

A UBIQUITINA-LIGASE SMURF1 REGULA A FOSFORILAÇÃO DE ERK1/2 EM MACRÓFAGOS E A RESISTÊNCIA DO HOSPEDEIRO CONTRA A INFECÇÃO POR *SALMONELLA TYPHIMURIUM*

Josiane T. A. Chaves¹, Luiz P. Souza-Costa¹, Luis. H. Franco²

1. Estudante de Pós-graduação. Departamento de Bioquímica e Imunologia. Instituto de Ciências Biológicas, UFMG.

2. Professor/Orientador. Departamento de Bioquímica e Imunologia. Instituto de Ciências Biológicas, UFMG.

Resumo

Smurf1 é uma E3 ubiquitina-ligase importante em mediar a autofagia antimicrobiana de macrófagos e a resistência do hospedeiro contra infecções bacterianas. Porém, os mecanismos mediados por Smurf1 na ativação da resposta inata de macrófagos ainda não são totalmente conhecidos. O objetivo deste trabalho foi estudar a importância de Smurf1 na ativação de macrófagos e avaliar a resistência do hospedeiro contra a infecção causada pela bactéria *Salmonella typhimurium*. Nossos resultados mostraram que macrófagos *Smurf1*^{-/-} apresentaram aumento nos níveis de fosforilação de ERK1/2 após tratamento com LPS e animais *Smurf1*^{-/-} infectados com *S. typhimurium* apresentaram números menores de bactérias replicativas no fígado e baço em comparação com os animais WT. Estes resultados sugerem um papel importante de Smurf1 na regulação da sinalização de receptores da imunidade inata e resistência contra infecções e abre novas perspectivas para o desenvolvimento de terapias contra doenças infecciosas.

Autorização legal: número autorização CEUA: 352/2018.

Palavras-chave: sinalização intracelular; inflamação; regulação da resposta imune

Apoio financeiro: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ).

Introdução

A ubiquitinação é um processo dependente da ação de enzimas E3 ubiquitina-ligases e regula a homeostasia de diversas funções biológicas incluindo a sinalização de receptores da imunidade inata (Li et al., 2016). ERK1/2 são membros da família das MAPK essenciais em mediar a produção de citocinas inflamatórias e espécies reativas do oxigênio e do nitrogênio por macrófagos após o reconhecimento de componentes microbianos (Arthur and Ley, 2013). Apesar do papel de ERK1/2 na ativação de macrófagos ser bem documentado, os mecanismos de regulação de ERK1/2 por ubiquitina-ligases ainda não estão totalmente esclarecidos.

Smurf1 é uma E3 ubiquitina-ligase que direciona para a degradação proteossomal substratos importantes na sinalização do sistema imune como MAVS, T β RI, STAT1 e MEKK2 (Ebisawa et al., 2001; Wang et al., 2012; Wen et al., 2015; Yuan et al., 2012). Smurf1 é essencial em mediar a resistência do hospedeiro contra a infecção por *Mycobacterium tuberculosis*. Macrófagos deficientes de Smurf1 (*Smurf1*^{-/-}) apresentaram defeitos na ativação de autofagia seletiva e foram mais permissivos à replicação de *M. tuberculosis*, comparados a macrófagos de animais C57BL/6 (wild-type; WT). Além disso, animais *Smurf1*^{-/-} infectados por *M. tuberculosis* apresentaram maior replicação bacteriana pulmonar e foram mais suscetíveis à infecção, comparados a animais WT (Franco et al., 2017). Baseado nestas informações, levantamos a hipótese de que Smurf1 é um fator importante na regulação da resposta imune de macrófagos e na resistência do hospedeiro contra infecções, desempenhando outros papéis além da ativação de autofagia seletiva. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi elucidar os mecanismos desempenhados por Smurf1 na ativação de macrófagos e na resistência do hospedeiro contra infecções. Para isso, avaliamos a participação de Smurf1 na regulação da ativação da via de ERK1/2 em macrófagos e seu impacto na resistência do hospedeiro contra a infecção por *S. typhimurium*.

