

REGULACIÓN DE LA VIA DE SEÑALIZACIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NF- $\kappa$ B EN RESPUESTA A LA ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR DE LA HORMONA ESTIMULANTE DE TIROIDES

NICOLA, Juan Pablo; NAZAR, Magali; REALE, Carla; MARTIN, Mariano; PEYRET, Victoria; VITO, Pasquale; MASINI-REPISO, Ana María

Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Departamento de Ciencias y Tecnología, Facultad de Ciencias, Universidad de Sannio, Italia.

**Introducción y Objetivos:** Los receptores acoplados a proteína G (GPCRs) constituyen una familia de receptores que desempeñan funciones importantes en la diferenciación, proliferación y supervivencia celular. Particularmente, la estimulación del receptor de TSH modula la diferenciación y función de la célula folicular tiroidea. Los GPCRs gatillan diferentes vías de señalización intracelular desencadenando la activación de diversos factores de transcripción, incluyendo NF- $\kappa$ B.

Existe evidencia que avala la activación de NF- $\kappa$ B en células foliculares tiroideas por TSH o anticuerpos estimulantes del receptor de TSH, aunque los mecanismos que resultan en la activación de NF- $\kappa$ B no han sido explorados. Resultados previos de nuestro laboratorio demostraron la participación de NF- $\kappa$ B en la regulación de genes involucrados en la síntesis de hormonas tiroideas en respuesta a la endotoxina bacteriana lipopolisacárido (1). Adicionalmente, reportamos la presencia de mecanismos autoregulatorios mediados por S-nitrosilación que operarían luego de la activación del receptor de TSH para regular la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B (2).

Recientemente, Reale et al. (3) demostraron que ratones deficientes en NEMO, proteína miembro del complejo I $\kappa$ B quinasa (IKK) clave en la activación canónica de NF- $\kappa$ B, desarrollan un estado de hipotiroidismo producto de una dramática pérdida de células foliculares tiroideas en respuesta a la activación de mecanismos apoptóticos.

El objetivo del trabajo comprendió el estudio de los mecanismos que median la activación de NF- $\kappa$ B en respuesta a la activación del receptor de TSH y su función como mediador transcripcional de la expresión de genes involucrados en la síntesis de hormonas tiroideas.

**Material y Métodos:** Como modelo se utilizó la línea celular derivada de tiroides FRTL-5 y cultivos primarios de células foliculares tiroideas aisladas de ratones transgénicos deficientes en la proteína NEMO (3). La expresión de proteínas y ARN mensajero se evaluó por Western blot y PCR en tiempo real. La actividad transcripcional de promotores y la unión de factores de transcripción a un promotor determinado se evaluó mediante ensayos de gen reportero e inmunoprecipitación de la cromatina. El silenciamiento de la expresión de genes se realizó mediante ARN de interferencia. El análisis estadístico se realizó mediante test ANOVA conjuntamente con el test de comparación múltiple Newman-Keuls considerando significativo  $p < 0.05$ .

**Resultados:** El tratamiento con TSH indujo la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B en células FRTL-5 transfectadas con un vector artificial de respuesta a NF- $\kappa$ B. Utilizando el mismo esquema experimental, se evaluó la participación de quinasas involucradas en la señalización gatillada por la activación del receptor de TSH. La inhibición farmacológica de PKA (H89) y PKC (Chelerythrine) bloqueó la activación de NF- $\kappa$ B inducida por TSH. Complementariamente, observamos que el tratamiento con TSH indujo el reclutamiento nuclear de la subunidad p65 de NF- $\kappa$ B. Sin embargo, sólo la inhibición farmacológica de PKC bloqueó la acumulación nuclear de p65.

Determinamos la participación de la vía canónica de activación de NF- $\kappa$ B mediante la fosforilación de las quinasas IKK- $\alpha$  e IKK- $\beta$  (Ser-176/180) en respuesta a TSH. Adicionalmente, el tratamiento con TSH indujo la fosforilación de I $\kappa$ B- $\alpha$  (Ser-32) y su posterior degradación proteasomal, dando lugar a la translocación de p65 hacia el núcleo de células FRTL-5. En coincidencia, el inhibidor farmacológico de la actividad quinasa de IKK- $\beta$  (BAY 11-7082) que inhibe la fosforilación de I $\kappa$ B- $\alpha$  bloqueó la activación transcripcional de NF- $\kappa$ B en respuesta a TSH.

