CÍNTIA RAQUEL BOMBARDIERI

O CIRCUITO p38MAPK-MSK1 INFLUENCIA
O PERÍODO INICIAL DE DIFERENCIAÇÃO
Th1/2

Tese de Doutorado Direto
apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Doutor em
Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientadora: Prof. Dr. Maristela Martins de Camargo

São Paulo

2007

Resumo

BOMBARDIERI, C. R. **O circuito p38MAPK/MSK1 influencia o período inicial de diferenciação Th1/2.** Tese (Doutorado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Palavras chave: linfócito, quinase, IFN- γ , IL-4.

O sistema imune dos mamíferos forma uma complexa rede de populações celulares especializadas e vias de sinalização extremamente reguladas. Linfócitos T *naïve* podem diferenciar-se após encontro com o antígeno em pelo menos duas sub-populações distintas, Th1 ou Th2, sendo que o papel do circuito p38MAPK/MSK1 durante este período inicial de ativação não é completamente entendido. Linfócitos T CD₄⁺ *naïve* humanos foram estimulados *in vitro* em condições não-polarizantes (Tnp), Th1 ou Th2, na presença de inibidor específico da p38MAPK. As células ativadas e mantidas em condições diferenciadoras Th1 ou Th2 na presença do inibidor SB203580, apresentaram menor produção de IFN- γ e maior produção de IL-4. Através do bloqueio do RNAm da MSK1 por siRNA, observamos o mesmo efeito resultante da inibição da p38MAPK, fato que foi confirmado em experimentos com linfócitos T de camundongos MSK1-deficientes. A alteração da produção das citocinas características de cada população parece ser decorrente da alteração da expressão da IL12R β 2 e IL4R α dos receptores de citocinas da IL-12 e IL-4, respectivamente. Desta forma, os nossos dados sugerem que o circuito p38MAPK/MSK1 participa do processo de ativação dos linfócitos T mantidos em condições diferenciadoras Th1/2.

Abstract

BOMBARDIERI, C. R. **The p38MAPK/MSK1 circuit influences the early stages of differentiation of Th1/2 cells.** [Thesis] Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, 2007.

Key words: lymphocyte, kinase, IFN- γ , IL-4.

The mammalian immune system form a complex network of highly regulated signaling pathways and populations of specialized cells. After meeting with the antigen naïve T cells differentiate into at least two distinct sub-populations, Th1 or Th2, and the role of the circuit p38MAPK/MSK1 during this initial period of activation is not completely understood. Human CD4⁺ T lymphocytes were stimulated in vitro under non-polarized, Th1 or Th2 conditions, in the presence of a specific p38MAPK inhibitor. The cells activated and differentiated under Th1 or Th2 condition in the presence of inhibitor SB203580, had decreased production of IFN- γ and increased IL-4. By silencing MSK1 through siRNA, we observed the same effect due to inhibition of p38MAPK, an observation that was confirmed in experiments with T lymphocytes from mice deficient of MSK1. The change in the production of cytokines appears to be a result of altered expression of IL12R β 2 and IL4R α receptors of the cytokines IL-12 and IL-4, respectively. Taken together, our data suggest that the circuit p38MAPK/MSK1 plays a key role in the activation of human T cells maintained under Th1/2 differentiation conditions.

1 - Introdução

1.1. Vias de sinalização MAPKs

As vias de sinalização MAPKs (do inglês *mitogen-activated protein kinases*) conectam os receptores de superfície celular aos elementos regulatórios das células. MAPKs podem ser ativadas em resposta ao estresse químico ou físico e podem fosforilar diversas proteínas, regulando diversas funções celulares, incluindo a mitose, o metabolismo, influxo de íons transmembrana, diferenciação, apoptose, migração/quimioatração, desenvolvimento dos linfócitos e produção de mediadores inflamatórios. Além disso, algumas proteínas quinases podem fosforilar outras quinases alvo (2, 3).

A atividade das MAPKs é regulada segundo uma organização característica, composta pela seguinte sequência: *MAPKK kinase* ou *MEK kinase* (do inglês *mitogen-activated protein kinase kinase kinase*, também denominada MAPKKK, MAP3K ou MEKK), *MAPK kinase* (do inglês *mitogen-activated protein kinase kinase*, denominada MAPKK, MAP2K, MKK ou MEK) e uma MAPK(2). Elas são ativadas pela fosforilação de um motivo conservado de treonina e tirosina "TXY" (onde X é E para ERK, G para p38MAPK, ou P para JNK). Há três principais famílias de MAPKs: *extracellular signal regulated protein kinases*, consistindo em ERK1 e 2, as p38MAPK (p38 α , β , γ e δ) e Jun NH₂-terminal quinases (JNK1, 2, 3 e Tyk2). Cada família de MAPK possui no mínimo duas MAP2K cognatas e múltiplas MAP3K. A ERK1/2, também denominadas p44 e p42MAPK podem ser ativadas pela MAPKK1 ou MAPKK2. As p38MAPKs são ativadas pela MKK3, MKK4 e MKK6, enquanto a JNK é ativada pela MKK4 e a MKK7 (2). Estas MAP2K são ativadas por diversas MAP3K que são ativadas por diferentes sinais *upstream*. Desta forma, a via de ERK pode ser ativada através de Ras (do inglês *RAS-GTPase-activating protein*) através do grupo Raf da MAP3K. Já as vias da p38MAPK e JNK são ativadas pela família Rho de GTPases, incluindo Rac (do inglês *GTPase-activating protein*) e Cdc42 (do inglês *CDC42-specific guanine nucleotide exchange factor*) (2).

1.1.1. p38MAPK

A p38MAPK foi inicialmente identificada por diferentes grupos utilizando abordagens diferentes. Primeiramente ela foi reconhecida como uma proteína de 38kDa, sendo a principal proteína fosforilada quando linhagens celulares de macrófagos murinos eram estimulados com LPS (*lipopolysaccharide*) (4). Ela também foi identificada como a proteína quinase ativada pela IL-1 que ativa a proteína quinase MAPKAP quinase 2 (do inglês *mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2*)(5, 6), e como sendo o alvo de drogas antiinflamatórias que inibem a síntese de IL-1 e TNF- α por monócitos humanos (7). Subseqüentemente, descreveu-se que a p38MAPK e o seu homólogo Hog1 (do inglês *p38MAPK homolog*) em *Saccharomyces cerevisiae*, eram responsivos a estímulos de estresse (4).

A atividade da p38MAPK é induzida principalmente por estímulos de estresse (como o choque osmótico, hipóxia, proteínas de choque térmico e radiação ultravioleta), além de ser ativada por estímulos pró-inflamatórios e citocinas, como a IL-1, TGF- β (do inglês *transforming growth factor β*) e TNF- α (do inglês *tumor necrosis factor α*) (5, 6, 8, 9).

A p38MAPK é uma quinase conservada evolutivamente. Em *Drosophila*, há duas isoformas da p38MAPK que parecem regular a expressão gênica imune (10). Nos mamíferos existem quatro isoformas da p38MAPK, cada uma codificada por um gene em separado. A p38 α e a p38 β apresentam 74% de similaridade na sua seqüência de aminoácidos e são amplamente expressas (11). Elas possuem substratos comuns *in vitro*, como a MBP (do inglês *myelin basic protein*), ATF-2 (do inglês *activating transcription factor-2*) e MAPKAPK2, mas diferem na atividade. Por exemplo, a p38 β (11) é mais ativa na fosforilação da ATF-2. A p38 γ apresenta 63% de similaridade na seqüência de aminoácidos com a p38 α , e sua distribuição é restrita aos músculos esqueléticos (12). A p38 γ possui a capacidade de fosforilar apenas a MBP, mas não a ATF-2 ou a MAPKAPK2 (13). A p38 δ por sua vez, comparando-se com a p38 α , possui 61% de similaridade na

seqüência de aminoácidos, e está presente nas células T CD₄⁺, nos testículos, pâncreas e no intestino delgado (14, 15).

Apesar do alto grau de similaridade, e a mesma preferência pelos sítios de fosforilação – serinas e/ou treoninas que precedem prolinas – pelo menos *in vitro* as diferentes isoformas apresentam especificidades diferentes para os diversos substratos. Os substratos *in vitro* da p38MAPK incluem os fatores de transcrição ATF-2 (8), e CHOP/GADD153 (do inglês *stress-inducible transcription factor CHOP/gadd153*), um membro da família dos fatores de transcrição do C/EBP (do inglês *CCAAT enhancer binding protein*), que medeiam os efeitos de estresse celular nos processos de crescimento e diferenciação (16); Elk-1 (do inglês *member of ets oncogene family*)(8, 17), MEF-2C (do inglês *nuclear receptor coactivator 2*) (18), e SAP-1 (do inglês *sphingolipid activator protein 1*), que ativam *c-fos* e aumentam a ativação gênica (17), e proteínas quinases incluindo a MAPKAP quinase 2 e 3 (5, 6, 19, 20), Mnk1 e 2 (do inglês *mapk-interacting kinase 1/2*) (21, 22), PRAK (do inglês *p38-regulated/activated kinase*) (23) e RSK-B (do inglês *ribosomal protein S6 kinase* ou MSK2)(24).

Uma característica comum de todos os homólogos da p38MAPK é a presença de um sítio de ativação com 12 aminoácidos. Este sítio contém a seqüência “TGY” (25). Entre as quinases *upstreams*, foi demonstrado que a MKK3 fosforila seletivamente as isoformas α e γ (26), enquanto a MKK6 fosforila todos os homólogos (27, 28). A MKK4 por sua vez, pode ativar tanto a via de p38MAPK como a via da JNK (11).

