

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

TESE DE DOUTORADO

**A SINALIZAÇÃO CELULAR DA LEPTINA ATRAVÉS
DA TIROSINA QUINASE Fyn**

Alessandra Girasol

Campinas

2009

i

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Alessandra Girasol

**A SINALIZAÇÃO CELULAR DA LEPTINA ATRAVÉS
DA TIROSINA QUINASE Fyn**

Tese apresentada à Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp para obtenção do título de Doutor em Fisiopatologia Médica, área de concentração: Biologia Estrutural, Celular, Molecular e do Desenvolvimento.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Lício Augusto Velloso

Campinas

2009

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

G442s Girasol, Alessandra
A sinalização celular da leptina através da quinase Fyn /
Alessandra Girasol. Campinas, SP : [s.n.], 2009.

Orientador : Lício Augusto Velloso
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Ciências Médicas.

1. Citocinas. 2. Hormônios. 3. Hipotálamo. 4. Sistema
imune. 5. Timo. I. Velloso, Lício Augusto. II. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês: The leptin cellular signaling through kinase Fyn

Keywords: • Cytokine
• Hormone
• Hypothalamus
• Immune system
• Thymus gland

Titulação: Doutor em Fisiopatologia Médica

**Área de concentração: Biologia Estrutural, Celular, Molecular e do
Desenvolvimento**

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Lício Augusto Velloso
Prof. Dr. Gabriel Forato Anhô
Profa. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud
Prof. Dr. Tiago Campos Pereira
Prof. Dr. Márcio Alberto Torsoni

Data da defesa: 30-11-2009

C,
R-637

Banca examinadora da tese de Doutorado

Alessandra Girasol

Orientador: Prof(a). Dr(a). Lício Augusto Velloso

Membros:

1. Prof(a). Dr(a). Lício Augusto Velloso
2. Prof(a). Dr(a). Gabriel Forato Anhô
3. Prof(a). Dr(a). Tiago Campos Pereira
4. Prof(a). Dr(a). Liana Maria Cardoso Verinaud
5. Prof(a). Dr(a). Marcio Alberto Torsoni

Handwritten signatures of the five members of the exam board, corresponding to the list provided. The signatures are written in black ink and are somewhat stylized.

Curso de pós-graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 30/11/2009

975600502

Dedicatória

Dedico esta tese aos meus pais, Izabel e Roberto,
meus maiores incentivadores.
E ao meu esposo, Sandro Augusto,
pelo apoio incondicional.
São as pessoas mais importantes da minha vida.

Agradecimento Especial

Ao meu orientador,
Prof. Dr. Lício Augusto Velloso

"A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original."

Albert Einstein.

Obrigada, professor, pela oportunidade.
Obrigada, pelo compartilhamento do seu conhecimento.
Obrigada, pelo direcionamento do meu trabalho.
Obrigada, pelo convívio sempre amistoso.
Obrigada, pelo exemplo de ética e dedicação.
Obrigada, pela confiança e amizade.
Muito obrigada!

Com imensa admiração

Lê

Agradecimento

Aos Amigos do Laboratório de Sinalização Celular,

“Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha,
é porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra.

Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha
e não nos deixa só,
porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós.

Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova
de que as pessoas não se encontram por acaso.”

Charlie Chaplin.

Sumário

Item	Página
Resumo	xii
Abstract	xiv
1 - Introdução	16
2 – Objetivos	31
2.1 - Objetivos gerais	32
2.2 - Objetivos específicos	32
3 - Capítulo 1 – Artigo	33
4 – Conclusão	42
5 - Referências Bibliográficas	44

Lista de Abreviaturas

Siglas

Akt	proteína serina quinase
ANOVA	análise de variâncias
AS	anti-sense
ASO	oligonucleotídeo anti-sense
BLAST	ferramenta de pesquisa de alinhamento
BSA	albumina sérica bovina
cDNA	ácido desoxirribonucléico complementar
DMEM	meio de cultivo celular Dulbecco
DNA	ácido desoxirribonucléico
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
FITC	fluoresceína isotiocianato isômero 1
FynAS	anti-sense da Fyn
GAPD	desidrogenase de gliceraldeído-3-fosfato
h	horas(s)
IL-1	interleucina 1
IL-1 β	interleucina 1 beta
IRS1	substrato 1 do receptor de insulina
JAK	<i>Janus Kinase</i>
kDA	quiloDalton
MAP-K	proteína quinase ativadora da mitogênese
MHC	complexo principal de histocompatibilidade
min	minuto(s)
MO	medula óssea
NCBI	Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia
<i>ob</i>	gene da leptina
ObR	receptor de leptina

PBS	solução tampão fosfato
PCR	reação em cadeia da polimerase
PI3-K	fosfatidilinositol 3-quinase
PMSF	fluoreto de fenilmetil sulfonila
PP2	inibidor de proteínas da família Src
PY	fosfotirosina
qPCR	PCR quantitativo
RNA	ácido ribonucléico
mRNA	ácido ribonucléico mensageiro
RT-PCR	reação em cadeia da polimerase em tempo real
SDS	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
SEM	erro padrão da média
Ser	serina
SFB	soro fetal bovino
SH2-B	proteína fosfatase de interação com JAK-2
Src	família de proteínas tirosina quinases
STAT	proteína transdutora de sinal e ativadora da transcrição
TNF α	fator de necrose tumoral alfa
TRIS	metano hidroximetilamina

Lista de Figuras

Figura	Página
1- Estrutura tridimensional da leptina humana	17
2 - Estrutura secundária da leptina humana	18
3 – Isoformas do receptor de leptina	20
4 – Vias de sinalização da leptina: JAK-2/STAT3 e IRS-1/PI-3K/Akt	22
5 – Domínios conservados das proteínas da família Src	29

Muitos dos efeitos da leptina no sistema imune dependem de sua capacidade de modular a expressão de citocinas e a apoptose no timo. Surpreendentemente, alguns desses efeitos são dependentes de transdução de sinal através do IRS1/PI3-quinase, mas independentes da ativação da JAK2. Uma vez que todos os efeitos conhecidos da leptina em diferentes tipos celulares e tecidos parecem ser dependentes da ativação da JAK2, nós aventamos a hipótese de que, pelo menos para o controle da função tímica, outra quinase, até então desconhecida, poderia mediar a transdução do sinal da leptina através do ObR e pela cascata de sinalização do IRS1/PI3-quinase. Neste trabalho, mostramos que a tirosina quinase Fyn está constitutivamente associada ao ObR em células tímicas. Após um estímulo agudo por leptina, a Fyn é rapidamente fosforilada em tirosina, ativando-se e associando-se ao IRS1 de forma transiente. Todos estes efeitos são independentes da ativação da JAK2, e com a inibição da Fyn a transdução de sinal através do IRS1/PI3-quinase é abolida. Além disso, a inibição da Fyn modifica significativamente os efeitos da leptina sobre a expressão de citocinas no timo. Sendo assim, no timo, a Fyn atua como uma tirosina quinase que transduz o sinal da leptina independentemente da ativação da JAK2, e medeia alguns dos efeitos imunomodulatórios da leptina neste tecido.

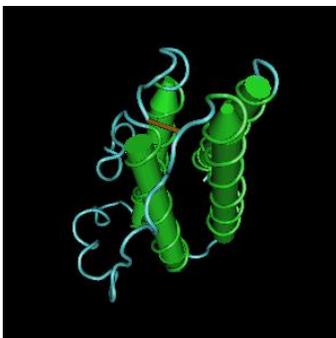
Abstract

Several effects of leptin in the immune system rely on its capacity to modulate cytokine expression and apoptosis in the thymus. Surprisingly, some of these effects are dependent on signal transduction through the IRS1/PI3-kinase, but not on the activation of JAK2. Since all the well known effects of leptin in different cell types and tissues seem to be dependent on JAK2 activation, we hypothesized that, at least for the control of thymic function, another, unknown kinase could mediate the transduction of the leptin signal from the ObR towards the IRS1/PI3-kinase signaling cascade. Here, we show that the tyrosine kinase Fyn is constitutively associated with the ObR in thymic cells. Following a leptin stimulus, Fyn undergoes an activating tyrosine phosphorylation and a transient association with IRS1. All these effects are independent on JAK2 activation and upon Fyn inhibition the signal transduction towards IRS1/PI3-kinase is abolished. In addition, the inhibition of Fyn significantly modifies the effects of leptin on thymic cytokine expression. Therefore, in the thymus, Fyn acts as a tyrosine kinase that transduces the leptin signal independently of JAK2 activation, and mediates some of the immunomodulatory effects of leptin in this tissue.

1 - Introdução

Biologia da leptina

A leptina é uma proteína não glicosilada de 16-kDA, codificada pelo gene *ob*, o qual está localizado no cromossomo 7 humano, no cromossomo 6 de camundongos [1], e no cromossomo 4 em ratos. Contém 167 aminoácidos, possui similaridade estrutural com a família das citocinas e é predominantemente produzida pelos adipócitos do tecido adiposo branco [2]. Alguns estudos, revelaram ainda sua expressão em outros tecidos, incluindo placenta, ovários, músculo esquelético, estômago, pituitária e fígado [3]. Estruturalmente a leptina é uma proteína de cadeia longa contendo 4 α -hélices, semelhante ao hormônio de crescimento, prolactina, eritropoietina, interleucina (IL)-3, IL-11, IL-12, oncostatina M, e fator estimulante de colonização de granulócitos (G-CSF) [4,5]. A leptina humana possui 67% de sua seqüência homóloga à diversas outras espécies, como gorilas, chimpanzés, orangotangos, macacos rhesus, cachorros, bovinos, porcos, ratos e camundongos [4]. Esta proteína é produzida pelo tecido adiposo branco em relação proporcional direta à massa corporal deste tecido [6]. Classicamente a leptina é considerada um hormônio, pois regula o balanço entre a ingestão alimentar e o gasto energético, sinalizando para o cérebro as alterações da energia armazenada. Seus níveis séricos estão diretamente relacionados aos estoques de gordura de um organismo, aumentando com o acúmulo de gordura e diminuindo durante jejum [1].



<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/mmdb/mmdbsrv.cgi?uid=55396>

Figura 1 - Estrutura tridimensional da leptina humana.

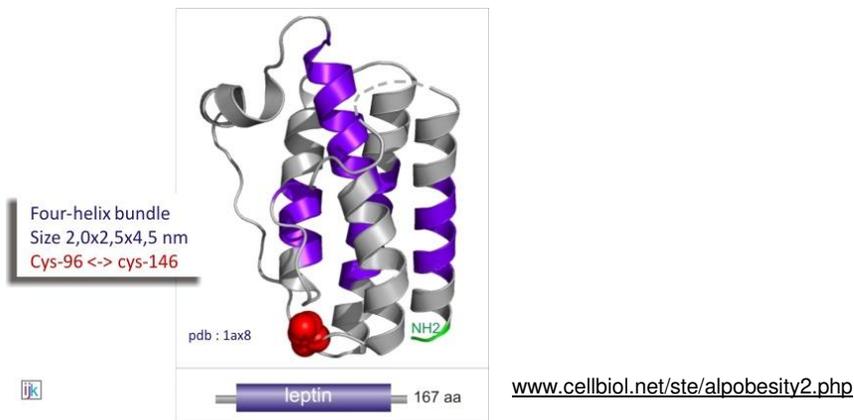


Figura 2 - Estrutura secundária da leptina humana. Aminoácidos altamente conservados (presentes em humanos, gorilas, chimpanzés, orangotangos, macacos rhesus, cachorros, vacas, porcos, ratos e camundongos) são demonstrados em roxo.

Função da leptina

A leptina é um dos principais hormônios implicados na regulação da ingestão alimentar e do gasto energético [7]. Após atravessar a barreira hematoencefálica, a leptina age em neurônios localizados em núcleos hipotalâmicos responsáveis pela regulação do apetite e do gasto de energia, sinalizando a presença de uma reserva excessiva de energia, o que leva a uma diminuição da ingestão alimentar e a um aumento do dispêndio energético [8-9]. Por outro lado, durante a restrição alimentar ocorre diminuição na produção desta e assim, ativa-se a sinalização que favorece a busca por um maior aporte nutricional [10].

Além do controle do peso, os animais homeotérmicos mantêm a temperatura corporal relativamente estável, a despeito da variação da temperatura externa. Tal fenômeno é dependente da atividade de neurônios específicos localizados em núcleos hipotalâmicos de regulação da temperatura corpórea, fenômeno esse que depende da participação da leptina. O alimento ingerido é utilizado como substrato para a produção de energia necessária tanto para o metabolismo como para a produção de calor [11].

