

UCH-FC
Biot. molecular
F837
c.1



UNIVERSIDAD DE CHILE FACULTAD DE CIENCIAS ESCUELA DE PREGRADO

“Modulación en la fosforilación de las MAPKs ERK1/2 por la estimulación de los receptores de dopamina D3R y D5R expresados en linfocitos T”

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

DAFNE SOFÍA FRANZ DEMANÉ

Director de Seminario de Título:

Dr. Rodrigo Pacheco Rivera

Profesor Patrocinante:

Dr. Mario Roseblatt

Junio 2012

Santiago - Chile



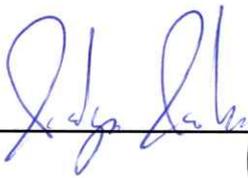
INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por la Srta. Dafne Sofía Franz Demané

“Modulación en la fosforilación de las MAPKs ERK1/2 por la estimulación de los receptores de dopamina D3R y D5R expresados en linfocitos T”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Dr. Rodrigo Pacheco Rivera
Director Seminario de Título



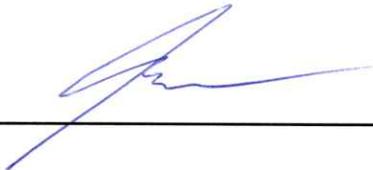


Comisión de Evaluación

Dra. María Rosa Bono
Presidenta Comisión



Dr. Alexander Vargas
Evaluador



Santiago de Chile, junio de 2012



Biografía



Nací el 22 de marzo de 1986 en la ciudad de Antofagasta. Mis padres son Erika (Demané) y Nicolás (Franz). Rápidamente dejé de ser hija única con el nacimiento de mi hermana Nicole en 1987 y posteriormente mi hermano Klaus el año 1991.

Estudí en el colegio San José de Antofagasta hasta el año 1996, en que nos mudamos con mi mamá y mis hermanos a la ciudad de Villa Alemana. En la quinta región estudié en el colegio Nacional Santa Ana de Villa Alemana, desde donde salí de 4° Medio el año 2003. También el año 2003 ingresé como monitora de Confirmación en la parroquia San Nicolás de Bari, labor que continué hasta el año 2010.

Mi primer año universitario fue en la Universidad Técnica Federico Santa María de Valparaíso, donde cursé el programa de Plan Común de Ingeniería. Sin embargo, rendí nuevamente la PSU y entré al programa de Bachillerato de la Universidad de Chile, donde estuve los años 2005 y 2006, obteniendo el grado de Bachiller en Ciencias Naturales y Exactas. Posteriormente ingresé a la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular (también de la Universidad de Chile) donde cursé ramos hasta el año 2010. En paralelo el año 2010 comencé a desarrollar el tema de mi tesis para obtener el título profesional de la carrera en el laboratorio de Neuroinmunología de la Fundación Ciencia y Vida. El año 2012 entregué la tesis (razón de esta autobiografía). Actualmente, sigo trabajando en el laboratorio de Neuroinmunología.

Dedicado a mi familia

Agradecimientos

Primero, quisiera agradecer al lab de Neuroinmuno: a Rodrigo por permitirme hacer la tesis, a Hugo quien me enseñó las primeras técnicas, a Caro por siempre estar dispuesta a aclarar cualquier duda, a Pancho por su siempre precisa discusión y ayuda e experimentos, a Dani E. por el apoyo y ayuda, a Claudio por su discusión en las reuniones, a Andro y a Glenda. También agradecer al lab de UPR: Jenny, Gonzalo, Emma, Marisol y Dani P. por su ayuda en las correcciones y los tips de WB que aprendí en este tiempo.

Quiero agradecer también a mis compañeros de la U, primero a Javi por convertirse finalmente en mi amiga y con quien me amanecí estudiando en la UTFSM. A mis amigos de Bachi, Felipe, Ricardo, Amanda e Isabel por convertir las salas en un lugar para también reír. A mis compañeros biotecs por todos los años juntos, especialmente a Yessia, Sarah y Cami B. que ha sido genial empezar trabajando con Uds. para después forjar una amistad. También a mis amigos del colegio Ely, Danny, Olga, Marcelo, Francisco y Camilo, quienes han sido un constante por todos estos años, y que sin su apoyo definitivamente este camino hubiese sido más solitario. A Benja por la compañía en los momentos críticos y darme el empujoncito para venir a la RM. A Jano por siempre sacarme una sonrisa y apañar en las noches que debí amanecerme en la U. A mis amigos de Confirmación: Pedro, Alan, Gerardo, Oscar, Roxi, Eli, Roberto, Mayito, Seba, Caro, Camilo y Duarte, por ser el ejemplo vivo de que aún hay bondad en el mundo.

A David, por ser un compañero en los momentos de alegría y también de tristeza y apoyarme siempre. Y por sobre todo a mi familia: a mi mamá y mi papá, por todo lo que han hecho y enseñado, a mis hermanos, a mis abuelitos y a mi tío Samuel.

ÍNDICE

ÍNDICE	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
LISTA DE ABREVIATURAS	VII
RESUMEN	1
ABSTRACT.....	3
INTRODUCCIÓN.....	5
LOS LINFOCITOS T JUEGAN UN PAPEL CENTRAL EN LA RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA.....	5
REGULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE POR EL SISTEMA NERVIOSO	6
LA DOPAMINA Y SUS RECEPTORES	8
LAS MAPKS ERK1 Y ERK2.....	9
VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DESENCADENADAS EN LT POR LA ESTIMULACIÓN DEL TCR.....	10
LA DA COMO MODULADOR DE LA RESPUESTA DE LT	13
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	15
MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
RESULTADOS.....	20
LA DA MODULA LA ACTIVACIÓN DE ERKS EN LT CD4 ⁺ Y CD8 ⁺ EN RESPUESTA A UN ESTÍMULO POLICLONAL.	20
LA ESTIMULACIÓN SELECTIVA DEL D3R DISMINUYE LA ACTIVACIÓN DE ERK1/2 EN LT CD4 ⁺ Y CD8 ⁺	24
LA FOSFORILACIÓN DE ERK1/2 Y LA SECRECIÓN DE IL-2 EN RESPUESTA A UN ESTÍMULO POLICLONAL REQUIEREN LA EXPRESIÓN DEL D5R EN LT CD4 ⁺	28
DISCUSIÓN.	32
CONCLUSIONES.....	37
REFERENCIAS.....	39

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. MODELO DE LA CASCADA DE SEÑALIZACIÓN DE ERK1/2 ACTIVADA POR LA ESTIMULACIÓN DEL TCR Y EL POSIBLE ROL MODULADOR DE LOS RECEPTORES DE DOPAMINA EXPRESADOS EN LINFOCITOS T	12
FIGURA 2. LA DOPAMINA INHIBE LA FOSFORILACIÓN DE ERK1/2 DESENCADENADA POR UN ESTÍMULO POLICLONAL EN LINFOCITOS T	22
FIGURA 3. LA ESTIMULACIÓN SELECTIVA DEL RECEPTOR D3R DISMINUYE LA FOSFORILACIÓN DE ERK1/2 INDUCIDA POR LA ESTIMULACIÓN DEL TCR EN LINFOCITOS T CD4 ⁺ Y CD8 ⁺	25
FIGURA 4. LA DISMINUCIÓN DE LA FOSFORILACIÓN DE ERK1/2 INDUCIDA POR DOPAMINA REQUIERE DE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR D3R EN LINFOCITOS T CD4 ⁺ Y CD8 ⁺	27
FIGURA 5. LA FOSFORILACIÓN DE ERK1/2 INDUCIDA POR LA ESTIMULACIÓN DEL TCR REQUIERE DE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR D5R EN LINFOCITOS T CD4 ⁺ Y CD8 ⁺	29
FIGURA 6. LA ACTIVACIÓN EFICIENTE DE LINFOCITOS T CD4 ⁺ REQUIERE DEL RECEPTOR D5R	31
FIGURA 7. MODELO PROPUESTO: MODULACIÓN DE LA FOSFORILACIÓN DE ERK1/2 POR LOS RECEPTORES DE DOPAMINA D3R Y D5R	38

LISTA DE ABREVIATURAS.

5-HT:	Serotonina.
AC:	Adenilato ciclasa.
ACh:	Acetilcolina.
ACK:	Tampón de lisis de eritrocitos.
AP-1:	Proteína activadora 1 (factor de transcripción)
cAMP:	Adenosina monofosfato cíclico.
Csk:	C-terminal Src quinasa.
D3RKO:	<i>knock out</i> para el receptor D3R de dopamina.
D5RKO:	<i>knock out</i> para el receptor D5R de dopamina.
DA:	Dopamina.
DAG:	Diacilglicerol.
DAR:	Receptor de dopamina.
DC:	Célula dendrítica.
ERK1/2:	Quinasas reguladas por señales extracelulares 1 y 2.
Fyn:	Proteína tirosina quinasa Fyn.
Glu:	Glutamato.
HRP:	Peroxidasa de rábano.
IL-2:	Interleuquina 2.

IL-4:	Interleuquina 4.
IL-10:	Interleuquina 10.
IL-17:	Interleuquina 17.
IFN-γ:	Interferón γ .
IP3:	Inositol 1,4,5-trifosfato.
ITAM:	Motivo de activación de inmunorreceptores basado en tirosina.
JNK1/2:	Quinasas c-Jun N-terminal 1 y 2.
Lck:	Proteína tirosina quinasa específica de linfocitos.
LT:	Linfocito T.
MAPK:	Proteínas quinasas activadas por mitógenos.
MEK:	Quinasa de ERK.
MHC:	Complejo mayor de histocompatibilidad.
NA/A:	Noradrenalina/Adrenalina.
NFAT:	Factor nuclear de linfocitos T activados.
NFκB:	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.
p38:	Proteína quinasa activada por mitógenos p38.
PBS:	Tampón fosfato salino.
PD:	PD128907, agonista selectivo del receptor D3R de dopamina.

PIP2:	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato.
PKA:	Proteína quinasa A.
PKC:	Proteína quinasa C.
PLC:	Fosfolipasa C.
Raf:	Nombre dado a una familia de tres miembros de proteínas serina/treonina quinasa que participa en la cascada de señalización de ERK, acrónimo de <i>Rapidly Accelerated Fibrosarcoma</i> .
Ras:	Nombre dado a una familia de GTPasas pequeñas, correspondiente a una abreviación de "Rat sarcoma" donde fueron descritas originalmente.
Syk:	Tirosina quinasa derivada del bazo.
T20:	Tween 20, monolaureato de polioxietilensorbitan 20.
TBS:	Tampón Tris salino.
TCR:	Receptor de linfocito T.
Th1:	Linfocito T colaborador tipo 1.
TMB:	3, 3', 5, 5' tetrametil benzidina
TNFα:	Factor de necrosis tumoral α .
ZAP-70:	Proteína quinasa asociada a la cadena Z 70.

