

**Mecanismos moleculares que
regulan la activación clásica y
alternativa en los macrófagos**

Luis Arpa Toribio

Tesis Doctoral

2008



Departamento de Fisiología
Facultad de Biología

Programa de Doctorado de Inmunología
Bienio 2003-2005

Tesis doctoral presentada por
Luis Arpa Toribio
Para obtener el grado de Doctor

Director de tesis
Dr. Antonio Celada Cotarelo
Catedrático de Inmunología

Codirectora de tesis
Dra. Annabel Fernández Valledor
Profesora de Inmunología

Barcelona, Abril de 2008
Grupo Biología del Macrófago:
regulación de la expresión génica

a Sergio

“En la vida, lo esencial es formular juicios a priori sobre todas las cosas. En efecto, parece ser que las masas están equivocadas y que los individuos tienen siempre razón. Es menester guardarse de deducir de esto normas de conducta: no tienen por qué ser formuladas para ser observadas. En realidad, sólo existen dos cosas importantes: el amor, en todas sus formas, con mujeres hermosas, y la música de Nueva Orleans o Duke Ellington. Todo lo demás debería desaparecer porque lo demás es feo, y toda la fuerza de las páginas de demostración que siguen proceden del hecho de que la historia es enteramente verdadera, ya que me la he inventado yo de cabo a rabo. Su realización material propiamente dicha consiste, en esencia, en una proyección de la realidad, en una atmósfera oblicua y recalentada, sobre un plano de referencia irregularmente ondulado y que presenta una distorsión. Como puede verse, es un procedimiento confesable donde los haya.”

Nueva Orleans,
10 de Marzo de 1946

Boris Vian
La espuma de los días

AGRADECIMIENTOS

Vaya, vaya, quien me lo iba a decir a mi hace cuatro años, cuando aún era estudiante y empezaba a trastear por aquí, escribir los agradecimientos... jejeje, llevo una semana ante este título y aún no sé cómo empezar. Lo intentaré como todos, por el principio:

Antonio, “el jefe”, hago memoria y recuerdo tus clases de Inmuno, ¡qué clases! La de veces que durante estos años, hablando con gente que compartió aquellas horas conmigo, me han preguntado “¿Y cómo después de tenerle en Inmuno aún te fuiste a pedirle trabajo?”. Yo siempre contesto lo mismo, “¡Precisamente por tenerle en Inmuno ahora estoy donde estoy!”. Es curioso, pero me encantó tu manera de explicar la inmunología, demostrabas cada palabra y cada teoría con un artículo o un experimento en aquellas hojas de transparencias, ¡qué tiempos! Y hoy, cinco años después, aquí estoy, todo un cebollino de postal, casi un doctor. Gracias por darme la oportunidad de trabajar en tu grupo, de hacer esta tesis, de aprender los entresijos de la ciencia y de ayudarme en todo lo posible durante el camino. Nos volveremos a ver, sin duda.

Annabel, “la orientadora”, les voltes que dóna la vida... havia sentit tant a parlar de tu, per ma mare!! Jejeje, qui m’anava a dir quan vaig començar i sentia a ma mare repetint-me esperaçada “la prima de un conocido mío estudió biología, hizo un doctorado y ahora está en EUA!” que aquella “prima” acabaria dirigint-me la tesis. La veritat és que has estat una autèntica guia científica per mi en aquests darrers anys, he après un munt de tu i de la teva manera de fer. Podria començar a elogiar-te i agrair-te les teves aportacions i el teu suport, sobretot en els darrers mesos de tesis, però em limitaré a dir només una cosa: Jo, quan sigui gran, vull ser com tu!

Jordi, casualment no et vaig tenir mai a classe i, al final, en lloc de codirector, has acabat “tribunalitzant-me” la tesi, jeje. Tu sempre estaves disposat a ajudar, amb els experiments, els protocols, el Word o el p*** EndNote (aquest però te l’apunto com un fracàs!) i la veritat és que en els moments d’estrès has estat el més semblant a un salvavides, gràcies per tot!

Concep, vàrem conviure poc al laboratori, però de tu vaig aprendre que es pot treballar dur fent poiata i al mateix temps portar una vida “civil”. I encara treies temps per ajudar-me a mi! Gràcies pel teu esforç durant aquells primers anys.

A mis compañeros de laboratorio, los que han sido y los que son. Especialmente a los más “añejos” por haberme aguantado con paciencia durante tantos años (sé que no ha sido fácil, jeje), ¡gracias a todos! Mònica (la Cuma, sempre seràs la meva mentora!), Carlitos, Carlos, ¡ese currante! Me quedo con tu frase “Sólo hay dos maneras de hacer las cosas... ¡cuánta

razón tienes!, María, Neus, Marina, Cristina, Ester, Núria, la única persona que se'n recuerda de mi cada 26 de noviembre, peti qui peti, gràcies!, Jaume, Andrée, Eva, Mariana, esto huele a Cell, ¿te acuerdas? Jeje, al final no ha podido ser..., Carolina, Marta Plega, Glòria, ànims! que ja no et queda res!, Consol, Patricia, Kamila, *Insane in the membrane!!!!* Andrea, ¡suerte con la producción! Elvira, Tullio, Roser, Jessica y a la subpoblación del grupo de receptores nucleares, Mònica, Ainhoa y Jonathan, ¡mucho suerte a los tres! Ah, no puedo olvidarme tampoco de Eva y Gemma, sin duda las mejores técnicos que hemos tenido nunca, ¡gracias por hacernos el trabajo mucho más fácil! Gracias también a Ricardo y a Carles, dos grandes investigadores de los que sin duda todos aprendimos mientras estuvieron con nosotros.

Parte de este trabajo no hubiera sido posible sin la inestimable ayuda de los miembros de los Servicios Científico-Técnicos, Jaume y Ricard, els mestres de la citometria, Ramon, està lliure la 7900?? Jejeje.

En estos últimos diez años, ¿diez años? dios... a pesar de mi condición recalcitrante y orgullosa de ente asocial (o antisocial incluso) he llegado a conocer a un montón de gente que ha contribuido, cada uno a su manera, a que hoy pueda estar escribiendo estas líneas. Algunos, los que más, tan sólo han pasado por mi vida como meros matices de colores, pero todos han dado un puntual sentido a mi vida en esos días que conforman épocas, unas más claras, las otras más oscuras. A todos os doy mil gracias por acompañarme, en un momento u otro, en este ciclo que al fin parece concluir. Porque como dijo el hombre sabio, no importa lo que hay al final del camino, lo importante es el camino en sí. ¡Va por ustedes!

A la Lidia (¡¡primaaa!!), el Aroka y el Gabi. A pesar de todas las movidas, que no han sido pocas, siempre me habéis tratado como a uno más del grupo. He sido muy feliz compartiendo tantos días y tantas noches con vosotros, ¡¡os quiero primos!!

A la gente del Umma, no han caído birras ni ná, y lo que no son birras! Tres años hace ya desde que Marta me descubrió ese agujero inmundos y a su gente, que tanto me aporta y tan poco me pide a cambio (Viva el Bono12!!). Roger, Bea, Mon, Fran, Flow, Cene, Sarai, Rasta, Pez, Popi, Rata, Vaca, Buruñas, Chuco, Super, Gemma, Paula, Cris,... sé que me dejo a muchos, *I'm sorry, you know who you are!*

Y pos supuesto no podía olvidarme de ti 2, ¡¡el segundo (aquí no iba una coma?) mejor camarero del mundo!! ¡Jejeje!

Al Soria y la Rebeka, mis “mágicos”. Sería una hipocresía no contar aquí con vosotros, habéis contribuido en esto más de lo que podéis imaginar. “Pues ya lo dijo Dios, no sólo de pan vive el hombre”.

Als germans Escala, Xavi y Albert. No m'oblido de vosaltres!! Ey Xavi, encara recordo el meu primer any de carrera... i em pregunto com vaig poder acabar-la!! Tantes tardes patinant a Sants i tants matins al monument "de los caídos" fumant-nos, literalment, les classes. I mira'ns ara, tu d'empresari i jo de doctor, me parto!! Gràcies tios!!

A los Pencil Rile, Borja, Ramon y Pep, qué tiempos, aaaay... Cómo disfruté de aquellos años con vosotros, coño!!

A los SUBWAY L4, Narcís, Jep i David. Lluny el què es diu lluny no vam arribar però, i el què ens vam arribar a riure!!

Al Robert, alias "titorobert", alias "el robe". Des de que ens vam conèixer (eructant, sí, què passa?) em vas donar tota la teva confiança i això sempre ho he valorat moltíssim. Ets una persona de puta mare, i costa un ou trobar gent així, creu-me, que ningú et digui el contrari!! Y a muerte con ellas, jejeje!!!

A la nueva generación de biólogos (o casi) que ha tenido la desgracia de pasar por mis manos y a aquellos que supieron esquivarme. Va, incluso a los BOSes y BABes, después de todo no sois tan malos, jeje. Quién me iba a decir que dando clases se conoce gente, ¡¡ja! He pasado muy buenos ratos con vosotros, ¡¡gracias a tod@s!!

Sin embargo, ha habido otras personas, sin duda las que menos, que por algún motivo (que un día me explicareis, jejeje) decidieron acompañarme durante todo el camino, compartiendo sus vidas conmigo y ayudándome a seguir adelante. A vosotros os lo debo todo. ¡¡Mil gracias!!

Dani, alias "el loko", alias "¿qué Dani? ¿mi Dani?", amigo de la infancia, superviviente de los tiempos, el único, el original, ¡jejeje! Ni si quiera recuerdo cómo nos conocimos, tío (supongo que diox los cría...), pero lo que sí sé es que después de... ¿cuántos, 15 años?, de todas las que hemos pasado juntos y, sobretodo, de las que nos hemos llegado a librar (¡buff!), ahora se me hace imposible recordar un solo hecho de mi infancia o de mi adolescencia en el que no estuvieras a mi lado. ¡¡Gracias por contagiarme tu locura!! ¡¡Espero decir lo mismo dentro de otros 15!!

Belén, contigo aprendí que la vida no es sólo ciencia y alcohol. Bueno, ¡alcohol sí! ¡Jeje! Tú me enseñaste un mundo que desconocía, me mostraste el poder y la belleza de las palabras, y me hiciste sentir que, para ti, yo era lo único importante. Nunca he vuelto sentirme así. ¡¡Gracias!!

Laia, alias “la Diosa”, alias “la txurri” (Ja! te la devia!). El País Vasc, La Guingueta, el pis de Sant Andreu (jajajaja), el Tibidabo (ese Daewoo!!), el Marroc... vaja, potser sí que m’esperaré fins als 35, jejeje!!! Ets una de les persones més íntegres que he conegut mai i de tu vaig aprendre uns valors que envejava. Avui em dono compte de què gran part del què sóc t’ho dec a tu (la part bona, és clar, jejeje). De veritat, ojalà hi hagués més gent com tu al mon, seria un lloc agradable. Gràcies per ensenyar-me les coses importants de la vida. T’estimo moltíssim!!

Ivan, alias “minabo”, alias “el jevi”, alias “el negro”, alias “el pollós”. Tan difícil com és aguantar-me a mi ho és entendre’t a tu, jejeje, però, a qui li importa? Suposo que per això, després de 10 anys, ets un dels millors amics que he tingut mai. Gràcies tio... per haver estat, per la confiança, per acollir-me sempre, amb tu i amb els teus, per la música (all is blues!), les esquíades alkohòliques, les immersions suïcides, les competis al duro (¡batiendo récords día a día!), en fi, per tot, perquè són tantes que ni hi cabrien, tu ja ho saps. Tota la carrera i tot el doctorat... ¡buff! Hooooow manyyyy baaars have we cloooosed togeeeetheer, hooooow maaaany soooooongs have we suuuuung...

Laura, no sé cómo nos aguantas, ¡¡jejeje!! Entre el borde de tu novio y los cabrones de tus amigos te has ganado el cielo, sin duda. Y a pesar de tantas furañas y hurgamientos cojoneros creo que tienes un corazón que no te cabe en el pecho, en ninguno de los dos. Digamos lo que digamos, ¡¡no cambies nunca por favor!! ¡Ah! ¿¿Y dónde están mis gayumbos del metal?? ¡¡Grrrrr!!!

Seluííííí, alias “el luisito”, alias “el greñúo”, alias “ertío”. Aún no sé muy bien porqué, serán casualidades de la vida o quizá otra vez aquello del diox que cría (va a ser eso...) pero desde el día que te conocí no hemos dejado de liarla juntos, y hasta hoy sólo ha ido a mejor. Qué te voy a contar que no sepas ya. Madre mía... “los luises”, jejeje, ¡¡más de un monumento será erigido en nuestro nombre!! Ya sabes, donde hay calidad... ¡y que dure! Tío, gracias por darme este último año, no sabes lo que ha significado para mí poder contar contigo en estos meses tan duros.

A toda la gente de Badalona, Carlos y Jose, alias “gitaner brothers”, alias “los gitanos”. Desde que os conozco habéis estado “cuidando” de nosotros allá dónde fuéramos... (creo que nunca podré olvidar ese Pilar ¡jejeje!) ¡Gracias! ¡Hay que tener mucha energía para seguirnos el ritmo como vosotros lo hacéis! Cansino, alias “er Nani”, ¡a ver si te desapollardas y te vemos el pelo tío! Fernando, alias “el Nando”. Contigo la diversión siempre está garantizada, ¡y las burradas también!. Porque, cuando el resto va, tú ya hace rato que has vuelto, no sé

cómo lo haces pero ¡que dure! ¡Jejeje! Tro, alias “Camello”, alias “Trocamello”. ¿Qué pasa tío? ¡No se te ve el pelo! ¡Jaja! ¡Vuelve pronto!

Jordi, alias “el chordi”. Vaya tela, ¿y ahora me tengo que poner sensible contigo?? ¡Jejeje! Desde luego si alguien se merece el gallifante de oro a la paciencia conmigo ese eres tú, sin duda. Si el niño te ha salido tonto, ¿qué le vas a hacer? Pues quererle. Compañero, colega, camarada y amigo. El hombre multifunción te voy a llamar. Lo mismo me solucionas un experimento como me tumbas a cubatas, me aguantas horas de chorreo, o me “negocias” una buena noche con toda suerte de abalorios. Si un hombre precavido vale por dos, tú vales por 4!! Gracias por estos años de cordura y comprensión. ¡¡Espero seguir teniéndote ahí en San Diego!!

Marta, alias “la punki”, alias “pus”, alias “misti”, alias “nena”. Marta... qué puedo decir de ti... al final son las 5 a.m., mañana he de imprimir estas páginas y aún sigo aquí, dándole vueltas, otra vez, la última. Siempre he dicho que, en la vida, mi mayor fracaso y mi asignatura pendiente han sido las mujeres. Pues bien, tú eres el paradigma de esta teoría. Creo que nunca he llegado a entenderte, ni he sabido qué querías, ni porqué hacías lo que hacías. Y hoy, después de tres años, sigo como el primer día. Sin embargo, a pesar de ello y de otras mil batallas, la palabra clave es “sigo”. No me preguntes porqué, porque ni yo lo sé. ¿Tozudez? ¿Orgullo? ¿Masoquismo? o quizá no querer darme nunca por vencido, no lo sé, pero podría escribir otra tesis entera hablando sólo de ti. Cuando creía que ya estaba de vuelta de casi todo tú me enseñaste a reandar el camino y me diste otra visión del mundo, más alegre. Me trajiste a tu familia y amigos, me mostraste un lado de la vida que tenía muy olvidado, y me hiciste ver que no todo estaba podrido. Tú me enseñaste a disfrutar de la vida a niveles que ni conocía, y me diste, sin duda, el mejor año de mi vida, gracias de corazón. Ah, y esto te gustará, lamento no haber sabido hacerlo mejor, de verdad que lo siento. Ahora ya sólo puedo decir “¡siempre nos quedará Sougia!”.

Sam y Nuria, aún estoy flipando con que os caséis, jejeje... ¡¡Enhorabuena coño!! ¡¡Seré el peor invitado de la fiesta, lo prometo!! ¡¡Sé que no esperáis menos de mí!! Sois lo que se dice “una pareja encantadora”, me parto con vosotros, en serio. Sam, tu *way of life* es digna de admiración y estudio. Siempre se puede contar contigo y sabes como cuidar de los tuyos. Admiro mucho a la gente que sabe valorar lo que tiene, y tú sabes. Tipos como tú no crecen en los árboles. ¡Gracias amigo! Núria, ja estàs segura del què fas?? Jejeje! Ets una gran persona i de les poquíssimes dones que em donen la confiança per parlar de qualsevol cosa i ser jo mateix, gràcies! Admiro els teus valors i el camí que has escollit a la vida, OLE per tu! Us desitjo el millor, suposo que tens assumit que casar-te amb aquest home suposa tenir-nos al Jordi i a mi de cunyats, oi?... per la resta de la vida!! Jajaja!!

Yorch, alias “Jorge”, alias “el Don”, ¡siempre serás el más borracho! Gracias por darme una oportunidad a pesar de todo el odio que me tenías, ¡jejeje! En serio, ¡eres un tipo muy grande!!

Fran, ¿¿birra o muerte??? Tío, ¡eres lo más parecido a un compañero de piso que he tenido! Me encantó compartir aquel mesecito contigo (no t’enfadis Nuri!). Parecíamos la extraña pareja, jejeje. Cosas como esa son las que no se olvidan. Me alegro de haber podido compartir esa experiencia contigo y que todo acabara bien, ¡¡cuida mucho de Nuri!!

Nuri, que passa petita?? La paciència i el cor que has hagut de tenir per aguantar al Fran tantíssims anys i tirar endavant amb tot... t’admiro! Ets un sol de dona i un encant de persona. Ah, i una anfitriona collonuda (me guanyat un sopar?? :D). Cuida molt del Fran que no sap ni el que té!

A Rakel, alias “manichaaaa”. Hay cosas en la vida que unen a la personas para siempre. Desde el primer día me trataste como a un hermano y eso no lo olvidaré jamás. Gracias por tu alegría y optimismo, ¡no los pierdas nunca! Os deseo lo mejor, a ti y a Javi, y espero seguir viéndoos, más tarde o más temprano, durante muchos años. Siempre estaré aquí para ti.

