

UNIVERSITAT DE BARCELONA
Facultat de Biologia
Departament de Fisiologia

Regulación de la expresión de los genes
tap1 y Imp2

Laura Marquès Soler
Tesis Doctoral

Índice

4.4.4. Transducción de la señal del TNF- α	31
4.4.5. Transducción de la señal del TGF- β	33
OBJETIVOS	39
MATERIAL Y MÉTODOS	41
1. REACTIVOS	43
1.1. Obtención del M-CSF	43
1.2. Obtención del IFN- γ	44
1.3. LPS	45
1.4. TNF- α	45
1.5. IFN- α/β	45
1.6. TGF- β	45
1.7. Dexametasona	45
1.8. Antibióticos	46
1.9. Células	46
1.9.1. Líneas celulares	46
1.9.1.1. Fibroblastos	46
1.9.1.2. Macrófagos	46
1.9.2. Obtención y cultivo de macrófagos murinos derivados de la médula ósea ...	46
1.10 Sondas	47
1.10.1. Sonda tap1	47
1.10.2. Sonda Imp2	48
1.10.3. Sonda ARNr 18S	48
1.10.4. Sonda L32	48
1.10.5. Sonda I-A α	48
1.10.6 Sonda IL-1 β	49
1.10.7. Sonda PU.1	49
1.11. Plásmidos	49
1.11.1. Vector pGL3-Basic	49
1.11.2. Vector pGL3-control	50
1.11.3. Vector pGL3-BOS	50
1.11.4. Vector pRL-CMV	51
1.11.5. Vector pRL-BOS	51
1.11.6 Vector pcDNA3Bos-PU.1	51

1.11.7. Vector pCR2.1	52
1.11.8. Vector pGEM-T	53
1.11.9. Vectores pGL3-tap1 y pGL3-Imp2.....	53
1.11.10. Vectores pGL3-GAS1tap y pGL3-GAS1Imp	55
1.11.11. Vectores pGL3-GAS2tap y pGL3-GAS2Imp	57
1.11.12. Vectores pGL3-IRF1tap y pGL3-IRF1Imp	57
1.11.13. Vectores pGL3-NFκBtap y pGL3-NFκBImp	58
1.11.14. Vectores pGL3-AP1tap y pGL3-AP1Imp	60
1.11.15. Vectores pGL3-AP1.atap y pGL3-AP1.almp	60
2. METODOLOGÍA	62
2.1. Extracción del ARN total	62
2.1.1. Recolección de las células	62
2.1.2. Aislamiento del ARN total	62
2.1.2.1. Método del tiocianato de guanidinio.....	62
2.1.2.2. Método del TRIZOL	63
2.2. Extracción de ADN	63
2.2.1. Extracción de ADN genómico	63
2.2.2. Extracción de ADN plasmídico	63
2.2.2.1. Transformación plasmídica	63
2.2.2.2. Mini-prep	64
2.2.2.3. Maxi-prep	64
2.2.2.3.1. Método del polietilenglicol	64
2.2.2.3.2. Kit comercial	65
2.2.2.4. Digestión y electroforesis	66
2.2.2.5. Secuenciación automática	66
2.3. Northern Blot	66
2.3.1. Electroforesis y Transferencia	66
2.3.2. Preparación de la sonda	67
2.3.3. Pre-hibridación e Hibridación	67
2.3.4. Lavados	68
2.3.5. Cuantificación	68
2.4. Obtención de las proteínas nucleares	68
2.4.1. Obtención de los extractos nucleares I	68
2.4.2. Obtención de los extractos nucleares II	68
2.5. Ensayo de retardo en gel	69

2.5.1. Marcaje de la sonda (oligonucleótidos)	69
2.5.2. Marcaje de la sonda (fragmento de ADN)	70
2.5.3. Reacción de Unión ADN-Proteína	70
2.5.4. Electroforesis	70
2.6. Transfecciones	71
2.6.1. Transfección de la línea celular L929 mediante cloruro de calcio	71
2.6.2. Transfección de la línea celular RAW 264.7 mediante liposomas	71
2.7. Ensayos de luciferasa	72
2.7.1. Lisado celular	72
2.7.2 Detección de la actividad luciferasa de <i>Photinus pyralis</i> (<i>P-Luc</i>).....	72
2.7.3 Detección de la actividad luciferasa de <i>Renilla reniformis</i> (<i>R-Luc</i>).....	72
RESULTADOS	73
1. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE TAP1 Y LMP2 POR IFN-γ	75
1.1. Inducción de la expresión de tap1 y Imp2 por IFN- γ en distintos tipos celulares	75
1.2. La inducción de tap1 y Imp2 por el IFN- γ es independiente de la síntesis <i>de novo</i> de proteína	78
1.3. Estabilidad del ARNm de tap1 y Imp2	79
1.4. La expresión de tap1 y Imp2 inducida por IFN- γ es dependiente de STAT1 en fibroblastos y macrófagos de médula ósea.....	81
1.5. Análisis de las secuencias nucleotídicas implicadas en la inducción de tap1 y Imp2 por IFN- γ	83
1.6. El factor STAT1 se une al promotor de tap1 y Imp2.....	87
2. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE TAP1 Y LMP2 POR EL LPS	88
2.1. Inducción de la expresión de tap1 y Imp2 por el LPS	88
2.2. La expresión de tap1 y Imp2 inducida por el LPS es dependiente de STAT1 en macrófagos de médula ósea	91
2.3 Análisis de las secuencias nucleotídicas implicadas en la inducción de tap1 y Imp2 por el LPS	94
3. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE TAP1 Y LMP2 POR EL TNF-α.....	96
3.1 Inducción de la expresión de tap1 y Imp2 por el TNF- α	96
3.2 La expresión de tap1 y Imp2 inducida por el TNF- α es dependiente de STAT1 en macrófagos de médula ósea.....	97

3.3 Análisis de las secuencias nucleotídicas implicadas en la inducción de tap1 y Imp2 por el TNF- α	98
4. OTROS ESTÍMULOS Y FACTORES QUE REGULAN LA EXPRESIÓN DE TAP1 Y LMP2.....	99
4.1 Efectos del estrés sobre la expresión de tap1 y Imp2.....	100
4.2 Efectos del TGF- β y la dexametasona sobre la expresión de tap1 y Imp2 inducida por el IFN- γ	100
4.3 Efectos del factor de transcripción PU.1 sobre la expresión de tap1 y Imp2 inducida por el IFN- γ	102
DISCUSIÓN	107
CONCLUSIONES	119
BIBLIOGRAFÍA	123
ÍNDICE DE FIGURAS.....	
INTRODUCCIÓN	
Figura 1. Estructura de las moléculas de MHC de clase I.....	4
Figura 2. Organización de los genes del MHC en el genoma humano y en el ratón	5
Figura 3. Esquema de la presentación de antígeno	7
Figura 4. Presentación antigénica por el MHC de clase I.....	8
Figura 5. Estructura de un proteosoma	9
Figura 6. Estructura del transportador TAP	11
Figura 7. Asociación del péptido con el MHC de clase I	13
Figura 8. Activación de un gen y ensamblaje del complejo de preiniciación Pol III	15
Figura 9. Proliferación y diferenciación del macrófago.....	18
Figura 10. Transducción de la señal del IFN- γ	23
Figura 11. Estructura de las moléculas STAT	25
Figura 12. Comparación entre las vías JAK/STAT inducidas por el IFN- γ y el IFN- α ..	29
Figura 13. Algunas vías de transducción de la señal del LPS.....	31
Figura 14. Representación esquemática de algunas vías de señalización activadas por el receptor del TNF.	33
Figura 15. Transducción de la señal del TGF- β	35
MATERIAL Y MÉTODOS	
Figura 16. Mapa del vector PGL3-basic	50

Figura 17. Mapa del vector pBOS-PU.1	51
Figura 18. Mapa del vector pCR2.1	52
Figura 19. Secuencia nucleotídica del promotor bidireccional tap1-Imp2 murino	56
Figura 20. Estrategias de clonación de los plásmidos pGL3-Imp2 y pGL3-tap1.....	59
 RESULTADOS	
Figura 21. Inducción de la expresión de tap1 y Imp2 por el IFN- γ en distintas líneas celulares	75
Figura 22. Inducción de la expresión de tap1 y Imp2 por el IFN- γ en macrófagos de médula ósea	76
Figura 23. Inducción de la expresión de tap1 y Imp2 por el IFN- γ en macrófagos de la línea celular Bac-1 F5a.....	76
Figura 24. Inducción de la expresión de tap1 y Imp2 por el IFN- γ en macrófagos de la línea celular Raw 264.7	77
Figura 25. Cuantificación de la expresión relativa de los mensajeros de tap1 y Imp2 en las líneas celulares indicadas	77
Figura 26. La inducción de la expresión de tap1 y Imp2 en respuesta al IFN- γ no requiere la síntesis <i>de novo</i> de proteínas	79
Figura 27. Vida media del ARNm de tap1 y Imp2.....	80
Figura 28. La expresión de tap1 y Imp2 inducidos por el IFN- γ esta mediada por STAT1	81
Figura 29. Expresión de tap1 y Imp2 inducidos por IFN- γ e IFN- α/β en macrófagos de médula ósea de ratones WT stat1 (<i>wild type stat1</i>) y de KO stat1 (<i>knock out stat1</i>).....	82
Figura 30. Determinación funcional de la actividad promotora de tap1 inducida por el IFN- γ en macrófagos	84
Figura 31. Determinación funcional de la actividad promotora de Imp2 inducida por el IFN- γ en macrófagos	85
Figura 32. Determinación funcional de la actividad promotora de tap1 inducida por el IFN- γ en fibroblastos.....	86
Figura 33. Determinación funcional de la actividad promotora de Imp2 inducida por el IFN- γ en fibroblastos.....	86
Figura 34. STAT1 se une al promotor de tap1-Imp2	87

Figura 35. El LPS induce la expresión de tap1 y Imp2 en macrófagos, pero no en fibroblastos	88
Figura 36(a). La expresión de los genes tap1 y Imp2 muestra una cinética distinta para el IFN- γ y el LPS en macrófagos de médula ósea	89
Figura 36(b). Cuantificación de la expresión relativa de los mensajeros tap1 y Imp2 en macrófagos de médula ósea	89
Figura 37(a). La expresión de los genes tap1 y Imp2 muestra una cinética distinta para el IFN- γ y el LPS en la línea celular Raw 264.7	90
Figura 37(b). Cuantificación de la expresión relativa de los mensajeros tap1 y Imp2 en Raw 264.7	90
Figura 38. Expresión de tap1 y Imp2 inducidos por LPS en macrófagos de médula ósea de ratones control (<i>wild type</i> stat1) y de KO stat1 (<i>knock out</i> stat1).....	91
Figura 39(a). La inducción de la expresión de tap1 y Imp2 por LPS no es debida a la inducción de la síntesis del TNF- α por el LPS	92
Figura 39(b). Cuantificación de la expresión relativa de los mensajeros tap1 y Imp2 en macrófagos de médula ósea de ratones KO para el receptor del TNF- α	92
Figura 40(a). La inducción de la expresión de tap1 y Imp2 por LPS no es debida a la inducción de la síntesis del TNF- α por el LPS	93
Figura 40(b). Cuantificación de la expresión relativa de los mensajeros tap1 y Imp2 en macrófagos de médula ósea de ratones control	93
Figura 41. Determinación funcional de la actividad promotora de tap1 inducida por el LPS en macrófagos	94
Figura 42. Determinación funcional de la actividad promotora de Imp2 inducida por el LPS en macrófagos	95
Figura 43. Cinética de inducción de la expresión de tap1 y Imp2 por el TNF- α en células RAW 264.7	96
Figura 44. Expresión de tap1 y Imp2 inducidos por TNF- α en macrófagos de médula ósea de ratones WT stat1 (<i>wild type</i> stat1) y de KO stat1 (<i>knock out</i> stat1).....	97
Figura 45. Determinación funcional de la actividad promotora de tap1 inducida por el TNF- α en macrófagos	98
Figura 46. Determinación funcional de la actividad promotora de Imp2 inducida por el TNF- α en macrófagos	99
Figura 47. Inducción de la expresión de tap1 y Imp2 en situaciones de estrés	100

Figura 48. Inhibición de la expresión inducida por IFN- γ de tap1 y Imp2 mediada por TGF- β y dexametasona en macrófagos.....	101
Figura 49. Inhibición de la expresión inducida por IFN- γ de tap1 y Imp2 mediada por TGF- β y dexametasona en macrófagos de la línea Raw 264.7.....	101
Figura 50(a). Inhibición de la expresión inducida por IFN- γ de tap1 y Imp2 mediada por el factor de transcripción PU.1.....	103
Figura 50(b). Cuantificación de la expresión relativa de los mensajeros de tap1 y Imp2 en la línea celular de fibroblastos L929.....	103
DISCUSIÓN	
Figura 51. Posibles mecanismos de activación de la expresión de los genes tap1 y Imp2 inducidos por IFN- γ , LPS y TNF- α	114
ÍNDICE DE TABLAS	
Tabla I. Clasificación de co-reguladores transcripcionales	16
Tabla II. Algunos de los productos secretados por los macrófagos	21

Introducción

INTRODUCCIÓN

El sistema inmunitario está especializado en la defensa del individuo frente a las agresiones del medio externo, en particular de los agentes infecciosos. Para desarrollar sus funciones, el sistema inmunitario requiere, y está dotado, de un importante número de células y moléculas. La forma más básica de defensa, conocida como inmunidad innata, la desarrollan un conjunto de diferentes tipos celulares, agrupados bajo el nombre de fagocitos. Su principal función es la de ingerir y destruir los agentes infecciosos. Existe también un conjunto de moléculas, englobadas en lo que se conoce como Sistema del Complemento que, por sí solas, son capaces de destruir bacterias y parásitos. Sin embargo, el sistema inmunitario ha desarrollado una serie de mecanismos más complejos y sofisticados que constituyen la respuesta inmunológica adquirida, y que se basa en la memoria inmunológica y la especificidad. Ambos fenómenos, trascendentes a lo largo de la evolución, constituyen la base de la vacunación, la forma de prevención de enfermedades infecciosas más eficaz de nuestros días.

La memoria inmunológica consiste, en realidad, en la expansión de clones de linfocitos T y B que perduran en el organismo durante largo tiempo. Estos clones presentan en su superficie un sofisticado sistema de reconocimiento cuya principal característica es la especificidad. En los linfocitos B este sistema lo forman las inmunoglobulinas. Estas moléculas son capaces de reconocer estructuras antigénicas naturales, como las que se encuentran por ejemplo en la superficie de las bacterias. En los linfocitos T, el reconocimiento se produce a través de una estructura conocida como el Receptor de la Célula T (TCR, *T cell receptor*). A diferencia de las inmunoglobulinas que reconocen estructuras tridimensionales, el TCR está especializado en el reconocimiento de estructuras peptídicas lineales. Además, este reconocimiento no es directo, sino que precisa de la participación de otras moléculas de superficie que se encuentran en las células presentadoras de antígeno, y que se conocen por el nombre de moléculas de histocompatibilidad (MHC, *Major Histocompatibility Complex*). La relación que se establece entre estas moléculas y las distintas células del sistema inmunitario permiten que la respuesta inmunológica adquirida sea uno de los fenómenos más específicos, eficaces y finamente regulados de los organismos superiores.

1. EL COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD

El Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC, *Major Histocompatibility Complex*) es la región de genes más polimórfica que se conoce. Este grupo de genes fue descrito por primera vez en 1935 por Peter Gorer. Inicialmente, los estudios sobre trasplantes mostraban que había numerosos genes que controlaban el rechazo del injerto (histocompatibilidad), pero sólo unos pocos eran altamente polimórficos y tenían una mayor influencia en el proceso de rechazo (Counce y col., 1956). Los elementos génicos que controlan las respuestas inmunitarias y determinan la especificidad del reconocimiento antigénico mediado por los linfocitos T fueron hallados en la misma región cromosómica (Benacerraf y McDevitt, 1972; Schwartz, 1985). Los genes del MHC se encuentran situados en el ratón en el cromosoma 17, y en el hombre en el cromosoma 6. El MHC humano se extiende a lo largo de unas 3500 Kb del ADN y comprende un gran número de genes, agrupados en tres regiones: clase I, clase II y clase III (Campbell y Trowsdale, 1993) (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001).

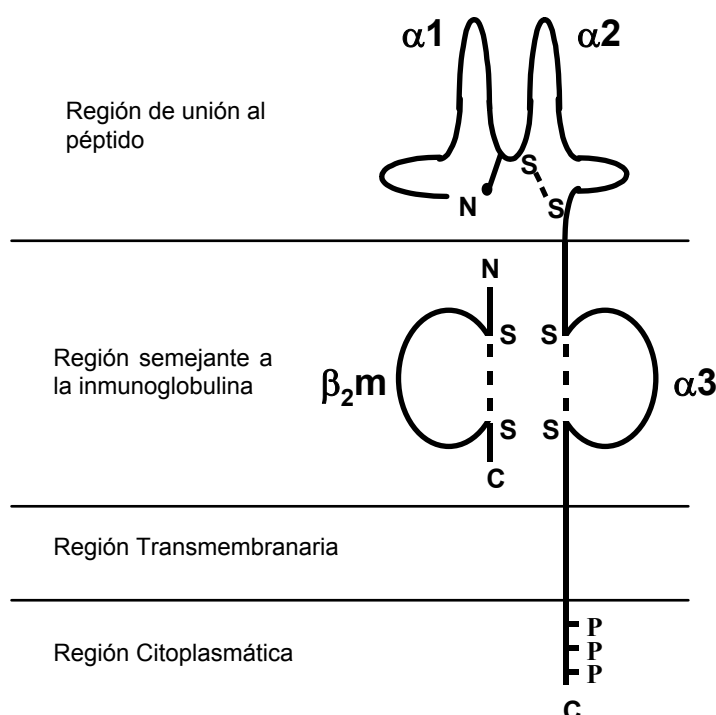


Figura 1. Estructura de las moléculas del MHC de clase I. *N* y *C* se refieren a los extremos amino y carboxi terminales respectivamente; S—S representan los puentes disulfuro; \uparrow una cadena de carbohidratos; y *P* los sitios de fosforilación.

Los genes del MHC de clase I en humanos son los que ocupan una posición más telomérica, y son principalmente tres los que juegan un papel importante en los procesos de rechazo: HLA-B, HLA-C y HLA-A. Cada uno de estos genes codifica para una de las

cadena α del MHC de clase I. Las moléculas del MHC de clase I son glucoproteínas de membrana que tienen un peso molecular de 46 kD (cadena pesada) a las que se asocia, mediante enlaces no covalentes, una unidad de 12 kD denominada β_2 -microglobulina (β_2m). Ambas cadenas tienen una estructura parecida a la de las inmunoglobulinas. La cadena pesada es altamente polimórfica y está compuesta de una parte extracelular, una transmembranaria y una citoplasmática. La porción extracelular de la molécula la constituyen dos unidades estructurales distintas. La primera, representada por la región de unión al péptido, está formada por los dominios α_1 y α_2 , y la segunda, la región α_3 , es la fracción que se une al receptor CD8 de los linfocitos T (Figura 1). La cadena β_2 -microglobulina, que no es polimórfica, se caracteriza por no tener anclaje en la membrana plasmática y puede encontrarse de dos formas, o bien asociada a la cadena pesada de las moléculas de clase I, o bien, en forma libre en el plasma o en el líquido tisular. La cadena β_2 -microglobulina está codificada por un gen situado en el cromosoma 15, fuera del complejo génico del MHC (Celada, 1994).

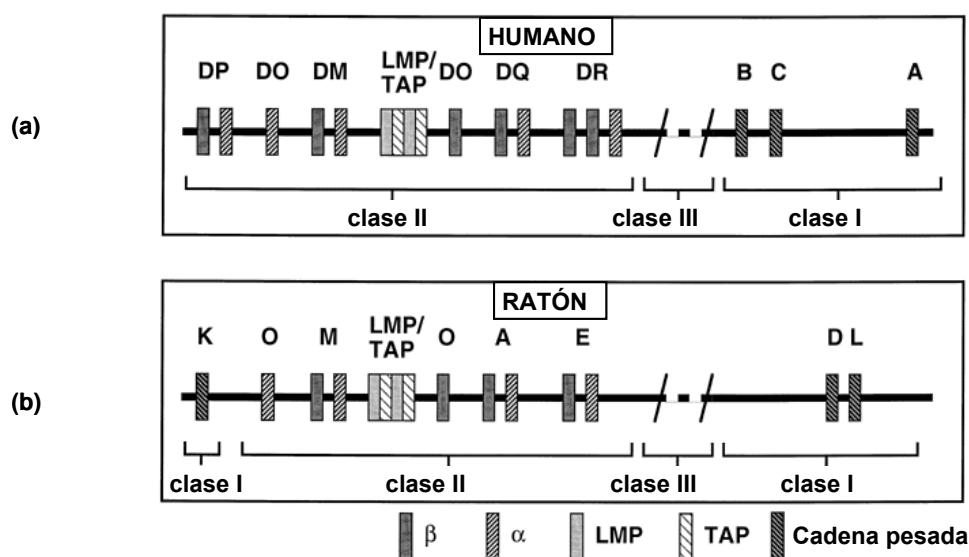


Figura 2. Organización de los genes del MHC en el genoma humano (a) y en el ratón (b)

En el ratón la región más proximal del complejo MHC corresponde a la familia de genes MHC de clase I. Sin embargo, el mapaje de los genes de clase I ha sugerido una posible recombinación intracromosomal, ya que algunos genes de clase I se localizan en la región distal del cromosoma. Los genes del MHC de clase I en el ratón fueron denominados K, D y L (Abbas y col., 1994) (Figura 2).

Los genes del MHC de clase II en humanos son los que están situados más cerca del centrómero y son principalmente cuatro: DP, DM, DQ y DR. Las moléculas de clase II del MHC son glucoproteínas heterodiméricas formadas por la asociación no covalente de una cadena α de 32-34 kD y una cadena β de 29-32 kD (Kaufman y col., 1984). Los genes HLA-DP (DPA codifica para la cadena α y DPB para la cadena β) son los más proximales al centrómero y se encuentran situados junto a los genes HLA-DM (DMB y DMA). Entre estos y los genes DQ están localizados los genes *Imp* (*low molecular mass polypeptide*) (Monaco, 1992a) y *tap* (*transporter associated with antigen processing*) (Hill y Ploegh, 1995). *Imp* y *tap* son genes que codifican para las moléculas involucradas en la generación de péptidos en el citosol a partir de proteínas endógenas y el transporte de los mismos a través de la membrana del retículo endoplasmático (RE). Los genes murinos más importantes del MHC de clase II son cuatro: $A\alpha$, $A\beta$, $E\alpha$, $E\beta$, cuyas proteínas se emparejan y forman en la membrana celular las glucoproteínas heterodiméricas I-A e I-E, respectivamente (Kaufman y col., 1984). En el ratón se descubrieron también otros dos genes ($A\beta 2$ y $E\beta 2$) con un patrón de expresión distinto del de los genes clásicos I-A e I-E (Karlsson y col., 1991).