RESUMEN

La dopamina (DA) es un neurotransmisor implicado en diversos procesos del sistema nervioso, el cual promueve efectos celulares a través de la estimulación de receptores de DA (DARs) expresados en la superficie celular. Los DARs se acoplan a proteína G modulando la actividad adenilato-ciclasa y otras importantes vías de señalización, tales como las quinasas activadas por mitógenos (MAPKs). Además de su papel clave como mediador en el sistema nervioso, la DA ha sido también recientemente involucrada como inmunomodulador.

La activación de los linfocitos T (LT) se inicia por el reconocimiento del antígeno mediante el receptor de LT (TCR), lo cual desencadena la activación de diferentes vías de señalización, incluyendo la activación de MAPKs.

Recientemente se ha descrito la expresión de DARs en LT, los cuales al ser estimulados regulan importantes procesos en la respuesta linfocitaria, tales como la liberación de citoquinas, la polarización hacia el fenotipo efector y el *homing*. Dado la importancia de las MAPKs en la activación de LT, el objetivo de este seminario de título fue determinar cómo la fosforilación de ERK1/2 desencadenada por la estimulación del TCR sería modulada a través de la co-estimulación de los DARs expresados en LT.

Los resultados muestran que la estimulación del receptor de DA D3 (D3R), ya sea por DA 50 nM o por el agonista selectivo PD128907, disminuye de manera importante la fosforilación de ERK1/2 inducida por un estímulo policlonal tanto en LT CD4⁺ como CD8⁺.

Esto fue confirmado utilizando LT deficientes en el D3R, en los cuales no se observó una modulación de la activación de ERK1/2. Por otro lado, la estimulación simultánea de D3R y del receptor D5 de DA (D5R) por DA 500 nM, resultó en un restablecimiento de los niveles de fosforilación de ERK1/2 en LT CD4⁺, similares a los observados en la ausencia de DA. A la inversa, la inhibición de la fosforilación de ERK1/2 por DA 500 nM se mantuvo en LT CD8⁺. De manera interesante, y mediante el uso de LT deficientes en el D5R, se demostró que tanto LT CD4⁺ como LT CD8⁺ requieren de este receptor para inducir una fuerte fosforilación de ERK1/2 en respuesta a un estímulo policlonal. Sin embargo, sólo en LT CD4⁺ la expresión del D5R contribuye a la secreción de IL-2 inducida por la estimulación del TCR.

Por lo tanto, en este trabajo se concluye que los LT murinos poseen receptores D3R y D5R funcionales y que al ser estimulados pueden modular la activación de ERK1/2 desencadenada por el reconocimiento antigénico y consecuentemente regular la activación de LT CD4⁺.

ABSTRACT

Dopamine (DA) is a neurotransmitter involved in several processes in the nervous system. It promotes cellular effects by stimulating dopamine receptors (DARs), expressed on the cell surface. DARs are G protein-coupled membrane receptors, which often regulate adenylate cyclase activity as well as other important signaling pathways including Mitogen-activated protein kinases (MAPKs) cascades. Besides its key role as a mediator in the nervous system, DA has recently been implicated in immunomodulation.

T-cell activation is initiated by recognition of antigens by the T-cell receptor (TCR). This triggers the activation of several signaling pathways including MAPKs.

Recently it was published that DARs are expressed on T-cells where they regulate important cellular processes. The stimulation of these receptors regulates key processes in the lymphocyte response, such as cytokine release, polarization toward effector phenotypes and homing. Since MAPKs are very important in T-cell activation, the aim of this work was to determine if the phosphorylation of ERK1/2 generated by TCR stimulations is modulated through the co-stimulation of DARS expressed in T-cells.

The results show that the stimulation of dopamine receptor 3 (D3R) either with 50 nM DA or with the selective-D3R-agonist PD128907 significantly reduces ERK1/2-phosphorylation induced by anti-CD3 in both CD4⁺ and CD8⁺ T-cells. This result was confirmed by the lack of a change in ERK1/2 phosphorylation in D3R deficient T-cells. The simultaneous stimulation of D3R and dopamine receptor 5 (D5R) with 500 nM DA evoked a recovery of ERK1/2-phosphorylation levels in CD4⁺ T-cells similar to those observed by TCR-stimulation in the absence of DA. However, inhibition of ERK1/2-phosphorylation with 500 nM DA persisted in CD8⁺ T-cells. Interestingly, D5R was required to promote efficient

TCR-triggered ERK1/2-phosphorylation in both CD4⁺ and CD8⁺ T-cells because these effects were not seen in D5R knock out cells. Since MAPKs are a key component for T-cell activation, IL-2 secretion was determined in TCR-stimulated T-cells lacking D5R. Results indicate that the absence of D5R promotes a significant decrease in IL-2 release from CD4⁺ T-cells but does not affect IL-2 production in CD8⁺ T-cells.

This work concludes that murine T-cell expresses functional D3R and D5R and that upon stimulation they can modulate the activation of ERK1/2 triggered by antigen recognition. Consequently, signaling through these receptors can regulate CD4⁺ T-cell activation.

INTRODUCCIÓN

Los linfocitos T juegan un papel central en la respuesta inmune adaptativa

El sistema inmune tiene como función principal reconocer patógenos y células tumorales para después activar mecanismos efectores capaces de eliminar dichas amenazas. A su vez, el sistema inmune debe distinguir entre dichos agentes peligrosos y las células propias sanas, activando mecanismos de tolerancia que eviten respuestas autoinmunes. La coordinación de estos dos procesos requiere de una estricta regulación de distintos tipos de células inmunes, lo que asegura la mantención de la homeostasis en el organismo.

La respuesta inmune consta de dos componentes: la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa. Mientras la primera está determinada por una respuesta rápida, la inmunidad adaptativa se caracteriza por requerir mayor tiempo en desarrollarse a la vez que presenta una mayor especificidad frente a los agentes peligrosos.

Los linfocitos T (LT) juegan un papel clave en el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa, regulando la función de distintos tipos celulares y orquestando la participación de una serie de mecanismos efectores para finalmente llevar a cabo la eliminación de patógenos y de focos neoplásicos, o bien, para mantener la tolerancia a constituyentes propios.

Dos poblaciones de LT funcional y fenotípicamente diferentes han sido descritas según la expresión diferencial de los marcadores CD4 o CD8 en la superficie celular. Ambas poblaciones reconocen antígenos unidos a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), a través del receptor de célula T (TCR). La expresión del co-

receptor CD4 en la superficie de los LT restringe el reconocimiento de antígenos en moléculas MHC de clase II (MHC-II), mientras que la expresión del co-receptor CD8 determina el reconocimiento de complejos péptido-MHC-I (Nouri-Shirazi y cols., 2000). El reconocimiento del complejo antígeno-MHC por el LT, desencadena una serie de señales intracelulares que inducen en primer lugar la activación y posterior diferenciación de estas células. Debido al rol central que los LT tienen dirigiendo la respuesta inmune y en la mantención de la tolerancia, la activación de estas células es un proceso finamente regulado.

Regulación de la respuesta inmune por el sistema nervioso

Además de los mecanismos regulatorios clásicos de la respuesta inmune, diversos estudios han evidenciado en los últimos años que existe una comunicación entre el sistema nervioso (SN) y el sistema inmunológico. Hasta la fecha se han descrito tres maneras principales por las que el SN puede ejercer regulación sobre el sistema inmune: la primera es la vía neuroendocrina, en la cual, por acción del hipotálamo y la glándula pituitaria se liberan mediadores al plasma donde pueden actuar a distancia sobre células del sistema inmune. La segunda manera está determinada por la inervación directa de órganos linfoides por terminales del sistema nervioso autónomo. Estudios independientes han demostrado la existencia de inervación de órganos linfoides primarios y secundarios por el sistema nervioso simpático (SNS). Esta evidencia apunta a que células inmunes podrían ser expuestas a mediadores provenientes del SNS, tales como las catecolaminas, en los sitios de iniciación de la respuesta inmune adaptativa. Además, el hecho de que órganos linfoides secundarios sean inervados por el SNS sugiere que las catecolaminas liberadas tendrían el potencial de modular algunos procesos que se llevan a cabo en estos órganos, tales como la presentación antigénica a LT (Elenkov y cols., 2000). Una

tercera fuente de neurotransmisores como moduladores de la respuesta de LT sería el sistema nervioso central, el cual se ha visto que puede ser infiltrado por LT durante situaciones patológicas, tal como ocurre durante la enfermedad de Parkinson y la esclerosis múltiple (Pacheco y cols., 2009).

Otra evidencia importante de la interacción entre el sistema inmune y el SN es la presencia de receptores de neurotransmisores en la superficie de distintas células inmunes, sugiriendo que su función o diferenciación sería modulada por estas moléculas. En el caso de los LT se ha descrito la expresión de receptores gabaérgicos (Tian y cols., 2004) , serotoninérgicos (Leon-Ponte y cols., 2007), glutamatérgicos (Pacheco y cols., 2007), adrenérgicos (Elenkov y cols., 2000), colinérgicos (Kawashima & Fujii, 2000; 2003) y dopaminérgicos (Besser y cols., 2005; Watanabe y cols., 2006).

De manera adicional a la expresión de receptores de neurotransmisores en células inmunes, estudios recientes han demostrado que algunas de estas células son capaces de sintetizar, capturar y almacenar neurotransmisores en vesículas intracelulares para su posterior liberación (Pacheco y cols., 2009). Con respecto a esto, se ha descrito que las células dendríticas (DCs), especializadas en la presentación de antígenos y la activación de LT vírgenes, son capaces de liberar glutamato (Glu) (Pacheco y cols., 2006), serotonina (5-HT) (O'Connell y cols., 2006) y dopamina (DA) (Nakano y cols., 2009); mientras que en el caso de los LT, se ha descrito que pueden liberar acetilcolina (ACh), noradrenalina/adrenalina (NA/A), 5-HT y DA (Pacheco y cols., 2010). De esta forma, ciertos neurotransmisores podrían actuar sobre los LT de manera autocrina, o bien, podrían actuar de manera paracrina al ser liberados por DCs durante la presentación antigénica (Pacheco y cols., 2010). **Así, las células inmunes con capacidad de almacenar y liberar neurotransmisores constituyen una cuarta fuente de estas moléculas que podrían contribuir a la modulación de LT.**

La dopamina y sus receptores

A la fecha se han descrito cinco receptores de DA (DARs), denominados D1R-D5R. Los DARs corresponden a receptores de siete segmentos transmembrana acoplados a proteína G, los cuales según sus características farmacológicas, la homología de secuencia aminoacídica y las vías de señalización a las cuales se encuentran normalmente acoplados, se han agrupado en dos tipos: los DARs de tipo 1, que incluye a los receptores D1R y D5R; y los DARs de tipo 2, que comprende los receptores D2R, D3R y D4R. Los DARs de tipo 1 se acoplan generalmente a la subunidad estimuladora $G_{\alpha s}$, que induce la activación de la enzima adenilato ciclasa (AC) y en consecuencia un aumento en los niveles intracelulares de AMP cíclico (cAMP). Por el contrario, los receptores de tipo 2 se acoplan canónicamente a la subunidad inhibitoria $G_{\alpha i}$, inhibiendo la actividad de la proteína AC y disminuyendo los niveles de cAMP intracelular (Neve y cols., 2004; Strange, 2009). Sin embargo, la modulación de los niveles de cAMP a través de la AC no es la única vía de señalización a la que pueden acoplarse los DARs. Existen antecedentes que indican que la estimulación de los DARs también puede activar otras cascadas de señalización, dependiendo del tipo celular donde se expresan. Por ejemplo, el receptor D1R, generalmente acoplado a la proteína $G_{\alpha s}$, puede también acoplarse a la proteína $G_{\alpha q}$, activando de esta manera a la proteína fosfolipasa C (PLC) y desencadenando así una cascada de señalización independiente de los niveles de cAMP (Neve y cols., 2004).

