

IV. FISIOPATOLOGIA DEL ENDOTELIO

Efecto de los inmunosupresores CsA y FK506 sobre vías de señalización intracelular y expresión génica en el endotelio

J. Navarro-Antolín, O. Hernández-Perera y S. Lamas

Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC. Madrid. Instituto «Reina Sofía» de Investigaciones Nefrológicas (IRSIN).

RESUMEN

CsA y FK506, después de unirse a su correspondiente inmunofilina citosólica, inhiben la calcineurina y con ello la traslocación de NF-AT al núcleo. Este paso temprano en la activación del linfocito T es importante para la activación de la transcripción de genes que codifican citoquinas involucradas en la respuesta inmuno-lógica. En la regulación transcripcional mediada por NF-AT suele participar AP-1. Además del efecto inmunosupresor, uno de los efectos tóxicos de estos fármacos es el daño sobre el endotelio vascular. Estudios in vivo e in vitro demuestran que la CsA modifica la regulación de algunas sustancias vasomotoras. Concretamente la CsA aumenta la producción de NO en el endotelio de aorta bovina. El aumento de la síntesis del NO puede tener un componente de regulación a nivel transcripcional. En el promotor del gen eNOS humano existen dos sitios putativos AP-1 y un sitio putativo NF-AT. La asociación del NO con radicales libres del oxígeno, que también son estimulados por la CsA en el endotelio de aorta bovina, podría dar lugar a la formación de especies reactivas con mayor capacidad de daño vascular, como sería la formación de peroxinitritos. Sólo un preciso conocimiento de los mecanismos moleculares por los que actúan los fármacos inmunosupresores, tanto en su acción inmunosupresora como en sus efectos tóxicos, permitirá un posterior desarrollo de nuevas moléculas con mejor resultado terapéutico.

Palabras clave: **ciclosporina, FK506, NO, eNOS, endotelio, radicales libres.**

THE EFFECT OF THE CYDOSPORINE A AND FK 506 ON INTRACELLULAR SIGNALING PATHWAYS AND GENE EXPRESSION IN ENDOTHELIUM

SUMMARY

The primary action of CsA and FK506 is to block the expression of lymphokines produced by T-cells. Damage to the vascular endothelium is one of their most well known side effects. Little is known about the molecular changes in signal transduction and gene expression induced by CsA on the endothelium. A CsA-

Correspondencia: Dr. J. Navarro Antolín
Laboratorio del Dr. S. Lamas
C.I.B.
Velázquez, 144
28006 Madrid

dependent up-regulation of eNOS mRNA was detected in bovine aortic endothelial cells. A similar result was observed with FK506. CsA appears to increase eNOS mRNA mainly by increasing the rate of transcription. Since CsA and FK506 induce an increase in reactive oxygen species in the bovine endothelium, a role of peroxynitrite in the vascular damage by immunosuppressants should be ruled out. An implication of calcineurin and NF-AT in this toxic effect remains to be shown. A molecular description of the immunosuppressants associated toxic mechanisms should be helpful in the design of new immunosuppressive molecules.

Key words: **cyclosporin, FK506, NO, eNOS, endothelium, free radicals.**

INTRODUCCION

La CsA y el FK506 inmunosuprimen porque inhiben la calcineurina. La utilidad clínica de Ciclosporina A (CsA) y FK506 radica en su capacidad de prevenir el rechazo del injerto transplantado. La inhibición de la activación del linfocito T es su principal efecto terapéutico. La inhibición de un paso temprano en la activación del linfocito T conduce a un fallo en la activación de la transcripción de genes de respuesta precoz tales como los que codifican citoquinas implicadas en la coordinación de la activación de los diferentes tipos celulares involucrados en la respuesta inmune. De esta forma, con un efecto dirigido principalmente, aunque no exclusivamente, al linfocito T se producen una gran variedad de efectos secundarios, y en conjunto una profunda inmunosupresión de utilidad terapéutica. Aunque la CsA y el FK506 difieren considerablemente en estructura, tienen acciones bastante similares. Actúan en un paso distal tanto a los receptores de membrana celular como a los segundos mensajeros conocidos, pero proximal a pasos tardíos del tipo de activación transcripcional de genes de respuesta precoz. Concretamente los dos fármacos tienen una diana común, que es la inhibición de la actividad fosfatasa del enzima citosólico calcineurina¹. Probablemente por tener un mecanismo de acción similar, los efectos tóxicos del FK506 y de la CsA son también muy parecidos.