En una posición más intermedia se encuentra la región de clase III. Esta región contiene los genes de algunos componentes del sistema del complemento, así como los genes codificantes para la 21-hidroxilasa, un enzima crítico en la biosíntesis de los glucocorticoides (White y col., 1984). También contiene los genes codificantes para los factores A y B del TNF (*tumor necrosis factor*) (Browning y col., 1993).

2. PRESENTACIÓN DE ANTÍGENO A LOS LINFOCITOS T

El sistema inmunitario ha desarrollado mecanismos de defensa contra la invasión de los microorganismos cuyos constituyentes antigénicos se pueden encontrar, una vez producida la infección, tanto en el interior de la célula huésped como en el espacio extracelular. En este último caso, los determinantes antigénicos pueden ser de naturaleza u origen distintos. Las proteínas exógenas, solubles o insolubles, deben ser procesadas por las células presentadoras de antígeno (APC, *Antigen Presenting Cell*). Las proteínas solubles son principalmente reconocidas, procesadas y presentadas por los linfocitos B. En el caso de las insolubles, los fagocitos, en especial los macrófagos y las células dendríticas, desempeñan el papel fundamental de procesamiento y presentación. En ambos casos la presentación del antígeno al linfocito T se lleva a cabo mediante las moléculas del MHC de clase II, expresadas en la superficie de la célula presentadora, y que es reconocida por el TCR de los linfocitos T CD4+.

Las proteínas de origen endógeno suelen ser presentadas en el contexto de las moléculas de clase I, reconocido por el TCR de los linfocitos T CD8+, aunque en determinadas circunstancias, también pueden procesarse y ser presentadas por células

APC en el contexto de las moléculas de clase II. Por último, se conoce que ciertas estructuras de naturaleza lipídica pueden comportarse como antígenos. Éstos suelen ser presentados por las moléculas CD1 (Paul, 1998) (Figura 3).

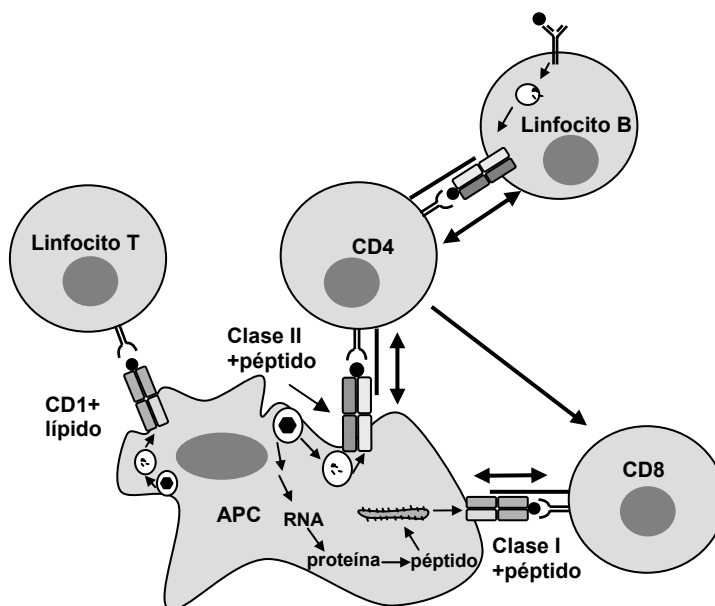


Figura 3. Esquema de la presentación de antígeno. La presentación antigénica puede realizarse mediante diferentes moléculas. Los péptidos pueden ser presentados en el contexto de las moléculas de clase I y II, mientras que las moléculas CD1 están especializadas en la presentación de glucolípidos, pero no se sabe con certeza si estimulan a los linfocitos T *in vivo*. Aunque en el esquema se representan los distintos contactos celulares posibles, es improbable que una misma APC establezca contactos simultáneos *in vivo*.

2.1. Procesamiento y presentación de antígeno por el MHC de clase I

Las moléculas del MHC de clase I se expresan en la superficie de la mayoría de las células nucleadas y su función es la de presentar los antígenos a los linfocitos T CD8+.

La degradación de los antígenos citosólicos es un proceso esencial para la presentación de antígeno por las moléculas del MHC de clase I. Los antígenos extraños deben ser reconocidos y degradados por los enzimas proteolíticos de la célula presentadora de antígeno para generar péptidos de longitud apropiada para que puedan ser transportados a través de la membrana del RE por el heterodímero TAP1-TAP2. En el RE los péptidos se asocian a las moléculas del MHC de clase I que han sido sintetizadas en los ribosomas y transportadas hasta el RE. Así se forma un complejo trimolecular (cadena pesada- β_2m -péptido) estable que es transportado a la superficie celular (Figura 4).

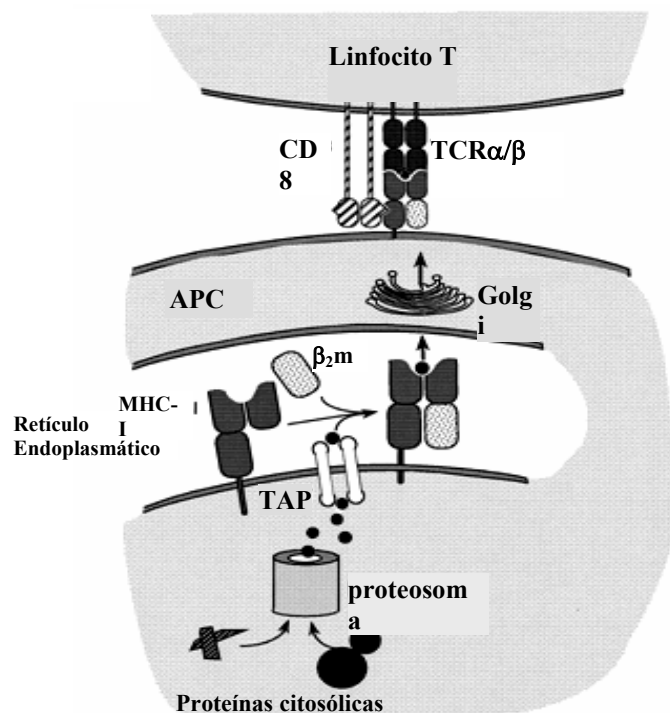


Figura 4. Presentación antigénica por el MHC de clase I. El ensamblaje del péptido cargado en las moléculas de clase I es reconocido por el receptor TCR α/β de los linfocitos T CD8+. Los péptidos son derivados de las proteínas citosólicas degradadas por los proteosomas y transportadas dentro del retículo endoplasmático por el transportador TAP.

2.1.1. Proteosomas y generación de péptidos

La generación de péptidos de origen endógeno es el resultado de la actividad de diferentes proteasas localizadas tanto en el citosol como en el retículo endoplasmático. El proteosoma es la estructura que contribuye predominantemente a la generación de péptidos susceptibles de ser transportados al retículo endoplasmático y asociarse a las moléculas del MHC de clase I. El grupo de Rock y colaboradores (1994) fue el primero en demostrar que los proteosomas mediaban en la degradación de la mayoría de las proteínas endógenas citoplasmáticas. En estos experimentos, se demostró que en las células tratadas con inhibidores proteosómicos, las moléculas del MHC de clase I quedaban retenidas en el retículo endoplasmático debido a la ausencia de péptidos.

Tradicionalmente se ha pensado que los sustratos específicos de los proteosomas eran proteínas a las que se había unido una cadena de ubiquitina. Actualmente, se han descrito tres enzimas diferentes (E1, E2 y E3) que llevan a cabo el proceso de ubiquitinación. Su actividad culmina en la unión de múltiples ubiquitinas a los residuos lisina de la proteínas que deben ser eliminadas (Hershko y Ciechanover, 1998). El proteosoma

degrada las proteínas ubiquitinadas dando lugar a péptidos de 3 a 20 aminoácidos (Hirsch y Ploegh, 2000). Así pues, la unión de las moléculas de ubiquitina a las proteínas susceptibles de ser degradadas, era la señal necesaria para la digestión y consiguiente generación de péptidos en el proteosoma. Sin embargo, recientemente se han descrito también sustratos no ubiquitinados (Verna y Deshaies, 2000; Sheaff y col., 2000).

2.1.1.1. Estructura y función de los proteosomas

Los proteosomas, también referidos como proteasas multicatalíticas, contienen un núcleo 20S que es activo proteolíticamente y puede degradar proteínas de forma ATP-independiente. El proteosoma 20S está formada por 28 subunidades distintas organizadas en cuatro anillos alrededor de un canal central donde tiene lugar la proteólisis. Los dos anillos externos contienen siete subunidades α cada uno, cuya participación es necesaria para el ensamblaje de la partícula. Los dos anillos más internos contienen siete subunidades β cada uno, de las cuales tres están implicadas en la proteólisis. De esta forma, cada proteosoma contiene seis sitios activos (Baumeister y col., 1998) (Figura 5).

El complejo cilíndrico 20S fue aislado unido a otras dos unidades, un complejo ATPasa (19S) y el complejo proteosómico PA28 (11S). El conjunto de estas subunidades forman el complejo 26S y estas subunidades adicionales permiten el acceso del sustrato al interior del complejo 20S (Pamer y Cresswell, 1998). El proteosoma 26S contiene el core 20S y subunidades adicionales que incrementan su masa y pueden degradar proteínas totales y sustratos ubiquitinados de forma ATP-dependiente (Hochstrasser, 1997). El complejo proteosómico PA28 se localiza en ambos extremos del proteosoma 20S (Gray y col., 1994) y juega un papel activador en el procesamiento de antígeno (Dick y col., 1996).

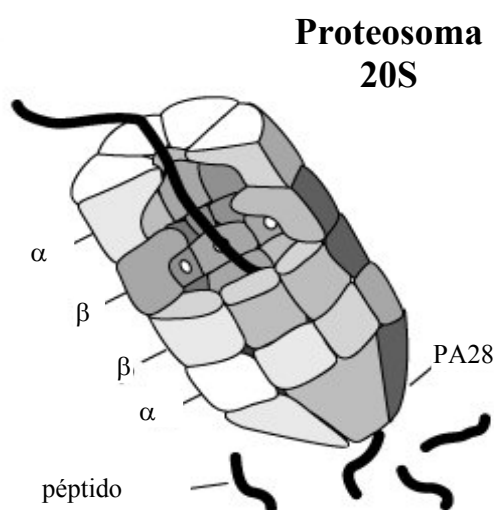


Figura 5. Estructura de un proteosoma. El proteosoma genera fragmentos peptídicos a partir de proteínas citosólicas captadas a través de las subunidades α del proteosoma. La proteólisis ocurre en la cavidad central que está formada por dos anillos con siete subunidades β cada uno.

Las proteínas LMP2 y LMP7 pertenecen a la familia de las subunidades proteosómicas β (Martínez y Monaco, 1991). El nivel de expresión de estas dos subunidades varía en los distintos tejidos (Brown y col., 1993) y es inducida por el interferón gamma (IFN- γ) (Ortiz-Navarrete y col., 1991). En las células activadas por el IFN- γ se observó que había un desplazamiento, en el proteosoma 20S, de las subunidades X (MB1) e Y (δ) que son constitutivas, por las subunidades LMP7 y LMP2 (Belich y col., 1994). Posteriormente se encontró una tercera subunidad proteosómica inducida por el IFN- γ , denominada MECL-1 (LMP10), la cual reemplaza a la subunidad Z. La localización de estas subunidades en la región cromosómica de clase II y su inducción por el IFN- γ hizo pensar que podrían jugar un papel en la presentación de antígeno. Se ha sugerido que este cambio en los componentes del proteosoma incrementaba la variedad de péptidos que podrían ser producidos dentro de una célula (Nandi y col., 1996). Esto se confirmó realizando experimentos en animales que carecían de subunidades LMP para ver su implicación en la presentación de antígeno. Los ratones que carecen de *Imp7* muestran una expresión reducida del MHC de clase I. Igualmente, los ratones que carecen de *Imp2* son menos eficientes en la presentación de un antígeno del virus de la gripe (*influenza*) y muestran una respuesta citotóxica pobre frente a este antígeno *in vivo*, aunque sí expresan niveles normales de las moléculas de clase I del MHC. Parece ser que estas subunidades del proteosoma no son esenciales para el proceso de la presentación de antígeno por clase I, aunque sí lo incrementan (York y col., 1999).

2.1.2. Transporte peptídico y ensamblaje dentro del RE

2.1.2.1. El Transportador TAP

TAP es una proteína heterodimérica formada por dos subunidades TAP1 y TAP2, cuyos genes codificantes se encuentran en la región cromosómica del MHC de clase II (Monaco, 1992b). Cada subunidad TAP tiene una región hidrofóbica N-terminal y un dominio de unión a ATP C-terminal citosólico. TAP1 y TAP2 pertenecen a la superfamilia de transportadores ABC, formada por proteínas de membrana transportadoras de diversas moléculas cuya función es dependiente de ATP. Todas las proteínas ABC contienen el motivo Walker A (GX₄GK[ST]), el motivo Walker B ([RK]X₃GX₃L[hidrofóbico]₃) y el motivo Walker C ([LIVMFY]S[SG]GX₃[RKA][LIVMYA]X[LIVFM][AG]) (Walker y col., 1982). A partir de los análisis de hidrofobicidad y de los alineamientos de secuencia con otros transportadores ABC relacionados, se dedujo el modelo básico de la proteína TAP. Su

estructura está formada por seis dominios transmembranarios más tres o cuatro hélices adicionales predecidas para las diferentes regiones amino-terminales. Los dominios transmembrana se encuentran unidos a los dominios de unión a nucleótidos, que a su vez contienen los motivos Walker A y B, localizados en el citosol y necesarios para la unión e hidrólisis de la molécula de ATP. El dominio C interacciona directamente con el último *loop* citosólico (E) de los dominios transmembrana (Figura 6) (Lankat-Buttgereit y Tampé, 1999).

En la primera etapa del transporte se produce una asociación bimolecular en la cual el péptido se une a la molécula de TAP independientemente de ATP. Seguidamente tiene lugar la isomerización del complejo TAP, desencadenando la hidrólisis de ATP y la traslocación del péptido a través de la membrana (Lankat-Buttgereit y Tampé, 1999).

La actividad ATPásica es específica de sustrato, habiéndose demostrado en numerosos estudios el transporte selectivo de los péptidos de 8-12 aminoácidos mediado por TAP a través de la membrana del RE (Androlewicz y Cresswell, 1994).

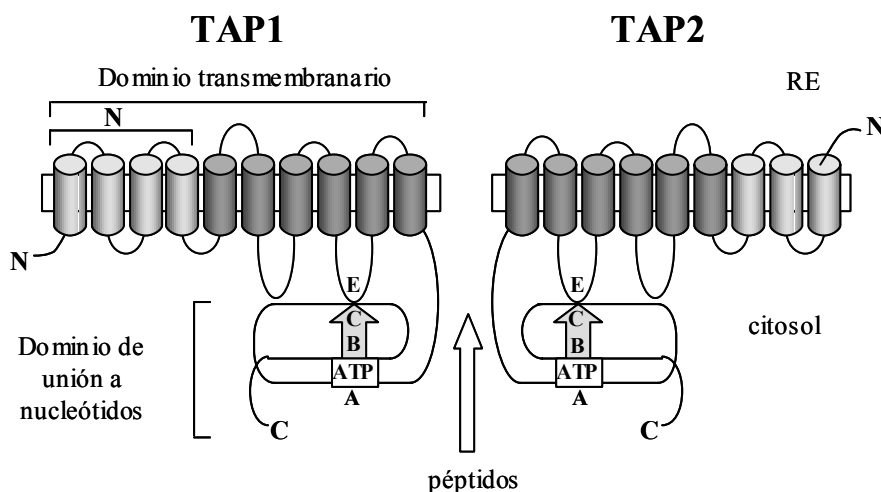


Figura 6. Estructura del transportador TAP. El dominio N-terminal de TAP1 y TAP2 es muy hidrofóbico y está formado por cuatro o tres hélices transmembranarias. El dominio de unión a nucleótidos consta de los motivos Walker A y B (A, B) y motivo Walker C que interacciona con el motivo E presente en el último *loop* citosólico de los dominios transmembranarios.

Los estudios de transfección en RMA-S, una línea celular murina de linfocitos T mutada para el gen *tap2*, y en las células humanas con mutaciones en los genes *tap*, han establecido que el ensamblaje y la presentación de antígeno defectiva en estas células es corregida por la adecuada expresión de las dos proteínas TAP (Spies y DeMars, 1991; Powis y col., 1991). También se ha observado que los ratones *knock out* para el gen *tap1* no son capaces de presentar antígenos citosólicos a los linfocitos T CD8+. Además, debido

a la ausencia de expresión de moléculas de clase I del MHC en su superficie, estos ratones carecen de linfocitos T CD4⁺8⁺ (Van Kaer y col., 1992). También, existen evidencias que muestran que en las células tap-negativas el transporte peptídico dentro del retículo endoplasmático está mediado por una secuencia señal N-terminal (Elliot y col., 1995). Además, se conoce la existencia de una familia homocigótica tap2^{-/-} en la cual se ve reducida la expresión del MHC de clase I en la superficie celular y la cantidad de linfocitos T citotóxicos. Sorprendentemente, estos individuos no muestran un incremento en la susceptibilidad a las infecciones víricas. Los antígenos parece que son transportados al interior del RE de forma independiente de TAP, aunque en condiciones normales TAP parece ser la vía predominante (De la Salle y col., 1997). En algunos tejidos tumorales se ha observado una disminución en la expresión del ARNm de tap o también mutaciones de tap, sugiriendo que la supresión de la expresión de tap puede ser un mecanismo utilizado por las células tumorales para escapar de la respuesta inmunitaria (Seliger y col., 1997).

2.1.2.2. Papel de las moléculas acompañantes en el ensamblaje

Además de las ya mencionadas, el ensamblaje y la carga de las moléculas del MHC de clase I requiere de otras proteínas. Al menos existen cuatro proteínas (calnexina, calreticulina, ERp57 y tapasina), que están involucradas en el ensamblaje de la cadena pesada y de la cadena β_2 -microglobulina (Koopmann y col., 1997).

La principal molécula involucrada en el ensamblaje de las moléculas de clase I es la **calnexina**. Esta proteína transmembranaria del RE comparte con la **calreticulina**, una proteína homóloga y soluble del RE, la propiedad de unirse a los glicanos monoglucosilados (Hammond y Helenius, 1995). La calnexina se asocia a la cadena pesada libre y posteriormente se produce la asociación con la cadena β_2 -microglobulina. Una vez unida la cadena pesada del MHC de clase I con la cadena β_2 -microglobulina, es la proteína soluble calreticulina la que se encuentra unida al heterodímero del MHC de clase I. También se ha observado la existencia de una proteína de 48 kD asociada a TAP y denominada **tapasina** (Sadasivan y col., 1996), que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas. En las células tap-negativas, tanto la tapasina como los dímeros clase I- β_2 -microglobulina están asociados a la calreticulina. Esto sugiere que, en las células normales, la tapasina podría hacer de puente entre el complejo calreticulina-cadena pesada- β_2 -microglobulina y la molécula TAP (Figura 7). Las moléculas de clase I interactúan con el complejo TAP mediante la tapasina. Las funciones de la molécula tapasina son las de aumentar los niveles de TAP incrementando así la eficiencia del transporte peptídico y asociarse con las moléculas de clase I facilitando el ensamblaje y la carga de éstas.

La proteína **ERp57** es un miembro de la familia enzimática tioredoxina. Estos enzimas catalizan la isomerización de los puentes de sulfuro de las proteínas, asegurando las correctas uniones intracatenarias o intercatenarias. Estos enzimas son denominados tiol-oxidoreductasas, porque pueden catalizar tanto la reducción como la oxidación de los puentes disulfuro dependiendo del potencial redox. Se ha sugerido que la formación de los puentes disulfuro se inicia cuando las cadenas pesadas de clase I están asociadas con la calnexina y se completa después de la unión a la molécula β_2 -microglobulina y la asociación con la calreticulina, siendo ERp57 la tiol-oxidoreductasa que facilita esta formación (Cresswell y col, 1999).

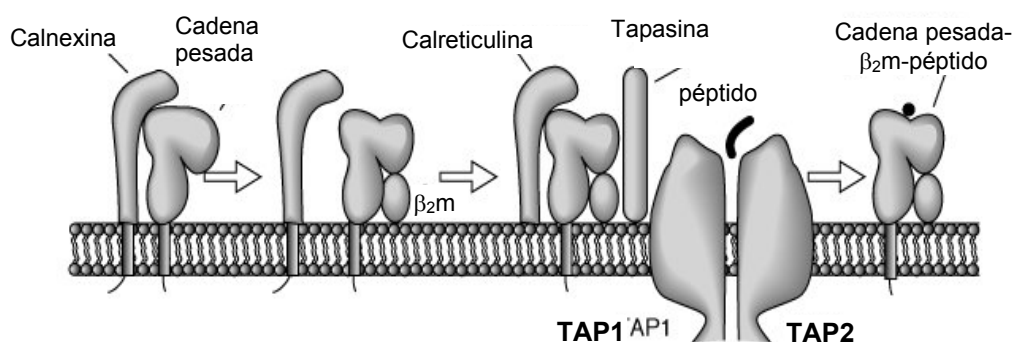


Figura 7. Asociación del péptido con el MHC de clase I

2.1.2.3. Presentación antigénica independiente de TAP

Aunque los proteosomas son los principales responsables de la generación de la mayoría de los péptidos presentados por clase I, otras proteasas también pueden generar péptidos antigénicos susceptibles de ser presentados por las moléculas de clase I. Quizás la evidencia más clara de la generación de péptidos independientemente de los proteosomas es la presentación de los péptidos derivados de las secuencias señal. Estas secuencias son liberadas de las proteínas cuando estas son traducidas y transportadas a su vez dentro del RE, donde una peptidasa separa el péptido de la proteína. Hay varios ejemplos de estos péptidos o proteínas que pueden ser presentados por el MHC de clase I. De hecho, la molécula HLA-A2, en ausencia de TAP, es capaz de presentar péptidos. Las moléculas del MHC de clase I no clásicas como HLA-E y Qa también se unen a las secuencias señal, pero en este caso la presentación es dependiente de TAP, aunque no se bloquea por los inhibidores proteosómicos (York y col., 1999).

Las moléculas CD1 no están codificadas en el MHC pero comparten características estructurales comunes con las moléculas MHC de clase I y también están asociadas a la proteína β_2 -microglobulina (Melian y col., 1996; Jayawardena-Wolf y Bendelac, 2001). Como las moléculas de clase I, CD1 requiere de la β_2 -microglobulina para el transporte a la superficie celular. Sin embargo el transporte de CD1 a la superficie parece ser independiente de TAP (Brutkiewicz y col., 1995). Estas moléculas presentan, a los linfocitos T, ligandos glucolipídicos (Figura 3).