Los DARs también difieren en su afinidad por DA. Utilizando ensayos de unión de ligando se han determinado las constantes de disociación (K_i) de los distintos DARs (Strange, 2009). Estos valores se encuentran resumidos en la siguiente tabla.

Tabla 1. Valores de las constantes de disociación por DA de los DARs.

Receptor	Constante de disociación (K_i)
D3R	27 nM
D5R	228 nM
D4R	450 nM
D2R	1705 nM
D1R	2340 nM

Las MAPKs ERK1 y ERK2

Las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK, *Mitogen-Activated Protein Kinases*) son una familia de quinasas altamente conservadas capaces de transmitir señales desencadenadas por la estimulación de proteínas de membrana a través del citoplasma hacia el núcleo en respuesta a un amplio rango de estímulos (Wada & Penninger, 2004). Tras activarse, las MAPKs pueden fosforilar residuos de serina o treonina en sus sustratos, regulando finalmente la expresión de genes implicados en diversos procesos celulares tales como, supervivencia, apoptosis, metabolismo, mitosis, movilidad y proliferación (Johnson & Lapadat, 2002). Debido a que responden a una amplia gama de estímulos y a la vez están involucradas en diversos procesos celulares, las MAPKs forman puntos de convergencia entre las distintas cascadas de señalización de las que forman parte, constituyendo un punto de integración de diversos estímulos para producir finalmente una respuesta adecuada.

Un tipo de MAPKs corresponde a las proteínas quinasas reguladas por señales extracelulares (ERKs, *Extracellular signal-Regulated Kinases*), las cuales incluyen a ERK1 y ERK2, entre otras proteínas. Las quinasas ERK1/2 se activan por las fosforilaciones de un residuo de treonina y uno de tirosina que se encuentran en el motivo "Thr-Glu-Tyr", las cuales son desencadenadas por varios factores de crecimiento u otros estímulos (Schramek, 2002). Una vez activadas por la di-fosforilación, las ERK1/2 se translocan hacia el núcleo donde fosforilan sus sustratos. Estas quinasas inducen la transición hacia el ciclo celular y están implicadas en procesos de proliferación, diferenciación, reorganización del citoesqueleto de actina y migración. (Johnson & Lapadat, 2002; Wada & Penninger, 2004)

Vías de señalización desencadenadas en LT por la estimulación del TCR

Como visión general respecto a las vías de transducción de señales desencadenadas por el reconocimiento del antígeno necesarias para la activación eficiente de LT, se sabe que están implicadas la activación de las vías de proteína quinasa C (PKC)/Ca²⁺ y de las MAPKs ERKs, p38 y quinasas c-Jun N-terminal (JNK), lo que resulta colectivamente en la activación de los factores de transcripción NFAT, NFκB y complejos AP-1.

Tras el reconocimiento del antígeno por los LT, la estimulación del TCR desencadena una cascada de señales que comienza con la fosforilación en tirosinas de dominios citoplasmáticos especializados denominados ITAM (*Immuno-receptor tyrosine-based activation motifs* o Motivo de activación de inmunorreceptores basado en tirosina) los cuales se encuentran ubicados en algunas subunidades del TCR, incluyendo las cadenas ζ, γ, δ y ε. Estas fosforilaciones son mediadas por las tirosina quinasas Lck y Fyn;

promueven el reclutamiento y activación de otras tirosina quinasas, denominadas ZAP-70 y Syk, hacia los ITAM del TCR. La activación de ZAP-70/Syk junto a Lck/Fyn promueve la fosforilación de sustratos río abajo, incluyendo a PLC γ 1. Esta última, a través de la hidrólisis de PIP2, genera IP3 y diacilglicerol (DAG). Mientras DAG promueve la actividad de la PKC, IP3 aumenta los niveles de calcio intracelular, contribuyendo así también a la activación de PKC. Esta quinasa a su vez activa a la proteína Ras que activa subsecuentemente a la quinasa Raf. Raf activada fosforila a las quinasas MEK1/2 que, una vez activadas, fosforilan y activan a las MAPKs ERK1/2 (Figura 1) (Whitehurst & Geppert, 1996; Finco y cols., 1998; Ramstad y cols., 2000). Finalmente, la activación de ERK1/2 conduce a la activación del factor de transcripción AP-1 (Ramstad y cols., 2000), el cual es necesario para la eficiente activación de LT.

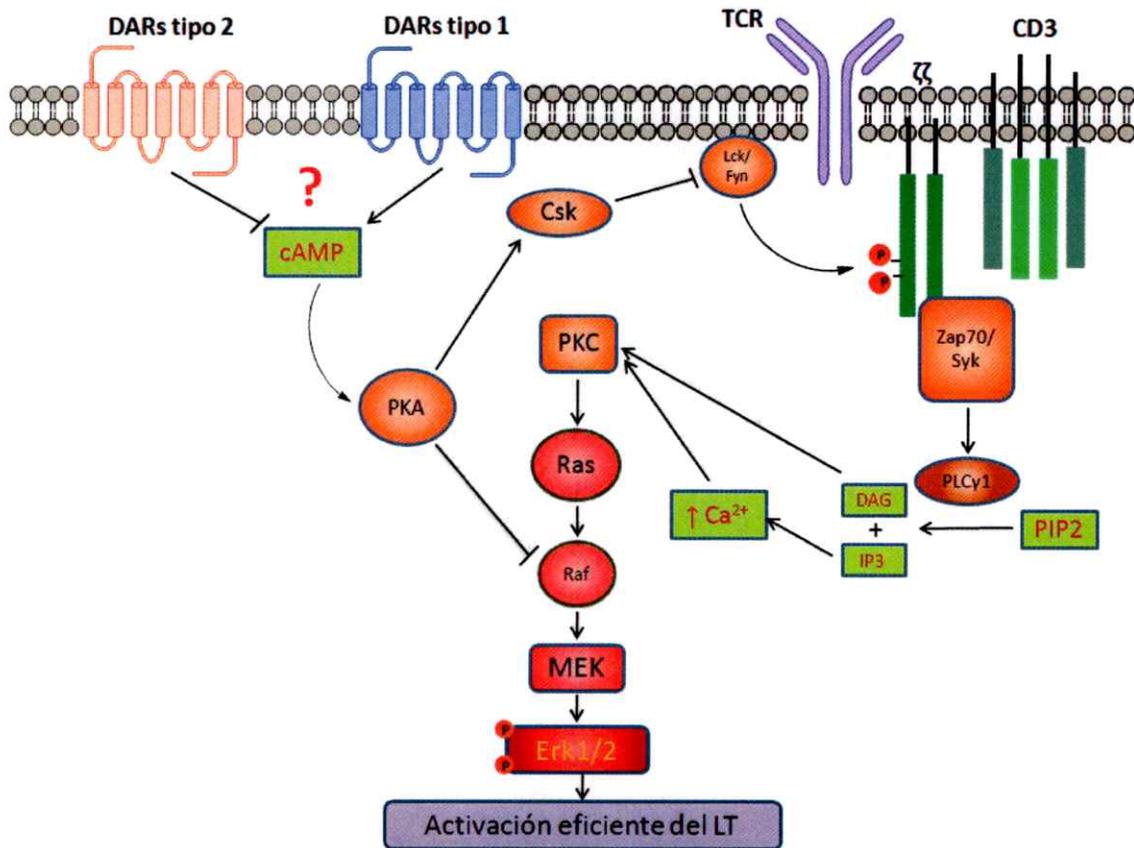


Figura 1. Modelo de la cascada de señalización de ERK1/2 activada por la estimulación del TCR y el posible rol modulador de los DARs expresados en LT. El reconocimiento del antígeno por el complejo TCR/CD3 desencadena la fosforilación de los dominios ITAM, lo que permite el reclutamiento de ZAP70 y con eso la activación de la PLCγ1. El DAG producido por la acción enzimática de PLCγ1, junto con la liberación de Ca²⁺ desde el retículo endoplásmico inducido por IP3, activan a la PKC para finalmente activar la cascada de señalización de las MAPKs ERK1/2. Se muestra además los dos tipos de DARs y su efecto putativo en la producción de cAMP. El aumento en cAMP activa a la PKA, incrementando la actividad de Csk la cual disminuye la señalización temprana en la activación del LT. Por otro lado, PKA también puede regular negativamente la actividad de Raf.

La DA como modulador de la respuesta de LT

Con respecto al papel modulador que la DA ejerce sobre la función de LT, se ha descrito que este neurotransmisor, a través del receptor D3 (D3R) expresado en LT CD8⁺ humanos y murinos, es capaz de inducir una respuesta quimiotáctica promoviendo también su adhesión. Por el contrario, el uso de antagonistas del D3R reducen el *homing* de LT CD8⁺ vírgenes (Watanabe y cols., 2006). La liberación de citoquinas por LT también se ve modulada por DA. Algunos estudios han mostrado un aumento en la liberación de TNF α e IL-10 por LT humanos al ser tratados con DA. Mediante el uso de agonistas y antagonistas, se ha determinado que los receptores involucrados en este proceso corresponden a D3R y D2R, respectivamente. Además, se ha demostrado que los receptores de tipo 1 (D1R/D5R) participan en ambos procesos, sugiriendo una regulación compleja mediada por DA sobre la producción de las diferentes citoquinas (Besser y cols., 2005). Al evaluar la producción de citoquinas por LT CD4⁺, se ha observado que mediante la estimulación de D2R y D3R, la DA inhibe la liberación de IL-2, IL-4 e IFN- γ (Ghosh y cols., 2003). De manera importante, hay evidencias que apuntan a que la estimulación del D3R en LT CD4⁺ contribuiría a la producción de citoquinas de tipo Th1 (Ilani y cols., 2004). Además, se ha descrito que la estimulación de LT CD4⁺ con DA aumenta los niveles de cAMP a través de los receptores de tipo 1 favoreciendo la producción de IL-17 (Nakano y cols., 2011). Por otra parte, se ha observado que la estimulación del D4R, a través de la inhibición de la fosforilación de ERK1/2, disminuye la proliferación de LT (Sarkar y cols., 2006). Aún cuando existe evidencia funcional de la modulación de LT por DA, no está claro cuáles son las vías de señalización intracelular que desencadena la estimulación de cada uno de los DARs expresados en estas células.