La CsA y el FK506 tienen efectos de toxicidad sobre la pared vascular. Entre los efectos tóxicos de estos fármacos se encuentra el daño sobre el endotelio vascular, asociado en ocasiones a hipertensión y a síndromes que recuerdan a la afectación vascular de la anemia hemolítica microangiopática. Aunque la hipertensión parece estar relacionada con alteraciones en el balance entre sustancias vasoconstrictoras y vasodilatadoras, poco se sabe sobre los mecanismos moleculares de la transducción de señales y la expresión génica inducida por CsA en el endotelio. Estudios *in vivo* e *in vitro* demuestran que la CsA altera la regulación de alguna de estas sus-

tancias vasomotoras. Entre estas sustancias estamos centrando en este momento nuestra atención sobre la modulación del óxido nítrico (NO) endotelial por CsA. Concretamente la CsA aumenta la producción de NO en el endotelio de aorta bovina² y en riñones de animales de experimentación tratados con CsA³. El aumento de la expresión de la eNOS tras tratamiento con CsA puede interpretarse de manera teleológica como una adaptación homeostática a un fármaco con evidente toxicidad. Así, para prevenir el daño endotelial, se sintetizaría más NO que mantendría un tono de vasodilatación necesario para asegurar la perfusión tisular. Sin embargo, es preciso recordar que la interacción química del NO con el anión superóxido (O_2^-) (especie reactiva del oxígeno que aumenta en el endotelio bovino tras tratamiento con CsA o FK506, trabajo en preparación) da lugar a un compuesto altamente tóxico, el peroxinitrito, que podría ser responsable de parte de los profundos efectos tóxicos observados en el endotelio. Desde cualquiera de las dos aproximaciones se hace necesario recordar cómo actúan la CsA y el FK506 en modelos mejor conocidos, como el linfocito T, para intentar comprender lo que sucede en el endotelio.

MECANISMO MOLECULAR DE LA INMUNOSUPRESION POR CsA Y FK506

CsA y FK506 no son activos por sí mismos. La acción primaria de CsA y FK506 es bloquear la expresión de linfoquinas producidas por los linfocitos T, incluyendo IL-2, IL-3, IL-4, IFN- α y TNF- α . Estos dos inmunosupresores se unen a un receptor citosólico que recibe el nombre genérico de inmunofilina. Concretamente el endecapéptido CsA se une a la ciclofilina y el compuesto macrocíclico FK506 se une a la FKBP12 (FK binding protein 12).

El complejo inmunofilina-inmunosupresor inhibe la calcineurina. El complejo inmunofilina-inmunosupresor inhibe una proteína con actividad enzimática de serintreonín fosfatasa denominada calci-

neurina, que está formada por una subunidad catalítica de 59 kDa y una subunidad reguladora de 19 kDa⁴⁻⁷.