Além dos efeitos neuroendócrinos da leptina, a ação deste hormônio já foi observada em outros órgãos e tecidos como os pulmões, intestino, rins, fígado,

pele, estômago, coração, baço e outros órgãos [12], sugerindo assim uma ação pleiotrópica. Isto inclui, por exemplo, a ação direta da leptina na regulação de células imunes, células beta pancreáticas [1], adipócitos [13], células musculares e sanguíneas [14,15]. Desta maneira, a leptina parece agir como um fator endócrino e parácrino na regulação da puberdade e reprodução, afetando as funções maternas, e fetais; na modificação da sensibilidade à insulina no músculo e no fígado; na prevenção da deposição ectópica de lipídeos; e, na associação dos sistemas endócrino e imune no contexto da reparação da pele [2]. Ainda, a leptina funciona como um marcador de dimorfismo sexual, sendo mais elevada em mulheres do que em homens com massas de gordura corporal similares [16].

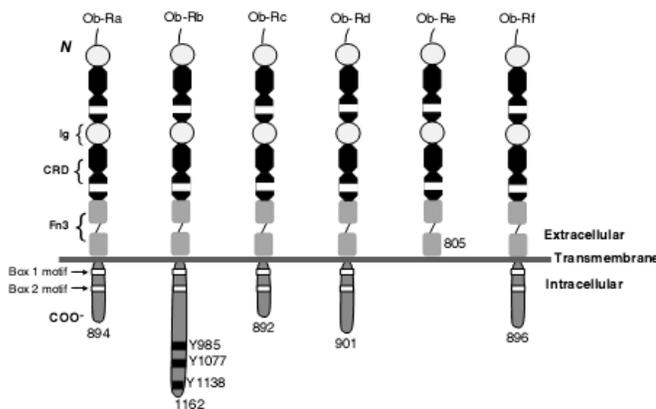
Regulação da leptina

A expressão gênica da leptina é regulada dentro do contexto do estado hormonal e nutricional. Os níveis de mRNA do gene *ob* no tecido adiposo branco e os níveis de leptina circulante são intimamente associados com a quantidade de massa de gordura, o que já foi demonstrado em humanos e roedores [17,18]. Os valores de leptina sérica são significativamente maiores em fêmeas do que em machos após correção para a gordura corporal total [19], e exibe um padrão circadiano com pico noturno [20]. Os níveis de leptina plasmática são notavelmente diminuídos pelo jejum ou restrição alimentar, e são rapidamente restabelecidos durante a re-alimentação [17,18]. A expressão da leptina pode ainda ser elevada pelas ações da insulina, glicose, estrogênios, glicocorticóides, TNF- α e IL-1, e em condições de função renal deficitária e processos inflamatórios agudos. Um decréscimo na quantidade de leptina é observado ainda em resposta a agonistas de receptores beta-adrenérgicos, andrógenos, exposição ao frio, tiazolidinodionas e ao fumo [21].

O receptor da leptina

A sinalização da leptina depende de sua ligação a um receptor monomérico trans-membrana da família dos receptores de citocina da classe I [22], a qual ainda agrupa receptores para IL-2, IL-6, IL-12, entre outros [23-25].

Seis diferentes formas protéicas deste receptor foram descritas, sendo chamadas de ObRa-ObRf [26,13]. As seis formas são codificadas por um único gene presente no lócus 1p31 (cromossomo 1 humano; Gene ID 3953/www.ncbi.nlm.nih.gov) sendo resultantes de diferentes “*splicings*” [12,13]. Em camundongos, o gene se localiza no cromossomo 4 e em ratos no cromossomo 5 [27]. Todas as isoformas apresentam domínio de ligação extracelular idêntico [12], no entanto apenas o ObRb, conhecido por forma longa, contém vários sítios intracelulares necessários para a transdução de sinal. As demais isoformas carecem de alguns ou todos estes sítios [1].



www.nature.com/.../n10/thumbs/0803025f2th.jpg

Figura 3 – Isoformas do receptor de leptina. Representação das seis isoformas conhecidas para o receptor de leptina, denominadas de ObRa à ObRf.

Em todas as espécies, as isoformas do ObR podem ser divididas em três classes: isoformas longa, curta e solúvel [28]. A função da isoforma curta (ObRa) do receptor de leptina é pouco conhecida. O ObRa tem capacidade de sinalização demonstrada em células COS transfectadas, mas somente através da ativação da JAK2 e do substrato I do receptor de insulina (IRS-1) dependente de leptina [29]. A expressão desta isoforma é constitutiva nos tecidos humanos, e sua função proposta inclui o transporte de leptina através da barreira hematoencefálica. O ObRe é truncado antes do domínio transmembrana e circula como um receptor solúvel (sObR), o que representa a principal atividade ligante à leptina no sangue humano [30]. Complexos de leptina com sObR ocorrem numa

proporção molecular de 1:1 [31]. A isoforma sObR funcional modula os níveis de leptina por associação à leptina livre presente na circulação, prevenindo que este hormônio seja degradado ou submetido ao clearance [32,33]. No entanto, altos níveis de sObR no sangue, como determinados em humanos magros ou anoréxicos, devem servir como um reservatório potencial de leptina bioativa [34,35]. Ainda, foi demonstrado por alguns grupos que, níveis de sObR aumentados em duas vezes ou mais podem suprimir a ação da leptina em células [36,37], e portanto o seu excesso poderia desempenhar uma função no desenvolvimento ou na progressão da resistência à leptina em tecidos periféricos [2]. Nenhum dos membros da família de receptores da classe I de citocinas possui atividade catalítica intrínseca, sendo constitutivamente ligados a uma proteína citosólica com atividade quinase, pertencente à família Janus [29], sendo que o ObR associa-se à JAK2. A isoforma longa (ObRb) é considerada a principal isoforma pelo fato de ser a única capaz de transmitir o sinal da leptina através da via completa da JAK/STAT (janus quinase 2 e transdutores-de-sinal-e-ativadores-de-transcrição 3, 5 e 6) [28]. O ObRb é expresso em todo o corpo, tendo sido localizado no hipotálamo, monócitos, linfócitos, células beta pancreáticas, enterócitos, células endoteliais de músculo liso, entre outros tipos celulares [38].

A associação da leptina ao seu receptor

A ligação da leptina ao seu receptor promove o recrutamento de outra unidade de receptor, formando assim uma estrutura transitoriamente dimérica [39]. A modificação conformacional induzida pela ligação da leptina e pela dimerização de receptores induz a atividade catalítica da enzima JAK2 associada, a qual se autofosforila em vários resíduos tirosina, tornando-se assim ativa para que a seguir fosforile e ative a outra molécula de JAK2 ligada ao segundo receptor [40]. Subseqüentemente as JAK2 ativas catalisam a fosforilação dos receptores ObRb nas tirosinas 985 e 1138 [41]. Desta forma criam-se três sítios ativos que darão continuidade ao sinal da leptina. O primeiro sítio encontra-se na molécula de JAK2 fosforilada. Este sítio promove o recrutamento e a fosforilação das proteínas da família dos substratos do receptor de insulina (IRSs) [42]. Os IRSs (principalmente

IRS-2) fosforilados são responsáveis pela ativação da enzima fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) que desempenha um papel relevante na transdução do sinal da leptina em direção ao controle do ritmo de disparos neuronais, o que, em última instância, regula a liberação de neurotransmissores relacionados ao controle da fome e da termogênese nos terminais sinápticos [43]. O segundo sítio encontra-se na adjacência do resíduo tirosina 985 fosforilado no ObRb. Este sítio é responsável pelo recrutamento e ativação da enzima SHP-2 (proteína tirosina fosfatase contendo o domínio SH2), a qual atua como intermediário na ativação de p21ras e da via MAP quinase (MAPK, mitogen-activated protein kinase) culminando com a ativação das ERKs (extracellular-signal-regulated kinase) que desempenham papel ainda pouco conhecido no controle da expressão gênica neuronal controlada pela leptina [44]. Através dessas vias, é possível que haja uma integração entre a sinalização da leptina e um complexo sistema intracelular de “cross-talk” que regula funções tais como crescimento celular, mitogênese, metabolismo e apoptose [7,45,46]. Por fim, o terceiro sítio encontra-se nas adjacências da tirosina 1138 do ObRb fosforilado. Este sítio promove o recrutamento de moléculas da família de transdutores-de-sinal-e-ativadores-de-transcrição (STATs, predominantemente STAT-3), responsáveis por conduzir o sinal gerado pela leptina ao núcleo onde coordenarão a transcrição de genes de neurotransmissores responsivos ao sinal hormonal [47].

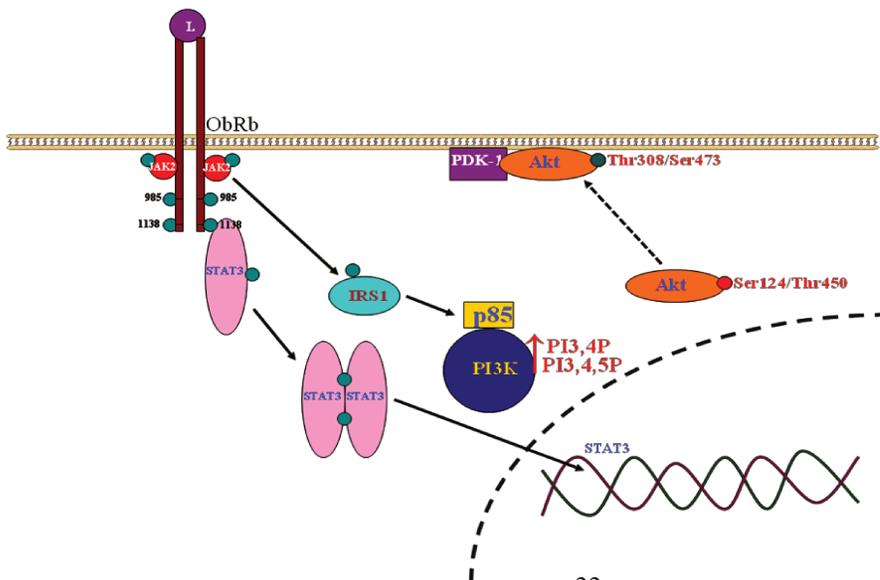


Figura 4 – Vias de sinalização da leptina: JAK-2/STAT3 e IRS-1/PI-3K/Akt.

Várias evidências têm demonstrado que a via de sinalização JAK/STAT de citocinas está sob controle de retroalimentação negativa por proteínas SOCS (supressores da sinalização de citocinas) [48,49]. Membros da família SOCS, que contém um domínio SH2, são induzíveis por uma variedade de citocinas, atuando como um regulador negativo destas vias de sinalização. Já foi demonstrado que a leptina é capaz de induzir a expressão de SOCS3 [40,48,50]. O recrutamento de STAT-3 pelo sítio Tyr¹¹³⁸ do receptor de leptina e sua subsequente fosforilação pela JAK2, leva a dimerização destes transdutores-de-sinal-e-ativadores-de-transcrição que então se translocam para o núcleo, onde induzem a expressão de SOCS3 e POMC (pró-opiomelanocortina – precursor de neurotransmissor anorexigênico), enquanto que inibem a expressão de AgRP (agouti-related peptide – neurotransmissor orexigênico). As proteínas SOCS inibem a sinalização da leptina através de sua ligação com a JAK2, indisponibilizando-a, promovendo assim um mecanismo de retroalimentação negativa no sistema de sinalização da leptina. As proteínas SOCS podem ainda interagir diretamente com ERKs, os quais, quando fosforilados, levam à expressão de genes alvo, como o c-fos e o egr-1, que participam da proliferação e diferenciação celular [51].

A leptina e o sistema imune

O sistema imune requer suprimento energético balanceado e adequado para otimização de suas funções [52]. O estado nutricional atua como fator determinante na resposta imune e tal efeito é, pelo menos parcialmente, modulado pela leptina [53]. Revela-se assim a função imunológica da leptina que atua como uma citocina. As citocinas são proteínas secretadas por células do sistema imune inato e adaptativo, e também por muitas outras células do organismo em situações nas quais há interação ou regulação da resposta imune. Dentre suas múltiplas funções destaca-se sua propriedade de interligar as células do sistema imune para favorecer uma resposta imune integrada [25]. A leptina parece atuar como elo entre o estado nutricional e o controle da atividade do sistema imune [46]. Este

hormônio apresenta um efeito imuno-modulatório nos sistemas imunes inato e adaptativo [54], regulando diferentes facetas da resposta imune, como, por exemplo, promovendo maior atividade e proliferação das células T periféricas [55,56], ativando a resposta de monócitos [57,58], regulando a produção de citocinas [59] e modulando a resposta imune na auto-imunidade [60]. No sistema imune inato a leptina modula a atividade de neutrófilos, aumenta a fagocitose por monócitos/macrófagos e melhora a secreção de mediadores inflamatórios na resposta de fase aguda [23,54]. No sistema imune adaptativo, a leptina pode induzir a linfopoiese em camundongos [55] e ainda prover um sinal de sobrevivência para os timócitos duplo positivos $CD4^+/CD8^+$ e monopositivos $CD4^+/CD8^-$ durante a maturação de linfócitos-T [56].