3. LA EXPRESIÓN GÉNICA

En los eucariotas, el ADN se encuentra formando parte de la cromatina que mantiene los genes en un estado inactivo debido a la restricción del acceso de la ARN polimerasa y de sus factores accesorios. La cromatina está compuesta por histonas, formando una estructura denominada nucleosoma. Entre la síntesis de ADN y la expresión de proteínas hay una serie de procesos intermediarios sobre los que el organismo puede ejercer un control y modificar la producción proteica. Estas etapas son las siguientes: 1) transcripción del gen, generándose ARN mensajero (ARNm); 2) procesos modificadores del ARN: adición del 5' CAP, poliadenilación, *splicing* o proceso de corte y unión, en el que diferentes zonas del ARNm serán cortadas y unidas entre sí, produciéndose cierto número de combinaciones de ARNm a partir de un mismo gen; 3) transporte del ARNm del núcleo al citoplasma; 4) control de la estabilidad del ARNm en el citoplasma, regulando su degradación; 5) traducción del ARNm en los ribosomas, dando lugar a la proteína; 6) modificaciones post-traduccionales. Las histonas pueden ser reguladas post-traduccionalmente, disminuyendo la habilidad del nucleosoma de inhibir la unión de los factores de transcripción.

3.1. Regulación transcripcional de la expresión génica

Las secuencias de ADN responsables de determinar el punto exacto de inicio de la transcripción y el nivel de ARNm sintetizado se denominan promotores. En un gen típico, la secuencia del ADN denominada núcleo o *core* del promotor se localiza inmediatamente adyacente a la secuencia codificante y es donde se une la ARN polimerasa II (pol II) y sus factores accesorios, formando la maquinaria general de transcripción. El *core* del promotor contiene los elementos que determinan el inicio de transcripción; las cajas TATA y/o los Iniciadores y/o el elemento DPE (*downstream promoter element*). Estos elementos se encuentran en la región 5' o incluso se pueden solapar con el inicio de la transcripción. Esta zona del promotor puede mantener un nivel basal de transcripción gracias a que la maquinaria básica de transcripción se une a los elementos TATA y/o Iniciadores y/o DPE. Además, los promotores contienen otras secuencias que son reconocidas específicamente

por unas proteínas denominadas factores de regulación de la transcripción o factores de transcripción. Los factores de transcripción pueden activar o inhibir la transcripción génica mediante mecanismos diferentes. Los factores activadores influyen positivamente en la regulación de la transcripción génica mientras que los factores inhibidores llevan a cabo una represión de dicha transcripción. La activación o represión génica se produce tras el reclutamiento de la maquinaria general de la transcripción a la secuencia *core* del promotor y la interacción de ésta con las proteínas activadoras o represoras unidas a la región reguladora del promotor. Algunos activadores y represores presentan una expresión ubicua, mientras otros están restringidos a determinados tipos celulares, regulando así genes necesarios para una función en particular (Carey y Smale, 2000).

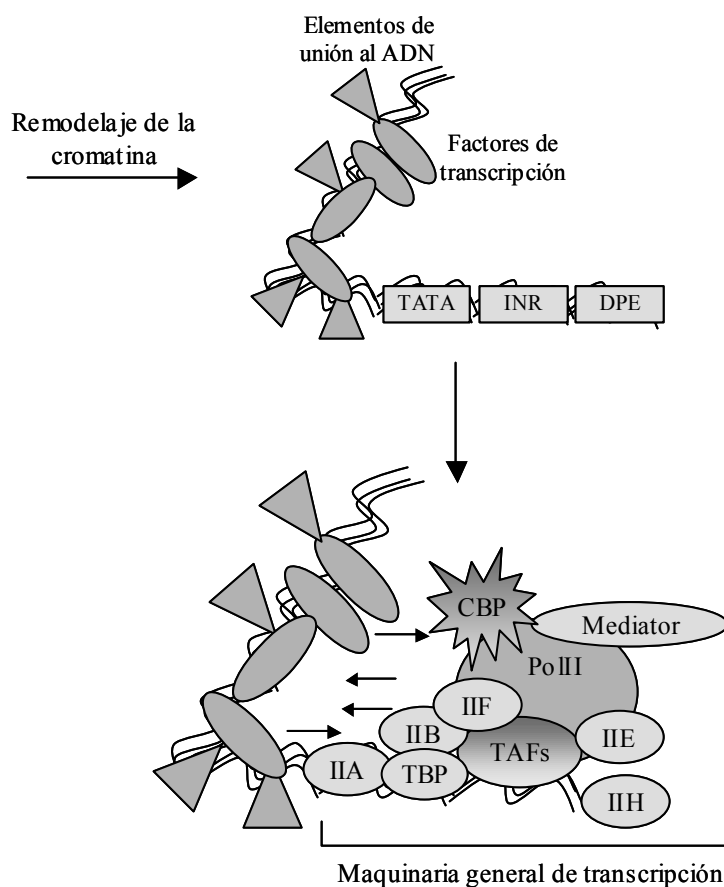


Figura 8. Activación de un gen y ensamblaje del complejo de preiniciación PolIII. En el *core* del promotor se puede encontrar la caja TATA, el elemento iniciador (INR) y el elemento DPE (*downstream promoter element*) donde se une la maquinaria general de transcripción. Ésta presenta interacciones con otras proteínas de la región reguladora del promotor como los elementos de niveles basales (BLE, cajas GC, cajas CCAAT) presentes en algunos genes y los elementos de respuesta a una señal que son específicos del gen (como por ejemplo: HRE (*hormone responsive element*) y NFE (*nuclear factor element*)).

En la activación de los genes, la cromatina tiene que estar alterada o remodelada para permitir la transcripción. Los enzimas involucrados en la remodelación de la cromatina se agrupan en dos grandes clases: los enzimas dependientes de ATP y las histonas acetiltransferasas (o simplemente histonas acetilasas). Estos enzimas, una vez unidos al

ADN, remodelan la cromatina permitiendo la unión de los activadores/represores y de la maquinaria general de transcripción. Los mecanismos de remodelación no están totalmente clarificados pero se conoce que aportan cambios en la estructura de la cromatina y participan en la modificación de las histonas permitiendo la accesibilidad a los factores de transcripción. Así, una vez las regiones amplificadoras y promotoras son accesibles, se unen a ellas una combinación de proteínas. Estas proteínas se unen a elementos de niveles basales, siendo su unión generalmente cooperativa. De esta manera, la unión débil de una proteína se ve incrementada mediante interacciones proteína-proteína en la región reguladora. Las estructuras de nucleoproteínas que se forman, interactúan con la maquinaria general de transcripción para formar el complejo de preiniciación. De esta forma se estructura una red compleja de interacciones proteína-proteína y proteína-ADN, que lleva a cabo lo que se denomina transcripción basal. Los activadores estimulan estos niveles de transcripción provocando la activación transcripcional (Figura 8).

CLASE	PROPIEDADES GENERALES	EJEMPLOS
I	Dianas de activadores y represores inherentes a la maquinaria del core, reconocimiento del promotor y funciones enzimáticas	TAFs, TFIIA, NC2, PC4
II	Adaptadores de activadores y represores, moduladores de la unión al ADN, diana de otros coreguladores y de la maquinaria del core	OCA-B/OBF-1, Groucho, Notch, CtBP, HCF, E1A, VP16
III	Estructuras multifuncionales: algunos interactúan con el ARN polimerasa II y/o varios tipos de activadores, algunos tienen funciones enzimáticas o propiedades selectivas sobre la cromatina	yeast:Mediator, SRBs human:CRSP, PC2, ARC/DRIP/TRAP, NAT, SMCC, Srb/Mediator
IV	Adaptadores de los activadores y represores que modifican la cromatina, actividad acetiltransferasa o deacetilasa con múltiples sustratos	CBP/p300, GCN5, P/CAF, p160s, HDAC-1, HDAC-2, Sir2
V	Actividad de remodelaje de la cromatina dependiente de ATP	SNF2-ATPasa e ISWI-ATPasa

Tabla I. Clasificación de co-reguladores transcripcionales

El complejo de iniciación que se une al core del promotor está formado por dos factores: (1) los GTFs (*General Transcription Factors*) que incluye la polimerasa II, TlIFA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF y TFIH (Orphanides y col., 1996) y (2) los coreguladores (coactivadores o corepresores) que permiten la comunicación de los activadores y los represores con los GTFs y el ADN mediando así la respuesta de las señales reguladoras (Hampsey, 1998; Myer y Young, 1998). TFIID es un complejo que contiene la proteína TBP (*TATA-binding protein*) (Hahn y col., 1989; Horikoshi y col., 1989) y varias proteínas TAFs (*Tightly Associated Factors*) (Dynlacht y col., 1991; Tanese y col., 1991) (Figura 8). Básicamente los factores coreguladores se clasifican en cinco clases (Tabla I) (Lemon y Tjian, 2000).

4. MACRÓFAGOS

Los macrófagos forman parte del sistema fagocítico mononuclear. Éste engloba a una serie de células (macrófagos, microglía, células de Kupfer, osteoclastos...) con múltiples funciones, siendo una de ellas la fagocitosis. Junto con los neutrófilos y las células dendríticas, el sistema fagocítico mononuclear constituye el principal mecanismo de defensa del organismo contra agentes extraños como los microorganismos (Abbas y col., 1994).

4.1. Características morfológicas y bioquímicas de los macrófagos

La morfología de los macrófagos depende de su localización tisular y de su función específica. No obstante, suelen ser células de gran tamaño (20 a 80 μm de diámetro) que contienen un núcleo reniforme con un marcado nucleolo. Los macrófagos tienen la capacidad de emitir largos pseudópodos para recubrir y fagocitar microorganismos, células dañadas o viejas y partículas de gran tamaño. El cierre de los pseudópodos alrededor de la partícula que va a ser fagocitada, permite la formación de una vesícula de fagocitosis (fagosoma). Los macrófagos también presentan un citoplasma granulado, con un desarrollado sistema lisosomal altamente especializado en la digestión de los materiales fagocitados. En el interior de estos lisosomas, se encuentra un elevado número de enzimas hidrolíticos, incluyendo lisozima, β -glucuronidasa, fosfatasa ácida, catepsinas, sulfatasas, glucosilasas, lipasas, elastasas, colagenasas, etc, así como una serie de reactivos producidos enzimáticamente como por ejemplo moléculas altamente reactivas de hipoclorito y de superóxido. La fusión de estos lisosomas con los fagosomas da lugar a los lisosomas secundarios o fagolisosomas, en cuyo interior se lleva a cabo la destrucción y digestión del material fagocitado. Los macrófagos también contienen un elevado número de mitocondrias que facilitan un gran metabolismo oxidativo, asociado a las funciones biológicas que desarrollan estas células (Alberts y col., 1994; Celada, 1994).

4.2. Origen de los macrófagos

Los macrófagos y el resto de las células del sistema inmunitario tienen un origen común en la médula ósea. Allí se hallan las células madre pluripotentes (*stem cells*), con capacidad autoregeneradora y con el potencial de diferenciarse en todos los tipos celulares de la sangre. En respuesta a las interleucinas IL-1, IL-3 e IL-6, la célula madre pluripotente experimenta una heteromitosis y da lugar a una nueva célula madre y a una célula pluripotencial mieloide, también conocida como GEMM-CFU (*Granulocyte/ Erythrocyte/*

La diferenciación terminal de las M-CFUs, proceso conocido como maduración, y la consiguiente generación de monocitos, también requiere la presencia de M-CSF. El monocito es más pequeño que su progenitor inmediato, el promonocito, pero tiene una capacidad fagocítica y un sistema lisosomal más desarrollados. Normalmente, el monocito pierde su capacidad proliferativa, aunque en ciertas condiciones, puede llegar a dividirse. Así, la generación basal de monocitos es un proceso regulado por el balance entre los factores de crecimiento (M-CSF, GM-CSF, IL-3 y TGF- β), producidos por las propias células en diferenciación, y una serie de agentes inhibidores, tales como la prostaglandina- E_2 , el interferón α/β y la lactoferrina (Celada y Maki, 1992; Celada, 1994; Valledor y col, 1998)

El monocito deja la médula ósea, pasa al torrente circulatorio, y de allí a los tejidos, gracias a la interacción entre moléculas de adhesión (selectinas e integrinas) existentes en la superficie de los monocitos y de las células del endotelio vascular. Una vez en los tejidos, el monocito culmina su maduración y se convierte en un macrófago. Este proceso conlleva un aumento del tamaño, un mayor desarrollo del sistema lisosomal y del contenido de enzimas hidrolíticas y un incremento en el número y tamaño de las mitocondrias, así como de su metabolismo energético.

A pesar de que proceden de los monocitos circulantes, los macrófagos tisulares presentan plena capacidad proliferativa y no dependen del suministro de monocitos en la médula ósea para mantener su población constante. No obstante, en situaciones de emergencia (inflamación, necrosis, etc.) se generan una serie de fenómenos que permiten una mayor afluencia de los macrófagos a los tejidos afectados. Por un lado, los macrófagos, tras la fagocitosis, y los linfocitos T activados por un antígeno, secretan factores de crecimiento que promueven la proliferación local de los macrófagos tisulares (Celada y Maki, 1992). Por otro lado, tales factores de crecimiento pueden, a través del torrente sanguíneo, acceder a la médula ósea e inducir un incremento de la producción de monocitos. Además, la liberación de determinadas citocinas, induce un aumento de la expresión de las moléculas de adhesión en la superficie de las células endoteliales de los vasos sanguíneos locales. Este fenómeno, asociado a una disminución del flujo sanguíneo, promueve la interacción entre los monocitos y las células endoteliales y la consiguiente extravasación de los primeros hacia el tejido afectado (Celada, 1994).

4.3. Función de los macrófagos

La morfología final y la función de los macrófagos tisulares dependen del tejido donde residen. Así, en los centros eritroblásticos de la médula ósea, los macrófagos transfieren hierro a los eritroblastos; en el bazo, fagocitan eritrocitos; en otros tejidos, fagocitan microorganismos, células, cuerpos apoptóticos y productos de desecho. Prácticamente, en

todos los órganos existen células derivadas de los macrófagos. Las células de la microglía en el sistema nervioso central, los osteoclastos del hueso, los histiocitos del tejido conectivo, las células de Kupfer del hígado, las células de clase A del tejido sinovial, las células de Langerhans de la epidermis y las células dendríticas de origen monocítico.

Los macrófagos juegan un papel crítico en la inmunidad natural pero además, están adaptados para desempeñar funciones esenciales en la inmunidad específica adquirida, tanto humoral como mediada por células.

En el contexto de la inmunidad natural, los macrófagos fagocitan y eliminan partículas extrañas tales como bacterias, virus, parásitos, macromoléculas e incluso células propias dañadas o muertas como es el caso de los eritrocitos viejos y cuerpos apoptóticos. Además, los macrófagos pueden matar células tumorales mediante la secreción de ciertas enzimas (por ejemplo, perforina y granzima), citocinas (TNF- α) e intermediarios reactivos del nitrógeno y del oxígeno, así como a través de interacciones célula-célula. Se piensa que el mecanismo de citotoxicidad de estos efectores consiste en la inducción de apoptosis de las células diana (Aliprantis y col., 1996). Una vez estas células se convierten en cuerpos apoptóticos, el macrófago puede fagocitarlos y degradarlos eficazmente. Del mismo modo, los macrófagos pueden provocar la muerte de microorganismos y controlar la dispersión de una infección mediante la secreción de enzimas (por ejemplo, lisozima), metabolitos del oxígeno y del nitrógeno e intermediarios lipídicos (por ejemplo, prostaglandinas) (Tabla II). Algunas de las sustancias secretadas por los macrófagos, en especial citocinas tales como TNF- α , IL-1 e IL-6, promueven el reclutamiento de otras células inflamatorias, principalmente neutrófilos, y son responsables de los efectos sistémicos de la inflamación (como el caso de la fiebre). Finalmente, los macrófagos también secretan factores de crecimiento para los fibroblastos (FGF, *Fibroblast Growth Factor*, TGF- β , *Transforming Growth Factor β*) y para el endotelio vascular, de tal manera que favorecen el riego sanguíneo y la reparación de tejidos dañados.

Durante la respuesta inmunitaria adquirida mediada por células, los macrófagos funcionan como células presentadoras de antígeno (APC, *Antigen Presenting Cell*) (Figura 3), es decir, procesan antígenos extraños y los presentan en su superficie para que puedan ser reconocidos por los linfocitos T. Además, producen una serie de proteínas que, una vez secretadas o expresadas en la membrana celular, promueven la activación de los linfocitos T. Recíprocamente, ciertas citocinas secretadas por los linfocitos T activados, activan a su vez a los macrófagos, aumentando la eficiencia de éstos en las funciones de presentación de antígeno, fagocitosis y lisis celular.

Los macrófagos también participan en la eliminación de antígenos extraños durante la respuesta adquirida humoral. Por un lado, estas células liberan proteínas del

complemento que, junto con los anticuerpos, recubren la superficie de un gran número de antígenos facilitando su reconocimiento por los receptores Fc γ o CR1, CR2, CR3 y CR4. Este proceso es conocido con el nombre de opsonización. Dado que los macrófagos expresan en su superficie receptores específicos tanto para la porción constante de los anticuerpos como para las proteínas del complemento, el proceso de reconocimiento y fagocitosis de antígenos extraños por parte de estas células se ve ampliamente potenciado (Abbas y col., 1994).

Tipo	Productos
Hormonas polipeptídicas	IL-1, IL-6, TNF- α , IFN- α/β , FGF, PDGF, TGF, GM-CSF, M-CSF, factor activador de neutrófilos, hormonas adenocorticotrópicas, eritropoyetina
Hormonas esteroideas	24-dihidroxitamina
Componentes del sistema de complemento	C1, C2, C3, C3a, C3b, C4, C5, C5a, Factor B, Factor D
Factores de coagulación	V, VII, IX, X, Protrombina, Factor tisular, Protrombinasa, Activador del plasminógeno, Inhibidor del activador del plasminógeno, Inhibidores de la plasmina
Enzimas hidrolíticos	Hidrolasas ácidas lisosómicas, proteasas, lipasas, Lisozima, Colagenasa, Elastasa, Perforina, Granzima
Inhibidores de enzimas y citocinas	Inhibidores de proteasas, Lipomodulina, Inhibidor de IL-1
Proteínas de la matriz extracelular	Fibronectina, Proteoglicanos de tipo condrotín sulfato
Proteínas ligadoras	Transferrina, Apolipoproteína E, Avidina
Oligopéptidos con función biológica	Glutatión
Intermediarios del metabolismo lipídico	Prostaglandinas, Tromboxano, Leucotrienos, PAF (Factor activador de plaquetas)
Intermediarios del metabolismo de ácidos nucleicos	Timidina, Uracilo, Ácido úrico
Intermediarios reactivos del oxígeno	Superóxido, Peróxido de hidrógeno, Radicales hidroxilo
Intermediarios reactivos del nitrógeno	Oxido nítrico (NO), Nitratos y Nitritos

Tabla II. Algunos de los productos secretados por los macrófagos (Nathan, 1987)

4.4. Activación de los macrófagos

La activación del macrófago es un proceso complejo y estrictamente controlado que consiste en una serie de modificaciones morfológicas, bioquímicas y funcionales que

culminan en un aumento del potencial de la célula para ejercer funciones complejas. La activación es un proceso necesario para que el macrófago sea capaz de desarrollar sus funciones específicas como, por ejemplo, la presentación de antígenos, la lisis de las células tumorales o la actividad bactericida. La principal citocina responsable de la activación de los macrófagos es el interferón gamma (IFN- γ), aunque también otros agentes como GM-CSF, M-CSF, IL-1, IL-2, IL-4 y TNF- α pueden inducir algunos aspectos de la activación del macrófago (Celada y Maki, 1992; Hamilton y Adams, 1987).

4.4.1. Interferón gamma

4.4.1.1. Características bioquímicas y funcionales del IFN- γ

El IFN- γ es una citocina con efecto autocrino y paracrino que originariamente se describió como perteneciente a una familia de agentes que confiere actividad antivírica a las células. Actualmente, se sabe que ejerce múltiples funciones como modulador de la respuesta inmunitaria sobre diversos tipos celulares y que esta función es más importante que su actividad antivírica (Goes y col., 1995).

El IFN- γ es sintetizado por los linfocitos T CD4+ (subtipo Th1) y algunos linfocitos T CD8+ (Mossman y Coffman, 1991). El estímulo que desencadena su síntesis es la interacción del receptor de los linfocitos T (TCR) con el complejo antígeno-MHC (de clase I o II dependiendo del tipo celular) (Figura 3), que se encuentra presente en la superficie de las células presentadoras de antígeno. También las células NK (Chan y col., 1992) son capaces de producir IFN- γ en respuesta a la IL-2 y al IFN- α (Perussia, 1991). La secreción viene modulada por diversos productos, tanto de los linfocitos T (IL-2) como de los macrófagos (IL-12) en estado de activación. Una vez secretado, el IFN- γ interactuará con su receptor específico sobre la superficie de las células diana e inducirá su activación (Celada y col., 1985).

El IFN- γ en su forma activa, es un homodímero formado por dos cadenas polipeptídicas idénticas, N-glucosiladas, unidas de forma no covalente que se encuentran codificadas por un gen único localizado, en el ratón, en el cromosoma 10. La expresión de éste genera un transcrito de 120 nucleótidos el cual dará lugar a un péptido con un peso molecular de 15.4 kD (Farrar y Schreiber, 1993).

Los monocitos/macrófagos representan la principal diana del IFN- γ , aunque esta citocina actúa sobre distintos tipos celulares ya que todas las células del organismo poseen receptores específicos (Celada y col., 1984). En los linfocitos B, el IFN- γ junto con la IL-4, induce la diferenciación y el cambio de isotipo de las inmunoglobulinas secretadas (Snapper y Paul, 1987), pero su efecto sobre las moléculas de clase II del MHC puede ser

inductor o represor (Wong y col., 1983; Mond y col., 1986). En linfocitos T CD4⁺, el IFN- γ dirige la respuesta inmunitaria hacia procesos mediados por células, induciendo la proliferación del subtipo Th1 y, bloqueando la de Th2. En los neutrófilos y las células NK desencadena el proceso de activación induciendo una respuesta inmunitaria inespecífica. Además, el IFN- γ causa un aumento de expresión de las selectinas sobre la membrana de las células endoteliales con el fin de facilitar la extravasación de los linfocitos T desde el torrente sanguíneo hacia los tejidos.

4.4.1.2. Transducción de la señal del IFN- γ

El receptor del IFN- γ es un heterodímero formado por dos cadenas polipeptídicas, α y β , que se encuentran disociadas en estado inactivo. Tras la unión con el ligando, las cadenas del receptor oligomerizan y dan lugar a un tetrámero $\alpha_2\beta_2$ (Bach y col, 1997) (Fig. 10). La cadena α del receptor es la responsable de la interacción de la molécula de IFN- γ , mientras que la cadena β está únicamente involucrada en la transmisión de la señal hacia el interior de la célula. En el estado inactivo, la cadena α se encuentra asociada a la quinasa JAK-1 (*Janus Kinase*) y la cadena β a la quinasa JAK-2. Tras la unión con el ligando y la consiguiente oligomerización, estas quinasas interaccionan entre sí y se activan por fosforilación recíproca. A continuación, fosforilan determinados residuos de tirosina que se encuentran en la región intracitoplasmática de la cadena α del receptor. Dichos residuos son reconocidos por el dominio SH2 de la proteína STAT1 α (*Signal Transducer and Activator of Transcription*).

