

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA
Versão Pública



LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA

**Signalling pathways in cystic fibrosis:
A cross talk between CFTR trafficking
and inflammation mechanisms**

João Pedro Lourenço Coelho

Mestrado em Bioquímica
Especialização em Bioquímica
Dissertação

Orientação: Prof. Dr. Carlos Farinha e Prof.^a Agnieszka Swiatecka-Urban

2014/2015

Acknowledgments

To professor Carlos Farinha, for the 4 year walk. For the numerous opportunities since I was an even younger baby in Biochemistry. For all of the teachings on all the different aspects of school, the lab, and life. For this last year, for the help and support, for the independence.

To professor Agnieszka Swiatecka-Urban, for the trust deposited in a complete unknown student, for the opportunity of joining her group.

To professor Margarida Amaral, for the open arms, and the inspiring dedication and strength.

To everyone from the lab, for keeping my head up, for all of the help, laughs, songs, and friendship.

To the greatest companions in this 5 year season. For the rides, the food, the laughter, the mocking, the crying, the coffee, the nights, the borrowed, and always returned, money, the life, the words, the eyes, the dreams.

Aos meus pais, obrigado pelo amor, educação e liberdade ao deixarem-me seguir o meu caminho. À minha irmã, obrigado por mim.

À Ana, por seres a melhor amiga que eu nunca conseguirei ser.
Ao Max.

Abstract

Cystic Fibrosis (CF) is the most common lethal autosomic recessive disease among the Caucasians. The disease is caused by mutations in the *CFTR* gene, that encodes a chloride channel expressed at the apical membrane of epithelial cells. CFTR dysfunction causes the electrolyte unbalance found in exocrine epithelia, leading to mucus thickening and bacteria entrapment in the lung. The inflammatory response is inefficient and exacerbated leading to tissue damage, fibrosis and lung failure.

The TGF- β pathway is over activated in CF and is one of the major factors leading to inflammation, fibrosis, EMT, and also to a reduction in CFTR levels. One of the cellular mechanisms responsible for the inhibition of the TGF- β pathway is the dephosphorylation of one of its associated receptors, T β RI, by PP1c. Previous reports have shown that PP1c interacts with LMTK2, a kinase that regulates CFTR endocytosis.

The present work aimed to study the role of LMTK2, and its inhibitory effect in PP1c, in the activation of the TGF- β pathway seen in CF. Our results in bronchial epithelial cells show that T β RI and PP1c interact *in vivo* and that this interaction is destabilized by the presence of TGF- β . Additionally, treatment with TGF- β increases LMTK2 interaction with PP1c.

TGF- β decreased CFTR expression, but this change was not significant, probably due to use of a CFTR-overexpressing cellular model.

TGF- β -induced EMT was assessed through the differential expression of E- and N-cadherin after incubation with TGF- β for 24 h. T320A-PP1c, a variant of the phosphatase that is not responsive to inhibitory phosphorylation, was able to lead to an arrest of EMT, as seen by a stabilization of N-cadherin levels even after TGF- β incubation.

Overall, this work provided some molecular insight on how some focal, unexplored, targets of the TGF- β pathway, can be set as underlying causes to the major phenotypical hallmarks in CF.

Keywords: Cystic Fibrosis, Inflammation, LMTK2, PP1c

Resumo

A Fibrose Quística (FQ) é a doença autossômica recessiva letal mais comum na população caucasiana. Fenotipicamente, a doença manifesta-se principalmente por uma alta concentração salina no suor e por insuficiência pancreática e pulmonar.

A doença é causada por mutações no gene *CFTR* (do inglês *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*) que codifica uma proteína com 1480 resíduos de aminoácidos que partilha o mesmo nome. Esta proteína funciona como um canal de cloreto e outros aniões na membrana apical das células epiteliais. Desde a clonagem do gene em 1989, foram já descritas mais de 2000 mutações possíveis causadoras de doença. Estas mutações levam a uma baixa taxa de síntese, à incorreta localização e/ou à falta de função da proteína CFTR e causam um desequilíbrio homeostático salino nas superfícies epiteliais exócrinas, com consequente aumento da viscosidade do muco associado. Estas alterações levam a que a resposta imunitária ao nível das superfícies respiratórias seja severamente diminuída, permitindo a colonização dos pulmões por estirpes bacterianas tais como *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Foi ainda descrito que mesmo na ausência de infecções bacterianas, se desenvolve uma resposta inflamatória exacerbada que geralmente culmina na insuficiência respiratória e na morte.