Ambos os extremos da disfunção nutricional, como a desnutrição e a obesidade, são conhecidos por predispor o sistema imune a diversas formas de disfunção, incluindo a imunodeficiência, a predisposição aumentada para doenças inflamatórias e autoimunes e até mesmo o desenvolvimento de certos tipos de câncer [61-64]. Um dos aspectos mais marcantes da desnutrição é a atrofia do timo e o desenvolvimento de imunossupressão [57,58]. O timo é um órgão formado por dois lobos, situado no mediastino anterior. Cada lobo é dividido em múltiplos lóbulos por septos fibrosos e cada lóbulo consiste em um córtex externo e uma medula interna. O córtex contém uma densa coleção de linfócitos T, enquanto a medula possui uma população mais esparsa de linfócitos. Este tipo celular é o principal controlador da imunidade adaptativa, e tem sua origem a partir de células-tronco derivadas da medula óssea (MO) que colonizam o timo. A MO e o timo são órgãos linfóides primários, sendo que na MO há a produção e maturação dos linfócitos B e no timo há a maturação dos linfócitos T. O timo tem um suprimento vascular abundante e vasos linfáticos eferentes que drenam para os linfonodos do mediastino. Os linfócitos no timo, também chamados de timócitos, são linfócitos T em vários estágios de desenvolvimento. Em geral, as células mais imaturas da linhagem de células T entram no córtex da glândula através dos vasos sanguíneos. O desenvolvimento começa no córtex e, conforme os timócitos vão se desenvolvendo, migram para a medula, de forma que esta

contém principalmente células T em estágios mais avançados de desenvolvimento. Somente as células T desenvolvidas deixam o timo e entram no sangue e nos tecidos linfóides periféricos [25].

A deficiência nutricional causa um desarranjo da arquitetura normal do timo e reduz o número de timócitos corticais através do aumento da taxa de apoptose [56]. Além disto, a desnutrição crônica promove uma queda nos níveis de leptina [59], e este fenômeno tem sido apontado como possível participante da indução da anormalidade da morfologia e da função do timo observadas durante estados de privação nutricional [56]. Como dito anteriormente, nos últimos anos tem sido demonstrada a participação da leptina na modulação de várias funções imunológicas [50]. Os mecanismos envolvidos na regulação da função imune dependente de leptina incluem a capacidade deste hormônio/citocina em inibir a apoptose tímica e em modular a expressão de citocinas no timo [50,56,59,65-67].

A apoptose é um processo de morte celular programada caracterizado por clivagem de DNA, condensação e fragmentação nuclear, vesiculação da membrana plasmática, mudança na distribuição lipídica da membrana e destacamento da célula da matriz extracelular. Isso resulta na fagocitose da célula. O que diferencia a apoptose da necrose é que nesta última há uma ruptura da membrana celular liberando o seu conteúdo, e resultando num processo inflamatório, enquanto que na apoptose não há evidência de inflamação [68]. A indução da apoptose em timócitos pode ocorrer de duas formas. A primeira é por negligência, ocorrendo por perda ou ausência de estímulos de sobrevivência. No timo, essa forma de apoptose ocorre quando os timócitos não são salvos da morte durante o processo de seleção positiva. A segunda forma de apoptose de timócitos é induzida ativamente através da sinalização via receptores de membrana indutores de morte que são expressos após a ativação dos timócitos. Essa forma de apoptose é desencadeada quando os timócitos auto-reativos são confrontados com auto-antígenos, durante a seleção negativa [25].

A função da leptina na inflamação permanece incompletamente compreendida. Modelos animais deficientes em leptina são protegidos dos efeitos tóxicos da inflamação mediada pelo sistema imune inato [69-72]. O mecanismo

envolvido neste presumido efeito antiinflamatório em organismos deficientes em leptina é desconhecido, mas um desequilíbrio entre citocinas pró-inflamatórias (não alteradas) e anti-inflamatórias (redução de IL-10 e antagonista de IL-1R) tem sido observado [69], aumentando a possibilidade de que a leptina possa modificar a produção de citocinas anti-inflamatórias pelos monócitos/macrófagos através da ativação da STAT-3 [73].

Sabe-se que as citocinas da família IL-6, incluindo o fator inibitório de leucemia, a oncostatina M e a própria IL-6 são mediadores críticos da involução tímica associada à idade e ao choque-séptico, e que o tecido adiposo do timo pode produzir tais citocinas [74,75]. Muitas citocinas exercem efeitos na indução de leptina, e de forma reversa, sabe-se que a leptina apresenta vários efeitos no controle da expressão de diversas citocinas [76].

O TNF- α , fator de necrose tumoral, é o principal mediador da resposta inflamatória aguda a bactérias Gram-negativas e outros microrganismos infecciosos, sendo responsável por muitas das complicações sistêmicas observadas em infecções graves. A principal fonte celular de TNF- α é constituída por fagócitos mononucleares ativados, embora células T estimuladas por antígeno, células NK e mastócitos também possam secretar tal proteína. A família TNF de proteínas inclui citocinas secretadas e proteínas de membrana que compartilham homologias na sequência e se enovelam em complexos homotriméricos triangulares/piramidais, os quais se ligam a receptores de superfície estruturalmente semelhantes. A principal função biológica do TNF- α é estimular o recrutamento de neutrófilos e monócitos para locais de infecção e ativar essas células para erradicar microrganismos. Em infecções graves, o TNF- α é produzido em grandes quantidades e causa distúrbios sistêmicos, podendo até mesmo atuar como um hormônio modulando a atividade endócrina em vários órgãos [25].

A interleucina-1 (IL-1) apresenta função semelhante à do TNF, atuando como mediadora da resposta inflamatória do hospedeiro a infecções e outros estímulos inflamatórios. Ela age juntamente com o TNF na imunidade inata e na inflamação. Sua principal fonte celular, assim como a de TNF, são fagócitos

mononucleares ativados, porém, diferentemente deste, também é produzida por muitos tipos celulares que não macrófagos, tais como neutrófilos, células epiteliais (p. ex., queratinócitos) e células endoteliais. Existem duas formas de IL-1, chamadas de IL-1 α e IL-1 β , que são menos de 30% homólogas uma à outra, mas se ligam a receptores de superfície celular e medeiam atividades biológicas semelhantes. A maior parte da IL-1 encontrada na circulação é IL-1 β . Os efeitos biológicos da IL-1 são semelhantes aos do TNF e dependem da quantidade de citocina produzida. Em baixas quantidades, a IL-1 atua como um mediador da inflamação local. Quando em maiores quantidades, entra na corrente sanguínea e exerce efeitos endócrinos, induzindo febre, síntese de proteínas plasmáticas de fase aguda pelo fígado e desgaste metabólico (caquexia), assim como o faz também o TNF [25].

A IL-1 β e o TNF- α são capazes de, independentemente, induzir um aumento nos níveis de leptina endógena [77]. Especificamente, a IL-1 β tem sido considerada como um mediador da indução de leptina, uma vez que a estimulação de leptina por LPS (lipopolissacarídeo) e outras citocinas é inibida em camundongos “*knockout*” para a IL-1 β [77]. Além disso, muitas citocinas pró-inflamatórias são reguladas pela leptina, incluindo-se IL-12, IL-6, TNF- α [78,79], e INF- γ [70,78]. Portanto, o fato da produção da leptina ser aumentada em resposta à LPS sugere ainda um importante papel regulatório para este hormônio na inflamação e no choque induzido por LPS [69,80].

A leptina e a família de tirosina quinases Src

Em um estudo anterior realizado por membros do nosso grupo [66] observou-se que a leptina exerce um efeito anti-apoptótico no timo de ratos jovens, e que este efeito é mediado pela cascata de sinalização da IRS-1/PI3-quinase/Akt, mas independente da ativação pela JAK. Uma vez que o receptor de leptina ObRb não possui atividade tirosina quinase intrínseca, suspeitou-se que deveria haver outra quinase, que não fosse da mesma família da JAK, e que estaria atuando como intermediário entre o receptor de leptina e o recrutamento da proteína IRS-1. Um estudo recente [81] revelou que, em um sistema celular

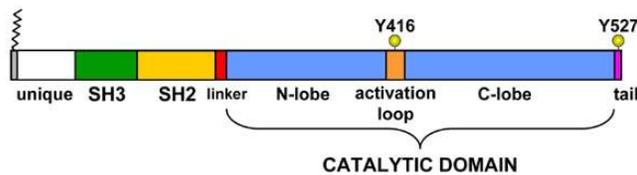
isolado, proteínas da família Src podem ser ativadas em resposta à leptina de uma maneira independente da JAK2.

Para explorar a possibilidade de que o sinal da leptina pudesse ser transduzido por membros da família Src, realizou-se um experimento piloto no qual ratos foram agudamente tratados com leptina e a fosforilação em tirosina de membros da família Src (Lck, Fyn e Src) foi avaliada por imunoblot. Tal piloto revelou que, apesar de todas as três quinases serem fosforiladas em resposta à leptina, a Fyn foi a que respondeu em menor tempo e com maior intensidade.

A família Src de proteínas e a tirosina quinase Fyn

A Fyn é uma tirosina quinase citoplasmática pertencente à família Src [82,83]. Sua expressão já foi observada no fígado, pulmão, rim, epitélio de glândula mamária, intestino e pâncreas, incluindo as ilhotas pancreáticas [84,85]. A família Src de proteínas tirosina quinases é um grupo composto por nove enzimas, Src, Fyn, Yes, Lck, Hck, Fgr, Lyn, Blk, e Yrk, que são ancoradas à face citoplasmática de membranas através da região amino-terminal de seus ácidos graxos [86], compondo o principal grupo de transdutores de sinais celulares [87,88]. Estas tirosina quinases podem ser ativadas por vários sinais extracelulares, através de receptores tirosina quinases, integrinas, receptores acoplados à proteína G, receptores Fc e de antígenos, e receptores citocinas. Podem modular uma grande variedade de funções intracelulares tanto em células imunes quanto em células não-hematopoiéticas, incluindo proliferação, diferenciação, sobrevivência, adesão, alterações morfológicas e migração celular [88]. Já foi demonstrada a participação de quinases da família Src na sinalização do sistema imune inato, na resposta a citocinas, a fatores de crescimento, a reguladores de apoptose, a reguladores da sinalização de antígenos, a estimulação de células por complexos imunológicos, na fagocitose, na resposta à estimulação de adesão (sinalização de integrinas), a controladores de canais de K/Cl, e a proteínas das vias de sinalização acopladas à proteínas G [89-96]. Além disso, revelou-se que há necessidade da atividade das quinases da família Src para o correto desenvolvimento de linfócitos T e B [97,98].

Estruturalmente a família Src de tirosina quinases contém um ou mais sítios de acilação amino-terminal, necessários para a localização na membrana, um domínio específico, o qual define membros individuais, um domínio homólogo Src 3 (SH3), que reconhece ligantes ricos em prolina, um domínio SH2, que reconhece ligantes ricos em fosfo-tirosina, um domínio catalítico e uma seqüência regulatória carboxi-terminal [86,99].



www.hxms.neu.edu/research/chime/Fig5.JPG

Figura 5 – Domínios conservados das proteínas da família Src.