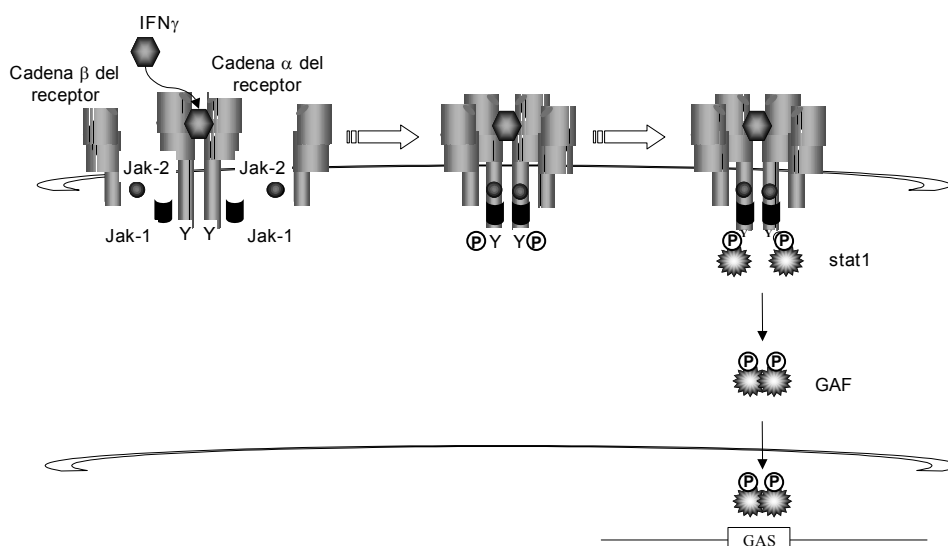


Figura 10. Transducción de la señal del IFN- γ GAF, *Gamma-interferon activated factor*; GAS, *Gamma-interferon Activated Sequence*; IFN- γ , *Interferon Gamma*; JAK, *Janus Kinase*; STAT, *Signal Transducer and Activator of Transcription*.

Una vez STAT1 α es reclutada por el complejo receptor-JAK activado, experimenta una fosforilación mediada por las proteínas JAK. La fosforilación induce la dimerización de STAT1 α , dando lugar al complejo transcripcional GAF (*Gamma-interferon Activated Factor*), que es translocado al núcleo donde induce la expresión de numerosos genes mediante la unión a una secuencia específica de ADN denominada GAS (*Gamma-interferon Activated Sequence*) (Ihle y Kerr, 1995; Schindler y Darnell, 1995). Entre los genes controlados por GAF, encontramos aquellos que codifican para el receptor de alta afinidad de la fracción constante de las inmunoglobulinas G (Fc γ RI); el transactivador de los genes del MHC de clase II (CIITA); factores de transcripción de la familia IRF-1 necesarios para la regulación de la expresión de genes con secuencias ISRE (*IFN-Stimulated Response Elements*) en sus promotores como por ejemplo, IFN- α/β , MHC de clase I y la sintasa inducible del óxido nítrico (iNOS). La activación de STAT1 α alcanza un máximo a los 15-30 minutos tras la estimulación con el IFN- γ y disminuye a niveles basales en 1-2 horas, permitiendo así la atenuación de la respuesta (Boehm y col., 1997). Por otro lado, el complejo IFN- γ -cadena α del receptor, se internaliza y es disociado en el interior de los lisosomas. El receptor es reciclado a la superficie celular, mientras que el IFN- γ es degradado y excretado (Boehm y col., 1997; Celada y Schreiber, 1987).

Pese a que la vía de activación de JAK/STATs es el único mecanismo de señalización descrito para el IFN- γ , existen evidencias de que esta citocina activa otras vías alternativas que podrían ser responsables de la inducción de determinadas respuestas en la activación del macrófago (Celada y col., 1989; Gil, 2001).

4.4.1.2.1. Activación de factores de transcripción mediada por el IFN- γ : STATs e IRFs.

Actualmente se conocen un total de siete proteínas STATs en mamíferos, denominadas STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b, y STAT6; con unos tamaños comprendidos entre 750 a 950 kD. La comparación de sus secuencias ha permitido identificar varios dominios conservados. El dominio amino-terminal forma una estructura única que parece promover la cooperatividad en la unión al ADN. El dominio *coiled* está formado por una cadena de cuatro hélices que media las interacciones con varias proteínas celulares. El dominio de unión al ADN media la interacción, como dímero, con el elemento palindrómico GAS. La dimerización se produce a través de la interacción entre la fosfotirosina de una molécula y el dominio SH2 de la otra. La región de unión entre el dominio ADN y el dominio SH2 es la que está más altamente conservada en todas las

moléculas STATs y se le denomina dominio de unión. Este sirve para traducir estructuralmente la dimerización al dominio de unión al ADN. El dominio carboxi-terminal es el más divergente en tamaño y secuencia y codifica el dominio de activación transcripcional (TAD-*Transcriptional Activation Domain*) (Schindler, 1999). Algunas proteínas de la familia presentan un *splicing* alternativo que conlleva a una forma truncada de esta región carboxi-terminal, de manera que se diferencia entre la forma α y β , siendo esta última la que presenta la delección (Hoey y Schindler, 1998) (Fig.11).

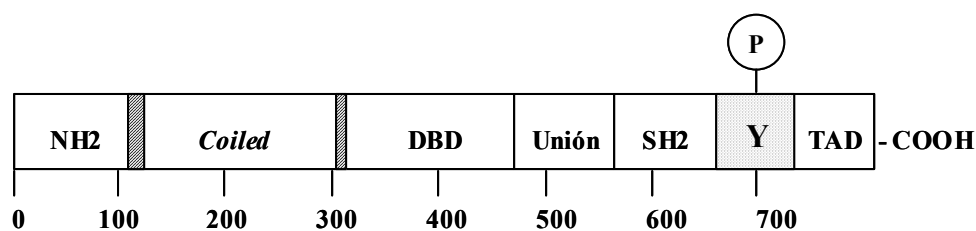


Figura 11. Estructura de las moléculas STAT. STAT comparte varios dominios conservados, un dominio amino-terminal (NH₂); un dominio *coiled*; un dominio de unión al ADN (DBD- *DNA Binding Domain* -); un dominio de unión; un dominio SH2; un motivo de activación tirosina (Y); un dominio de activación transcripcional (TAD-*Transcription Activation Domain*-); y una secuencia carboxi-terminal.

La activación específica de STAT está mediada parcialmente a través del reclutamiento de tirosinas específicas del receptor mediante el dominio SH2 de STAT. Por ejemplo, la tirosina 440 del dominio citoplasmático de la cadena α del receptor del IFN- γ es responsable del reclutamiento y activación de STAT1 (Heim y col., 1995). También se dan otros casos en los que el reclutamiento y fosforilación de STAT, implicando por tanto su activación, está mediada únicamente por JAK1 y JAK2. Así, la activación de JAK-STAT puede depender del tipo celular o de su estado de diferenciación (Ward y col., 2000).

Hay muchos factores implicados en la gran variabilidad de las respuestas producidas por STAT. Los lugares de unión de STAT no son idénticos y por lo tanto los diferentes genes tienen dianas para la inducción de diferentes STATs. Además STAT pueden mediar una represión transcripcional de los promotores específicos. Algunas STAT pueden formar homodímeros o heterodímeros aumentando el rango de uniones específicas al ADN. La duración en la activación de STAT también puede influir en la transcripción. Por otra parte, las distintas isoformas son expresadas en diferentes tipos celulares. Además, los STATs pueden interactuar con distintos factores nucleares y coactivadores como p300/CBP (Bhattacharya y col., 1996), el receptor de los glucocorticoides (Zhang y col., 1997), c-jun (Schaefer y col., 1995), lo cual incrementa el rango de respuestas transcripcionales moduladas por STAT. Finalmente, aunque la fosforilación en la tirosina C-terminal sea

crítica para la activación de STAT, también es probable que la fosforilación en una serina module la respuesta transcripcional. Está demostrado que la serina 727 de STAT1 α está directamente involucrada en el reclutamiento de MCM5 (*Minichromosome Maintenance*) como parte de la activación transcripcional inducida por el IFN- γ (Zhang y col., 1998).

La especificidad de las diferentes STAT en la unión a las secuencias GAS fue deducida mediante tres tipos de experimentos: las secuencias de alineamiento, los experimentos de mutagénesis dirigida y los procedimientos del sitio de unión del ADN. Todos los métodos mostraron la importancia de una secuencia palindrómica TTCN₂₋₄GAA. También se ha observado la presencia de secuencias GAS atípicas como la del promotor de GBP-1 (*Guanylate-Binding protein-1*) (TTANNNTAA) sugiriendo que estas secuencias promueven una unión más débil a STAT. Además, parece ser que sólo se asocian a STAT1 y no a otras proteínas STAT. En este promotor en concreto, se observó el primer ejemplo de una actividad transcripcional cooperativa entre GAS e ISRE. Posiblemente, los factores asociados a ISRE compensarían la débil unión de STAT1 a GAS. También se han encontrado promotores que contienen varias cajas GAS, cuya función sería la de potenciar la transcripción (Decker y col, 1997).

Los ratones deficientes de STAT1 no muestran alteraciones en el desarrollo de los órganos y los tejidos, en el número y distribución de las poblaciones celulares inmunitarias ni en la capacidad de reproducción. Sin embargo, no son capaces de resistir a las infecciones microbianas ni víricas. En principio estos ratones no son capaces de manifestar respuestas biológicas tras el tratamiento con IFN- γ o con IFN- α , pero no presentan ninguna anomalía en las respuestas inducidas por otras citocinas (como la hormona del crecimiento, EGF-*Epidermal Growth Factor*- e IL-10), de las cuáles se conoce su capacidad de activación de STAT3 y de STAT1 *in vitro* (Meraz y col, 1996; Durbin y col., 1996).

Los mecanismos de señalización del IFN condujeron al descubrimiento de una nueva familia de factores de transcripción denominada IRFs (*Interferon Regulatory Factor*), que consta al menos de cuatro factores denominados IRF-1, IRF-2, p48, e ICSBP (*Interferon Consensus Sequences Binding Protein*). Estos muestran homología en su región N-terminal que es la zona de unión al ADN. La expresión de estos cuatro factores se incrementa tras la estimulación con IFN- γ . El factor IRF-1 es inducido por el IFN- γ (Sims y col., 1993), mediante la presencia de una caja GAS en su promotor, así como por otras citocinas como el TNF- α (Fujita y col., 1989). El factor IRF-2 presenta una alta homología con IRF-1 y además de ser inducible por el IFN- γ actúa como inhibidor transcripcional antagonizando con IRF-1 (Harada y col., 1989). El factor ICSBP se une a las secuencias ISRE actuando como transactivador de la regulación negativa. ICSBP interacciona con IRF-1, IRF-2 mediante uniones proteína-proteína sin estar implicada la región de unión al ADN, mientras que bloquea la región de unión al ADN de p48 (Bovolenta y col., 1994).

4.4.1.2.2. Los factores *IRF-1* y *NFκB* como mediadores del sinergismo entre el *IFN-γ* y el *TNF-α*

Muchos genes que son inducibles por el *IFN-γ* también lo son por el *TNF-α* y en la mayoría de los casos la inducción es sinérgica. En el sinergismo entre estas dos citocinas están involucrados el factor *NFκB*, activado por el *TNF-α*, y un factor de transcripción inducido por el *IFN-γ*. El *TNF-α* activa a *NFκB*, un factor de transcripción que se encuentra latente en el citosol, mediante la degradación de *IκB*, su inhibidor citoplasmático. Una vez activado, el factor *NFκB* se trasloca al núcleo e induce la transcripción de varios genes. La mayoría de los genes inducibles sinérgicamente por *IFN-γ* y *TNF-α* contienen cajas ISRE y *NFκB* en su promotor (Boehm y col., 1997). *IRF-1* es el factor que está mayoritariamente implicado en esta interacción pero hay otros factores de unión a la caja ISRE que también pueden estar involucrados. También se pueden producir otras vías de sinergismo. Así, se ha observado que el *TNF-α* puede inducir al factor *IRF-1* a través de la caja *NFκB* presente en su promotor (Fujita y col., 1989), y que el *IFN-γ* puede activar *NFκB* mediante la inducción de una proteína capaz de fosforilar *IκB* (Siebenlist y col., 1994). El receptor del *TNF-α* es también inducible por el *IFN-γ* (Tsujiyamoto y col., 1986), permitiendo así el primer efecto adicional. Este sinergismo entre el *TNF-α* producido por los macrófagos y el *IFN-γ* producido por los linfocitos T y las células NK sugiere un mecanismo de acción conjunto a nivel fisiológico llevado a cabo por estos tipos celulares en respuesta a una infección.

4.4.1.2.3. Represión de la vía *JAK-STAT*

Los mecanismos de represión de la vía *JAK-STAT* son básicamente cinco, la endocitosis de los complejos *JAK-Receptor*, efectos dominantes negativos de las diversas variantes de *STAT*, la familia de proteínas *PIAS* (*Protein Inhibitors of Activated STATs*), la familia de proteínas *SOCS* (*Suppressors Of Cytokine Signaling*) y las tirosina fosfatasas (Ward y col., 2000).

Las proteínas *PIAS* parece ser que se unen directamente a *STAT* para inhibir su unión al ADN, aunque su papel biológico exacto aún está por determinar.

La familia *CIS/SOCS/SSI* es un grupo de proteínas que contienen un dominio *SH2* y dominios de homología *CIS*. Actualmente parece ser que al menos tres de ellas (*CIS1*, *CIS3/SOCS3* y *JAB/SOCS1*) regulan negativamente la transducción de señales por varios mecanismos. *CIS1* inhibe la activación de *STAT5* al unirse al receptor que recluta *STAT5*, mientras que *CIS3/SOCS3* y *JAB/SOCS1* se unen directamente al dominio quinasa de *JAK*, inhibiendo entonces su actividad tirosina quinasa (Yasukawa y col., 2000).

Existen varios estudios que han demostrado la existencia de un mecanismo de regulación negativa de la vía JAK-STAT debido a la unión de ciertas tirosina fosfatasas, que contienen dominios SH2 en tándem (SHP-1 y SHP-2), al receptor. Ambas fosfatasas pueden unirse a los receptores activados o a los miembros de la familia JAK, produciendo la defosforilación de la quinasa (Ward y col., 2000).

4.4.2. Transducción de la señal de los IFNs de tipo I

En la vía de activación de JAK/STATs están implicados tanto los interferones de tipo I (existen más de 20 tipos como por ejemplo: IFN- α , - β , - ω y - τ) como el de tipo II (IFN- γ). Aunque ambas clases de interferones tienen una actividad antivírica potente, los de tipo I juegan un papel más importante en la respuesta inmunitaria innata y el IFN- γ en la respuesta inmunitaria adquirida (Bach y col., 1997). Los interferones de tipo I median la rápida inducción de los genes diana a través de los elementos ISRE y del factor de transcripción que se une a estos elementos, denominado ISGF3 (*IFN Stimulated Gene response Factor*). La purificación de ISGF3 identificó cuatro proteínas de 48, 84, 91 y 113 kD. La proteína p48 se identificó como un nuevo miembro de la familia IRF. Las proteínas p91 y p84 son dos isoformas obtenidas mediante *splicing* alternativo de STAT1, nombradas STAT1 α y STAT1 β respectivamente. Por último, la proteína p113 fue denominada STAT2 (Schindler y col., 1992). Para completar la cascada de activación de STAT1 y STAT2, el IFN- α depende de una tirosina quinasa. Posteriormente las dos proteínas STAT heterodimerizan, se traslocan al núcleo y se asocian a la proteína p48 para formar el complejo estable ISGF3 (Schindler, 1999) (Figura 12).

Se han observado algunos efectos sinérgicos del IFN- α y del IFN- γ . El IFN- γ además de aumentar la expresión de STAT1 incrementa la expresión de p48, lo que significa que el pretratamiento con IFN- γ puede incrementar la respuesta del IFN- α (Gao y col., 1993). También se ha demostrado que p48 puede asociarse con GAF, modificando de esta manera la especificidad en el reconocimiento de las secuencias GAS en las secuencias ISRE (Bluyssen y col., 1995). Por lo tanto, la especificidad transcripcional del IFN- γ puede ser modificada a nivel de una respuesta secundaria al incluirse también genes de la respuesta a los interferones IFN- α/β .

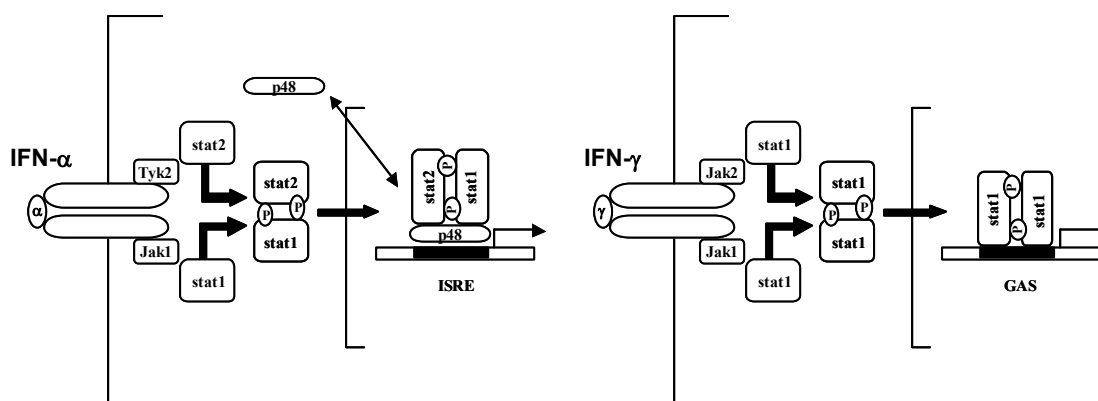


Figura 12. Comparación entre las vías JAK-STAT inducidas por el IFN- γ y el IFN- α . α , IFN- α ; γ , IFN- γ ; Jak, Janus kinase; Tyk, tyrosin kinase; ISRE, IFN Stimulated Gene Response Factor.

4.4.3. El Lipopolisacárido (LPS)

El LPS, también conocido como endotoxina, es uno de los componentes estructurales de la membrana exterior de las bacterias Gram negativas. Desde el punto de vista estructural, el LPS está formado por tres regiones distintas: una región central compuesta por polisacáridos repetitivos, una estructura de tipo antígeno-O, ambas hidrofílicas, y un dominio hidrofóbico formado por seis cadenas de ácidos grasos también denominado lípido A, que representa el componente biológicamente activo del LPS. Debido a esta estructura, el LPS actúa como molécula anfipática y muy poco soluble en soluciones acuosas (Ulevitch y Tobias, 1995).

El LPS funciona como un antígeno timo-independiente, es decir, es capaz de estimular a los linfocitos B en ausencia de linfocitos T cooperadores. Además, el LPS activa a los linfocitos B sin la necesidad de interactuar con las inmunoglobulinas presentes en la superficie de este tipo celular (Celada, 1994).

En los macrófagos, el LPS induce la síntesis de citocinas, tales como TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, metabolitos del ácido araquidónico (prostaglandinas y leucotrienos) y otros lípidos bioactivos (factor activador de plaquetas), péptidos quimiotácticos como MIP-1 (*Macrophage Inflammatory Protein*), y especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno. La mayor parte de estos productos inducidos por el LPS actúan de forma autocrina sobre los propios macrófagos y algunos de ellos, como por ejemplo los metabolitos del ácido araquidónico, controlan la expresión de genes tardíos en el contexto de la respuesta al LPS. Sin embargo, no todos estos productos ejercen un efecto positivo sobre la respuesta de los macrófagos. Por ejemplo, la IL-10 forma parte de un mecanismo autoinhibidor que

controla la producción de otras citocinas como el TNF- α (Sweet y Hume, 1996). También se ha descrito un efecto negativo del LPS sobre alguna de las actividades inducidas por el IFN- γ , tales como la expresión de las moléculas del MHC de clase II o la expresión de los receptores *scavenger* (Celada y col., 1989).

4.4.3.1. Transducción de la señal del LPS

En los macrófagos el receptor de alta afinidad del LPS es la molécula CD14. Se trata de una glicoproteína que se encuentra o bien anclada en la membrana de los monocitos, los macrófagos y los leucocitos polimorfonucleares mediante la unión a una molécula de glicofosfatidilinositol (GPI), o bien soluble en la circulación (Ulevitch y Tobias, 1995).

Aunque el mecanismo exacto de transducción de la señal por el receptor no está definido, se han descrito numerosas vías de señalización intracelular activadas tras la estimulación de los macrófagos con LPS. La unión del LPS al CD14 induce la activación de tirosina-quinasas, requisito necesario para la expresión de citocinas como el TNF- α , la IL1- β y la IL-6 y para la activación de enzimas (por ejemplo, la sintasa del óxido nítrico) y del factor de transcripción NF κ B (Weinstein y col., 1991; Shapira y col., 1994; Paul y col., 1995; Schletter y col., 1995).

En las células eucariotas, uno de los mecanismos más frecuentes en la transducción de señales es la activación de la cascada de las quinasas MAP (*Mitogen-Activated Protein Kinases*). El término general MAPK engloba a varias quinasas con especificidad dual serina/treonina-quinasa. Las tres MAPKs más conocidas son ERK (*Extracellular-Regulated Kinase*), JNK/SAPK (*c-Jun N-terminal Kinase/Stress-Activated Protein Kinase*) y p38RK (*Reactivating Kinase*) (Robinson y Cobb, 1997).

La activación de la cascada JNK/SAPK, mediante la fosforilación de c-Jun, conduce a la rápida activación del factor de transcripción dimérico AP-1. En numerosos genes existen secuencias reconocidas por AP-1, entre los que destacamos los que codifican para la citocina TNF- α y para el propio factor c-Jun, cuya expresión funcionaría como mecanismo de retroalimentación positivo. También se ha observado que el LPS induce la expresión de varios genes a través de la activación del factor de transcripción NF κ B (Baeuerle y Baltimore, 1996). El LPS también ejerce un rápido efecto en la activación de STAT1 mediada por el IFN- γ a través del incremento de la actividad serina-quinasa de STAT1. La fosforilación de la serina (S727) de STAT1 aumenta su actividad transcripcional (Kovarik y col., 1999).

