Caracterización de la RNasa ZC3H12A /MCPIP1 en psoriasis

M. Ferran[1], E. Ruiz-Romeu[2], M. Marcuello[2], B. A. Celada[2], J. Jura[3], RM. Pujol[1], LF. Santamaria-Babí[1,2]

1. Servicio de Dermatología, Hospital del Mar. Barcelona
2. Departamento de Fisiología e Inmunología. Universidad de Barcelona. Barcelona
3. Department of General Biochemistry, Jagiellonian University, Krakow, Poland

Introducción y Objetivos

ZC3H12A codifica para una RNasa conocida como MCPIP1, la cual participa en el metabolismo del mRNA y miRNA[1,2]. Se ha descrito que está sobrexpresada en piel psoriática, y que recupera niveles normales tras la resolución de la psoriasis con los nuevos tratamientos que bloquean la vía Th17[3-8]. Sin embargo, el papel de dicha RNasa en la psoriasis es desconocido. Nuestros objetivos son estudiar cómo se modula por IL-17A y analizar la distribución de MCPIP1 en la piel afecta de psoriasis.

Material y Métodos

Para los estudios *in vitro*, se incubaron queratinocitos humanos normales (NHKs) y/o queratinocitos HaCaT con sobrenadantes condicionados, procedentes de cocultivos[9] diluidos 1/10 o con citoquinas recombinantes. Se utilizó el modelo de ratón de inflamación psoriasiforme inducida por imiquimod (IMQ), así como biopsias cutáneas lesionales procedentes de pacientes con psoriasis (previo consentimiento informado), para los experimentos *in vivo*. Asimismo, realizamos estudios de expresión génica y proteína mediante qPCR y *western blot*, respectivamente, y se analizó el patrón de expresión de la proteína con técnicas imunohistoquímicas. Finalmente, se llevó a cabo un análisis por citometria de flujo de suspensiones de células epidérmicas para caracterizar las subpoblaciones que expresaban MCPIP1.

Resultados

Figura 1. Los sobrenadantes procedentes de cocultivos de linfocitos T CLA+ y células epidérmicas autólogas estimulados con extracto de estreptococo, inducen una mayor expresión de ZC3H12A en NHKs.

(A) Los cocultivos de linfocitos T CLA+ (CLA+) con células epidérmicas autólogas (EPI) estimulados con extracto de estreptococo (SE) producen una mayor cantidad de citoquinas proinflamatorias, tales como IL-17A, IFN-γ, TNF-α, IL-6 y IL-8 (Psoriasis n=21; Controles n=5). **(B)** Al estimular NHKs con estos sobrenadantes condicionados (procedentes del cocultivo CLA+/EPI activados con SE) se observa un aumento de la expresión de diferentes genes implicados en psoriasis, entre los cuales ZC3H12A (a diferencia de la estimulación con sobrenadantes procedentes de otras condiciones de cocultivo: CLA- o sin estimulación estreptocócica (Ø). (Psoriasis n=13; Controles n=5). **(C)** El incremento neto de la expresión de ZC3H12A por el cocultivo condicionado se correlacionaba con el nivel de ASLOs para cada paciente. Cada punto representa un paciente.

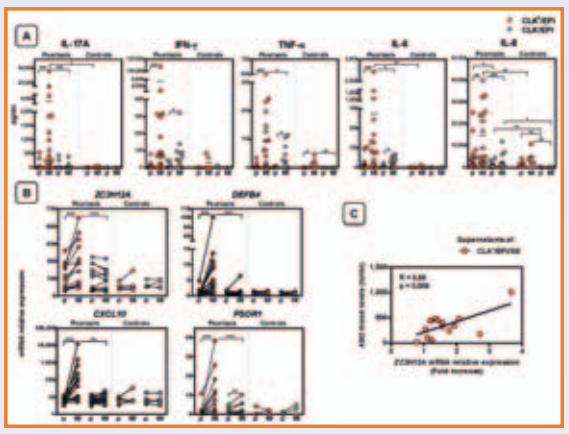


FIGURA 2. La expresión del gen ZC3H12A y de su proteína MCPIP1 es inducida por IL-17A.

(A) El aumento neto de IL-17A (pero no de IFN-γ) que se observa en los sobrenadantes de los cocultivos condicionados se correlacionó con la expresión de ZC3H12A inducido por dichos sobrenadantes en NHKs.