Muitas das proteínas desta família são expressas como duas proteínas devido à padrões de “*splicing*” alternativos ou pelo uso de códons iniciadores alternativos. Exemplos incluem a Src [100], Fyn, Lyn [101] e Hck [102]. A Fyn sofre “*splicing*” alternativo e passa a conter um sétimo éxon único, codificando a região unificadora entre os domínios SH2 e o que confere atividade quinase, a qual é diferente entre células T e neurônios [103]. A função diferencial destas isoformas não está bem estabelecida, embora já tenha sido sugerido diferenças na utilização de substrato ou na localização sub-celular [100,104]. A cristalografia destas tirosina quinases revelou que a atividade quinase é regulada pela formação e rompimento de interações intramoleculares envolvendo os domínios SH2 e SH3 [105,106]. O domínio quinase propriamente dito contém dois resíduos críticos: um sítio de auto-fosforilação que é necessário para a ativação da quinase, e um resíduo de tirosina C-terminal que regula negativamente a atividade da enzima por ligar-se ao domínio SH2 e posicionar a quinase em uma conformação fechada e inativa. Este resíduo C-terminal é um ponto crítico para a regulação da atividade de quinases da família Src. Esta fosforilação é proporcionada principalmente pela quinase Csk, e a desfosforilação do resíduo é obtida, pelo menos em células imunes, pela ação principal da fosfatase CD45. A Csk é um importante e potente

regulador negativo das quinases da família Src em todas as células. Esta enzima é recrutada para a membrana pela proteína adaptadora Cbp/PAG, através de interação entre fosfo-tirosina e SH2, na qual a própria Cbp/PAG é fosforilada por quinases da família Src. Isso configura um mecanismo pelo qual a própria quinase da família Src pode modular negativamente sua própria atividade quinase pelo recrutamento de um regulador negativo [107]. É ainda importante mencionar que a Cbp/PAG está localizada em regiões estratégicas da membrana onde a Csk pode atuar diretamente sobre as quinases da família Src [108].

Através de um mecanismo dependente da associação física, membros da família Src podem conferir atividade quinase à receptores que não apresentem intrinsecamente esta função, mas ainda podem também se ligar a receptores que possuam atividade tirosina quinase [109]. Desta maneira, e devido ao fato da tirosina quinase Fyn estar envolvida em várias funções imunológicas [110-113], decidimos concentrar nossos esforços em explorar a função desta proteína nas ações da leptina no timo. A possibilidade de se encontrar outra tirosina quinase, que não fosse da mesma família da JAK, intermediando o sinal gerado pela leptina entre o receptor ObR e o recrutamento da proteína IRS-1, poderia abrir novos caminhos na compreensão da sinalização e ação da leptina em vários tecidos.

2 - Objetivos

2.1 - Objetivos gerais

- Avaliar a participação da proteína tirosina quinase Fyn na transdução de sinal através do receptor de leptina em timo.

2.2 - Objetivos específicos

- Avaliar a capacidade da leptina em ativar a tirosina quinase Fyn no timo;
- Avaliar se há associação entre a proteína Fyn e o receptor ObRb;
- Havendo associação, determinar qual a provável região do ObRb está envolvida neste evento;
- Avaliar se a Fyn transduz o sinal da leptina através da via do IRS1;
- Promover a inibição da Fyn e avaliar os seus efeitos sobre a apoptose dos timócitos;
- Promover a inibição da Fyn e avaliar os seus efeitos sobre o padrão de expressão de citocinas do timo frente ao tratamento dos ratos com LPS.

3 – Capítulo 1

Fyn Mediates Leptin Actions in the Thymus of Rodents

Alessandra Girasol¹, Gabriela G. Albuquerque¹, Eli Mansour¹, Eliana P. Araújo², Giovanna Degasperì¹, Raphael G. Denis¹, José B. Carnevalheira¹, Mário J. Saad¹, Lício A. Velloso^{1*}

1 Department of Internal Medicine, University of Campinas, Campinas, Brazil, **2** Department of Nursing, University of Campinas, Campinas, Brazil

Abstract

Background: Several effects of leptin in the immune system rely on its capacity to modulate cytokine expression and apoptosis in the thymus. Surprisingly, some of these effects are dependent on signal transduction through the IRS1/PI3-kinase, but not on the activation of JAK2. Since all the well known effects of leptin in different cell types and tissues seem to be dependent on JAK2 activation, we hypothesized that, at least for the control of thymic function, another, unknown kinase could mediate the transduction of the leptin signal from the ObR towards the IRS1/PI3-kinase signaling cascade.

Methodology/Principal Findings: Here, by employing immunoblot, real-time PCR and flow cytometry we show that the tyrosine kinase, Fyn, is constitutively associated with the ObR in thymic cells. Following a leptin stimulus, Fyn undergoes an activating tyrosine phosphorylation and a transient association with IRS1. All these effects are independent of JAK2 activation and, upon Fyn inhibition, the signal transduction towards IRS1/PI3-kinase is abolished. In addition, the inhibition of Fyn significantly modifies the effects of leptin on thymic cytokine expression.

Conclusion/Significance: Therefore, in the thymus, Fyn acts as a tyrosine kinase that transduces the leptin signal independently of JAK2 activation, and mediates some of the immunomodulatory effects of leptin in this tissue.

Citation: Girasol A, Albuquerque GG, Mansour E, Araújo EP, Degasperì G, et al. (2009) Fyn Mediates Leptin Actions in the Thymus of Rodents. PLoS ONE 4(11): e7707. doi:10.1371/journal.pone.0007707

Editor: Sérgio Teixeira Ferreira, Federal University of Rio de Janeiro, Brazil

Received: September 4, 2009; **Accepted:** October 13, 2009; **Published:** November 3, 2009

Copyright: © 2009 Girasol et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: lavelloso@fcm.unicamp.br

Introduction

Both sides of extreme nutritional dysfunction, i.e., malnutrition and obesity, are known to predispose to anomalous immune activities, which include immunodeficiency, increased predisposition to inflammatory and autoimmune diseases and development of certain types of cancer [1–4]. During the last ten years, a number of studies have provided strong evidence to support a role for leptin as a link between the metabolic and immune systems [5,6]. Leptin was first characterized as a hormone responsible for providing adipostatic signals to the hypothalamus, therefore warranting the homeostatic control of body energy stores [7]. Later, an immunomodulatory role for leptin was described [8] which explained, at least in part, the defective regulation of immune response in mice [9] and humans [10] with leptin or leptin-receptor deficiency.

The mechanisms involved in leptin-dependent regulation of immune function include the capacity of leptin to inhibit thymic apoptosis and the modulation of thymic cytokine expression [5,11,12]. In young rodents, leptin can reduce up to 30% of basal thymic apoptosis [11]. This effect is dependent on the expression of the long form of the ObR, but not on the activation of the receptor-associated tyrosine kinase JAK2 [11]. Interestingly, upon inhibition of the docking protein, IRS1, or the enzyme, PI3-kinase, most of the apoptosis-inhibiting effect of leptin is suppressed [11]. Since the ObR, as a member of the class I cytokine receptor family, is devoid of intrinsic tyrosine kinase activity, we suspected

that an as yet unknown tyrosine kinase is activated in the response to leptin, mediating the transduction of the signal from the ObR to the IRS1/PI3-kinase/Akt pathway, and therefore modulating thymic function.

Here, we show that the tyrosine kinase Fyn, associates with the ObR and delivers a leptin-dependent immunomodulatory signal in the thymus of rodents.

Materials and Methods

Materials and Chemicals

Antibodies against JAK-2 (sc-278), Fyn (sc-16), Lck (sc-13), Src (sc-180), pJAK-2 (sc-16566), pSTAT3 (sc-7993), SHP2 (sc-424), phosphotyrosine (sc-508), IRS-1 (sc-559), ObR (sc-8325), pERK (sc-7383), Bcl-2 (sc-492), Bax (sc-493), rabbit IgG-B (sc-2040), mouse IgG-B (sc-2039) and goat IgG-B (sc-2042) were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Antibodies against p-Src family Tyr416 (2101L) and p-Src family Tyr 527 (2105L) were from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA). Protein A Agarose and nitrocellulose paper (Hybond ECL, 0.45 µm) were from Amersham (Bucks, UK). Leptin, JAK inhibitor AG490 (tyrphostin B42) and Fyn inhibitor PP2 were from Calbiochem (La Jolla, CA, USA). Tris base, phenylmethylsulphonyl fluoride, aprotinin, dithiothreitol, Triton X-100, Tween-20, glycerol, bovine serum albumin (BSA, fraction V), lipopolysaccharide from *Escherichia coli* (LPS) and propidium iodide (PI) were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). SuperSignal

West Pico Chemiluminescent Substrate was from Thermo Scientific (Rockford, IL, USA). Ficoll-Paque™ PLUS was obtained from Becton Dickinson Biosciences (San Jose, CA, USA), RPMI 1640 from Cultilab (Campinas, Brazil), and annexin V was purchased from the Laboratory of Immunobiology of the University of São Paulo (São Paulo, Brazil). Chemicals for real-time PCR were from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) and Applied Biosystems (Foster City, CA, USA). All other chemicals were standard commercial products of reagent-grade quality. Antisense (5' - CAC AGC CCA TTA TCC A - 3') (FynAS) and scramble control (5' - CAT CCAGTC ACT ACC A - 3') (FynSCR) oligonucleotides specific for Fyn were produced by IDT (San Diego, CA, USA). The oligonucleotide sequences were submitted to BLAST analyses (www.ncbi.nlm.nih.gov) and matched only for the *Rattus norvegicus* Fyn coding sequence (NCBI/NM 012755). Four peptides (1- M K K L F W D D V P N P K N; 2- P L I L I E P E P V S E E I S; 3- S Q P S V K Y A T L V S N V; 4- N H G E K S V Y Y L G V S S) were constructed based on different portions of the ObRb's intracellular region, to be used in a competition assay for the Fyn kinase against the receptor. These were purchased from Peptide Protein Research Ltd (Wickham, Hampshire, UK).

Experimental Animals

Three-week old male Wistar rats and nine-week-old Lep/db (db/db) and C57BLKS/J mice were obtained from the University of Campinas Breeding Center. The Lep/db (db/db) mice were originally purchased from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA) and are currently established as a colony at the University of Campinas Breeding Center. Eight-month old Zucker rats were obtained from the Laboratory of Physiology of the Federal University of São Paulo (Brazil). The animals were allowed access to standard rodent chow and water *ad libitum*. All experiments involving animals were in accordance with the guidelines of the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA), and were approved by the University of Campinas Ethical Committee. Room temperature was maintained at 21–23°C with 12-h light/dark cycles. The animals were age-matched for individual experiments and randomly distributed into treatment or control groups with free access to a standard rodent chow (Labina/Purina, Campinas, SP, Brazil) and tap water. For some experiments, we additionally employed 10 or 40 day-old male Wistar rats.

Experimental Protocols

For experiments of molecular associations and immunoblottings, rats were treated with 100 µL of saline solution or with 100 µL of leptin 10^{-6} M via the cava vein. The thymuses were extracted after different time intervals: 0, 5, 10, 15, 20 and/or 30 min. For experiments of Fyn inhibition with antisense oligonucleotide (FynAS) (or the scrambled antisense FynSCR), rats were treated with 400 µL of saline solution; 400 µL of leptin 10^{-6} M; 400 µL of saline solution plus 2.0 nmol FynAS (or FynSCR), or with 400 µL of leptin 10^{-6} M plus 2.0 nmol FynAS (or FynSCR) via intra-peritoneum (ip) during three consecutive days. For experiments of Fyn inhibition with the chemical inhibitor (PP2), rats were treated with 100 µL solution containing 2.5, 5 or 10 nM of PP2 via ip 30 min before the thymus' extraction. Five minutes before the extraction, rats were also treated with 100 µL of saline solution or with 100 µL of leptin 10^{-6} M via the cava vein. For experiments of molecular associations using db/db mice, the animals were treated with 400 µL of saline solution or with 400 µL of leptin 10^{-6} M via ip and the thymus was extracted after 15 minutes. For experiments of molecular associations using Zucker rats, the animals were treated with 100 µL of saline solution or

with 100 µL of leptin 10^{-6} M via ip during three consecutive days. The thymus was extracted on the following day. For the determination of gene expression by Real Time PCR, rats were treated with 100 µL of saline solution; 100 µL of lipopolysaccharide (LPS) 1 mg/mL; 150 µL of PP2 5 nM; 100 µL of leptin $31.2 \mu\text{M}$ or with different combinations of these treatments.

Protocol for Immunoprecipitation and Immunoblotting

Rats or mice were anesthetized by ip injection of sodium thiopental (50 mg/kg body weight), and the thymus or hypothalamus were removed. The tissue was minced coarsely, and homogenized immediately in extraction buffer at 4°C with a Polytron PTA 20S generator (model PT 10/35, Brinkmann Instruments, Inc., Westbury, NY, USA) operated at maximum speed for 20 s. The extracts were centrifuged at 9,000 x g and 4°C in a Beckman 70.1 Ti rotor (Palo Alto, CA, USA) for 20 min to remove insoluble material, and the supernatants were used for immunoprecipitation, for direct immunoblotting, as previously described [13], or for a competition assay.

Protocol for Competition Assay

Samples containing 1.0 mg total protein obtained from thymuses, as described above, were incubated with different concentrations of each one of the four peptides that were constructed to compete against the ObRb receptor for association with Fyn. The concentrations of the peptides employed were 0, 1, 10, 50 and 100 µg, and the incubations were performed overnight at 4°C under gentle rocking. The samples were used for immunoprecipitation with anti-ObR and immunoblotting with anti-Fyn, anti-JAK-2 or anti-SHP2.