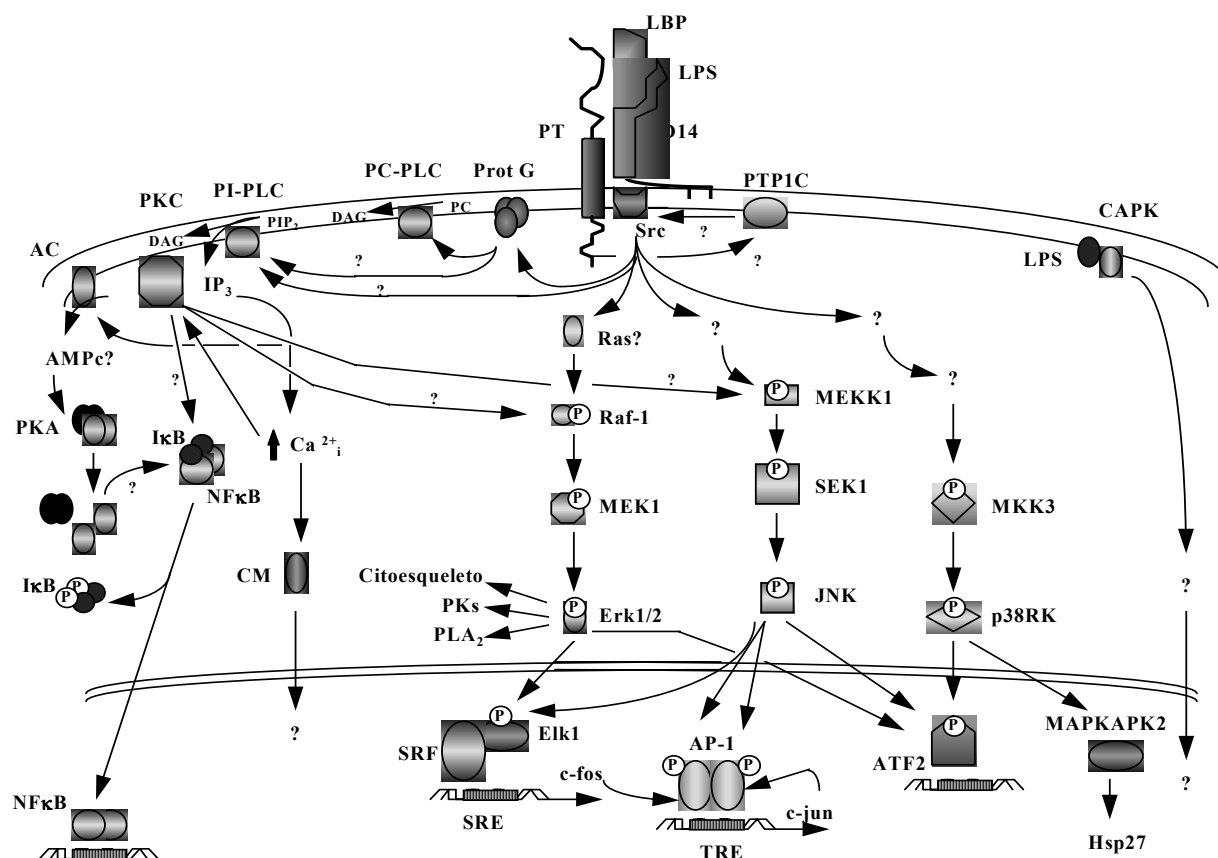


Figura 13. Algunas vías de transducción de señal del LPS. AC, adenilato ciclasa; AMPc, adenosina monofosfato cíclico; AP-1, *Activating Protein-1*; Ca^{2+}_i , iones calcio intracelulares; CAPK, *Ceramide-Activated Protein Kinase*; Cer, ceramida; CM, calmodulina; DAG, diacilglicerol; Erk, *Extracellular-regulated kinase*; Hsp, *Heat-shock protein*; $I\kappa B$, inhibidor de kappa B; IP₃, fosfatidilinositol 1,4,5-trifosfato; JNK, *c-Jun N-terminal Kinase/Stress-activated protein kinase* (SAPK); LBP, *LPS-binding protein*; LPS, lipopolisacárido; NF κ B, *Nuclear Factor kappa B*; PC, fosfatidilcolina; PC-PLC, fosfolipasa C específica por PC; PIP₂, fosfatidilinositol 4,5-bifosfato; PI-PLC, fosfolipasa C específica por fosfatidilinositol; PKA, proteína-quinasa A; PKC, proteína-quinasa C; PK, proteína-quinasa; PLA₂, fosfolipasa A₂; PTP1C, proteína-tirosina-fosfatasa 1C; SEK, *SAPK/JNK Kinase*; Src, tirosina-quinasa de la familia de Src; SRE, *Serum Response Element*; SRF, *Serum Response Factor*; TRE, *TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate) Response Element*.

4.4.4. Transducción de la señal del TNF- α

La citocina TNF- α es sintetizada como una proteína transmembranaria no glucosilada de 25 kD. Tras una proteólisis se produce un fragmento de 17 kD que es la forma circulante como homotrímero (51 kD). Para ejercer su efecto el TNF- α debe unirse a su receptor específico. Se han descrito dos receptores para el TNF- α : TNF-R1 (p55) y TNF-R2 (p75). TNF-R1, pero no TNF-R2, presenta interacciones intracelulares proteína-proteína que tienen motivos denominados DD (*Death Domain*), los cuales están involucrados en la activación de las vías apoptóticas. TNF-R2, por otra parte, pertenece a la familia de receptores del TNF que interactúa directamente con uno o más miembros de la familia de

proteínas TRAF (*TNF Receptor-Associated Factor*) (Rothe y col., 1994). TRAF2 es una proteína de 56 kD que se une a la región C-terminal del TNF-R y parece jugar un papel en la activación del factor de transcripción NF κ B inducida por TNF- α . También se han identificado otras proteínas TRAF (Darnay y Aggarwal, 1997; Baker y Reddy, 1996)

Hay muchos genes conocidos que son inducidos por el TNF- α , como los genes que codifican para citocinas, factores de crecimiento, receptores, moléculas de adhesión celular, factores de transcripción, etc (Vilcek y Lee, 1991). La inducción de algunos de estos genes se debe a la activación de factores de transcripción como AP-1 y específicamente NF κ B.

La señal intracelular para la activación de NF κ B inducida por TNF- α puede darse por diferentes vías. Es conocido que la unión del TNF- α a TNF-R1 o a TNF-R2 desencadena la activación de NF κ B. También es conocido que la sobreexpresión de TRAF2 o la sobreexpresión de proteínas con motivos DD como TRADD (*TNF-Receptor-Associated DD protein*), FADD (*Fas-Associated DD protein*) o RIP (*Receptor-Interacting Protein*) conducen a la activación de NF κ B (Wallach, 1997). Parece ser que la asociación directa o indirecta de las proteínas DD con TRAF2 es la vía central de activación (Figura 14). TRAF2 se asocia con una serina-treonina quinasa denominada NIK (*NF κ B-inducing Kinase*) (Malinin y col., 1997). NIK no activa directamente a NF κ B pero actúa como activador de otra serina-treonina quinasa denominada I κ B- α quinasa (Regnier y col., 1997; DiDonato, 1997). En la mayoría de los vertebrados las proteínas NF κ B están presentes de forma latente, secuestradas en el citoplasma por miembros de la familia de proteínas inhibitoras I κ B (Baldwin, 1996). La quinasa I κ B- α es responsable de la fosforilación de las serinas 32 y 36 de I κ B- α (la subunidad inhibidora mayor de NF κ B) (Regnier y col., 1997; DiDonato, 1997). Esta misma quinasa es también responsable de la fosforilación de I κ B- β , otra subunidad inhibidora de NF κ B. La fosforilación de I κ B conduce a la activación de NF κ B y su posterior traslocación al núcleo.

El TNF- α también está implicado en la traducción de la señal vía JNK (*c-Jun N-terminal Kinase*), dándose la inducción de c-fos y c-jun y su posterior unión al ADN. Parece ser que la vía central de la inducción por TNF- α es la molécula TRAF2 la cual asocia señales producidas por la unión al TNF-R1 o la unión al TNF-R2 (Wajant y Scheurich, 2001).

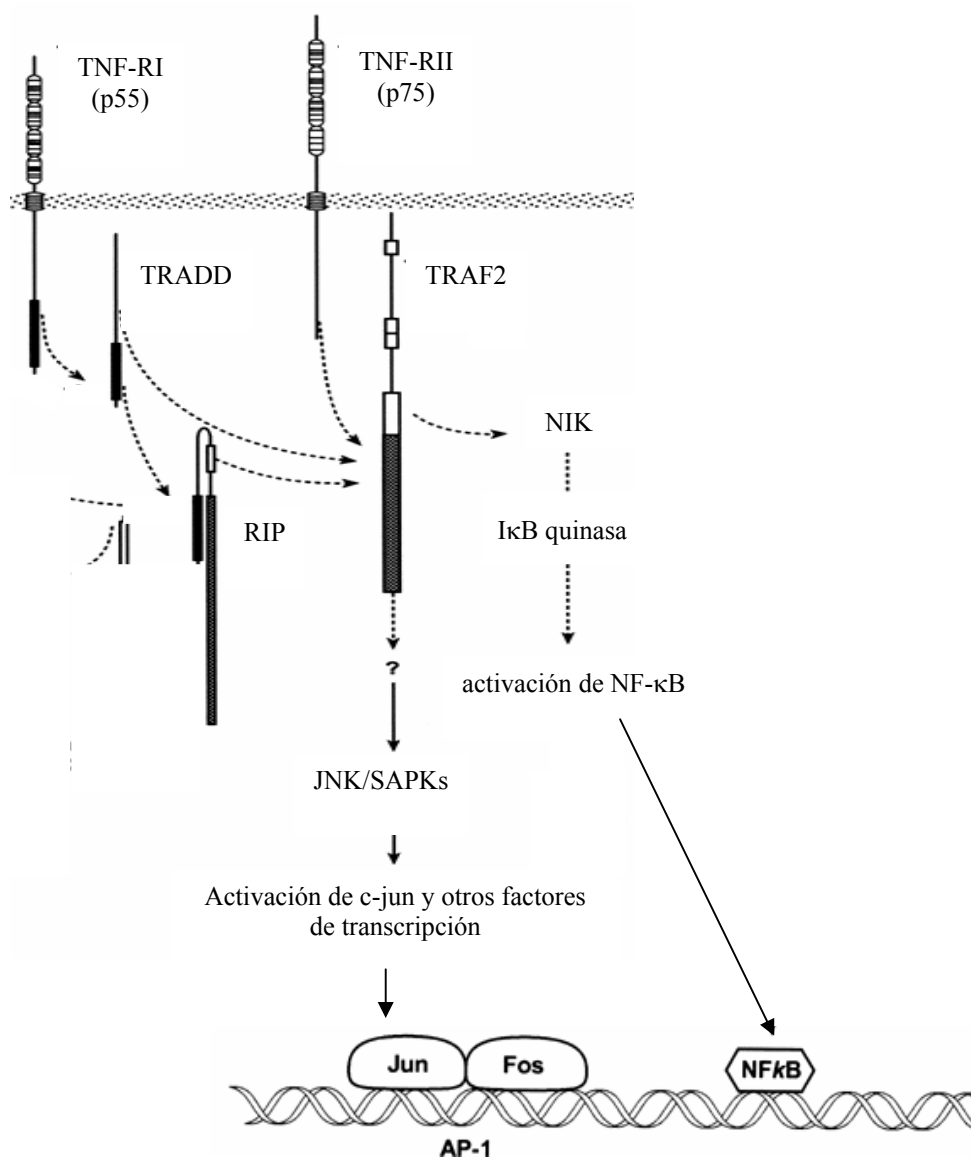


Figura 14. Representación esquemática de algunas de las vías de señalización activadas por el receptor del TNF. TRADD; *TNF Receptor-Associated Death Domain*; TRAF, *TNF Receptor-Associated Factor*; RIP, *Receptor-Interacting Protein*; NIK, *NFκB-activating Kinase*; I_κB inhibidor de kappa B; JNK/SAPKs, *c-Jun N-terminal Kinase/Stress-Activated Protein Kinase*.

4.4.5. Transducción de la señal del TGF-β

El TGF-β es una citocina multifuncional que regula el crecimiento y diferenciación de varios tipos celulares y tiene actividades inmunosupresoras y proinflamatorias. Algunas células expresan TGF-β constitutivamente y su producción es mayor cuando son estimuladas, entre ellas se incluyen las plaquetas, los macrófagos, los linfocitos B y T, los

fibroblastos, las células endoteliales, los osteoblastos, los osteoclastos, los astrocitos y las células de la microglía.

Hasta la fecha se han identificado cinco formas de TGF- β , pero únicamente tres isoformas con homologías entre el 70-76 % se han encontrado en mamíferos: TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3. Cada isoforma está altamente conservada en diferentes especies, por ejemplo sólo un aminoácido varía del TGF- β humano al murino (Massagué, 1990).

TGF- β 2 y TGF- β 3 son importantes reguladores de la diferenciación celular, mientras que TGF- β 1 tiene efectos principalmente inmunológicos.

Los TGF- β s son sintetizados como precursores proteicos inactivos biológicamente. Consisten en pre-pro-péptidos que requieren de dos procesos para obtener el TGF- β activo. El primer proceso consiste en la eliminación de un péptido señal hidrofóbico en la región N-terminal dando lugar al pro-TGF- β . El segundo proceso requiere de la separación de la pro-región para dar el TGF- β maduro (Gleizes y col., 1997). Una vez sintetizado y procesado, el TGF- β es liberado por las células como un complejo latente inactivo biológicamente. Dos formas de complejos latentes han sido descritas, una de menor tamaño y una de mayor tamaño. El complejo latente menor está formado por una molécula de TGF- β activa unida no covalentemente a un propéptido dimerizado mediante puentes disulfuro denominado LAP (*Latency-Associated Protein*). En el complejo latente mayor la proteína LAP está unida a una glucoproteína, LTBP (*Latent TGF- β Binding Protein*). La glucoproteína LTBP confiere al complejo la capacidad de asociarse a la matriz extracelular permitiendo así el almacenaje del TGF- β . Su liberación es llevada a cabo por enzimas proteolíticas. Las formas activas biológicas del TGF- β son dímeros unidos por puentes disulfuro de 25 kD. Los TGF- β s son producidos normalmente como homodímeros (TGF- β 1.1, - β 2.2, - β 3.3) pero también se han observado heterodímeros (TGF- β 1.2 y - β 2.3) (Fortunel y col., 2000).

Se han descrito diferentes mecanismos de activación del TGF- β . En monocitos, macrófagos y células endoteliales parece ser que en la activación están implicados los receptores de M6P/IGFII (*Mannose-6-Phosphate/type II Insulinlike Growth Factor*) y de uPA (*urokinase Plasminogen Activator*) (Dennis y Rifkin, 1991).

Los efectos inmunosupresores del TGF- β se observan en los ratones *knock-out* para este gen. Estos ratones desarrollan una respuesta inflamatoria multifocal con una infiltración masiva de leucocitos en varios órganos, acompañada por un incremento en la expresión de TNF- α , IFN- γ , MIP-1 α , moléculas del MHC de clase I y de clase II. Estos ratones mueren a las 3-5 semanas del nacimiento. También se ha observado en estos

ratones altos niveles de autoanticuerpos circulantes y presentan depósitos de IgG en el glomérulo renal (Shull y col., 1990).

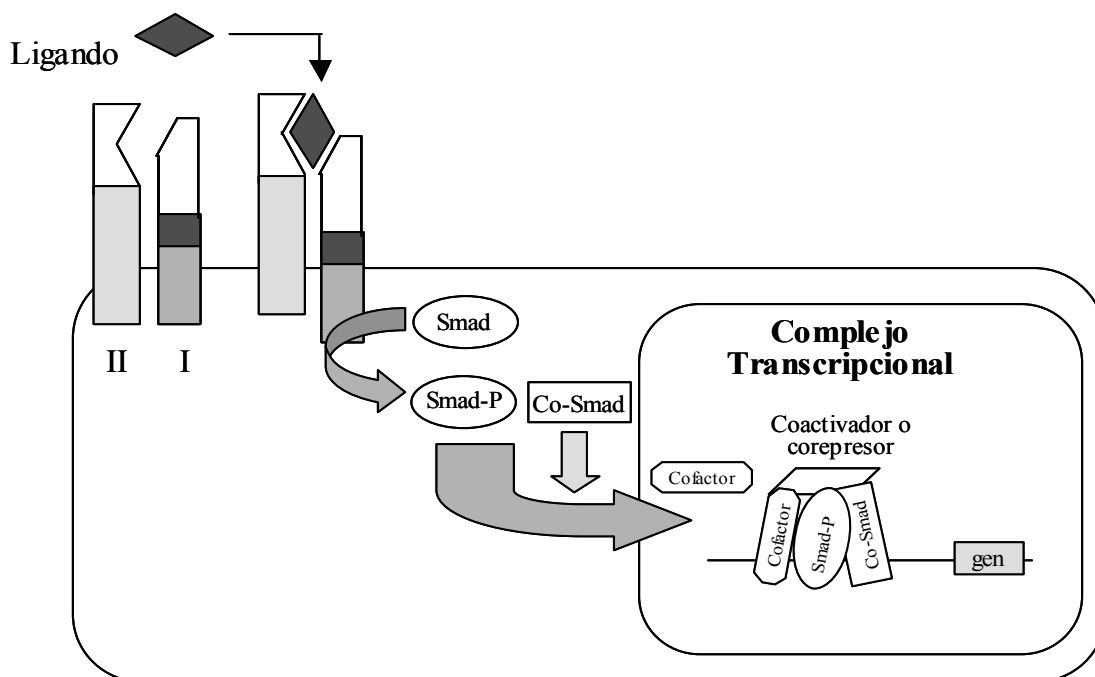


Figura 15. Transducción de la señal del TGF-β.

La transducción de la señal se da básicamente por la unión del TGF-β a dos receptores serina/treonina proteína quinasa denominados receptor I y receptor II, estos fosforilan a una familia de sustratos denominada smad o R-smad. La activación de estos permite su traslocación al núcleo y la unión a otras proteínas formando un complejo regulador de la transcripción. Hay un segundo grupo de proteínas denominadas co-smads que no son sustrato del receptor pero que son requeridas para la mayoría de las respuestas génicas inducidas por smads (Massagué y Chen, 2000) (Figura 15).

Una vez el complejo smad se une al ADN puede controlar la transcripción alterando la estructura del nucleosoma y remodelando la cromatina (Derynck y col., 1998). Smads y co-smads pueden unirse a un amplio grupo de coactivadores y corepresores para regular la respuesta transcripcional. La expresión de smad7 puede ser incrementada por vías que regulen negativamente la señal inducida por el TGF-β. Por ejemplo, el IFN-γ actúa vía JAK1 y STAT1 incrementando la expresión de smad7 (Ulloa y col., 1999) que a su vez inhibe la fosforilación de smad3 inducida por el TGF-β. Así, la inducción de smad7 por el IFN-γ es un mecanismo de transmodulación entre las vías de transducción de señal de STAT y smad, dándose un efecto antagónico entre el TGF-β y el IFN-γ en la regulación inmunitaria.

También se ha observado que las citocinas proinflamatorias TNF- α e IL1- β activan la expresión de smad7 a través del factor de transcripción NF κ B/RelA (Bitzer y col., 2000).

Objetivos

El objetivo principal de este trabajo es el estudio de la regulación de la expresión de los genes *tap1* y *Imp2* murinos, centrándonos de manera especial en los macrófagos como ejemplo de célula presentadora de antígeno. Para desarrollar este objetivo global, se ha abordado el estudio de los objetivos concretos que se detallan a continuación:

1. Regulación de la expresión de los genes *tap1* y *Imp2* mediada por el IFN- γ , el LPS y el TNF- α , como estímulos activadores de la respuesta inmunitaria.
2. Estudio del papel del factor de transcripción STAT1 en las vías de señalización.
3. Identificación de los elementos reguladores del promotor bidireccional de *tap1* y *Imp2*, implicados en la expresión de estos genes.
4. Estudio de otros factores que puedan modular la expresión de los genes *tap1* y *Imp2*.

Material y Métodos

1. REACTIVOS

Todos los reactivos químicos utilizados fueron de la máxima pureza (grado biología molecular). En todos los procesos, el término agua purificada se refiere a agua obtenida mediante el sistema de ósmosis inversa (Milli-Ro Plus) y purificada posteriormente por el sistema Milli-Q UF Plus (Millipore, Bedford, MA, EEUU). Esta agua está totalmente libre de ARNasas y materia orgánica incluyendo el LPS bacteriano y tiene una resistividad igual o superior a 18.2 mΩ. Todos los reactivos destinados al cultivo y/o tratamiento de las células fueron conservados y utilizados en condiciones estériles.

1.1. Obtención del M-CSF

El M-CSF necesario para la diferenciación y proliferación de macrófagos murinos se obtuvo del sobrenadante del cultivo de fibroblastos de ratón de la línea celular L929 (ATCC CCL 1, NCTC clon 929). Estas células producen grandes cantidades de M-CSF mientras proliferan. El M-CSF es el único factor de crecimiento que producen estas células capaz de estimular la proliferación y diferenciación de los macrófagos, ya que la obtención de macrófagos queda bloqueada tras añadir en el medio un anticuerpo monoclonal contra el M-CSF (Lokeshwar y Lin, 1988). Por este motivo, el sobrenadante resultante del cultivo de las células L929 también recibe el nombre de medio acondicionado para los macrófagos.

Las células L929 fueron sembradas en frascos de cultivo de 150 cm², a una densidad de 1x10⁶ células por frasco, y cultivadas en 40 ml de medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) rico en glucosa (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, EEUU), suplementado con un 5% de suero fetal bovino (Sigma Chem. Co.). El sobrenadante fue recogido al cabo de 7 días, momento en el que las células habían llegado a confluencia. Dicho sobrenadante fue centrifugado para eliminar las células en suspensión y conservado en alícuotas a -20°C hasta el momento de su utilización. Los sobrenadantes pueden conservarse en estas condiciones durante más de seis meses. Una vez descongeladas, las alícuotas fueron conservadas a 4°C para evitar la degradación del M-CSF debida a un exceso de ciclos de congelación-descongelación.

El contenido en M-CSF fue valorado mediante un ensayo de proliferación basado en la incorporación de timidina-H³ en los macrófagos de la médula ósea de ratón y comparado con un estándar en el que se utilizó el M-CSF recombinante. Mediante este ensayo se determinó que los niveles máximos de proliferación de los macrófagos se alcanzaban con un 30% del medio acondicionado, lo que es equivalente a 1200 U/ml de M-CSF recombinante.

1.2. Obtención del IFN- γ

Esta citocina se obtuvo a partir del sobrenadante del hibridoma de linfocitos T X63 transfectado con un constructo de expresión constitutiva capaz de producir elevadas cantidades de IFN- γ murino recombinante (X63-IFN- γ , amablemente cedido por el Dr. J. A. García, Basel Institut für Immunobiologie, Basel, Suiza).