Nos linfócitos T há uma via alternativa de ativação da p38MAPK, onde a estimulação do TCR (do inglês *T-cell receptor*) resulta ativação de Lck (do inglês *lymphocyte-specific protein-tyrosine kinase*), que fosforila as subunidades de ITAMs (do inglês *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) associados ao TCR, resultando na ativação de Zap70 (do inglês *zeta-chain-associated protein kinase*), no qual fosforila a p38MAPK na Tyr323 (tirosina na posição 323) (29). As células T estimuladas através do TCR utilizam um mecanismo alternativo de ativação, onde a fosforilação da Tyr323 possibilita a autofosforilação da p38MAPK nos resíduos Thr180 e Tyr182 (treonina na posição 180 e tirosina na posição 182), de maneira dependente da Zap70 e independente da proteína adaptadora LAT (do inglês *linker for*

activation of T cells) (30), possibilitando que a p38MAPK se autofosforile e ative os seus substratos (Figura 1).

A ativação da p38 MAPK pela autofosforilação nos resíduos Thr180 e Tyr182 mediada via estimulação do TCR pode ser inibida pelo SB203580 (31). Portanto a ativação é dependente da própria quinase. Este inibidor SB203580 é um componente pirimidil imidazólico amplamente usado que inibe especificamente as isoformas α e β da p38MAPK (32). O SB203580 inibe a produção de citocinas e a proliferação induzida por mitógenos pela estimulação via TCR, com ou sem a coestimulação mediada por CD28 (33-35).

Figura 1 – A estimulação via TCR resulta na ativação de LCK e na ZAP70, que fosforila a p38 no resíduo de tirosina 323, que induz a autofosforilação e a atividade dos seus substratos. Figura: Ashwell, 2006.

A ativação da p38MAPK pode ser terminada pela ação de fosfatases como a MAPK fosfatase 1 (36) através de retroalimentação negativa que envolve uma fosfatase com especificidade única (serina) WIP1 (do inglês *protein phosphatase, magnesium-dependent*). Esta fosfatase pode ser ativada pela via dependente de p38–p53 (37) ou por outros mecanismos reguladores (38).

1.1.2. MSK1/MSK2

Dentre as proteínas quinase ativadas pela p38MAPK está a MSK1 (do inglês *mitogen- and stress-activated protein kinase*) e a sua isoforma MSK2, que apresenta 75% de similaridade na sequência de aminoácidos. Estas quinases foram recentemente descritas e são ativadas tanto pela p38MAPK como pelas ERK-1/2 (24, 39, 40). As MSKs parecem ser expressas constitutivamente no núcleo das células (40), sendo as únicas proteínas quinase descritas capazes de fosforilar histona H3 (41, 42), além de fosforilar alguns fatores de transcrição como o CREB (do inglês *cAMP response element-binding protein*) e ATF1 (do inglês *activating transcription factor 1*) (43, 44) e HMG-14 (do inglês *high-mobility group protein 14*) (41) em resposta a estímulos de estresse e mitose. As MSKs são requeridas na indução de vários *immediate early genes*, incluindo o *c-fos*, *junB* (do inglês *oncogene JunB*), *mkip-1* (do inglês *MAPK phosphatase-1*) (45), *nurr 1* (do inglês *nuclear receptor subfamily 4, group a, member 2*), *nor 1* (do inglês *oxidoreductase domain-containing protein 1*) e *nur 77* (do inglês *nuclear receptor subfamily 4, group a, member 1*) (46).

A MSK1 possui uma sequência de 802 aminoácidos com peso molecular de 89.9kDa (40). A MSK1 possui dois domínios quinase, cada domínio possui os 11 subdomínios característicos de todas as proteínas quinase (47). A sequência de aminoácidos da MSK2 murina e humana apresenta 90% de similaridade (40). Em camundongos o gene codificante da MSK1 localiza-se no cromossomo 12F, enquanto o da MSK2 está localizado no cromossomo 19B (43).

A regulação negativa da atividade das MAPKs é feita primariamente pelas *MAPK fosfatases* (MKPs), que são um grupo de 11 fosfatases específicas que desfosforilam as MAPKs nos seus resíduos regulatórios de Treonina e Tirosina (48). MKP-1 é um membro desta família, e foi clonada inicialmente como um *early response gene* induzido por fatores de crescimento (49, 50). MKP-1 localiza-se no núcleo através de sua extremidade N-terminal (51) e desfosforila preferencialmente a p38MAPK, JNK e em menor extensão ERK1/2 (52). Utilizando células deficientes em MKP-1, diversos grupos têm demonstrado que a deficiência desta fosfatase

resulta na maior ativação de p38MAPK e JNK em resposta a diferentes estímulos (51, 53, 54). Nos camundongos deficientes de MKP-1, observou-se a ativação sustentada de p38MAPK e JNK. Desta forma, a MKP-1 atenua a atividade de p38MAPK e JNK na regulação da produção de citocinas pró e antiinflamatórias (55). Assim sendo, MAPKs e MKP devem apresentar uma inter-relação dinâmica no controle do balanço da resposta imune, através da regulação dos diversos aspectos da resposta imune e na regulação gênica.

1.2. Receptores de citocinas

As citocinas possuem um papel fundamental no desenvolvimento, diferenciação e função das células linfóides e mielóides. Estes fatores estimulam a proliferação, diferenciação e induzem sinais de sobrevivência, bem como induzem funções especializadas em resposta aos patógenos (56).

As citocinas se ligam com alta afinidade aos seus receptores de citocinas, que são formados por homo ou heterodímeros, e a dimerização das subunidades do receptor de citocina é suficiente para iniciar a sinalização (57, 58). A via de sinalização envolve uma família de proteínas denominada Jaks (do inglês *Janus family tyrosine kinases*) e STATs (do inglês *signal transducers and activators of transcription*). Estas vias são importantes tanto para os interferons de tipo I e II, também conhecidas como citocinas do tipo II e incluem IFN α/β , IFN- γ , IFN- ω , IL-10, e seus novos membros, que ainda possuem funções desconhecidas: IL-19, IL-20, IL-22/IL-TIF, IL-24 (mda-7), e IL-26 (AK155) (59). Além disso, são importantes a todas as citocinas cujos receptores são membros da superfamília dos receptores de citocinas, também conhecidos como receptores de citocinas do tipo I. As citocinas do tipo I incluem as citocinas IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, GM-CSF, IL-7, IL-9, IL-13, IL-15, IL-6, IL-11, OSM, CNTF, CT-1, além do hormônio de crescimento, prolactina eritropoetina e trombopoetina. A via Jak-STAT representa uma via de sinalização extremamente rápida, que liga a superfície celular ao núcleo (56).

1.2.1. Receptor da IL-12

A IL-12 é uma citocina heterodimérica (p35/p40) produzida por monócitos ativados e células dendríticas e que possui um papel importante na indução da produção de IFN- γ . O receptor da IL-12 por sua vez, é composto por duas cadeias, a $\beta 1$ e a $\beta 2$ (60) e é expresso em linfócitos T e células NK. Ambas as cadeias possuem grande homologia com gp130, a cadeia β comum do receptor da superfamília da citocina IL-6 *like* (60, 61). As cadeias IL12R $\beta 1$ e IL12R $\beta 2$ são glicoproteínas transmembranas e a co-expressão de ambas as cadeias é necessária para que ocorra a formação de um sítio de ligação de alta afinidade a IL-12 e a sinalização seja eficiente (60). A ativação dos linfócitos T via TCR aumenta a transcrição e a expressão de ambas as cadeias, em especial da IL12R $\beta 2$, cuja expressão é aumentada pela presença da IL-12, IFN- γ , IFN- α , TNF- α , e pela co-estimulação do CD-28 (62, 63). A sinalização intracelular ocorre pela fosforilação de uma proteína de 85kDa que se encontra associada a IL12R $\beta 1$, em resposta a IL-12 (64). A sinalização via receptor da IL-12 induz a fosforilação da tirosina da Janus kinase 2 (Jak2) e Tyk-2, que fosforilam e ativam Stat1, 3, 4 e 5 (60). Os efeitos celulares específicos a IL-12 são decorrentes principalmente da ativação de Stat4.

A cadeia $\beta 1$ é constitutivamente expressa nas células Th1 e Th2. Tanto em humanos quanto em camundongos, a cadeia $\beta 2$ é preferencialmente expressa pelas células Th1, correlacionando a expressão desta subunidade com a responsividade destas células a IL-12 (62, 63). À medida que os linfócitos T *naïve* se comprometem com o fenótipo Th2, estas células expressam apenas a cadeia $\beta 1$, da mesma maneira que os linfócitos B (62, 63). Desta forma, a IL-12 induz a fosforilação de Stat4 em células Th1, mas não em células Th2. A sinalização dependente da IL-12 em linfócitos T humanos está correlacionada com a expressão seletiva dos transcritos que codificam o componente $\beta 2$ do receptor da IL-12. Nas células estimuladas na presença da IL-4, há a menor expressão do IL12R $\beta 2$ (62). Além disso, tanto a fosforilação de Stat4 (65) como a expressão de T-bet (*T box transcription*

factor), que induz a fosforilação de Stat1 (66), parecem ser importantes para a expressão da cadeia $\beta 2$ do receptor da IL-12. Assim, a expressão de ambas as cadeias se faz necessária para que a IL-12 possa induzir a produção de IFN- γ .