Posteriormente evaluamos la participación de la quinasa TAK-1 en la activación de NF- $\kappa$ B inducida por la actividad de PKC que ocurriría luego de la activación del receptor de TSH. Observamos que el tratamiento con TSH indujo la fosforilación de TAK-1 (Thr-184/187), y el silenciamiento de TAK-1 inhibió la fosforilación de IKK- $\alpha$  e IKK- $\beta$  y la activación de NF- $\kappa$ B en respuesta al estímulo de TSH. Por otra parte, establecimos un vínculo entre la fosforilación de p65 (Ser-276) dependiente de la actividad quinasa de PKA y la inducción de la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B en respuesta a TSH. Además, observamos que TSH estimula la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B mediante la acetilación de p65 (Lys-310) en respuesta al reclutamiento de las acetil-transferasas CBP/p300.

La evaluación del rol de NF- $\kappa$ B como mediador del efecto fisiológico de TSH sobre la expresión de diferentes genes involucrados en la síntesis de hormonas tiroideas demostró que la presencia de BAY 11-7082 redujo significativamente la expresión génica en respuesta al estímulo de TSH. Coincidentemente, células foliculares tiroideas aisladas de ratones deficientes en la proteína NEMO mostraron una expresión disminuida de diferentes genes involucrados en la síntesis hormonal cuando fueron estimulados con TSH en comparación con células aisladas de ratones control. La deficiencia funcional de NF- $\kappa$ B no afectó la expresión y/o función del receptor de TSH. Adicionalmente, BAY 11-7082 disminuyó el efecto de TSH sobre la estimulación de la región promotora de genes involucrados en la síntesis hormonal indicando su participación a nivel transcripcional. En estrecha relación, el análisis bioinformático reveló la presencia de sitios consenso para NF- $\kappa$ B en sus regiones promotoras, y ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina confirmaron que el estímulo con TSH induce la unión de la subunidad p65 a las regiones promotoras. Complementariamente, la remoción de las regiones consenso NF- $\kappa$ B identificadas mediante mutagénesis

sitio-dirigida demostró su funcionalidad en respuesta a la estimulación con TSH y el silenciamiento de la expresión de p65 permitió corroborar su participación en la estimulación de TSH sobre la expresión génica.

**Conclusiones:** La activación del receptor de TSH conduce a la inducción del complejo regulador IKK, en dependencia de la actividad de PKC, activando la vía canónica de señalización del factor de transcripción NF- $\kappa$ B. Aunque el mecanismo por el cual el complejo IKK es activado en respuesta a la estimulación de GPCRs es poco conocido, observamos que la quinasa TAK-1 es activada por TSH y participa en la fosforilación del complejo IKK y posterior activación de NF- $\kappa$ B.

La fosforilación de NF- $\kappa$ B desempeña un rol importante en la regulación de su actividad transcripcional. Particularmente, observamos que TSH induce la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B mediante la fosforilación de p65 en Ser-276 en dependencia de la actividad de PKA. Adicionalmente, la modificación en la actividad transcripcional de p65 producto de la fosforilación en Ser-276 se asocia con el reclutamiento de las acetil-transferasas CBP/p300 y la acetilación de p65 en Lys-310.

La evaluación del rol desempeñado por NF- $\kappa$ B en la fisiología tiroidea demostró la participación de la subunidad p65 como efector transcripcional de la estimulación inducida por TSH sobre la expresión de genes involucrados en la síntesis hormonal. Nuestros resultados señalan a NF- $\kappa$ B como un mediador relevante en la expresión genética y diferenciación de la célula folicular tiroidea. Creciente evidencia indica que NF- $\kappa$ B participa en la patogenia de diversas enfermedades autoinmunes, siendo un factor clave en la vinculación de procesos inflamatorios asociados al desarrollo de cáncer en modelos experimentales. Puede especularse que una alteración en la señalización mediada por TSH estaría implicada en la carcinogénesis de procesos neoplásicos que afectan la glándula tiroidea, así como en la patogénesis de enfermedades autoinmunes a través de la modulación de la señalización de NF- $\kappa$ B.

#### Referencias:

1. Nicola J.P. et al. (2010) *Mol Endocrinol.* 24(9):1846-62
2. Nicola J.P. et al. (2015) *Endocrinology.* 156(12):4741-54
3. Reale C. et al. (2016) *J Biol Chem.* 291(11):5765-73.