Las células fueron cultivadas en DMEM rico en glucosa, suplementado con un 5% de suero fetal bovino, en presencia de 1 mg/ml de geneticina (G418; Sigma) como presión selectiva para asegurar la permanencia y transmisión del plásmido que codifica para el IFN- γ . Las células fueron mantenidas en frascos de 150 cm² hasta que llegaron a la confluencia, momento en que se les substituyó el medio por un volumen idéntico de medio fresco carente de geneticina. A las 48 horas, el sobrenadante fue retirado, centrifugado para eliminar células en suspensión y conservado en alícuotas a -80°C hasta el momento de su utilización. Una vez descongeladas, las alícuotas fueron conservadas a 4°C para evitar la degradación del IFN- γ debida a un exceso de ciclos de congelación/descongelación.

El contenido en IFN- γ fue determinado mediante un ensayo funcional en nuestro modelo biológico y comparándolo con la acción de IFN- γ recombinante (donado por Genentech Inc., San Francisco, CA, EEUU). Para ello, se obtuvieron los macrófagos derivados de la médula ósea de ratones C3H/HeJ y se los estimuló durante 48 h con diversas diluciones del sobrenadante con IFN- γ . Seguidamente, se extrajo el ARN total y se cuantificó mediante un ensayo de protección a las ARNsas la inducción del ARNm de I-A β , una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II de ratón, cuya expresión es inducida en los macrófagos por el IFN- γ (Celada y col., 1989). La máxima inducción obtenida fue de 30 veces. La cantidad de sobrenadante necesario para ello pudo equipararse a 300 U/ml de IFN- γ recombinante, dado que ésta es la dosis capaz de producir una saturación de los receptores para el IFN- γ presentes en la superficie de los macrófagos (Celada y col., 1984). Además, se añadió un anticuerpo monoclonal contra el IFN- γ (Schreiber y col., 1985), el cual inhibió completamente la capacidad de inducción de I-A β por el sobrenadante de las células X63-IFN- γ , demostrando que el IFN- γ es la única citocina producida por estas células capaz de inducir la expresión de I-A β en macrófagos.

1.3. LPS

El LPS fue obtenido de *Escherichia coli* (serotipo 0127:B8) (Sigma, referencia L-3129). Posteriormente fue disuelto en PBS y esterilizado por filtración con filtros Millex-GS de 0.22 μm (Millipore). Para excluir un efecto debido a posibles contaminantes el LPS de origen comercial se comparó al purificado donado amablemente por el Dr. C. Galanos (Max Planck Institute, Freiburg, Alemania) (Merlin y col., 2001).

1.4. TNF- α

Se utilizó TNF- α humano obtenido de origen comercial (Peprotech EC LTD, London, referencia 300-01A). La actividad del TNF- α se determinó por la citólisis provocada en presencia de actinomicina D en las células L929.

1.5. IFN- α/β

El IFN- α/β de origen comercial fue obtenido a partir de la línea celular L929 por estimulación con poly I:C (Sigma, referencia 59640).

1.6. TGF- β

El TGF- β 1 recombinante humano de origen comercial fue producido en una línea celular de ovario de hámster chino (CHO) transfectada con un plásmido recombinante que codificaba para una proteína precursora del TGF- β 1 (Pharmacia Biotech., Uppsala, Suecia). La proteína activa TGF- β 1 fue aislada del medio condicionado y purificada por cromatografía secuencial. El TGF- β 1 fue reconstituido con acetonitrilo acuoso (25 %) y ácido trifluoroacético (TFA, 0.1 %), esterilizado por filtración (0.22 μm) y alíquotado a -20°C .

1.7. Dexametasona

La dexametasona se obtuvo encapsulada en ciclodextrina siendo así soluble en agua (Sigma, referencia D2915).

1.8. Antibióticos

Las líneas celulares utilizadas fueron mantenidas sin antibióticos en sus medios correspondientes exceptuando las líneas transfectadas, en las que se añadía al medio 10 U/ μ l de penicilina y 10 mg/ml de estreptomicina (Sigma). En los cultivos bacterianos, tanto sólidos como líquidos, se utilizó 50 μ g/ml de ampicilina (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, EEUU) o de sulfato de Kanamicina (Fluka Chemie AG, Buchs, Suiza). La ampicilina se disolvió en agua y se esterilizó por filtración (0.22 μ m).

1.9. Células

1.9.1. Líneas celulares

1.9.1.1. Fibroblastos

Se utilizó la línea celular L929 (ATCC CCL 1, NCTC clon 929) que es una línea fibroblástica subclonada a partir de la Línea L, la cual fue generada en 1940 por W. R. Earle a partir de tejido adiposo subcutáneo de un ratón C3H/An. Esta línea se cultivó en DMEM rico en glucosa y suplementado con 10% de suero fetal bovino de complementado (Gibco BRL, Life technologies, Gaithersburg, MD), a 37°C y 5 % CO₂.

1.9.1.2. Macrófagos

Se utilizó la línea celular Raw 264.7 (ATCC: TIB-71). Esta línea es de tipo macrofágico y se generó a partir de ratones Balb/c, por transformación con el virus de la leucemia murina de Abelson, tiene capacidad fagocítica y también lítica dependiente de anticuerpo. Esta línea se cultivó en DMEM rico en glucosa y suplementado con 10% de suero fetal bovino de complementado (Gibco BRL), a 37°C y 5% CO₂.

1.9.2. Obtención y Cultivo de Macrófagos Murinos derivados de la Médula Ósea

Los macrófagos murinos fueron obtenidos a partir de la médula ósea de los fémures de ratones Balb/c (CRIFFA, Sta. Perpetua de la Mogoda, Barcelona) tal como ha sido descrito

anteriormente (Celada y col., 1984). Los ratones de 6 a 8 semanas fueron sacrificados por dislocación cervical. Se extrajeron los fémures de estos ratones y se eluyó la médula ósea con medio de cultivo DMEM. Para evitar los efectos de la variabilidad entre ratones independientes, varias médulas óseas fueron recogidas en una misma placa, disgregadas, y repartidas en placas de Petri para bacteriología (60-150 mm de diámetro, según el experimento a realizar) (Rubilabor, Rubí, España).

Las células obtenidas fueron cultivadas en DMEM rico en glucosa, suplementado con un 20 % de suero fetal bovino y un 30 % de medio acondicionado para macrófagos. El cultivo de las células se llevó a cabo en un ambiente saturado de humedad con CO₂ al 5 % y a una temperatura constante de 37°C. Al tercer día de cultivo ya se puede observar un cambio en la morfología celular y un aumento de la adherencia a la superficie de la placa, debido a la diferenciación de los precursores de la médula ósea hacia la línea macrofágica. Las células fueron cultivadas hasta llegar a un estado de subconfluencia (5-6 días), momento en que se extrajo el medio y se restituyó por medio nuevo antes de iniciar las estimulaciones. Es importante destacar que dado que los macrófagos se adhieren al plástico de la placa de petri, no es necesario recoger las células cada vez que se cambian las condiciones del medio de cultivo.

Alternativamente, también se obtuvieron macrófagos derivados de la médula ósea de ratones de la cepa C57/BL6 (ratones *wild type*) y de ratones de esta misma cepa homocigóticos para una mutación en el gen que codifica la proteína STAT-1 (ratones *knock out stat-1*), los cuales fueron amablemente cedidos por el Dr. Robert D. Schreiber (Department of Pathology, Washington University School of Medicine, St. Louis, Missouri) (Meraz y col, 1996).

Los ratones *knock out* para el receptor del TNF fueron amablemente cedidos por el Dr. Manuel Modolell (Max Planck Institute, Freiburg, Alemania) (Rothe y col., 1993).

1.10 Sondas

1.10.1. Sonda tap1

La sonda tap1 se construyó clonando un fragmento de 199 pb obtenido por RT-PCR a partir de 1 µg de ARN de macrófagos de la línea celular WR19 activados con IFN-γ durante 24 horas y utilizando los cebadores AAC CCT GTC TCC TGG CGA AG y GCC GCA TCA CTG ACT GGA TT. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: tras una primera desnaturalización a 94°C durante 3 minutos, se realizaron 35 ciclos de amplificación consistiendo cada uno de ellos en una desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, un anillamiento a 55°C durante 1 minuto y

una elongación a 72°C durante 1 minuto. Tras el último ciclo, la fase de elongación a 72°C se mantuvo durante 7 minutos. El producto de PCR fue clonado y secuenciado comprobándose que la secuencia coincide en un 100 % con la publicada previamente (Kishi y col., 1993).

1.10.2. Sonda Imp2

La sonda para Imp2 se obtuvo mediante amplificaciones de un fragmento de 560 pb obtenido por RT-PCR a partir de 1 µg de ARN de macrófagos de la línea celular WR19 activados con IFN-γ durante 24 horas y utilizando los cebadores: CAT GGC AGT GGA GTT TGA CG y CCA GGA TGA CTC GAT GGT CC. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: tras una primera desnaturalización a 94°C durante 3 minutos, se realizaron 35 ciclos de amplificación consistiendo cada uno de ellos en una desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, un anillamiento a 57°C durante 1 minuto y una elongación a 72°C durante 1 minuto. Tras el último ciclo, la fase de elongación a 72°C se mantuvo durante 7 minutos. El producto de PCR fue clonado y secuenciado comprobándose que la secuencia coincide en un 100 % con la publicada previamente (Kishi y col., 1993).

1.10.3. Sonda ARNr 18S

Se obtuvo mediante la digestión con el enzima EcoRI del vector Bluescript KS que contenía un fragmento de 212 pb del ADNc de la subunidad 18S del ARNr (Torczynski y col, 1983).

1.10.4. Sonda L32

El vector pGEM-L32 está constituido por el vector pGEM1, que presenta resistencia a la ampicilina, más un inserto en la diana SacI de 1600 pb del pseudogen de la proteína ribosomal L32-4 (Dudov y Perry, 1984). A partir de este vector digerido con HindIII y posteriormente religado se obtuvo un plásmido de menor tamaño con un inserto de 1062 pb del gen de la proteína ribosomal de ratón L32-4 (pseudogen). El inserto para la obtención de la sonda L32 puede ser aislado mediante la digestión de esta segunda construcción con EcoRI y HindIII.

1.10.5. Sonda I-Aα

La construcción pGEM3/I-Aα contiene un fragmento del ADNc de I-Aα, uno de los genes del MHC de clase II del ratón. Esta construcción fue obtenida en nuestro laboratorio a partir de

una construcción previa (pCDM8/I- α), amablemente cedida por el Dr. P. Cosson (Basel Institute for Immunobiologie, Basel, Suiza).

1.10.6 Sonda IL-1 β

La construcción pGEM1/IL-1 β contiene un fragmento del ADNc de la interleucina IL-1 β de ratón (290 pb) clonado entre las dianas PstI y EcoRI del plásmido pGEM1. Este plásmido fue cedido amablemente por la Dra. R. Wilson (Glaxo Research and Dev. Limited, Greenford, UK).

1.10.7. Sonda PU.1

Se obtuvo a partir de la construcción pKS-PU.1 que contiene el ADNc completo del gen PU.1 insertado en una diana EcoRI (Klemsz y col., 1990).

1.11. Plásmidos

1.11.1. Vector pGL3-Basic

Los vectores pGL3 están diseñados principalmente para el análisis cuantitativo de los factores que potencialmente regulan la expresión génica en los mamíferos. Estos factores pueden ser *cis*-activadores, tales como los promotores y los amplificadores, o *trans*-activadores, como son los factores de unión al ADN.

El vector pGL3-basic (Promega Corp., Madison, WI, EEUU) carece de promotor eucariota y de secuencias amplificadoras o *enhancer*, permitiendo la máxima flexibilidad en el clonaje de hipotéticas secuencias reguladoras de la transcripción. Este vector presenta una secuencia modificada del ADNc del gen de la luciferasa de *Photinus pyralis*, designada como luc+. La expresión de luciferasa en las células transfectadas depende de la inserción y orientación del promotor, que puede clonarse en la región de restricción múltiple. Los elementos amplificadores que se desean estudiar pueden ser clonados en las dianas BamHI y Sall que se encuentran en la zona 3' del gen de la luciferasa. El mapa con todas las características del vector pGL3-Basic se muestra en la figura 16.

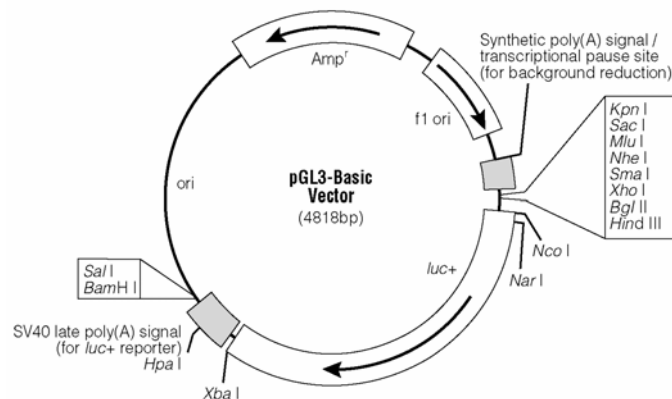


Figura 16. Mapa del vector pGL3-basic. Este vector contiene un polylinker con dianas únicas de restricción como son Kpn I, Sac I, Mlu I, Nhe I, Sma I, Xho I, Bgl II y Hind III. En el polylinker se inserta correctamente la región promotora delante del gen indicador de la luciferasa (*luc*). Las dianas Sal I y Bam HI permiten clonar secuencias *enhancer*.

1.11.2. Vector pGL3-control

El vector pGL3-control contiene el promotor SV40 y secuencias *enhancer*, dando una expresión elevada del gen de la luciferasa en muchos tipos celulares. Este plásmido es muy útil para determinar la eficiencia de la transfección y como control positivo en los ensayos de transfección.

1.11.3. Vector pGL3-BOS

El vector pGL3-control fue modificado porque el promotor SV40 no es muy potente para ser utilizado como control de transfección en los macrófagos. Por esta razón, se reemplazó este promotor por el del factor de elongación EF-1 α , también denominado promotor BOS, debido a su elevada expresión. Para realizar esta construcción se extrajo el promotor BOS del vector pEF-BOS (Mizushima y Nagata, 1990) digiriendo su inserción con los enzimas HindIII y EcoRI y se clonó en el vector pKS+ (Stratagene, La Jolla, CA, EEUU). De este vector se extrajo el promotor digiriendo con los enzimas KpnI y BamHI y se clonó en el vector pGL3-basic a través de las dianas KpnI y BglIII (compatible con BamHI).

1.11.4. Vector pRL-CMV

Los vectores de la familia pRL tienen la característica de presentar el ADNc de la luciferasa de *Renilla reniformis*. El vector pRL-CMV contiene la región promotora del CMV dando una expresión constitutiva de la luciferasa de Renilla en varios tipos celulares.

1.11.5. Vector pRL-BOS

El vector pRL-CMV fue modificado porque el promotor CMV no es muy potente para ser utilizado como control de transfección en los macrófagos. Por ello se cambió el promotor CMV por el promotor BOS. Se obtuvo el vector pRL-BOS a partir de la eliminación del promotor CMV del vector pRL-CMV digiriendo el vector con BglII y PstI, extrayendo la banda de 3200 pb correspondiente al vector. El promotor BOS fue extraído del constructo pGL3-BOS, mediante las dianas HindIII-HindIII, purificado y romado. Se ligaron ambos fragmentos con el enzima T4 ligasa (Boehringer Mannheim).

1.11.6 Vector pcDNA3Bos-PU.1

A partir del vector pKS-PU.1 digerido con el enzima EcoRI recuperamos el fragmento de ADN que contiene la secuencia del gen PU.1. Este fragmento se clonó en un vector pcDNA3 que contenía el promotor del factor de elongación EF-1 α , también denominado promotor BOS. El vector pcDNA3 con el promotor BOS se obtuvo a partir del vector pEF-BOS (Mizushima y Nagata, 1990) digerido con HindIII y XbaI para obtener el promotor BOS que se clonó en el vector pcDNA3 digerido con las mismas dianas. Posteriormente se extrajo el promotor del CMV mediante las dianas NruI y HindIII. El vector pcDNA3 presenta el gen de la neomicina para poder realizar transfecciones estables.

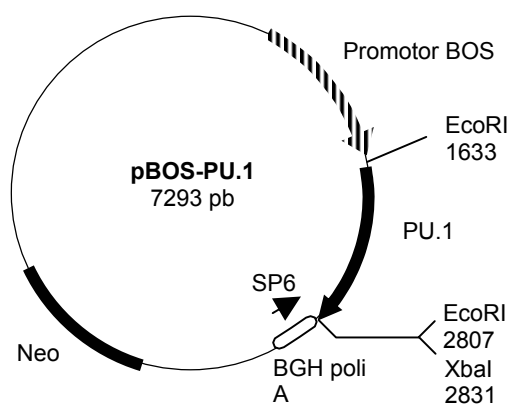


Figura 17. Mapa del vector pBOS-PU.1. Este vector contiene el ADNc completo del factor PU.1, el promotor BOS y el gen de la neomicina.

1.11.7. Vector pCR2.1

El vector pCR2.1 del *TA Cloning Kit* (Invitrogen, San Diego, CA, EEUU) está diseñado para clonar productos de PCR. El pCR2.1 presenta un residuo de timidina en cada extremo del vector. El enzima Taq polimerasa añade un residuo de adenosina al final de la secuencia amplificada durante la reacción de PCR. La asociación entre los productos de PCR y el vector pCR2.1 se debe al reconocimiento entre los residuos de timidina y adenosina.

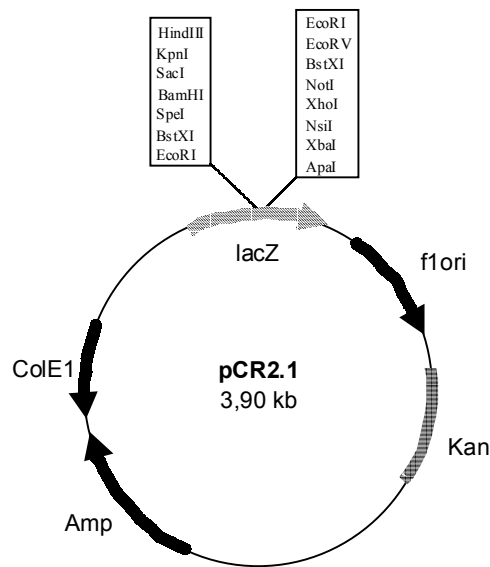


Figura 18. Mapa del vector pCR2.1. Este vector permite la clonación de productos amplificados por PCR.

La cantidad de producto de PCR necesaria para la unión con 50 ng de vector pCR2.1 en una relación molar 3:1 fue determinada mediante la siguiente ecuación:

$$X \text{ (ng de producto de PCR)} = \frac{3 \times (\text{tamaño en pb de la PCR}) \times (50\text{ng de vector})}{(3900 \text{ pb del vector})}$$

La reacción de ligación entre el inserto y el vector se realizó a 14°C durante 12-16 horas, utilizando el tampón de ligación (Tris-HCl 60mM a pH 7.5, MgCl₂ 60mM, NaCl 50mM, DTT 20mM, ATP 1mM, BSA 1mg/ml, β-mercaptoetanol 70mM, espermidina 10mM) y 4 U del enzima T4 ADN ligasa.

A continuación, se transformaron las bacterias competentes del TA Cloning Kit con los productos de ligación mediante el procedimiento del choque térmico. Se utilizaron 2 μ l de la ligación, junto con β -mercaptoetanol (15 mM) y se mezclaron con las bacterias competentes. Se incubó la mezcla durante 30 minutos en hielo. Después se incubó 30 segundos a 42°C y finalmente se incubó 2 minutos en hielo antes de añadir 500 ml de medio de cultivo 2xYT (bacto-triptona 16 g/l, extracto de levadura 10 g/l, NaCl 5 g/l, a pH 7). Las bacterias se incubaron en un agitador rotatorio a 37°C durante 1 hora. Pasado este tiempo, se sembró una alícuota de las bacterias en una placa de petri preparada con medio de cultivo LB (bacto-triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 10 g/l, a pH 7), solidificado con 1.5% de agar y suplementado con 50 μ g/ml de ampicilina y con 1 mg de 5-Br-4-Cl-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-gal). Las placas de petri inoculadas fueron incubadas durante 12-14 horas a 37°C.

La existencia de ampicilina permitió la selección de las bacterias transformadas con el vector pCR2.1, ya que contiene un gen de resistencia a dicho antibiótico. Además, la adición de X-gal a las placas permitió la diferenciación de las colonias transformadas con el vector ligado a un producto de PCR frente a las transformadas con el vector religado. Esto se debe a que el punto de inserción en el vector pCR2.1 del producto de PCR, destruye la integridad del gen *lacZ* que codifica para el enzima β -galactosidasa.

Las bacterias competentes no expresan el represor *lac*, por lo que no fue necesario el uso de isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) para la activación del promotor *lac*. Las colonias transformadas con el vector religado presentaron color azul, debido a la conversión del X-gal en un producto azul (5-Br-4-Cl-3-indolil) debido a la acción de la β -galactosidasa. A continuación se tomaron 12 colonias blancas de cada placa y se crecieron en medio 2xYT líquido, suplementado con 50 mg/ml de ampicilina o kanamicina durante 14 horas a 37°C.

1.11.8. Vector pGEM-T

El vector pGEM-T (Promega Corp., Madison, WI, EEUU) se utilizó para el clonaje de los productos resultantes de la PCR y tiene las mismas adaptaciones que el pCR2.1. Este vector se utilizó para el clonaje de las sondas *tap1* y *Imp2*, obtenidas por RT-PCR.

1.11.9. Vectores pGL3-*tap1* y pGL3-*Imp2*

Para la obtención de estos dos vectores primero se amplificó por PCR la secuencia de 1007 pb del promotor bidireccional de los genes murinos *tap1* y *Imp2* descrita por Kishi y colaboradores (1993). Para esto, se extrajo ADN genómico de la línea celular L929, se cortaron

30 µg de ADNg con 30 U del enzima EcoRI (Boehringer Mannheim) en presencia del tampón M, durante 2 horas a 37°C, y con un volumen final de 100 µl. Se realizó una extracción fenólica y posterior precipitación, dejando el ADNg a una concentración de 1 mg/ml. La reacción de PCR se realizó en presencia de 1 µg de ADNg, 0.3 mM de deoxinucleótidos (Boehringer Mannheim), tampón de PCR, 0.13 U/µl de *Taq expand high fidelity PCR system* (Boehringer Mannheim) y 2 µM de cada cebador (PTL-1 y PTL-2, Boehringer Mannheim):

PTL-1: TGT CTC CAG CGT CCC TGT TGC

PTL-2: ATC TCA GCA GAG GCG GCT CG

Las condiciones de PCR fueron las siguientes: tras una primera desnaturalización a 94°C durante 3 minutos, se realizaron 35 ciclos de amplificación consistiendo cada uno de ellos en una desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, un anillamiento a 62°C durante 1 minuto y una elongación a 72°C durante 2 minutos y treinta segundos. Tras el último ciclo, la fase de elongación a 72°C se mantuvo durante 15 minutos.

