

LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS): ATIVADOR E REGULADOR DA TRANSCRIÇÃO GÊNICA VIA FATOR DE TRANSCRIÇÃO NFKB

Sanseray da Silveira Cruz-Machado

Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, USP
Recebido 19out09 / Aceito 14jan10 / Publicação inicial 15abr10
sanseray@usp.br

Resumo. O LPS é o principal componente da membrana externa de bactérias gram-negativas e conhecido como importante ativador da resposta imunológica. Seus efeitos são mediados principalmente pelo NFKB, um fator de transcrição que se mantém inativo no citoplasma e que migra para o núcleo após a interação do LPS com seus receptores, promovendo a transcrição de diversos genes relacionados à resposta inflamatória aguda. Embora a resposta frente ao LPS seja bem compreendida, pouco se sabe a respeito dos pontos de regulação dessa resposta. Nesse sentido, descreveremos como o LPS se comunica com o meio intracelular, revisaremos os principais pontos conhecidos sobre a regulação da expressão de genes induzidos pelo NFKB e a participação desse fator e dos receptores de LPS na resposta inflamatória

Palavras-chave. Regulação de expressão gênica, Lipopolissacarídeo, NFKB

LIPOPOLYSACCHARIDE (LPS): POTENT ACTIVATOR AND REGULATOR OF GENE TRANSCRIPTION THROUGH NFKB SIGNALING

Abstract. LPS is the main component from membrane surface of gram-negative bacteria known as a potent activator of immune response. This effect is mediated mainly through the NFKB signaling pathway. NFKB remains inactivated in cytoplasm due to interactions with repressor proteins and the triggering of LPS receptors allows NFKB dimmers to translocate to the nucleus and to promote gene transcription. Besides the response activated by LPS being well understood, the regulatory steps of this response remain obscure. In this review, we will describe how LPS activates NFKB pathway and the main steps that regulate this signaling with focus on the regulation of gene expression.

Keywords. Regulation of gene expression, Lipopolysaccharide, NFKB

Lipopolissacarídeo (LPS) também conhecido como endotoxina é uma molécula altamente tóxica derivada da membrana celular externa de bactérias gram-negativas. Sua liberação ocorre quando a bactéria se multiplica ou quando é fagocitada e degradada pelas células de defesa (Tuin e col., 2006). Atualmente, LPS é considerado o principal fator responsável pelas manifestações tóxicas de infecções por bactérias gram-negativas bem como por inflamação sistêmica (Rietschel e col., 1994). Sua estrutura é composta por duas camadas de açúcar e uma camada lipídica, uma parte hidrofílica e outra hidrofóbica, respectivamente. A porção lipídica é considerada a responsável pela maior ação antigênica do LPS (Raetz e Whitfield, 2002).

Essa endotoxina desencadeia vias de sinalização intracelular através de sua ligação a receptores próprios. Os principais estão localizados na membrana celular, denominados receptores Toll-like 4 (TLR4). Desde sua descoberta, no final da década de 1990, os receptores Toll-like têm sido identificados como sensores primários de infecções microbianas e permitido avanços significativos na compreensão dos mecanismos envolvidos na imunidade inata e adquirida (Poltorak e col., 1998). O reconhecimento do LPS é mediado ainda por outras moléculas como LBP, a proteína ligante de LPS (do inglês, *Lipopolysaccharide Binding Protein*), a proteína CD14 que pode estar

sobre a forma solúvel na circulação ou ancorada à membrana celular (sCD14 e mCD14, respectivamente) e ainda a proteína mielóide diferenciadora 2 (MD-2) que também pode ser encontrada nas duas formas. As proteínas LBP, MD-2 e CD14 na versão solúvel atuam como proteínas auxiliares, responsáveis por transferir LPS para o receptor TLR4 ou para o complexo formado entre o receptor TLR4 e a proteína MD-2 (Shimazu e col., 1999; Akira e Takeda, 2004). Esse complexo é considerado como a principal forma de reconhecimento do LPS.