Al resto de compañeros de facultad, ¡¡me arrepiento mucho de no haberos conocido más y mejor!! Albert, alias “tito”, tío ets una de les persones més nobles que conec, molta sort a la feina i amb la casa, t’ho mereixes! Pato, alias “el gremlin”, gracias por acogerme en la huerta de Abu Bardem y en tu propia casa (aunque ya no quieras invitarme nunca más, jejeje). ¡Sigue tan zumbada como siempre! Xavi, ¿¿qué pasa piltrafilla?? A ti te conocí por no saber tener la boca cerrada, fotos, fotos, fotos, y ale, ya nos odia todo el mundo por pesados, ¡jejeje! Cuidate mucho, ¡aquí me tienes para lo que quieras! Edu, eduuu, ¿¿ande andas tío?? Jeje, que te vaya muy bien por las tierras del sur, ¡¡y quiero verte liseniaaado!! Trini, alias “trinity”, cocoordinadora! Va ser dur però divertit eh, jeje, i encara porta cua, putó barbita!...! Sempre alegre tu, no sé com t’ho fas però no ho perdis mai! Eva, a tu et vam conèixer més tard però des de llavors sempre has estat amb nosaltres, amenitzant els dinars dia a dia, sort amb la tesis! Kike y Lidia, vosotros sí que sois la extraña pareja, jejeje, ¡¡mucha suerte guapos!!

¡¡Madre!! ¡¡Padre!! Jejeje, gracias por haberme dado siempre todo lo que he necesitado, y mucho más. Por el cariño y la educación, por enseñarme valores que no podría haber aprendido en ningún otro lugar, por apoyarme siempre, en todo (¡madre! ¡sin sufrimiento no hay victoria!! ¡Jaja!). Gracias por darme la libertad de elegir mi camino en todo momento y por manteneros detrás, siempre atentos. ¡No creáis que no lo veo! Normalmente, en estos casos, deberíais decir algo como “¡qué orgulloso/a estoy de mi niño!”, ¿no? Bueno, pues en

este caso el mérito es vuestro, así que: ¡¡¡Estoy muuuuy orgulloso de teneros como padres!!!
Y ahora, 27 años después, creo que habéis sido el mejor ejemplo que he podido tener, porque, como se suele decir “la culpa es de los padres”. Esta tesis es tan vuestra como mía.
¡¡¡Gracias padres!!! ¡¡¡Os quiero!!!

Y como no, a todo el resto de mi familia, de una parte y de la otra, porque ya lo dijo Don Vito, cuando todo lo demás falla, la familia permanece, para siempre. ¡¡Os quiero a todos!!
¡Primabea! ¡¡Espérame, que ya voy!!

También me gustaría hacer un pequeño homenaje a todas las mujeres que han pasado por mi vida. Algunas sólo pasaron, otras se quedaron más tiempo, pero sólo unas pocas han permanecido y ya no se irán jamás. ¡Gracias a todas! a pesar de mis muchas quejas, la vida sin vosotras no tendría ningún sentido.

En fin, no ha sido tan duro, ¿no? Ahora ya podéis cerrar este libracó, ¡que lo mejor ya ha pasado! ¡Jeje! Por último, quiero agradecer también a toda la gente que no aparece en estas páginas, a los que me han conocido, a los que he conocido, al lector, a todo aquel que algún día compartió una cerveza conmigo, a todo con el que he salido, aunque sólo haya sido una vez, a todas las mujeres que han sucumbido (ejem...), a todas las que me rechazaron, a todos mis profesores, a todos mis alumnos, a los curtidos y sufridos profesionales del grupo Soteras, vosotros hacéis que la facultad de Biología sea única y su bar, un centro de reuniones, Lourdes, Inés, José, Miguel, Gumer, Manel, sois todos increíbles, de vosotros he aprendido más que de algunos profesores, muchas gracias por todo! Y, en definitiva, a todo el que durante estos últimos años me ha enseñado algo, de algún modo, por poco que fuera, para bien y para mal, porque siempre he creído que lo que no te mata te hace más fuerte. Y hoy, gracias a vosotros soy una persona mucho más fuerte. Por todo esto, y por mucho más, ¡¡¡¡¡¡¡¡gracias a tod@s!!!!!!!!!!

¡¡¡¡¡Nos vemos en los bares!!!!

CONTENIDOS

CONTENIDOS	I
ABREVIATURAS	IX
INTRODUCCIÓN.....	1
1. MACRÓFAGOS	3
1.1. Origen de los macrófagos	3
1.2. Funciones biológicas del macrófago.....	6
2. PROLIFERACIÓN DE LOS MACRÓFAGOS	9
2.1. M-CSF (<i>Macrophage colony stimulating factor</i>)	9
2.1.1. Características bioquímicas	9
2.1.2. El receptor del M-CSF	10
2.1.3. La transducción de la señal a través del M-CSFR	11
2.1.3.1. Vía de supervivencia, PI3K/Akt(PKB)	13
2.1.3.2. Vía de proliferación, Raf-1/MEK/ERK	15
2.2. El ciclo celular.....	15
2.2.1. Complejos Ciclina-Cdk	17
2.2.2. Inhibidores de las Cdk (CDKI)	19
2.2.2.1. La familia INK4	20
2.2.2.2. La familia CIP/KIP	20
2.2.2.2.1. p21 ^{Waf-1/Cip-1}	20
2.2.2.2.2. p27 ^{Kip-1/Cip-2}	22
2.3. Inhibidores de la proliferación inducida por el M-CSF	23
3. ACTIVACIÓN DE LOS MACRÓFAGOS	24
3.1. Activación clásica, el IFN- γ	24
3.1.1. Características bioquímicas del IFN- γ	24
3.1.2. Transducción de la señal por el receptor del IFN- γ	25
3.1.3. Funciones fisiológicas del IFN- γ	27
3.2. Activación alternativa, la IL-4	28
3.2.1. Características bioquímicas de la IL-4.....	28
3.2.2. Transducción de la señal por el receptor de la IL-4.....	30
3.2.3. Funciones biológicas de la IL-4	33
4. <i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i> (MAPK)	34
4.1. Proliferación y MAPK	35

4.1.1. <i>Extracellular signal-Regulated Kinase (ERK)</i>	37
4.1.2. <i>c-Jun NH₂-terminal Kinase (JNK)</i>	39
4.1.3. p38 MAPK.....	40
4.2. Activación y MAPK	40
4.2.1. ERK MAPK.....	41
4.2.2. JNK MAPK.....	41
4.2.3. p38 MAPK.....	43
4.3. Fosfatasas de las MAPK (MKP)	45
OBJETIVOS	49
RESULTADOS.....	53
La IL-4 para la proliferación de los macrófagos dependiente de M-CSF induciendo p21 ^{Waf1} vía STAT6.	55
La inhibición de la expresión de las fosfatasas de las MAPK mediada por el IFN- γ alarga la actividad de las MAPK e inhibe la proliferación del macrófago en respuesta al M-CSF	61
JNK-1 es necesario para la respuesta del macrófago a la IL-4	66
DISCUSIÓN	71
CONCLUSIONES.....	85
ANEXO	89
REFERENCIAS	93

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1. Diferenciación del macrófagos	18
Figura 2. Funciones biológicas del macrófago tisular	21
Figura 3. Receptor del M-CSF	24
Figura 4. Señalización por el receptor del M-CSF	25
Figura 5. Puntos de control del ciclo celular	29
Figura 6. El ciclo celular	31
Figura 7. Señalización por el receptor del IFN- γ	39
Figura 8. Estructura molecular de la IL-4	42
Figura 9. Señalización por el receptor de la IL-4	45
Figura 10. Estructura de las proteínas Raf	49
Figura 11. Vía de activación de ERK	51
Figura 12. Vía de señalización de las Stress-Activated MAP Kinases JNK y p38	56
Figura 13. Vías de señalización utilizadas por el IFN- γ y la IL-4 para inhibir la proliferación inducida por el M-CSF	79
Figura 14. Esquema de la vía de acción de JNK-1 y STAT6	83
Tabla I. Miembros de la familia de las fosfatasas	59

ABREVIATURAS

AP-1, activating protein -1
APC, antigen-presenting cell
ARE, adenosine/uridine rich element
SK1, apoptosis signal-regulating kinase
ATF, activating transcription factor 2
ATM, ataxia telangiectasia mutated
ATR, ataxia telangiectasia and RAD3-related
BRCA, breast-cancer susceptibility gene
C/EBP, CCAAT enhancer binding protein
CAK, cell cycle-activated kinase
cAMP, cyclic adenosine monophosphate
CBP, CREB binding protein
CDC, cell division cycle
CDK, cyclin-dependent kinase
CDKI, Cdk inhibitor
CHK, checkpoint kinase
Cic, ciclina
CIS, cytokine-induced SH2
CRD, cystein rich domain
CREB, cAMP-response element binding protein
CSF, colony-stimulating factor
DAG, 1, 2-diacylglycerol
DSP, dual specificity phosphatase
Elk-1, ETS-domain protein
ERK, extracellular signal regulated kinase
GAS, gamma-interferon activated sequence
GDP, guanosine diphosphate
GEMM-CFU, granulocyte/erythrocyte/megakaryocyte/macrophage colony-forming unit
GM-CFU, granulocyte-macrophage colony-forming unit
GM-CSF, granulocyte-macrophage colony stimulating factor
GM-CSFR, granulocyte-macrophage colony stimulating factor receptor
GSK, glycogen synthase kinase
GTP, guanosine triphosphate
HB-EGF, heparin binding epidermal growth factor
HSP, heat shock protein
ICAM, intercellular adhesion molecule
IFN, interferon
IFN γ R, interferon gamma receptor
IgG, immunoglobulin G
IKK, I-kappa-b kinase

IL-X, interleukin X
IL-XR, interleukin X receptor
IL-Xa, interleukin X antagonist
IRAK, IL-1R-associated kinase
IRF, immediate-early inducible factor
IRS, insulin receptor substrate
ISRE, interferon-stimulated response elements
JAB, JAK binding
JAK, janus kinase
JNK, c-jun NH2-terminal kinase
LDL, low density lipoprotein
LPS, lipopolysaccharide
MAPK, mitogen-activated protein kinase
MAPKAPK2, MAPK-activated protein kinase -2
MAPKK, MAPK kinase
MAPKKK, MAPKK kinase
M-CFU, macrophage colony forming unit
M-CSF, macrophage colony stimulating factor
M-CSFR, macrophage colony stimulating factor receptor
MDM2, murine double minute 2
MEK, mitogen extracellular signal-related kinase
MHC, major histocompatibility complex
MKB, MAPK binding domain
MKP, MAPK phosphatase
MLK, mixed-lineage protein kinase
MNK, MAPK interacting kinases
MR, mannose receptor
MSK, mitogen- and stress-activated kinase
NES, nuclear export signal
NF-AT, nuclear factor activator of T lymphocytes
NF- κ B, nuclear factor immunoglobulin kappa chain enhancer B cell transcription
NK, natural killers
NLS, nuclear localization signal
NO, nitric oxide
NOS2, nitric oxide synthase -2
PCNA, proliferating cell nuclear antigen
PDGF, platelet derived growth factor
PDK, phosphoinositide-dependent kinase
PH, pleckstrin homology
PI, phosphatidylinositol
PI3K, phosphoinositide 3-kinase
PI (4) P, phosphatidylinositol 4 monophosphate

PI (4, 5) P2, phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate
PIP₃, (phosphatidylinositol (3, 4, 5)-triphosphate
PKA, protein kinase A
PKB, protein kinase B
PKC, protein kinase C
PLC, phospholipase C
pRb, retinoblastoma tumor suppression gene
PSP, serine/threonine-specific phosphatase
PTB, phosphotyrosine binding domain
PTEN, phosphatase and tensin homologue
PTP, tyrosine-specific phosphatase
PTPase, phosphotyrosine protein phosphatase
RBD, ras binding domain
RSK, pp90 ribosomal S6 kinase
RTK, receptor tyrosine kinase
SAPK, stress activated protein kinase
SHX, Src homology domain X
SHIP, SH2-containing inositol phosphatase
SHP, Src-homology-domain-containing protein tyrosine phosphatase
SOCS, suppressors of cytokine signalling
SRF, serum response factor
SSI, STAT-induced STAT-inhibitor
STAT, signal transducer and activator of transcription
TCF, ternary complex factor
TCR, lymphocyte T cell receptor
TGF, transforming growth factor
TLR, Toll-like receptor
TNF, tumor necrosis factor
Tpl-2, tumor progression locus 2
VCAM, vascular cell adhesion molecule
Waf, wild-type p53-activated factor

INTRODUCCIÓN

1. MACRÓFAGOS

Los macrófagos son células fagocíticas mononucleares involucradas en un gran número de funciones dentro del sistema inmunitario. Son críticas tanto para el mantenimiento de la homeostasis en el organismo (reparación tisular, angiogénesis, eliminación de células apoptóticas, etc.) como en la lucha y establecimiento de defensas contra agentes patógenos (Mantovani, Sozzani et al. 2002).

En presencia de un estímulo mitogénico los macrófagos son capaces de proliferar pero, a diferencia de otras células del sistema inmunitario, los estímulos como las citocinas, los microbios o los agentes proinflamatorios detienen dicha proliferación e inducen la activación del macrófago que ahora pasará a desarrollar sus actividades funcionales específicas (Frantz, Vincent et al. 2005). Por el contrario, en ausencia de estímulos el macrófago entra inicialmente en un estado de quiescencia en el que es capaz de mantenerse durante un corto período de tiempo antes de inducir su muerte por apoptosis contribuyendo así a la homeostasis de las células efectoras en el organismo (Celada and Nathan 1994; Xaus, Comalada et al. 2001).

1.1. Origen de los macrófagos

Todas las células del torrente sanguíneo proceden de un precursor común presente en la médula ósea a partir del cual se diferencian y maduran siguiendo un proceso conocido como hematopoyesis (Ogawa 1993). Dicho proceso parte de las capacidades autoregeneradora y diferenciadora de estas células precursoras pluripotentes gracias a la cual se consigue un recambio celular adecuado. Todos estos procesos se coordinan a través de la interacción con otras células y con componentes de la matriz extracelular del entorno, así como con factores solubles ya sean secretados localmente o provenientes del torrente sanguíneo (Compston 2002).

En una primera fase del desarrollo de una célula sanguínea, el precursor hematopoyético permanece en la médula ósea en estado de quiescencia. En respuesta a factores de crecimiento específicos, interleucinas y hormonas, estas células experimentan un primer proceso de diferenciación consistente en un direccionamiento por el cual la célula madre pierde su capacidad autoregeneradora y se diferencia a otra célula un poco más especializada que su predecesora pero que aún mantiene su capacidad de diferenciación. A continuación este precursor sufre un

proceso de maduración gracias al cual acabará de diferenciarse en un linaje celular específico.

Existen diferentes factores de crecimiento, hormonas y citocinas solubles en el capaces de actuar sobre estas células madre hematopoyéticas, aunque los factores estimuladores de colonias (CSF, *colony-stimulating factor*) son sin duda los más importantes en el desarrollo de los diferentes linajes de las células sanguíneas (Watowich, Wu et al. 1996).

En una primera etapa en la médula ósea las interleucinas 1, 3 y 6 (IL-1, IL-3, IL-6) inducen una división desigual en la célula progenitora hematopoyética que dará lugar a una nueva célula madre y una célula pluripotente mieloide llamada GEMM-CFU (*granulocyte-erythrocyte-megakaryocyte-macrophage colony-forming unit*). Este precursor genérico, en presencia de IL-1 e IL-3, adquirirá un nuevo nivel de especialización como precursor común de los macrófagos y los granulocitos conocido como GM-CFU (*granulocyte-macrophage colony-forming unit*) el cual, a su vez, se especializará en un precursor M-CFU (*macrophage colony-forming unit*) en presencia de IL-3, GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) y M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*) (Figura 1). A partir de este precursor M-CFU pueden derivarse tres vías distintas de diferenciación: osteoclastos, células dendríticas mieloides o macrófagos. Para diferenciarse en la línea de macrófagos este precursor debe encontrarse en presencia de M-CSF gracias al cual la unidad M-CFU se diferenciará primero en monoblasto, después en promonocito y por último en monocito.

Ya diferenciados, los monocitos circulan por el torrente sanguíneo y son capaces de alcanzar cualquier parte del organismo a través del sistema periférico capilar, donde gracias a la interacción entre moléculas de adhesión como las integrinas y las selectinas podrán entrar en los tejidos (Penna, Vulcano et al. 2002). Una vez allí, el monocito entra en una última etapa de diferenciación mediante la cual adquirirá ya la morfología y bioquímica propias de un macrófago, tales como un aumento del contenido lisosomal, de la cantidad de enzimas hidrolíticas y del número y tamaño de las mitocondrias, así como de su metabolismo energético y su capacidad fagocítica (Valledor, Borrás et al. 1998; Furukawa 2002). A pesar de que estos macrófagos tisulares mantienen cierta capacidad proliferativa, la médula ósea de un individuo adulto produce aproximadamente 5×10^9 macrófagos al día. Si a esto sumamos el hecho de que la vida media de un macrófago tisular puede llegar a ser de varios años, es crucial para el mantenimiento de la homeostasis que estas células

sean capaces de entrar en apoptosis sin necesidad de recibir ningún tipo de estímulo (Xaus, Comalada et al. 2001).

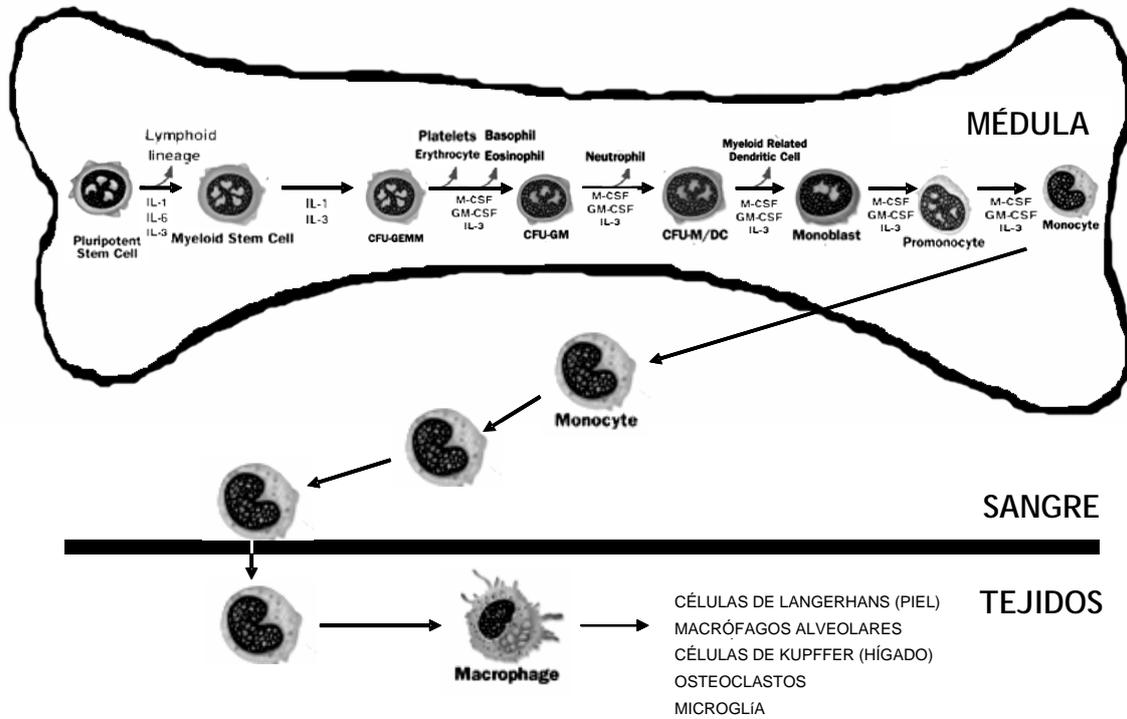


Figura 1. Diferenciación del macrófago. El crecimiento y diferenciación del macrófago depende de citocinas y factores de crecimiento específicos de linaje. Después de ser distribuidos a través del torrente sanguíneo, los monocitos entran en todos los compartimentos tisulares del cuerpo donde dejan de proliferar y se diferencian. M-CSF, *macrophage colony-stimulating factor*; GM-CSF, *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*; IL, interleucina; GEMM-CFU, *granulocyte-erythrocyte-megakaryocyte-macrophage colony-forming unit*; GM-CFU, *granulocyte-macrophage colony-forming unit* and M-CFU, *macrophage colony-forming unit*.

