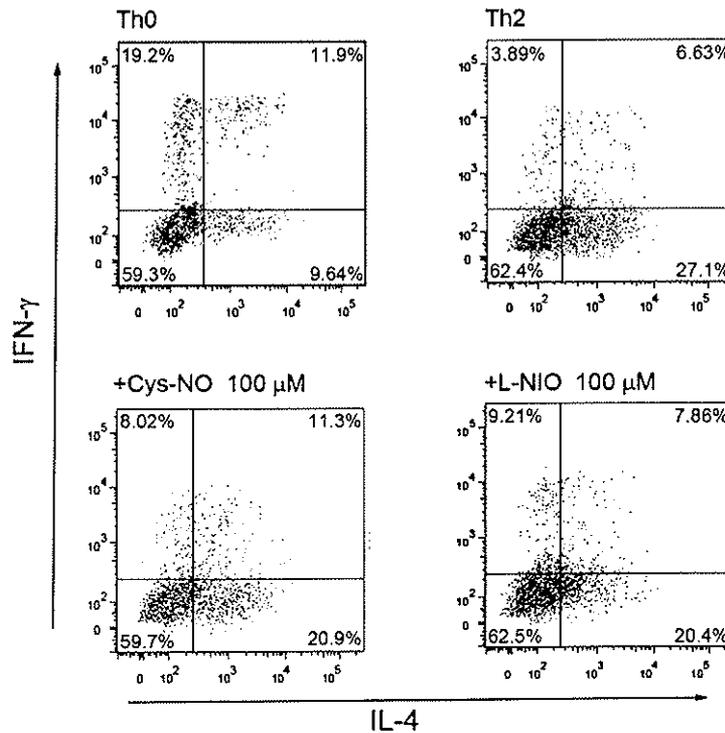


Figura 5: El NO interfiere parcialmente la diferenciación Th2 "in vitro" de células T CD4+ vírgenes humanas. Células T vírgenes (CD4+/CD45RA), estimuladas en placa con Acs CD3 + CD28, fueron cultivadas en condiciones de polarización Th2 (IL-4, 15 ng/ml + Ac anti-IFN-γ, 3 µg/ml) en presencia o ausencia de 50 y 100 µM de nitrosocisteína (Cys-NO) o L-NIO, analizándose mediante tinción intracelular la producción de IFN-γ e IL4 por Citometría de Flujo a las 8 h de la estimulación con Acs CD3 + CD28. Se indican los porcentajes de células en cada cuadrante. Como control (Th0), se incluye la diferenciación de células en presencia de Acs CD3 + CD28 pero ausencia de los agentes inductores de diferenciación Th2. La gráfica representa, para cada tratamiento, las veces que aumenta el número de células productoras de IL-4 respecto de las células Th2 no tratadas. Se muestra la media±SEM de dos experimentos independientes. *p<0.05.

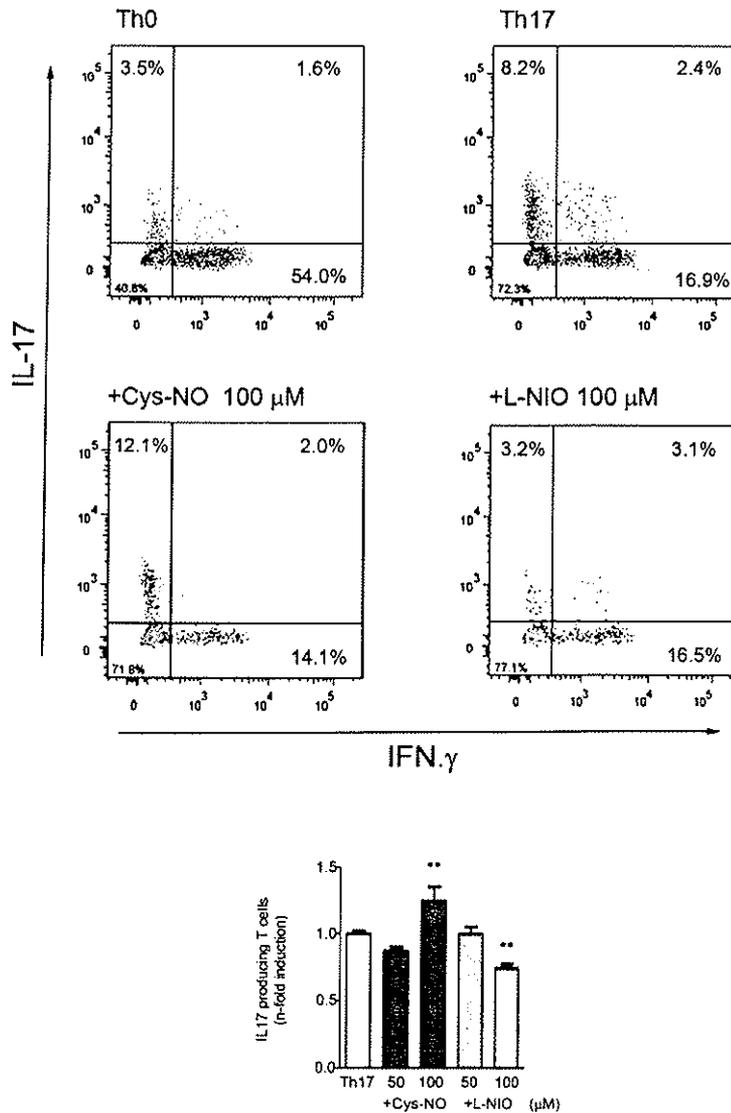


Figura 6: El NO interfiere en la diferenciación Th17 “in vitro” de células T CD4+ vírgenes humanas. Células T vírgenes (CD4+/CD45RA), estimuladas en placa con Acs CD3 + CD28, fueron cultivadas en condiciones de polarización Th17 (IL-6, 10 ng/ml; IL-1β, 10 ng/ml; TGF-β, 5ng/ml y Acs anti-IL4 e -IFN-γ, ambos a 3 ng/ml) en presencia o ausencia de 50 y 100 μM de nitrosocisteína (Cys-NO) o L-NIO, analizándose, mediante tinción intracelular, la producción de IFN-γ e IL7 por Citometría de Flujo 8 h después de la estimulación con los Acs CD3 + CD28. Se indican los porcentajes de células en cada cuadrante. Como control (Th0), se incluye la diferenciación de células en presencia de Acs CD3 + CD28 pero ausencia de los agentes inductores de diferenciación Th17. En la gráfica de la parte inferior, se representa, para cada tratamiento, las veces que aumenta el número de células productoras de Th17 respecto de las células Th17 no tratadas. Se muestra la media±SEM de tres experimentos independientes. **p≤0,01