A ativação dos receptores TLR4 pode desencadear diversas vias de sinalização, como MAPK (do inglês *mitogen-activated protein kinase*), AP-1 (*activator protein 1*), STAT (*signal transducer and activator of transcription*) IRF3 (*interferon (IFN)-regulatory factor 3*) entre outras. Uma das principais vias ativadas pelo LPS é a via do fator de transcrição NFKB (do inglês, *Nuclear Factor kappa B*) que ao se translocar ao núcleo, promove a transcrição de diversos genes que participam de processos fisiológicos e fisiopatológicos (para revisão, Raetz & Whitfield, 2002).

O fator de transcrição NFKB pertence à família dos fatores de transcrição NFKB/REL formada por cinco genes (*NFKB1*, *NFKB2*, *RELA*, *c-REL* e *RELB*) que dão origem a sete proteínas: p100, p105, p50, p52, RELA (também conhecida por p65), RELB e c-REL. O dímero p50 corresponde à metade amino-terminal de p105 e

é codificado pelo *NFKB1* e o dímero p52 corresponde à metade amino-terminal de p100 que é codificado pelo gene *NFKB2* (Chen e Greene, 2004).

O NFKB apresenta-se como homo ou heterodímeros constituídos por duas das subunidades mencionadas anteriormente (Baeuerle e Baltimore, 1996; Siebenlist, 1997). A composição do dímero é importante na regulação dessa via (tabela 1), visto que embora todas as subunidades possuam o domínio de homologia REL (RHD, do inglês, *REL homology domain*) responsável pela ligação ao DNA e a outros co-fatores (Gosh e col., 1998) apenas as proteínas p65, c-REL e REL-B possuem domínios de transativação (TAD, do inglês, *transcription activation domain*) na sua porção carboxiterminal (Hayden & Gosh, 2004) e, portanto, apenas dímeros que contenham uma cópia dessas proteínas podem ativar diretamente a transcrição de genes. Por outro lado, acredita-se que homodímeros formados apenas pelas subunidades p50 e/ou p52 sejam repressores da atividade transcricional devido à ausência de domínios do tipo TAD (Gosh & Hayden, 2008). No entanto, se esses homodímeros estiverem associados à proteína BCL-3, que possui domínio TAD e localiza-se no núcleo, é possível que esses passem a apresentar atividades transcricionais positivas (Nolan e col., 1993).

Uma vez no núcleo, o NFKB promove o recrutamento de aumentadores *kappa B*, os quais contêm uma ou mais sequências consenso 5'-GGGRNYYYCC-3', onde R é uma purina, Y é uma pirimidina e N é qualquer ácido nucléico (Chen e Greene, 2004). Esse ponto de regulação é importante, visto que pode caracterizar a resposta de acordo com a subunidade ativada.

Proteína REL	Dímeros	Genes Alvo
REL-A	Homodímeros RELA – RELA RELA – p50 RELA – c-REL	<i>IL8, Colágeno Tipo VII e molécula de aderência ICAM1</i> <i>IkB-alfa, IL8, IL6, TNF-alfa, GM-CSF, HIV1 uPA, IL2R-alfa, MCP1</i>
REL-B	RELB – p50 RELB – p52	<i>MDC</i> <i>SLC, ELC, MDC</i>
c-REL	Homodímeros c-REL – c-REL c-REL – p50	<i>IL8</i> <i>IL12/p40, IL12/p35,</i> <i>IL2R-alfa</i>
p50	Homodímeros p50 – p50 P50 – BCL3	<i>TNF-alfa, IL6 e MHC II</i> <i>BCL2</i>
p52	Homodímeros p52 – p52 P52-BCL3	<i>MHC II</i> <i>Ciclinas D1, BCL2</i>

Tabela 1: A literatura relata uma resposta estereotipada em relação à subunidade do NFKB que se transloca ao núcleo e os genes alvo (para revisão Chen e Greene, 2004).