(B, C) La incubación de NHKs con IL-17A y/o IFN-γ recombinante humano reveló que la sobrexpresión de ZC3H12A era dependiente de IL-17A, hecho que se confirmó al realizar experimentos con anticuerpos bloqueantes en los sobrenadantes de cocultivos **(D)**. Además, la estimulación de queratinocitos HaCat con IL-17A evidenció un aumento de la producción de la proteína de ZC3H12A **(E)**. Esta sobreproducción de proteína MCPIP1 no se producía en los queratinocitos HaCAT cuando eran transfectadas con un plásmido que expresaba una secuencia silenciadora shRNA para ZC3H12A (datos no mostrados). Las líneas discontinuas indican expresión basal. Volumen final de estimulación = 300 μl. Los valores netos corresponden a la diferencia entre *los valores* de producción de citoquinas en condiciones activadas por SE y las basales (Ø).

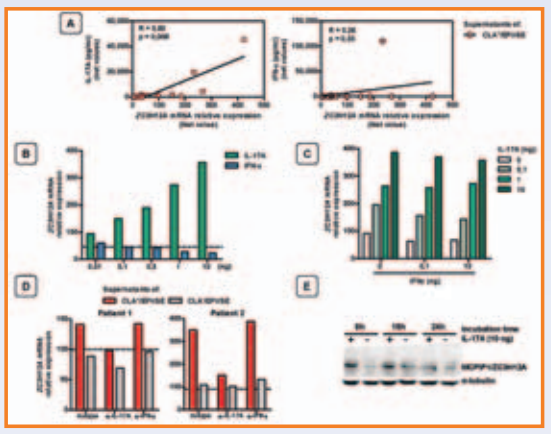


FIGURA 3. El gen ZC3H12A se expresa en la piel de ratón inflamada por IMQ.

(A) En el modelo de ratón con inflamación psoriasiforme tras la aplicación de IMQ, se observó que el gen ZC3H12A estaba marcadamente sobrexpresado, reduciéndose a valores normales tras la aplicación de propionato de clobetasol 0,05% en crema, paralelamente a otros genes implicados en psoriasis. **(B)** El estudio inmunohistoquímico de la biopsia cutánea frente ZC3H12A mostró una tinción más marcada en la zona de piel inflamada con IMQ respecto al control o tras la aplicación del corticoide. Escala gráfica = 50 μm. El cuadrado amarillo indica la zona ampliada.

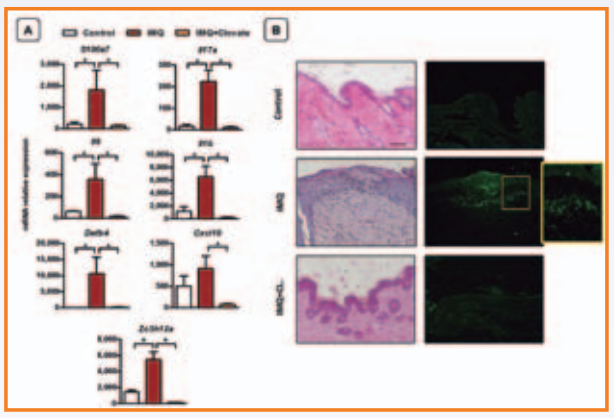
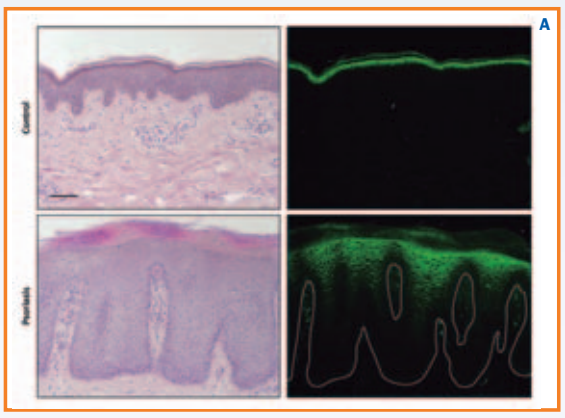
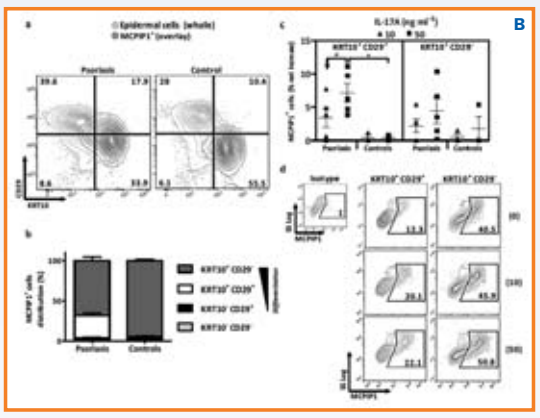


FIGURA 4. La expresión de ZC3H12A está aumentada en piel lesional de pacientes con psoriasis.