Referente a las vías de señalización que podrían ser moduladas por la estimulación de DARs en LT, se ha descrito que el cAMP, por medio de la activación de la proteína quinasa A (PKA), puede regular negativamente la activación de LT por inhibición de la activación de las ERKs (Ramstad y cols., 2000) y de las JNKs (Harada & Sugimoto, 1999), activando la proteína C-terminal Src quinasa (Csk) (Vang y cols., 2001) y bloqueando la activación del factor de transcripción NF- κ B (Jimenez y cols., 2001; Hershfield, 2005). Específicamente, en la vía que requiere la activación de ERK1/2, PKA puede modular esta activación de dos formas. Por una parte PKA puede fosforilar a Csk aumentando su actividad inhibitoria sobre Lck y Fyn. La inhibición de las quinasas Lck y Fyn a su vez evita la fosforilación de los ITAMs asociados a CD3 y por lo tanto, la generación de las señales posteriores a la estimulación del complejo TCR (Vang y cols., 2001). Por otra parte, PKA puede directamente fosforilar a Raf-1, inhibiendo así su función posterior, que involucra la fosforilación y activación de ERK1/2 (Ramstad y cols., 2000). En resumen, el aumento de los niveles de cAMP en LT conlleva a una disminución de la fosforilación de las ERKs y consecuentemente a una atenuación de la activación celular. Por lo tanto, es posible que a través de la regulación de la actividad de la AC, los DARs sean capaces de modular la activación de las quinasas ERKs desencadenada por la estimulación del TCR.

Los DARs también podrían modular la actividad de estas MAPK a través de mecanismos independientes de cAMP como por ejemplo, la activación de ERK1/2 a través de la liberación del heterodímero G β γ posterior a la estimulación de la proteína G α (Faure y cols., 1994; Neve y cols., 2004).

Hipótesis y objetivos

En base a los antecedentes previamente mencionados, la hipótesis planteada en este seminario de título propone que **la estimulación de los receptores de dopamina expresados en linfocitos T modularía la fosforilación de las MAPKs ERK1/2 en estas células.**

Para evaluar la hipótesis anterior se plantearon los siguientes objetivos:

- Determinar los niveles de fosforilación de ERK1/2 en LT CD4⁺ y CD8⁺ estimulados con concentraciones crecientes de dopamina, tanto en presencia como en ausencia de estimulación del TCR.
- Determinar la fosforilación de ERK1/2 en LT CD4⁺ y CD8⁺ estimulando selectivamente a D3R o D5R, tanto en presencia como en ausencia de estimulación del TCR.
- Comparar la fosforilación de ERK1/2 en respuesta a DA o agonistas selectivos, en LT CD4⁺ y CD8⁺ provenientes de ratones deficientes en D3R o en D5R con respecto a ratones normales.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Purificación de LT

Se extrajo el bazo de ratones de entre 10 y 14 semanas de edad, de la cepa C57BL/6J con genotipo "wild type" (WT) o "knockout" (KO) para D3R (D3RKO) o D5R (D5RKO). Los bazos se perfundieron con PBS (Na_2HPO_4 8,1 μM , KH_2PO_4 1,47 μM , NaCl 64,2 mM, KCl 2,68 mM) y posteriormente las células obtenidas se trataron con ACK (NH_4Cl 170 mM; KHCO_3 10 mM; EDTA 0,1 mM disódico; pH 7.2) para lisar los eritrocitos. Los LT CD4^+ se purificaron por selección negativa utilizando el kit de purificación de *CD4⁺ T Cell Isolation Kit II, mouse* MACS (Miltenyi Biotec, Alemania) siguiendo las indicaciones del fabricante. Para la purificación de LT CD8^+ por selección negativa se utilizó el kit de purificación *CD8a⁺ T Cell Isolation Kit II, mouse* MACS (Miltenyi Biotec, Alemania).

Los LT CD4^+ o CD8^+ se mantuvieron a 37°C en medio RPMI-1640 suplementado con L-Glutamina 2.05 mM (Thermo Scientific, Utah, Estados Unidos), piruvato de sodio 1 mM, aminoácidos no esenciales 0.1 mM, penicilina-estreptomicina 1 U/mL; 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y gentamicina 0.1 mg/mL (todos obtenidos desde Gibco, Nueva York, Estados Unidos).

Estimulación de LT con DA y agonistas de DARs

Los LT CD4^+ y LT CD8^+ purificados se estimularon con concentraciones crecientes de DA (Sigma Aldrich, Estados Unidos) y de PD128907 –agonista selectivo para el D3R- (Tocris Bioscience, Estados Unidos) por 5 minutos a 37°C. La estimulación con DA o PD128907 se realizó en presencia o ausencia de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ del anticuerpo anti-CD3 ϵ de ratón desarrollado en hámster (BD Pharmigen, Estados Unidos) para inducir la estimulación del TCR. La incubación se detuvo con tampón de lisis frío como se describe en la siguiente sección.

Fosforilación de ERK

Para analizar el estado de fosforilación de ERK1/2, los LT se trataron con tampón de lisis (Tris/HCl 50mM pH 6.8, SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,01%) en conjunto con un cóctel de inhibidores de proteasas e inhibidores de fosfatasa (ambos de Roche, Alemania) e incubadas en frío por 30 minutos. Después de centrifugar los lisados celulares a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C, el sedimento insoluble se descartó mientras que el extracto de proteína soluble se cuantificó con el método del ácido bicinconínico (BCA, Thermo Scientific, Estados Unidos). Posteriormente, 30 µg de proteína soluble se separaron por SDS-PAGE y transferidas a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF, de Thermo Scientific, Estados Unidos). Las membranas transferidas se bloquearon con BSA 3% en TBS (Tris 25 mM, NaCl 150 mM, KCl 2 mM pH 7.4)-Tween-20 0,1% (TBS-T20) por 2 horas. Para la detección de la fosforilación de ERK1/2 las membranas se incubaron con un anticuerpo monoclonal de ratón específico para el epítipo difosforilado de ERK1/2 (*Monoclonal mouse Anti-Diphosphorylated ERK1/2 MAP kinase*, Sigma Aldrich, Estados Unidos) a una dilución de 1:1.000 en una solución de BSA 3% en TBS-T20 por toda la noche a 4°C. Las membranas se lavaron tres veces con TBS-T20 y luego incubadas con el anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de ratón conjugado con la enzima peroxidasa de rábano diluido 1:5.000 (*goat anti-mouse IgG HRP*, Rockland, Estados Unidos) en una solución de BSA 3% en TBS-T20 durante 1 hora a temperatura ambiente. La inmunodetección se realizó con el sustrato *SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate* (Pierce, Estados Unidos). Posteriormente las membranas se trataron con NaOH 200 mM para eliminar los anticuerpos unidos, lavadas con TBS-T20, nuevamente bloqueadas e incubadas con el anticuerpo policlonal de conejo específico para ERK1/2 total (*rabbit Anti-ERK-1 & ERK-2*, de Sigma Aldrich) diluido 1:10.000 durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego de lavar tres veces con TBS-T20, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de conejo

conjugado a peroxidasa de rábano diluido a 1:5.000 (*goat anti-rabbit IgG*, Rockland, Estados Unidos) durante 1 hora a temperatura ambiente. Este último marcaje de ERK1/2 totales se realizó como un control de carga.

Determinación de los niveles de IL-2 mediante ELISA

Para evaluar la activación de LT, placas *Nunclon MicroWell* de 96 pocillos (Nunc, Estados Unidos) se trataron con 0,5 µg/ml de anti-CD3ε más 0,5 µg/ml de anti-CD28 de ratón (BD Pharmigen, Estados Unidos) diluidos en PBS por toda la noche a 4°C y luego se lavaron tres veces con PBS. LT CD4⁺ o LT CD8⁺ purificados (2x10⁵/pocillo) se incubaron en las placas previamente tratadas con anti-CD3ε y anti-CD28. Luego de 24 horas de incubación a 37°C, se recuperó el sobrenadante de los cultivos y los niveles de IL-2 se midieron mediante un ensayo de ELISA. Brevemente, placas *MaxiSorp* de 96 pocillos (Nunc, Estados Unidos) se trataron con 1 µg/ml de anticuerpo específico para IL-2 de ratón (*purified rat anti-mouse IL-2*, BD Pharmigen, Estados Unidos) diluido en PBS por 1 hora a 37°C. Las placas se bloquearon con BSA 3% en PBS por 2 horas a temperatura ambiente y se lavaron una vez con PBS-T20 0,02% y posteriormente una vez con PBS. Los sobrenadantes recuperados de los cultivos se incubaron por 12 horas a 4°C. Luego de lavar como se describió previamente, las placas fueron incubadas con 0,5 µg/ml de anticuerpo específico para IL-2 de ratón biotinilado (*Biotin rat anti-mouse IL-2*, BD Pharmigen, Estados Unidos) diluido en PBS-BSA 1% por 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, las placas se lavaron y finalmente se incubaron con estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano (*Streptavidin-HRP*, BD Pharmigen, Estados Unidos) diluida en PBS-BSA 1% a una concentración de 1:1.500 por 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar, se añadió el sustrato (Buffer Citrato-fosfato 0,1 M pH 6, TMB 100 µg/mL, H₂O₂) y se incubó hasta la aparición de señal. La reacción fue detenida con

H₂SO₄ 2 M. La lectura se realizó en lector de placa (Synergy 4, Biotek, Estados Unidos) a una longitud de onda de 450 nm.

Como estándar para la cuantificación se utilizó IL-2 recombinante de ratón (BD Pharmigen, Estado Unidos).

RESULTADOS.

La DA modula la activación de ERKs en LT CD4⁺ y CD8⁺ en respuesta a un estímulo policlonal.

Con el objetivo de estandarizar las condiciones de estimulación de LT que permitan detectar la fosforilación de ERKs mediante *western blot*, en primer lugar se evaluaron diferentes tiempos de estímulo y distintas concentraciones de anti-CD3 ϵ . En base a esto se determinó que la estimulación de LT, tanto CD4⁺ como CD8⁺, con 1 μ g/ml de anti-CD3 ϵ durante 5 minutos produce un nivel de fosforilación intermedio de las quinasas, lo que permitiría evaluar su modulación positiva o negativa en respuesta a co-estimulación de los DARs (datos no mostrados).

A continuación, se evaluó si la estimulación de los DARs presentes en LT purificados modula los niveles basales de fosforilación de ERKs o los niveles de fosforilación de estas quinasas inducidos en respuesta a la estimulación del TCR. Para esto, los LT fueron incubados con concentraciones crecientes de DA en presencia o ausencia de anti-CD3 ϵ en las condiciones mencionadas anteriormente. En ausencia de estimulación con anti-CD3 ϵ la dopamina no fue capaz de inducir la fosforilación de ERK1/2 en LT CD4⁺ y CD8⁺ en el rango de concentraciones evaluado (Figura 2). En presencia de anti-CD3 ϵ la estimulación con DA 50 nM (Figura 2-A) y DA 5 μ M (Figura 2-C) produjo cambios en la fosforilación de ERK1/2 en LT CD4⁺, resultando en una importante disminución comparado al control. De manera interesante, en LT CD8⁺ se observó una marcada disminución en la fosforilación de ERK1/2 al co-estimar con DA 50 y 500 nM, comparado con el control estimulado con anti-CD3 ϵ en ausencia de DA. Por otra parte, no se observaron diferencias en la fosforilación de ERK1/2 en LT CD8⁺ al co-estimar con

DA 5 nM (Figura 2-B) y en el caso de DA 5 μ M los niveles de fosforilación fueron levemente menores comparado con el control (Figura 2-D).

