Goran Tomić

Ispitivanje uloge MAPK, JAK/STAT i NF-κB u regulaciji produkcije interleukina-17 u ćelijama limfnog čvora miša stimulisanim konkanavalinom A

Regulacija produkcije interleukina 17 (IL-17) nije u potpunosti ispitana, te je cilj ovog rada bio da se utvrdi uloga signalnih puteva MAPK, JAK/STAT i NF-κB u regulaciji produkcije IL-17 u ćelijama limfnog čvora miša stimulisanim konkanavalinom A ćelije limfnog čvora su stimulisane konkanavalinom A i tretirane inhibitorima MAPK, JAK/STAT i NF-κB signalnih puteva u koncentracijama koje nisu toksične za ćelije limfnog čvora miša. Sekrecija IL-17 merena je ELISA metodom nakon 24h inkubacije. C-jun N-terminalna kinaza (JNK) prvenstveno čini deo signalnog puta kojim se stimuliše produkcija IL-17. Pretpostavlja se da su p38 MAPK i ERK deo ove kaskade. Janus kinaza 2 i transkripcioni faktori NF-κB i STAT3 nisu deo signalnog puta kojim se kontroliše proizvodnja IL-17 kada se kao mitogen koristi konkanavalin A. Dobijeni rezultati su značajni za istraživanje ostalih delova kaskade i njihove regulacije.

Uvod

Interleukin-17 (IL-17) je 30-35 kDa homodimerni glikoprotein čije su subjedinice povezane disulfidnim vezama (Fossiez *et al*. 1996). IL-17 je proinflamatorni citokin koji sekretuju prevashodno aktivirane T ćelije. Kod čoveka se IL-17 mRNA nalazi u aktiviranim CD4+ memorijskim T ćelijama (Fossiez *et al*. 1996) dok CD8+ T ćelije sekretuju IL-17, ali na značajno manjem nivou (Yao *et al*. 1995). Kod miševa CD4+ i CD8+ T ćelije produkuju slične nivoe IL-17 (Happel *et al*. 2003). IL-17 indukuje ekspresiju drugih proinflamatornih citokina, hemokina i adhezivnih molekula u različitim tipovima ćelija, kao što su makrofagi, dendritske ćelije, T ćelije i ćelije endotela (Moseley *et al*. 2003). IL-17 takođe deluje sinergistički sa nekim proinflamatornim citokinima, kao što je TNF-α (Ruddy *et al*. 2004). Ispitani efekti interleukina 17 ukazuju da ovaj citokin ima važnu ulogu u inflamatornim procesima u kojima učestvuju T ćelije.

Signalni put kojim IL-17 ostvaruje svoj efekat uključuje IL-17 receptor (IL-17R) koji aktivira ERK (ekstracelularnim signalom regulisanu kinazu), JNK (c-jun N-terminalna kinazu) i p38 MAP kinazu (mitogenom aktiviranu protein kinazu) što rezultira regulacijom transkripcionog faktora NF-κB (nuklearnog faktora κB), interleukina-6 i interleukina-1 (Moseley *et al*. 2003).

Mitogeni kao što su PMA (forbol 12-miristat 13-acetat) i konkanavalin A (ConA) stimulišu T ćelije da proizvode IL-17. Povećanje produkcije IL-17 postiže se ukoliko se ovi mitogeni primenjuju sa anti-CD3 i anti-CD28 stimulacijom, pokazujući da je signaling pri produkciji IL-17 povezan sa T ćelijskim receptorom (TCR) (Lenarczyk *et al*. 2000). TCR stimulacija indukuje produkciju IL-17 kroz kalcineurin/NFAT (nuklearni faktor aktiviranih T ćelija) i MAPK signalne puteve (Liu *et al*. 2005). Stimulacija intreleukinom-23 takođe indukuje produkciju IL-17 kroz STAT3 (prenosilac signala i aktivator transkripcije) i NF-κB signalni put (Cho *et al*. 2006).