La inhibición de la calcineurina impide la activación de NF-AT. La activación del linfocito T en ausencia de CsA o FK506 supone la activación de la calcineurina por un mecanismo dependiente de Calcio y Calmodulina (fig. 1). La activación de la calcineurina conlleva la defosforilación de una proteína con función de factor transcripcional conocido como NF-AT (Nuclear Factor of activated T-cell), que en su forma defosforilada se transloca desde el citosol hasta el núcleo, donde forma un complejo con otras proteínas con capacidad de unirse al DNA, incluyendo Fos y Jun^{8,9}. Durante el tratamiento con CsA o FK506 (fig. 2), la inhibición de la actividad fosfatasa de la calcineurina impide, aún en presencia de estímulos antigénicos reconocidos como extraños, que se transloque NF-AT al núcleo y, por tanto, que se estimule la producción de linfoquinas codificadas por genes cuya expresión es regulada por NF-AT. La calcineurina, NF-AT y los complejos que forma con otros factores transcripcionales quedan identificados, por tanto, como elementos decisivos para entender las bases moleculares de la acción inmunosupresora de CsA y FK506. Una pregunta que ha suscitado nuestro interés es si la vía de señalización mediada por calcineurina y NF-AT es importante en el mecanismo por el que la CsA aumenta la expresión del ARNm de la eNOS.

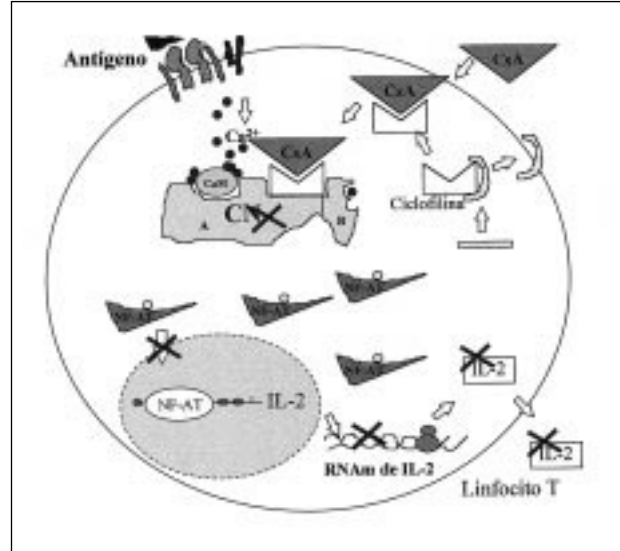


Fig. 2.—Mecanismo de acción de la ciclosporina. Como consecuencia de que el complejo CsA-ciclofilina se une e inactiva a la calcineurina, queda retenido en el citosol NF-AT, impidiéndose la transcripción de IL-2. CaM: calmodulina. CN: calcineurina.

MECANISMO MOLECULAR DEL AUMENTO DE EXPRESION DE eNOS POR INMUNOSUPRESORES

CsA y FK506 aumentan la expresión de eNOS. En experimentos previos observamos un aumento en la actividad de eNOS en células endoteliales de aorta bovina expuestas a 1µM CsA, que se correspondía con un aumento en los niveles de ARN mensajero (ARNm) de eNOS, que también pudo observarse con 1µM FK506 (fig. 3).

El aumento de expresión de eNOS por CsA y FK506 tiene un componente transcripcional. La progresión en el conocimiento de las bases moleculares del aumento de la expresión del ARNm de eNOS implica saber si el fenómeno está mediado por una disminución en la degradación del mensajero (estabilización) o por un aumento en la tasa de transcripción del gen eNOS. En experimentos de bloqueo de la transcripción con diclorobenzimidazol ribósido (DBR) se detecta que el aumento de la expresión del mensajero de eNOS por CsA no puede ser explicado por un componente de estabilización, sugiriendo un componente mayoritario de aumento de la tasa de transcripción (datos de los autores). El aumento transcripcional de eNOS por CsA y FK506 implica la participación de factores de transcripción cuya regulación, a su vez, dependerá de vías de señalización intracelulares.