Metodologia

Para analisarmos a importância de Smurf1 na ativação da via de ERK1/2, macrófagos derivados da medula óssea (BMDM) de animais WT ou *Smurf1*^{-/-} foram estimulados por LPS (100 ng/mL) por 20, 40 ou 60 minutos. Após estes períodos, os lisados celulares foram coletados e avaliados

quanto aos níveis de fosforilação de ERK1/2 por imunoblotting utilizando anticorpo específico contra as proteínas fosforiladas.

Para avaliarmos a participação de Smurf1 na resistência do hospedeiro contra infecções bacterianas, animais WT ou *Smurf1*^{-/-} (machos; 6-8 semanas) foram infectados pela via intraperitoneal com 1×10^4 unidades formadoras de colônia (CFU) de *S. typhimurium* obtidas na fase log de crescimento da bactéria. A contagem do número de CFU nos homogenatos do fígado e do baço dos animais infectados foi determinada 48 horas após a infecção através de plaqueamento dos homogenatos em meio LB/ágar (Wu et al., 2014). A análise estatística foi feita no software Graphpad Prism 8.0 (San Diego, CA) utilizando o teste t não pareado (Mann-Whitney test). A diferença foi considerada significativa quando $p < 0.05$.

Resultados e Discussão

A fim de entender se Smurf1 regula a ativação da via de ERK1/2 em macrófagos, BMDMs de animais WT ou *Smurf1*^{-/-} foram estimulados com LPS, um componente da parede celular de bactérias gram-negativas estimulador de TLR4 e os níveis de fosforilação de ERK1/2 foram determinados por imunoblotting nos lisados celulares após 20, 40 ou 60 min de tratamento. Observamos que o tratamento com LPS estimulou a fosforilação de ERK1/2 em macrófagos WT, sendo que o pico da fosforilação ocorreu aos 20 min e reduziu progressivamente no decorrer dos 60 min de tratamento. Em relação aos macrófagos *Smurf1*^{-/-}, observamos que a cinética de fosforilação de ERK1/2 foi semelhante àquela observada em macrófagos WT, sendo que, entretanto, o pico da fosforilação ocorreu aos 40 min após o tratamento com LPS. De maneira interessante, a análise comparativa da densidade das bandas revelou que os níveis de fosforilação de ERK1/2 observados em macrófagos *Smurf1*^{-/-} tratados com LPS foram maiores àqueles observados em macrófagos WT tratados dentro do mesmo período de tempo. Este dado sugere que Smurf1 exerce um papel de regulador negativo da fosforilação de ERK1/2 em macrófagos e pode ser importante na resistência contra infecções. Acreditamos que Smurf1 funcione como um regulador negativo da ativação dos receptores de reconhecimento padrão de macrófagos, sendo importante no controle fino das respostas inflamatórias destas células. Para entender exatamente como Smurf1 atua na regulação negativa da via das MAPK em macrófagos, é essencial que se conheça o substrato alvo de ubiquitinação de Smurf1, assim como o impacto de Smurf1 na produção de citocinas inflamatórias e na expressão de mecanismos microbicidas dos macrófagos.

Os resultados obtidos em macrófagos sugerem que Smurf1 possa exercer uma função importante na resistência do hospedeiro contra infecções. Para testar esta hipótese, animais WT ou *Smurf1*^{-/-} foram infectados pela via intraperitoneal com 1×10^4 CFU da bactéria *S. typhimurium* e a contagem do número de bactérias replicativas no baço e no fígado dos animais foi determinada após 48 horas de infecção. Observamos um número significativamente menor de bactérias replicativas no fígado de animais *Smurf1*^{-/-} infectados com *S. typhimurium*, comparados àqueles encontrados no fígado de animais WT ($p = 0.0159$). De maneira semelhante, observamos um número menor de bactérias replicativas no baço de animais *Smurf1*^{-/-}, comparados aos de animais WT, apesar da diferença encontrada não ter sido significativa ($p = 0.2286$). Esses dados sugerem que Smurf1 apresenta um papel crítico na regulação da imunidade contra a infecção por *S. typhimurium*.