3.- Explorar los mecanismos por los que el NO puede regular la activación del factor de transcripción NF-κB y la diferenciación de los linfocitos T.

Para llevar a cabo este objetivo, en primer lugar, mediante aproximaciones bioquímicas, estudiamos la fosforilación de PKC-θ en la Thr⁵³⁸ de células CH7C17 eNOS y G2A

estimuladas con Ac anti-CD3 en, observando que los niveles de fosforilación eran mayores en las células eNOS que en las células G2A (**Figura 7**). A continuación quisimos confirmar que el aumento de la fosforilación de PKC- θ observado en las células que sobreexpresaban eNOS se correspondía con un aumento en su activación. Para ello nos centramos en el estudio de la activación de elementos de regulación situados *upstream* al propio factor de transcripción NF- κ B, una ruta de señalización que en los linfocitos T se encuentra favorecida por PKC- θ (7), comparando su activación entre células eNOS y G2A estimuladas con Ac anti-CD3 entrecruzado (**Figura 7**). En concreto, estudiamos la fosforilación de CARMA1, I κ B Kinasa (IKK) e I κ B α . Para el estudio de la activación de CARMA1 nos centramos en la fosforilación de la Ser⁶⁵², equivalente a la Ser⁶⁵⁷ en ratón (12). Tras la estimulación, las células eNOS presentaban niveles de fosforilación de CARMA1, IKK α/β y de I κ B α superiores a los de las células G2A. Por tanto, los resultados indicaban que eNOS regulaba positivamente la activación y función de PKC- θ en la SI.

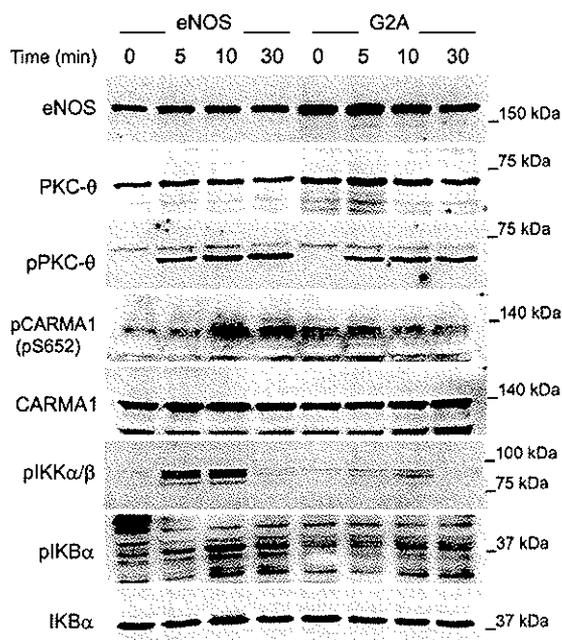


Figura 7: eNOS activa PKC- θ y regula positivamente la cascada de señalización de NF- κ B. Análisis por *western-blot* de la activación de la cascada de señalización de NF- κ B en células T eNOS y G2A estimuladas con Ac anti-CD3 durante los tiempos indicados. Se detecta la forma fosforilada de IKK α/β y la fosforilada y total de PKC- θ , CARMA1 e I κ B α .

Puesto que con anterioridad se ha descrito que la activación de PKC- θ se regula desde la sinapsis inmune de la célula T (13), estudiamos la localización de PKC- θ en la sinapsis inmune de conjugados entre células parentales CH7C17, eNOS o G2A y células APC Raji pulsadas con SEB, observando, por microscopía de fluorescencia confocal, que PKC- θ se concentraba en el c-SMAC del 40-50 % de las células control CH7C17 y G2A, mientras que en las células eNOS este porcentaje descendía hasta aproximadamente la mitad (**Figura 8A**). El patrón disperso de distribución de PKC- θ en las células eNOS se evidencia de manera más clara en las proyecciones sobre los planos XZ de la zona de la SI y en los perfiles de fluorescencia correspondientes a la línea

trazada sobre los mismos (**Figura 8A**). También estudiamos si la expresión y localización de PKC- θ en el c-SMAC se veía afectada por la translocación de eNOS a la SI, analizando de manera simultánea la posición de la enzima respecto a la SI y el área ocupada por PKC- θ en conjugados entre células eNOS o G2A y células APC Raji pulsadas con SEB (**Figura 8B-C**). Los resultados reflejaron una correlación inversa entre la distancia de eNOS a la SI y el área ocupada por PKC- θ (**Figura 8B**) así como un aumento en la expresión de esta última en las células eNOS respecto de las G2A (**Figura 8C**).

Estos resultados sugieren que la presencia y actividad de eNOS en la región de la SI controla la coalescencia de PKC- θ en el c-SMAC.