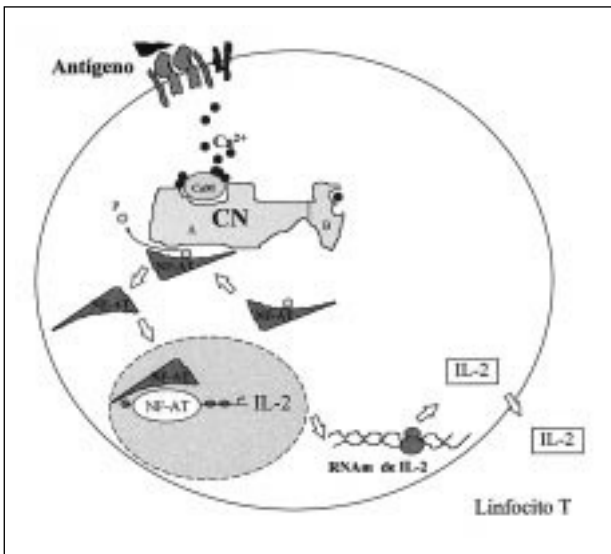


Fig. 1.—Activación antigénica del linfocito T. La activación de la calcineurina (CN) conlleva la posterior activación por defosforilación del factor transcripcional NF-AT, y consiguiente aumento de la transcripción del gen IL-2. CaM: calmodulina. CN: calcineurina, P: fósforo.

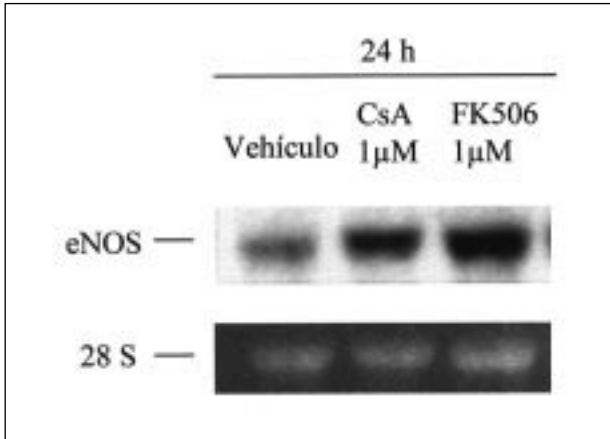


Fig. 3.—Northern blot de células endoteliales de aorta bovina tratadas con 1µM CsA o FK506, usando como sonda ADN de eNOS bovina. La parte inferior muestra el control de la carga total de ARN mediante exposición al ultravioleta de la subunidad 28S con bromuro de etidio intercalado.

CALCINEURINA y NF-AT EN EL ENDOTELIO VASCULAR: IMPLICACIONES EN LOS EFECTOS DE EXPRESION GENICA

Además de abordar el mecanismo íntimo del aumento de la expresión del gen eNOS, tomado en nuestros experimentos como uno de los posibles genes diana en el contexto del daño endotelial por inmunosupresores, queda por conocer qué vía o vías de transducción de señales están implicadas. Es decir, qué sucesos ocurren desde la exposición de la monocapa de células endoteliales al inmunosupresor y la constatación del aumento del mensajero de eNOS. El abordaje de las vías de señalización intracelular implicadas en este fenómeno supone considerar, y cuando proceda integrar, los procesos asociados al uso de estos inmunosupresores tanto dentro como fuera del endotelio. Una primera aproximación supone demostrar la existencia de los elementos calcineurina y NF-AT en el endotelio. En segundo lugar, es necesario demostrar que la participación de la movilización de calcio citosólico tiene suficiente intensidad y duración como para activar la calcineurina. Finalmente, y junto a la existencia de NF-AT, ya demostrada en el endotelio¹¹, es necesario demostrar que este factor de transcripción cooperando con otros tales como AP-1 es capaz de activar la transcripción de genes implicados en la respuesta tóxica o inflamatoria del endotelio o simplemente homeostática como algunos autores sugieren en el caso de la eNOS.