De modo geral, há consenso na literatura de que a exposição à patógenos (vírus, bactérias, fungos), citocinas e outros fatores estressantes

ativam o fator de transcrição NFKB levando à indução transcricional de mais de 200 genes (Pahl, 1999). A desregulação na transcrição dependente do NFKB está relacionada com complicações associadas a desordens crônicas como diabetes, doenças cardiovasculares, desordens auto-imunes e certos tipos de câncer. Dentre as diversas respostas e atividades fisiológicas controladas pelo NFKB, sua ação sobre processos inflamatórios e imunes, apoptose, diferenciação celular e ativação da proliferação de células tumorais estão entre os mais bem estudados e entendidos até agora.

A sinalização intracelular induzida pela interação do LPS com seus receptores desencadeia o recrutamento de diversas proteínas citoplasmáticas, através de interações domínio-domínio específicas através de via uma dependente ou independente da proteína Myd88 (do inglês, *myeloid differentiation primary-response protein 88*). Ambas as vias que podem ser ativadas convergem para ativação do complexo de quinases IKKs, que por sua vez ativam a fosforilação, ubiquitinação e degradação proteossômica da proteína *IkB-alfa* (conhecida ainda como NFKBIA, figura 1). Essa proteína é responsável por manter o NFKB retido no citoplasma e sua degradação permite a liberação do fator de transcrição (ainda sob a forma de dímeros) e sua translocação ao núcleo da célula para se ligar aos elementos responsivos no DNA (Kawai e Akira, 2006; Carmody e Chen, 2007; Lu e col., 2008). Esse é um ponto importante de regulação da expressão de genes ativados pelo LPS, pois se não ocorrer a fosforilação do *IkB-alfa* e se não houver a degradação proteossômica, o fator de transcrição NFKB não será translocado ao núcleo (Gosh e col., 1998). Há ainda uma alça de retroalimentação negativa que retira a ligação do NFKB ao DNA, e que ocorre num momento mais tardio. Algumas características desse mecanismo ainda precisam ser elucidadas, mas o que se sabe é que a ligação do NFKB ao elemento responsivo no DNA promove a transcrição do RNAm do *IkB-alfa*. Após sua tradução no citoplasma, a proteína *IkB-alfa* migra do citoplasma ao núcleo para sequestrar o fator de transcrição e inibir a cascata de ativação. Isto ocorre, pois a afinidade entre esta proteína ao NFKB é muito maior que a ligação do NFKB ao DNA (Gosh & Hayden, 2008).

O NFKB é um fator de transcrição central da resposta inflamatória em células imunocompetentes (tanto as periféricas como macrófagos, quanto no sistema nervoso central, como as células da glia). A ativação por estímulos inflamatórios como a citocina TNF (fator de necrose tumoral) ou LPS culmina na repressão ou transcrição de vários genes, levando as células a um estado ativado pronto para responder a injúria e também para gerar proteínas que na fase antiinflamatória induzem a finalização adequada

do processo (Meffert e Baltimore, 2005; Karin e Ben-Neriah, 2000).