La función de un macrófago tisular así como su morfología depende directamente del tejido en el que se halle. De esta manera encontramos microglía en el sistema nervioso central, osteoclastos en el hueso, células de Kupffer en el hígado, macrófagos alveolares en los pulmones o células de Langerhans en la dermis. En este aspecto existen diversos factores de transcripción directamente involucrados en la expresión de genes de diferenciación específicos de linaje (Valledor, Borrás et al. 1998). Así, encontramos genes clásicamente asociados al fenotipo de macrófago como el receptor para el M-CSF, la lisozima, las moléculas de adhesión como el CD11b o el CD18, los receptores para el lipopolisacárido (LPS), el interferon gamma

(IFN- γ), los receptores *scavenger*, o aquellos para las fracciones constantes de las IgG.

1.2. Funciones biológicas del macrófago

Los macrófagos juegan un papel crítico tanto en la respuesta inmunitaria innata como en la adaptativa reconociendo, fagocitando y limpiando el organismo de agentes patógenos y cuerpos apoptóticos. Participan modulando la respuesta inmunitaria a través de la producción de citocinas y quimiocinas, la presentación antigénica y la activación y diferenciación de los linfocitos T. Por otro lado también están involucrados en la resolución de la inflamación, promoviendo directamente la reparación de los tejidos dañados. En este contexto son capaces de inducir la síntesis de proteínas de la matriz extracelular, la angiogénesis, la proliferación de fibroblastos circundantes y de fagocitar restos y/o fragmentos celulares (Stout and Suttles 2004).

La diferenciación terminal del macrófago incluye una elevada expresión de receptores de membrana para la fracción constante de las IgG. Esto permite a la célula reconocer y unir aquellos patógenos que han sido previamente opsonizados y así poder fagocitarlos. El macrófago/monocito juega un papel importante en la producción de citocinas, radicales libres de oxígeno, proteasas y factores del complemento que, juntamente con los anticuerpos producidos por las linfocitos B podrán opsonizar a dichos patógenos para luego ser reconocidos por los receptores de membrana del macrófago (Frantz, Vincent et al. 2005).

Así, siguiendo una secuencia temporal, en una primera fase de la infección, estas células son determinantes para el reconocimiento y eliminación de los patógenos, actuando principalmente como células fagocíticas y/o microbicidas (respuesta innata), mientras que, en una segunda fase actuarían tanto como células efectoras, produciendo citocinas y quimiocinas proinflamatorias, como presentando antígenos, y activando así, a los linfocitos T (respuesta adaptativa).

Una gran parte de moléculas presentes en la superficie de los patógenos (patrones moleculares asociados a patógenos) son capaces de inducir en el macrófago una activación conocida como “activación clásica”. El mejor ejemplo de ello lo encontramos con el LPS, molécula presente en la pared de bacterias Gram-negativas, o en un ambiente de citocinas tipo Th1 (aquellas secretadas por linfocitos activados con IFN- γ o IL-12) como el que da el IFN- γ o la IL-2. Estos macrófagos activados

clásicamente producirán ahora citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF- α), la IL-1, la IL-6, así como agentes antiproliferativos y microbicidas como la lisozima o el óxido nítrico (NO). Paralelamente, las citocinas tipo Th1 aumentan los niveles de expresión del complejo de histocompatibilidad (MHC) de clase II y del CD86, potenciando así su capacidad presentadora de antígenos a los linfocitos T. Sin embargo, un proceso inflamatorio persistente suele ser contraproducente ya que tiende a dañar los tejidos y en estos casos el sistema inmunitario debe desarrollar mecanismos antiinflamatorios (Gordon 2003).

En presencia de citocinas tipo Th2 (secretadas por linfocitos activados por la IL-4) como la IL-4 o la IL-13, se induce en el macrófago una activación conocida como “alternativa”. A diferencia de los macrófagos activados clásicamente, éstos no son capaces de producir NO a partir de L-Arginina y tampoco consiguen controlar el crecimiento de patógenos intracelulares (Kropf, Fuentes et al. 2005). En contrapartida, son capaces de producir una elevada cantidad de Arginasa 1, enzima que también metaboliza la L-arginina obteniendo esta vez como producto final prolina, glutamato y poliaminas. Conjuntamente, estos metabolitos de la L-arginina favorecen la reparación tisular, así, la prolina actúa como precursora del colágeno (Hesse, Modolell et al. 2001) y las poliaminas han sido ampliamente relacionadas con procesos de proliferación y diferenciación (Kramer, Chang et al. 2001), e incluso con la inhibición de la producción de NO por macrófagos activados con LPS (Southan, Szabo et al. 1994). Además, estos macrófagos muestran una elevada capacidad endocítica y fagocítica. Así, estos macrófagos alternativamente activados son capaces de proteger los tejidos circundantes de procesos inflamatorios prolongados o de respuestas inmunes agresivas induciendo la reparación y/o remodelación del tejido.

En una visión global de la respuesta inmunitaria, vemos que el macrófago, como célula efectora y fagocítica, es capaz de llevar a cabo la eliminación de los agentes patógenos, ya sea de manera directa mediante fagocitosis como indirecta a través de la activación de los linfocitos T. Posteriormente, el propio macrófago es responsable de inducir la reparación de los daños causados durante la respuesta inflamatoria completando así la remodelación del tejido afectado y eliminando además cualquier residuo celular producido durante el desarrollo de la respuesta inmunitaria (Figura 2).

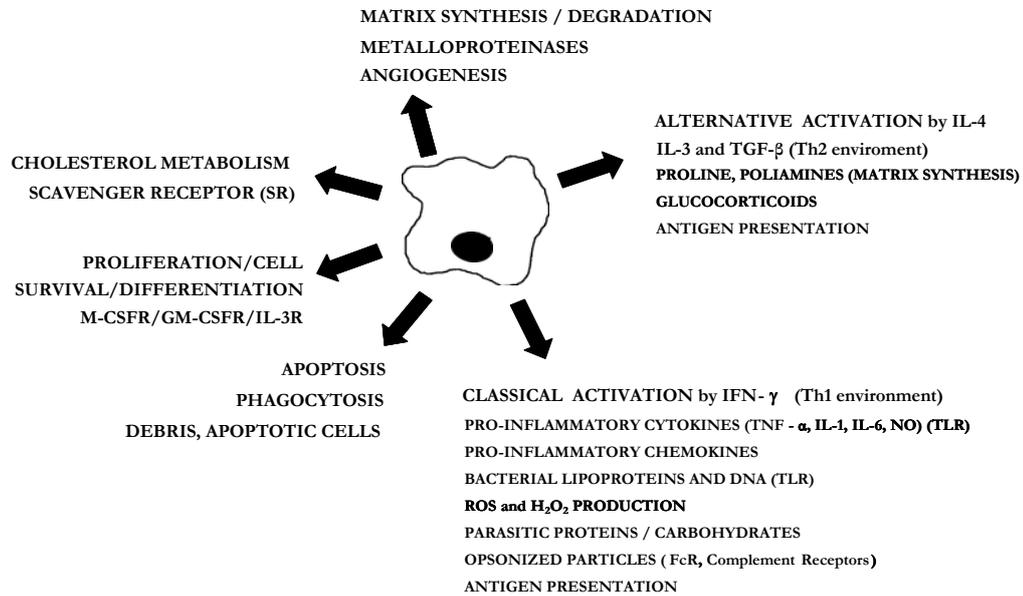


Figura 2. Funciones biológicas del macrófago tisular. Dependiendo del estímulo recibido, los macrófagos pueden proliferar, activarse o morir por apoptosis. IL, interleucina; TGF- β , *transforming growth factor- β* ; IFN- γ , interferón- γ ; TNF- α , factor de necrosis tumoral- α ; NO, óxido nítrico; TLR, *Toll-like receptor*; M-CSFR, *macrophage colony stimulating factor receptor*; GM-CSFR, *granulocyte-macrophage colony stimulating factor receptor*, IL-3R, receptor de la interleucina-3.

Por último, el macrófago está también implicado en procesos de eliminación de restos celulares y células apoptóticas. Este proceso está directamente relacionado con la homeostasis y metabolismo del hierro en el cuerpo, ya que, por un lado, el macrófago es el encargado de fagocitar a los eritrocitos envejecidos que van a morir al bazo, y a su vez, es también la célula responsable de transferir hierro a los eritroblastos en los centros eritroblásticos de la médula ósea, completando así su ciclo de reciclaje. Además, gracias al receptor *scavenger A*, encargado de unir proteínas modificadas químicamente en los lugares de inflamación, esta célula reconoce gran variedad de lípidos y lipoproteínas favoreciendo finalmente la absorción de lipoproteínas acetiladas de baja densidad (LDL) y contribuyendo así al metabolismo del colesterol en el cuerpo.

2. PROLIFERACIÓN DE LOS MACRÓFAGOS

Llamamos proliferación celular al conjunto de mecanismos que llevan a una célula a dividirse en dos células hijas cada una de las cuales contiene toda la información genética de su predecesora. El M-CSF es un factor de crecimiento necesario para la proliferación y diferenciación del macrófago, el monocito y sus precursores más inmediatos. Así, los procesos de división celular están finamente regulados por una serie de factores tanto extrínsecos (factores de crecimiento, señales mitogénicas, etc.) como intrínsecos (reguladores del ciclo celular).

2.1. M-CSF (*Macrophage colony stimulating factor*)

2.1.1. Características bioquímicas

El M-CSF, también llamado CSF-1, es el principal factor de crecimiento, diferenciación y supervivencia del macrófago y sus precursores. Es una sialoglicoproteína homodimérica sintetizada por varios tipos celulares como las células endoteliales, los fibroblastos, las células del estroma de la médula ósea, etc. (Fixe and Praloran 1997), e incluso por los propios macrófagos, monocitos y linfocitos T y B, que son capaces de sintetizarlo una vez activados.

A pesar de que el M-CSF está codificado en un solo gen tanto en humanos como en ratones, se han descrito varias formas distintas de procesamiento de su RNA mensajero (*splicing*) que dan lugar tanto a transcritos con distinta estabilidad como a diferentes procesamientos posttraduccionales de la proteína obtenida. Así, encontramos tres posibles formas finales de la molécula de M-CSF en función de las modificaciones que sufran y su posterior proteólisis. Dos de ellas (glicoproteína y proteoglicano) serán secretadas al medio para actuar de forma autocrina y/o paracrina, pudiendo el proteoglicano ser almacenado en la matriz extracelular del tejido como reservorio para un futuro uso. Existe también una tercera forma no proteolizada (glicoproteína) que permanecerá anclada en la membrana lipídica de la célula productora. Esta forma del M-CSF de membrana podría tener un papel importante en las interacciones célula-célula o bien podría ser liberada de forma local mediante una posterior proteólisis mediante la proteína quinasa C (PKC) (Stein and Rettenmier 1991; Stanley, Berg et al. 1997).

A nivel funcional, el M-CSF desarrolla la principal de sus funciones de manera local, y se ha descrito que una ausencia prolongada de este estímulo provoca la

muerte del macrófago por apoptosis. También se ha demostrado la implicación del M-CSF en el desarrollo del linaje monocítico con ratones Op/Op que, debido a una mutación en la región codificante del gen del M-CSF, carecen de una forma activa de la proteína. Estos ratones sufren una grave deficiencia en la producción de osteoclastos y macrófagos y, en consecuencia, muestran un fenotipo de osteopetrosis, ausencia de dientes, remodelación ósea anormal, menor masa corporal, fertilidad reducida y una menor esperanza de vida, algunos de los cuales pueden ser revertidos mediante la inyección de M-CSF recombinante (Wiktor-Jedrzejczak and Gordon 1996). Sin embargo, la osteopetrosis y las anomalías hematológicas de la sangre periférica, la médula ósea y el bazo no lograron ser revertidas, demostrando la importancia de este factor en el desarrollo del linaje hematopoyético (Dai, Zong et al. 2004).

2.1.2. El receptor del M-CSF

Los efectos biológicos del M-CSF están mediados por un único receptor de alta afinidad llamado M-CSFR o CD115 y que está codificado por el protooncogén *c-fms* (Stanley, Berg et al. 1997). EL M-CSFR, que pertenece a los receptores tirosina quinasa de clase III (RTK), es una glicoproteína transmembrana con una fracción extracelular N-terminal glicosilada que contiene 5 dominios inmunoglobulina (Ig) repetidos y que es la que propiamente interaccionará con el factor de crecimiento. También lo forman un pequeño dominio transmembrana, un dominio yxtamembrana, dos dominios quinasa intracelulares divididos por un inserto quinasa, y un dominio C-terminal (Wang, Myles et al. 1993; Reilly 2002) (Figura 3).

La activación del receptor viene dada por la unión del M-CSF con su dominio extracelular, lo cual induce la dimerización del receptor de forma no covalente. Ahora, estos dos receptores son capaces de fosforilarse en sus residuos tirosina de forma cruzada, lo que llevará a la estabilización del propio receptor en su forma activa y a la creación de residuos fosfotirosina. Estos residuos conforman lugares de unión para otras proteínas que iniciarán la transducción de la señal al interior de la célula. Finalmente el complejo ligando-receptor será internalizado y degradado en los lisosomas (Hamilton 1997).

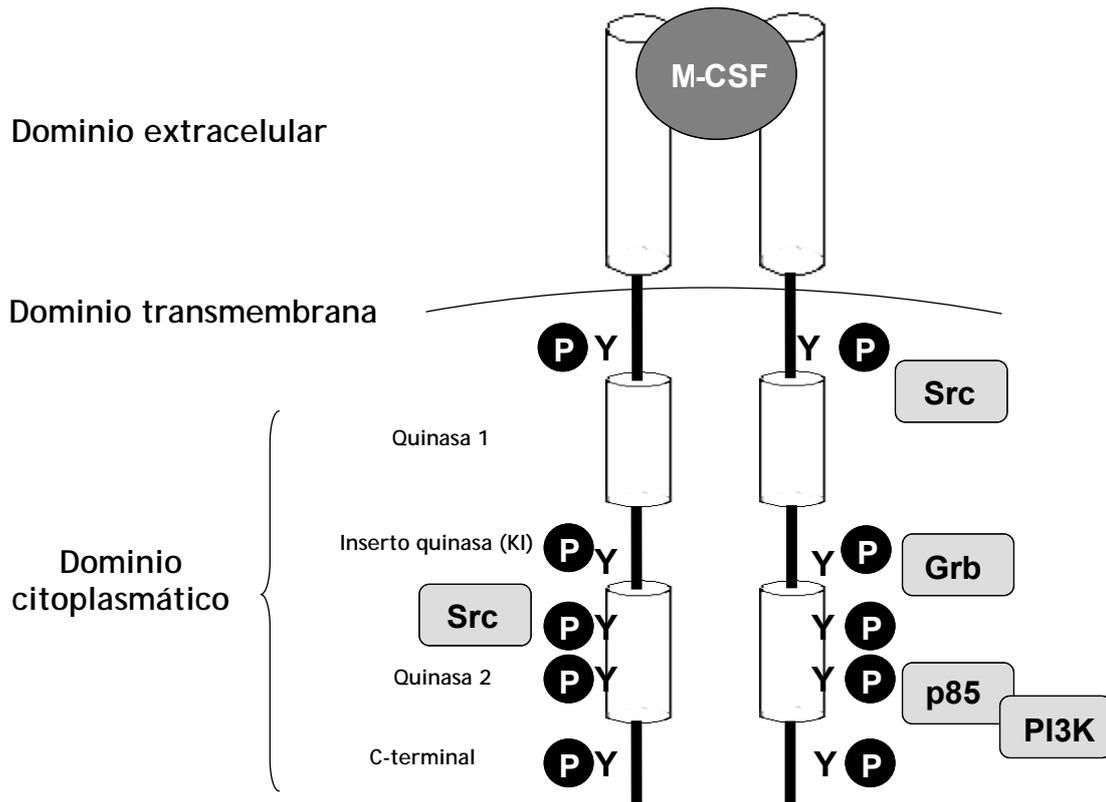


Figura 3. Receptor del M-CSF. M-CSF, *macrophage colony-stimulating factor*; PI3K, fosfatidilinositol 3-quinasa; Y, residuo tirosina y P, grupo fosfato.

2.1.3. La transducción de la señal a través del M-CSFR

El receptor del M-CSF presenta varias regiones susceptibles de fosforilación tanto en su dominio yuxtamembrana como en el citoplasmático. La tirosina Y559 se ha visto asociada con miembros de la familia Src a través de dominios de interacción proteína-proteína homólogos de Src (SH2 y SH3). La tirosina Y697, en el inserto quinasa (KI), interacciona con las proteínas adaptadoras Grb2 y Shc quienes a través de su dominio SH2 lo harán con la subunidad reguladora (p85) de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K). p85 a su vez interacciona con el residuo Y721 de la cola citoplasmática del receptor y con p110, subunidad catalítica de PI3K. Otras moléculas asociadas con la transducción de señal por M-CSFR son la fosfolipasa $C\gamma$ (Y706) y las proteínas transductoras de la señal y activadoras de la transcripción 1 y 3 (STAT1 y STAT3) (Bourgin, Bourette et al. 2000; Pixley and Stanley 2004) (Figura 4).