Iako se biološke funkcije IL-17 temeljno proučavaju, mehanizmi regulacije produkcije IL-17 nisu precizno istraženi. Nije detaljno ispitano koji

Goran Tomić (1988), Omoljica, Patrijarha Arsenija Čarnojevića 39B, učenik 4. razreda Medicinske škole "Stevica Jovanović" u Pančevu

MENTOR: Dr Ivana Stojanović, Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković" u Beogradu

signalni putevi su uključeni u regulaciji produkcije IL-17 u ćelijama limfnog čvora kada se kao mitogen koristi konkanavalin A. Preciznije utvrđivanje ovih mehanizama će omogućiti veći broj načina za regulaciju produkcije IL-17, što je značajno zbog toga što je ovaj interleukin izuzetno važan faktor u velikom broju imunoloških oboljenja.

Cilj ovog rada je određivanje učešća MAPK, JAK/STAT i NF-κB signalnih puteva u regulaciji produkcije IL-17 u ćelijama limfnog čvora miša stimulisanim konkanavalinom A.

Materijal i metode

Reagensi

U radu su korišćeni serum fetusa govečeta (FCS), fiziološki rastvor sa fosfatnim puferom (PBS), medijum za kultivaciju ćelija RPMI 1640, (ICN, Costa Mesa, California), Konkanavalin A (ConA), SB203580, SP600125, AG490 (Calbiochem, Darmstadt, Germany), MG132, PD98059, TMB (3,3',5,5' tetrametilbenzidin), MTT (3-(4, 5-dimetiltiazol-il-2)-2, 5 difeniltetrazolijum bromid) i DMSO (Sigma, St Louis, USA). Antitela specifična za mišji IL-17 proizvedena u pacovu i antitela specifična za mišji IL-17 proizvedena u pacovu, sa biotinom, nabavljena su od BD Pharmingen (New Jersey, USA). Avidin konjugovan sa peroksidazom (Avidin-HRP) kupljen je u eBioscience (San Diego, USA), dok je rekombinantni mišji IL-17 kupljen u R&D (Minneapolis, USA).

Ćelije

Ćelije limfnog čvora dobijene su iz izolovanih cervikalnih, pankreasnih i poplitealnih limfnih čvorova C57BL/6 miša. Ćelije limfnog čvora zasejane su na ploči sa 24 bazenčića (500 μL, $1 \cdot 10^6$ ćelija/mL) i inkubirane u RPMI-1640 medijumu suplementiranim 5% FCS. ćelije su tretirane konkanavalinom A (5 μg/mL) i odgovarajućim inhibitorima tokom 24 sata. Za inhibiciju signalnih puteva upotrebljeni su selektivni inhibitor p38, SB203580 (1 μM), inhibitor aktivacije NF-κB, MG132 (0.1 μM), selektivni inhibitor ERK, PD98059 (5 M), selektivni inhibitor JNK, SP600125 (1 μM) i selektivni inhibitor JAK2/STAT3, AG490 (6 μM). Proizvodnja IL-17 merena je u netretiranim ćelijama (grupa 0), ćelijama tretiranim samo konkanavalinom A (grupa ConA) i ćelijama tretiranim istovremeno konkanavalinom A i inhibitorima odgovarajućih signalnih puteva (grupe SB, MG, PD, SP i AG). Nakon inkubacije, sakupljeni su supernatanti za određivanje IL-17 ELISA metodom.

MTT esej

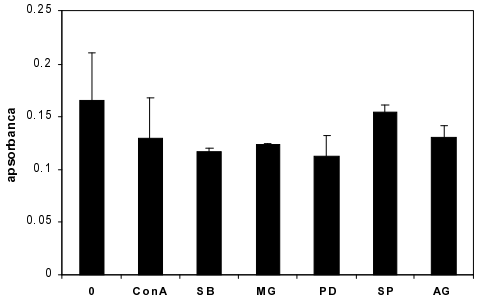
Vijabilitet ćelija, radi isključenja eventualne citotoksičnosti korišćenih inhibitora, utvrđen je MTT esejom. Sakupljeni supernatanti centrifugirani su (2000 rpm), a precipitirane ćelije rastvorene u rastvoru MTT (1 mg/mL). Nakon 30 minuta, rastvor je ponovo centrifugiran, a boja koja je nastala prevođenjem tetrazolijumovih soli u formazan rastvorena je u DMSO. Apsorbanca ovog rastvora merena je na 570 nm (Titertek-Multiscan, Labsystem, Helsinki).