¿Qué elementos verdaderamente existen en el endotelio? Schreiber da cuenta de los receptores citosólicos (inmunofilinas) en el endotelio¹, pero ello no presupone la existencia de la calcineurina, puesto que la acción reconocida endógena de las inmunofilinas no precisa de la acción de ella. Concretamente nos referimos a la participación de ciclofilina y FKBP en el plegamiento de otras proteínas que luego quedarán integradas en las membranas celulares. La existencia de calcineurina en el endotelio bovino queda al menos parcialmente demostrada por el reconocimiento mediante inmunodetección de su subunidad reguladora B (fig. 4). La posible participación de NF-AT en la regulación de eNOS o de otros genes exige la existencia de secuencias de reconocimiento (secuencia consenso de NF-AT¹²: T/A G G A A A/N T/A/C N) en el ADN de dicho gen, como así puede verse en el análisis de los sitios cis de reconocimiento de factores de transcripción en la región 5' reguladora de eNOS (fig. 5). Además la región 5' reguladora cuenta con dos sitios AP-1 (TGAGTCA) uno de los cuales se encuentra en íntima proximidad con el sitio NF-AT, hasta el punto de solaparse. La inhibición de la unión de NF-AT endotelial a su secuencia consenso en presencia de CsA queda demostrada mediante ensayo de cambio de movilidad electroforética (datos de los autores). Asimismo hemos observado que la CsA promueve un aumento de la unión al ADN del factor de transcripción AP-1. Es interesante hacer notar que este factor es sensible al estado redox, estado que es a

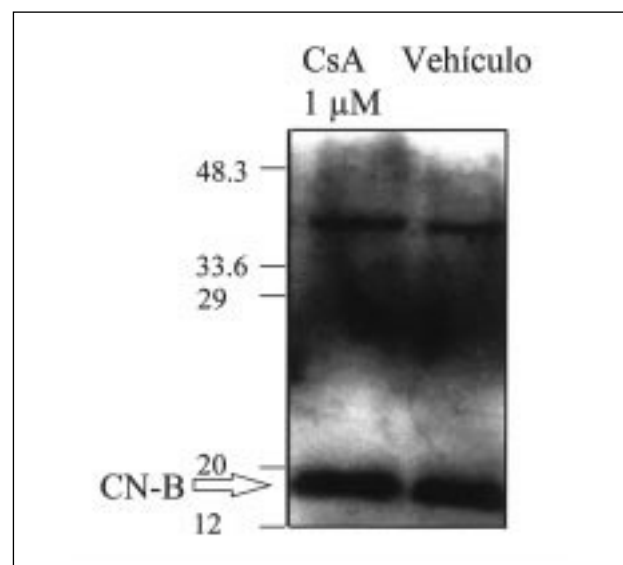


Fig. 4.—Western blot de extractos protéicos de células endoteliales de aorta bovina. Se detecta una banda de 19 kDa cuando se hace inmunodetección con anticuerpo antiCN-B.

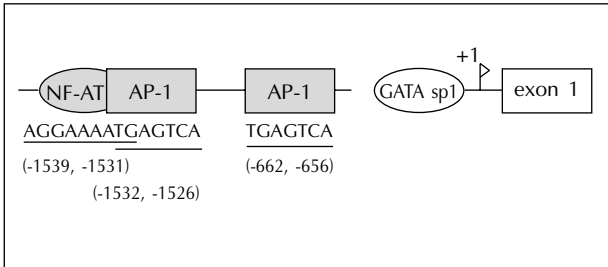


Fig. 5.—Esquema de los sitios putativos AP-1 y NF-AT de la región 5' reguladora del gen eNOS humano. GATA y Sp1 parecen ser fundamentales para la expresión de los niveles basales del transcrito de eNOS. La localización numérica hace referencia al sitio de inicio de la transcripción (+1).

su vez modulable por CsA. De hecho, cuando se expone el endotelio bovino a sistemas generadores de radicales libres se produce un aumento de la actividad de eNOS así como de los niveles de ARNm (trabajo en preparación).