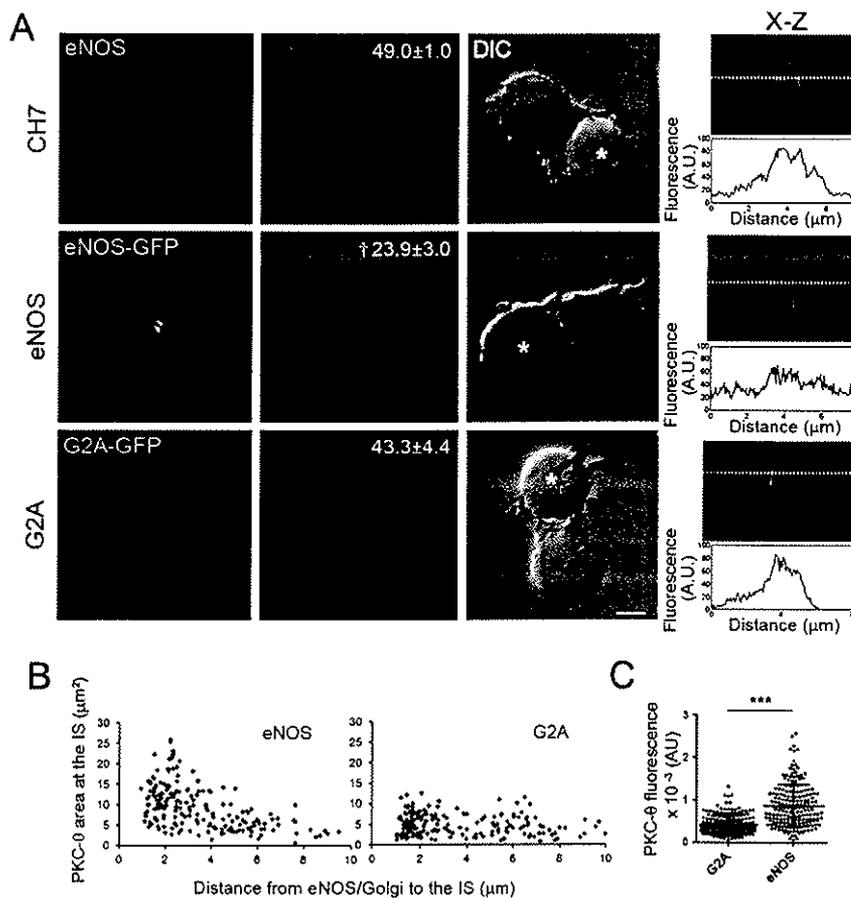


Figura 8: La sobreexpresión de eNOS dificulta la coalescencia de PKC- θ en el c-SMAC de la sinapsis inmune. A) Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia de células CH7C17, eNOS y G2A conjugadas durante 20 min con células Raji pulsadas con SEB (asterisco), mostrando la localización de PKC- θ (rojo) y eNOS endógena, eNOS-GFP o G2A-GFP (verde) en las células T. Barra de escala = 4 μm . El porcentaje de células con PKC- θ concentrada en el c-SMAC se indica como la media \pm SEM de al menos 200 células de cada tipo celular pertenecientes a cuatro experimentos independientes. † $p \leq 0,01$. A la derecha se muestran las proyecciones XZ de PKC- θ en la SI, y los perfiles de fluorescencia correspondientes a la línea discontinua amarilla. B) Análisis del área (μm^2) ocupada por PKC- θ respecto a la distancia del Golgi a la SI (μm) en células eNOS y G2A conjugadas durante 20 min con células Raji pulsadas con SEB. En las células G2A se marcó el aparato de Golgi con un Ac anti-Golgina-97. Se analizaron más de 180 células de cada tipo celular. C) Fluorescencia de PKC- θ (U.A.) en la sinapsis inmune de las células eNOS y G2A. Se muestra la media \pm SEM. *** $p \leq 0.001$.

Como el citoesqueleto de actina es un elemento fundamental para la organización de la SI (14), quisimos estudiar si eNOS regulaba la disposición de PKC- θ en el c-SMAC a través de la organización de actina en la SI. Comenzamos comparando los niveles de F-actina en células eNOS y G2A conjugadas con APC Raji pulsadas con SEB, observando que en las células eNOS los niveles de F-actina eran mucho menores que en las G2A (**Figura 9A-B**). También pudimos apreciar que la fracción de eNOS-GFP asociada a la membrana plasmática se localizaba en las regiones de F-actina, no ocurriendo lo mismo en el caso de eNOS-GFP asociada al Golgi ni en el caso de G2A-GFP, tal y como se puede observar en los planos ortogonales XZ realizados sobre la región de la SI o del Golgi, y en los correspondientes perfiles de fluorescencia de las líneas trazadas sobre dichos planos ortogonales (Fig. 9A-B, gráficas a la derecha).