IL-17 ELISA

Produkcija IL-17 utvrđena je ELISA metodom. Rastvor primarnog antitela u PBS nanet je na ploču sa 96 bazenčića u zapremini od 50 μL i ostavljen preko noći. Ploča je isprana 3 puta rastvorom 0.05% Tween PBS (200 μL). Blokiranje je izvršeno rastvorom PBS + 10% FCS, tokom jednog sata (100 μL). Ploča je isprana 2 puta, nakon čega su naneti sakupljeni supernatanti i inkubirani 2 sata (u duplikatu u zapremini od 50 μL). Nakon ispiranja ploče 4 puta, nanet je rastvor sekundarnog antitela sa biotinom u PBS + 10% FCS i inkubiran 2 sata (50 μL). Ploča je isprana 6 puta, dodato 50 μL rastvora avidin-HRP, inkubirano 30 minuta, ponovo isprano 6 puta, a zatim su dodati rastvori TMB i H_2O_2 do pojave boje (50 μL). Reakcija je zaustavljena dodavanjem 2M HCl (50 μL) i apsorbanca je merena na 450 nm. Koncentracija IL-17 u uzorcima određivana je na osnovu standardne krive dobijene inkubacijom poznatih koncentracija rekombinantnog mišjeg IL-17 u dvostrukim razblaženjima.

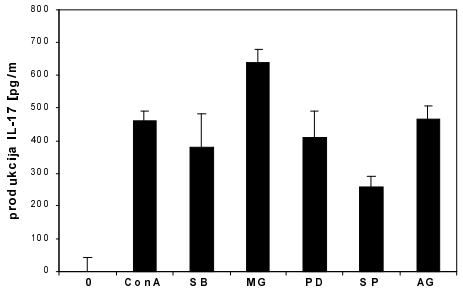
Rezultati i diskusija

Pošto signalni putevi koji učestvuju u regulaciji produkcije IL-17 nisu detaljno poznati, ispitana je produkcija IL-17 u ćelijama limfnog čvora miša nakon nespecifične stimulacije T ćelija pomoću konkanavalina A. Nijedan od korišćenih inhibitora



Slika 1. Uticaj inhibitora na vijabilitet ćelija limfnog čvora (MTT test)

Figure 1. Effect of inhibitors on lymph node cell viability (MTT test)

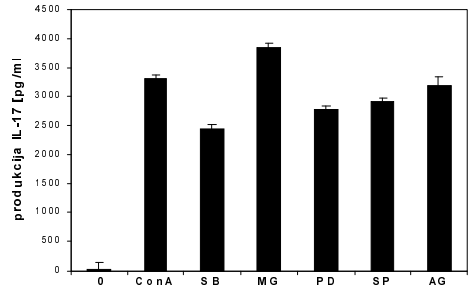


Slika 2. Koncentracija IL-17 u ćelijama limfnog čvora miša nakon stimulacije ConA i tretiranja inhibitorima (eksperiment 1). ELISA je izvedena u duplikatu.

Figure 2. IL-17 concentration in mouse lymph node cells after ConA stimulation and inhibitor treatment (experiment 1). ELISA was performed in duplicate.

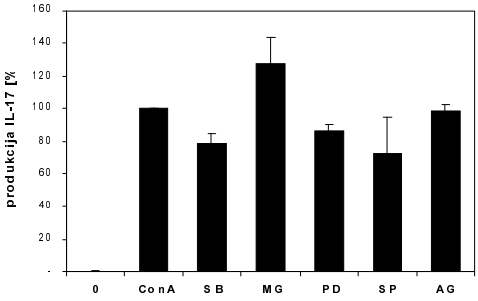
nije značajno uticao na vijabilitet ćelija, jer se apsorbanca grupa tretiranih konkanavalinom A i kombinacijom ConA i inhibitora nije razlikovala značajno od apsorbance netretiranih ćelija. Na osnovu toga je zaključeno da su dobijeni rezultati posledica regulacije produkcije IL-17, a ne citotoksičnosti inhibitora (slika 1). Nakon tretiranja ćelija konkanavalinom A i inhibitorima signalnih puteva za koje se pretpostavilo da učestvuju u regulaciji produkcije IL-17, analizirana je koncentracija ovog citokina (slika 2, slika 3).