Após a ativação do linfócito T via TCR, ocorre a expressão da IL12R $\beta 2$, e a presença da IL-4 e IFN- γ influenciam a expressão desta cadeia do receptor da IL-12 (63). A estimulação via IL-12 resulta na ativação da Janus quinase 2 (Jnk2) e Tyk2, que fosforilam o IL12R, promovendo a alteração conformacional que possibilita a ligação de Stat4 (67, 68). O papel de Stat4 na sinalização parece ser importante, pois o camundongo deficiente em Stat4, apresenta um fenótipo concordante com a deficiência de IL-12 e IL-12R, que possuem a produção de IFN- γ e a diferenciação para o fenótipo Th1 alterada (69, 70). Stat4 é fosforilado na tirosina 693 pelas Jaks, que induzem a dimerização de Stat e a sua translocação para o núcleo, regulando a expressão gênica (68). Ainda não foi elucidado se Stat4 contribui diretamente para a regulação gênica do IFN- γ , embora tenham sido descritos sítios potenciais para a ligação de Stat4 próximo ao gene de IFN- γ (71).

A IL-12 ativa a via MKK6/p38MAPK de duas maneiras: I) dependente de Stat4, induzindo a fosforilação da serina 721 (65, 72, 73), ou II) independente de Stat4 (72). Ambas as vias de ativação propostas induzem a produção de IFN- γ .

1.2.2. Receptor da IL-4

A IL-4 produzida por diversas células do sistema imune, entre as quais as células Th2, basófilos, mastócitos (74), eosinófilos (75), células NKT (76) e linfócitos $\gamma\delta$ (77). Esta citocina possui diversas funções e, embora não seja um fator de crescimento, prolonga substancialmente a vida de linfócitos T e B em cultura (78). Sua presença induz a expressão do seu receptor (79). Há dois tipos de receptores para a IL-4. O receptor do tipo I da IL-4 consiste em uma cadeia IL4R α de 140KDa que se liga com alta afinidade a IL-4, e uma cadeia IL4R γ comum (cadeia γ -c) que foi inicialmente identificada como um componente do receptor da IL-2, mas também faz parte dos receptores da IL-

7, 9, 15 e 21 (80-83). Embora a cadeia IL4R γ apresente baixa afinidade com a IL-4, ela é necessária para que ocorra a ativação das vias de sinalização (84).

Nas linhagens celulares onde a cadeia γ -c não é expressa há um segundo tipo de receptor da IL-4, o receptor do tipo II, que consiste na cadeia IL4R α e a cadeia IL13R α ou IL13R α' (84), sendo que a IL13R α' é o principal componente do complexo IL4R em tecidos não hematopoiéticos (85). Esta cadeia é um membro da superfamília dos receptores da hematopoietina e faz parte do receptor da IL-13, juntamente com as cadeias IL13R α e IL13R α' (84). A IL-13 também possui dois tipos de receptores, e se liga com alta afinidade ao receptor do tipo I, formado pela IL4R α e a IL13R α , que é idêntico ao receptor do tipo II da IL-4. A IL-13 se liga com afinidade maior ainda ao seu receptor do tipo II que consiste na cadeia IL13R α' , mas este receptor falha na indução do sinal, agindo como um *decoy receptor* (86). Apesar de ambas citocinas se ligarem ao mesmo receptor, não está claro se a resposta funcional resultante é a mesma (83). Além disso, o receptor do tipo II, que é comum a IL-4 e IL-13 é expresso somente em linhagens celulares onde a cadeia γ comum não é expressa, o que não inclui os linfócitos T humanos (87).

1.2.3. Receptor do IFN- γ

A molécula de IFN- γ é um homodímero ligado não covalentemente que consiste em duas cadeias polipeptídicas idênticas de 17kDa (88). Durante a biossíntese das cadeias polipeptídicas, os peptídeos são N-glicosilados resultando na forma madura que possui o peso molecular predominante de 50kDa (89).

O receptor do IFN- γ possui duas cadeias α , também denominada CDw119 ou IFNGR1 e duas cadeias β do receptor de IFN- γ , também denominadas fator acessório 1 (AF-1) ou IFNGR2 (90). A expressão das duas subunidades difere significativamente. A subunidade α é expressa na superfície de quase todas as células, enquanto a subunidade β é expressa em níveis muito baixos, mas sua expressão pode ser induzida em certos

tipos celulares por estímulos externos. A sinalização de IFN- γ induz a fosforilação da cadeia α do receptor que leva a modificação conformacional do receptor ativado que se liga a Stat1 (91).

Inicialmente foi demonstrado que células Th1 e Th2 mantêm padrões opostos de responsividade a IL-12 e IFN- γ , sendo que células Th1 respondem somente a IL-12 (92) e células Th2 respondem somente a IFN- γ , pois somente estas células mantêm a expressão da cadeia β do receptor do IFN- γ , (93). Esta diferente responsividade às citocinas afeta significativamente a estabilidade destas populações.

A cadeia β possui expressão baixa, e à medida que os linfócitos T se comprometem com o perfil Th1 eles deixam de expressar esse receptor (93). A perda da cadeia β do receptor ocorre após as células T CD4 *naïve* serem mantidas por cinco dias em condições diferenciadoras Th1 (94). Entretanto, a perda da expressão da cadeia β não está relacionada com o processo de diferenciação dos linfócitos para o perfil Th1. Para que as células T possam diferenciar-se, elas devem possuir um receptor funcional para IFN- γ , o que ocorre como uma resposta das células ao ligante (94). As células Th2 que expressam inicialmente a cadeia β , porém, quando expostas ao IFN- γ deixam de expressar esta subunidade. Desta forma, a presença de IFN- γ parece regular a expressão da cadeia beta do receptor (94).

Células T que são estimuladas via TCR e expandidas na presença de IL-2 são irresponsivas ao IFN- γ devido a falta da expressão da cadeia β . No entanto, estas células ainda expressam a cadeia alfa deste receptor, e a presença da cadeia β pode ser restaurada quando estas células são re-estimuladas com anti-CD3 ou PMA (fitohematoglutininina – PHA) (95).

1.3. Linfócitos Th1/Th2

Linfócitos T *naïve* podem diferenciar-se após o encontro com o antígeno em duas sub-populações distintas caracterizadas pela regulação transcricional recíproca dos *loci* dos genes das citocinas IFN- γ e IL-4. A IL-12 coopera na diferenciação para o perfil Th1 que produz IFN- γ , enquanto a IL-4 induz a diferenciação para o fenótipo Th2 e a produção de IL-4, IL-5 e IL-13.

A resposta Th1 é importante para a eliminação de patógenos intracelulares enquanto a resposta Th2 é efetiva contra patógenos extracelulares. No entanto a resposta Th1 inapropriada pode resultar em doenças autoimunes, enquanto reações atópicas, incluindo a asma, relacionam-se com o desbalanço da resposta Th2 (96).

Ambas as populações celulares parecem derivar de um precursor comum, as células Th precursoras, que são células T CD_4^+ *naïve* que passaram pela seleção tímica e emergem na periferia, mas que ainda não encontraram o antígeno (97). Essas células diferenciam-se em células Th0 que são capazes de produzir uma gama variada de citocinas (inclusive IL-4 e IFN- γ), e dão origem às diferentes sub-populações de linfócitos T.

A ativação via TCR é necessária, mas não suficiente, para a diferenciação e células previamente estimuladas retêm a capacidade de diferenciar-se em Th1 ou Th2 após o encontro secundário com o antígeno. A combinação do reconhecimento do antígeno via TCR e as citocinas presentes no meio ativam as vias de sinalização e fatores de transcrição que agem sinergicamente de modo a induzir a diferenciação celular, promovendo a expressão gênica diferenciada nas diferentes sub-populações (98).

Vários fatores contribuem para a diferenciação das células T. Dentre os fatores determinantes encontram-se as citocinas presentes no meio (99), o número de divisões celulares (100, 101), o tipo de célula apresentadora de antígenos (APC), a dose e a natureza do antígeno (102-104), bem como fatores epigenéticos e o remodelamento da cromatina.

1.3.1 Ativação e Diferenciação dos linfócitos T CD_4^+ *naïve*

O processo pelo qual as células diferenciam-se em Th1 e/ou Th2 está associado com a abertura da cromatina dos genes das citocinas características de cada sub-população (98).

Nas células T *naïve* os genes responsáveis por codificar as citocinas efectoras como o IFN- γ e IL-4, IL-5 e IL-13 apresentam-se não acetilados, em uma condição restritiva da cromatina que não é completamente silenciada e que pode ser reposicionada, tornando-se ativa após a estimulação pelo

antígeno através da acetilação das histonas H3 e H4 (105, 106). Nestas células o *ifng* parece ser remodelado na presença de T-bet e Hlx, e *il4* parece ser remodelado na presença dos fatores de transcrição GATA-3 e c-Maf (107-109). Durante a diferenciação para Th1 há o reposicionamento dos *loci* de GATA-3 e c-maf da eucromatina para a heterocromatina, enquanto que na diferenciação para Th2 o gene do T-bet é metilado, sendo assim silenciado (110, 111). No entanto, estes fatores de transcrição (T-bet e GATA-3) parecem ser requeridos para o estabelecimento, mas não para a manutenção da estrutura permissiva da cromatina dos loci *ifng* e *il4*, respectivamente.