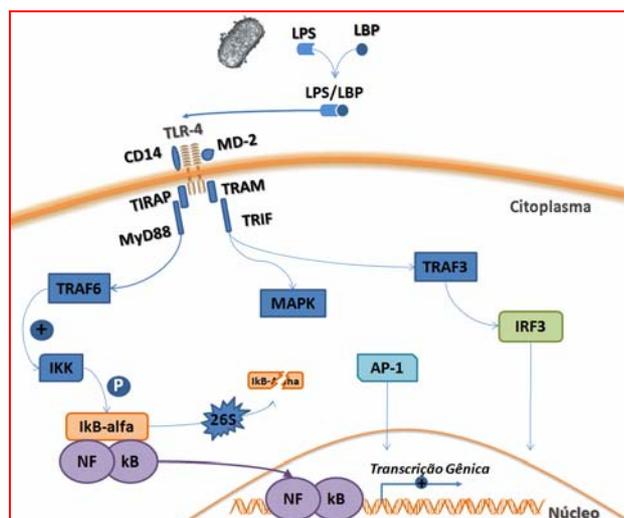


Figura 1 – Via clássica da ativação dos receptores por LPS e a ativação da translocação nuclear do NFkB e de outros fatores de transcrição. Maiores detalhes ao longo do texto (Baseado em Gosh e col., 1998; Raetz & Whitfield, 2002; Kawai e Akira, 2006; Carmody e Chen, 2007; Lu e col., 2008; Gosh & Hayden, 2008).

O organismo está preparado para detectar pequenas quantidades de LPS circulante para combater o foco infeccioso. Essa função é principalmente orquestrada por monócitos, que através de uma resposta imunológica inata passam a expressar diferentes moléculas. A participação do NFkB nessa cinética pode ser evidenciado, por exemplo, por mediar a transcrição de moléculas de adesão celular, como ICAM e PECAM, citocinas pró-inflamatórias como TNF, Interleucina 6 (IL-6), interleucina 1 (IL-1), enzimas como iNOS, COX-2, receptores como os de bradicinina do subtipo B1, e como já abordado anteriormente, a transcrição da proteína repressora IκB-alfa, o que resulta na auto-inibição do sistema (Gosh & Hayden, 2008). A produção dessas proteínas promove uma sinalização variada para outras células do organismo (por exemplo, células endoteliais, neutrófilos entre outras) permitindo o controle da resposta frente ao LPS. Entretanto, excesso de endotoxina circulante ou uma reação exacerbada pode levar a uma síndrome de resposta inflamatória sistêmica (Guha e Mackman, 2001). Na tabela 2 pode ser observada uma lista com os principais genes induzidos que o LPS induz em monócitos.

Citocinas	<i>TNF, IL-1, IL-6, G-CSF, GM-CSF, M-CSF</i>
Quimiocinas	<i>IL-8, MCP-1</i>
Fatores de Transcrição	<i>p50, c-Rel, IRF-1, Egr1</i>

Tabela 2 – Principais genes expressos por monócitos/macrófagos após estímulo com LPS (Baseado em Guha e Mackman, 2001).

A ação pleiotrópica do LPS e seu padrão de expressão multi-mediado possibilitam que as

células do organismo tenham a capacidade de gerar diferentes respostas (Bonizzi e Karin, 2004). Um exemplo desse mecanismo pode ser observado nos efeitos do LPS ao promover a produção da citocina TNF e aumentar a expressão dos receptores para essa proteína em diferentes tecidos (Shen e col., 2009). É bem conhecido que TNF é uma das primeiras citocinas produzidas durante um processo infeccioso e desse modo fica claro que o LPS ao atuar em seus receptores próprios, ativa uma cascata de sinalização intracelular para promover um efeito que não é apenas mediado diretamente, mas indiretamente pela regulação de um pacote de genes alvo que permite um efeito posterior em um mecanismo bem regulado e estereotipado. Acredita-se ainda que esses efeitos ocorram para amplificação e propagação do sinal gerado inicialmente, visto que TNF também é um regulador importante da atividade do fator de transcrição NFkB (Meffert e Baltimore, 2005).