A mutação mais comum está presente em cerca de 85% dos doentes (em pelo menos um alelo) e leva à deleção de um resíduo de fenilalanina na posição 508 da cadeia polipeptídica (F508del). A proteína F508del-CFTR fica retida no retículo endoplasmático da célula por não adquirir o *fold*ing correto, sendo depois enviada para degradação pelo sistema ubiquitina-proteasoma. Caso a proteína mutada consiga ser enviada para a membrana plasmática através de mecanismo de correção, tanto a sua atividade como canal de cloreto, como a sua estabilidade na membrana estão diminuídas em relação à proteína wt-CFTR.

Alguns compostos como o VX-809 (Lumacaftor) conseguem resgatar a proteína F508del-CFTR para a membrana plasmática (corretores), enquanto outros, como o VX-770 (Iva-

caftor, KalydecoTM) conseguem potenciar a sua função como canal de cloreto (potenciadores). O VX-770 foi aprovado para tratar doentes que possuam uma de dez mutações geradoras de defeitos de *gating*, entre as quais a G551D (cerca de 4-5% dos doentes). Recentemente foi também aprovada a combinação do VX-809 e do VX-770, OrkambiTM, para doentes a partir dos 12 anos, homozigóticos para F508del.

No microambiente pulmonar, a combinação da disfunção da CFTR com a colonização por estirpes bacterianas leva ao aumento dos níveis de mediadores pró-inflamatórios, os principais responsáveis pela remodelação epitelial observada. Um dos genes mais polimórficos em pacientes, e cuja via de sinalização está sobre-activada, é o do TGF- β . Esta sobre-activação é capaz de desencadear tanto o processo inflamatório, como o de fibrose, observado em pulmões de doentes FQ, sendo por isso um forte candidato a terapias direcionadas. Para além disto, o TGF- β diminui a expressão da proteína CFTR em células de doentes FQ homozigóticos para F508del, e desencadeia o processo de transição epitélio-mesênquima (EMT, do inglês *epithelial-to-mesenchymal transition*).

Na membrana plasmática, a ligação do TGF- β a um dos seus receptores, TGF- β RII, leva à heterodimerização deste último com o seu "contra-par", TGF- β RI. O heterodímero é depois responsável pela fosforilação de um conjunto de proteínas, incluindo os factores de transcrição Smad2/3. Na maior parte dos casos estas associam-se depois à Smad4, sendo o complexo translocado para o núcleo. Os genes alvo do complexo são transcritos, nomeadamente aqueles responsáveis pela ativação da resposta pró-inflamatória, pró-fibrótica e da EMT.

A ativação constitutiva da via do TGF- β é usualmente prevenida pela ligação do TGF- β RI a um complexo proteico, no qual o proteína fosfatase 1c (PP1c, do inglês *protein phosphatase 1c*) é responsável pela desfosforilação do receptor, mantendo a via inibida em condições de repouso.

O LMTK2 (*Lemur tyrosine kinase 2*) é um cinase capaz de fosforilar a proteína CFTR num resíduo de serina específico (S737), favorecendo a sua endocitose da membrana plasmática. Para além disto, o cinase foi ainda descrito como sendo capaz de fosforilar o resíduo de treonina 320 do PP1c, tornando o fosfatase inativo. Esta fosforilação será então suficiente para que o efeito inibitório que o PP1c tem na via do TGF- β seja suprimido, o que pode explicar parte da sobre-activação da via observada em CF.

Usando uma linha celular com origem no epitélio brônquico humano pretendemos elucidar o mecanismo pelo qual o LMTK2 é capaz de regular a atividade do PP1c e a do via do TGF- β e como é que a modelação da atividade do cinase e do fosfatase contribuem para o desencadear do processo inflamatório, da EMT e da subexpressão de CFTR.