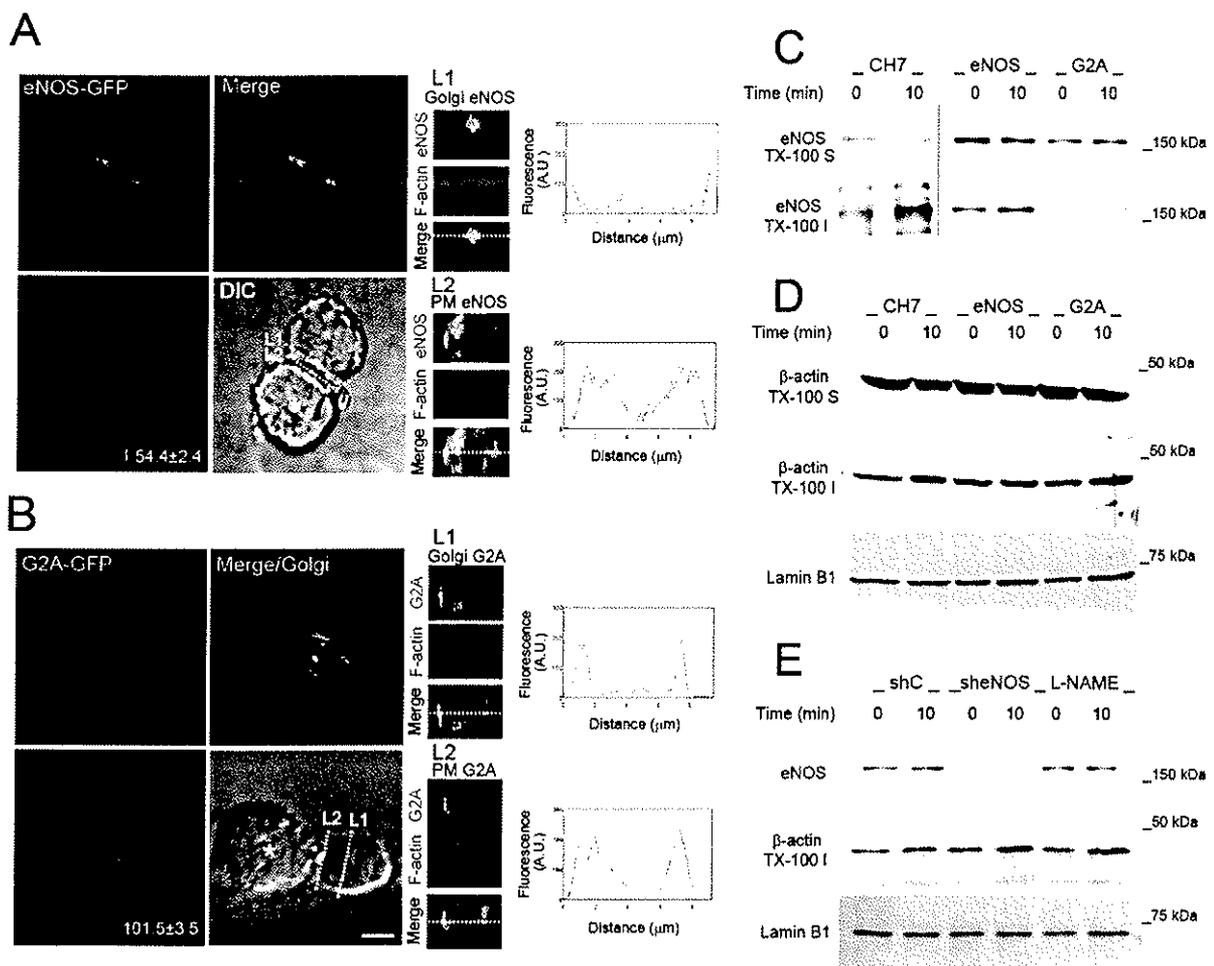


Figura 9: eNOS interacciona con F-actina en el d-SMAC de la sinapsis inmune y reduce su polimerización. A-B) Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia de células eNOS (A) y G2A (B) conjugadas con células Raji pulsadas con SEB (asterisco) mostrando la localización de F-actina (rojo) y G2A- o eNOS-GFP (verde). La F-actina fue marcada con faloidina-Alexa568 y el Golgi en las células G2A teñido con Ac anti-Golgin-97 (cian). Barra de escala = 4 μ m. La fluorescencia de F-actina (U.A.) en la SI de las células eNOS y G2A se representa como la media \pm SEM. $\dagger \leq 0,01$. Se analizaron más de 80 células por tipo celular. A la derecha, se muestran las proyecciones

XZ de F-actina y eNOS- o G2A-GFP en la región del Golgi (L1) y de la membrana plasmática (MP) (L2), así como los perfiles de fluorescencia correspondientes a las líneas discontinuas amarillas. C-D) Análisis por *western-blot* de eNOS, eNOS-GFP y G2A-GFP (C) y β -actina (D) en las fracciones solubles (S) e insolubles (I) a Tritón-X100 de células CH7C17, eNOS y G2A estimuladas durante 10 min con Ac anti-CD3 entrecruzado. Se muestra también la expresión de lamina B1. E) Estudio por *western-blot* de β -actina en fracciones insolubles (I) a Tritón-X100 de células eNOS tratadas con 300 μ M L-NAME, o transducidas con shRNAs control o específico para eNOS y estimuladas como en (C-D).

Para profundizar en esta hipótesis, realizamos experimentos bioquímicos de fraccionamiento subcelular con Tritón-X100 en las distintas células de estudio estimuladas con Ac anti-CD3 entrecruzado, analizando el contenido de eNOS y β -actina en las fracciones solubles (0,2 % Tritón-X100) e insolubles o de citoesqueleto. En condiciones basales, G2A-GFP se asocia principalmente con la fracción soluble, mientras que tanto eNOS endógena como eNOS-GFP, aparecen distribuidas entre las fracciones soluble e insoluble. Sin embargo, tras la estimulación celular, se observa un reclutamiento de ambas hacia la fracción insoluble/citoesqueleto (**Figura 9C**). En paralelo, observamos que tras la estimulación se produce un incremento de β -actina en la fracción insoluble de las células CH7C17 y G2A, siendo éste mucho menor en las células eNOS (**Figura 9D**). Quisimos verificar que la actividad de eNOS, y no su mera expresión, era la responsable de la disminución de actina polimerizada. Para ello interferimos con lentivirus específicos la expresión de células eNOS, o pretratamos las células con L-NAME; en ambos casos observamos que los niveles de F-actina aumentaban tras la estimulación con Ac anti-CD3 respecto a células eNOS tratadas shRNA control (**Figura 9E**). Por tanto, los resultados indicaban que, en las células estudiadas, era la acción del NO producido por eNOS, y no su mera expresión, el que disminuía la polimerización de actina inducida por señalización desde el TCR. Estos resultados se corroboraron en linfoblastos T primarios humanos conjugados con APC Raji pulsadas con SEE y tratados con Cys-NO, un donador de NO con actividad transnitrosilante; analizando también en este caso la fluorescencia y el área ocupada por PKC- θ en la SI. Encontramos que todos estos parámetros aumentaban significativamente tras el tratamiento con Cys-NO (**Figura 10A-C**). Como observamos que la actividad de eNOS afectaba a la fosforilación de PKC- θ y a la polimerización de β -actina en la línea celular T CH7C17, quisimos averiguar si el tratamiento con Cys-NO también alteraba estos procesos en linfoblastos T humanos de origen primario activados con Ac anti-CD3. Para ello tras activar las células las tratamos con 50 o 100 μ M de Cys-NO encontrando que, de forma similar a como ocurría en células T CH7C17 transfectadas con eNOS, ambas concentraciones de agente transnitrosilante aumentaban los niveles de PKC- θ fosforilada y disminuían la cantidad de β -actina polimerizada (**Figura 10D-E**). En su conjunto, estos resultados sugieren que en conjugados antígeno específicos entre células T y APC, eNOS se transloca al citoesqueleto de actina, reorganizándolo y dispersando PKC- θ en la SI, una localización que parecía corresponderse con un mayor estado de activación de PKC- θ .