Esse último exemplo evidencia que o principal alvo do LPS são as células de defesa do organismo. Entretanto nos últimos anos vem crescendo o número de trabalhos que demonstram que o LPS promove regulação da expressão gênica no sistema nervoso central (SNC). A febre é um bom exemplo desse efeito, pois substâncias pirogênicas agem proporcionando liberação de prostaglandinas que agem no centro termorregulador localizado no hipotálamo anterior, reconfigurando o limiar da termoregulação para uma temperatura mais alta e ao fazê-lo promove mecanismos de aumento de temperatura do corpo acima dos níveis homeostáticos. Experimentalmente, essa resposta surge minutos após injeção sistêmica de LPS, mesmo quando citocinas ainda não são detectadas na circulação (Rivest, 2003). Além disso, é bem conhecido que áreas do cérebro expressam os receptores TLR4 e CD14, como os órgãos circunventriculares (Laflamme e Rivest, 2001), regiões encefálicas peculiares localizadas no lúmen do terceiro e quarto ventrículo com alta vasculatura composta por capilares fenestrados. Nessas áreas, a comunicação do tecido nervoso com o sistema vascular é mais acessível, o que permite a passagem de moléculas que não atingem outras áreas do cérebro (Duvernoy e Risold, 2007). Nesses locais, LPS promove a transcrição de genes de citocinas como TNF, IL-6 e IL-1 (Rivest, 2003) receptor CD14 e a proteína inibitória IκB-alfa (Laflamme e Rivest, 2001). Em relação à funcionalidade dessa produção central de citocinas desencadeada pelo LPS as hipóteses principais sugerem que esse processo possa modular a excitabilidade neuronal, e processos de neurodegeneração e/ou neuroproteção (Rivest, 2003).

Recentemente foi evidenciado que os receptores TLR4 e CD14, além de reconhecer o LPS, possuem função de reconhecer substâncias

endógenas e estão envolvidas na neuroinflamação da doença de Alzheimer, visto que a ativação de células gliais no SNC depende da funcionalidade desses receptores e que a expressão desses receptores se co-localiza em áreas com formação de placas senis, característica dessa patologia (Walter et al., 2007). No entanto o que ocorre primeiro (neuroinflamação ou degeneração celular) não é totalmente claro (Rivest, 2003).

Em resumo, podemos concluir que a ativação da via de sinalização do NFkB pelo LPS ocorre de maneira estereotipada para a grande maioria dos tecidos e que os efeitos são decorrentes das subunidades do NFkB ativadas. Essa endotoxina é conhecida como potente ativadora de genes relacionados à resposta inflamatória aguda, como o TNF, uma das primeiras citocinas ativadas durante a fase pró-inflamatória. A possibilidade de gerar novas proteínas confere, portanto, a possibilidade de amplificação e perpetuação de um sinal inicialmente gerado pelo LPS. No entanto os sinais que chegam ao núcleo para finalizar essa sinalização são pouco compreendidos. Os efeitos dessa endotoxina não estão relacionados apenas à sinalização em células imunocompetentes periféricas, mas também com processos no SNC. O mais bem compreendido até o momento é a ativação da produção de citocinas em células gliais e neurônios dos órgãos circunventriculares. A participação dos receptores para LPS parecem ainda estar envolvidos no reconhecimento de substâncias endógenas no SNC e essa informação pode no futuro, ampliar a compreensão desse sistema e sua comunicação com o sistema imunológico.

De modo geral, o principal ponto de regulação da sinalização do LPS via NFkB é a regulação pós-translacional do adaptador citoplasmático I κ B-alfa que reprime o NFkB no citoplasma e o libera após o estímulo na membrana aivar a sua fosforilação e degradação proteossômica. Outros pontos na regulação da sinalização ativada pelo LPS ainda precisam ser elucidados, bem como mecanismos que favorecem NFkB como principal via ativada pelo LPS em grande parte dos tecidos. Experimentos que avaliem essas e outras perguntas serão necessários para elucidar os pontos de que regulam a sinalização ativada pelo LPS.

Agradecimentos. À Prof^a Lucile Maria Floeter-Winter.

Bibliografia

Akira, S., Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 4:499-511.
 Baeuerle, P.A., Baltimore, D. (1996). NF-kappa B: ten years after. *Cell*, 87, 13-20.
 Bonizzi, G., Karin, M. (2004). The two NF-kB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol*, 25, 280-288.