Protocol for Thymocyte Isolation

Rat thymuses were gently homogenized in a manual Dounce homogenizer. Thymocytes were overlaid onto a Ficoll-Paque™ PLUS layer, with density adjusted to 1.076 g/mL, and centrifuged at 1,000 x g at room temperature for 25 min. The interface cell layer containing thymocytes was recovered by Pasteur pipette, washed twice in PBS, and centrifuged at 500 x g for 10 min [14,15]. Cells were counted in a Neubauer chamber, and cell viability was determined by the Trypan blue exclusion method. Cells were only used when viability was greater than 98%.

Short-Term Cell Culture and Treatments

The *in vitro* thymocyte cultures were obtained by seeding isolated thymus cells at a density of 10^5 or 10^6 cells/mL in RPMI 1640 in 1.5 cm² plate wells in a humidified atmosphere (5% CO₂ at 37°C). For determination of markers of apoptosis and cytokine expression, thymocytes were treated according to one of the following protocols: control; leptin 10^{-6} M; PP2 10^{-6} M; or, leptin 10^{-6} M + PP2 10^{-6} M. Apoptosis was evaluated after 23 hours using the Flow Cytometry method for all experiments.

Flow Cytometry

The samples were analyzed in a FACSCalibur flow cytometer equipped with an argon laser and CellQuest software (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Ten thousand events were acquired from each sample. The thymocyte populations were identified by their light-scattering characteristics, enclosed in electronic gates, and analyzed for the intensity of the fluorescent probe signal [15].

Analysis of Cell Viability by Annexin-V and PI Labelling

Thymocytes were labelled with annexin-V, following the manufacturer's instructions [16]. Briefly, 10^7 or 10^6 cells were harvested

at each time point, washed twice with PBS and resuspended in a binding buffer containing annexin V-FITC (1:500). After 20 min of incubation at room temperature, thymocytes were centrifuged at $1,000 \times g$ for 5 min and resuspended in binding buffer containing PI (1:50). Apoptosis was quantified by FACS analysis as the number of annexin V-FITC positive and PI negative thymocytes as a percentage of the total number, while necrosis was quantified as the number of PI positive and annexin V-FITC negative thymocytes as a percentage of the total number of cells.

Real-Time PCR

Thymic total RNA was extracted using Trizol reagent (Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA), according to the manufacturer's recommendations. Real-time PCR analysis of gene expression was carried out in an ABI Prism 7500 sequence detection system (Applied Biosystems). The optimal concentration of cDNA and primers, as well as the maximum efficiency of amplification, were obtained through seven-point, 3-fold dilution curve analysis for each gene. Each PCR reaction contained 75 ng of reverse-transcribed cDNA. Primers were purchased from Applied Biosystems and were: TNF α , Rn99999017; IL-1 β , Rn00580432; IL-6, Rn00561420; IL-10, Rn00563409; and GAPD, #4352338E, for rat. The PCR conditions were 2 min at 50°C; 10 min at 95°C, followed by 40 cycles at 95°C for 15 sec and 60°C for 60 sec. Real-time data were analyzed using the engine provided by Applied Biosystems.

Statistical Analysis

All numerical results are expressed as the means \pm sem of the indicated number of experiments. The results of blots are presented as direct comparisons of bands in autoradiographs. The results of cell viability, estimated by annexin-V and propidium iodide staining, were analyzed by ANOVA and a post-hoc Tukey test. Level of significance was set at $p < 0.05$.

Results

Src Family Members Are Expressed in the Thymus and Undergo Tyrosine Phosphorylation Following Leptin Injection

Proteins of the Src family can mediate some of the effects of leptin in isolated and transfected cell systems [17]. To evaluate the presence of proteins of the Src family in the intact thymus, we performed regular immunoblots of total thymus protein extracts. As depicted in Figure 1A, Src, Fyn and Lck are expressed at high levels in the thymus. A time-course experiment was performed to determine the capacity of leptin to induce tyrosine phosphorylation of the Src family members in the thymus. Although all three proteins underwent a significant increase in tyrosine phosphorylation, peaking around 10–15 min, the effect of leptin demonstrated a significantly greater induction of Fyn tyrosine phosphorylation (increase of $325 \pm 37\%$ for Src, $470 \pm 41\%$ for Fyn and $186 \pm 28\%$ for Lck, $p < 0.05$ for Fyn *vs.* Src and *vs.* Lck, $n = 5$) (Fig. 1B). In addition, leptin induced Fyn tyrosine phosphorylation in a dose-dependent manner starting at the concentration of 10^{-10} M (100 μ L leptin through the cava vein) and peaking at 10^{-6} – 10^{-8} M. Therefore, in the remaining experiments, we concentrated our efforts on the characterization of leptin action through Fyn, only.

Associations of Fyn/ObR and Fyn/IRS1 Are Modulated by Leptin

The highest expression of Fyn and ObR in the thymus of Wistar rats occurred at 21 days, according to immunoblot analysis of

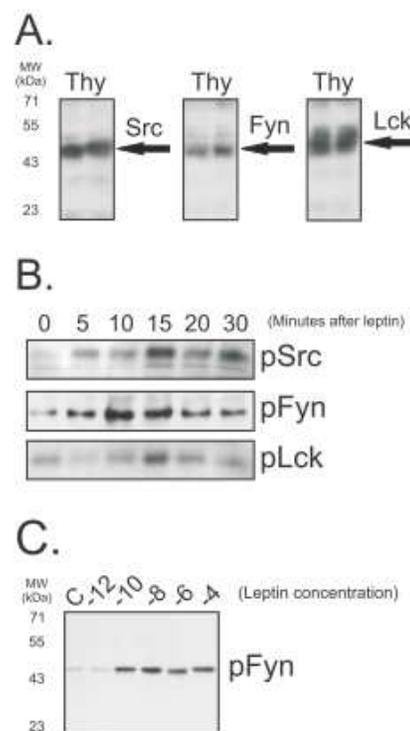


Figure 1. Expression of Src family members in the thymus. (A) The thymus from 21-d rats was homogenized and samples containing 0.2 mg total protein were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted with anti-Src, Fyn or Lck antibodies; the specific bands are indicated by arrows. (B) Rats were anesthetized and a single injection of leptin (100 μ L, 10^{-6} M) was performed through the cava vein; thymuses were obtained after the times depicted in the figure and homogenized; samples containing 0.5 mg total protein were used in immunoprecipitation assays with anti-Src, Fyn or Lck antibodies; immunocomplexes were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted with anti-phosphotyrosine antibodies. (C) Rats were anesthetized and a single injection of leptin (100 μ L, concentrations ranging from 10^{-12} to 10^{-4} M) was performed through the cava vein; thymuses were obtained after 10 min and homogenized; samples containing 0.5 mg total protein were used in immunoprecipitation assays with anti-Fyn antibodies; immunocomplexes were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted with anti-phosphotyrosine antibodies. The depicted blots are representative of $n = 5$. MW, molecular mass; Thy, thymus. doi:10.1371/journal.pone.0007707.g001

thymic protein extracts obtained from animals at 10, 21 and 40 days of life (Fig. 2A). Therefore, the remainder of experiments was performed always with 21-day old rats. Leptin-induced tyrosine phosphorylation of Fyn peaked at 10 min (as shown in Fig. 1B), which is similar to the timing of activation of other early leptin-responsive proteins such as JAK2 and IRS1, and precedes some of the late leptin-responsive proteins, such as STAT3 and ERK (Fig. 2B). To start testing the hypothesis that Fyn can mediate some of leptin's actions in the thymus through IRS1, but independently of JAK2, we performed immunoprecipitation assays to evaluate the associations of Fyn with the ObR and IRS1. As depicted in Figure 2C, Fyn is constitutively associated with both ObR and IRS1. However, following leptin injection, there is a time-dependent increase in the association of Fyn with both ObR and IRS1. Fyn/ObR association was maximal at 5

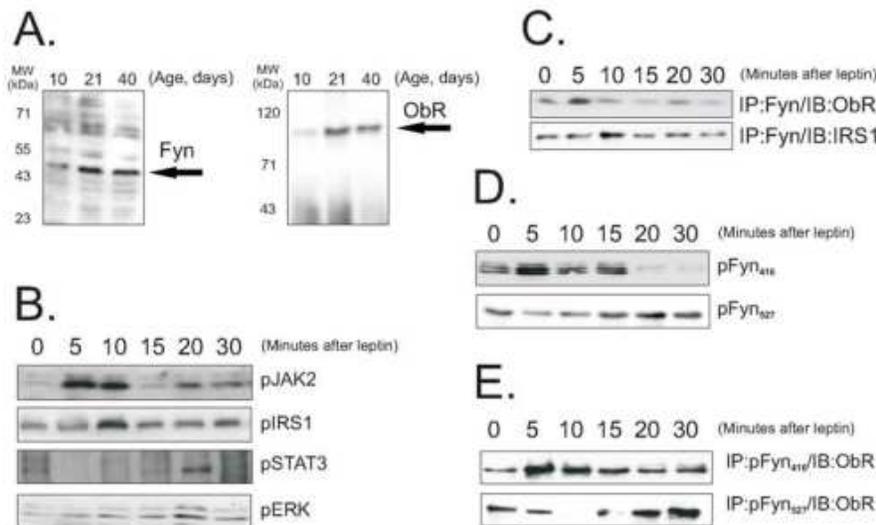


Figure 2. Fyn activation in the thymus. (A) Thymuses from 10-, 21-, or 40-d rats were homogenized and samples containing 0.2 mg total protein were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted with anti-Fyn or ObR antibodies; the specific bands are indicated by the arrows. (B) Rats were anesthetized and a single injection of leptin ($100 \mu\text{L}$, 10^{-6}M) was given through the cava vein; thymuses were obtained after the times depicted in the figure and homogenized; samples containing 0.5 mg total protein were used in immunoprecipitation assays with anti-JAK2, IRS1 or STAT3 antibodies; immunocomplexes were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted with anti-phosphotyrosine antibodies; samples containing 0.2 mg total protein were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted with anti-phospho ERK antibodies. (C–E) Rats were anesthetized and a single injection of leptin ($100 \mu\text{L}$, 10^{-6}M) was given through the cava vein; thymuses were obtained after the times depicted in the figure and homogenized; in C and E, samples containing 0.5 mg total protein were used in immunoprecipitation (IP) assays with anti-Fyn (C), or phospho-(^{416}Tyr)Fyn (E), or phospho-(^{527}Tyr)Fyn (E) antibodies; immunocomplexes were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted (IB) with anti-ObR or IRS1 antibodies (C), or anti-ObR (E); in D, samples containing 0.2 mg total protein were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted with anti-phospho-(^{416}Tyr)Fyn, or phospho-(^{527}Tyr)Fyn. The depicted blots are representative of $n=5$. MW, molecular mass. doi:10.1371/journal.pone.0007707.g002

min, while Fyn/IRS1 association was maximal at 10 min (Fig. 2C). The capacity of leptin to induce Fyn activation was further demonstrated by the time-course of Fyn tyrosine phosphorylation at residue 416, which is an activating phosphorylation site, and 527, which is an inactivating phosphorylation site. As depicted in Figure 2D, leptin-induced Fyn-Tyr416 phosphorylation peaked at 5 min and had almost vanished at 20 min, this was followed by Fyn-Tyr527 phosphorylation peaking at 20 min. Interestingly, Fyn-Tyr527 phosphorylation was present in the basal state, when Fyn is inactive, undergoing a considerable reduction of phosphorylation at 5 and 10 min (Fig. 2D). Furthermore, it is important to notice that the highest Fyn/ObR association coincides with the peak of leptin-induced Fyn-Tyr416 phosphorylation (at 5 min) and, using the anti-Fyn-Tyr416 specific antibody, the Fyn-ObR complex could be detected at its highest level at 5 min (Fig. 2E). Conversely, ObR co-immunoprecipitates with Fyn-Tyr527 before leptin treatment or at 20 min after leptin injection (Fig. 2E).

Fyn Associates with the ObR in the Box1/Box2 Transition Domain

Four peptides were designed to be used in binding-competition assays with the objective of defining the site of Fyn interaction with the ObR (Fig. 3A). As depicted in Figure 3B, only peptide 2 was capable, in a dose-dependent manner, of disrupting the Fyn/ObR complex. Peptide 1 efficiently competed with the JAK2 binding site, while peptide 3 efficiently competed with the SHP2 binding site (Fig. 3C). Interestingly, in *db/db* mice, which lack most of the box 2 domain of the ObR, Fyn was still capable of binding to the ObR, although in a lower amount than in control mice (Fig. 3D).