Eksperimenti su prikazani zasebno, jer je koncentracija produkovanog IL-17 varirala među eksperimentalnim životinjama tako da nije bilo moguće predstaviti produkciju IL-17 u okviru jed-



Slika 3. Koncentracija IL-17 u ćelijama limfnog čvora miša nakon stimulacije ConA i tretiranja inhibitorima (eksperiment 2). ELISA je izvedena u duplikatu.

Figure 3. IL-17 concentration in mouse lymph node cells after ConA stimulation and inhibitor treatment (experiment 2). ELISA was performed in duplicate.



Slika 4. Produkcija IL-17 u ćelijama limfnog čvora miša nakon stimulacije ConA i tretiranja inhibitorima. Rezultati predstavljaju procenat produkcije IL-17 u odnosu na grupu ConA, na osnovu dva eksperimenta.

Figure 4. IL-17 production in mouse lymph node cells after ConA stimulation and inhibitor treatment. Results represent the percentage of IL-17 production comparing to ConA group, based on two experiments.

nog prikaza. Stimulacija ćelija pomoću konkanavalina A dovela je do visoke produkcije IL-17 u odnosu na netretirane ćelije, čime su potvrđeni rezultati prethodnih istraživanja da ConA dovodi do povećanog stvaranja IL-17 u T ćelijama (Lenarczyk *et al*. 2000). Prime-nom selektivnog inhibitora p38 MAPK, SB203580, smanjena je produkcija IL-17. Ovo smanjenje iznosi od 17% do 26%, u poređenju sa ConA stimulisanim ćelijama, ali se može pretpostaviti da se deo signalin-ga koji reguliše stvaranje

IL-17 odvija preko signalnog puta koji uključuje p38 MAP kinazu. Inhibitor ERK, PD98059, smanjio je produkciju IL-17 za 11-16%. Razlog ovako malog smanjenja mogao bi biti u koncentraciji inhibitora, jer nisu mogle biti korišćene veće koncentracije inhibitora koje bi dale eventualno veće smanjenje produkcije IL-17, zbog citotoksičnosti ovih inhibitora pri većim koncentracijama. Inhibicijom c-jun N-terminalne kinaze pomoću SP600125, selektivnog inhibitora ovog enzima, zapaženo je smanjenje koncentracije IL-17 do 44% u poređenju sa ConA tretiranim ćelijama. Ovaj rezultat ukazuje da regulacija produkcije IL-17 uključuje JNK. Na osnovu rezultata dobijenih korišćenjem inhibitora MAP kinaza, može se zaključiti da su MAP kinaze, a prvenstveno JNK, uključene u regulaciju produkcije IL-17 u ćelijama limfnog čvora miša. Ovaj zaključak potvrđuju prethodna istraživanja koja su pokazala da ConA verovatno deluje preko TCR i da je TCR signaling posredovan MAP kinazama. MG132, inhibitor aktivacije NF-κB, ne dovodi do smanjenja produkcije IL-17, ukazujući da NF-κB nije deo signalnog puta kojim se reguliše stvaranje IL-17. U eksperimentima je prisutno i povećanje koncentracije IL-17 u MG132 tretiranim ćelijama. To se može objasniti time što je poznato da korišćeni inhibitor u manjoj meri aktivira JNK, za koju je ovim istraživanjem pokazano da reguliše IL-17 produkciju. Inhibicijom Janus kinaze 2 (JAK2) i STAT3 molekula pomoću **AG**490, nije se postiglo smanjenje koncentracije IL-17. JAK2/STAT3 nisu deo signalnog puta regulacije IL-17 kada se kao mitogen koristi ConA. NF-κB i STAT3 su potrebni za IL-23 indukovanu produkciju IL-17 (Cho *et al*. 2006). Rezultati ovog istraživanja pokazuju da ovi transkripcioni faktori nisu neophodni za ekspresiju IL-17 kada se kao mitogen koristi ConA. Može se pretpostaviti da ConA deluje prvenstveno preko TCR, aktivirajući kaskadu koja uključuje JNK, ali neophodna su detaljnija istraživanja kako bi se sa sigurnošću moglo tvrditi da i druge MAP kinaze čine deo signalnog puta koji reguliše stvaranje IL-17 u ćelijama limfnog čvora miša.