Neste trabalho, através de co-imunoprecipitações em células incubadas, ou não, com TGF- β , mostrámos que em células CFBE wt-CFTR existe interação entre o T β RI e o PP1c, e que esta interação é desfavorecida na presença de TGF- β . Este resultado suporta o modelo no qual o PP1c tem efeito inibitório na via do TGF- β , através da desfosforilação inibitória. Verificámos também que, ao imunoprecipitar LMTK2, é possível detectar PP1c e que esta interação é favorecida em células incubadas com TGF- β .

Numa segunda fase do trabalho estudámos o efeito do TGF- β sobre a expressão de CFTR. Observou-se um pequeno decréscimo na quantidade de proteína em células CFBE F508del-CFTR, embora esta descida não seja significativa. O principal problema reside provavelmente no facto de a proteína ser sobreexpressa neste modelo celular. Desta forma, o possível efeito do TGF- β na degradação de transcritos é mascarada pelos níveis de transcrição superiores àqueles observados em células com expressão endógena de CFTR.

De forma a estudar o efeito do PP1c, estudos semelhantes aos descritos acima foram efectuados, através de transfecção com uma variante não passível de inibição por fosforilação, T320A-PP1c. Aqui, mais uma vez não se observou um decréscimo significativo nos níveis de CFTR, nem diferenças significativas entre a variante mutada de PP1c e a situação controlo (sobreexpressão de wt-PP1c).

Os ensaios com células transfectadas com PP1c foram usados também para detectar os níveis de Smad2 fosforilada (indicativos da ativação da via do TGF- β) e de marcadores da EMT. Os níveis de pSmad2 aumentavam com a incubação de células com TGF- β , sendo no entanto necessários mais replicados de forma a tirar conclusões sobre a possível supressão da via aquando da transfecção com T320A-PP1c. A EMT foi estudada através da análise dos níveis de E- e N-caderina, sendo expectável uma diminuição dos níveis da primeira, e um aumento dos da segunda quando ocorre a transição. A incubação com TGF- β durante 24 h não é suficientes para levar a uma diminuição significativa dos níveis de E-caderina em células transfectadas com wt-PP1c. Por outro lado, em células transfectadas com GFP ou wt-PP1c, é possível observar um aumento significativo nos níveis de N-caderina, sugerindo a ocorrência de EMT parcial ao fim de 24 h. Adicionalmente, a transfecção de células com T320A-PP1c foi capaz de suprimir esta variação nos níveis de N-caderina, sugerindo que a não inibição do fosfatase é capaz de atenuar pelo menos um dos fenótipos causados pela

ativação da via do TGF- β .

O último conjunto de experiências consistiu no estudo de um grupo de mutantes do LMTK2 e do seu efeito nos níveis de PP1c e Smad2, quando ambos estão fosforilados. Os mutantes produzidos consistem num conjunto de variantes com efeitos diferentes na ativação, função e estrutura do cinase, e tornam-se numa boa aposta para o estudo da regulação exercida pelo LMTK2 na via em estudo.

A incubação de células CFBE wt-CFTR com TGF- β durante 24 h, não levou à detecção de diferenças significativas nos níveis de PP1c fosforilado em T320, o que se deve à incapacidade do anticorpo usado para detectar especificamente a forma fosforilada do PP1c.

O estudo dos níveis de pSmad2 foram ainda alargados a células com *knockdown* do LMTK2 por siRNAs. Tanto nestas condições, como em condições de sobreexpressão das diferentes variantes de LMTK2, foi detectado um aumento no nível de pSmad2 em células expostas ao TGF- β . No entanto, são necessários replicados adicionais de forma a tirar conclusões sobre variações nos níveis entre as diferentes variantes do cinase.

Embora o estudo do papel do LMTK2 na via do TGF- β e as suas implicações na FQ necessitem ainda de ser aprofundados, este trabalho permitiu confirmar este cinase como um candidato forte a terapias para a doença. O seu papel celular dual na FQ - sinalização do TGF- β e endocitose de CFTR - e o facto de se tratar de um cinase, tornam-no um potencial alvo para terapias celulares no contexto da doença.

Palavras-chave: Fibrose Quística, Inflamação, LMTK2, PP1c