Puesto que el citoesqueleto de actina desempeña un importante papel en la organización de la SI, y habíamos encontrado que su polimerización se veía reducida por la actividad de eNOS, nos planteamos si β -actina podría ser una posible diana de nitrosilación por eNOS. Con este objetivo, realizamos ensayos de *biotin-switch* en

linfoblastos T primarios humanos activados con Ac anti-CD3, observando que la nitrosilación de β -actina aumentaba de manera significativa tras activación (**Figura 11A**). Validamos también estos resultados en muestras de células eNOS activadas con células Raji pulsadas con SEB, que de igual manera presentaban un incremento en la nitrosilación de β -actina tras la estimulación (**Figura 11B**), el cual disminuía considerablemente al interferir la expresión de eNOS con vectores lentivirales (**Figura 11C**).

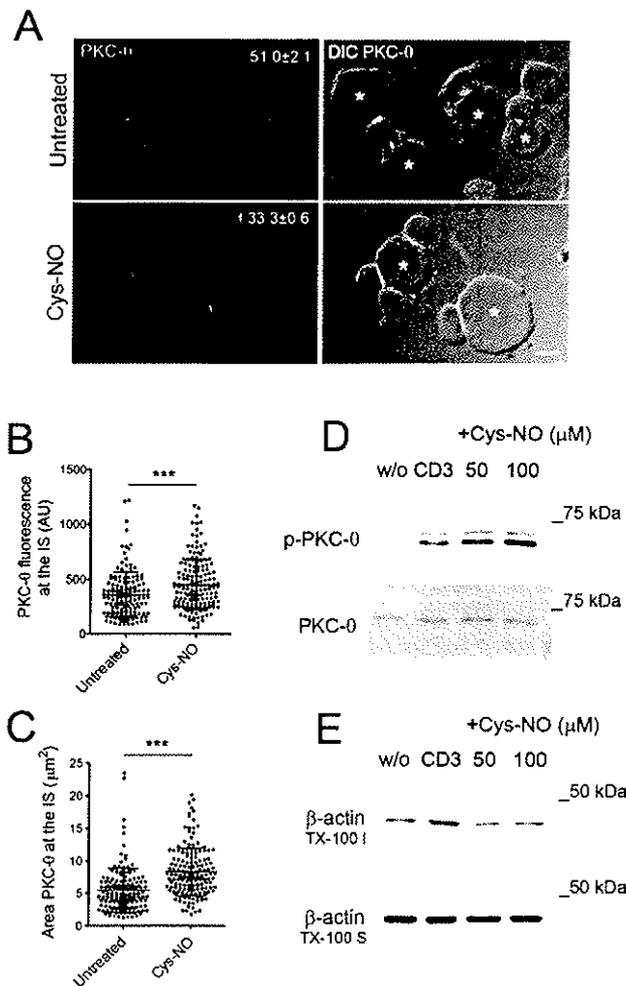


Figura 10: El tratamiento con Cys-NO dificulta la concentración de PKC- θ en el c-SMAC de linfocitos T primarios. A) Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia de linfoblastos T humanos SEE-específicos conjugados durante 20 min con células Raji pulsadas con SEE (asterisco) y tratadas o no con 50 μM Cys-NO. Se muestra la localización de PKC- θ (verde). Barra de escala = 6 μm . en la esquina superior derecha de las micrografías de fluorescencia se representa la media \pm SEM del porcentaje de células con PKC- θ concentrada en el c-SMAC. $\dagger p \leq 0,01$. B-C) Fluorescencia en U.A. (B) y área en μm^2 (C) de PKC- θ en la SI de linfoblastos T de origen primario. Se representa la media \pm SD de tres experimentos independientes. Se analizaron más de 150 células por condición. *** $p \leq 0,001$. D) Análisis por *western-blot* de la fosforilación de PKC- θ (Thr⁵³⁸) en linfoblastos T primarios estimulados con Ac anti-CD3 entrecruzado y tratados, donde se indica, con Cys-NO. E) Análisis por *western-blot* de β -actina en fracciones soluble (S) e insoluble (I) de linfoblastos T primarios estimulados y tratados como en (D).

En neutrófilos se han identificado cuatro cisteínas en la región C-terminal de β -actina (Cys^{257} , Cys^{272} , Cys^{285} y Cys^{374}) como las principales dianas de S-nitrosilación por agentes oxidantes (15). Llevamos a cabo análisis proteómicos para estudiar si una o más de estas cisteínas resultaban S-nitrosiladas en las células T activadas. Los resultados mostraban que la Cys^{374} era el único residuo estudiado cuya S-nitrosilación aumentaba en los linfocitos T tras estimulación vía TCR (datos no mostrados). Confirmamos dichos resultados de proteómica con ensayos de *biotin-switch* (16). Para ello utilizamos células CH7C17 establemente transfectadas con la construcción mCherry- β -actina *wild type* (WT), así como el mutante puntual C374S. Tratamos dichas células con Cys-NO y sometimos sus extractos al protocolo estándar de *biotin-switch* por marcaje con biotina-HPDP. Los resultados mostraban que la S-nitrosilación de mCherry- β -actina se reducía considerablemente en el mutante C374S (**Figura 11D**). Realizamos también experimentos con células eNOS transfectadas de manera transitoria con las mismas dos construcciones anteriores, activándolas con células Raji pulsadas con SEB, observando que, del mismo modo al mostrado con anterioridad, tras estimulación la S-nitrosilación del mutante de β -actina C374S se veía considerablemente reducida respecto de la forma WT (**Figura 11E**). En su conjunto, estos resultados sugerían que, en respuesta a la estimulación vía TCR, el NO producido por eNOS nitrosilaba β -actina principalmente en la Cys^{374} .