Carmody, R.J., Chen, Y.H. (2007). Nuclear Factor-kB: Activation and regulation during Toll-like receptor signaling. *Cellular & Molecular Immunology*. 4: 31-41.
 Chen, L.F., Green, W.C. (2004). Shaping the nuclear action of NF-kB. *Mol Cell Biol*, 5, 392-401, 2004.
 Duvernoy, H.M., Risold, P.Y. (2007). The circumventricular organs: An atlas of comparative anatomy and vascularization. *Brains Research Reviews*, 56, 119-147.
 Ghosh, S., Hayden, M.S. (2008). New regulators of NF-kappaB in inflammation. *Nat Rev Immunol*, 11, 837-848.
 Ghosh, S., Mary, M.J., Kopp, E.B. (1998). NF-kB and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol*, 16, 225-260.
 Guha, M., Mackman, N. (2001). LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cellular Signaling*, 13, 85-94.
 Hayden, M.S., Ghosh, S. (2004). Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev*, 18, 2195-2224.
 Karin, M., Ben-Neriah, Y. (2000). Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NFkB activity. *Annu Rev Immunol*, 18:621-663.
 Kawai, T., Akira, S. (2006). TLR signaling. *Cell Death and Differentiation*. 13:816-825.
 Laflamme, N., Rivest, S. (2001). Toll-like receptor 4: The missing link of the cerebral innate immune response triggered by circulating gram-negative bacterial cell wall components. *FASEB Journal*, 15, 155-163.
 Lu, Y.C., Yeh, W.C., Ohashi, P.S. (2008). LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*. 42: 145-151.
 Meffert, M.K., Baltimore, D. (2005). Physiological functions for brain NF-kB. *TRENDS in Neurosciences*. 28: 27-43.
 Nolan, G.P., Fujita, T., Bhatia, K., Huppi, C., Liou, H.C., Scott, M.L., Baltimore, D. (1993). The bcl-3 proto-oncogene encodes a nuclear I kappa B-like molecule that preferentially interacts with NF-kappaB p50 and p52 in a phosphorylation-dependent manner. *Mol Cell Biol*, 13, 3557-3566.
 Pahl, H.L., (1999). Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18: 6853-6866.
 Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.Y., Van Huffel, C., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B., Beutler, B. (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *tlr4* gene. *Science*. 282: 2085-2088.
 Raetz, C.R., Whitfield, C. (2002). Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem*. 71: 635-700.
 Rietschel, E.T., Kirikae, T., Shcde, F.U., Mamat, U., Schmidt, G., Loppnow, H., Ulmer, A.J., Zähringer, U., Seydel, U., Padova F.D., Schreier, M., Brade, H. (1994). Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J*. 8:217-225.
 Rivest, S. (2003). Molecular insights on the cerebral innate immune system. *Brain, Behavior and Immunity*, 17, 13-19.
 Shen, A., Zhou, D., Shen, Q., Liu, H.O., Sun, L.L., Liu, Y., Chen, J., Yang, J., Ji, Y., Cheng, C. (2009). The expression of Tumor Necrosis Factor - alpha (TNF-alpha) by the intrathecal injection of Lipopolysaccharide in the rat spinal Cord. *Neurochem Res*. 34: 333-341.
 Shimazu, R., Akashi, S., Ogata, H., Nagai, Y., Fukudome, K., Miyake, K., Kimoto, M. (1999). MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med*. 189: 1777-1782.
 Siebenlist, U. (1997). NF kappa B/I kappa B proteins. Their role in cell growth, differentiation and development. *Biochim Biophys Acta*, 1332, 7-13.
 Tuin, A., Vlag, A.H.V.D., Voenen-Weemaes A.M.M.A.V., Meijer, D.K.F., Poelstra K. (2006). On the role and fate of LPS-dephosphorylating activity in the rat liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 290: 377-385.
 Walter, S., Letiembre, M., Liu Y., Heine, H., Penke, B., Hao, W., Bode, B., Manietta, N., Walter, J., Schulz-Schaffer, W., Fabender, K. (2007). Role of Toll-like receptor 4 in neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Cell Physiol Biochem*, 20, 947-956.