In Zucker rats, which lack an extracellular portion of the ObR, Fyn was also bound to the receptor (Fig. 3E). Nevertheless, in both animal models harboring defective ObRs, the ability of leptin to promote Fyn tyrosine phosphorylation was virtually absent (Figs. 3D and 3E).

Fyn Expression/Activity Is Inhibited by Two Distinct Methods

To provide the adequate tools to determine the role of Fyn in leptin's action in the thymus, two methods were employed. Firstly, Fyn expression was reduced by treating living rats with a phosphorothioate modified antisense oligonucleotide, which provided a significant reduction of Fyn expression in doses of 2.0 and 4.0 nmol (reductions of $58 \pm 7\%$ and $66 \pm 5\%$, $p < 0.05$ vs. control, respectively) (Fig. 4A). Secondly, leptin-induced activation of Fyn was inhibited with the specific inhibitor PP2, which completely abrogated leptin-induced tyrosine phosphorylation of Fyn, but produced no changes in leptin-induced activation of JAK2 and ERK (Fig. 4B).

Fyn Is Not Involved in Leptin-Dependent Control of Apoptosis in the Thymus

Leptin exerts a potent anti-apoptotic effect on thymic cells [11]. To evaluate whether the inhibition of Fyn would result in the modulation of the anti-apoptotic activity of leptin, rats were treated with the anti-Fyn antisense oligonucleotide or with PP2 and then treated with leptin. As depicted in Figure 5A, the inhibition of Fyn resulted in no modification of the leptin-dependent reduction in the expression of the pro-apoptotic

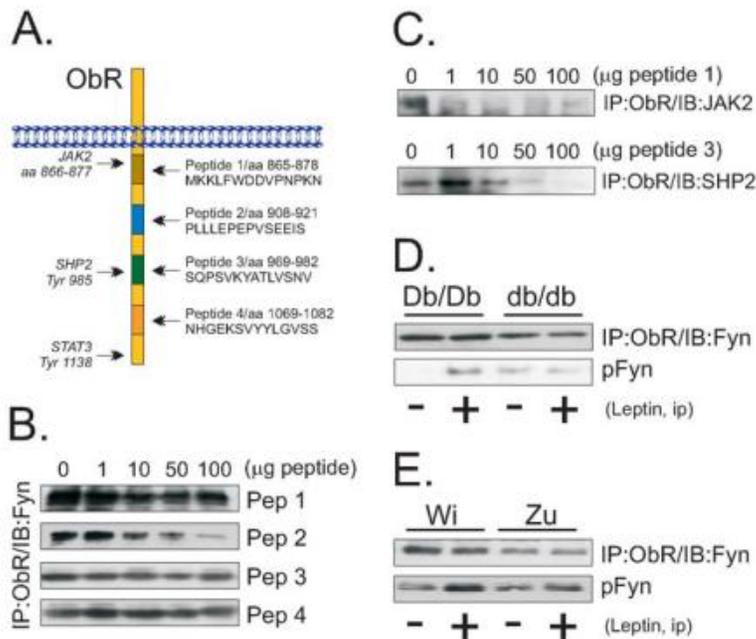


Figure 3. Exploring the Fyn/ObR association. (A) Four different peptides, corresponding to the protein sequence of the regions of the ObR, as depicted, were synthesized to compete with the receptor for Fyn binding; the binding sites for JAK2, SHP2 and STAT3 are depicted. (B–C) Thymus total protein homogenate samples containing 1.0 mg protein were incubated with peptides 1–4 at concentrations ranging from 0–100 µg, as depicted; immunoprecipitation (IP) assays were performed with the anti-ObR antibody; immunocomplexes were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted (IB) with the anti-Fyn (B) or the anti-JAK2 (C), or the anti-SHP2 (C) antibodies. (D–E) Lean (Db/Db) or obese (db/db) mice (D), or lean Wistar (Wi) or obese Zucker (Zu) rats (E) were acutely treated with leptin (400 µl, 10^{-6} M ip, for mice and 100 µl, 10^{-6} M via cava vein, for rats) (+) or an equal volume of saline (–) and the thymuses were obtained, homogenized and samples containing 0.5 mg protein were used in immunoprecipitation assays with the anti-ObR antibody; immunocomplexes were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted with anti-Fyn antibody; or, 0.2 mg protein was separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted with anti-phospho Fyn antibody. The depicted blots are representative of $n=5$. doi:10.1371/journal.pone.0007707.g003

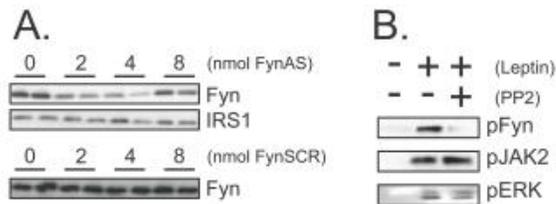


Figure 4. Inhibiting Fyn. (A) Rats were treated once a day for three days with a single 400 µl ip dose of buffer containing 0–8 nmol Fyn antisense (FynAS) or scrambled (FynSCR) phosphorothioate modified oligonucleotides; at the end of the experimental period the thymuses were obtained, homogenized and samples containing 0.2 mg total protein were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted with anti-Fyn or anti-IRS1 antibodies. (B) Rats were pre-treated with a single dose of PP2 (5 nmol in 100 µl buffer, ip) (+) or saline (–), 30 min prior to leptin treatment. A single dose of leptin (100 µl 10^{-6} M, via cava vein) (+), or similar volume of saline (–) was then injected; the thymuses were obtained for homogenization; samples containing 0.5 mg total protein were used in immunoprecipitation assays with anti-Fyn or anti-JAK2 antibodies; immunocomplexes were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted (IB) with anti-phosphotyrosine antibody; or 0.2 mg protein was separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted with anti-phospho ERK antibody. The depicted blots are representative of $n=5$. doi:10.1371/journal.pone.0007707.g004

protein, Bax, nor in the modification of leptin-induced expression of the anti-apoptotic protein, Bcl-2. In addition, the inhibition of Fyn with PP2 had no impact on leptin-induced inhibition of apoptosis of isolated thymocytes (Fig. 5B).

Fyn Mediates the Effects of Leptin on Thymic Cytokine Expression

Leptin is known to modulate cytokine expression in the thymus [5]. To test the hypothesis that Fyn could mediate some of the leptin's effects on the control of cytokine expression, rats were pre-treated with PP2 and the effect of leptin on basal and LPS-stimulated cytokine expressions were determined by real-time PCR. As depicted in Figures 5C and 5D, the inhibition of Fyn resulted in significant reductions of basal and LPS-stimulated leptin-dependent IL-1 β and TNF- α expressions by thymic cells.

Fyn Undergoes Leptin-Induced Tyrosine Phosphorylation in the Hypothalamus

Due to the classical hypothalamic actions of leptin in the control of food intake [7], we evaluated whether Fyn is expressed in the hypothalamus of rats and if it becomes tyrosine phosphorylated following an acute dose of leptin. As shown in Figure 6A, both Fyn and JAK2 are expressed in the hypothalamus and undergo rapid tyrosine phosphorylation following leptin injection. In addition, upon the inhibition of Fyn activity, a reduction in leptin-induced

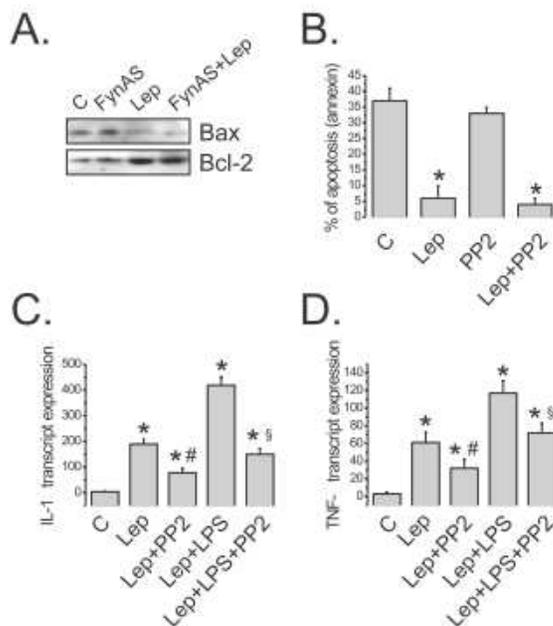


Figure 5. Effects of Fyn inhibition on apoptosis and cytokine expression. (A) Rats were treated ip for three days with Fyn antisense phosphothioate modified oligonucleotide (FynAS) (400 μ l, 2 nmol). On the fourth day, the rats were injected via intra cava vein either with 100 μ l saline (C and FynAS) or with an equal volume of leptin (10^{-6} M) (Lep and FynAS+Lep); the thymuses were obtained, homogenized and 0.2 mg protein was separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted with anti-Bax or anti-Bcl-2 antibodies. (B) Isolated thymocytes were treated with leptin (10^{-6} M) (Lep) or PP2 (10^{-6} M) or both together and apoptosis was determined by the annexin method after 24h. (C–D) Rats were treated ip with a single dose of 100 μ l of saline solution (C); 100 μ l of lipopolysaccharide (LPS) 1 mg/mL; 150 μ l of PP2 5 nM; 100 μ l of leptin 31.2 μ M (Lep) or with different combinations of these treatments; the sequence of treatment was, PP2, followed by leptin after 30 min and LPS after 30 min. Thymus was obtained after 2 h and RNA was prepared for determination of IL-1b (C) and TNF- α expression by real-time PCR. In all experiments n=5. *p<0.05 vs. C; #p,0.05 vs. lep; §p<0.05 vs. Lep+LPS. doi:10.1371/journal.pone.0007707.g005

Fyn tyrosine phosphorylation is observed. The inhibition of Fyn has no effect on JAK2 expression or leptin-induced JAK2 phosphorylation (Fig. 6B).

Discussion

The ObR belongs to the IL-6-like, class 1 cytokine receptor family that contains an extracellular ligand-binding domain, a transmembrane domain and an intracellular signaling domain devoid of intrinsic catalytic activity [18,19]. Upon ligand binding, the receptor undergoes a conformational change resulting in the transphosphorylation and activation of a noncovalently bound tyrosine kinase JAK2 [20], which catalyzes the phosphorylation of other tyrosine residues on JAK2, ObR and additional proteins involved in leptin signal transduction [21].

Most actions of leptin were studied in the hypothalamus where this hormone/cytokine exerts potent anorexigenic/thermogenic effects [7,22,23]. Signal transduction and functional studies in neural tissue suggest that the activation of JAK2 is an obligatory event linking the ObR to downstream effectors of leptin action

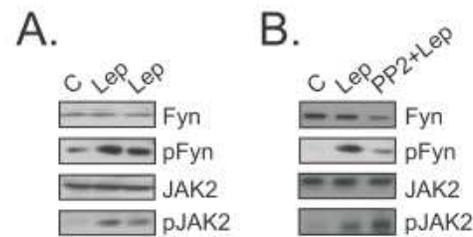


Figure 6. Fyn expression and activation in the hypothalamus. (A–B) Some rats were used without previous treatment (A), or some rats were treated with Fyn inhibitor PP2 (5 nmol in 100 μ l buffer, ip) 30 min before leptin injection (B). Anesthetized rats were injected via intra cava vein either with 100 μ l saline (C) or with an equal volume of leptin (10^{-6} M) (Lep and PP2+Lep); the hypothalami were obtained, homogenized and samples containing 0.5 mg total protein were used in immunoprecipitation assays with anti-Fyn or anti-JAK2 antibodies; immunocomplexes were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted with anti-phosphotyrosine antibody; or 0.2 mg protein was separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted with anti-Fyn or anti-JAK2 antibodies. The depicted blots are representative of n=5. In all experiments, n=5; *p<0.05 vs. C. doi:10.1371/journal.pone.0007707.g006

[19,22]. However, in the thymus, where leptin modulates apoptosis and cytokine expression, JAK2 independent effects have been described [11]. Since the functional characteristics of the ObR relies on the recruitment of an independent tyrosine kinase in order to appropriately deliver the incoming signals, we hypothesized that, in the thymus, a tyrosine kinase other than JAK2 would play a role in leptin activity.

A recent study has shown that, in an isolated cell system, proteins of the Src family can be activated in response to leptin in a JAK2-independent fashion [17]. In the first part of the study, we showed that members of the Src family are highly expressed in the thymus and respond to an acute dose of leptin by undergoing tyrosine phosphorylation. Since the highest leptin-induced tyrosine phosphorylation was observed in Fyn, and also, because Fyn has been implicated as an important intermediate in a number of immunological functions [24–27], we decided to concentrate our efforts to explore the role of Fyn on leptin action in the thymus.