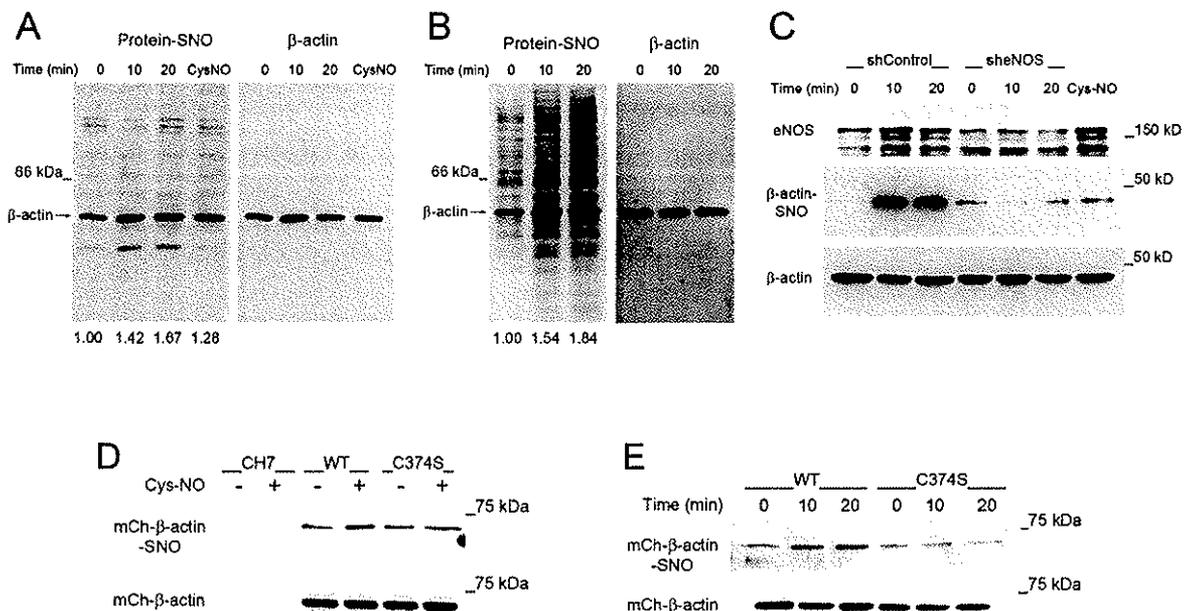


Figura 11: eNOS nitrosila β -actina en la Cys^{374} tras la estimulación vía TCR. A-B) Análisis por *biotin-switch* y *western-blot* de la S-nitrosilación de β -actina en linfoblastos T primarios humanos (A) y células eNOS (B) estimulados durante los tiempos indicados con Ac anti-CD3 o células Raji pulsadas con SEB \pm Cys-NO, respectivamente. En la parte inferior se indica el análisis cuantitativo de la S-nitrosilación de β -actina representado como la media de tres (A) y cinco (B) experimentos independientes. C) Análisis por *biotin-switch* y *western blot* de la S-nitrosilación de β -actina en células T eNOS transducidas con shRNAs control o de eNOS y estimuladas durante los tiempos que se indica con células Raji pulsadas con SEB. Como control, las células se trataron con 50 μM de Cys-NO. Se muestra un experimento representativo de tres. D) Análisis por *biotin-switch* y *western-blot* de la S-nitrosilación de mCherry- β -actina en células CH7C17, WT y C374S tratadas con 50 μM Cys-NO. E) Estudio por *biotin-switch* y *western-blot* de la S-nitrosilación de mCherry- β -actina en células eNOS transitoriamente transfectadas con WT- o C374S-mCherry- β -actina y estimuladas 24 h más tarde, durante los tiempos indicados, con células Raji pulsadas con SEB. $n=3$.

A continuación quisimos averiguar si el mecanismo por el que el NO procedente de eNOS regulaba la localización y activación de PKC- θ en la SI podía transcurrir a través de la S-nitrosilación de β -actina en la Cys³⁷⁴. Para ello utilizamos células CH7C17 que expresaban establemente mCherry- β -actina WT o los mutantes complementarios de Cys por Ser 3C (Cys²⁵⁷, Cys²⁷² y Cys²⁸⁵) y C374S (**Figuras 12A**). Dichas células fueron conjugadas con células APC Raji pulsadas con SEB, observando que PKC- θ se concentraba en el c-SMAC de las células WT y 3C, pero mostraba una localización dispersa en células tratadas con Cys-NO (**Figura 12A**). Sorprendentemente, incluso en ausencia de Cys-NO, PKC- θ mostraba una localización dispersa en la SI de las células C374S (**Figura 12A**). Estudiamos también si la mutación en dicho residuo suponía un cambio en la fosforilación de PKC- θ , encontrando que tras la estimulación de células WT, 3C y C374S con células Raji pulsadas con SEB los niveles de fosforilación eran mayores en las células C374S (**Figura 12B-C**). Ambos resultados indicaban que la mutación C374S mimetizaba la acción ejercida por el NO sobre la localización y activación de PKC- θ en la SI, reforzando nuestra hipótesis de que, como resultado de la señalización vía TCR, el NO procedente de eNOS regula la organización y activación de PKC- θ en la SI a través de la S-nitrosilación de β -actina en la Cys-374 y la consiguiente reorganización del citoesqueleto de actina.