Al igual que el resto de actividades biológicas, la proliferación y la supervivencia requieren también de mecanismos precisos y bien regulados capaces de

controlarlas o inhibirlas. Está descrito que el M-CSF tiene una vida media corta, y además de la internalización del complejo ligando-receptor, el M-CSFR presenta también mecanismos de regulación por defosforilación. Así, fosfatasas como SHP-1 (*Src-Homology-domain-containing Protein tyrosine phosphatase*), SHIP (*SH2-containing Inositol Phosphatase*) o PTPase (*Phosphotyrosine Protein Phosphatase*) parecen estar relacionadas con la defosforilación de la cola citoplasmática del receptor del M-CSF en sus residuos tirosina (Suzu and Motoyoshi 2002). Otro mecanismo existente para impedir la unión de un factor de crecimiento a su receptor correspondiente es la secreción de receptores solubles que pueden unir al ligando, impidiendo así su asociación con el receptor celular unido a membrana (Iwasaki, Shimoda et al. 1999).

Visto esto, existen dos vías principales de acción a través del recetor del M-CSF en los macrófagos, la vía de proliferación mediada por la MAPK ERK y la de supervivencia a través de la PI3K.

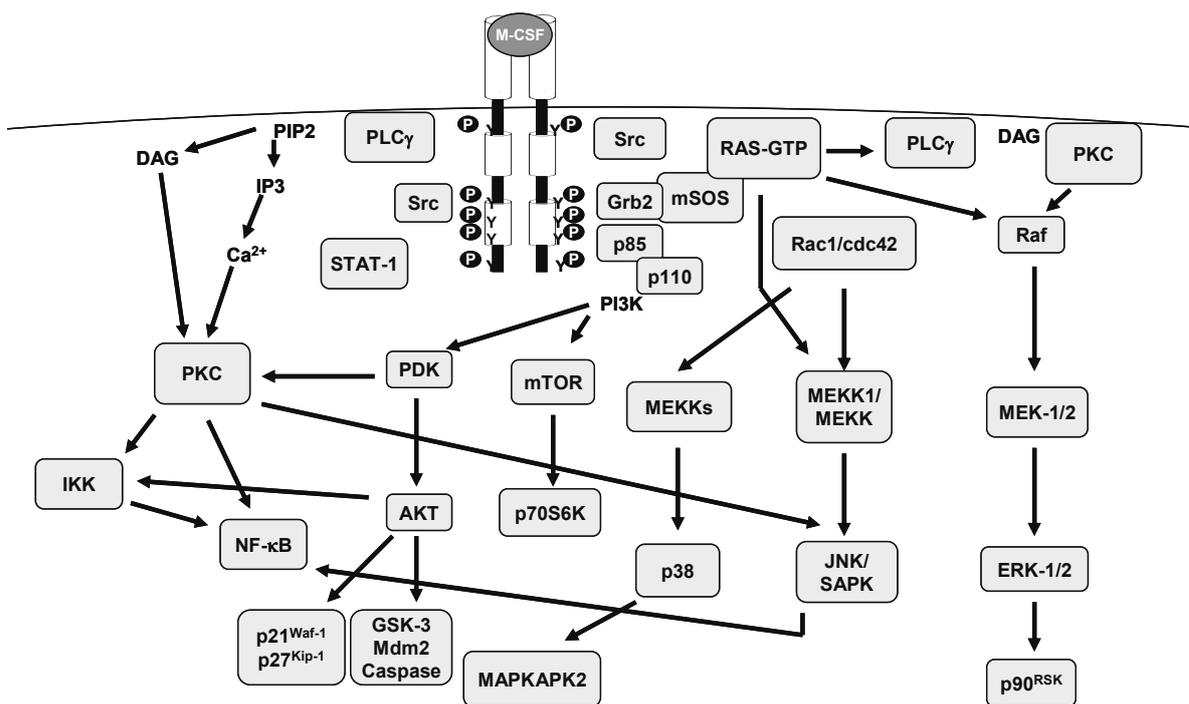


Figura 4. Señalización por el receptor del M-CSF. La señalización por el M-CSF induce la cascada de fosforilación de la MAPK ERK, Raf-1/MEK/ERK-1,2, así como de las MAPK JNK y p38, que también son activadas por MEKK. La hidrólisis de los fosfolípidos por la PLC genera un aumento del calcio y los niveles de DAG, activando a las PKC responsables del incremento de los niveles de NF-κB a través de la fosforilación de IKK. MEK, *mitogen extracellular signal-related kinase*; ERK, *extracellular regulated kinase*; JNK, *c-jun NH2-terminal kinase*; MEKK, *MEK kinase*; MAPKAPK2, *MAPK-activated*

protein kinase 2; PLC, phospholipase C; DAG, 1,2-diacylglycerol; PKC, protein kinase C; NF-κB, nuclear factor immunoglobulin kappa chain enhancer B cell transcription; IKK, I-kappa-b kinase; STAT-1, signal transducer and activator of transcription-1; PDK, phosphoinositide-dependent kinase; PI3K, phosphoinositide-3 kinase; GSK, glycogen synthase kinase; PIP2, phosphatidylinositol-2-trisphosphate and IP3, inositol-3-phosphate.

2.1.3.1. Vía de supervivencia, PI3K/Akt(PKB)

Una vez que el M-CSF se une a su receptor y éste fosforila los residuos tirosina de su cola citoplasmática se produce un rápido incremento en los niveles de actividad de la PI3K. La vía de señalización de la PI3K/Akt rige diversos procesos celulares como la proliferación y la tasa de supervivencia o la remodelación del citoesqueleto y el tráfico de orgánulos intracelulares (Koyasu 2003). Las quinasas asociadas a esta vía contienen dominios de homología con la plecstrina (PH) que son capaces de unir lípidos fosfoinositol producidos en la membrana.

La PI3K es un quinasa de lípidos que consta de una subunidad reguladora (p85) con dominios SH2 y SH3 y una subunidad catalítica (p110). La fosforilación de la subunidad p85 lleva a la activación de la unidad catalítica p110, responsable de fosforilar grupos 3'-OH (anillos inositol) de fosfolípidos inositol (Fruman, Meyers et al. 1998). Hasta la fecha se han descrito nueve isozimas distintas de la PI3K dependiendo de la isoforma de cada subunidad que se use para formar el enzima. Estas 9 isozimas se clasifican en tres grandes grupos. Los grupos I y II se encuentran sólo en metazoos mientras que el grupo III también está presente en eucariotas unicelulares (Wymann and Pirola 1998).

Las PI3K del grupo I se caracterizan por producir fosfatidilinositol(3,4,5)trifosfato (PIP₃) y por tener dos dominios SH2 en su subunidad reguladora para interactuar con residuos tirosina fosforilados de receptores de factores de crecimiento y moléculas adaptadoras (Arcaro, Volinia et al. 1998). También son capaces de producir PI-3-P y PI-3,4-P₂ a partir de fosfatidilinositol (PI) y PI(4)P respectivamente. Las del grupo II tienen un dominio Ct C2 capaz de unir fosfolípidos de manera dependiente de Ca²⁺ (Arcaro, Zvelebil et al. 2000). Este grupo se ha visto asociado a procesos de tráfico de membrana (Zhang, Hogan et al. 1998). La biosíntesis de PI(4,5)P₂ (PIP₂) también cataliza la formación de PIP₃ por la fosfolipasa C (PLC), quien a su vez inicia el flujo de Ca²⁺ y del 1,2-diacilglicerol (DAG) activando así la PKC (Rhee and Bae 1997).

Existen diversas moléculas de señalización con un dominio homólogo de la plecstrina (PH) reguladas por la vía de la PI3K. La proteína quinasa B (PKB), también llamada Akt, es el principal y más directo sustrato de la PI3K ya que sus dominios PH unen $PI(3,4)P_2$ y $PI(3,4,5)P_3$ (Alessi, Andjelkovic et al. 1996).

La PKB/Akt es un serina-treonina quinasa activada por la fosforilación de la treonina 308 de su dominio catalítico y la serina 473 en su extremo C-terminal (Alessi, Andjelkovic et al. 1996). Akt se ha asociado con la regulación de la supervivencia celular, el transporte y metabolismo de la glucosa. Además, interviene en la inhibición de la apoptosis de varios tipos celulares y en distintas situaciones de inducción de muerte celular incluyendo la ausencia de factores de señalización externos, el estrés osmótico y oxidativo, la radiación ultravioleta o el uso de drogas quimioterapéuticas.

Uno de los primeros sustratos de Akt relacionados directamente en procesos de supervivencia celular fue Bad, gen proapoptótico miembro de la familia de genes Bcl-2, que es activado por fosforilación. Además, Akt también inhibe numerosos sustratos como la glicógeno sintasa 3 (GSK3) impidiendo así la inactivación y la degradación de c-myc y de la ciclina D; el Foxo-3 (*forkhead transcription factor -3*) que está implicado en la expresión de los ligandos de Fas (Kops and Burgering 1999); la $I\kappa B$, permitiendo así a NF- κB inducir la expresión de proteínas antiapoptóticas (Kane, Shapiro et al. 1999); y, en humanos, a la caspasa 9, implicada en la inducción de apoptosis mediada por factores mitocondriales (Blume-Jensen and Hunter 2001). Por otro lado, Akt puede también fosforilar a Mdm2 quien entrará al núcleo induciendo un descenso en los niveles de p53. Esto provoca que el complejo Mdm2-p53 salga del núcleo y p53 sea degradado vía proteasoma en el citoplasma (Zhou, Liao et al. 2001).

Akt también también es capaz de translocarse al núcleo y fosforilar allí a diferentes factores de transcripción, modulando así la progresión a través del ciclo celular, la supervivencia y el crecimiento celular (Testa and Bellacosa 2001). De esta manera, Akt puede regular negativamente a inhibidores de cdk como p21^{Waf-1} o p27^{Kip-1}, fosforilándolos e induciendo así su translocación al citoplasma (Shin, Yakes et al. 2002).

La vía PI3K puede ser regulada negativamente por el cAMP (Kim, Park et al. 2001) y por el supresor de tumores PTEN (*phosphatase and tensin homologue*) (Leslie, Gray et al. 2000). PTEN es una fosfatasa dual de lípidos y proteínas que actúa directamente sobre PI3K alterando su estado de fosforilación e inhibiendo así su actividad.

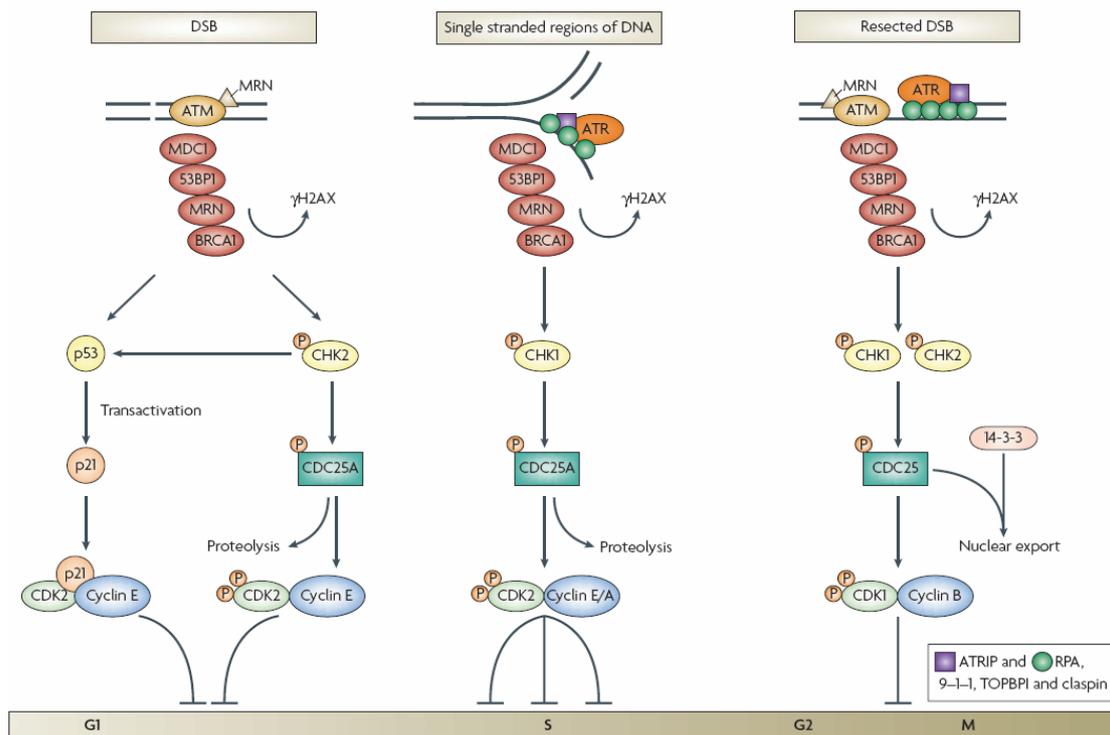
2.1.3.2. Vía de proliferación, Raf-1/MEK/ERK

Una de las principales vías inducidas por la acción del M-CSF es la de las MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) Raf→MEK→ERK-1/2 a la que clásicamente se le ha otorgado un papel crucial en procesos de proliferación celular. De este tema, sin embargo, se hablará más extensamente en el punto 4 de esta introducción.

2.2. El ciclo celular

El ciclo celular es un proceso universal gracias al cual las células se dividen en presencia de estímulos mitogénicos manteniendo su integridad genómica. En los mamíferos consiste de 4 fases consecutivas: G₁, donde la célula prepara su maquinaria para la posterior replicación del DNA; S, en la que se produce la replicación de la información genómica; G₂, que es una interfase de preparación para la mitosis; y M, fase en la que se produce propiamente la división nuclear y celular. Esta fase M a su vez se divide en otras 4, llamadas profase, metafase, anafase y telofase en las que los cromosomas se compactan y agrupan por parejas, para, posteriormente, acabar repartiéndose equitativamente en las dos células resultantes. Una vez completada la citocinesis (separación física de las dos células hijas), cada una de ellas podrá ahora entrar en un nuevo ciclo o bien, en ausencia de estímulo mitogénico, permanecer en un estado de quiescencia llamado fase G₀.

Los macrófagos necesitan el M-CSF durante casi la totalidad de la fase G₁, pero una vez han entrado en S son capaces de completar el resto del ciclo en ausencia de estímulo mitogénico. La duración de las fases G₁, S, G₂ y M es, respectivamente, 12, 6, 4 y 2h en los macrófagos (Rock, Cleveland et al. 1992). La transición de una fase a otra es un proceso ordenado y bien regulado que cuenta con diferentes puntos de control. Dichos puntos de control o *checkpoints* se definen como cascadas de señalización capaces de retrasar o incluso detener la progresión del ciclo en respuesta a un posible daño genético o a un error ocurrido durante alguna de las fases. De esta manera, la célula dispone de un mayor lapso de tiempo para solventar el problema o, en caso de que éste fuese irreparable, no continuar con el ciclo y evitar así una división anormal (Lukas and Bartek 2004) (Figura 5).



©Adapted from Markus Löbrich and Penny A. Jeggo, Nat Rev Cancer. 2007 Nov;7(11):861-9

Figura 5. Puntos de control del ciclo celular. El ciclo celular está finamente regulado de manera que se asegure una división celular completa con una repartición equitativa del contenido genético en las dos células hijas. ATM, *ataxia telangiectasia mutated*; ATR, *ataxia telangiectasia and RAD3-related*; MNR, complejo NBS1-MRE11-RAD50; ATRIP, *ATR-interacting protein*; RPA, complejo RAD17-RFC2-5; 9-1-1, complejo AD9-HUS1-RAD1; MDC1, *mediator of DNA damage checkpoint protein 1*; P53BP1, *p53 Binding protein 1*; BRCA1, *breast-cancer susceptibility gene 1*; Chk1 and Chk2, *checkpoint kinase 1 and 2*; CDC25, *Cell division cycle 25*; Cdk, *cyclin-dependent kinase*; γ H2AX, *gamma-histone 2AX*.

El punto de control previo a la transición G_1/S es el responsable de comprobar el estado del material genético de la célula, de manera que, si existiese un posible daño en el DNA, la cascada de señalización iniciada en este punto permitiría a la célula disponer de tiempo para repararlo. Una rotura en el material genético provoca un arresto de p53 lo que favorece su fosforilación por Chk2 y consecuente estabilización. p53 inducirá ahora la transcripción de múltiples factores, entre los que destacan p21^{Waf-1} y Mdm2. p21^{Waf-1} es un inhibidor de los complejos Cdk-ciclina de G_1 , imprescindibles para la progresión a S, mientras que Mdm2 actúa como molécula autoreguladora de la vía de señalización de p53 inhibiendo su transcripción y uniéndose directamente a ella para favorecer su ubiquitinización (Levine 1997;

Agarwal, Mathur et al. 1999). Conjuntamente, el acúmulo de p21^{Waf-1} y la fosforilación por Chk2 de la fosfatasa Cdc25 encargada de defosforilar a Cdk2, activándola, inhibirán al complejo Ciclina E-Cdk2, impidiendo así la progresión a S (Lobrich and Jeggo 2007).

A diferencia de los de la fase G₁, los mecanismos de control de S no están tan bien descritos. Se cree, sin embargo, que existen tres factores que dispararían mecanismos de restricción en esta fase del ciclo, (1) defectos en la horquilla de replicación o en alguno de sus componentes; (2) roturas de doble cadena en el DNA independientes de la horquilla de replicación; (3) ya en el umbral de transición entre S y G₂/M existe otro mecanismo encargado de evitar que la célula empiece a dividirse antes de que su material genético se haya duplicado por completo.

El punto de control de G₂/M es el responsable de evitar la entrada en mitosis de aquellas células que, habiendo sufrido algún daño durante las fases previas del ciclo, no hayan sido capaces de repararlo. De una manera similar a cómo ocurre en la transición G₁/S y en los puntos de control internos de S, en G₂/M es el complejo Ciclina B-Cdk1 quien regula esta progresión. A su vez, tanto Chk1 como Chk2 se cree que son las encargadas de fosforilar a Cdc25, inhibiéndolo, e impidiendo así la defosforilación de la Cdk1, esencial para la entrada en mitosis (Lobrich and Jeggo 2007).

Existen diferentes métodos y drogas para sincronizar una población celular en cualquiera de las diferentes fases del ciclo. El más habitual por su sencillez, reversibilidad y poca agresividad es el de privar a las células de estímulo mitogénico durante un periodo de entre 16 y 24h, obligándolas así a permanecer en G₀. Después de añadirles de nuevo el estímulo, las células volverán a entrar en el ciclo, pero esta vez de manera sincrónica. Además, existen drogas que sincronizan las células en fase G₁ (Mimosine), S (OH-urea) o G₂/M (Nocodazole) algunas de ellas también de manera reversible.