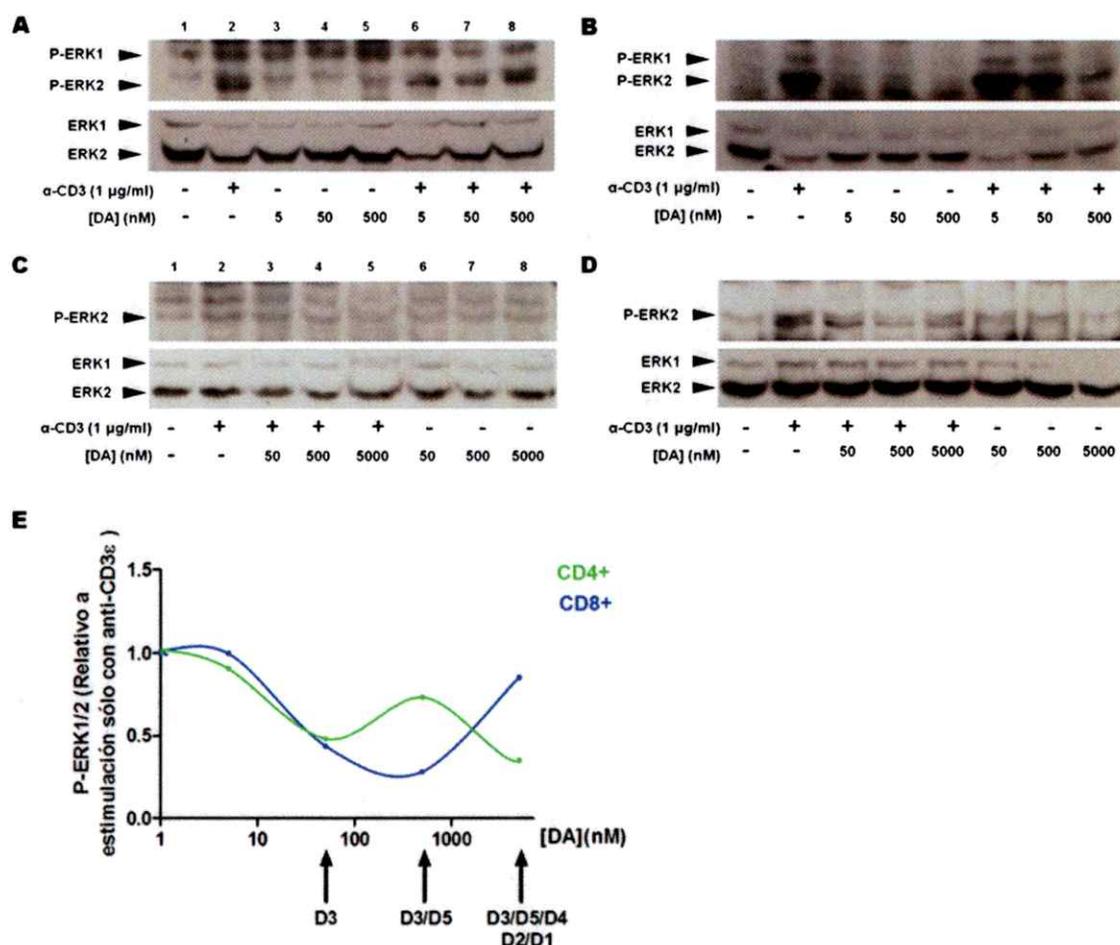


Figura 2. La DA inhibe la fosforilación de ERK1/2 desencadenada por un estímulo policlonal en LT. LT purificados por selección negativa se mantuvieron sin estímulo (carril 1), estimulados con 1 μg/ml de anti-CD3ε (carril 2), estimulados sólo con DA a las concentraciones indicadas (carriles 3-5) o co-estimulados con 1 μg/ml de anti-CD3ε y DA a las concentraciones indicadas (carriles 6-8) durante 5 minutos a 37°C. Posteriormente, se lisaron las células y se determinaron los niveles de fosforilación de ERK1/2 en LT CD4⁺ (**A**), LT CD8⁺ (**B**), LT CD4⁺ (**C**) y LT CD8⁺ (**D**). Se muestra una imagen representativa de 3 experimentos independientes. (**E**) Esquema de la modulación de la fosforilación de ERK1/2 desencadenada por la estimulación policlonal de LT CD4⁺ (verde) y CD8⁺ (azul) en presencia de concentraciones crecientes de DA. Las flechas indican los DARs estimulados a las diferentes concentraciones de DA utilizadas. La cuantificación relativa de la fosforilación de ERK1/2 (P-ERK1/2) se obtuvo en base a la normalización de cada tratamiento respecto al control positivo (estimulado sólo con anti-CD3ε) a partir de 8 experimentos independientes.

En base a estos resultados se realizó un esquema representativo de la modulación de la fosforilación de ERK1/2 por DA en respuesta a un estímulo de activación policlonal (Figura 2-C), indicando los receptores que estarían siendo estimulados según las distintas concentraciones de DA utilizadas (Strange, 2009).

Los resultados obtenidos indican que la DA, a una concentración de 50 nM, inhibe la fosforilación de ERK1/2 inducida por la estimulación del TCR en LT CD4⁺. Considerando que el único receptor estimulado por DA a esta concentración sería el D3R (Tabla 1), este resultado sugiere que este receptor estaría implicado en la disminución de la fosforilación de ERK1/2 inducida por la estimulación del TCR. Adicionalmente, los resultados muestran que al co-estimular LT CD4⁺ con DA a una concentración de 500 nM se restablecen parcialmente los niveles de fosforilación de ERK1/2, siendo comparables al control estimulado con anti-CD3 ϵ en ausencia de DA. Tomando en cuenta que a esta concentración de DA tanto el D3R como el D5R estarían siendo estimulados (Tabla 1), estos datos sugieren que el D5R actuaría de manera opuesta al D3R, favoreciendo la activación de las ERKs. Por el contrario, tal como se esquematiza en la figura 2C, al evaluar la fosforilación de ERK1/2 inducida por la co-estimulación con DA 5 μ M y anti-CD3 ϵ , se observó una disminución con respecto al control sin DA; por lo tanto, la estimulación de todos los DARs restantes (Tabla 1) promueve finalmente una regulación negativa de esta cascada de señalización (Figura 2-C).

En el caso de LT CD8⁺, los resultados obtenidos muestran que la DA disminuye la fosforilación de ERK1/2 inducida por la estimulación del TCR tanto a 50 nM como a 500 nM, lo que sugiere que en estas células la acción del D3R no es contrarrestada por el D5R. A concentraciones mayores, los niveles de fosforilación son muy similares a los observados en el control positivo, lo cual sugiere que a 5 μ M los restantes DARs actuarían de manera opuesta al D3R en LT CD8⁺ (Figura 2-D).

La estimulación selectiva del D3R disminuye la activación de ERK1/2 en LT CD4⁺ y CD8⁺.

La disminución en la fosforilación de ERK1/2 inducida por DA 50 nM en ambas poblaciones de LT sugiere que este efecto podría estar mediado por la estimulación del D3R. Para evaluar lo anterior, LT CD4⁺ y CD8⁺ se estimularon con un agonista selectivo para D3R, PD128907 (PD) en presencia y ausencia de anti-CD3 ϵ para posteriormente determinar la fosforilación de ERK1/2.

De manera similar a los resultados obtenidos con la estimulación por DA 50 nM en ausencia de anti-CD3 ϵ , la estimulación con PD sin un estímulo policlonal no produjo cambios en la fosforilación de ERK1/2 comparado con el control (Figura 3). Estos resultados confirman que la estimulación del D3R no es capaz de modular la fosforilación basal de las quinasas ERKs, tanto en LT CD4⁺ como en LT CD8⁺ en ausencia de otros estímulos.

Al evaluar el efecto del agonista selectivo para D3R en conjunto con la estimulación del TCR, se observó que PD 50 nM disminuye casi totalmente la fosforilación de las ERKs en LT CD4⁺ comparado con el control positivo (Figura 3-A). De manera similar, la estimulación selectiva del D3R (25 y 50 nM) en presencia de la estimulación del TCR en LT CD8⁺ produjo una disminución de la fosforilación respecto al control positivo (Figura 3-B). Estos resultados sugieren que tanto en LT CD4⁺ como CD8⁺ la disminución en la fosforilación de ERKs inducida por anti-CD3 ϵ estaría mediada por el D3R.

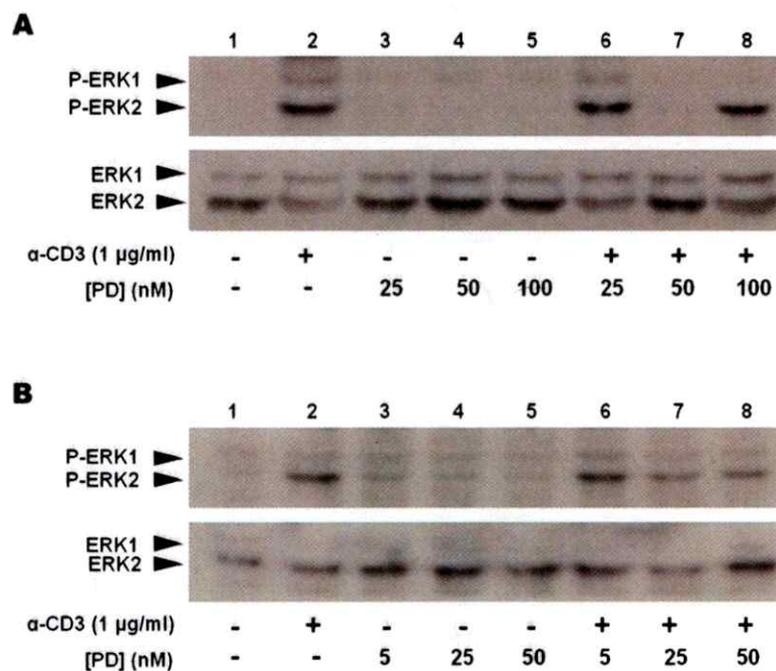


Figura 3. La estimulación selectiva del D3R disminuye la fosforilación de ERK1/2 inducida por la estimulación del TCR en LT CD4⁺ y CD8⁺. LT purificados por selección negativa se mantuvieron sin estímulo (carril 1), estimulados con 1 μ g/ml de anti-CD3 ϵ (carril 2) estimulados sólo con el agonista PD 128907 (PD) a las concentraciones indicadas (carriles 3-5) o co-estimulados con 1 μ g/ml de anti-CD3 ϵ y el agonista PD a las concentraciones indicadas (carriles 6-8), durante 5 minutos a 37°C. Posteriormente, las células se lisaron y los niveles de fosforilación de ERK1/2 se determinaron en LT CD4⁺ (**A**) y CD8⁺ (**B**). Se muestran imágenes representativas de 2 experimentos independientes en cada caso.