Células CD4⁺ mantidas em condições polarizantes Th1 (presença de IL-12 recombinante e anticorpo neutralizante de IL-4) apresentam a repressão de GATA-3, enquanto nas células diferenciadas em condições polarizantes Th2 (presença de IL-4 recombinante e anticorpo neutralizante de IFN- γ) ocorre a inibição de T-bet. A expressão de T-bet e GATA-3 ocorre de maneira independente do ciclo celular, enquanto que a expressão de ativadores e as modificações pós-traducionais das histonas que potencializam o remodelamento da cromatina parecem ser dependentes do ciclo celular (112).

A transcrição de citocinas parece depender de fatores adicionais específicos para cada sub-população, além de modificações pós-traducionais da histona e descondensação local da cromatina. Durante a diferenciação, um grupo de genes deve ser epigeneticamente ativado, enquanto outros devem ser silenciados. Células Th1 transcrevem IFN- γ em quantidades 100 vezes maiores que células T *naïve*, enquanto silenciam IL-4. Já as células Th2 apresentam um padrão inverso de ativação e silenciamento (113).

4. Plasticidade dos linócitos T CD4⁺ e linfócitos T de memória

A heterogeneidade é uma característica dos linfócitos T antígeno-específicos (114). Os linfócitos T CD4⁺ podem diferenciar-se em células Th1, Th2, Th17 ou células reguladoras antígeno-específicas (Treg) (113, 115). A heterogeneidade também pode ser observada pelos marcadores de *homing*

que distinguem as sub-populações de linfócitos T de memória efetora (116) (116) e os linfócitos T de memória central (T_{CM}) (117).

Os receptores de quimiocinas parecem ser marcadores do comprometimento celular dos linfócitos T. CXCR3 é o receptor para as quimiocinas CXCL9-11 e é principalmente expresso pelas células Th1, que podem ser T_{EM} ou T_{CM} (117, 118). CXCR6 e CCR5 também são preferencialmente expressos pelas células T_{EM} Th1 (119). A sub-população T_{EM} Th2 por sua vez, expressa preferencialmente CCR3, CCR4, CCR8 e o receptor da prostaglandina D2, CRTh2 (117, 118, 120). Linfócitos T_{CM} também expressam CXCR3 e CCR4 e representam as células pré efetoras Th1 e Th2 respectivamente (120).

Os linfócitos T_{CM} expressam o marcador CD45RO⁺ e expressam CCR7 e CD62L, dois receptores que também são característicos de células naïve, e que são necessários para o extravasamento celular pelas vênulas endoteliais altas (78) e migração para os linfonodos (120, 121). Possuem função efetora limitada, mas proliferam e tornam-se células efetoras após a estimulação antigênica secundária e são menos dependentes da co-estimulação (120). As T_{CM} superexpressam CD40L, estimulando de maneira eficaz células dendríticas (122) e linfócitos B (120, 121). Após a estimulação via TCR os T_{CM} produzem IL-2, mas após a estimulação antigênica são capazes de produzir IL-4 e IFN- γ . As T_{EM} , por sua vez, migram para os tecidos periféricos, pois perdem a expressão de CCR7 e são heterogêneas para a expressão de CD62L. Estas células possuem a habilidade de produzir rapidamente citocinas efetoras como o IFN- γ , mas possuem capacidade limitada de proliferação (121). Além disso, as células desempenham funções distintas. As T_{CM} estão envolvidas com a resposta imune secundária e a proteção de longa duração, enquanto as T_{EM} estão envolvidas na proteção imediata. Embora algumas destas propriedades pareçam estar relacionadas com o estado de ativação celular, a maioria parece representar escolhas distintas dos linfócitos T e são estáveis após a expansão clonal (114).

A ontogenia dos linfócitos T de memória é controversa. Alguns estudos sugerem o desenvolvimento progressivo das células de memória a partir das células efetoras, enquanto outros estudos sugerem uma divisão inicial de

comprometimento entre as células efectoras e de memória (117, 123-125). Não há um consenso se o processo de diferenciação é determinístico ou estocástico. Uma das hipóteses é que durante o processo de diferenciação das células T CD_4^+ naïve para células efectoras e de memória não parece haver uma determinada seqüência de eventos (126). Ao contrário, coexistem vias em paralelo que resultam em populações altamente heterogêneas e multifuncionais que expressam um ou ambos os perfis terminais e podem ser encontradas co-expressando os marcadores naïve.

Foi demonstrado que, conforme a expressão de CXCR3 e CCR4, os linfócitos T_{CM} são capazes de se diferenciar espontaneamente em células Th1 e Th2 respectivamente, na ausência de condições polarizantes (127). Além disso, a maioria dos linfócitos T_{EM} (tanto Th1 como Th2) quando estimulados in vitro sob condições polarizantes opostas retêm a capacidade de produzir as citocinas que já estavam sendo produzidas e passam a produzir as citocinas dos genes opostos (128). Além disso, no modelo murino as células T de memória efectora – T_{EM} – permanecem comprometidas com a produção das citocinas características da sua linhagem (128). Células Th1 T_{EM} possuem a capacidade de produzir IL-4 quando mantidas em condições diferenciadoras Th2 e mantêm a capacidade de produzir IFN- γ . Contudo, células Th2 T_{EM} são menos flexíveis quanto à produção de citocinas e não passam a produzir IFN- γ prontamente quando mantidas em condições diferenciadoras Th1. Assim, achados demonstram que há um potencial diferencial de produção de citocinas entre as diferentes populações de linfócitos T, indicando um comprometimento diferenciado entre as várias populações de linfócitos de memória (129).

Neste estudo, nós analisamos o papel do circuito p38MAPK/MSK1 durante o período inicial de ativação de linfócitos T naïve mantidos em condições diferenciadoras Th1/2. Os dados sugerem que o circuito p38MAPK/MSK1 participa do processo de ativação dos linfócitos T mantidos em condições diferenciadoras Th1/2 como resultado da alteração da expressão das cadeias IL12R β 2 e IL4R α dos receptores de citocinas da IL-12 e IL-4, respectivamente.

6. Conclusões

- * A p38MAPK está envolvida na produção de IFN- γ no período de diferenciação inicial das células Th1/2.
- * As quinases MSK1/2, ativadas pela p38MAPK, estão envolvidas no período de diferenciação inicial das células Th1/2.
- * A presença de SB203580 foi aditiva a ausência do gene MSK na inibição da produção de IFN- γ . A tendência de elevar o número de células que produzem IL-4 também foi observada.
- * MSK1 e p38MAPK agem em conjunto, mas nossos resultados indicam que há no mínimo mais uma via alternativa regulando a produção das citocinas características das células Th1/2.
- * A alteração da produção das citocinas características de cada população parece ser decorrente da alteração da expressão da IL12R β 2 e IL4R α dos receptores de citocinas da IL-12 e IL-4, respectivamente.
- * Os nossos dados sugerem que o circuito p38MAPK/MSK1 participa do processo de diferenciação dos linfócitos T ativados e mantidos em condições diferenciadoras Th1/2.

7. Bibliografia

1. Macdonald, N., Welburn, J.P., Noble, M.E., Nguyen, A., Yaffe, M.B., Clynes, D., Moggs, J.G., Orphanides, G., Thomson, S., Edmunds, J.W., Clayton, A.L., Endicott, J.A., Mahadevan, L.C. (2005) Molecular basis for the recognition of phosphorylated and phosphoacetylated histone h3 by 14-3-3. *Mol Cell*, **20**, 199-211.
2. Dong, C., Davis, R.J., Flavell, R.A. (2002) MAP kinases in the immune response. *Annu Rev Immunol*, **20**, 55-72.
3. Chang, L.K., M. (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*, **410**, 37-40.
4. Han, J., Lee, J.D., Bibbs, L., Ulevitch, R.J. (1994) A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science*, **265**, 808-811.
5. Freshney, N.W., Rawlinson, L., Guesdon, F., Jones, E., Cowley, S., Hsuan, J., Saklatvala, J. (1994) Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27. *Cell*, **78**, 1039-1049.
6. Rouse, J., Cohen, P., Trigon, S., Morange, M., Alonso-Llamazares, A., Zamanillo, D., Hunt, T., Nebreda, A.R. (1994) A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell*, **78**, 1027-1037.
7. Lee, J.C., Laydon, J.T., McDonnell, P.C., Gallagher, T.F., Kumar, S., Green, D., McNulty, D., Blumenthal, M.J., Heys, J.R., Landvatter, S. W. et al., (1994) A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature*, **372**, 739-746.
8. Raingeaud, J., Whitmarsh, A.J., Barrett, T., Derijard, B., Davis, R.J. (1996) MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Mol Cell Biol*, **16**, 1247-1255.
9. Hannigan, M., Zhan, L., Ai, Y., Huang, C.K. (1998) The role of p38 MAP kinase in TGF-beta1-induced signal transduction in human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun*, **246**, 55-58.
10. Han, Z.S., Enslen, H., Hu, X., Meng, X., Wu, I.H., Barrett, T., Davis, R.J., Ip, Y.T. (1998) A conserved p38 mitogen-activated protein kinase pathway regulates Drosophila immunity gene expression. *Mol Cell Biol*, **18**, 3527-3539.
11. Jiang, Y., Chen, C., Li, Z., Guo, W., Gegner, J.A., Lin, S., Han, J. (1996) Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38beta). *J Biol Chem*, **271**, 17920-17926.
12. Li, Z., Jiang, Y., Ulevitch, R.J. and Han, J. (1996) The primary structure of p38 gamma: a new member of p38 group of MAP kinases. *Biochem Biophys Res Commun*, **228**, 334-340.
13. Ashwell, J.D. (2006) The many paths to p38 mitogen-activated protein kinase activation in the immune system. *Nat Rev Immunol*, **6**, 532-540.
14. Kumar, S., Orsini, M.J., Lee, J.C., McDonnell, P.C., Debouck, C., Young, P.R. (1996) Activation of the HIV-1 long terminal repeat by cytokines and