2.2.1. Complejos Ciclina-Cdk

La progresión a través del ciclo celular está regulada por una serie de proteínas incluyendo las ciclinas (Cic) y las quinasas dependientes de ciclina (cdk), la cuales, en última instancia son las que determinarán la progresión entre cada una de sus fases. Las Cdk existen como monómeros con actividad serina/treonina quinasa que se activan al unirse a una ciclina específica. A diferencia de las levaduras en las que una

sola Cdk (cdc2 o cdc28) controla todo el ciclo celular, los mamíferos han evolucionado hasta disponer de varias Cdk específicas para cada fase del ciclo. Mientras los niveles de Cdk se mantienen constantes durante todo el ciclo, la expresión de las ciclinas está regulada por factores tanto transcripcionales como posttranscripcionales y depende estrictamente del momento del ciclo en el que se encuentre la célula. Así, cada ciclina tiene un patrón de expresión único durante el ciclo que determinará cuándo se activa cada una de las Cdk (Sanchez and Dynlacht 2005) (Figura 6).

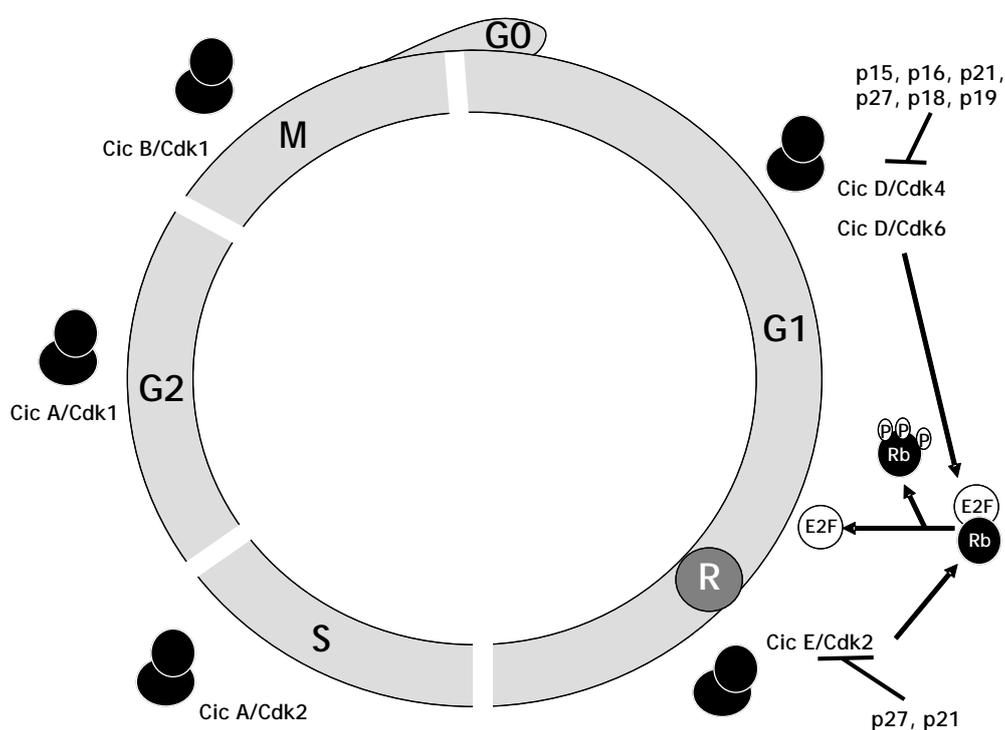


Figura 6. El ciclo celular. El ciclo celular consiste en 4 fases llamadas G₁, S, G₂ y M, reguladas por complejos Cic/Cdk. S, replicación del DNA; M, mitosis; G₁ y G₂, fases de preparación para la replicación del DNA y la mitosis respectivamente; R, punto restricción; G₀, estado de quiescencia; Cdk, quinasa dependiente de ciclina; cic, ciclina; Rb, retinoblastoma; y E2F, familia de factores de transcripción.

Las ciclinas de tipo D son las primeras en sintetizarse al salir la célula de G₀ y son también necesarias para la progresión inicial a través de G₁. Estas ciclinas unen principalmente a la Cdk4 y la Cdk6. Estos complejos se encargan de hiperfosforilar a la proteína del retinoblastoma (pRb), inactivándola, y evitando así su unión a

miembros de la familia de factores de transcripción E2F, quienes podrán ahora iniciar la transcripción de una variedad de genes importantes en la progresión del ciclo celular, entre ellos, las ciclinas necesarias para posteriores fases del ciclo (DeGregori, Kowalik et al. 1995; Muller 1995). Posteriormente, durante la fase G₁ tardía, se forman los complejos Cic E/Cdk2 que permiten la transición a S (Payton and Coats 2002). En este momento, las ciclinas A y B serán reclutadas por las Cdk2 y la Cdk1 (Cdc2) para continuar la progresión a través de S y G₂/M respectivamente (Arellano and Moreno 1997).

La actividad de las Cdk puede ser regulada de tres maneras distintas: por la unión a su ciclina correspondiente, por fosforilación/defosforilación y mediante la unión de un inhibidor de Cdk (CDKI) (Grana and Reddy 1995). La subunidad Cdk es inactiva como monómero y como heterodímero defosforilado. Sólo la unión con la ciclina específica induce en la Cdk un cambio conformacional que deja su centro activo expuesto de manera que pueda ser fosforilado por la CAK (*Cell cycle-Activated Kinase*), completando así la activación del complejo Cic-Cdk.

Existen también otros posibles lugares de fosforilación conservados en las Cdk que hacen que cambie su estado de conformación de manera que las ciclinas no pueden unirse a ellas (Donzelli and Draetta 2003). Estos residuos son fosforilados por quinasas como Wee1, Mik1 o Myt1. A su vez, la fosfatasa Cdc25 es la responsable de la defosforilación de estos residuos y la consecuente activación del complejo Cic-Cdk. La fosfatasa Cdc25 es fosforilada por las quinasas de los puntos de control Chk1 y Chk2 haciendo que ésta salga del núcleo y sea ubiquitinizada y degradada por el proteasoma en el citoplasma. Cdc25 está bien regulada a nivel de expresión siendo rápidamente sintetizada o degradada según la fase del ciclo en la que se encuentre la célula. Así, en la fase G₁ tardía, Cdc25 defosforila a Cdk2 activando el complejo Cic E-Cdk2 para la correcta progresión a S (Ross, Tienhaara et al. 2002) mientras que en el umbral G₂/M hace lo propio con Cdk1 (Lobrich and Jeggo 2007).

2.2.2. Inhibidores de las Cdk (CDKI)

La actividad de las Cdk durante las diferentes fases del ciclo celular puede ser inhibida por una serie de proteínas llamadas inhibidores de las Cdk (CDKI) que se unen a los complejos Cic-Cdk o directamente a las Cdk regulando así su actividad. Existen dos familias distintas de CDKI, la INK4 y la Cip/Kip (Sherr and Roberts 1995).

2.2.2.1. La familia INK4

La familia de CDKI INK4 está compuesta por proteínas inhibidoras de los complejos de G₁ formados específicamente por Cdk4 y Cdk6. Sus componentes son p15^{INK4b}, p16^{INK4a}, p18^{INK4c} y p19^{INK4d}. Estas proteínas presentan varios dominios anquirina gracias a los cuales interaccionan con las Cdk impidiendo así su unión con las ciclinas (Carnero and Hannon 1998; Pavletich 1999).

Se ha descrito que p16^{INK4a} bloquea específicamente la fosforilación de pRb por el complejo Cic D-Cdk4, induciendo la parada en G₁ del ciclo celular. p15^{INK4b} une tanto a Cdk4 como a Cdk6 y algunos autores han descrito que está implicado en la parada de ciclo mediada en respuesta al TGF-β (Sandhu, Garbe et al. 1997). Los otros dos miembros de la familia, p18INK4c y p19INK4d también son capaces de unir a Cdk4 y Cdk6 y actúan como genes supresores de tumores (Roussel 1999).

2.2.2.2. La familia CIP/KIP

La familia CIP/KIP está formada por los CDKI p21^{Waf-1/Cip-1}, p27^{Kip-1/Cip-2} y p57^{Kip-2} (Harper, Adami et al. 1993; Matsuoka, Edwards et al. 1995). A diferencia de la familia INK4, los miembros de CIP/KIP muestran una mayor afinidad por los complejos Cic-Cdk que por los monómeros Cdk, de manera que ejercen su actividad inhibitoria uniéndose directamente a ellos gracias a un dominio altamente conservado en su región N-terminal (Chen, Jackson et al. 1995). Estos CDKI son capaces de inhibir a todas las Cdk de G₁, Cdk2, Cdk4 y Cdk6 y, en menor medida, al complejo Cic B-Cdk1 (Harper, Adami et al. 1993) pero a diferencia de los inhibidores INK4, éstos no previenen ni disocian la unión de las ciclinas con su Cdk. Debido a su gran capacidad inhibitoria del ciclo celular todas estos CDKI están considerados posibles genes supresores de tumores (el-Deiry, Tokino et al. 1993).

2.2.2.2.1. p21^{Waf-1/Cip-1}

p21^{Waf-1} es un CDKI con un amplio rango de sustratos Cdk que ha sido relacionado con los mecanismos de parada del ciclo celular que permiten la reparación del DNA (Li, Waga et al. 1994). p21^{Waf-1} contiene dos regiones funcionales: un dominio inhibitorio de las Cdk en el extremo N-terminal (común a todas las CIP/KIP), y un dominio único en C-terminal capaz de unir DNA. p21^{Waf-1} es también capaz de unirse al factor de procesamiento de la DNA polimerasa δ (PCNA, *Proliferating Cell Nuclear Antigen*) a través de su región C-terminal e inhibir así la

replicación del DNA dependiente de PCNA formando complejos cuaternarios con Cic-Cdk (Chen, Jackson et al. 1995).

p21^{Waf-1} se une a los complejos Cic-Cdk de dos formas funcionales distintas, una en la que la actividad quinasa se encuentra inhibida, y otra en la que no, dependiendo de su estequiometría (Sherr and Roberts 1999). Se cree que la mayoría de moléculas de p21^{Waf-1} presentes en las células en estado de proliferación están unidas a complejos Cic-Cdk activos, lo cual sugiere que, en condiciones fisiológicas normales, p21^{Waf-1} no estaría actuando como un inhibidor de dichos complejos sino favoreciendo la progresión del ciclo celular (Zhang, Hannon et al. 1994). A su vez, p21^{Waf-1} puede unirse a Cic A-Cdk2 y a Cic E-Cdk2 en G₁ tardía e inhibir su actividad manteniendo así a pRb inactiva hasta que todos los genes necesarios en G1 hayan sido expresados correctamente (Rank, Evans et al. 2000). Algunos autores creen que la capacidad inhibitoria de p21^{Waf-1} sobre los complejos Cic-Cdk vendría dada por un aumento en su nivel de expresión que daría lugar a una modificación de la estequiometría p21:Cic:Cdk (Brugarolas, Chandrasekaran et al. 1995).

También se ha relacionado a p21^{Waf-1} con mecanismos de supervivencia celular inducida por la vía de Akt (Xaus, Comalada et al. 2001). Se ha visto que Akt es capaz de fosforilar directamente a p21^{Waf-1} en su extremo C-terminal, disminuyendo así su afinidad hacia Cdk2, y liberando a su vez a PCNA del complejo PCNA-p21^{Waf-1}-Cdk-Cic (Rossig, Jadidi et al. 2001). Como resultado de esta fosforilación, el p21^{Waf-1} citoplasmático puede ahora interaccionar con la SAPK (*Stress-Activated Protein Kinase*) y ASK1 (*Apoptosis Signal-regulating Kinase*) para inhibir sus actividades catalíticas y prevenir así la apoptosis inducida por TNF- α u otros estímulos (Suzuki, Tsutomi et al. 1999). Otros mecanismos por los que p21^{Waf-1} podría inhibir la apoptosis es gracias a su unión directa con las caspasas 8 y 10 (Xu and El-Deiry 2000) o la procaspasa 3 (Suzuki, Tsutomi et al. 1999).

Muchos estudios sugieren también que las proteínas CIP/KIP podrían actuar como cofactores transcripcionales. p21^{Waf-1} regula la actividad de NF- κ B, STAT3 (Coqueret and Gascan 2000), c-Myc (Kitaura, Shinshi et al. 2000), C/EBP y E2F (Harris, Albrecht et al. 2001). La expresión de genes relacionados con el ciclo celular como la DNA polimerasa α , la topoisomerasa II, la Ciclina B1 y la Cdk1 también está regulada por p21^{Waf-1}.

La expresión de p21^{Waf-1} puede ser regulada a nivel transcripcional de una manera tanto dependiente como independiente de p53 (Peter 1997). p53 es capaz de unirse a dos regiones específicas del promotor de p21^{Waf-1}, induciéndolo. A su vez,

una gran variedad de factores de transcripción son capaces de inducir la transcripción de p21^{Waf-1} de manera independiente de p53 en respuesta a diferentes estímulos. Entre ellos se encuentran Sp1, Sp3, Ap2, STAT, C/EBP α y β , y proteínas bHLH como BETA2 y MyoD. Por último, los niveles de p21^{Waf-1} pueden también ser regulados de manera posttranscripcional a través de su degradación por el proteasoma, ya sea de una manera dependiente de ubiquitina como independiente (Touitou, Richardson et al. 2001).

2.2.2.2.2. p27^{Kip-1/Cip-2}

p27^{Kip-1} es un miembro CDKI de la familia de inhibidores CIP/KIP al que se le ha adjudicado un papel clave en la inhibición del complejo Cic E-Cdk2 y en la síntesis del DNA. Comparte el dominio N-terminal con p21^{Waf-1} y p52^{Kip-2}, pero a diferencia de p21^{Waf-1}, p27^{Kip-1} no tiene un dominio C-terminal capaz de unirse a PCNA. Durante la progresión a través de G₁, p27^{Kip-1} se encuentra secuestrada por el complejo Cic D1-Cdk4, dejando así libre al complejo Cic E-Cdk2 que de esta manera podrá realizar su función en la transición a S (Medema, Kops et al. 2000). Por el contrario, la unión de p27^{Kip-1} con Cic E-Cdk2 resulta en una parada del ciclo celular en la fase G¹ temprana.

La cantidad de p27^{Kip-1} aumenta en células quiescentes o en proceso de diferenciación, inhibiendo así a los complejos Cic E-Cdk2. Por el contrario, los estímulos mitogénicos provocan su degradación, permitiendo de esta manera que las células quiescentes vuelvan a entrar en un ciclo celular. Así mismo, p27^{Kip-1} media la parada en G₁ inducida por TGF- β (Polyak, Kato et al. 1994), la inhibición por contacto (Polyak, Lee et al. 1994) o la pérdida de matriz extracelular (Fang, Orend et al. 1996).

La regulación de p27^{Kip-1} se produce principalmente a nivel posttranscripcional, De hecho, a lo largo del ciclo celular los niveles del mRNA de p27^{Kip-1} son constantes, mientras que la proteína es rápidamente degradada vía ubiquitina-proteasoma (Pagano, Tam et al. 1995). Del mismo modo que el complejo Cic E-Cdk2 es sustrato de p27^{Kip-1}, ésta puede ser a su vez sustrato del mismo complejo, y es precisamente esta fosforilación la responsable de la regulación por proteólisis de p27^{Kip-1}. De esta manera, una vez activados los complejos Cic E-Cdk2 la degradación de p27^{Kip-1} hace irreversible la entrada en S (Nguyen, Gitig et al. 1999). La actividad de p27^{Kip-1} también puede ser regulada a través de la vía PI3K/Akt. La familia de factores de transcripción FOX encargada de la inducción de un gran número de genes proapoptóticos entre los que se encuentra p27^{Kip-1} puede ser inactivada por

determinadas fosforilaciones en residuos serina y treonina llevados a cabo por Akt (Liang, Zubovitz et al. 2002).

Del mismo modo que p21^{Waf-1}, p27^{Kip-1} ha sido también relacionado con mecanismos de translocación nuclear tanto de las Cdk como de las ciclinas. Los miembros de la familia CIP/KIP citoplasmáticos son importantes para la localización nuclear de los complejos de tipo D que carecen de dichas señales de localización nuclear (NLS), involucrando así a esta familia de proteínas en la comunicación entre el núcleo y el citoplasma. Así, p27^{Kip-1} puede unirse a la proteína asociada a los poros de la membrana nuclear mNPA60, y p21^{Waf-1} bloquea la interacción entre la Ciclina D1 y la exportina CRM1 aumentando así los niveles de Ciclina D1 en el núcleo (Gaubatz, Lees et al. 2001).

2.3. Inhibidores de la proliferación inducida por el M-CSF

Existen diferentes mecanismos de inhibición de la proliferación inducida por M-CSF en los macrófagos. Las quinasas como la PKA (*cAMP-dependent protein kinase*) se sabe que regulan la actividad de Raf-1, inhibiendo así la proliferación dependiente de la vía Raf/MEK/ERK. PKA también disminuye los niveles de c-Myc, Cic D1 y Cdk4 en macrófagos y aumenta los de p27^{Kip-1} (Xaus, Valledor et al. 1999). De esta manera, aquellos agentes capaces de aumentar los niveles de cAMP como la Prostaglandina E₂ (PGE₂) actuarán como inhibidores de la síntesis de DNA inducida por el M-CSF (Xaus, Valledor et al. 1999).

A diferencia de otras células del sistema inmunitario como los linfocitos, que realizan la expansión clonal después ser activados ya sea vía MHC (linfocitos T) como por reconocimiento directo del antígeno (linfocitos B), la activación del macrófago está íntimamente asociada a una parada de la proliferación. Así, los estímulos activadores para el macrófago como los interferones de tipo I (IFN- α , IFN- β) y los de tipo II (IFN- γ), el LPS o el TNF- α son capaces de bloquear su proliferación en la fase G₁ del ciclo celular a través de diferentes mecanismos (Vadiveloo, Vairo et al. 1996). En los casos del TNF- α y el LPS la parada del ciclo parece estar mediada por una síntesis endógena de interferones de tipo I (Hamilton, Whitty et al. 1996). Esta dicotomía ampliamente descrita para el macrófago en respuesta a estímulos de tipo Th1 no ha sido hasta la fecha estudiada en profundidad para los estímulos de tipo Th2.