Conclusões

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que Smurf1 atua como um regulador negativo da ativação da via das MAPK ERK1/2 em macrófagos e desempenha um papel importante na regulação da imunidade inata e resistência contra a infecção por *S. typhimurium*. Acreditamos que Smurf1 atua possivelmente na ubiquitinação e degradação de substratos celulares relacionados à sinalização de receptores da imunidade inata de macrófagos e consequentemente da resistência do hospedeiro contra infecções bacterianas. O papel regulador de Smurf1 em outras vias de sinalização relacionadas ao sistema imune foram publicados previamente (Ebisawa et al., 2001; Wang et al., 2012; Wen et al., 2015; Yuan et al., 2012) e os dados do nosso trabalho suportam a ideia geral de que Smurf1 apresenta um papel amplo na regulação das respostas inflamatórias do hospedeiro frente a infecções patogênicas. Como perspectivas futuras pretendemos avaliar o impacto da regulação da via das MAPK por Smurf1 na produção de citocinas e nos mecanismos microbicidas de macrófagos frente à infecção por bactérias intracelulares e correlacionar estes parâmetros à resistência/suscetibilidade do hospedeiro a infecções. O entendimento do papel de Smurf1 na ativação de macrófagos

contribuirá para a melhor compreensão dos mecanismos que controlam a inflamação e na busca de novas formas de tratamento para as doenças inflamatórias e infecciosas.

Referências Bibliográficas

Arthur, J.S., and Ley, S.C. (2013). Mitogen-activated protein kinases in innate immunity. *Nat Rev Immunol* 13, 679–692.

Ebisawa, T., Fukuchi, M., Murakami, G., Chiba, T., Tanaka, K., Imamura, T., and Miyazono, K. (2001). Smurf1 Interacts with Transforming Growth Factor- β Type I Receptor through Smad7 and Induces Receptor Degradation. *J. Biol. Chem.* 276, 12477–12480.

Franco, L.H., Nair, V.R., Scharn, C.R., Xavier, R.J., Torrealba, J.R., Shiloh, M.U., and Levine, B. (2017). The Ubiquitin Ligase Smurf1 Functions in Selective Autophagy of Mycobacterium tuberculosis and Anti-tuberculous Host Defense. *Cell Host Microbe* 21, 59–72.

Li, J., Chai, Q.-Y., and Liu, C.H. (2016). The ubiquitin system: a critical regulator of innate immunity and pathogen–host interactions. *Cell. Mol. Immunol.* 13, 560–576.

Wang, Y., Tong, X., and Ye, X. (2012). Ndfip1 Negatively Regulates RIG-I–Dependent Immune Signaling by Enhancing E3 Ligase Smurf1-Mediated MAVS Degradation. *J. Immunol.* 189, 5304–5313.

Wen, M., Ma, X., Cheng, H., Jiang, W., Xu, X., Zhang, Y., Zhang, Y., Guo, Z., Yu, Y., Xu, H., et al. (2015). Stk38 protein kinase preferentially inhibits TLR9-activated inflammatory responses by promoting MEKK2 ubiquitination in macrophages. *Nat. Commun.* 6, 7167.

Wu, J., Pugh, R., Laughlin, R.C., Andrews-Polymenis, H., McClelland, M., Bäumler, A.J., and Adams, L.G. (2014). High-throughput assay to phenotype salmonella enterica typhimurium association, invasion, and replication in macrophages. *J. Vis. Exp.* 1–7.

Yuan, C., Qi, J., Zhao, X., and Gao, C. (2012). Smurf1 protein negatively regulates interferon- γ signaling through promoting STAT1 protein ubiquitination and degradation. *J. Biol. Chem.* 287, 17006–17015.