- environmental stress requires an active CSBP/p38 MAP kinase. *J Biol Chem*, **271**, 30864-30869.
15. Hale, K.K., Trollinger, D., Rihaneck, M., Manthey, C.L. (1999) Differential expression and activation of p38 mitogen-activated protein kinase alpha, beta, gamma, and delta in inflammatory cell lineages. *J Immunol*, **162**, 4246-4252.
  16. Wang, X.Z.R., D. (1996) Stress-induced phosphorylation and activation of the transcription factor CHOP (GADD153) by p38 MAP Kinase. *Science*, **272**, 1347-1349.
  17. Whitmarsh, A.J., Yang, S.H., Su, M.S., Sharrocks, A.D., Davis, R.J. (1997) Role of p38 and JNK mitogen-activated protein kinases in the activation of ternary complex factors. *Mol Cell Biol*, **17**, 2360-2371.
  18. Han, J., Jiang, Y., Li, Z., Kravchenko, V.V., Ulevitch, R.J. (1997) Activation of the transcription factor MEF2C by the MAP kinase p38 in inflammation. *Nature*, **386**, 296-299.
  19. McLaughlin, M.M., Kumar, S., McDonnell, P.C., Van Horn, S., Lee, J.C., Livi, G.P., Young, P.R. (1996) Identification of mitogen-activated protein (MAP) kinase-activated protein kinase-3, a novel substrate of CSBP p38 MAP kinase. *J Biol Chem*, **271**, 8488-8492.
  20. Ludwig, S., Engel, K., Hoffmeyer, A., Sithanandam, G., Neufeld, B., Palm, D., Gaestel, M., Rapp, U.R. (1996) 3pK, a novel mitogen-activated protein (MAP) kinase-activated protein kinase, is targeted by three MAP kinase pathways. *Mol Cell Biol*, **16**, 6687-6697.
  21. Fukunaga, R.H., T. (1997) MNK1, a new MAP kinase-activated protein kinase, isolated by a novel expression screening method for identifying protein kinase substrates. *Embo J*, **16**, 1921-1933.
  22. Waskiewicz, A.J., Flynn, A., Proud, C.G., Cooper, J.A. (1997) Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. *Embo J*, **16**, 1909-1920.
  23. New, L., Jiang, Y., Zhao, M., Liu, K., Zhu, W., Flood, L.J., Kato, Y., Parry, G.C., Han, J. (1998) PRAK, a novel protein kinase regulated by the p38 MAP kinase. *Embo J*, **17**, 3372-3384.
  24. Pierrat, B., Correia, J.S., Mary, J.L., Tomas-Zuber, M., Lesslauer, W. (1998) RSK-B, a novel ribosomal S6 kinase family member, is a CREB kinase under dominant control of p38alpha mitogen-activated protein kinase (p38alphaMAPK). *J Biol Chem*, **273**, 29661-29671.
  25. Lee, J.C., Kassis, S., Kumar, S., Badger, A., Adams, J.L. (1999) p38 mitogen-activated protein kinase inhibitors--mechanisms and therapeutic potentials. *Pharmacol Ther*, **82**, 389-397.
  26. Enslen, H., Raingeaud, J., Davis, R. J. (1998) Selective activation of p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase isoforms by the MAP kinase kinases MKK3 and MKK6. *J Biol Chem*, **273**, 1741-1748.
  27. Goedert, M., Cuenda, A., Craxton, M., Jakes, R., Cohen, P. (1997) Activation of the novel stress-activated protein kinase SAPK4 by cytokines and cellular stresses is mediated by SKK3 (MKK6); comparison of its substrate specificity with that of other SAP kinases. *Embo J*, **16**, 3563-3571.
  28. Cuenda, A., Cohen, P., Buee-Scherrer, V., Goedert, M. (1997) Activation of stress-activated protein kinase-3 (SAPK3) by cytokines and cellular

- stresses is mediated via SAPKK3 (MKK6); comparison of the specificities of SAPK3 and SAPK2 (RK/p38). *Embo J*, **16**, 295-305.
29. Salvador, J.M., Mittelstadt, P.R., Guszczynski, T., Copeland, T.D., Yamaguchi, H., Appella, E., Fornace, A. J., Ashwell, J.D. (2005) Alternative p38 activation pathway mediated by T cell receptor-proximal tyrosine kinases. *Nat Immunol*, **6**, 390-395.
  30. Salvador, J.M., Mittelstadt, P.R., Belova, G.I., Fornace, A.J., Jr., Ashwell, J.D. (2005) The autoimmune suppressor Gadd45alpha inhibits the T cell alternative p38 activation pathway. *Nat Immunol*, **6**, 396-402.
  31. Mittelstadt, P.R., Salvador, J.M., Fornace, A.J., Jr. and Ashwell, J.D. (2005) Activating p38 MAPK: new tricks for an old kinase. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*, **4**, 1189-1192.
  32. Kumar, S., McDonnell, P.C., Gum, R.J., Hand, A.T., Lee, J.C., Young, P.R. (1997) Novel homologues of CSBP/p38 MAP kinase: activation, substrate specificity and sensitivity to inhibition by pyridinyl imidazoles. *Biochem Biophys Res Commun*, **235**, 533-538.
  33. Rincon, M., Enslin, H., Raingeaud, J., Recht, M., Zapton, T., Su, M. S., Penix, L. A., Davis, R. J., Flavell, R. A. (1998) Interferon-gamma expression by Th1 effector T cells mediated by the p38 MAP kinase signaling pathway. *Embo J*, **17**, 2817-2829.
  34. Zhang, D.H., Yang, L., Ray, A. (1998) Differential responsiveness of the IL-5 and IL-4 genes to transcription factor GATA-3. *J Immunol*, **161**, 3817-3821.
  35. Haeryfar, S.M.H., D.W. (2001) Selective pharmacological inhibitors reveal differences between Thy-1- and T cell receptor-mediated signal transduction in mouse T lymphocytes. *Int Immunopharmacol*, **1**, 689-698.
  36. Wu, J.J.B., A.M. (2005) Essential role for mitogen-activated protein (MAP) kinase phosphatase-1 in stress-responsive MAP kinase and cell survival signaling. *J Biol Chem*, **280**, 16461-16466.
  37. Takekawa, M., Adachi, M., Nakahata, A., Nakayama, I., Itoh, F., Tsukuda, H., Taya, Y., Imai, K. (2000) p53-inducible wip1 phosphatase mediates a negative feedback regulation of p38 MAPK-p53 signaling in response to UV radiation. *Embo J*, **19**, 6517-6526.
  38. Cheung, P.C., Campbell, D.G., Nebreda, A.R., Cohen, P. (2003) Feedback control of the protein kinase TAK1 by SAPK2a/p38alpha. *Embo J*, **22**, 5793-5805.
  39. New, L., Zhao, M., Li, Y., Bassett, W.W., Feng, Y., Ludwig, S., Padova, F.D., Gram, H., Han, J. (1999) Cloning and characterization of RLPK, a novel RSK-related protein kinase. *J Biol Chem*, **274**, 1026-1032.
  40. Deak, M., Clifton, A.D., Lucocq, L.M., Alessi, D.R. (1998) Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB. *Embo J*, **17**, 4426-4441.
  41. Soloaga, A., Thomson, S., Wiggin, G. R., Rampersaud, N., Dyson, M. H., Hazzalin, C. A., Mahadevan, L. C., Arthur, J. S. (2003) MSK2 and MSK1 mediate the mitogen- and stress-induced phosphorylation of histone H3 and HMG-14. *Embo J*, **22**, 2788-2797.
  42. Nowak, S.J.C., V.G. (2004) Phosphorylation of histone H3: a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation. *Trends Genet*, **20**, 214-220.