El producto de amplificación de 1010 pb se clonó en un vector pCR2.1, obteniéndose el promotor en ambas direcciones. Posteriormente se cortó este vector con los enzimas SpeI y EcoRV, recuperándose del gel de agarosa el fragmento que correspondía al promotor y se clonó en el vector pGL3 basic previamente cortado con los enzimas SmaI y NheI (compatible con SpeI) y purificado con las columnas Microspin S-200 HR (Amersham). Los dos plásmidos obtenidos se denominaron pGL3-tap1⁽¹⁰¹⁰⁾ y pGL3-Imp2⁽¹⁰¹⁰⁾ en función de la direccionalidad y se secuenciaron con unos cebadores de secuencia nucleotídica presente en el vector pGL3-basic:

RV3: CTA GCA AAA TAG GCT GTC CC

GL2: CTT TAT GTT TTT GGC GTC TTC CA

dando una homología con la secuencia descrita casi total, exceptuando 3 guanidinas que posteriormente fueron descritas junto con un nuevo inicio de traducción distinto para el gen tap1 (Marusina y col., 1997). Este nuevo inicio de traducción reducía la región promotora a 571 pb en lugar de la descrita con anterioridad. Así, se amplificó de nuevo el promotor tap1-Imp2 a partir de 100 ng del plásmido pGL3-Imp2⁽¹⁰¹⁰⁾, 0.2 µM de cada cebador (PTL2 y PTL3: CGA GCG TGA GCT GTC CAG AGT CTG G), 0.1 mM de deoxinucleótidos, tampón de PCR y 0.035 U/µl de *Taq expand high fidelity PCR system*. Las condiciones de PCR utilizadas en esta ocasión fueron las siguientes: tras una primera desnaturalización a 94°C durante 1 minuto y 30 segundos, se realizaron 30 ciclos de amplificación consistiendo cada uno de ellos en una desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, un anillamiento a 50°C durante 1 minuto y una elongación a 72°C durante 1 minutos. Tras el último ciclo, la fase de elongación a 72°C se mantuvo durante 2 minutos.

De esta manera se obtuvo la nueva secuencia promotora descrita. El producto de la amplificación se clonó en un vector pCR2.1 y posteriormente en el vector pGL3 basic obteniéndose así los vectores pGL3-Imp2 y pGL3-tap1.

1.11.10. Vectores pGL3-GAS1tap y pGL3-GAS1Imp

Estos vectores se diseñaron para el estudio de la funcionalidad de la posible caja GAS1 presente en el promotor tap1-Imp2 (Figura 19). Para ello se realizaron experimentos de mutagénesis dirigida siguiendo el esquema presente en la figura 18. El primer fragmento se amplificó a partir de 100 ng del plásmido pGL3-Imp2, 0.2 μ M de cada cebador (PTL3 y GAS1lower: GTT TCT TCC CCA GAT CTA CGC CAG CAC), 0.1 mM de deoxinucleótidos, tampón de PCR y 0.035 U/ μ l de *Taq expand*. Las condiciones de PCR utilizadas fueron una primera desnaturalización a 94°C durante 1 minuto y 30 ciclos de amplificación consistiendo cada uno de ellos en una desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, un anillamiento a 58°C durante 30 segundos y una elongación a 72°C durante 30 segundos. Tras el último ciclo, la fase de elongación a 72°C se mantuvo durante 1 minuto. Se obtuvo un producto de PCR de 177 pb, el cual fue digerido con el enzima BgIII presente en el cebador GAS1lower para así mutar la caja GAS1.

El segundo fragmento se amplificó a partir de 100 ng del plásmido pGL3-Imp2, 0.2 μ M de cada cebador (PTL2 y GAS1upper: TGG CGT AGA TCT CCC GAA GAA ACC GAA AGC), 0.1 mM de deoxinucleótidos, tampón de PCR y 0.035 U/ μ l de *Taq expand*. Las condiciones de PCR utilizadas fueron las siguientes: tras una primera desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, se realizaron 30 ciclos de amplificación consistiendo cada uno de ellos en una desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, un anillamiento a 50°C durante 1 minuto y una elongación a 72°C durante 1 minuto. Tras el último ciclo, la fase de elongación a 72°C se mantuvo durante 2 minutos, obteniéndose un fragmento de 417 pb que también fue digerido con el enzima BgIII. Ambos fragmentos se purificaron mediante columnas Microspin S-200 HR y se ligaron. El producto obtenido de la ligación de los fragmentos 417 pb y 177 pb fue amplificado con los cebadores de los extremos del promotor, PTL-2 y PTL-3, utilizando las mismas condiciones antes mencionadas. El producto de la amplificación se clonó en un vector pCR2.1 obteniéndose la inserción en ambas direcciones. Posteriormente los dos vectores fueron digeridos con SpeI y EcoRV, recuperándose los insertos en un gel de agarosa y clonándose en el vector pGL3-basic previamente digerido con NheI y SmaI y purificado por columna. Así se obtuvieron los vectores pGL3-GAS1tap y pGL3-GAS1Imp, ambos con la caja GAS1 mutada.



Figura 19. Secuencia nucleotídica del promotor bidireccional tap1-imp2 murino. Aparecen en recuadro las posibles cajas GAS, IRF, NFκB y AP.1. Los oligos utilizados para la amplificación del promotor y los inicios de transcripción ya descritos aparecen en color.

1.11.11. Vectores pGL3-GAS2tap y pGL3-GAS2Imp

Estos vectores se diseñaron con el fin de determinar la importancia funcional de la posible caja GAS2 presente en el promotor tap1-Imp2 (Figura 19). Para ello se realizaron también experimentos de mutagénesis dirigida.

El primer fragmento se amplificó a partir de 100 ng del plásmido pGL3-Imp2, 0.2 μ M de cada cebador (PTL3 y GAS2lower: CGG CAG CAG CTA GCA CAG CCT GAG CAA GC), 0.1 mM de deoxinucleótidos, tampón de PCR y 0.035 U/ μ l de *Taq expand*. Las condiciones de PCR utilizadas fueron una primera desnaturalización a 94°C durante 1 minuto y 30 segundos y se realizaron 30 ciclos de amplificación consistiendo cada uno de ellos en una desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, un anillamiento a 55°C durante 1 minuto y una elongación a 72°C durante 1 minuto. Tras el último ciclo, la fase de elongación a 72°C se mantuvo durante 2 minutos. Se obtuvo así un producto de PCR de 251 pb.

Posteriormente este fragmento de 251 pb y el fragmento de 338 pb, creado por PCR a partir de las mismas condiciones y con los cebadores PTL2 y GAS2upper: CTG TGC TAG CCG CTG CCG CTG AAG CT, y purificados ambos de un gel de agarosa se utilizaron como molde para la amplificación del promotor entero. Para esta última amplificación se utilizaron los cebadores de los extremos, PTL-2 y PTL-3, y las mismas condiciones antes mencionadas pero con una temperatura de anillamiento de 60°C. El producto de la amplificación se clonó en un vector pCR2.1 obteniéndose la inserción en ambas direcciones. Posteriormente los dos vectores fueron digeridos con *SpeI* y *EcoRV*, se recuperaron los insertos en un gel de agarosa y se clonaron en el vector pGL3-basic previamente digerido con *NheI* y *SmaI* y purificado por columna. Así se obtuvieron los vectores pGL3-GAS2tap y pGL3-GAS2Imp, ambos con la caja GAS2 mutada. Los cebadores fueron diseñados de manera que la caja GAS2 mutada presentase el enzima *NheI* para posterior comprobación.

1.11.12. Vectores pGL3-IRF1tap y pGL3-IRF1Imp

Estos vectores se diseñaron con el fin de determinar la importancia funcional de la posible caja IRF-1 presente en el promotor de tap1-Imp2 (Figura 19). Para ello se realizaron, como anteriormente, experimentos de mutagénesis dirigida.

El primer fragmento se amplificó a partir de 100 ng del plásmido pGL3-Imp2, 0.2 μ M de cada cebador (PTL3 y IRF1lower: CGA GGT CGT GGC TAG CGT GCT TCT TCC TCT), 0.1 mM de deoxinucleótidos, tampón de PCR y 0.035 U/ μ l de *Taq expand*. Las condiciones de PCR

utilizadas fueron las mismas que en el apartado anterior obteniéndose un producto de PCR de 192 pb.

El segundo fragmento se obtuvo con las mismas condiciones y con los cebadores PTL2 e IRFupper: GAA GAA GCA CGC TAG CCC CGA CCT CGA A. El tamaño del fragmento era de 405 pb. Para la última amplificación se utilizaron los cebadores de los extremos, PTL-2 y PTL-3, y las mismas condiciones antes mencionadas pero con una temperatura de anillamiento de 60°C. El producto de la amplificación se clonó en un vector pCR2.1 obteniéndose la inserción en ambas direcciones. Posteriormente los dos vectores fueron digeridos con SpeI y EcoRV, se recuperaron los insertos en un gel de agarosa y se clonaron en el vector pGL3-basic previamente digerido con NheI y SmaI y purificado por columna. Así se obtuvieron los vectores pGL3-IRFtap y pGL3-IRFImp, ambos con la caja IRF-1 mutada. Los cebadores fueron diseñados de manera que la caja IRF-1 mutada presentase el enzima NheI para su posterior comprobación

1.11.13. Vectores pGL3-NFκBtap y pGL3-NFκBImp

Estos vectores se diseñaron para el estudio de la funcionalidad de la caja NFκB presente en el promotor tap1-Imp2 (Figura 19). Para ello se realizaron experimentos de mutagénesis dirigida.

El primer fragmento se amplificó a partir de 100 ng del plásmido pGL3-Imp2, 0.2 μM de cada cebador (PTL3 y NFκBlower: CGG GTA AGC TAG CCT ATT CGC GCA CGC CC), 0.1 mM de deoxinucleótidos, tampón de PCR y 0.035 U/μl de *Taq expand*. Las condiciones de PCR utilizadas fueron una primera desnaturalización a 94°C durante 1 minuto y 30 ciclos de amplificación consistiendo cada uno de ellos en una desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, un anillamiento a 61°C durante 30 segundos y una elongación a 72°C durante 30 segundos. Tras el último ciclo, la fase de elongación a 72°C se mantuvo durante 2 minutos. Así se obtuvo un producto de PCR de 125 pb, el cual fue digerido con el enzima NheI presente en el cebador NFκBlower para así mutar la caja NFκB.

El segundo fragmento se amplificó a partir de 100 ng del plásmido pGL3-Imp2, 0.2 μM de cada cebador (PTL3 y NFκBupper: GCG CAG CTA GCA CCG TTCA CCC GCT CGA), 0.1 mM de deoxinucleótidos, tampón de PCR y 0.035 U/μl de *Taq expand*. Las condiciones de PCR utilizadas fueron las mismas que las citadas anteriormente para los cebadores PTL3 y NFκBlower, obteniéndose un fragmento de 469 pb que también fue digerido con el enzima NheI. Ambos fragmentos se purificaron mediante columnas Microspin S-200 HR y se ligaron.

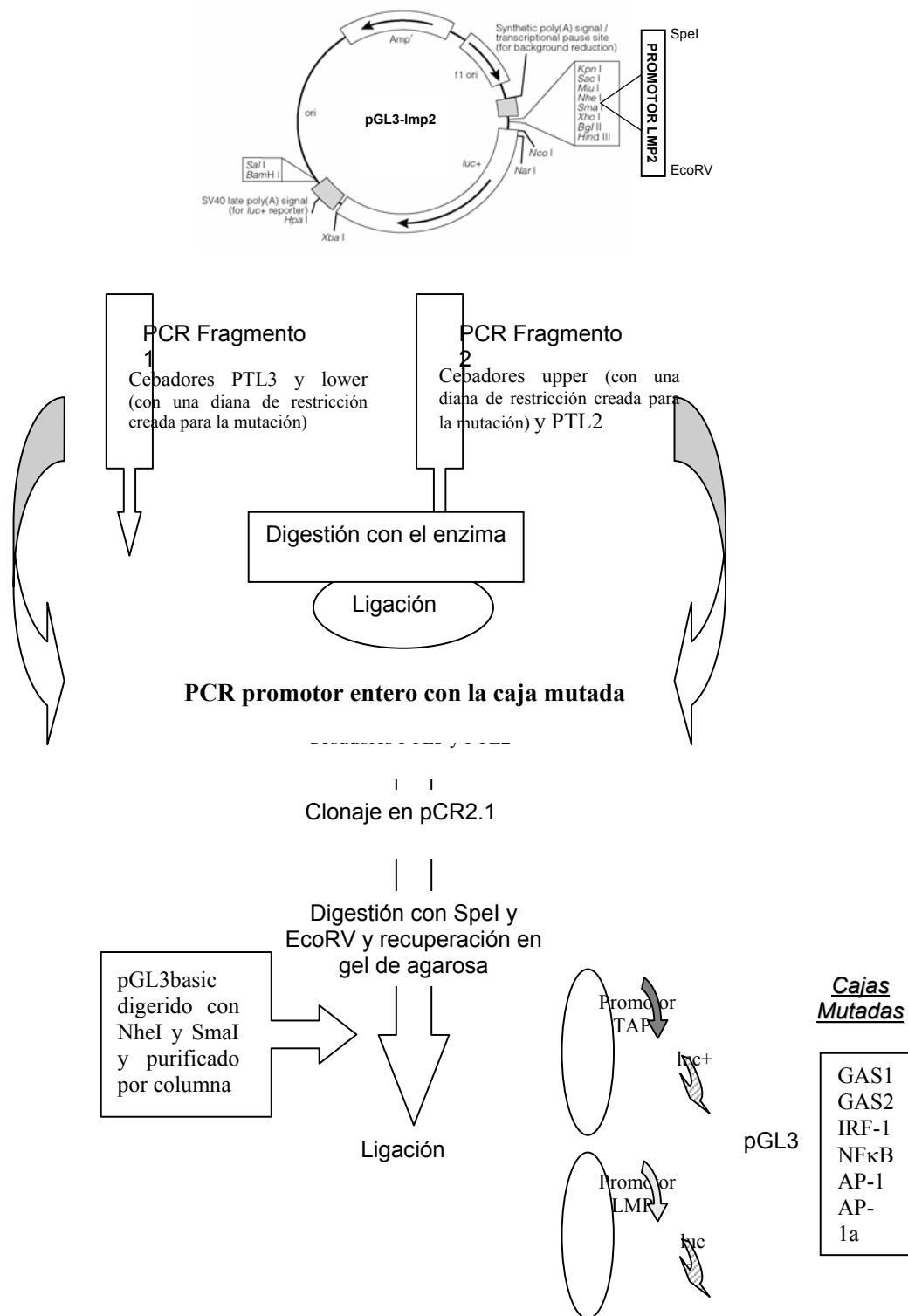


Figura 20. Estrategias de clonación de los plásmidos pGL3-lmp2 y pGL3-tap1 con las cajas GAS1, GAS2, IRF-1, NFκB, AP-1, AP-1a, indicadas en la figura 19, mutadas.

El producto obtenido de la ligación de los fragmentos 125 pb y 469 pb fue amplificado con los cebadores de los extremos del promotor, PTL-2 y PTL-3, utilizando las mismas condiciones mencionadas en este apartado. El producto de la amplificación se clonó en un vector pCR2.1 obteniéndose la inserción en ambas direcciones. Posteriormente los dos vectores fueron digeridos con SpeI y EcoRV, recuperándose los insertos en un gel de agarosa y clonándose en el vector pGL3-basic previamente digerido con NheI y SmaI y purificado por columna. Así se obtuvieron los vectores pGL3-NF κ Btap y pGL3-NF κ BImp, ambos con la caja NF κ B mutada. Para estos plásmidos se utilizó esta estrategia de clonación, ya que con la amplificación directa de los productos de PCR, sin previa restricción y ligación, no se obtuvo la caja mutada, posiblemente debido a que la secuencia nucleotídica de la caja NF κ B es mayor que la de las otras cajas antes mencionadas.

1.11.14. Vectores pGL3-AP1tap y pGL3-AP1Imp

Estos vectores se diseñaron con el fin de determinar la importancia funcional de la posible caja AP1 presente en el promotor tap1-Imp2 (Figura 19). Para ello se realizaron experimentos de mutagénesis dirigida para la caja AP1 con los cebadores PTL3 y AP1lower: AGC ACT TGC TAG CCG CTC CAC CAG CT, obteniéndose un producto de PCR de 155 pb y los cebadores PTL2 y AP1upper: GGT GGA GCG GCT GCT AGC AAG TGC TGG CGT T, dando un fragmento de 438 pb.

Al final se obtuvieron los vectores pGL3-AP1tap y pGL3-AP1Imp, ambos con la caja AP1 mutada. Los cebadores fueron diseñados de manera que la caja AP1 mutada presentase el enzima NheI.

1.11.15. Vectores pGL3-AP1a tap y pGL3-AP1a Imp

Estos vectores se diseñaron a fin de determinar la importancia funcional de la otra posible caja AP1, que se denominó AP1a para diferenciarla de la anterior descrita, presente en el promotor tap1-Imp2 (Figura 19). Para ello se volvieron a realizar experimentos de mutagénesis dirigida.

El primer fragmento se amplificó con las mismas condiciones que en el apartado anterior pero con una temperatura de anillamiento de 60°C y con los cebadores PTL3 y AP1alower: CCA GAG ACA CGC TAG CTC AGA GGG TCC. Se obtuvo así un producto de PCR de 421 pb.

Posteriormente este fragmento de 421 pb y el fragmento de 173 pb, creado mediante PCR a partir de las mismas condiciones y con los cebadores PTL2 y AP1aupper: CCT CTG AGC TAG CGT GTC TCT GGG CA, y purificados ambos de un gel de agarosa se utilizaron como molde para la amplificación del promotor entero. Para esta última amplificación se utilizaron los cebadores de los extremos, PTL-2 y PTL-3, y las mismas condiciones antes mencionadas. El producto de la amplificación se clonó en un vector pCR2.1 obteniéndose la inserción en ambas direcciones. Posteriormente los dos vectores fueron digeridos con Spel y EcoRV, se recuperaron los insertos en un gel de agarosa y se clonaron en el vector pGL3-basic previamente digerido con NheI y SmaI y purificado por columna. Así se obtuvieron los vectores pGL3-AP1a tap y pGL3-AP1a Imp, ambos con la caja AP1.a mutada. Los cebadores fueron diseñados de manera que la caja AP1.a mutada presentase el enzima NheI.

2. METODOLOGÍA

2.1. Extracción del ARN total

En los métodos de extracción de ARN que se utilizaron, las soluciones y los materiales estaban totalmente libres de ARNasas. Por ello, se trataron todos los recipientes con NaOH 0.2M por un tiempo mínimo de 15 minutos y posteriormente fueron lavados con agua milliQ libre de ARNasas. Se utilizaron guantes durante todo el proceso de la extracción.

2.1.1. Recolección de las células

Tras un tratamiento experimental determinado, el medio de cultivo fue eliminado y las células fueron lavadas con tampón PBS para eliminar los restos del medio de cultivo. A continuación, las células fueron lisadas en la propia placa en la que se encontraban adheridas y se procedió a la extracción del RNA total.

2.1.2. Aislamiento del ARN total

2.1.2.1. Método del tiocianato de guanidinio

El ARN total se extrajo mediante el método de tiocianato de guanidinio/fenol ácido (Chomczynsky y Sacchi, 1987), con alguna modificación. La lisis de las células se llevó a cabo a temperatura ambiente con solución desnaturizante de tiocianato de guanidinio (tiocianato de guanidinio 4 M, citrato de sodio 5 mM a pH 7, lauril-sarcosina sódica al 0.5 %, 2-mercaptoetanol 100 mM) (Solución D). Para una placa de 150 mm de diámetro con células en un estado de subconfluencia, se utilizó 1 ml de solución D, de manera que la concentración celular nunca excedió los 20 millones de células por 1 ml de solución D.

A cada muestra se añadieron 100 µl de acetato sódico 2 M a pH 4, 1 ml de fenol saturado con agua y 200 µl de mezcla de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1). Las muestras se incubaron en hielo durante 15 minutos y después se sometieron a una centrifugación a 3000 g, 4°C, durante 20 minutos, con el fin de separar la fase acuosa de la orgánica. El ARN, presente en la fase acuosa, fue precipitado con 1 ml de isopropanol a -20°C, durante 1 hora y posteriormente centrifugado a 3000 g durante 30 minutos a 4°C. El *pellet* de ARN fue resuspendido en 300 µl de solución D, precipitado, de nuevo, con 1 ml de isopropanol durante 1

hora a -20°C y centrifugado a 10000 g durante 15 minutos a 4°C . El *pellet* resultante se lavó con 70 % de etanol para eliminar restos de sales y se resuspendió en 30-50 μl de tampón Tris/EDTA (TE) (Tris-HCl 50 mM a pH 7.5, EDTA 10 mM a pH 8). La concentración de ARN se determinó por espectrofotometría y las muestras se conservaron a -80°C hasta el momento de su utilización.

2.1.2.2. Método del TRIZOL

Se utilizó el kit comercial TRIZOL reagent (Gibco, BRL) utilizando 10^7 células. La ventaja de este kit frente al método del tiocianato de guanidinio es que es mucho más rápido y permite además aislar ADN genómico y la fracción proteica al mismo tiempo que el ARN total de la muestra.

2.2. Extracción de ADN

2.2.1. Extracción de ADN genómico

A 1×10^6 células se añadieron 500 μl de tampón de digestión (10 mM Tris-CL pH 8.0; 10 mM EDTA pH 8.0; 50 mM NaCl; 0,5 % SDS) y 20 μl de proteinasa K, 10 mg/ml. Se incubó a 55°C durante toda la noche. Se realizó una extracción con 400 μl de fenol:cloroformo:isoamílico (25:25:1), se centrifugó a 13000 g 5 minutos, el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo de 1.5 ml y se añadió 1 ml de etanol absoluto, 50 μl de acetato de sodio 3 M pH 7.0 y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. A continuación se centrifugó a 13000 g durante 10 minutos. Se lavó con etanol 70 % y el precipitado se dejó secar a temperatura ambiente durante 10 minutos. El precipitado se resuspendió con 100 μl de H_2O milliQ.

2.2.2. Extracción de ADN plasmídico

2.2.2.1. Transformación plasmídica

Se añadieron 2 μl del producto obtenido de la ligación, o 20 ng de los vectores que se querían amplificar, a 200 μl de bacterias competentes XL1-Blue (competentes por el método del cloruro de rubidio) y se incubaron durante 30 minutos en hielo. Posteriormente se realizó el shock térmico a 42°C durante 1 minuto y 45 segundos, rápidamente se dejó en hielo durante 2 minutos y se añadió 1 ml de 2xYT. Se agitaron durante 1 hora a 37°C y finalmente se plaquearon 100 μl de cultivo en placas de petri con agar y el antibiótico pertinente. Se dejaron las placas a 37°C durante unas 12-14 horas.