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En este momento, nuestros datos sugieren claramente que el estado redox y el elemento AP-1 están implicados en la respuesta a CsA en el endotelio. Es posible además que la vía calcineurina-NF-AT y una cooperación adicional entre AP-1 y NF-AT puedan estar implicados en ciertos cambios de expresión génica como los observados en el gen de la eNOS. El aumento de expresión de la eNOS por CsA y FK506 (ambos inhibidores de calcineurina) podría suponer identificar un mismo mecanismo molecular de iniciación de la inmunosupresión y de efectos secundarios, como los que podrían estar mediando el daño en el endotelio vascular.

Sólo un preciso conocimiento de los mecanismos moleculares por los que actúan los fármacos inmunosupresores, tanto sobre su acción inmunosupresora como sobre sus efectos tóxicos, permitirá un posterior desarrollo de nuevas moléculas con mejor resultado terapéutico.

Agradecimientos y observaciones

Agradecemos a D. Diego Rodríguez-Puyol su colaboración y la donación de la ciclosporina A. Agra-

decemos a Fujisawa la donación del FK506. Javier Navarro Antolín ha sido becario del Fondo de Investigación Sanitaria (F.I.S.) hasta noviembre de 1997, y es actualmente becario de la Comunidad de Madrid. Octavio Hernández Perera es becario del subprograma de Formación de Personal Investigador del Ministerio de Educación y Cultura. Los estudios comentados en este trabajo han sido financiados en parte por la CICYT (proyecto SAF 97-0035), la UE (proyecto BIOMED 2, BMH4-CT96-0979) y la CAM (proyecto 07/096/96).

Bibliografía

- Schreiber SL, Crabtree GR: The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Immunol Today* 13: 136-142, 1992.
- López-Ongil S, Saura M, Rodríguez-Puyol D, Rodríguez-Puyol M, Lamas S: Regulation of endothelial NO synthase expression by cyclosporin A in bovine aortic endothelial cells. *Am J Physiol* 271: H1072-H1078, 1996.
- Bobadilla NA, Gamba G, Tapia E, García-Torres R, Bolio A, López-Zetina P, Herrera-Acosta J: Role of NO in cyclosporine nephrotoxicity. Effects of chronic NO inhibition and NO synthases gene expression. *Am J Physiol* 1998 (en prensa).
- Clipstone NA, Crabtree GR: Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature* 357: 695-697, 1992.
- Fruman DA, Klee CB, Bierer BE, Burakoff SJ: Calcineurin phosphatase activity in T lymphocytes is inhibited by FK 506 and cyclosporin. *A Proc Natl Acad Sci. USA* 89: 3686-3690, 1992.
- McKeon F: When worlds collide: immunosuppressants meet protein phosphatases. *Cell* 66: 823-826, 1991.
- Liu J, Farmer JD Jr, Lane WS, Friedman J, Weissman I and Schreiber SL: Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 66: 807-815, 1991.
- Jain J, McCaffrey PG, Miner Z, Kerppola TK, Lambert JN, Verdine GL, Curran T, Rao A: The T-cell transcription factor NFATp is a substrate for calcineurin and interacts with Fos and Jun. *Nature* 365: 352-355, 1993.
- Timmerman LA, Clipstone NA, Ho SN, Northrop JP, Crabtree GR: Rapid shuttling of NF-AT in discrimination of Ca²⁺ signals and immunosuppression. *Nature* 383: 837-840, 1997.
- Yoshizumi M, Perrella MA, Burnett JC Jr, Lee M-E: Tumor necrosis factor downregulates an endothelial nitric oxide synthase mRNA by shortening its half-life. *Circ Research* 73: 205-209, 1993.
- Cockerill GW, Bert AG, Ryan GR, Gamble JR, Vadas MA, Cockerill PN: Regulation of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and E-selectin expression in endothelial cells by cyclosporin A and the T-cell transcription factor NF-AT. *Blood* 86: 2689-2698, 1995.
- Rao A, Luo Ch, Hogan PG. Transcription factors of the NFAT family: Regulation and function. *Annu Rev Immunol* 15: 707-747, 1997.