Con el objetivo de confirmar las evidencias farmacológicas obtenidas con una aproximación genética, se realizaron experimentos similares utilizando LT CD4⁺ y CD8⁺ provenientes de ratones deficientes en el D3R (D3RKO).

De manera similar a los resultados mostrados anteriormente, PD atenuó la fosforilación de ERK1/2 inducida por anti-CD3ε tanto en LT CD4⁺ y CD8⁺ provenientes de ratones normales (*wild-type*, WT) comparado con el control positivo respectivo. (Figura 4-A y 4-B; carriles 2 y 6). Por el contrario, la estimulación de LT CD4⁺ y CD8⁺ D3RKO con PD no afectó la fosforilación de ERK1/2 comparado con el control positivo (Figura 4-A y 4-B, carriles 4 y 8). Estos resultados muestran que la disminución en la activación de ERKs mediada por PD en LT CD4⁺ y CD8⁺ requiere de la expresión del D3R en estas células. Además, confirman que la señalización desencadenada por la estimulación del D3R modula la activación de las quinasas ERK1/2 inducida por la estimulación del TCR.

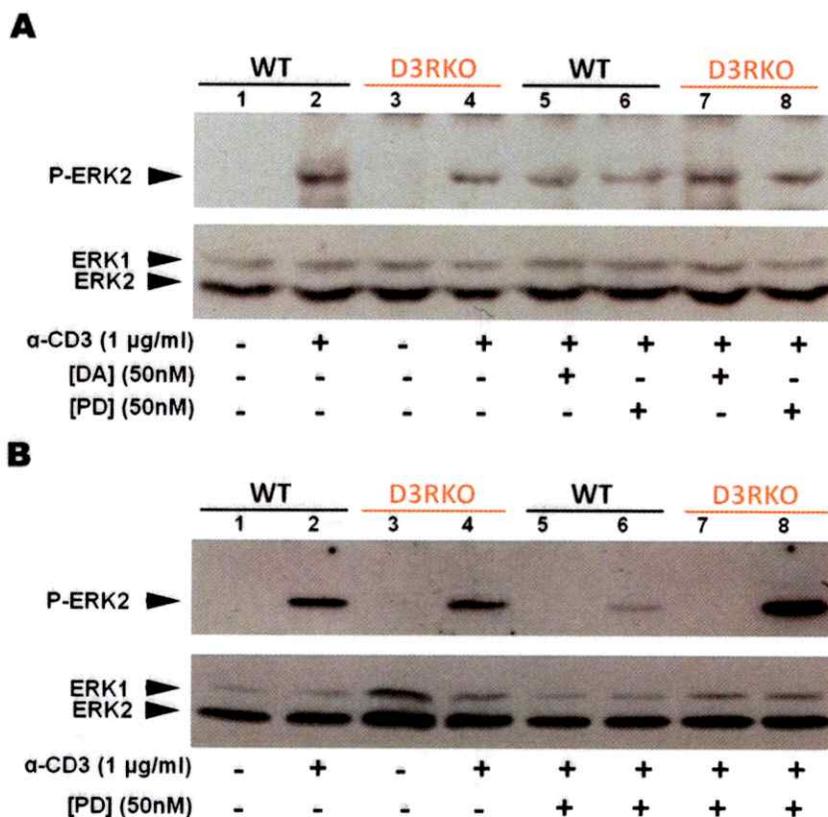


Figura 4. La disminución de la fosforilación de ERK1/2 inducida por DA requiere de la expresión del D3R en LT CD4⁺ y CD8⁺. (A) LT CD4⁺ purificados de ratones WT (negro, carriles 1, 2, 5 y 6) o D3RKO (naranja, carriles 3, 4, 7 y 8) se mantuvieron sin estímulo (carriles 1 y 3), estimulados con 1 μ g/ml de anti-CD3 ϵ (carriles 2 y 4), co-estimulados con 1 μ g/ml de anti-CD3 ϵ y 50 nM de DA (carriles 5 y 7) o co-estimulados con 1 μ g/ml de anti-CD3 ϵ y 50 nM de PD 128907 (PD) (carriles 6 y 8) durante 5 minutos a 37°C. Posteriormente, las células se lisaron y se determinaron los niveles de fosforilación de ERK1/2 en LT CD4⁺ mediante *western blot*. (B) LT CD8⁺ purificados de ratones WT (negro, carriles 1, 2, 5 y 6) o D3RKO (naranja, carriles 3, 4, 7 y 8) se mantuvieron sin estímulo (carriles 1 y 3), estimulados con 1 μ g/ml de anti-CD3 ϵ (carriles 2 y 4), estimulados con 50 nM de PD 128907 (PD) (carriles 5 y 7) o co-estimulados con 1 μ g/ml de anti-CD3 ϵ y 50 nM de PD 128907 (carriles 6 y 8) durante 5 minutos a 37°C. Posteriormente, las células se lisaron y los niveles de fosforilación de ERK1/2 se determinaron mediante *western blot*. Se muestran imágenes representativas de 2 experimentos independientes en cada caso.

La fosforilación de ERK1/2 y la secreción de IL-2 en respuesta a un estímulo policlonal requieren la expresión del D5R en LT CD4⁺.

La co-estimulación de LT CD4⁺ con DA a una concentración de 500 nM en presencia de anti-CD3 ϵ resultó en un nivel de fosforilación de ERK1/2 mayor que el observado a DA 50nM (Figura 2-A), lo que sugiere que la estimulación del D5R anularía la inhibición promovida por el D3R, mediante un aumento de la activación de las ERKs. En base a lo anterior, la aproximación farmacológica ideal sería evaluar el efecto de la estimulación del D5R mediante un agonista selectivo, sin embargo, las herramientas farmacológicas actualmente disponibles no permiten distinguir entre la estimulación del receptor D5R y D1R. Por esto, se utilizaron LT CD4⁺ provenientes de ratones WT o D5RKO. A diferencia de lo observado en LT CD4⁺ WT, donde la estimulación con anti-CD3 ϵ promueve un claro aumento de la fosforilación de ERK1/2, la estimulación con 1 μ g/ml de anti-CD3 ϵ no induce niveles detectables de fosforilación de las ERK1/2 en LT CD4⁺ D5RKO (Figura 5-A, carriles 3 y 4) e induce un pobre aumento en LT CD8⁺ D5RKO (Figura 5-B, carriles 3 y 4). En conjunto, estos resultados sugieren que el D5R contribuye de manera importante en el proceso de señalización inducido por la estimulación del TCR en LT tanto CD4⁺ como CD8⁺.

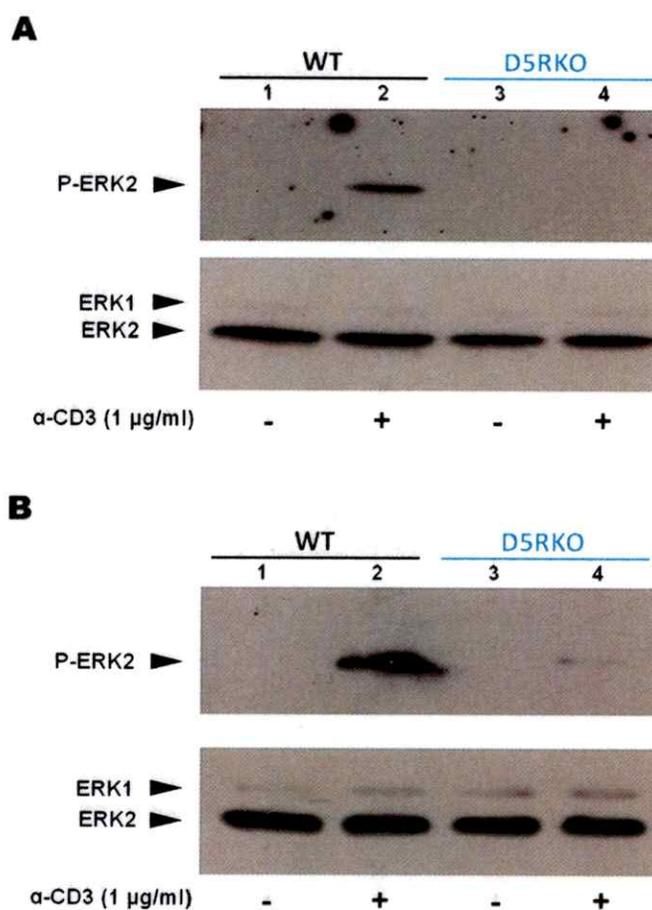


Figura 5. La fosforilación de ERK1/2 inducida por la estimulación del TCR requiere de la expresión del D5R en LT CD4⁺ y CD8⁺. LT purificados de ratones WT (negro, carriles 1 y 2) o D5RKO (celeste, carriles 3 y 4) se mantuvieron sin estímulo (carriles 1 y 3) o se estimularon con 1 μ g/ml de anti-CD3 ϵ (carriles 2 y 4) por 5 minutos a 37°C. Posteriormente, las células se lisaron y los niveles de fosforilación de ERK1/2 se determinaron en LT CD4⁺ (**A**) y CD8⁺ (**B**). Se muestran imágenes representativas de 3 y 6 experimentos independientes, respectivamente.

Considerando los resultados anteriores y la importancia de la vía de señalización de las ERKs en la activación de LT, a continuación se evaluó la liberación de IL-2, un marcador clásico de activación temprana, por parte de LT normales o deficientes en el D5R.

Como se observa en la Figura 6, en ausencia de estimulación policlonal no hay diferencias en la liberación de IL-2 entre LT WT y D5RKO, tanto CD4⁺ (Figura 6-A) como CD8⁺ (Figura 6-B). Sin embargo, al comparar la secreción de IL-2 por LT estimulados durante 24 horas con anti-CD3 ϵ , se observó que los LT CD4⁺ D5RKO liberan significativamente menos IL-2 en comparación con LT CD4⁺ WT (Figura 6-A). A diferencia de los LT CD4⁺, no se observaron diferencias significativas en la secreción de IL-2 entre LT CD8⁺ WT y D5RKO (Figura 6B). Estos resultados sugieren que los LT CD4⁺ requieren de la expresión de D5R para lograr una activación eficiente en respuesta a estimulación del TCR. En conjunto, estos resultados indican que si bien ambas poblaciones requieren del D5R para la activación eficiente de las ERK1/2 en respuesta a la estimulación del TCR, sólo en los LT CD4⁺ se observa una correlación funcional entre la activación de estas MAPKs y la liberación de IL-2.