The dynamics of Fyn tyrosine phosphorylation, in response to leptin, were similar in timing to the activation of JAK2, although occurring faster than the engagement of the substrates of JAK2 and, therefore, suggesting that fyn activation exists as a parallel and independent phenomenon with regard to the classic JAK2 signaling pathway [28,29]. Interestingly, the time-course and protein association experiments showed that, under basal conditions, Fyn is predominantly tyrosine phosphorylated on the inhibitory 527 Tyr residue and is constitutively associated at a low level with the ObR. Upon leptin treatment, Fyn undergoes a transient increase in association with the ObR, which coincides with the induction of tyrosine phosphorylation at the activating 416 Tyr residue. Finally, the deactivating 527 Tyr phosphorylation reinstalls and the levels of Fyn bound to the ObR return to basal levels. While tyrosine phosphorylated on the 416 Tyr residue, and highly associated with the ObR, Fyn associates with IRS1 establishing a protein complex that may drive JAK2-independent signals.

Using a peptide competition assay we mapped the transition of box1 to box2 as the binding site for Fyn in the ObR. This site lies just below the JAK2 binding site and is approximately 70 residues up from the SHP2 binding site [22,30]. Using two natural mutants of the ObR that retain the transition box1 to box2 region [31], in the

db/db mouse and the Zucker rat, we could still detect the association of the receptor with Fyn, however most of the leptin-induced Fyn tyrosine phosphorylation was lost in both cases. In fact, in db/db mice, where the ObR lacks most of the box2 region, the basal association of Fyn was considerably lower than in control mice.

In order to evaluate the role of Fyn in leptin actions in the thymus we used two distinct methods to reduce Fyn activity, *in vivo*. With the antisense oligonucleotide approach, we reduced Fyn expression to approximately 40% of basal levels, while using the chemical inhibitor PP2 we virtually abolished leptin-induced Fyn activation. With these two methods we could then determine the role of Fyn in two important phenomena modulated by leptin in the thymus, apoptosis and cytokine expression [5,8,11].

The capacity of leptin to reduce the rate of apoptosis in the thymus has been evaluated in several studies [5,11,32]. It is believed that, by controlling the survival of certain lymphocyte subpopulations, leptin may impact on the immune repertoire, predisposing or restraining the development of certain diseases. One such example is the apparent role played by leptin in the development of autoimmunity [33]. In addition, a tight connection between thymic function in malnutrition and leptin activity in this tissue has been demonstrated, reinforcing the role for leptin in the connection between metabolic and immune function [6,12,32].

When we evaluated the role of Fyn in leptin-inhibited apoptosis in the thymus, we found no significant changes in the expression of Bax and Bcl-2 and also in the number of apoptotic cells, as determined by flow cytometry. These experiments were repeated a number of times with variations in the doses and times of treatment with the respective inhibitors of Fyn and, consistently, we could detect no changes in the rate of apoptosis inhibited by leptin. Therefore, we believe that Fyn plays no important role in this process.

References

- Fernandes G (2008) Progress in nutritional immunology. *Immunol Res* 40: 244–261.
- Ahluwalia N (2004) Aging, nutrition and immune function. *J Nutr Health Aging* 8: 2–6.
- Lesourd BM, Mazari L, Ferry M (1998) The role of nutrition in immunity in the aged. *Nutr Rev* 56: S113–125.
- Valdes-Ramos R, Benitez-Arciniega AD (2007) Nutrition and immunity in cancer. *Br J Nutr* 98 Suppl 3: S127–132.
- Matarese G, Moschos S, Mantzoros CS (2005) Leptin in immunology. *J Immunol* 174: 3137–3142.
- Flier JS (1998) Lowered leptin slims immune response. *Nat Med* 4: 1124–1125.
- Friedman JM, Halaas JL (1998) Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395: 763–770.
- Lord GM, Matarese G, Howard JK, Baker RJ, Bloom SR, et al. (1998) Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature* 394: 897–901.
- Howard JK, Lord GM, Matarese G, Vendetti S, Ghatei MA, et al. (1999) Leptin protects mice from starvation-induced lymphoid atrophy and increases thymic cellularity in ob/ob mice. *J Clin Invest* 104: 1051–1059.
- Farooqi IS, Matarese G, Lord GM, Keogh JM, Lawrence E, et al. (2002) Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. *J Clin Invest* 110: 1093–1103.
- Mansour E, Pereira FG, Araujo EP, Amaral ME, Morari J, et al. (2006) Leptin inhibits apoptosis in thymus through a janus kinase-2-independent, insulin receptor substrate-1/phosphatidylinositol-3 kinase-dependent pathway. *Endocrinology* 147: 5470–5479.
- Velloso LA, Savino W, Mansour E (2009) Leptin action in the thymus. *Ann N Y Acad Sci* 1153: 29–34.
- Gasparetti AL, de Souza CT, Pereira-da-Silva M, Oliveira RL, Saad MJ, et al. (2003) Cold exposure induces tissue-specific modulation of the insulin-signaling pathway in *Rattus norvegicus*. *J Physiol* 552: 149–162.
- Boyum A (1976) Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. *Scand J Immunol Suppl* 5: 9–15.
- Degasperi GR, Zecchin KG, Borecky J, Cruz-Hoffing MA, Castilho RF, et al. (2006) Verapamil-sensitive Ca²⁺ channel regulation of Th1-type proliferation of splenic lymphocytes induced by Walker 256 tumor development in rats. *Eur J Pharmacol* 549: 179–184.
- Brumatti G, Weinlich R, Chelab CF, You M, Amarante-Mendes GP (2003) Comparison of the anti-apoptotic effects of Bcr-Abl, Bcl-2 and Bcl-x(L) following diverse apoptogenic stimuli. *FEBS Lett* 541: 57–63.
- Jiang L, Li Z, Rui L (2000) Leptin stimulates both JAK2-dependent and JAK2-independent signaling pathways. *J Biol Chem* 275: 28066–28073.
- Taga T, Kishimoto T (1997) Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annu Rev Immunol* 15: 797–819.
- Tartaglia LA (1997) The leptin receptor. *J Biol Chem* 272: 6093–6096.
- Klock C, Haq AK, Dunn SL, Lavery HJ, Banks AS, et al. (2002) Regulation of Jak kinases by intracellular leptin receptor sequences. *J Biol Chem* 277: 41547–41555.
- Banks AS, Davis SM, Bates SH, Myers MG, Jr. (2000) Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor. *J Biol Chem* 275: 14563–14572.
- Myers MG, Cowley MA, Munzberg H (2000) Mechanisms of leptin action and leptin resistance. *Annu Rev Physiol* 70: 537–556.
- Velloso LA, Araujo EP, de Souza CT (2008) Diet-induced inflammation of the hypothalamus in obesity. *Neuroimmunomodulation* 15: 189–193.
- Stein PL, Lee HM, Rich S, Soriano P (1992) pp59^{lyn} mutant mice display differential signaling in thymocytes and peripheral T cells. *Cell* 70: 741–750.
- Obszow MW, Leuchtmann PL, Veillette A, Shaw AS (1995) Comparison of p56lck and p59lyn protein expression in thymocyte subsets, peripheral T cells, NK cells, and lymphoid cell lines. *J Immunol* 155: 4236–4240.
- Uting O, Teh SJ, Teh HS (1998) T cells expressing receptors of different affinity for antigen ligands reveal a unique role for p59lyn in T cell development and optimal stimulation of T cells by antigen. *J Immunol* 160: 5410–5419.
- Salmond RJ, Filby A, Qureshi I, Caserta S, Zamoyka R (2009) T-cell receptor proximal signaling via the Src-family kinases, Lck and Fyn, influences T-cell activation, differentiation, and tolerance. *Immunol Rev* 228: 9–22.
- Kellerer M, Koch M, Metzinger E, Mushack J, Capp E, et al. (1997) Leptin activates PI-3 kinase in C2C12 myotubes via janus kinase-2 (JAK-2) and insulin receptor substrate-2 (IRS-2) dependent pathways. *Diabetologia* 40: 1358–1362.
- Carvalho JR, Siloto RM, Ignacchioni I, Brenelli SL, Carvalho CR, et al. (2001) Insulin modulates leptin-induced STAT3 activation in rat hypothalamus. *FEBS Lett* 500: 119–124.
- Munzberg H, Myers MG, Jr. (2005) Molecular and anatomical determinants of central leptin resistance. *Nat Neurosci* 8: 566–570.
- Chung WK, Power-Kehor L, Chua M, Leibel RL (1996) Mapping of the OB receptor to Ip in a region of nonconserved gene order from mouse and rat to human. *Genome Res* 6: 431–438.

Acknowledgments

We thank Mr. G. Ferraz for technical work and Dr. N. Conran for editing the English grammar.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AG GGA JBC MJS LAV. Performed the experiments: AG GGA EM EPA GD RGD. Analyzed the data: AG EM EPA JBC LAV. Contributed reagents/materials/analysis tools: MJS LAV. Wrote the paper: AG LAV.

32. Savino W, Dardenne M, Velloso LA, Daye Silva-Barbosa S (2007) The thymus is a common target in malnutrition and infection. *Br J Nutr* 98 Suppl 1: S11–16.
33. Matarese G, Di Giacomo A, Sanna V, Lord GM, Howard JK, et al. (2001) Requirement for leptin in the induction and progression of autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 166: 5909–5916.
34. La Cava A, Matarese G (2004) The weight of leptin in immunity. *Nat Rev Immunol* 4: 371–379.

4 – Conclusão

Conclusão

- A tirosina quinase Fyn está associada constitutivamente ao ObR em células tímicas;
- Após estimulação por leptina, a Fyn sofre ativação por fosforilação em tirosina, e se associa mais intensamente ao IRS-1;
- Todos estes efeitos são independentes da ativação da JAK2;
- A inibição da Fyn não modifica o efeito da leptina na redução da apoptose no timo, mas modifica sua atividade moduladora da expressão de citocinas.

5 – Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas

- [1] Friedman, J.M. and Halaas, J.L. (1998) *Nature* 395, 763-70.
- [2] Koerner, A., Kratzsch, J. and Kiess, W. (2005) *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 19, 525-46.
- [3] Muoio, D.M. and Lynis Dohm, G. (2002) *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 16, 653-66.
- [4] Zhang, F. et al. (1997) *Nature* 387, 206-9.
- [5] Cohen, S.L., Halaas, J.L., Friedman, J.M., Chait, B.T., Bennett, L., Chang, D., Hecht, R. and Collins, F. (1996) *Nature* 382, 589.
- [6] Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L. and Friedman, J.M. (1994) *Nature* 372, 425-32.
- [7] Friedman, J.M. (2002) *Nutr Rev* 60, S1-14; discussion S68-84, 85-7.
- [8] Halaas, J.L., Gajiwala, K.S., Maffei, M., Cohen, S.L., Chait, B.T., Rabinowitz, D., Lallone, R.L., Burley, S.K., Friedman, J.M. (1995) *Science* 269, 534-46.
- [9] Flier, J.S. (2004) *Cell* 116, 337-50.
- [10] Boden, G., Chen, X., Mozzoli, M., Ryan, I. (1996) *Clin Endocrinol Metab* 81, 3419-23.
- [11] Leibel, R.L., Rosenbaum, M., Hirsh, J. (1995) *N Engl J Med* 332, 621-8.
- [12] Dal Farra, C., Zsurgar, N., Vincent, J.P., et al. (2000) *Peptides* 21, 577-87.
- [13] Unger, R.H., Zhou, Y.T. and Orci, L. (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 2327-32.
- [14] Bennett, B.D., Solar, G.P., Yuan, J.Q., Mathias, J., Thomas, G.R. and Matthews, W. (1996) *Curr Biol* 6, 1170-80.
- [15] Sierra-Honigmann, M.R. et al. (1998) *Science* 281, 1683-6.
- [16] Casabiell, X. et al. (1998) *J Clin Endocrinol Metab* 83, 2149-55.
- [17] Frederich, R.C., Lollmann, B., Hamann, A., et al. (1995) *J Clin Invest* 96, 1658-63.
- [18] Considine, R.V., Sinha, M.K., Heiman, M.L., et al. (1996) *N Engl J Med* 334, 292-5.