Zaključak

Ispitana je uloga MAPK, JAK/STAT i NF-κB signalnih puteva pri produkciji IL-17 u ConA stimulisanim ćelijama limfnog čvora miša. Utvrđeno je da JNK čini deo signalnog puta kojim se reguliše produkcija IL-17. Pretpostavlja se da su deo ove kaskade p38 MAPK i ERK. Upotrebom inhibitora JAK2/STAT3 signalnog puta, zaključeno je da Janus kinaza 2 i STAT3 molekul nisu neophodni za produkciju IL-17. NF-κB transkripcioni faktor takođe nije deo ove kaskade. Za razliku od istraživanja gde je pokazano da NF-κB i STAT3 predstavljaju deo signalnog puta pri IL-23 indukovanoj produkciji IL-17, rezultati ovog istraživanja ukazuju da to nije slučaj kada se kao stimulacija koristi ConA. Nova saznanja o signalnim putevima kojim se ostvaruje produkcija IL-17 u ćelijama limfnog čvora otvaraju nove načine za regulisanje ovih kaskada, kako bi se kontrolisala ekspresija IL-17. Na ovaj način bi moglo da se reguliše stvaranje IL-17 u različitim inflamatornim oboljenjima u kojima učestvuju T ćelije. Jedan od potencijalnih načina kontrole stvaranja ovog citokina jeste regulisanje aktivnosti JNK. Daljim istraživanjima neophodno je razjasniti ostale delove kaskade i njihovu međusobnu interakciju, kako bi se otvorile nove mogućnosti regulacije produkcije IL-17.

Zahvalnost. Autor duguje veliku zahvalnost Dr Ivani Stojanović, mentoru ovog rada, na pomoći oko ideje, realizacije rada i obrade rezultata. Autor se takođe zahvaljuje Tamari Cvjetićanin, na pomoći tokom izvođenja istraživanja, Institutu za imunologiju i mikrobiologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, u čijim laboratorijama je izvedeno ovo istraživanje, kao i Rafineriji nafte Pančevo, na nabavci AG490 i ConA.

Literatura

Cho M. L, Kang J. W., Moon Y. M., Nam H. Y., Jhun J. Y., Heo S. B, Jin H. T., Min S. Y., Ju J. H., Park K. S., Cho Y. G., Yoon C. H., Park S. H., Sung Y. C., Kim H.Y. 2006. STAT3 and NF-êB Signal Pathway Is Required for IL-23-Mediated IL-17 Production in Spontaneous Arthritis Animal Model IL-1 Receptor Antagonist-Deficient Mice. *The Journal of Immunology*, **176**: 5652.

Fossiez F., Djossou O., Chomarat P., Flores-Romo L., Ait-Yahia S., Maat C. Pin J. J., Garrone P., Garcia E., Saeland S., Blanchard D., Gaillard C., Das Mahapatra B., Rouvier E., Golstein P., Banchereau J., Lebecque S. 1996. T cell interleukin-17 induces stromal cells to

produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *Journal of Experimental Medicine*, **183** (6): 2593.

Happel K. I., Zheng M., Young E., Quinton L. J., Lockhart E., Ramsay A. J., Shellito J. E., Schurr J. R., Bagby G. J., Nelson S., Kolls J. K. 2003. Cutting Edge: Roles of Toll-Like Receptor 4 and IL-23 in IL-17 Expression in Response to *Klebsiella pneumoniae* Infection. *Journal of Immunology*, **170**: 4432.

Lenarczyk A., Helsloot J., Farmer K., Peters L., Sturgess A., Kirkham B. 2000. Antigen-induced IL-17 response in the peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of healthy controls. *Clinical and Experimental Immunology*, **122**: 41.