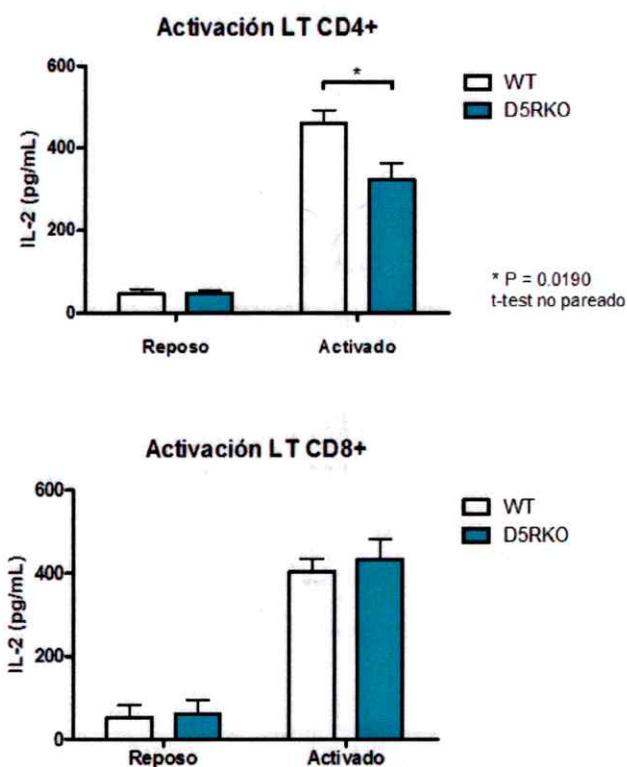


Figura 6. La activación eficiente de LT CD4⁺ requiere del D5R. LT purificados de ratones WT (barras blancas) o D5RKO (barras celestes) se estimularon con 0,5 μ g/ml de anti-CD3 ϵ (Activado) o incubaron sólo con medio (reposo) por 24 horas. A continuación, la secreción de IL-2 secretada al medio de cultivo por LT CD4⁺ (A) y CD8⁺ (B) se determinó por ELISA. Datos correspondientes a 4 experimentos independientes. *, $p < 0.05$, según el test *t* de student no pareado de dos colas.

DISCUSIÓN.

Estudios recientes señalan que los neurotransmisores tendrían un rol regulador de la activación de LT y por ende de la iniciación de la respuesta inmune. De acuerdo con esto, nuestros resultados indican que la DA, a través de los D3R y D5R expresados en LT CD4⁺ y CD8⁺, es capaz de modular la activación de las MAPKs ERK1/2 inducida por la estimulación del TCR, contribuyendo de manera diferencial en el proceso de activación de LT.

Los resultados obtenidos aquí muestran que la estimulación con DA 50 nM disminuye la fosforilación de las ERK1/2 inducida por la estimulación del TCR en LT CD4⁺. De acuerdo a las constantes de afinidad de los distintos DARs por DA (Strange, 2009), a dicha concentración se estimularía exclusivamente el D3R (Tabla 1). Los resultados obtenidos con PD, el agonista selectivo para D3R (Figura 3-A), y LT CD4⁺ D3RKO (Figura 4-A), corroboraron que la estimulación selectiva de este receptor es responsable de la disminución en la fosforilación de las ERKs observada en presencia de DA 50 nM. Esta evidencia indica que los LT CD4⁺ de ratón expresan el D3R funcional, el cual actúa disminuyendo la activación de ERKs inducida por la estimulación del TCR. Sin embargo, considerando que la disminución en los niveles de cAMP intracelular se correlaciona con una mayor activación de MAPKs (Ramstad y cols., 2000) (ver figura 1), estos resultados sugieren que el D3R expresado en LT CD4⁺ no estaría acoplado a la inhibición de la AC como se ha descrito generalmente en neuronas. De esta manera, la disminución en la activación de las MAPKs ERK1/2 puede ser el resultado de un acoplamiento no canónico del D3R a la subunidad G α_s y el consecuente aumento en los niveles de cAMP

intracelular. La validación experimental de esta hipótesis requeriría evaluar los niveles de cAMP intracelular y también determinar la contribución de la subunidad $\beta\gamma$ (vía activación de canales iónicos o PLC) en la fosforilación de ERK1/2 en LT CD4⁺ estimulados por DA 50 nM o por el agonista selectivo PD.

De manera interesante, cuando los LT CD4⁺ fueron expuestos a concentraciones mayores de DA (500nM) se observó una recuperación parcial de la fosforilación de ERK1/2 en respuesta a un estímulo policlonal (Figura 2). En base a estos resultados y a la afinidad de los distintos DARs por DA (Tabla 1), se postuló que el D5R actuaría ya sea bloqueando la señalización inhibitoria del D3R o bien promoviendo directamente la fosforilación de ERK1/2, cancelando de este modo el efecto producido por el D3R. Puesto que actualmente no existen agonistas selectivos para D5R, se utilizaron LT CD4⁺ deficientes en el D5R para evaluar la contribución individual de este receptor en la modulación de las ERK1/2 por DA. De manera interesante, estos experimentos evidenciaron una fosforilación ineficiente de ERK1/2 en LT CD4⁺ D5RKO estimulados con anti-CD3 ϵ 1 μ g/mL (Figura 5-A), destacando la importancia de este receptor en la señalización vía TCR. Dado que en las condiciones utilizadas no se detectó la fosforilación de ERK1/2 en LT CD4⁺ D5RKO, no fue posible evaluar la modulación de la activación de las ERKs mediada por DA en ausencia del D5R. Sin embargo, resultados preliminares de nuestro grupo indican que el D5R estaría acoplado de manera no canónica a Gai en LT CD4⁺ disminuyendo los niveles intracelulares de AMP cíclico (datos no publicados). En conjunto, estos resultados apoyan la noción que este receptor favorecería la activación de las ERKs inducida vía TCR en LT CD4⁺ y sugieren un mecanismo dependiente de AMP cíclico.

Los eventos iniciales en la activación de los LT dependen, entre otras señales, de la fosforilación y translocación al núcleo de las ERK1/2. De esta manera, un nivel de

fosforilación insuficiente podría tener un impacto negativo en el proceso de activación de LT. Una de las principales moléculas efectoras secretadas por LT activados es la citoquina IL-2, la cual entrega señales para la supervivencia y expansión celular. En línea con lo anterior, se detectó una producción de IL-2 significativamente menor por parte de LT CD4⁺ D5RKO en respuesta a un estímulo policlonal comparado con LT CD4⁺ WT (Figura 6-A). En conjunto, estos resultados sugieren que la menor activación de los LT CD4⁺ D5RKO podría estar determinada en parte por una activación insuficiente de ERK1/2. El aporte de otras cascadas de señalización desencadenadas por la estimulación del TCR que contribuyen a la activación eficiente de los LT, tales como la activación de p38 o JNK, y su potencial modulación por el D5R deberán ser analizadas en trabajos a desarrollar en el futuro.

Al evaluar el rol modulador de la DA en LT CD8⁺, se determinó que la estimulación con DA 50 y 500nM en presencia de un estímulo policlonal disminuyó la fosforilación de las ERK1/2 en comparación con el control. Según las constantes de afinidad de los DARs por DA (Tabla 1), los datos sugieren que el D3R estaría involucrado en la disminución de la fosforilación de las ERKs por DA 50 nM (Figura 2-B), de manera similar a lo observado en LT CD4⁺ (Figura 2-A). Por medio del uso de un agonista selectivo de este receptor en LT CD8⁺ WT (Figura 3-B) y LT CD8⁺ D3RKO (Figura 4-B), fue posible confirmar que la disminución en la activación de las ERKs inducida por DA 50 nM depende del D3R. Al igual que en LT CD4⁺, los resultados sugieren que el D3R en LT CD8⁺ tampoco seguiría la vía canónica de acoplamiento a G α _i y una disminución de los niveles de cAMP intracelular. En conjunto, estos resultados indican que el D3R tendría un papel en la modulación de la activación de las MAPKs ERK1/2, el cual opera de manera similar tanto en LT CD4⁺ como CD8⁺.

A diferencia de lo observado en LT CD4⁺, en LT CD8⁺ no se observó la recuperación de los niveles de fosforilación de ERK1/2 al estimular con DA 500 nM en presencia de anti-CD3 ϵ . Lo anterior sugiere que la estimulación del D5R en LT CD8⁺ no promueve la fosforilación de ERK1/2, observándose mayoritariamente el efecto del D3R a dicha concentración de DA. Para confirmar esto, se evaluó la activación de ERK1/2 en LT CD8⁺ D5RKO. Sin embargo, y similar a lo observado en LT CD4⁺, el D5R parece participar de manera importante en el proceso de fosforilación de las MAPKs ERK1/2 en respuesta a la estimulación del TCR, ya que se detectaron muy bajos niveles de ERK fosforilado en LT CD8⁺ D5RKO en presencia de anti-CD3 ϵ (Figura 5-B). Por esta razón, se evaluó también la secreción de IL-2 de LT CD8⁺ WT y D5RKO en respuesta a un estímulo policlonal. Al contrario de lo observado con LT CD4⁺, la ausencia del D5R no afectó la secreción de IL-2 en LT CD8⁺ (Figura 6-B). Estos resultados indican que los LT CD8⁺ requieren del D5R para inducir la fosforilación eficiente de las ERK1/2, pero no sería necesario para completar el proceso de activación. Futuros estudios son necesarios para determinar la contribución de otras vías de señalización activadas por la estimulación del TCR que puedan compensar la leve activación de las ERK1/2 en LT CD8⁺ D5RKO en presencia de anti-CD3 ϵ y explicar la ausencia de diferencias en la secreción de IL-2 entre LT CD8⁺ WT y D5RKO.

A concentraciones mayores de DA (5 μ M) se observó una recuperación parcial en la fosforilación de ERK1/2 en respuesta a anti-CD3 ϵ en LT CD8⁺ (Figura 2-D). En base a las constantes de afinidad de los diferentes DARs por DA, a 5 μ M todos los receptores son estimulados. Así, los resultados sugieren que la estimulación de los D2R, D4R y/o D1R puede compensar la disminución de la fosforilación de las ERKs desencadenada por el D3R y D5R en respuesta a un estímulo policlonal. Futuros trabajos deberán determinar

el aporte de cada uno de estos receptores en la modulación de la activación de ERK1/2 en LT CD8⁺.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que la estimulación del D3R expresado en LT tiene un efecto modulador en la cascada de señalización de las MAPKs ERK1/2 desencadenada por la estimulación del TCR, produciendo una disminución en su activación. Ya que los resultados sugieren un acoplamiento no canónico del D3R, queda por determinar si las otras vías de MAPKs, tales como p38 y JNK, responden a la co-estimulación del D3R y el TCR, y si esta respuesta afecta la funcionalidad de LT. Por otra parte, el análisis del D5R indica que al menos su expresión es importante para la activación de ERK1/2 desencadenada por la estimulación del TCR. Será necesario determinar si el D5R tiene algún papel en la activación de las otras vías de MAPKs y si la acción sobre estas vías en su conjunto determina finalmente su contribución en el proceso de activación de los LT CD4⁺.

CONCLUSIONES

Este trabajo muestra que la activación de las quinasas ERK1/2 inducida por la estimulación con anti-CD3 ϵ en LT es modulada por DA. Este efecto sería mediado por D3R y D5R. Con la información obtenida no se puede descartar que otros DARs expresados en LT puedan contribuir a esta modulación cuando son estimulados con concentraciones mayores de DA.