3. ACTIVACIÓN DE LOS MACRÓFAGOS

La activación de los macrófagos, tanto clásica como alternativa, es un proceso complejo y finamente regulado que consiste en una serie de modificaciones morfológicas y bioquímicas que culminan con el aumento de la capacidad de la célula para ejercer sus funciones fisiológicas.

La activación clásica es inducida por citocinas proinflamatorias como el IFN- γ o el TNF- α y/o por moléculas microbianas como el LPS. Los macrófagos activados clásicamente (M1) producen óxido nítrico (NO) a la vez que aumentan la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC II) y el CD86, potenciando así su capacidad presentadora de antígeno. También llevan a cabo actividades antiproliferativas y citotóxicas que se producen, en parte, como resultado de la secreción de NO y de citocinas proinflamatorias como el TNF- α , la IL-1 o la IL-6 (Klimp, de Vries et al. 2002).

La activación alternativa del macrófago es inducida por citocinas tipo Th2 como la IL-4 o la IL-13. Los macrófagos activados alternativamente (M2) no son capaces de producir NO a partir de L-arginina ni de controlar el desarrollo de patógenos intracelulares. En su lugar producen Arginasa 1 para metabolizar la L-arginina y obtener como productos finales prolina, glutamato o poliaminas. También aumentan su capacidad endocítica y fagocítica así como la expresión del receptor de la Manosa (MR), del falso receptor para la IL-1 (IL-1R *decoy*), del antagonista del receptor de la IL-1 (IL-1Ra), y de varios receptores basurero (*scavenger receptors*) y de quimiocinas, favoreciendo, en conjunto, la función reparadora/remodeladora de tejidos del macrófago. Los macrófagos M2 mantienen sin embargo los mismos niveles de moléculas coestimuladoras CD11a, CD40, CD54, CD58, CD80 y CD86 que los M1. Algunos autores sugieren también que, en humanos, los monocitos periféricos activados alternativamente podrían inducir la expresión del MHC II y en consecuencia, su capacidad presentadora de antígenos (de Waal Malefyt, Figdor et al. 1993) aunque esto no se ha probado en macrófagos M2.

3.1. Activación clásica, el IFN- γ

3.1.1. Características bioquímicas del IFN- γ

Existen dos clases distintas de interferones conocidas como tipos I y II que se clasifican según la especificidad de su receptor y la homología de su secuencia. Los

interferones de tipo I comprenden al IFN- α , el IFN- β y algunos subtipos como el IFN- ι (Baccala, Kono et al. 2005). El IFN- γ sin embargo, es el único representante de los interferones de tipo II. Está codificado en un cromosoma diferente de los de tipo I, se une a un receptor distinto y no tiene homología estructural con ellos. El IFN- γ está implicado en respuestas de tipo antiproliferativo, antiviral, inmunomodulador, de vigilancia y de supresión de tumores (Boehm, Klamp et al. 1997). Se ha descrito que puede llegar a regular más de 300 genes a través de distintos mecanismos.

El IFN- γ es una glicoproteína homodimérica proveniente de la unión no covalente de dos subunidades codificadas por el mismo gen. Las principales células productoras de IFN- γ son los linfocitos T CD4+, CD8+ y las células NK (Yoshimoto, Wang et al. 1998; Pestka, Krause et al. 2004), aunque algunos autores sugieren que las células presentadoras de antígeno (APC) y los linfocitos B también podrían producirlo (Puddu, Fantuzzi et al. 1997; Frucht, Fukao et al. 2001). Los linfocitos T son la principal fuente de IFN- γ producida durante la respuesta adaptativa mientras que la producción llevada a cabo por las células NK y posiblemente las APC se cree que juega un papel importante en una etapa temprana de la respuesta inmunitaria frente a infecciones. El IFN- γ producido por las células APC de manera local podría ser también importante actuando de manera autocrina y en la activación de células circundantes (Munder, Mallo et al. 1998).

Las células APC regulan este proceso por dos mecanismos distintos: por un lado, la secreción de IL-12 e IL-18 inducirá la producción de IFN- γ por las células NK, y por otro, la interacción del complejo MHC II-antígeno con el TCR de los linfocitos T vírgenes hará que éstos se diferencien a linfocitos Th1 productores de IFN- γ . Existen varias citocinas capaces de inhibir la producción de IFN- γ por las APC como el IFN- α , el TGF- β , la IL-10, los glucocorticoides o las citocinas de tipo Th2 como la IL-4 y la IL-13.

3.1.2. Transducción de la señal por el receptor del IFN- γ

El receptor del IFN- γ está formado por dos subunidades llamadas IFN γ R1 e IFN γ R2 (Bernabei, Coccia et al. 2001) y formadas por dos cadenas polipeptídicas α y β cada una. La transducción de la señal viene dada por unas proteínas tirosina quinasa asociadas a receptor de la familia Janus (JAK quininas). La unión del IFN- γ a su receptor produce la oligomerización de éste y la activación de las quininas asociadas JAK1 y JAK2 por transfosforilación (Sakatsume, Igarashi et al. 1995). Las quininas JAK

activadas fosforilarán, entre otros, residuos tirosina intracelulares del receptor creando así un lugar de reconocimiento para los dominios SH2 de STAT1. Una vez STAT1 es reclutada por el complejo receptor-JAK activado, experimenta una fosforilación mediada por las quinasas JAK que hará que pueda interactuar con dominios SH2 de otras STAT y así formar homo/heterodímeros. Estos dímeros se translocarán al núcleo donde podrán unirse a secuencias específicas de DNA llamadas elementos de respuesta sensibles al IFN (ISRE) presentes en los promotores de genes regulados por IFN- γ , y activar su transcripción (Figura 7). El dominio de unión al DNA de las proteínas STAT reconoce una secuencia consenso TTCC(G/C)GGAA llamada secuencia de activación por IFN- γ (GAS) presente en elementos ISRE (Kisseleva, Bhattacharya et al. 2002).

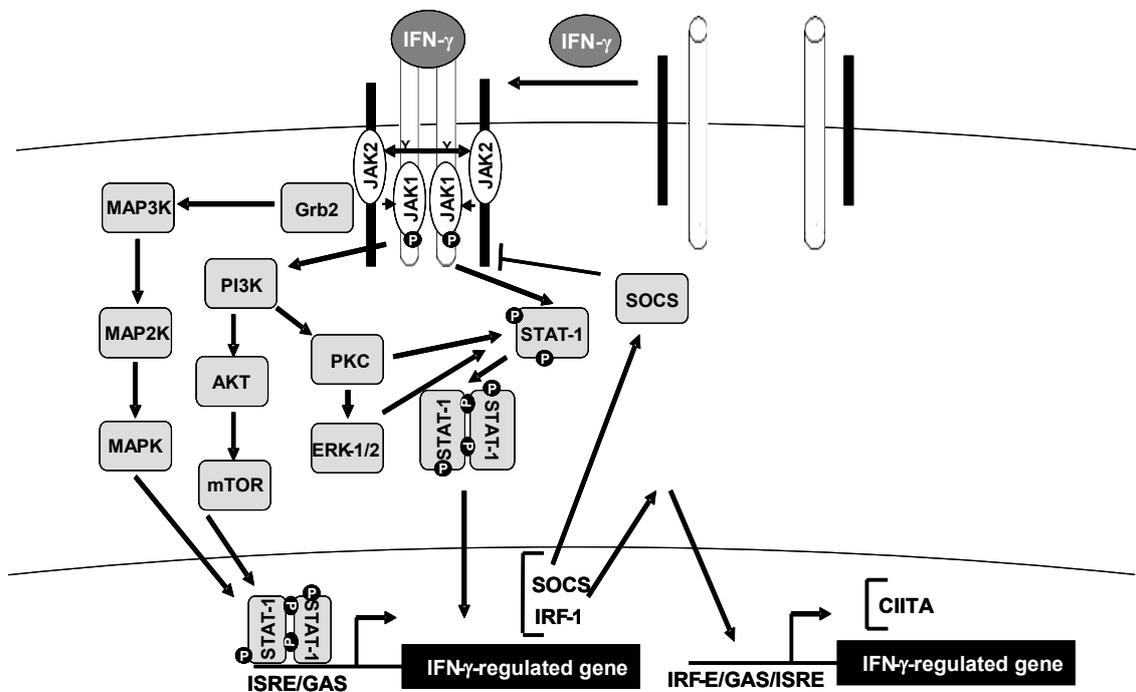


Figura 7. Señalización por el receptor del IFN- γ . La unión del IFN- γ induce un cambio conformacional en su receptor que hará que JAK2 se autofosforile y active. Una vez activado, JAK2 transfosforilará a JAK1, activándolo, y éste fosforilará a STAT1 induciendo su homodimerización. Los dímeros de STAT1 viajarán al núcleo donde unirán cajas GAS presentes en los promotores de genes regulados por IFN- γ para activarlos o reprimirlos. Entre estos genes se encuentran el factor regulador de IFN (IRF-1) y el supresor de la señalización por citocinas (SOCS1) quienes llevarán a cabo la regulación de la propia vía. Simultáneamente, las vías de las MAPK y de PI3K también son activadas.

Además de la fosforilación en tirosina mediada por JAK, algunos autores han descrito que la regulación de los genes dependientes de STAT puede verse también condicionada por una fosforilación en serina de estos dímeros. En el caso de STAT1 se ha comprobado que en un punto temprano de su activación se fosforila la serina 727 (Goh, Haque et al. 1999). Ni la fosforilación en tirosina, ni la homodimerización del complejo, ni su unión al DNA dependen de esta fosforilación en serina, pero se ha visto que sin ella disminuyen los niveles de transcripción de algunos de los genes regulados por STAT1. Además de la vía clásica JAK/STAT, existen otras vías a través de las cuales el IFN- γ ejerce sus funciones, como la de la creatinina quinasa y la del sustrato del receptor de la insulina (IRS) que resultan en la activación de la PI3K (Platanias and Fish 1999).

La regulación negativa de la activación de STAT está mediada por uno de los principales factores inducidos por IFN- γ , SOCS1, quien se asocia con JAK1/2 interfiriendo en su actividad tirosina quinasa inhibiendo así la señalización por IFN- γ (Kile and Alexander 2001). A su vez, el complejo IFN- γ /IFN γ R1 se internaliza una vez completada la transducción de la señal y entra en la vía lisosomal, donde se disocia (Celada and Schreiber 1987). En muchos tipos celulares la cadena IFN γ R1 es reciclada y vuelve a la superficie celular en su estado disociado y defosforilado mientras que el ligando es degradado. Sin embargo, en otros tipos celulares la degradación afecta a todo el complejo internalizado haciendo disminuir de esta manera la cantidad de IFN γ R1 en superficie.

3.1.3. Funciones fisiológicas del IFN- γ

Aunque inicialmente se le atribuyó un efecto principalmente antivírico, hoy en día se sabe que el IFN- γ juega un papel crítico en la regulación de la respuesta inmunitaria (Goes, Sims et al. 1995). Todas las células del organismo poseen receptores para el IFN- γ , lo que hace que esta citocina tenga efectos pleiotrópicos. A pesar de ello, sus células diana por excelencia son los monocitos y los macrófagos, para los cuales representa el principal factor inductor de la activación clásica (Farrar and Schreiber 1993). Entre todos los IFN sólo el IFN- γ es capaz de inducir eficientemente la expresión de los genes del MHC de clase II en estas células, facilitando así el desarrollo de una respuesta inmunitaria adaptativa a través de la presentación de antígenos y la activación específica de péptido de los linfocitos T CD4+ (Guermonprez, Valladeau et al. 2002).

El IFN- γ también induce la expresión de la enzima NOS2 (MacMicking, Xie et al. 1997) y del sistema fagocítico oxidativo dependiente de NADH más conocido como “estallido respiratorio”. Como consecuencia de esto, el NO y las especies reactivas del oxígeno formadas podrán penetrar fácilmente a través de las paredes microbianas para causar el daño (MacMicking, Xie et al. 1997). Además, los oxidantes producidos por el estallido respiratorio podrán reaccionar con aquellos producidos por la NOS2 formando un gran número de especies que mediarán procesos de citotoxicidad a través de distintos mecanismos (Radi, Beckman et al. 1991).

El NO y el IFN- γ producidos en las zonas de inflamación causan una vasodilatación local haciendo que descienda la velocidad del flujo sanguíneo y favoreciendo así la extravasación de los linfocitos gracias a la interacción entre moléculas de adhesión. En este sentido, el IFN- γ regula tanto la expresión de quimiocinas (IP-10, MCP-1, RANTES, MIG, MIP-1/2, etc.) como de moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1) (Vaday, Franitza et al. 2001). El IFN- γ también induce la expresión en superficie del receptor de alta afinidad del Fc (Fc γ RI) potenciando así la destrucción microbiana por citotoxicidad dependiente de anticuerpos, y promueve el cambio isotípico a IgG2a en los linfocitos B (Capsoni, Minonzio et al. 1994). En la respuesta innata el IFN- γ también aumenta la secreción de moléculas del complemento por fagocitos mononucleares y la expresión en superficie de receptores para tales moléculas, así como la producción de citocinas proinflamatorias como el TNF- α , la IL-6, la IL-1 β o la IL-12.

El IFN- γ induce la especialización al fenotipo Th1 sobre los linfocitos y la inhibe al tipo Th2, favorece la inmunidad innata celular a través de la activación de las células NK, así como la presentación de antígeno por las células APC y la expresión de moléculas coestimuladoras en células dendríticas y macrófagos. Por otro lado, el IFN- γ induce la producción de IL-12 por células fagocíticas creando así un sistema de retroalimentación positiva para la producción de más IFN- γ (Yoshida, Koide et al. 1994).

3.2. Activación alternativa, la IL-4

3.2.1. Características bioquímicas de la IL-4

La IL-4 forma parte del grupo de citocinas antiinflamatorias de tipo I. Es una pequeña glicoproteína (18 KDa) pleiotrópica producida por un subtipo específico de linfocitos T CD4+, llamados de tipo Th2, así como por basófilos y mastocitos

activados (Seder and Paul 1994) (Figura 8). Se ha visto que los eosinófilos (Dubucquoi, Desreumaux et al. 1994) y algunos subtipos especializados de linfocitos T como los γ/δ o aquellos que expresan NK1.1 también pueden producir IL-4 (Yoshimoto and Paul 1994; Ferrick, Schrenzel et al. 1995).

La IL-4 actúa principalmente sobre los linfocitos T induciendo su diferenciación al subtipo Th2, productor de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, y sobre los linfocitos B regulando el cambio de isotipo de las inmunoglobulinas a IgE y a diferentes subtipos de IgG según la especie, así, IgG1 en ratones e IgG4 en humanos (Nelms, Keegan et al. 1999).

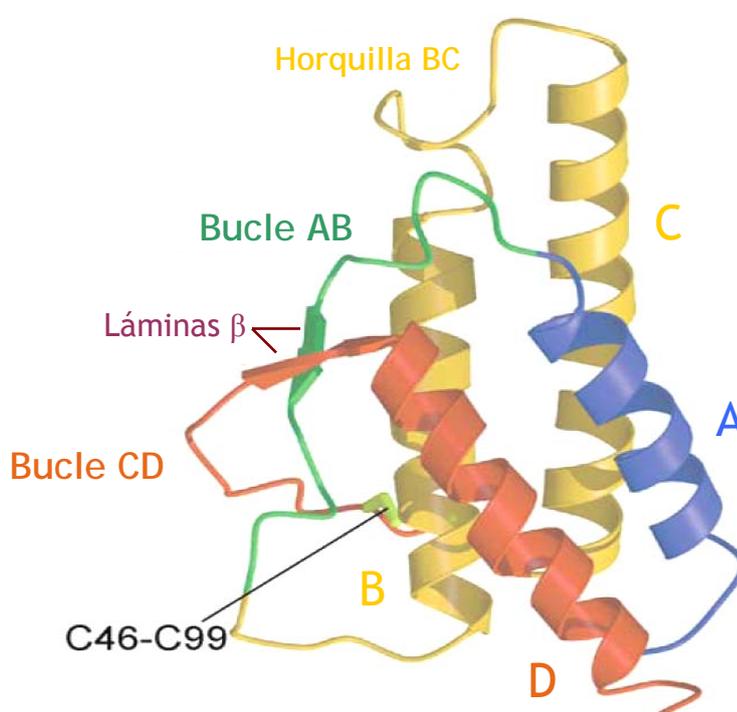


Figura 8. Estructura molecular de la IL-4. La interleucina 4 es una glicoproteína perteneciente al subgrupo de citocinas de tipo I. Éstas se caracterizan por presentar una estructura terciaria típica con 4 hélices α antiparalelas yuxtapuestas llamadas A, B, C y D, y dos largos bucles *end-to-end*, el AB y el CD, que están conectados por dos lámina β cortas y contrapuestas a las hélices B y D. La IL-4, además, presenta un puente disulfuro invariante (C46-C99) usado para estabilizar la horquilla BC y dos epítopos de unión a los receptores. El epítipo de unión para la cadena del receptor de alta afinidad IL4-R α se encuentra en las hélices A y C mientras que el lugar de unión para las cadenas de receptores de baja afinidad γ c e IL-13R α ' está en las hélices A y D.

3.2.2. Transducción de la señal por el receptor de la IL-4

El receptor de la IL-4 está formado por el heterodímero de una cadena α de 140 KDa (IL-4R α) que se une a la IL-4 con alta afinidad (K_d 20-300 pM) y una cadena γ (γ_c) común identificada en el receptor de la IL-2 y que parece ser la cadena dominante en la heterodimerización. Esta cadena γ_c reconoce al complejo IL-4-IL-4R α y, aunque este reconocimiento sólo hace aumentar modestamente la afinidad del receptor por la IL-4, se ha comprobado que es necesario para que se inicie la transducción de la señal (Russell, Keegan et al. 1993; Letzelter, Wang et al. 1998).

La cadena IL-4R α también forma parte del receptor de la IL-13 (IL-13R), la cual se ha visto que cumple funciones muy similares a las de la IL-4 en monocitos y macrófagos (Hart, Bonder et al. 1999). Sin embargo el receptor de la IL-13 utiliza otras cadenas distintas a la γ_c para heterodimerizar (IL-13R α'). Curiosamente, un gran número de líneas celulares carentes de la cadena γ son igualmente capaces de responder a estímulos de IL-4, lo que sugiere que la cadena IL-4R α podría heterodimerizar también con cadenas IL-13R α y/o IL-13R α' en estas células (Obiri, Debinski et al. 1995; Dawson, Brown et al. 1997). De hecho, se ha visto que, en células no hematopoyéticas, la cadena IL-13R α' es la cadena principal del receptor de la IL-4 (Murata, Taguchi et al. 1998).