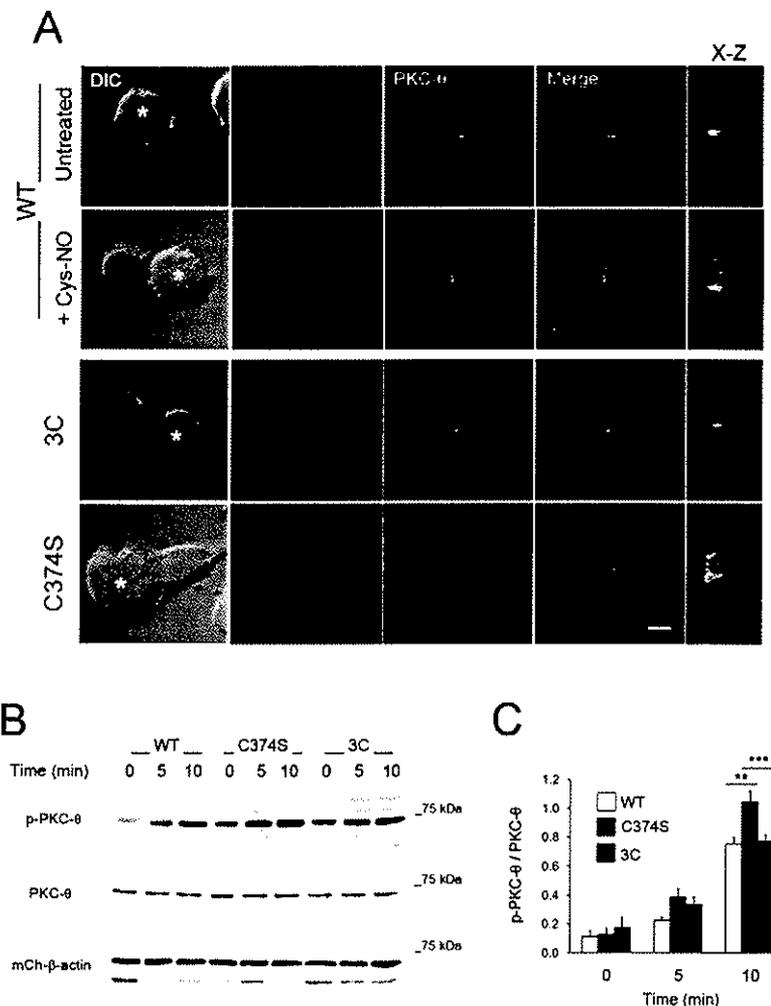


Figura 12: La nitrosilación de β -actina en la Cys³⁷⁴ regula la localización y activación de PKC- θ en la sinapsis inmune. A) Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia de células T CH7C17 establemente transfectadas con WT-, 3C- y C374S-mCherry- β -actina (rojo) conjugadas durante 20 min con células Raji pulsadas con SEB (asterisco) y, posteriormente teñidas con Ac anti-PKC- θ (verde); donde se indica fueron tratadas con 50 μ M Cys-NO. A la derecha, se muestran las reconstrucciones correspondientes a los planos ópticos XZ de mCherry- β -actina y PKC- θ en la SI. Barra de escala = 4 μ m. B) Estudio por *western-blot* de la fosforilación de PKC- θ (Thr⁵³⁸) de células WT, 3C y C374S estimuladas con células Raji pulsadas con SEB. El histograma representa la fosforilación normalizada de PKC- θ como la media \pm SEM de cuatro experimentos independientes. **p \leq 0,01; ***p \leq 0,001.

CONCLUSIONES:

La ayuda otorgada por la Fundación Domingo Martínez a nuestro grupo de investigación ha tenido una doble finalidad, por una parte se ha destinado a finalizar un proyecto de investigación en fase ya avanzada, y por otra ha permitido iniciar un estudio continuidad del anterior. Los resultados presentados muestran claros indicios de que el NO juega un papel importante en mecanismos básicos relacionados con la activación y diferenciación de los linfocitos T. Dichos mecanismos transcurren, en parte, como consecuencia de la actividad nitrosilante que dicho agente ejerce sobre cisteínas localizadas en dominios clave para la regulación de la función de proteínas celulares. En nuestro caso, hemos encontrado que, en los linfocitos T humanos, la producción localizada de NO por eNOS regula la actividad de PKC- θ en la sinapsis inmune y que dicha regulación transcurre de forma indirecta a través de la nitrosilación de β -actina, una proteína cuya dinámica resulta clave para la organización de receptores de señalización y adhesión en la sinapsis inmune. Es en este punto donde el proyecto abre nuevas perspectivas que animan a estudiar los aspectos funcionales de los hallazgos. En este sentido, nuestros resultados muestran que el NO procedente de eNOS regula no sólo la activación de PKC- θ sino también la del factor de transcripción NF- κ B, así como la transcripción de genes cuyos promotores poseen sitios de regulación por dicho factor. Estudiar en linfocitos T primarios humanos si eNOS juega un papel importante en los procesos de diferenciación no es tarea fácil. Sin embargo, aunque preliminares, nuestras aproximaciones "in vitro" utilizando el agente transnitrosilante Cys-NO e inhibidores de óxido nítrico sintasas (NOS) constitutivas sugieren que, en linfocitos T humanos, el NO de origen enzimático podría jugar un papel importante en los procesos de diferenciación Th2 y Th17, poniendo de manifiesto algunos de los mecanismos moleculares por los que el NO regula la respuesta inmune adaptativa, hallazgos que en el futuro podrían ayudar a abrir nuevas oportunidades terapéuticas para el tratamiento de las enfermedades de origen autoinmune y alérgico.