43. Wiggin, G.R., Soloaga, A., Foster, J.M., Murray-Tait, V., Cohen, P., Arthur, J.S. (2002) MSK1 and MSK2 are required for the mitogen- and stress-induced phosphorylation of CREB and ATF1 in fibroblasts. *Mol Cell Biol*, **22**, 2871-2881.
44. Arthur, J.S.C., P. (2000) MSK1 is required for CREB phosphorylation in response to mitogens in mouse embryonic stem cells. *FEBS Lett*, **482**, 44-48.
45. Schuck, S., Soloaga, A., Schrott, G., Arthur, J.S., Nordheim, A. (2003) The kinase MSK1 is required for induction of c-fos by lysophosphatidic acid in mouse embryonic stem cells. *BMC Mol Biol*, **4**, 6.
46. Darragh, J., Soloaga, A., Beardmore, V.A., Wingate, A.D., Wiggin, G.R., Pegg, M., Arthur, J.S. (2005) MSKs are required for the transcription of the nuclear orphan receptors Nur77, Nurr1 and Nor1 downstream of MAPK signalling. *Biochem J*, **390**, 749-759.
47. Hanks, S.K.Q., A.M. (1991) Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members. *Methods Enzymol*, **200**, 38-62.
48. Farooq, A.Z., M.M. (2004) Structure and regulation of MAPK phosphatases. *Cell Signal*, **16**, 769-779.
49. Charles, C.H., Abler, A.S. & Lau, L.F. (1992) cDNA sequence of a growth factor-inducible immediate early gene and characterization of its encoded protein. *Oncogene*, **7**, 187-190.
50. Lau, L.F.N., D. (1985) Identification of a set of genes expressed during the G0/G1 transition of cultured mouse cells. *Embo J*, **4**, 3145-3151.
51. Wu, J.J., Zhang, L. & Bennett, A.M. (2005) The noncatalytic amino terminus of mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 directs nuclear targeting and serum response element transcriptional regulation. *Mol Cell Biol*, **25**, 4792-4803.
52. Franklin, C.C.a.K., A.S. (1997) Conditional expression of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase MKP-1 preferentially inhibits p38 MAPK and stress-activated protein kinase in U937 cells. *J Biol Chem*, **272**, 16917-16923.
53. Nimah, M., Zhao, B., Denenberg, A.G., Bueno, O., Molkenstein, J., Wong, H.R., Shanley, T.P. (2005) Contribution of MKP-1 regulation of p38 to endotoxin tolerance. *Shock*, **23**, 80-87.
54. Zhao, Q., Shepherd, E.G., Manson, M.E., Nelin, L.D., Sorokin, A., Liu, Y. (2005) The role of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in the response of alveolar macrophages to lipopolysaccharide: attenuation of proinflammatory cytokine biosynthesis via feedback control of p38. *J Biol Chem*, **280**, 8101-8108.
55. Chi, H., Barry, S.P., Roth, R.J., Wu, J.J., Jones, E.A., Bennett, A.M., Flavell, R. A. (2006) Dynamic regulation of pro- and anti-inflammatory cytokines by MAPK phosphatase 1 (MKP-1) in innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 2274-2279.
56. Leonard, W.J. and O'Shea, J.J. (1998) Jaks and STATs: biological implications. *Annu Rev Immunol*, **16**, 293-322.
57. Nakamura, Y., Russell, S.M., Mess, S.A., Friedmann, M., Erdos, M., Francois, C., Jacques, Y., Adelstein, S. and Leonard, W.J. (1994) Heterodimerization of the IL-2 receptor beta- and gamma-chain cytoplasmic domains is required for signalling. *Nature*, **369**, 330-333.

58. Walter, M.R., Windsor, W.T., Nagabhushan, T.L., Lundell, D.J., Lunn, C.A., Zauodny, P.J. and Narula, S.K. (1995) Crystal structure of a complex between interferon-gamma and its soluble high-affinity receptor. *Nature*, **376**, 230-235.
59. Blumberg, H., Conklin, D., Xu, W.F., Grossmann, A., Brender, T., Carollo, S., Eagan, M., Foster, D., Haldeman, B.A., Hammond, A. *et al.* (2001) Interleukin 20: discovery, receptor identification, and role in epidermal function. *Cell*, **104**, 9-19.
60. Presky, D.H., Yang, H., Minetti, L.J., Chua, A.O., Nabavi, N., Wu, C.Y., Gately, M.K., Gubler, U. (1996) A functional interleukin 12 receptor complex is composed of two beta-type cytokine receptor subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 14002-14007.
61. Trinchieri, G. (2003) Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*, **3**, 133-146.
62. Rogge, L., Barberis-Maino, L., Biffi, M., Presky, D. H., Gubler, U., Sinigaglia, F. (1997) Selective expression of an interleukin-12 receptor component by human T helper 1 cells. *J Exp Med*, **185**, 825-831.
63. Szabo, S.J., Dighe, A.S., Gubler, U., Murphy, K.M. (1997) Regulation of the interleukin (IL)-12R beta 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells. *J Exp Med*, **185**, 817-824.
64. Kawashima, T., Kawasaki, H., Kitamura, T., Nojima, Y. and Morimoto, C. (1998) Interleukin-12 induces tyrosine phosphorylation of an 85-kDa protein associated with the interleukin-12 receptor beta 1 subunit. *Cellular immunology*, **186**, 39-44.
65. Morinobu, A., Gadina, M., Strober, W., Visconti, R., Fornace, A., Montagna, C., Feldman, G.M., Nishikomori, R. and O'Shea, J.J. (2002) STAT4 serine phosphorylation is critical for IL-12-induced IFN-gamma production but not for cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 12281-12286.
66. Afkarian, M., Sedy, J. R., Yang, J., Jacobson, N. G., Cereb, N., Yang, S. Y., Murphy, T. L., Murphy, K. M. (2002) T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4+ T cells. *Nat Immunol*, **3**, 549-557.
67. Jacobson, N.G., Szabo, S.J., Weber-Nordt, R.M., Zhong, Z., Schreiber, R.D., Darnell, J.E., Jr. and Murphy, K.M. (1995) Interleukin 12 signaling in T helper type 1 (Th1) cells involves tyrosine phosphorylation of signal transducer and activator of transcription (Stat)3 and Stat4. *J Exp Med*, **181**, 1755-1762.
68. Bacon, C.M., McVicar, D.W., Ortaldo, J.R., Rees, R.C., O'Shea, J.J. and Johnston, J.A. (1995) Interleukin 12 (IL-12) induces tyrosine phosphorylation of JAK2 and TYK2: differential use of Janus family tyrosine kinases by IL-2 and IL-12. *J Exp Med*, **181**, 399-404.
69. Thierfelder, W.E., van Deursen, J.M., Yamamoto, K., Tripp, R.A., Sarawar, S.R., Carson, R.T., Sangster, M.Y., Vignali, D.A., Doherty, P.C., Grosveld, G.C. *et al.* (1996) Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells. *Nature*, **382**, 171-174.
70. Kaplan, M.H., Sun, Y.L., Hoey, T. and Grusby, M.J. (1996) Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice. *Nature*, **382**, 174-177.

71. Xu, X., Sun, Y.L. and Hoey, T. (1996) Cooperative DNA binding and sequence-selective recognition conferred by the STAT amino-terminal domain. *Science*, **273**, 794-797.
72. Zhang, S. and Kaplan, M.H. (2000) The p38 mitogen-activated protein kinase is required for IL-12-induced IFN-gamma expression. *J Immunol*, **165**, 1374-1380.
73. Visconti, R., Gadina, M., Chiariello, M., Chen, E.H., Stancato, L.F., Gutkind, J.S. and O'Shea, J.J. (2000) Importance of the MKK6/p38 pathway for interleukin-12-induced STAT4 serine phosphorylation and transcriptional activity. *Blood*, **96**, 1844-1852.
74. Seder, R.A. and Paul, W.E. (1994) Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. *Annu Rev Immunol*, **12**, 635-673.
75. Dubucquoi, S., Desreumaux, P., Janin, A., Klein, O., Goldman, M., Tavernier, J., Capron, A. and Capron, M. (1994) Interleukin 5 synthesis by eosinophils: association with granules and immunoglobulin-dependent secretion. *J Exp Med*, **179**, 703-708.
76. Ferrick, D.A., Schrenzel, M.D., Mulvania, T., Hsieh, B., Ferlin, W.G. and Lepper, H. (1995) Differential production of interferon-gamma and interleukin-4 in response to Th1- and Th2-stimulating pathogens by gamma delta T cells in vivo. *Nature*, **373**, 255-257.
77. Chen, H. and Paul, W.E. (1997) Cultured NK1.1+ CD4+ T cells produce large amounts of IL-4 and IFN-gamma upon activation by anti-CD3 or CD1. *J Immunol*, **159**, 2240-2249.
78. Hu-Li, J., Shevach, E. M., Mizuguchi, J., Ohara, J., Mosmann, T., Paul, W. E. (1987) B cell stimulatory factor 1 (interleukin 4) is a potent costimulant for normal resting T lymphocytes. *J Exp Med*, **165**, 157-172.
79. Ohara, J., Paul, W. E. (1988) Up-regulation of interleukin 4/B-cell stimulatory factor 1 receptor expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 8221-8225.
80. Noguchi, M., Nakamura, Y., Russell, S.M., Ziegler, S.F., Tsang, M., Cao, X. and Leonard, W.J. (1993) Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-7 receptor. *Science*, **262**, 1877-1880.
81. Russell, S.M., Keegan, A.D., Harada, N., Nakamura, Y., Noguchi, M., Leland, P., Friedmann, M.C., Miyajima, A., Puri, R.K., Paul, W.E. *et al.* (1993) Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-4 receptor. *Science*, **262**, 1880-1883.
82. Kondo, M., Takeshita, T., Ishii, N., Nakamura, M., Watanabe, S., Arai, K. and Sugamura, K. (1993) Sharing of the interleukin-2 (IL-2) receptor gamma chain between receptors for IL-2 and IL-4. *Science*, **262**, 1874-1877.
83. Kelly-Welch, A.E., Hanson, E.M., Boothby, M.R. and Keegan, A.D. (2003) Interleukin-4 and interleukin-13 signaling connections maps. *Science*, **300**, 1527-1528.
84. Nelms, K., Keegan, A.D., Zamorano, J., Ryan, J.J., Paul, W.E. (1999) The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. *Annu Rev Immunol*, **17**, 701-738.
85. Murata, T., Taguchi, J. and Puri, R.K. (1998) Interleukin-13 receptor alpha' but not alpha chain: a functional component of interleukin-4 receptors. *Blood*, **91**, 3884-3891.