El IL-4R forma parte de la superfamilia de receptores de la hematopoyetina los cuales se caracterizan por presentar dominios fibronectina de tipo III en su región extracelular (Miyajima, Kitamura et al. 1992). Estos motivos incluyen residuos Cys emparejados y, en la zona más proximal a la membrana, un motivo WSXWS que parece estar implicado en mantener una conformación favorable del receptor para la unión de la citocina. La región citoplasmática de la cadena α presenta cinco residuos tirosina altamente conservados tanto en su posición como en la secuencia de las regiones circundantes. Además, presenta también una secuencia rica en prolina en la zona proximal a la membrana de la cadena IL4-R α llamada motivo *box1*, que también se haya en gran variedad de miembros de la familia de receptores hematopoyetina y que ha sido descrito que puede ser una diana de unión para proteínas de la familia Src y JAK (Izuhara, Feldman et al. 1994). Además, situado de manera adyacente al motivo *box1* hay una región ácida similar a la existente en el receptor β de la IL-2 que ha sido descrito que es capaz de interactuar con miembros de la familia de quinasas Src (Minami, Kono et al. 1993).

La unión de la IL-4 con la cadena IL-4R α de su receptor, causa la heterodimerización de ésta con la cadena γ_c iniciando así la activación de la

señalización por el IL-4R (Kammer, Lischke et al. 1996). Ni la cadena IL-4R α ni la γ c tienen actividad quinasa endógena, de manera que el IL-4R (al igual que el resto de miembros de la familia de receptores hematopoyetina) requiere de quinasas asociadas a receptor para iniciar la transducción de su señal. En este caso, al igual que ocurre con numerosas citocinas, la familia de tirosina quinasas Janus (JAK) son críticas en el inicio de la transducción de la señal por esta familia de receptores (Ihle 1995).

Se ha visto que el IL-4R puede activar a los miembros de la familia JAK. JAK1 se asocia a la cadena IL-4R α mientras que JAK3 lo hace con la γ c (Miyazaki, Kawahara et al. 1994) y, en algunas líneas celulares se ha visto que JAK2 puede asociarse también a IL-4R α (Murata, Noguchi et al. 1996). La activación de estas quinasas lleva a la fosforilación del receptor en su cadena α , proceso que ocurre en los primeros minutos tras la unión de la IL-4 con el receptor (Smerz-Bertling and Duschl 1995). Esta fosforilación crea lugares de interacción para proteínas con dominios SH2 y de unión a fosfotirosinas (PTB), tales como las proteínas de la familia STAT. STAT6 es el principal miembro de esta familia activado por la IL-4. Del mismo modo que ocurre con la respuesta al IFN- γ mediada por STAT1, STAT6 une los residuos tirosina fosforilados de la cadena α del receptor de la IL-4 a través de su dominio SH2 permitiendo así a las quinasas asociadas al receptor fosforilar residuos tirosina (Y641) de su extremo C-terminal (Mikita, Campbell et al. 1996). Una vez fosforilado, STAT6 es capaz de homodimerizar con otra molécula fosforilada de STAT6 de nuevo a través del dominio SH2. El homodímero de STAT6 será capaz ahora de translocarse al núcleo y unirse a secuencias específicas de los promotores de genes sensibles a la IL-4. Las secuencias unidas por los dímeros de STAT comparten una similitud muy elevada entre ellos (Figura 9). En este caso se asume que STAT6 reconoce secuencias TTC(N)₄GAA (Ihle 1996).

Aunque en este trabajo nos hemos centrado en diferentes efectos de la IL-4 sobre el macrófago derivado de médula ósea dependientes de STAT6, inicialmente se asoció la señalización por esta citocina con una proteína llamada sustrato del receptor de la insulina-2 (IRS-2) por su homología con IRS-1 (Wang, Keegan et al. 1993; Sun, Wang et al. 1995). Las proteínas IRS-1/2 tienen aproximadamente 20 lugares potenciales de fosforilación cada una, un gran número de los cuales está asociado a dominios de interacción SH2, indicando que IRS-1/2 actúan como proteínas citosólicas puente capaces de asociar dominios SH2 de moléculas señalizadoras con receptores fosforilados (Sun, Rothenberg et al. 1991). Entre las

moléculas que pueden interactuar con dominios fosforilados de IRS-1/2 se encuentran la subunidad reguladora de la PI3K p85 y la proteína adaptadora Grb-2. Estas interacciones llevan a la activación de las vías de señalización de la PI3K y de Ras/MAPK, respectivamente (Nelms, Keegan et al. 1999).

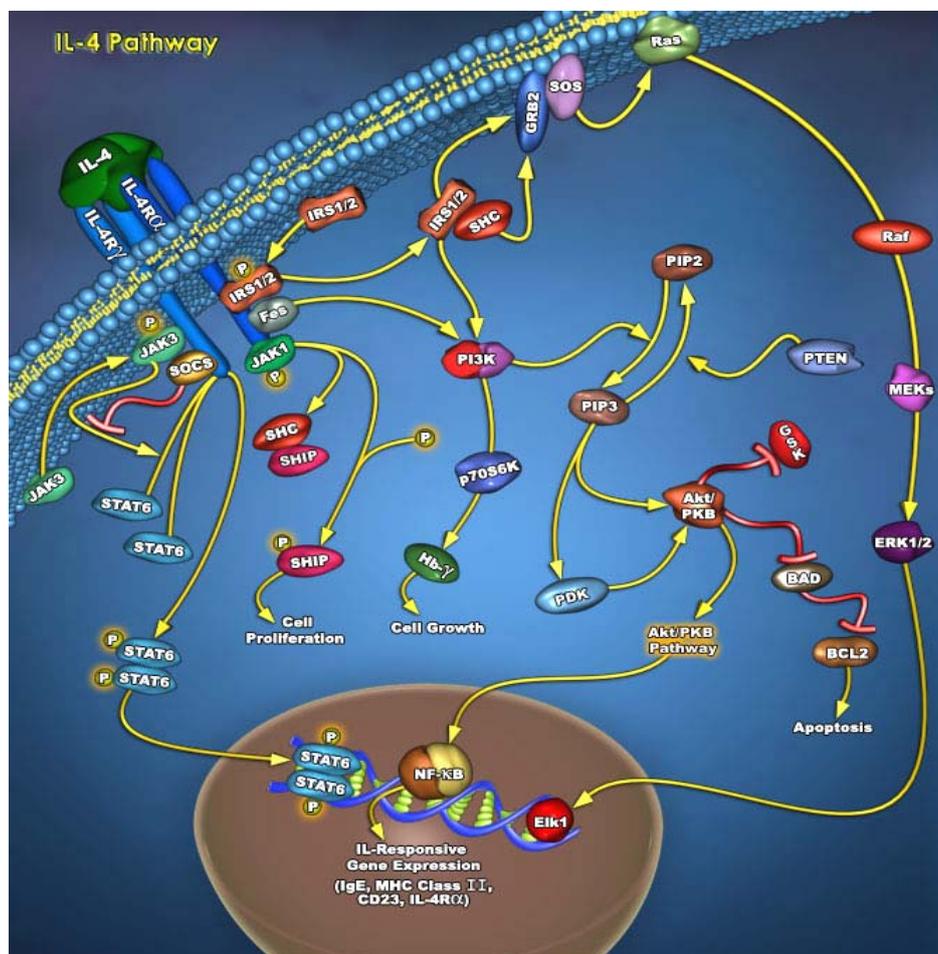


Imagen adaptada de <http://www.ambion.com>

Figura 9. Señalización por el receptor de la IL-4. La unión de la IL-4 a su receptor produce una fosforilación de las quinasas JAK asociadas, quienes, a su vez, fosforilarán a proteínas SH2 como STAT6 o IRS-1/2. En el caso de STAT6, esta fosforilación inducirá su homodimerización y posterior translocación nuclear, donde llevará a cabo su función como factor de transcripción. Sin embargo, fosforilaciones en IRS-1/2 crearán otros lugares de reconocimiento para una gran variedad de proteínas citosólicas que ahora podrán reconocerlos e interactuar con el receptor, fosforilarse y activar nuevas cascadas de señalización como la vía de las MAPK o la de la PI3K/Akt.

Existen diferentes mecanismos para regular de forma negativa la señalización a través del receptor de la IL-4. De manera general se ha visto que las fosfotirosina

fosfatasa (PTP) pueden estar implicadas en este proceso. De esta manera, tanto SHP-1 y SHP-2 (*SH2-containing phosphatases*) como SHIP (*SH-2 containing inositol-5-phosphatase*) pueden ser críticas en la modulación de la señalización por citocinas (Scharenberg and Kinet 1996). Por otro lado, y aunque la importancia de la vía de Ras/MAPK en respuesta a la IL-4 no está muy clara todavía, se ha visto que una proteína llamada RasGAP (*Ras GTPase activating protein*) podría ser la principal reguladora, uniéndose a la forma activa de Ras (Ras-GTP) y catalizando la formación de la forma inactiva (Ras-GDP) (Boguski and McCormick 1993).

Por último, se ha descrito otro mecanismo de regulación que juega un papel crítico en la inhibición de la vía JAK/STAT. Los componentes reguladores de esta vía son una serie de proteínas SH2 cuya expresión es inducida en respuesta a la activación de STAT. Estas moléculas llamadas CIS (*cytokine-induced SH2*), SOCS (*supressors of cytokine signaling*), JAB (*JAK binding*) y SSI (*STAT-induced STAT-inhibitor*) se expresan rápidamente después de un estímulo por citocinas. La IL-4, concretamente, induce la expresión de CIS y SOCS-3 en células derivadas de médula ósea aunque también lo hace en menor grado con SOCS-1 y SOCS-2 (Starr, Willson et al. 1997). El mecanismo por el cual actúan estos inhibidores no está del todo descrito aún pero parece ser que se unen directamente a JAK, inhibiéndolo.

3.2.3. Funciones biológicas de la IL-4

La principal función de la IL-4 consiste en inducir el cambio a Th2 de los linfocitos Th0 así como el cambio isotípico de las inmunoglobulinas de los linfocitos B. Al actuar sobre los linfocitos T, también suprime la aparición de la variante Th1 productora de IFN- γ . Se ha visto que en ratones carentes de IL-4, IL-4R o STAT6, la producción de IgEs está disminuida en más de cien veces (Kuhn, Rajewsky et al. 1991; Shimoda, van Deursen et al. 1996; Noben-Trauth, Shultz et al. 1997). Los ratones *knockout* para IL-4R o STAT6 son, además, deficientes en el desarrollo de linfocitos T productores de IL-4 bajo infecciones por parásitos helmínticos (Akira and Kishimoto 1997). Estas funciones fisiológicas confieren a la IL-4 un papel preferente en la regulación de las condiciones alérgicas así como una posición clave en el desarrollo de una respuesta inmunitaria protectora frente a helmintos y otros parásitos extracelulares. Además, se ha comprobado también en situaciones tanto experimentales como clínicas que la IL-4 es capaz de mejorar los efectos de daño tisular provocados en los procesos autoinmunitarios (O'Garra, Steinman et al. 1997).

Además de estas funciones, la IL-4 tiene una gran variedad de efectos en otras células hematopoyéticas. En los linfocitos B aumenta la expresión de las moléculas del MHC de clase II (Noelle, Krammer et al. 1984), del CD23 (Defrance, Aubry et al. 1987), del IL-4R (Ohara and Paul 1988), y, en asociación con el LPS permite a estos linfocitos expresar el marcador CD90 (Snapper, Hornbeck et al. 1988). También actúa como factor co-mitogénico para la proliferación de los linfocitos B (Howard, Farrar et al. 1982) y, aunque no es en sí mismo un factor de crecimiento para los linfocitos, es capaz de alargar la vida de los linfocitos B y T (Hu-Li, Shevach et al. 1987).

La IL-4 también tiene un papel importante en la adhesión tisular y la inflamación. Actúa, junto con el TNF- α , induciendo la expresión de VCAM-1 en células endoteliales vasculares (Thornhill, Wellicome et al. 1991) y disminuyendo la de E-selectina (Bennett, Cruz et al. 1997). Esta regulación selectiva de moléculas de adhesión por la IL-4 se cree que podría favorecer el reclutamiento de los linfocitos T y los eosinófilos (en lugar de granulocitos) en el lugar de la inflamación.

En el macrófago se ha visto que la IL-4 es capaz de inducir una gran variedad de quimiocinas (CCL17, CCL22, CCL24, etc.), el receptor de la manosa (MR), el falso receptor para la IL-1 (IL-1R decoy), el antagonista de la IL-1 (IL-1a), y numerosos receptores basurero (*scavenger*) (Mantovani, Sozzani et al. 2002) aumentando así su capacidad endocítica y fagocítica. Además, también es capaz de inducir la Arginasa 1, enzima capaz de inhibir la NOS2 a nivel posttranscripcional y, en consecuencia, la producción de NO (Lee, Ryu et al. 2003). Incluso se ha descrito que el balance entre los niveles de NOS2 y Arginasa 1 se correlaciona con el de las actividades Th1 y Th2 en los macrófagos (Munder, Eichmann et al. 1998). En conjunto, estos efectos confieren al macrófago una capacidad reparadora capaz de contrarrestar los efectos causados por la activación de la NOS2 y la secreción de NO, así como un fenotipo clave en la respuesta alérgica tanto celular como humoral.

4. *Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK)*

Las MAPK son una superfamilia de proteínas quinasa con especificidad dual serina/treonina dirigida por dominios prolina y que pueden ser activadas por una gran variedad de estímulos. Su activación depende de la señal iniciada por receptores de factores de crecimiento, hormonales, de citocinas y asociados a la proteína G. También pueden ser activadas por condiciones de estrés tales como el shock osmótico, la irradiación, las lesiones en el DNA o por productos bacterianos como el

LPS. La activación de las MAPK en respuesta a estos estímulos controla la expresión de genes que regulan el metabolismo celular y también funciones del citoesqueleto, contribuyendo así a la regulación de procesos celulares tan complejos como la migración, la mitogénesis, la diferenciación o la supervivencia celular.

Las MAPK se clasifican en tres grandes grupos en función de los estímulos que inducen su activación. Así, los factores de crecimiento o estímulos mitogénicos desarrollan su función induciendo la activación de ERK-1/2 (*Extracellular signal-Regulated Kinase*) principalmente, mientras que los estímulos de estrés celular lo hacen gracias a la activación de las otras dos subfamilias, la de JNK/SAPK1 (*c-Jun NH2-terminal Kinase/Stress-Activated Protein Kinase*) y las SAPK2 cuyo componente principal es la proteína p38.

Cada MAPK es activada por una fosforilación dual de un motivo Thr-Xaa-Tyr. Esta fosforilación es llevada a cabo por otras quinasas que actúan en un nivel previo de la vía de señalización y que son conocidas como MAPKK (*MAPK kinase*, o MAP2K). A su vez, las MAPKK son también activadas por las MAPKKK (o MAP3K) de las cuales hay descritas más de 30 distintas (Cano and Mahadevan 1995).

Hasta la fecha se han identificado varios miembros de la familia de las MAPK en mamíferos: la MAPK ERK (ERK-1→8), SAPK2 (p38 α , β , γ , δ) y JNK/SAPK1 (JNK-1/-2/-3) (Gupta, Campbell et al. 1995; Marshall 1995; Gupta, Barrett et al. 1996).

Todos los miembros de las MAPK consisten en un homodímero que contiene la secuencia TXY (X es glutamato, prolina o glicina, respectivamente, para ERK, JNK o p38) (Payne, Rossomando et al. 1991; Robbins, Zhen et al. 1993). La fosforilación tanto de la tirosina como de la treonina es esencial para la activación de la MAPK y sólo se consigue gracias a la acción de las MAPKK MEK (*Mitogen Extracellular signal-related Kinase*). Las quinasas duales MEK son una familia de genes compuesta por 5 miembros: MEK1, MEK2, MEK3, MEK4 y MEK5 (Crews, Alessandrini et al. 1992). Esta familia de quinasas tienen especificidad dual tanto para Ser/Thr como para Tyr sobre MAPK (Tanoue, Yamamoto et al. 2001).

4.1. Proliferación y MAPK

La familia de proteínas Raf está formada por tres componentes, A-Raf, B-Raf y Raf-1 (o c-Raf) que están implicados en la regulación de la proliferación, la diferenciación y la apoptosis inducidas por estímulos de citocinas (Daum, Eisenmann-Tappe et al. 1994). Todas ellas tienen tres dominios funcionales: CR1, CR2 y CR3. EL

dominio CR1 es necesario para la unión con Ras y su consiguiente activación y translocación a la membrana celular por las GTPasas Ras. Recientemente se ha descrito que el dominio CR2 podría estar implicado en la regulación negativa de Raf-1 a consecuencia de su fosforilación por Akt o PKA. El dominio CR3 es el dominio Ct quinasa (Morrison and Cutler 1997; Farrar, Tian et al. 2000) (Figura 10).

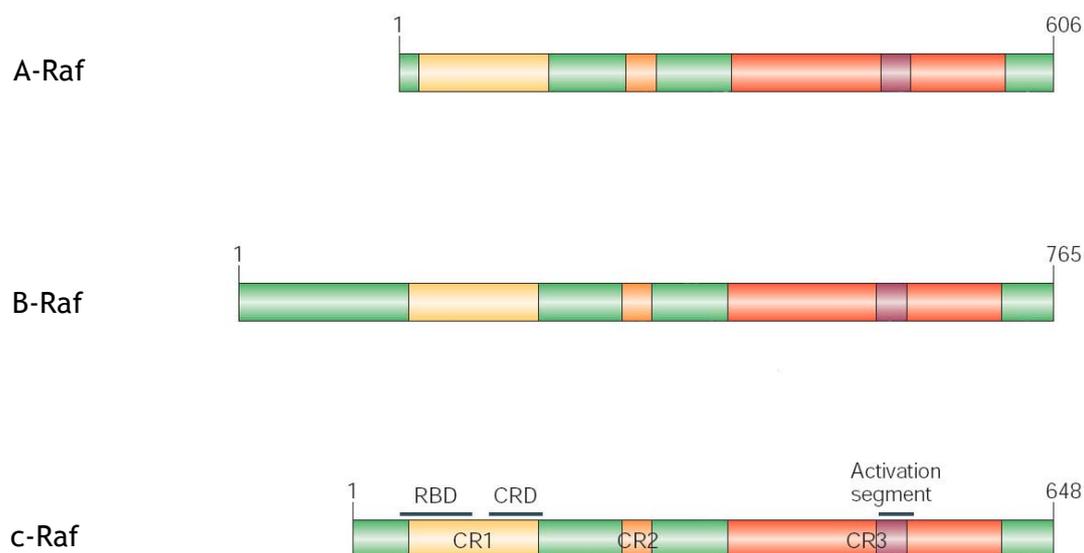


Figura 10. Estructura de las proteínas Raf. Las isoformas de Raf, A-Raf, B-Raf y c-Raf comparten tres regiones conservadas: CR1 (amarilla), CR2 (naranja) y CR3 (rojo). La región CR1 contiene el dominio de unión a Ras (*Ras-Binding Domain*, RBD) y el dominio rico en cisteína (*Cysteine-Rich Domain*, CRD), ambos necesarios para su reclutamiento en la membrana. La región CR2 contiene uno de los tres lugares de unión a 14-3-3, y la región CR3 el dominio catalítico (el lugar de activación está resaltado en rosa). Este dominio catalítico contiene los dos residuos de fosforilación T491 y S494, que también están conservados en A-Raf (T452 y T455) y B-Raf (T598 y S601).