(A) El estudio inmunohistoquímico de ZC3H12A en biopsias de piel psoriásica mostró una tinción ampliamente distribuida en los queratinocitos suprabasales, que es diferente de los controles sanos (tinción limitada a la parte más alta de la capa granulosa). Escala gráfica = 100 μm.

(B) Los estudios de citometría de flujo de suspensiones de células epidérmicas confirmó que en las muestras procedentes de controles sanos, la subpoblación MCPIP1+ se encontraba principalmente en los queratinocitos más diferenciados (KRT10+CD29-), mientras que en muestras de psoriasis, también los queratinocitos menos diferenciados (KRT10+ CD29+) se marcaban con MCPIP1(b). Al incubar las suspensiones celulares con IL17A, se detectó un ligero aumento de la subpoblación MCPIP1+, especialmente en el compartimento KRT10+ CD29+ de las muestras de psoriasis(c).





Conclusiones

Los resultados sugieren que MCPIP1 se expresa de forma aberrante en la epidermis psoriática y que puede estar involucrada en la alteración de la diferenciación epidérmica mediada por IL-17A. Futuros estudios permitirán confirmar si el papel de MCPIP1 es específico de psoriasis y cómo participa en los diferentes subtipos clínicos de la enfermedad.

Referencias

1. Mizgalska, D., Wegrzyn, P., Murzyn, K., Kasza, A., Koj, A., Jura, J., Jarzab, B., and Jura, J. (2009). Interleukin-1-inducible MCPIP protein has structural and functional properties of RNase and participates in degradation of IL-1β mRNA. FEBS Journal *276*, 7386–7399.
2. Suzuki, H.I., Arase, M., Matsuyama, H., Choi, Y.L., Ueno, T., Mano, H., Sugimoto, K., and Miyazono, K. (2011). MCPIP1 Ribonuclease Antagonizes Dicer and Terminates MicroRNA Biogenesis through Precursor MicroRNA Degradation. Molecular Cell *44*, 424–43
3. Krueger, J.G., Fretzin, S., Suárez-Fariñas, M., Haslett, P.A., Phipps, K.M., Cameron, G.S., McColm, J., Katcherian, A., Cueto, I., White, T., et al. (2012). IL-17A is essential for cell activation and inflammatory gene circuits in subjects with psoriasis. Journal of Allergy and Clinical Immunology
4. Nograles, K. e., Zaba, L. c., Guttman-Yassky, E., Fuentes-Duculan, J., Suárez-Fariñas, M., Cardinale, I., Khatcherian, A., Gonzalez, J., Pierson, K. c., White, T. r., et al. (2008). Th17 cytokines interleukin (IL)-17 and IL-22 modulate distinct inflammatory and keratinocyte-response pathways. British Journal of Dermatology *159*, 1092–1102.
5. Somma, D., Mastrovito, P., Grieco, M., Lavorgna, A., Pignalosa, A., Formisano, L., Salzano, A.M., Scaloni, A., Pacifico, F., Siebenlist, U., et al. (2015). CIKS/DDX3X Interaction Controls the Stability of the Zc3h12a mRNA Induced by IL-17. J Immunol *194*, 3286–3294
6. Xie, S., Chen, Z., Wang, Q., Song, X., and Zhang, L. (2014). Comparisons of gene expression in normal, lesional, and non-lesional psoriatic skin using DNA microarray techniques. Int J Dermatol *53*, 1213–1220.
7. Chiricozzi, A., Guttman-Yassky, E., Suárez-Fariñas, M., Nograles, K.E., Tian, S., Cardinale, I., Chimenti, S., and Krueger, J.G. (2011). Integrative Responses to IL-17 and TNF-α in Human Keratinocytes Account for Key Inflammatory Pathogenic Circuits in Psoriasis. J Invest Dermatol *131*, 677–687.
8. Russell, C.B., Rand, H., Bigler, J., Kerkof, K., Timour, M., Bautista, E., Krueger, J.G., Salinger, D.H., Welcher, A.A., and Martin, D.A. (2014). Gene expression profiles normalized in psoriatic skin by treatment with brodalumab, a human anti-IL-17 receptor monoclonal antibody. J. Immunol. *192*, 3828–3836.
9. Ferran, M., Galván, A.B., Rincón, C., Romeu, E.R., Sacrista, M., Barboza, E., Giménez-Arnau, A., Celada, A., Pujol, R.M., and Santamaria-Babí, L.F. (2013). Streptococcus Induces Circulating CLA+ Memory T-Cell-Dependent Epidermal Cell Activation in Psoriasis. J Invest Dermatol *133*, 999–1007.

Agradecimientos:
Este estudio se ha realizado gracias a las becas FIS/ISCIII 2013 y FI-DGR.

Hospital del Mar

Parc de Salut MAR Barcelona