Liu X. K., Clements J. L., Gaffen S. L. 2005. Signaling Through the Murine T Cell Receptor Induces IL-17 Production in the Absence of Costimulation, IL-23 or Dendritic Cells. *Molecules and Cells*, **20** (3): 339.

Moseley T. A., Haudenschild D. R., Rose L., Reddi A. H. 2003. Interleukin-17 family and Il-17 receptors. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, **14**: 155.

Ruddy M. J., Wong G. C., Liu X. K., Yamamoto H., Kasayama S., Kirkwood K. L., Gaffen S. L. 2004. Functional Cooperation between Interleukin-17 and Tumor Necrosis Factor- Is Mediated by CCAAT/Enhancer-binding Protein Family Members. *Journal of Biological Chemistry*, **279**: 2559.

Yao Z., Painter S. L., Fanslow W. C., Ulrich D., Macduff B. M., Spriggs M. K., Armitage R. J. 1995. Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells. *Journal of Immunology,* **155**: 5483-5486

Goran Tomić

Role of MAPK, JAK/STAT and NF-κB during Concanavalin A Induced IL-17 Production in Mouse Lymph Node Cells

Interleukin 17 is a cytokine with a complex and important role in the immune system. IL-17 is a proinflammatory cytokine that activates T cells and other immune cells to produce a variety of cytokines, chemokines, and cell adhesion molecules (Moseley *et al*. 2003). It also synergizes potently with inflammatory cytokines such as TNFα (Ruddy *et al*. 2004). IL-17 is produced at high levels in response to the T cell mitogens PMA and ConA, with the highest levels produced in response to anti-CD3/anti-CD28 stimulation, demonstrating that T cell-specific signalling is involved in the production of IL-17 (Lenarczyk *et al*. 2000). TCR signaling is mediated by MAP kinases and calcineurin/NFAT (Liu *et al*. 2005). IL-23 mediated IL-17 production is controlled by JAK2, STAT3 and NF-κB (Cho *et al*. 2006).

Since the signals that regulate IL-17 production have not been defined in detail, it is necessary to determine the mechanism of IL-17 regulation. These findings could help regulate IL-17 production, which is of some medical importance because this cytokine has an important role in a variety of immunological disorders.

The aim of this study is to determine the role of MAP kinases, JAK/STAT and NF-κB during concanavalin A induced IL-17 production in mouse lymph node cells.

Lymph node cells were prepared from C57BL/6 mice lymph nodes. Cells were stimulated for 24 hours with ConA, in the presence or abscence of inhibitors of several signaling pathways. Supernatants were collected and analyzed for IL-17 concentration by ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).

IL-17 is produced at high levels in response to ConA stimulation. IL-17 production is reduced by 17% to 26%, in presence of SB203580, a p38 MAP kinase selective inhibitor. This result sugessts that IL-17 production control is partly regulated by p38 MAP kinase. The ERK inhibitor, PD98059, inhibited 11-16% of IL-17 production in mouse lymph node cells. Such low inhibition might be the result of a low inhibitor concentration used in these experiments. A higher inhibitor concentration could not be used, since the inhibitors were cytotoxic at higher concentrations. Inhibition of c-jun N-terminal kinase (JNK) by SP600125, a selective inhibitor of this enzyme reduces IL-17 concentration by 44%, when compared to ConA stimulated cells. This result shows that JNK is part of a cascade that regulates the IL-17 production. Inhibition of the NF-κB and JAK2/STAT3 signaling pathway had no influence on IL-17 production, demonstrating that these path-

ways are not included in control of IL-17 production, when ConA is used to stimulate the T cells.

IL-17 production is stimulated by ConA. JNK is part of a signaling pathway that regulates the production of this cytokine. It may be sugessted that other MAP kinases, such as p38 and ERK, partly control IL-17 production. Janus kinase 2 is not involved in this cascade. Transcription factors NF-κB and STAT3 are not necessary for IL-17 expression. Further research should be performed in order to clarify other parts of this casade and their interaction, since IL-17 has an important role in the immune system.