86. Wood, N., Whitters, M.J., Jacobson, B.A., Witek, J., Sypek, J.P., Kasaian, M., Eppihimer, M.J., Unger, M., Tanaka, T., Goldman, S.J. *et al.* (2003) Enhanced interleukin (IL)-13 responses in mice lacking IL-13 receptor alpha 2. *J Exp Med*, **197**, 703-709.
87. Chomarat, P. and Banchereau, J. (1998) Interleukin-4 and interleukin-13: their similarities and discrepancies. *International reviews of immunology*, **17**, 1-52.
88. Ealick, S.E., Cook, W.J., Vijay-Kumar, S., Carson, M., Nagabhushan, T.L., Trotta, P.P. and Bugg, C.E. (1991) Three-dimensional structure of recombinant human interferon-gamma. *Science*, **252**, 698-702.
89. Kelker, H.C., Le, J., Rubin, B.Y., Yip, Y.K., Nagler, C. and Vilcek, J. (1984) Three molecular weight forms of natural human interferon-gamma revealed by immunoprecipitation with monoclonal antibody. *J Biol Chem*, **259**, 4301-4304.
90. Bach, E.A., Aguet, M., Schreiber, R. D. (1997) The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu Rev Immunol*, **15**, 563-591.
91. Greenlund, A.C., Farrar, M. A., Viviano, B. L., Schreiber, R. D. (1994) Ligand-induced IFN gamma receptor tyrosine phosphorylation couples the receptor to its signal transduction system (p91). *Embo J*, **13**, 1591-1600.
92. Szabo, S.J., Jacobson, N.G., Dighe, A.S., Gubler, U. and Murphy, K.M. (1995) Developmental commitment to the Th2 lineage by extinction of IL-12 signaling. *Immunity*, **2**, 665-675.
93. Pernis, A., Gupta, S., Gollob, K.J., Garfein, E., Coffman, R.L., Schindler, C. and Rothman, P. (1995) Lack of interferon gamma receptor beta chain and the prevention of interferon gamma signaling in TH1 cells. *Science*, **269**, 245-247.
94. Bach, E.A., Szabo, S. J., Dighe, A. S., Ashkenazi, A., Aguet, M., Murphy, K. M., Schreiber, R. D. (1995) Ligand-induced autoregulation of IFN-gamma receptor beta chain expression in T helper cell subsets. *Science*, **270**, 1215-1218.
95. Sakatsume, M. and Finbloom, D.S. (1996) Modulation of the expression of the IFN-gamma receptor beta-chain controls responsiveness to IFN-gamma in human peripheral blood T cells. *J Immunol*, **156**, 4160-4166.
96. Mosmann, T.R., & Coffman, R.L. (1989) Th1 and Th2 cells: Different Patterns of Lymphokine Secretion Lead to Different Functional Properties. *Ann. Rev. Immunol.*, **7**, 145 - 173.
97. O'Garra, A. (1998) Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity*, **8**, 275-283.
98. Ansel, K.M., Lee, D.U., Rao, A. (2003) An epigenetic view of helper T cell differentiation. *Nat. Immunol.*, **4**, 616 - 623.
99. Abbas, A.K., Murphy, K. M. & Sher, A. (1996) Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*, **133**, 787 - 793.
100. Gett, A.V.H., P.D. (1998) Cell division regulates the T cell cytokine repertoire, revealing a mechanism underlying immune class regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **95**, 9488 - 9493.
101. Bird, J.J., Brown, D.R., Mullen, A.C., Moskowitz, N.H., Mahowald, M.A., Sider, J.S., Gajewski, T.F., Wang, C., Reiner, S.L. (1998) Helper T cell differentiation is controlled by cell cycle. *Immunity*, **9**, 229 - 237.

102. Hosken, N.A., Shibuya, K., Heath, A.W., Murphy, K.M., O'Garra, A. (1995) The effect of antigen dose on CD4+ T helper cell phenotype development in a T cell receptor-alpha beta-transgenic model. *J. Exp. Med.*, **182**, 1579 - 1584.
103. Burstein, H.J.A., A.K. (1993) In vivo role of interleukin 4 in T cell tolerance induced by aqueous protein antigen. *J. Exp. Med.*, **177**, 457 - 463.
104. DeWit, D., Mechelen, M.V., Ryelandt, M., Figueiredo, A.C., Abramowicz, D., Goldman, M., Bazin, H., Urbain, J., Leo, O. (1992) The injection of deaggregated gamma globulins in adult mice induces antigen-specific unresponsiveness of T helper type 1 but not type 2 lymphocytes. *J. Exp. Med.*, **175**, 9 - 14.
105. Sallusto, F.a.R., S.L. (2005) Sliding doors in the immune response. *Nat Immunol.*, **6**, 10 - 12.
106. Fields, P.E., Kim, S.T. and Flavell, R. (2002) Cutting Edge: Changes in histone acetylation at the IL-4 and IFNg loci accompany Th1/Th2 differentiation. *J Immunol*, **169**, 647 - 650.
107. Zheng, W.F., R.A. (1997) The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell*, **89**, 587 - 596.
108. Mullen, A.C., Hutchins, A.S., High, F.A., Lee, H.W., Sykes, K.J., Chodosh, L.A., Reiner, S.L. (2002) Hlx is induced by and genetically interacts with T-bet to promote heritable Th1 gene induction. *Nat. Immunol.*, **3**, 652 - 658.
109. Szabo, S.J., Kim, S.T., Costa, G.L., Zhang, X., Fathman, C.G., Glimcher, L.H. (2000) A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell*, **100**, 655 - 669.
110. Hewitt, S.L., High, F.A., Reiner, S.L., Ficher, A.G., Merkenschlager, M. (2004) Nuclear repositioning marks the selective exclusion of lineage-inappropriate transcription factor loci during T helper cell differentiation. *Eur. J. Immunol.*, **34**, 3604 - 3613.
111. Grogan, J.L., Mohrs, M., Harmon, B., Lacy, D.A., Sedat, J.W., Locksley, R.M. (2001) Early transcription and silencing of cytokine genes underlie polarization of T helper cell subsets. *Immunity*, **14**, 205 - 215.
112. Mullen, A.C., Hutchins, A.S., Villarino, A.V., Lee, H.W., High, F.A., Cereb, N., Yang, S.Y., Hua, X., Reiner, S.L. (2001) Cell cycle controlling the silencing and functioning of mammalian activators. *Curr Biol*, **11**, 1695-1699.
113. Murphy, K.M.R., S. L. (2002) The lineage decisions of T helper cell differentiation. *Nat. Rev. Immunol.*, **2**, 933 - 944.
114. Reiner, S.L., Sallusto, F. and Lanzavecchia, A. (2007) Division of labor with a workforce of one: challenges in specifying effector and memory T cell fate. *Science*, **317**, 622-625.
115. Sakaguchi, S. and Powrie, F. (2007) Emerging challenges in regulatory T cell function and biology. *Science*, **317**, 627-629.
116. Kalinski, P., Smits, H.H., Schuitemaker, J.H., Vieira, P.L., van Eijk. M., de Jong, E.C., Wierenga, E.A., Kapsenberg, M.L. (2000) IL-4 is a mediator of IL-12p70 induction by human Th2 cells: reversal of polarized Th2 phenotype by dendritic cells. *J. Immunol.*, **165**, 1877 - 1881.

117. Sallusto, F., Lenig, D., Forster, R., Lipp, M., Lanzavecchia, A. (1999) Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*, **401**, 708-712.
118. Yamamoto, J., Adachi, Y., Onoue, Y., Adachi, Y. S., Okabe, Y., Itazawa, T., Toyoda, M., Seki, T., Morohashi, M., Miyawaki, T. (2000) Differential expression of the chemokine receptors by the Th1- and Th2-type effector populations within circulating CD4+ T cells. *J Leukoc Biol*, **68**, 568-574.
119. Langenkamp, A., Messi, M., Lanzavecchia, A., Sallusto, F. (2000) Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of Th1, Th2 and nonpolarized T cells. *Nat Immunol.*, **1**, 311 - 316.
120. Sallusto, F., Geginat, J., Lanzavecchia, A. (2004) Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol*, **22**, 745-763.
121. Lanzavecchia, A. and Sallusto, F. (2005) Understanding the generation and function of memory T cell subsets. *Curr Opin Immunol*, **17**, 326-332.
122. Caenepeel, S., Charydczak, G., Sudarsanam, S., Hunter, T., Manning, G. (2004) The mouse kinome: discovery and comparative genomics of all mouse protein kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 11707-11712.
123. Catron, D.M., Rusch, L.K., Hataye, J., Itano, A.A. and Jenkins, M.K. (2006) CD4+ T cells that enter the draining lymph nodes after antigen injection participate in the primary response and become central-memory cells. *J Exp Med*, **203**, 1045-1054.
124. Chang, J.T., Palanivel, V.R., Kinjyo, I., Schambach, F., Intlekofer, A.M., Banerjee, A., Longworth, S.A., Vinup, K.E., Mrass, P., Oliaro, J. *et al.* (2007) Asymmetric T lymphocyte division in the initiation of adaptive immune responses. *Science*, **315**, 1687-1691.
125. Fearon, D.T., Manders, P. and Wagner, S.D. (2001) Arrested differentiation, the self-renewing memory lymphocyte, and vaccination. *Science*, **293**, 248-250.
126. Song, K., Rabin, R. L., Hill, B. J., De Rosa, S. C., Perfetto, S. P., Zhang, H. H., Foley, J. F., Reiner, J. S., Liu, J., Mattapallil, J. J., Douek, D. C., Roederer, M., Farber, J. M. (2005) Characterization of subsets of CD4+ memory T cells reveals early branched pathways of T cell differentiation in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 7916-7921.
127. Rivino, L., Messi, M., Jarrossay, D., Lanzavecchia, A., Sallusto, F., Geginat, J. (2004) Chemokine receptor expression identifies Pre-T helper (Th)1, Pre-Th2, and nonpolarized cells among human CD4+ central memory T cells. *J Exp Med*, **200**, 725-735.
128. Messi, M., Giacchetto, I., Nagata, K., Lanzavecchia, A., Natoli, G., Sallusto, F. (2003) Memory and flexibility of cytokine gene expression as separable properties of human T(H)1 and T(H)2 lymphocytes. *Nat Immunol.*, **4**, 78 - 86.
129. Krawczyk, C.M., Shen, H., Pearce, E. J. (2007) Functional plasticity in memory T helper cell responses. *J Immunol*, **178**, 4080-4088.
130. Livak, K.J., Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, **25**, 402-408.
131. Davies, S.P., Reddy, H., Caivano, M., Cohen, P. (2000) Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J*, **351**, 95-105.