La evidencia farmacológica y genética indica que la estimulación selectiva del D3R en las dos poblaciones de LT sería responsable de la disminución en la fosforilación de ERK1/2 observada originalmente por DA 50 nM. Por lo tanto, la estimulación de este receptor es capaz de afectar la activación de ERK1/2 desencadenada por la estimulación del TCR a través de un mecanismo aún por definir.

Los resultados obtenidos en LT CD4⁺ deficientes en el D5R sugieren que la fosforilación de ERK1/2 y la consecuente secreción de IL-2 inducida por anti-CD3 ϵ requieren de la expresión de este receptor. Por otra parte, la expresión del D5R en LT CD8⁺ modularía sólo la fosforilación de ERK1/2 en respuesta a un estímulo policlonal, sin afectar la secreción de IL-2.

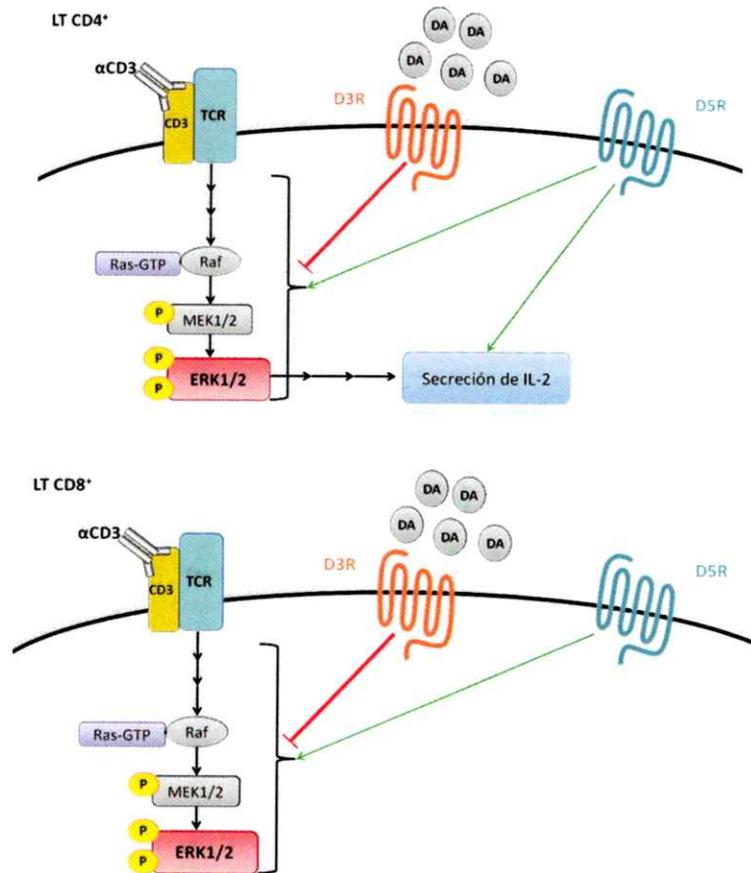


Figura 7. Modelo propuesto: modulación de la fosforilación de ERK1/2 por los receptores de DA D3R y D5R. La estimulación del D3R es capaz de disminuir la fosforilación de ERK1/2 desencadenada por un estímulo policlonal en LT CD4⁺ y CD8⁺. En cambio, la expresión del D5R es necesaria para la fosforilación de ERK1/2 gatillada por un estímulo policlonal en LT CD4⁺ y CD8⁺. En el caso de LT CD4⁺, la expresión del D5R es también necesaria para su eficiente secreción de IL-2.

REFERENCIAS

Besser, M. J., Ganor, Y. y Levite, M. 2005. Dopamine by itself activates either D2, D3 or D1/D5 dopaminergic receptors in normal human T-cells and triggers the selective secretion of either IL-10, TNF α or both. *J Neuroimmunol* **169**(1-2): 161-171.

Elenkov, I. J., Wilder, R. L., Chrousos, G. P. y Vizi, E. S. 2000. The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol Rev* **52**(4): 595-638.

Faure, M., Voyno-Yasenetskaya, T. A. y Bourne, H. R. 1994. cAMP and beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins stimulate the mitogen-activated protein kinase pathway in COS-7 cells. *J Biol Chem* **269**(11): 7851-7854.

Finco, T. S., Kadlecsek, T., Zhang, W., Samelson, L. E. y Weiss, A. 1998. LAT is required for TCR-mediated activation of PLC γ 1 and the Ras pathway. *Immunity* **9**(5): 617-626.

Ghosh, M. C., Mondal, A. C., Basu, S., Banerjee, S., Majumder, J., Bhattacharya, D. y Dasgupta, P. S. 2003. Dopamine inhibits cytokine release and expression of tyrosine kinases, Lck and Fyn in activated T cells. *Int Immunopharmacol* **3**(7): 1019-1026.

Harada, J. y Sugimoto, M. 1999. An inhibitor of p38 and JNK MAP kinases prevents activation of caspase and apoptosis of cultured cerebellar granule neurons. *Jpn J Pharmacol* **79**(3): 369-378.

Hershfield, M. S. 2005. New insights into adenosine-receptor-mediated immunosuppression and the role of adenosine in causing the immunodeficiency associated with adenosine deaminase deficiency. *Eur J Immunol* **35**(1): 25-30.

Ilani, T., Strous, R. D. y Fuchs, S. 2004. Dopaminergic regulation of immune cells via D3 dopamine receptor: a pathway mediated by activated T cells. *FASEB J* **18**(13): 1600-1602.

Jimenez, J. L., Punzon, C., Navarro, J., Munoz-Fernandez, M. A. y Fresno, M. 2001. Phosphodiesterase 4 inhibitors prevent cytokine secretion by T lymphocytes by inhibiting nuclear factor-kappaB and nuclear factor of activated T cells activation. *J Pharmacol Exp Ther* **299**(2): 753-759.

Johnson, G. L. y Lapadat, R. 2002. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* **298**(5600): 1911-1912.

Kawashima, K. y Fujii, T. 2000. Extraneuronal cholinergic system in lymphocytes. *Pharmacol Ther* **86**(1): 29-48.

Kawashima, K. y Fujii, T. 2003. The lymphocytic cholinergic system and its contribution to the regulation of immune activity. *Life Sci* **74**(6): 675-696.

Leon-Ponte, M., Ahern, G. P. y O'Connell, P. J. 2007. Serotonin provides an accessory signal to enhance T-cell activation by signaling through the 5-HT7 receptor. *Blood* **109**(8): 3139-3146.

Nakano, K., Higashi, T., Takagi, R., Hashimoto, K., Tanaka, Y. y Matsushita, S. 2009. Dopamine released by dendritic cells polarizes Th2 differentiation. *Int Immunol* **21**(6): 645-654.

Nakano, K., Yamaoka, K., Hanami, K., Saito, K., Sasaguri, Y., Yanagihara, N., Tanaka, S., Katsuki, I., Matsushita, S. y Tanaka, Y. 2011. Dopamine induces IL-6-dependent IL-17 production via D1-like receptor on CD4 naive T cells and D1-like receptor antagonist SCH-23390 inhibits cartilage destruction in a human rheumatoid arthritis/SCID mouse chimera model. *J Immunol* **186**(6): 3745-3752.

Neve, K. A., Seamans, J. K. y Trantham-Davidson, H. 2004. Dopamine receptor signaling. *J Recept Signal Transduct Res* **24**(3): 165-205.

Nouri-Shirazi, M., Banchereau, J., Fay, J. y Palucka, K. 2000. Dendritic cell based tumor vaccines. *Immunol Lett* **74**(1): 5-10.

O'Connell, P. J., Wang, X., Leon-Ponte, M., Griffiths, C., Pingle, S. C. y Ahern, G. P. 2006. A novel form of immune signaling revealed by transmission of the inflammatory mediator serotonin between dendritic cells and T cells. *Blood* **107**(3): 1010-1017.

Pacheco, R., Gallart, T., Lluís, C. y Franco, R. 2007. Role of glutamate on T-cell mediated immunity. *J Neuroimmunol* **185**(1-2): 9-19.

Pacheco, R., Oliva, H., Martínez-Navio, J. M., Climent, N., Ciruela, F., Gatell, J. M., Gallart, T., Mallol, J., Lluís, C. y Franco, R. 2006. Glutamate released by dendritic cells as a novel modulator of T cell activation. *J Immunol* **177**(10): 6695-6704.

Pacheco, R., Prado, C. E., Barrientos, M. J. y Bernales, S. 2009. Role of dopamine in the physiology of T-cells and dendritic cells. *J Neuroimmunol* **216**(1-2): 8-19.

Pacheco, R., Riquelme, E. y Kalergis, A. M. 2010. Emerging evidence for the role of neurotransmitters in the modulation of T cell responses to cognate ligands. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem* **10**(1): 65-83.

Ramstad, C., Sundvold, V., Johansen, H. K. y Lea, T. 2000. cAMP-dependent protein kinase (PKA) inhibits T cell activation by phosphorylating ser-43 of raf-1 in the MAPK/ERK pathway. *Cell Signal* **12**(8): 557-563.

Sarkar, C., Das, S., Chakroborty, D., Chowdhury, U. R., Basu, B., Dasgupta, P. S. y Basu, S. 2006. Cutting Edge: Stimulation of dopamine D4 receptors induce T cell quiescence by up-regulating Kruppel-like factor-2 expression through inhibition of ERK1/ERK2 phosphorylation. *J Immunol* **177**(11): 7525-7529.

Schramek, H. 2002. MAP kinases: from intracellular signals to physiology and disease. *News Physiol Sci* **17**: 62-67.

Strange, P. G. 2009. Dopamine Receptors. *Tocris Bioscience Scientific Review Series* **15**: 1-5.

Tian, J., Lu, Y., Zhang, H., Chau, C. H., Dang, H. N. y Kaufman, D. L. 2004. Gamma-aminobutyric acid inhibits T cell autoimmunity and the development of inflammatory responses in a mouse type 1 diabetes model. *J Immunol* **173**(8): 5298-5304.

Vang, T., Torgersen, K. M., Sundvold, V., Saxena, M., Levy, F. O., Skalhegg, B. S., Hansson, V., Mustelin, T. y Tasken, K. 2001. Activation of the COOH-terminal Src kinase (Csk) by cAMP-dependent protein kinase inhibits signaling through the T cell receptor. *J Exp Med* **193**(4): 497-507.

Wada, T. y Penninger, J. M. 2004. Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene* **23**(16): 2838-2849.

Watanabe, Y., Nakayama, T., Nagakubo, D., Hieshima, K., Jin, Z., Katou, F., Hashimoto, K. y Yoshie, O. 2006. Dopamine selectively induces migration and homing of naive CD8+ T cells via dopamine receptor D3. *J Immunol* **176**(2): 848-856.

Whitehurst, C. E. y Geppert, T. D. 1996. MEK1 and the extracellular signal-regulated kinases are required for the stimulation of IL-2 gene transcription in T cells. *J Immunol* **156**(3): 1020-1029.