- [19] Havel, P.J., Kasim-Karakas, S., Dubuc, G.R., et al. (1996) *Nat Med* 2, 949-50.
- [20] Heptulla, R., Smitten, A., Teague, B., et al. (2001) *J Clin Endocrinol Metab* 86, 90-6.
- [21] Margetic, S., Gazzola, C., Pegg, G.G., et al. (2002) *Int J Obes Relat Metab Disord* 26, 1407-33.
- [22] Tartaglia, L.A. et al. (1995) *Cell* 83, 1263-71.
- [23] Haniu, M., Arakawa, T., Bures, E.J., Young, Y., Hui, J.O., Rohde, M.F., Welcher, A.A., Horan, T. (1998) *J Biol Chem* 273, 28691-9.
- [24] Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pober, J.S. (2005) *Cellular and molecular immunology*. Philadelphia: 5th Ed. W.B. Saunders.
- [25] Wang, M.Y., Zhou, Y.T., Newgard, C.B., Unger, R.H. (1996) *FEBS Lett* 392, 87-90.
- [26] Tartaglia, L.A. (1997) *J Biol Chem* 272, 6093-6.
- [27] Chung, W.K., Power-Kehoe, L., Chua, M., Leibel, R.L. (1996) *Genome Res* 6, 431-8.
- [28] Ghilardi, N., Ziegler, S., Wiestner, A. (1996) *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 6231-5.
- [29] Bjorbaek, C., Uotani, S., da Silva, B. and Flier, J.S. (1997) *J Biol Chem* 272, 32686-95.
- [30] Lammert, A., Kiess, W., Bottner, A., et al. (2001) *Biochem Biophys Res Commun* 283, 982-8.
- [31] Devos, R., Guisez, Y. et al., Van der H.J. (1997) *J Biol Chem* 272, 18304-10.
- [32] Liu, C., Liu, X.J., Barry, G., et al. (1997) *Endocrinology* 138, 3548-54.
- [33] Huang, L., Wang, Z., Li, C. (2001) *Biol Chem* 276, 6343-9.
- [34] Sinha, M.K., Opentanova, I., Ohannesian, J.P., et al. (1996) *J Clin Invest* 98, 1277-82.
- [35] Kratzsch, J., Lammert, A., Bottner, A., et al. (2002) *J Clin Endocrinol Metab* 87, 4587-94.
- [36] Yang, G., Ge, H., Boucher, A., et al. (2004) *Mol Endocrinol* 18, 1354-62.

- [37] Zastrow, O., Seidel, B., Kiess, W., et al. (2003) *Int J Obes Relat Metab Disord* 27, 1472-8.
- [38] Fruhbeck, G. (2001) *Proc Nutr Soc* 60, 301-18.
- [39] Zabeau, L., Lavens, D., Peelman, F., Eyckerman, S., Vandekerckhove, J. and Tavernier, J. (2003) *FEBS Lett* 546, 45-50.
- [40] Bjorbaek, C., Lavery, H.J., Bates, S.H., Olson, R.K., Davis, S.M., Flier, J.S. and Myers, M.G., Jr. (2000) *J Biol Chem* 275, 40649-57.
- [41] Munzberg, H. and Myers, M.G., Jr. (2005) *Nat Neurosci* 8, 566-70.
- [42] Kellerer, M., Koch, M., Metzinger, E., Mushack, J., Capp, E. and Haring, H.U. (1997) *Diabetologia* 40, 1358-62.
- [43] Xu, A.W., Kaelin, C.B., Takeda, K., Akira, S., Schwartz, M.W. and Barsh, G.S. (2005) *J Clin Invest* 115, 951-8.
- [44] Bjorbaek, C. et al. (2001) *J Biol Chem* 276, 4747-55.
- [45] Matarese, G., La Cava, A. (2004) *Trends Immunol* 25, 193-200.
- [46] La Cava, A. and Matarese, G. (2004) *Nat Rev Immunol* 4, 371-9.
- [47] Bjorbaek, C. and Kahn, B.B. (2004) *Recent Prog Horm Res* 59, 305-31.
- [48] Sahu, A. (2003) *Front Neuroendocrinol* 24, 225-53.
- [49] Muller, P., Kuttenukeuler, D., Gesellchen, V., Zeidler, M.P. and Boutros, M. (2005) *Nature* 436, 871-5.
- [50] Eyckerman, S., Broekaert, D., Verhee, A., Vandekerckhove, J. and Tavernier, J. (2000) *FEBS Lett* 486, 33-7.
- [51] Fruhbeck, G. (2006) *Biochem J* 393, 7-20.
- [52] Buttgereit, F., Burmester, G.R. and Brand, M.D. (2000) *Immunol Today* 21, 192-9.
- [53] Fazeli, M. et al. (2006) *J Immunol Methods* 312, 190-200.
- [54] La Cava, A., Matarese, G., Ebling, F.M. and Hahn, B.H. (2003) *Curr Opin Investig Drugs* 4, 1327-32.
- [55] Lord, G.M., Matarese, G., Howard, J.K., Baker, R.J., Bloom, S.R. and Lechler, R.I. (1998) *Nature* 394, 897-901.
- [56] Martin-Romero, C., Santos-Alvarez, J., Goberna, R. and Sanchez-Margalet, V. (2000) *Cell Immunol* 199, 15-24.

- [57] Zarkesh-Esfahani, H., Pockley, A.G., Wu, Z., Hellewell, P.G., Weetman, A.P. and Ross, R.J. (2004) *J Immunol* 172, 1809-14.
- [58] Zarkesh-Esfahani, H. et al. (2001) *J Immunol* 167, 4593-9.
- [59] Farooqi, I.S. et al. (2002) *J Clin Invest* 110, 1093-103.
- [60] Matarese, G., Sanna, V., Lechler, R.I., Sarvetnick, N., Fontana, S., Zappacosta, S. and La Cava, A. (2002) *Diabetes* 51, 1356-61.
- [61] Fernandes, G. (2008) *Immunol Res* 40, 244-61.
- [62] Ahluwalia, N. (2004) *J Nutr Health Aging* 8, 2-6.
- [63] Lesourd, B. M., L. Mazari, and M. Ferry. (1998) *Nutr Rev* 56, S113-25.
- [64] Valdes-Ramos, R., and A. D. Benitez-Arciniega. (2007) *Br J Nutr* 98 Suppl 1, S127-32.
- [65] Matarese, G., S. Moschos, and C. S. Mantzoros. (2005) *J Immunol* 174, 3137-42.
- [66] Mansour, E., F. G. Pereira, E. P. Araujo, M. E. Amaral, J. Morari, N. R. Ferraroni, D. S. Ferreira, I. Lorand-Metze, and L. A. Velloso. (2006) *Endocrinology* 147, 5470-9.
- [67] Velloso, L. A., W. Savino, and E. Mansour. (2009) *Ann N Y Acad Sci* 1153, 29-34.
- [68] Bredensen, D.E., Rammohan, V.R., Mehlen, P. (2006) *Nature* 443, 796-802.
- [69] Faggioni, R., Fantuzzi, G., Gabay, C., Moser, A., Dinarello, C.A., Feingold, K.R., Grunfeld, C. (1999) *Am J Pathol* 276, R136-42.
- [70] Faggioni, R., Moser, A., Feingold, K.R., Grunfeld, C. (2000) *Am J Pathol* 156, 1781-7.
- [71] Takahashi, N., Waelput, W., Guisez, Y. (1999) *J Exp Med* 189, 207.
- [72] Bernotiene, E., Palmer, G., Talabot-Ayer, D., et al. (2004) *Arthritis Res Ther* 6, R256.
- [73] Williams, L., Bradley, L., Smith, A., et al. (2004) *J Immunol* 172, 567.
- [74] Sempowski, G.D., Hale, L.P., Sundry, J.S., et al. (2000) *J Immunol* 164, 2180-7.
- [75] Sempowski, G.D., Rhein, M.E., Scearce, R.M., et al. (2002) *Eur J Immunol* 32, 3066-70.

- [76] Wang, W., Poole, B., Mitra, A., et al (2004) *J Am Soc Nephrol* 15, 645-9.
- [77] Sarraf, P., Frederich, R.C., Turner, E.M., et al. (1997) *J Exp Med* 185, 171-5.
- [78] Juge-Aubry, C.E., Meier, C.A. (2002) *Mol Cell Endocrinol* 194, 1-7.
- [79] Loffreda, S., Yang, S.Q., Lin, H.Z., et al. (1998) *FASEB J* 12, 57-65.
- [80] Grunfeld, C., Zhao, C., Fuller, J., et al. (1996) *J Clin Invest* 97, 2152-7.
- [81] Jiang, L., Z. Li, and L. Rui. (2008) *J Biol Chem* 283, 28066-73.
- [82] Cance, W.G., Craven, R.J., Bergman, M., Xu, L., Alitalo, K. and Liu, E.T. (1994) *Cell Growth Differ* 5, 1347-55.
- [83] Lee, J., Wang, Z., Luoh, S.M., Wood, W.I. and Scadden, D.T. (1994) *Gene* 138, 247-51.
- [84] Oberg-Welsh, C. and Welsh, M. (1995) *Gene* 152, 239-42.
- [85] Thuveson, M., Albrecht, D., Zurcher, G., Andres, A.C. and Ziemiecki, A. (1995) *Biochem Biophys Res Commun* 209, 582-9.
- [86] Courtneidge, S.A. (1994) *Semin Cancer Biol* 5, 239-46.
- [87] Hunter, T. and Cooper, J.A. (1985) *Annu Rev Biochem* 54, 897-930.
- [88] Thomas, S.M. and Brugge, J.S. (1997) *Annu Rev Cell Dev Biol* 13, 513-609.
- [89] Chan, V.W., Mecklenbrauker, I., Su, I., et al. (1998) *J Exp Med* 188, 93-101.
- [90] De Franceschi, L., Fumagalli, L., Olivieri, O., et al. (1997) *J Clin Invest* 99, 220-7.
- [91] Fitzer-Attas, C.J., Lowry, M., Crowley, M.T., et al. (2000) *J Exp Med* 191, 669-82.
- [92] Gardai, S., Whitlock, B.B., Helgason, C., et al. (2002) *J Biol Chem* 277, 5236-46.
- [93] Lowell, C.A., Berton, G. (1999) *J Leukoc Biol* 65, 313-20.
- [94] Lowell, C.A., Fumagalli, L., Berton, G. (1996) *J Cell Biol* 133, 895-910.
- [95] Nijhuis, E., Lammers, J.W., Koenderman, L., et al. (2002) *J Leukoc Biol* 71, 115-24.
- [96] Rane, S.G., Reddy, E.P. (2002) *Oncogene* 21, 3334-58.
- [97] Saijo, K., Schmedt, C., Su, I.H., et al. (2003) *Nat. Immunol* 4, 274-9.
- [98] van Oers, N.S., Lowin-Kropf, B., Finlay, D., et al. (1996) *Immunity* 5, 429-36.

- [99] Cooper, J.A. (1994) *Semin Cell Biol* 5, 377-87.
- [100] Modafferi, E.F., Black, D.L. (1999) *RNA* 5, 687-706.
- [101] Yi, T.L., Bolen, J.B., Ihle, J.N., et al. (1991) *Mol Cell Biol* 11, 2391-8.
- [102] Lock, P., Ralph, S., Stanley, E., et al. (1991) *Mol Cell Biol* 11, 4363-70.
- [103] Picard, C., Gilles, A., Pontarotti, P., et al. (2002) *J Immunol* 168, 2595-8.
- [104] Robbins, S.M., Quintrell, N.A., Bishop, J.M. (1995) *Mol Cell Biol* 15, 3507-15.
- [105] Xu, W., Harrison, S.C. and Eck, M.J. (1997) *Nature* 385, 595-602.
- [106] Sicheri, F., Moarefi, I. and Kuriyan, J. (1997) *Nature* 385, 602-9.
- [107] Lindquist, J.A., Simeoni, L., Schraven, B. (2003) *Immunol Ver* 191, 165-82.
- [108] Davidson, D., Bakinowski, M., Thomas, M.L., et al. (2003) *Mol Cell Biol* 23, 2017-28.
- [109] Erpel, T. and Courtneidge, S.A. (1995) *Curr Opin Cell Biol* 7, 176-82.
- [110] Stein, P. L., H. M. Lee, S. Rich, and P. Soriano. (1992) *Cell* 70, 741-750.
- [111] Olszowy, M. W., P. L. Leuchtman, A. Veillette, and A. S. Shaw. (1995) *J Immunol* 155, 4236-40.
- [112] Utting, O., S. J. Teh, and H. S. Teh. (1998) *J Immunol* 160, 5410-9.
- [113] Salmond, R. J., A. Filby, I. Qureshi, S. Caserta, and R. Zamoyska. (2009) *Immunol Rev* 228, 9-22.