132. Clayton, A.L.M., L.C. (2003) MAP kinase-mediated phosphoacetylation of histone H3 and inducible gene regulation. *FEBS Lett*, **546**, 51-58.
133. Farrar, M.A. and Schreiber, R.D. (1993) The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. *Annu Rev Immunol*, **11**, 571-611.
134. Singh, S.P.C., M.M.; Foley, J.F.; Zhang, H.H.; Farber, J.M. (2007) Epigenetics of chemokine receptor genes during differentiation of human CD4+ T cells: histone H3 modifications are related to the stability of gene expression, but not transcriptional activity or history. *Keystone meeting on Epigenetics: Regulation of chromatin structure in development and diseases*.
135. Kapsenberg, M.L. (2003) Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol*, **3**, 984-993.
136. Zhang, J., Salojin, K.V., Gao, J.X., Cameron, M.J., Bergerot, I., Delovitch, T.L. (1999) p38 mitogen-activated protein kinase mediates signal integration of TCR/CD28 costimulation in primary murine T cells. *J Immunol*, **162**, 3819-3829.
137. So, E.Y., Park, H.H., Lee, C.E. (2000) IFN-gamma and IFN-alpha posttranscriptionally down-regulate the IL-4-induced IL-4 receptor gene expression. *J Immunol*, **165**, 5472-5479.
138. Lee, G.R., Fields, P.E., Griffin, T.J. and Flavell, R.A. (2003) Regulation of the Th2 cytokine locus by a locus control region. *Immunity*, **19**, 145-153.
139. Dodeller, F., Skapenko, A., Kalden, J.R., Lipsky, P.E., Schulze-Koops, H. (2005) The p38 mitogen-activated protein kinase regulates effector functions of primary human CD4 T cells. *Eur J Immunol*, 3631-3642.
140. Dumont, F.J., Staruch, M.J., Fischer, P., DaSilva, C. and Camacho, R. (1998) Inhibition of T cell activation by pharmacologic disruption of the MEK1/ERK MAP kinase or calcineurin signaling pathways results in differential modulation of cytokine production. *J Immunol*, **160**, 2579-2589.
141. Schafer, P.H., Wang, L., Wadsworth, S.A., Davis, J.E. and Siekierka, J.J. (1999) T cell activation signals up-regulate p38 mitogen-activated protein kinase activity and induce TNF-alpha production in a manner distinct from LPS activation of monocytes. *J Immunol*, **162**, 659-668.
142. Ono, K. and Han, J. (2000) The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal*, **12**, 1-13.
143. Morooka, T. and Nishida, E. (1998) Requirement of p38 mitogen-activated protein kinase for neuronal differentiation in PC12 cells. *J Biol Chem*, **273**, 24285-24288.
144. Craxton, A., Shu, G., Graves, J.D., Saklatvala, J., Krebs, E.G. and Clark, E.A. (1998) p38 MAPK is required for CD40-induced gene expression and proliferation in B lymphocytes. *J Immunol*, **161**, 3225-3236.
145. Engel, F.B., Schebesta, M., Duong, M.T., Lu, G., Ren, S., Madwed, J.B., Jiang, H., Wang, Y. and Keating, M.T. (2005) p38 MAP kinase inhibition enables proliferation of adult mammalian cardiomyocytes. *Genes Dev*, **19**, 1175-1187.
146. Engelman, J.A., Lisanti, M.P. and Scherer, P.E. (1998) Specific inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase block 3T3-L1 adipogenesis. *J Biol Chem*, **273**, 32111-32120.
147. Adams, R.H., Porras, A., Alonso, G., Jones, M., Vintersten, K., Panelli, S., Valladares, A., Perez, L., Klein, R. and Nebreda, A.R. (2000)

- Essential role of p38alpha MAP kinase in placental but not embryonic cardiovascular development. *Mol Cell*, **6**, 109-116.
148. Mudgett, J.S., Ding, J., Guh-Siesel, L., Chartrain, N.A., Yang, L., Gopal, S. and Shen, M.M. (2000) Essential role for p38alpha mitogen-activated protein kinase in placental angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 10454-10459.
  149. Allen, M., Svensson, L., Roach, M., Hambor, J., McNeish, J. and Gabel, C.A. (2000) Deficiency of the stress kinase p38alpha results in embryonic lethality: characterization of the kinase dependence of stress responses of enzyme-deficient embryonic stem cells. *J Exp Med*, **191**, 859-870.
  150. Tamura, K., Sudo, T., Senftleben, U., Dadak, A.M., Johnson, R. and Karin, M. (2000) Requirement for p38alpha in erythropoietin expression: a role for stress kinases in erythropoiesis. *Cell*, **102**, 221-231.
  151. Ventura, J.J., Tenbaum, S., Perdiguero, E., Huth, M., Barbacid, M., Pasparakis, M., Nebreda, A.R. (2007) p38alpha MAP kinase is essential in lung stem and progenitor cell proliferation and differentiation. *Nature genetics*, **39**, 750-758.
  152. Hui, L., Bakiri, L., Mairhorfer, A., Schweifer, N., Haslinger, C., Kenner, L., Komnenovic, V., Scheuch, H., Beug, H. and Wagner, E.F. (2007) p38alpha suppresses normal and cancer cell proliferation by antagonizing the JNK-c-Jun pathway. *Nature genetics*, **39**, 741-749.
  153. Perdiguero, E., Ruiz-Bonilla, V., Gresh, L., Hui, L., Ballestar, E., Sousa-Victor, P., Baeza-Raja, B., Jardi, M., Bosch-Comas, A., Esteller, M. *et al.* (2007) Genetic analysis of p38 MAP kinases in myogenesis: fundamental role of p38alpha in abrogating myoblast proliferation. *Embo J*, **26**, 1245-1256.
  154. Kaiser, M., Wiggin, G.R., Lightfoot, K., Arthur, J.S., Macdonald, A. (2007) MSK regulate TCR-induced CREB phosphorylation but not immediate early gene transcription. *Eur J Immunol*, **37**, 2583-2595.
  155. Barton, K., Muthusamy, N., Chanyangam, M., Fischer, C., Clendenin, C. and Leiden, J.M. (1996) Defective thymocyte proliferation and IL-2 production in transgenic mice expressing a dominant-negative form of CREB. *Nature*, **379**, 81-85.
  156. Baumann, S., Kyewski, B., Bleckmann, S.C., Greiner, E., Rudolph, D., Schmid, W., Ramsay, R.G., Krammer, P.H., Schutz, G. and Mantamadiotis, T. (2004) CREB function is required for normal thymic cellularity and post-irradiation recovery. *Eur J Immunol*, **34**, 1961-1971.
  157. Schiller, M., Bohm, M., Dennler, S., Ehrchen, J.M. and Mauviel, A. (2006) Mitogen- and stress-activated protein kinase 1 is critical for interleukin-1-induced, CREB-mediated, c-fos gene expression in keratinocytes. *Oncogene*, **25**, 4449-4457.
  158. Ansel, K.M., Lee, D.U. & Rao, A. (2003) An epigenetic view of helper T cell differentiation. *Nat Immunol*, **4**, 616-623.
  159. Mahadevan, L.C., Willis, A.C. & Barratt, M.J. (1991) Rapid histone H3 phosphorylation in response to growth factors, phorbol esters, okadaic acid, and protein synthesis inhibitors. *Cell*, **65**, 775-783.
  160. Barratt, M.J., Hazzalin, C.A., Cano, E., Mahadevan, L.C. (1994) Mitogen-stimulated phosphorylation of histone H3 is targeted to a small

- hyperacetylation-sensitive fraction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 4781-4785.
161. Thomson, S., Mahadevan, L.C., Clayton, A.L. (1999) MAP kinase-mediated signalling to nucleosomes and immediate-early gene induction. *Semin Cell Dev Biol*, **10**, 205-214.
  162. Chua, A.O., Chizzonite, R., Desai, B.B., Truitt, T.P., Nunes, P., Minetti, L.J., Warrier, R.R., Presky, D.H., Levine, J.F., Gately, M.K. (1994) Expression cloning of a human IL-12 receptor component. A new member of the cytokine receptor superfamily with strong homology to gp130. *J Immunol*, **153**, 128-136.
  163. Heath, V.L., Showe, L., Crain, C., Barrat, F.J., Trinchieri, G. and O'Garra, A. (2000) Cutting edge: ectopic expression of the IL-12 receptor-beta 2 in developing and committed Th2 cells does not affect the production of IL-4 or induce the production of IFN-gamma. *J Immunol*, **164**, 2861-2865.
  164. Reiner, S.L., Sallusto, F., Lanzavecchia, A. (2007) Division of labor with a workforce of one: challenges in specifying effector and memory T cell fate. *Science*, **317**, 622-625.
  165. Gett, A.V., Sallusto, F., Lanzavecchia, A. and Geginat, J. (2003) T cell fitness determined by signal strength. *Nat Immunol*, **4**, 355-360.