BIBLIOGRAFIA:

- (1) Hobbs AJ, Higgs A, Moncada S, (1999) Inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target. *Annual review of pharmacology and toxicology* **39**: 191-220.
- (2) Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *The Biochemical journal* **357**: 593-615.
- (3) Ibiza S, Victor VM, Bosca I, Ortega A, Urzainqui A, O'Connor JE, Sanchez-Madrid F, Esplugues JV, Serrador JM (2006) Endothelial nitric oxide synthase regulates T cell receptor signaling at the immunological synapse. *Immunity* **24**: 753-765.
- (4) Ibiza S, Perez-Rodriguez A, Ortega A, Martinez-Ruiz A, Barreiro O, Garcia-Dominguez CA, Victor VM, Esplugues JV, Rojas JM, Sanchez-Madrid F, Serrador JM (2008) Endothelial nitric oxide synthase regulates N-Ras activation on the Golgi complex of antigen-stimulated T



cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 10507-10512.

(5) Marsland BJ, Soos TJ, Spath G, Littman DR, Kopf M (2004) Protein kinase C theta is critical for the development of in vivo T helper (Th)2 cell but not Th1 cell responses. *J Exp Med* **200**: 181-189.

(6) Kwon MJ, Ma J, Ding Y, Wang R, Sun Z (2012) Protein kinase C-theta promotes Th17 differentiation via upregulation of Stat3. *J Immunol* **188**: 5887-5897.

(7) Vallabhapurapu S, Karin M (2009) Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annual review of immunology* **27**: 693-733.

(8) Niedbala W, Cai B, Liew FY (2006) Role of nitric oxide in the regulation of T cell functions. *Ann Rheum Dis* **65 Suppl 3**: iii37-4.

(9) Jianjun Y, Zhang R, Lu G, Shen Y, Peng L, Zhu C, Cui M, Wang W, Arnaboldi P, Tang M, Gupta M, Qi CF, Jayaraman P, Zhu H, Jiang B, Chen SH, He JC, Ting AT, Zhou MM, Kuchroo VK, Morse HC, 3rd, Ozato K, Sikora AG, Xiong H (2013) T cell-derived inducible nitric oxide synthase switches off Th17 cell differentiation. *J Exp Med* **210**: 1447-1462

(10) Obermajer N, Wong JL, Edwards RP, Chen K, Scott M, Khader S, Kolls JK, Odunsi K, Billiar TR, Kalinski P (2013) Induction and stability of human Th17 cells require endogenous NOS2 and cGMP-dependent NO signaling. *J Exp Med* **210**: 1433-1445.

(11) Isakov N, Altman, A (2012) PKC-theta-mediated signal delivery from the TCR/CD28 surface receptors. *Front. Immunol.* **3**:1.

(12) Sommer K, Guo B, Pomerantz JL, Bandaranayake AD, Moreno-Garcia ME, Ovechkina YL, Rawlings DJ (2005) Phosphorylation of the CARMA1 linker controls NF-kappaB activation. *Immunity* **23**: 561-574.

(13) Yokosuka T, Kobayashi W, Sakata-Sogawa K, Takamatsu M, Hashimoto-Tane A, Dustin ML, Tokunaga M, Saito T (2008) Spatiotemporal regulation of T cell costimulation by TCR-CD28 microclusters and protein kinase C theta translocation. *Immunity* **29**: 589-601.

(14) Yu Y, Smoligovets AA, Groves JT (2013) Modulation of T cell signaling by the actin cytoskeleton. *J Cell Sci* **126**: 1049-1058.

(15) Thom SR, Bhopale VM, Mancini DJ, Milovanova TN (2008) Actin S-nitrosylation inhibits neutrophil beta2 integrin function. *The Journal of biological chemistry* **283**: 10822-10834.

(16) Jaffrey SR, Erdjument-Bromage H, Ferris CD, Tempst P, Snyder SH (2001) Protein S-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide. *Nat Cell Biol* **3**: 193-197.



DIFUSION DE RESULTADOS:

Los resultados presentados en este informe forman parte de un manuscrito enviado a publicación en una revista de prestigio internacional. Dichos resultados también han formado parte del trabajo de Tesis Doctoral “Papel de eNOS en la regulación de PKC- θ en la sinapsis inmune de los linfocitos T” perteneciente al miembro del equipo investigador Almudena García-Ortiz (se adjunta un ejemplar), cuya lectura tuvo lugar en febrero de 2016 en la Universidad Autónoma de Madrid con calificación Sobresaliente “Cum Laude”.

AGRADECIMIENTOS:

El equipo investigador agradece la colaboración en este estudio al Dr. Francisco Sánchez-Madrid, Dra. Noa B. Martín-Cofreces y Dr. Antonio Martínez Ruiz (Servicio de Inmunología Hospital Universitario de la Princesa), Dra. Sales Ibiza (Instituto de Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de Lisboa), Dr. Ángel Ortega (Facultad de Farmacia de la Universidad de Valencia), Dr. Víctor Manuel Víctor (Hospital Universitario Dr. Peset Aleixandre de Valencia), así como la ayuda técnica de Ángel Bago y Juan Antonio Muner en el CBMSO. Los estudios de Proteómica y Genómica fueron llevados a cabo por los Dres. Jesús Vázquez, Enrique Calvo y Ana Dopazo, en el Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC). Los estudios de Microscopía Confocal y Citometría se llevaron a cabo en las respectivas Unidades de Microscopía Confocal y Citometría del CBMSO.

Finalmente, el equipo de investigación quiere agradecer a la Fundación Domingo Martínez su importante y continuada apuesta por el fomento de la investigación científica, puesta de manifiesto mediante iniciativas como la convocatoria anual de “Ayudas en el Área de Biomedicina y Salud”, a través de la cual, gracias a la confianza depositada en nuestro equipo de investigación por la Fundación Domingo Martínez, hemos podido llevar a cabo el trabajo de investigación.