2.2.2.2. Mini-prep

Las mini-preps se realizaron por el método alcalino. Las colonias bacterianas presentes en la placa de petri portadoras del ADN plasmídico se cultivaron con 4 ml de medio 2xYT líquido y 50 mg/ml de ampicilina durante toda la noche a 37°C en agitación. De este crecimiento se tomaron 1.5 ml y se centrifugaron a 13000 g durante 30 segundos. Se resuspendió el pellet con 100 µl de solución I (50 mM Glucosa, 25 mM Tris-Cl pH 8, 10 mM EDTA) y se dejó 4 minutos a temperatura ambiente. Después se añadió 200 µl de solución II (1% SDS, 0.2M NaOH) preparada en el mismo momento y se incubó a temperatura ambiente durante 3 minutos, mezclando por inversión. Seguidamente se añadió 150 µl de solución III (3 M acetato potásico, 0.1 % ácido acético) se mezcló suavemente y se incubó durante 3 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó una extracción fenol/cloroformo (1:1) con un volumen de 350 µl y se centrifugaron las muestras a 13000 g durante 3 minutos en una microcentrífuga. Se precipitó la fase acuosa con 900 µl de etanol, dejando las muestras a temperatura ambiente durante 5 minutos. Seguidamente se centrifugaron 5 minutos a 13000 g y se disolvió el pellet en 20 µl de TE con ARNasas (A 20 µg/ml, T1 500 U/ml). Se incubaron las muestras a 37°C durante 30 minutos antes de la comprobación con los enzimas de restricción correspondientes.

La cantidad de ADN plasmídico obtenida por esta técnica oscila entre 20-50 µg, dependiendo siempre de la capacidad de replicación del plásmido.

2.2.2.3. Maxi-prep

2.2.2.3.1. Método del polietilenglicol

Se utilizó este método para obtener el ADN plasmídico portador de los ADNc utilizados como sondas. Se hizo un cultivo bacteriano de 250 ml que creció durante toda la noche en agitación y a 37°C. Después de centrifugar el cultivo a 5000 g durante 10 minutos, se resuspendió el pellet en 7.2 ml de solución I y se añadió 0.8 ml de lisozima 50 mg/ml. Se adicionaron 16 ml de la solución II mezclando bien por inversión y se dejó 5 minutos en hielo. La lisozima y la solución II rompen la pared bacteriana liberando todo el contenido celular. A continuación se añadieron 12 ml de la solución III y se dejó en hielo durante 15 minutos para permitir que el ADN genómico precipitase. Se centrifugaron las muestras a 10000 g durante 20 minutos a 4°C. El sobrenadante resultante se filtró con una gasa, se recogió en un tubo al que se añadieron 18 ml de polietilenglicol (PEG) al 40 % y se incubó en hielo durante 1 hora. Después se centrifugó a 3500 g durante 30 minutos a 4°C. El pellet resultante se resuspendió en 4 ml de

agua milliQ y se añadieron 8 ml de acetato amónico 7.5 M dejando precipitar durante 30 minutos a -20°C . Posteriormente se centrifugó a 10000 g durante 30 minutos a 4°C . El sobrenadante se pasó a un nuevo tubo y se añadieron 12 ml de cloropan, mezclándolo todo durante 1 minuto con el vórtex. Se centrifugó durante 10 minutos a 3500 g obteniéndose dos fases, la fenólica (contiene la fracción proteica) y la acuosa (contiene el ADN plasmídico). Se recuperó la fase acuosa y se añadieron 7.2 ml de isopropanol, se agitó durante 10 segundos y se dejó 5 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente se centrifugó a 10000 g durante 10 minutos a 4°C . El pellet obtenido se resuspendió en 600 μl de agua milliQ y se pasó a un tubo eppendorf al que se le añadieron 200 μl de polietilenglicol al 40% en 2.5 M de cloruro de litio y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó a 13000 g durante 10 minutos, se lavó el pellet dos veces con etanol al 70 % y se dejó secar. Al final se resuspendió el pellet en 100-300 μl de agua milliQ y se procedió a determinar su concentración por densitometría óptica a 260 y 280 nm.

2.2.2.3.2. Kit comercial

Para la obtención de grandes cantidades de plásmido para las transfecciones se utilizó el Kit Concert (Gibco BRL).

Se centrifugaron 100 ml de cultivo bacteriano a 5000 g durante 10 minutos. Se resuspendió el pellet en 10 ml de tampón E1 (50 mM Tris-HCl, pH 8, 10 mM EDTA), se lisaron las células con 10 ml de tampón E2 (200 mM NaOH, 1 % SDS). Se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se añadieron 10 ml de tampón E3 (3.1 M acetato potásico, pH 5.5) y se centrifugó a 12000 g a temperatura ambiente durante 10 minutos precipitando así el ADN genómico. Durante la centrifugación se equilibró la columna de purificación con 30 ml de tampón E4 (600 mM NaCl, 100 mM acetato sódico pH 5, 0.15 % Tritón X-100). El sobrenadante obtenido de la centrifugación se pasó por la columna equilibrada. Se añadieron 60 ml de tampón E5 (800 mM NaCl, 100 mM acetato sódico pH 5) descartando así la fracción proteica. Finalmente se añadieron 15 ml de tampón E6 (1.25 M NaCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8.5) recogiendo el volumen eluido por la columna, se añadió 10.5 ml de isopropanol y se centrifugó a 12000 g durante 5 minutos a 4°C . El pellet obtenido se lavó con 5 ml de etanol 70 % repitiendo la centrifugación a 8000 g durante 5 minutos a 4°C . Se dejó secar el pellet a temperatura ambiente y se resuspendió con 100-300 μl de agua milliQ estéril. De esta forma los plásmidos se pueden utilizar directamente para transfectar. Mediante una alícuota se calculó la cantidad y pureza del plásmido. Con este método aparecen a veces partículas flotantes que se eliminan centrifugando el plásmido a 13000 g en una microcentrifuga durante 1 minuto a temperatura ambiente.

2.2.2.4. Digestión y electroforesis

Mediante una batería de enzimas de restricción se comprobaron todos los plásmidos obtenidos por la metodología que fuese. Las restricciones se llevaron a cabo con los tampones comerciales de los enzimas requeridos y a las temperaturas adecuadas sin sobrepasar las dos horas de digestión. Posteriormente se comprobaron las digestiones en un gel de agarosa (Ecogen S.R.L., Madrid) con un porcentaje variable dependiendo del tamaño de los fragmentos a visualizar y teñido con 10 ng/ml de bromuro de etidio.

2.2.2.5. Secuenciación automática

Para la secuenciación se utilizó el kit comercial Thermo SequenasaTM (Amersham Pharmacia). La reacción se hizo con los componentes siguientes: 0.2-2 µg de plásmido, 5 pmoles de cebador específico, 2 µl de reactivo A y 2 µl de reactivo B (incluidos en el kit) y agua milliQ hasta un volumen final de 20 µl. Se realizaron 30 ciclos en un termociclador *PTC-100 Programmable Thermal Controller* (MJ Research, Inc). Cada ciclo consistió en una desnaturalización a 96°C durante 30 segundos, un anillamiento a la temperatura óptima para el cebador utilizado durante 15 segundos y una extensión a 60°C durante 4 minutos. Después de la reacción de PCR se añadieron 2 µl de acetato de sodio 3 M y posteriormente 60 µl de etanol 100 % y se dejó en hielo durante 15 minutos. Más tarde se centrifugó a 13000 g durante 15 minutos. Se lavó el pellet con 500 µl de etanol al 70% y se volvió a centrifugar a 13000 g durante 5 minutos. Finalmente se dejó secar el pellet a temperatura ambiente durante 5 minutos y se secuenciaron las muestras en un secuenciador automático *Abi 377 Sequencer* (Perkin Elmer Corp., Norwalk, CO) en los Serveis Científico-Tècnics de la Universitat de Barcelona.

2.3. Northern Blot

2.3.1. Electroforesis y Transferencia

Se mezclaron 20 µg de ARN total con tampón de carga (formamida desionizada al 0.5 %, 1 x tampón MOPS/EDTA, formaldehído al 6%, glicerol al 0.13%, azul de bromofenol al 0.013 %), fueron desnaturalizados a 65°C durante 10 minutos y separados en un gel de agarosa/formaldehído al 1.2 % (Ausubel y col., 1997). Seguidamente, las muestras fueron

transferidas por capilaridad a una membrana de nylon (Genescreen, DuPont/NEN, Boston, MA, EEUU), durante 18 horas en presencia de tampón 10 x SSC (NaCl 1.5 M, citrato sódico 0.15 M a pH 7). El ARN fue fijado a la membrana mediante irradiación con luz UV (150 mJ) en una cámara de irradiación Stratalinker (Stratagene).

2.3.2. Preparación de la sonda

Como sonda, se preparó un fragmento del ADNc del gen objeto de estudio, obtenido a partir de la digestión de una construcción plasmídica (ver apartado de Material y Métodos)

Todas las sondas fueron marcadas radiactivamente con el kit *Oligolabeling Kit* (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia), el cual está basado en el método de *random priming* descrito por Feinberg y Volgstein (1983). Resumidamente, 50 ng de sonda de DNA fueron desnaturalizados durante 10 minutos a 95°C. Seguidamente, se les añadió una mezcla de deoxinucleótidos, cebadores y tampón de reacción, así como 50 µCi de ³²P-αdCTP (ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, CA, EEUU) y 10 U de Fragmento Klenow (Pharmacia Biotech). La reacción fue llevada a cabo a 37°C durante 90 minutos.

Las sondas marcadas fueron purificadas a través de una columna de sefarosa G50 (*Nick Column*, Pharmacia Biotech) para eliminar el exceso de nucleótidos radiactivos no incorporados. La eficiencia de marcaje fue evaluada en un contador de centelleo Packard TRi-CARB 1500 (Packard, Merriden, CT, EEUU).

2.3.3. Pre-hibridación e Hibridación

La membrana con el ARN fijado fue humedecida en agua milliQ durante 2 minutos. A continuación, dicha membrana fue incubada durante 3 horas a 65°C en solución de pre-hibridación (0.1 g/ml de sulfato dextrano, formamida desionizada 20 %, 4 x SSPE (0.72 M NaCl, 40 mM NaH₂PO₄, 4 mM EDTA), 5 x solución de Denhardt (1 g/l de polivinilpirrolidona, 1 g/l de Ficoll 400, 1 g/l de BSA fracción V, SDS 5 %, 0.2 mg/ml de DNA de esperma de salmón desnaturalizado, 0.1 mg/ml de ARNt y 25 mM HCl).

Finalizada la pre-hibridación, se añadió a la solución 1.5x10⁶ cpm/ml de sonda radiactiva, desnaturalizada a 95°C. La hibridación con esta sonda fue mantenida durante 18 horas a 65°C en un horno de hibridación.

2.3.4. Lavados

Finalizada la hibridación, la membrana fue sometida a varios lavados aumentando la astringencia para eliminar la unión inespecífica y el exceso de sonda radiactiva. La astringencia está determinada por la temperatura y la concentración salina de la solución de lavado. Se realizaron tres lavados con agitación constante: uno a 65°C durante 30 minutos con 3 x SSC, 0.1 % SDS; otro a 65°C durante 30 minutos con 1 x SSC, 0.1% SDS y el tercero a 65°C durante 30 minutos con 0.2 x SSC, 0.1 % SDS. Este último lavado sólo se realizó cuando se utilizaron sondas con elevada unión específica (como L32 y 18S).

2.3.5. Cuantificación

Para visualizar el resultado la membrana fue expuesta a una película autorradiográfica Kodak-AR (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, EEUU). Además, la cuantificación de las bandas radiactivas se realizó mediante el sistema *Molecular Analyst* (BioRad, Hercules, CA, EEUU). Los resultados se expresan como DO (densidad óptica) del ARNm de estudio/DO del ARNm control x 100.

2.4. Obtención de las proteínas nucleares

2.4.1. Obtención de los extractos nucleares I

Las células se recogieron y se lavaron con PBS. Posteriormente fueron lisadas en el tampón A (10 mM Hepes pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 M EDTA, 0.1 M EGTA, 1 mM DTT) y se dejaron en hielo durante quince minutos. Pasado este tiempo, se añadió NP-40 al 10 % y se centrifugaron durante 30 segundos a 14000 g. Se descartó el sobrenadante citoplasmático y los núcleos fueron lisados en tampón B (20 mM Hepes pH 7.9, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA y 1 mM DTT) durante quince minutos a 4°C. Finalmente se centrifugaron los núcleos durante 15 minutos a 14000 g. El sobrenadante resultante (concentración proteica 1-5 mg/ml) se congeló a -80°C hasta su utilización.

2.4.2. Obtención de los extractos nucleares II

Las células se centrifugaron a 1200 g durante 5 minutos a 4°C. El pellet se resuspendió en 10 ml de PBS frío. Se repitió la centrifugación y tras descartar el sobrenadante, se añadió

PBS frío en una cantidad correspondiente a 5 veces el volumen ocupado por el pellet (para calcularlo se pone el pellet en paralelo con un tubo vacío al que se va añadiendo agua hasta obtener el mismo volumen que el pellet). A continuación se centrifugó a 1200 g durante 10 minutos a 4°C. El pellet resultante se resuspendió en tampón hipotónico (10 mM HEPES, pH 7.9 a 4°C; 1.5 mM MgCl₂; 10 mM KCl; 0.2 mM PMSF; 0.5 mM DTT) con un volumen que es 5 veces el ocupado por el pellet (este paso ha de ser rápido ya que las células pueden lisarse). Posteriormente se centrifugó a 1500 g durante 5 minutos a 4°C y el pellet obtenido se resuspendió en tampón hipotónico (3 veces su volumen ocupado). Esta suspensión se dejó en hielo durante 10 minutos para que los núcleos se fueran hinchando. Después la suspensión se transfirió a un homogenizador (5 cm³) previamente enfriado en hielo. Se homogeneizó diez veces y se comprobó la obtención de núcleos tomando 10 µl del homogeneizado, 50 µl del tampón hipotónico y 10 µl del azul de tripán en una cámara de Neubauer (el colorante que no es permeable a las membranas, sólo teñirá los núcleos de las células lisadas). Tras comprobar la obtención de los núcleos intactos, se pasó el homogeneizado a un tubo de 12 ml. Se centrifugó a 5000 g durante 20 minutos a 4°C y a partir de este punto se trabajó siempre en una cámara a 4°C. El pellet se resuspendió en la mitad de su volumen en tampón bajo en sales (20 mM Hepes, pH 7.9 a 4°C, 25 % glicerol; 1.5 mM MgCl₂; 20 mM KCl, 0.2 mM EDTA; 0.2 mM PMSF; 0.5 mM DTT). El contenido se pasó a un tubo eppendorf y se añadió gota a gota la mitad del volumen ocupado por el pellet de tampón rico en sales (20 mM Hepes, pH 7.9 a 4°C; 25 % glicerol; 1.5 mM MgCl₂, 1.2 mM KCl; 0.2 mM EDTA; 0.2 mM PMSF; 0.5 mM DTT). En este punto los núcleos se colapsan y liberan el contenido proteico de su interior. Se agitó la suspensión resultante (debe quedar un aspecto granuloso) durante 30 minutos en un agitador orbital. Posteriormente se centrifugó a 14000 g durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante resultante contenía el extracto nuclear y el pellet presentaba los núcleos. Se dializó el sobrenadante en tampón de diálisis previamente enfriado (20 mM Hepes, pH 7.9 a 4°C; 20 % glicerol; 100 mM KCl; 0.2 mM PMSF; 0.5 mM DTT) durante 30 minutos. Previamente se hidrataron las bolsas de diálisis con agua milliQ. El sobrenadante dializado se centrifugó a 13000 g durante 20 minutos para eliminar los restos de ADN. El contenido en proteínas se determinó por la técnica de Bradford (Bradford, 1976) y se alicuotaron los extractos nucleares conservándose a -80°C.

2.5. Ensayo de retardo en gel

2.5.1. Marcaje de la sonda (oligonucleótidos)

El marcaje de la sonda se realizó mediante una reacción de fosforilación. A 100 ng de sonda se le añaden 20 U del enzima polinucleótido quinasa T4 (Boehringer Mannheim), tampón específico (*polynucleotide kinase buffer*, Boehringer Mannheim) y 5 µl de [γ -³²P]-ATP (10 µCi/µl,

ICN Pharmaceuticals). La reacción se llevó a cabo durante 1 hora a 37°C. Posteriormente, el DNA marcado se precipita con 40 µl de agua, 240 µl de acetato de amonio 5 M, 750 µl de etanol 100 % frío y 1 µl de glucógeno, dejándolo en hielo durante 30 minutos. A continuación se centrifugó a 12000 g durante 20 minutos a 0°C. Se elimina el sobrenadante y el pellet resultante se lava con 500 µl de etanol al 80 % y se centrifuga de nuevo. Finalmente, el pellet se redisuelve con 100 µl de TE (pH 7.6). La eficiencia de marcaje fue evaluada en un contador de centelleo Packard TRI-CARB 1500 (Packard, Meriden, CT, EEUU).

2.5.2. Marcaje de la sonda (fragmento de ADN)

El marcaje de la sonda se realizó partiendo de 20 µg del plásmido pGL3Imp2 digerido con Xho I para obtener el fragmento del promotor que incluyese las posibles cajas GAS y la caja IRF1. Posteriormente a la digestión se realizó una precipitación con 100 µl de etanol al 100 %, resuspendiendo el pellet con 33 µl de agua mQ. Se procedió al marcaje con 10 µl de ³²P-αdCTP 3000 Ci/mmol (=100 µCi) (ICN); 1 µl de dGTP, dATP, dTTP 10 mM (Pharmacia); 5 µl del tampón L (Boehringer Mannheim) y 1 µl de Klenow 6.4 U/µl (Pharmacia). Se dejó la reacción durante 25 minutos a temperatura ambiente y finalmente se añadió 1 µl de dNTPs 10 mM (Pharmacia) durante 5 minutos más a temperatura ambiente, y se paró la reacción con 1 µl de EDTA 0.5 M. El fragmento marcado se recuperó de un gel de agarosa (Ecogen) al 1 %. Se obtuvieron unas 12000 cpm por 0.4 ng de ADN, valores óptimos dentro de los parámetros indicados (Ausubel y col., 1997)

2.5.3. Reacción de Unión ADN-Proteína

La sonda marcada (100.000 cpm correspondientes aproximadamente a 0.1 ng de ADN) se mezcla con los extractos nucleares (4 µg) en un volumen final de 20 µl de tampón de unión (12 mM Hepes, 60 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.12 mM EDTA, 0.3 mM PMSF, 0.3 mM DTT y 12 % glicerol). A cada una de las muestras se añadió también 100 ng de poly (dI-dC)/4 µg (Pharmacia Biotech). Las muestras fueron incubadas a temperatura ambiente durante 30 minutos.

2.5.4. Electroforesis

Las muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida al 4.5 % (acrilamida:bisacrilamida, 30:1) y 0.5 x TBE. La electroforesis se llevó a cabo a temperatura ambiente y 110 V. Después de la electroforesis, el gel fue secado al vacío y expuesto a una película autorradiográfica Kodak-

AR (Eastman Kodak Company). La cuantificación de las bandas radiactivas se llevó a cabo mediante el sistema *Molecular Analyst* (BioRad).

2.6. Transfecciones

2.6.1. Transfección de la línea celular L929 mediante cloruro de calcio

Se plaquearon 500.000 células por pocillo en placas de 6 pocillos con 2 ml de medio de cultivo (DMEM+10 % FCS) 24 horas antes de la transfección. Previa a la transfección se cambió el medio por 2 ml de DMEM con 10 % de FCS que contenía 25 μ M de cloroquina y antibiótico. Seguidamente se añadieron 7 μ g del ADN plasmídico a 31 μ l de CaCl_2 2 M hasta un volumen final de 250 μ l y por último 250 μ l de 2 x HBS (50 mM Hepes, pH 7.05; 10 mM KCl; 12 mM glucosa; 280 mM NaCl, 1.5 mM Na_2HPO_4), que deben ser añadidos mientras se producen burbujas en la solución. Para homogeneizar todo el proceso, se preparó la mezcla de los 6 pocillos juntos y se añadió al final los 500 μ l a cada pocillo (entre 1 y 2 minutos después de la preparación del ADN). Las muestras de los primeros 3 pocillos eran réplicas sin estimular y los otros tres pocillos eran réplicas estimuladas, todos transfectados con el mismo plásmido. Al cabo de 10 horas se cambió el medio con 2 ml de DMEM y 10 % de FCS y tras otras 12 horas se llevaron a cabo las estimuciones, siendo de diferente duración según el estímulo. En las transfecciones estables se utilizaron 0.5 μ g/ml de neomicina.

2.6.2. Transfección de la línea celular RAW 264.7 mediante liposomas

Esta línea celular de macrófagos se tranfectó con *Fugene 6* (Boehringer Mannheim) que consiste en una mezcla lipídica capaz de fusionarse con la membrana celular y atravesarla. Se incubaron 3 μ l de *Fugene 6* con 97 μ l de DMEM durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación se añadió a la muestra 1 μ g de plásmido y se dejó incubar 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se añadieron los 100 μ l a 2 ml de medio con células que se encontraban a una confluencia aproximada del 60-70 %. Para ello 24 horas antes de la transfección se plaquearon 80.000 células por pocillo, en placas de 6 pocillos, con 2 ml de medio de cultivo (DMEM, 10 % de FCS y penicilina/estreptomocina). Las estimuciones se realizaron 12 horas después de la transfección, siendo de diferente duración según el estímulo utilizado. En los experimentos de cotransfección, se añadieron 100 ng del plásmido pRLBOS.

2.7. Ensayos de luciferasa

2.7.1. Lisado celular

Las células se lisaron con 250 μ l de tampón de lisis *Luciferase Dual System Assay* (Promega), dejándose en agitación durante 15 minutos a temperatura ambiente.

2.7.2 Detección de la actividad luciferasa de *Photinus pyralis* (P-Luc)

La actividad P-Luc consiste en la oxidación de luciferina en presencia de Mg^{2+} y ATP, generando la producción de fotones de luz. Esta proteína no requiere modificaciones post-traduccionales, por lo cual puede funcionar como indicador de la actividad enzimática inmediatamente después de su traducción. Se tomaron 20 μ l del lisado celular y en presencia de 50 μ l de LAR (*Luciferase Assay Reagent*) se midió la luminiscencia producida durante 15 segundos en un luminómetro TD-20/20 (Turner Designs, Sunnyvale, CA). La intensidad de luz se mantiene constante durante unos 20 segundos, decayendo lentamente.

2.7.3 Detección de la actividad luciferasa de *Renilla reniformis* (R-Luc)

La actividad R-Luc se introdujo como control de transfección. Consiste en la oxidación de la coelenterazina, lo que genera la producción de fotones de luz. De forma similar a la P-Luc, esta proteína no requiere de modificaciones post-traduccionales, por lo cual puede funcionar como indicador de la actividad enzimática inmediatamente después de su traducción. Una vez medida la actividad P-Luc, se añadieron 50 μ l de la solución Stop&Glo™. Esta solución inhibe por completo la actividad P-Luc a la vez que induce la actividad R-Luc. De esta forma se obtuvo la luminiscencia producida durante 15 segundos en el mismo luminómetro TD-20/20.