De las tres isoformas de Raf únicamente Raf-1 se expresa de forma ubicua mientras que A-Raf lo hace predominantemente en el tracto urogenital y en los testículos, y B-Raf en el tejido neuronal (Wadewitz, Winer et al. 1993). La regulación de Raf es altamente compleja ya que Raf-1 forma parte de un complejo multiproteico y su activación depende de interacciones proteína-proteína, fosforilaciones de residuos tirosina, treonina y serina, y de su localización celular (Morrison and Cutler 1997). Por lo tanto, el estado de fosforilación y activación de Raf-1 dependerá de múltiples familias de proteínas, incluyendo miembros de la familia Src, PKC, PAK y Akt.

4.1.1. *Extracellular signal-Regulated Kinase (ERK)*

La familia de genes ERK está compuesta por ocho miembros distintos de quinasas duales serina/treonina: ERK1, ERK2, ERK3, ERK4, ERK5, ERK6, ERK7 y ERK8. Las quinasas ERK1 (p42) y ERK2 (p44) han sido las más estudiadas en relación a la activación por Raf en las células hematopoyéticas. Estas proteínas son activadas mediante una fosforilación dual en treonina y en tirosina por las quinasas MEK-1/2. Así mismo, tanto Mos como los tres miembros de la familia Raf son capaces de fosforilar y activar a MEK-1/2 (Papin, Eychene et al. 1995; Wu, Noh et al. 1996) (Figura 11). La dimerización de ERK ocurre a consecuencia de su fosforilación y promueve la translocación nuclear de la proteína (Khokhlatchev, Canagarajah et al. 1998). ERK, una vez activada, fosforilará principalmente residuos Ser/Thr precedentes a un dominio prolina, así como proteínas nucleares. Sin embargo, la actividad de ERK puede ser regulada negativamente por una serie de miembros de la familia de las MKP (*MAP Kinase Phosphatases*), principalmente MKP-1 y MKP-3 (Pouyssegur, Volmat et al. 2002).

Las proteínas ERK activadas median procesos celulares clave en el citoplasma, incluyendo la fosforilación de proteínas citosólicas y asociadas a membrana como quinasas, elementos del citoesqueleto, la fosfolipasas A2 y la Stathmina. Como se ha dicho anteriormente, estas proteínas también pueden translocarse al núcleo y allí fosforilar directamente a una gran variedad de factores de transcripción como Ets-1, c-Jun, c-Fos y c-Myc, permitiendo a la célula proliferar gracias a la expresión de genes fundamentales para la progresión del ciclo celular, p.e., Cdks, ciclinas, factores de crecimiento, o de genes clave para la prevención de la apoptosis como son Bcl-2 y algunas citocinas (Karin 1995; Karin and Hunter 1995; Chang, Steelman et al. 2003).

Ets es una familia de factores de transcripción que incluye a Ets-1, Ets-2, Elk-1, SAP1, SAP2, E1AF, PEA3, PU.1 y otros (Wasylyk, Hahn et al. 1993). Estos factores regulan un gran número de genes incluyendo otros factores de transcripción como p53, c-Fos y NF- κ B (Venanzoni, Robinson et al. 1996; Lambert, Ludford-Menting et al. 1997), genes de regulación del ciclo celular como la ciclina D1 (Beier, Lee et al. 1999), Rb (Tamir, Howard et al. 1999) y p21^{Waf-1} (Albanese, Johnson et al. 1995), genes implicados en la apoptosis como Bcl-2, Bcl-X_L y Fas (Sevilla, Aperlo et al. 1999), citocinas como el GM-CSF o la IL-3 (Nimer, Zhang et al. 1996), factores de crecimiento como el PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*) o el HB-EGF (*Heparin Binding Epidermal Growth Factor*) (McCarthy, Chen et al. 1997), y el receptor del M-

CSF (Celada, Borrás et al. 1996). Además, las proteínas Ets son capaces de asociarse con otros factores de transcripción para transactivar a sus genes diana.

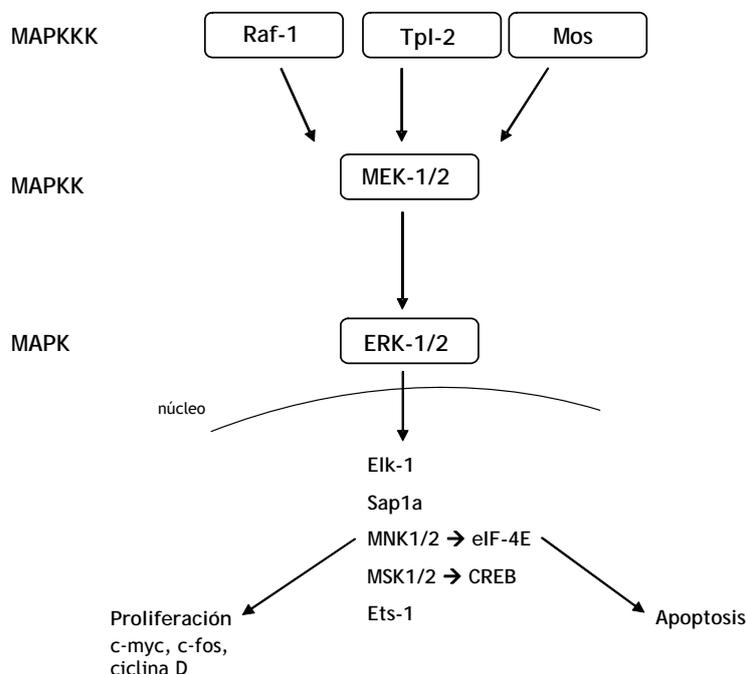


Figura 11. Vía de activación de ERK. La fosforilación dual en treonina y tirosina de ERK por las MAP quinasa quinasa (MAPKK) conduce a su activación y translocación nuclear donde, a su vez, ERK activará a una serie de factores de transcripción específicos. Del mismo modo, la activación de estas MAPKK viene dada por una fosforilación dual en serina y treonina llevada a cabo por las MAP quinasa quinasa (MAPKKK). ERK, *Extracellular signal-Regulated Kinase*; MEK, *Mitogen Extracellular signal-related Kinase*; Elk-1, *ETS-domain protein*; MNK, *MAPK iNteracting Kinases*; Tpl-2, *Tumor Progression Locus 2* y MSK, *Mitogen- and Stress-activated Kinase*.

C-Myc es un factor de transcripción que regula la proliferación celular induciendo un aumento de la masa celular así como un gran número de genes diana cuyas funciones están asociadas con la progresión del ciclo celular o la apoptosis (Prendergast 1999, Amati 2001, Nasi 2001). Las ERK pueden regular directamente los niveles de c-Myc en tanto en cuanto una fosforilación en Ser62 incrementa su transactivación y vida media (Seth 1991) y una fosforilación en Thr58 facilita su rápida degradación por la vía de la ubiquitina-proteasoma (Gregory and Hann 2000).

Las proteínas ERK también pueden fosforilar y activar a otras quinasa como RSK (*pp90 Ribosomal S6 Kinase*) quienes a su vez fosforilarán y activarán a factores de transcripción como CREB (*cAMP-Response Element Binding protein*) (Seth,

Gonzalez et al. 1992). CREB pertenece a la familia de genes CRE/ATF que funcionan como efectores de la vía de señalización del cAMP. Entre los miembros de esta familia también se encuentran CREM, ATF-1, ATF-2, ATF-3 y ATF-4, los cuales pueden formar homodímeros, heterodímeros, e incluso heterodímeros con miembros de la familia de factores de transcripción Jun (De Cesare, Jacquot et al. 1998; Boehlk, Fessele et al. 2000). Algunos de los genes regulados por los factores de transcripción de la familia CRE/ATF incluyen a la ciclina A, la ciclina D1, c-fos y bcl-2 (Pugazhenti, Miller et al. 1999; Wang and Murphy 2000).

Elk-1 contribuye a la rápida inducción de c-fos mediada por factores de crecimiento. Elk-1 forma el TCF (*Ternary Complex Factor*) junto con dos moléculas de SRF (*Serum Response Factor*), y así puede reconocer elementos de respuesta al suero (SRE) situados en el promotor de c-fos. A su vez, los dímeros CRE/ATF se unen a elementos de respuesta al cAMP (CRE) presentes en este mismo promotor, induciendo conjuntamente su expresión. Junto a c-jun, c-fos es un componente del factor de transcripción AP-1 (*Activating Protein-1*) cuya actividad está directamente relacionada con procesos de proliferación celular (Chinenov and Kerppola 2001).

Además, ERK también puede inducir indirectamente la activación del factor de transcripción NF- κ B (*Nuclear Factor immunoglobulin kappa chain enhancer B cell*) fosforilando y activando a su quinasa inhibidora IKK y permitiendo así que se separe de sus inhibidores y pueda translocarse al núcleo. Existen numerosos genes diana de NF- κ B que juegan un papel importante en la proliferación celular, la protección de apoptosis, la angiogénesis, la metástasis y en las respuestas inmunitarias (Schreck, Rieber et al. 1991; Baldwin 2001).

4.1.2. *c-Jun NH₂-terminal Kinase (JNK)*

Aunque la SAPK1 JNK se encuentra típicamente activada por estímulos de estrés celular, infecciones bacterianas y citocinas proninflamatorias, también se la ha relacionado con procesos de proliferación celular, diferenciación y apoptosis (Ip and Davis 1998; Shaulian and Karin 2001). JNK (p54MAPK) es activada gracias a una fosforilación dual en residuos treonina y tirosina llevada a cabo por las MAPKK MEKK1 y SEK1, secuencialmente.

La activación de JNK tiene como resultado la fosforilación y activación de AP-1 y otros factores de transcripción (Chinenov and Kerppola 2001). Los dímeros de AP-1 están formados por proteínas Jun/Fos. Todos los miembros de la superfamilia de

protooncogenes Jun/Fos codifican para factores de transcripción con un dominio en cremallera de leucina que es necesario para la dimerización y la unión a una secuencia de DNA similar para todos ellos (Karin, Liu et al. 1997). Las proteínas Jun (c-Jun, JunB y JunD) pueden formar homodímeros con otras proteínas Jun o bien heterodímeros con c-Fos, mientras que las proteínas Fos (c-Fos, FosB, Fra1 y Fra2) sólo dimerizan con proteínas Jun. Sin embargo, ambas familias, Jun y Fos, pueden dimerizar con otros factores de transcripción incluyendo miembros de la familia de proteínas ATF/CRE o de Maf/Nrl para transactivar la expresión de algunos genes (Kerppola and Curran 1994; van Dam and Castellazzi 2001). Así, la actividad de los factores de transcripción AP-1 está finamente regulada tanto a nivel proteico como posttranscripcional durante el ciclo celular. Genes como la ciclina D1, la ciclina A, Cdk4/6, p53, p16^{INK4a}, la IL-2, la IL-3, el GM-CSF o el MHC de clase II se encuentran bajo el control de AP-1 (Wisdom, Johnson et al. 1999; Bakiri, Lallemand et al. 2000; Casals, Barrachina et al. 2007).

4.1.3. p38 MAPK

La SAPK2 (p38) es activada por factores de crecimiento mediante la fosforilación dual en residuos treonina y tirosina por las MAPKK MKK6 o MKK3 (Clark, Dean et al. 2003). p38 activa en el citoplasma a la quinasa MAPKAPK-2 quien se encarga de unir elementos ARE (*Adenosin/uridin Rich Elements*) de zonas 3'-UTR (*UnTranslated Regions*) de mRNAs de genes proinflamatorios, para desadenilarlos y alargar así su vida media (Shi and Gaestel 2002). Los elementos ARE pueden dividirse en tres categorías. Los ARE de Clase I (p.e. c-fos) contienen de una a tres copias del motivo AUUUA próximos a regiones ricas en U. Los ARE de Clase II (p.e. GM-CSF, TNF- α , COX2 y otras citocinas proinflamatorias) contienen múltiples pentámeros. Los de Clase III (p.e. c-jun) incluyen ARE sin la secuencia pentamérica pero sí con las regiones ricas en U. Sin embargo, p38 en el núcleo regula la transcripción a través de MEF2C, ATF-2 y NF- κ B (Treisman 1996; Schmitz, Bacher et al. 2001).

4.2. Activación y MAPK

Tanto la activación clásica como la alternativa están mediadas en el macrófago por citocinas proinflamatorias cuyos receptores desencadenan fosforilaciones en tirosina en un gran número de proteínas citoplasmáticas con la consiguiente

activación de múltiples MAPK. De esta manera, los receptores para el IFN- γ y para la IL-4 están asociados a tirosina quinasas de la familia de proteínas JAK, y el receptor para el LPS (TLR4) a las serina/treonina quinasas IRAK-1/4. Recientemente han sido descritas diversas vías a través de las cuales los estímulos activadores pueden iniciar estas vías de señalización en el macrófago con diferentes resultados (Chan and Riches 2001; David, Ford et al. 2001; Ip, Wong et al. 2006; Valledor, Sanchez-Tillo et al. 2008).

4.2.1. ERK MAPK

A pesar de que esta quinasa ha sido relacionada principalmente con procesos de proliferación celular, el LPS también es capaz de inducir la actividad de ERK-1/2 a través de la vía Raf/MEK con una cinética distinta a la producida por el M-CSF (Reimann, Buscher et al. 1994). Mientras que los estímulos mitogénicos como el M-CSF inducen una rápida y fugaz actividad de ERK-1/2 (de los 5 a los 30 minutos), el LPS lo hace de manera más tardía y sostenida (de los 15 a los 60 minutos). El uso de inhibidores ha demostrado que la actividad de ERK es necesaria en el macrófago tanto para la proliferación dependiente de M-CSF como para la producción de citocinas inducidas por el LPS (Valledor, Comalada et al. 2000; Sebolt-Leopold 2004).

Como se ha comentado con anterioridad, las proteínas ERK una vez activadas son capaces de fosforilar a una gran variedad de proteínas celulares incluyendo a otras quinasas, componentes del citoesqueleto, la fosfolipasa A2 (responsable de la síntesis del ácido araquidónico) y factores de transcripción nucleares como Elk1/TCF y c-Jun, el cual regula la expresión de genes tempranos (Boulton, Nye et al. 1991).

4.2.2. JNK MAPK

La SAPK1 JNK es fosforilada y activada por las MAPKK SEK1 (también MKK4) y MKK7 de manera cooperativa (Derijard, Raingeaud et al. 1995). A su vez, estas MAPKK son activadas por las MAPKKK MEKK (1-4), MLK (*Mixed-Lineage protein Kinase*) (MLK1-3, DLK, LZK), ASK1-2 (*Apoptosis Signal-regulating Kinase*), TAK (*TGF- β -Activated Kinase-1*) y Tpl-2 (*Tumor Progression Locus 2*) (Figura 12). La actividad de JNK puede ser inducida por diversos estímulos incluyendo citocinas y factores de crecimiento, pero a diferencia de lo ocurrido con ERK-1/2, JNK no varía su cinética

de actividad bajo estímulos activadores y mitogénicos en macrófagos (Valledor, Comalada et al. 2000).

Existen 3 genes que codifican para JNK en los mamíferos, JNK-1, JNK-2 y JNK-3, cada uno localizado en un cromosoma distinto (Kyriakis and Avruch 1996). Cada uno de estos genes puede ser procesado de manera diferencial por *splicing* alternativo dando lugar al menos a diez proteínas JNK diferentes. La expresión de JNK-3 está limitada únicamente al corazón, el cerebro y los testículos, mientras que JNK-1 y JNK-2 están ampliamente distribuidas.

Clásicamente las proteínas JNK se han caracterizado por su capacidad para fosforilar regiones reguladoras en la zona N-terminal del factor de transcripción c-Jun (Sanchez, Hughes et al. 1994). Sin embargo, las quinasas JNK también pueden fosforilar a otros factores de transcripción como JunB, JunD, ATF-2, Elk-1, NFAT y p53 (Gupta, Campbell et al. 1995; Yang, Mark et al. 1998; Buschmann, Potapova et al. 2001). Además, JNK también puede jugar un importante papel en la apoptosis mediante la fosforilación de proteínas no nucleares implicadas en su regulación. De hecho, JNK es capaz de fosforilar directamente sustratos mitocondriales como algunos miembros de la familia de genes Bcl-2, induciendo en la célula una apoptosis dependiente de Bax (Lei and Davis 2003).

A partir de ensayos con inhibidores de las proteínas JNK como el SP600125 o el uso de ratones *knockout*, se ha podido conocer la contribución de cada una de las isoformas de esta MAPK. Así, la ausencia de JNK-3 no se ha visto asociada a ningún tipo de anomalía fenotípica (Dong, Yang et al. 1998). La pérdida de JNK-1 sin embargo, conlleva una hiperproliferación de los linfocitos T, una menor apoptosis inducida por activación, y una mayor polarización hacia linfocitos presentadores del subtipo Th2 (Dong, Yang et al. 1998). Además, los ratones *knockout* están más protegidos frente a la resistencia a la insulina inducida por la obesidad (Hirosumi, Tuncman et al. 2002). Por otro lado, la expresión de JNK-2 es requerida para la producción de IFN- γ por los linfocitos Th1 y para una correcta activación y apoptosis de los linfocitos T (Sabapathy, Hu et al. 1999). Algunos estudios prueban que en determinados tejidos donde JNK-1 y JNK-2 están coexpresados, pueden llevar a cabo funciones redundantes o al menos solapantes. Por el contrario, la inactivación de JNK-1 y JNK-2 en combinación se ha visto que produce la muerte del embrión (Kuan, Yang et al. 1999). También los *knockouts* de MKK4 y MKK7 son ambos letales a nivel embrionario a pesar de que la ausencia de cualquiera de ellos no impide la activación de JNK sino que sólo la atenúa (Yang, Tournier et al. 1997).

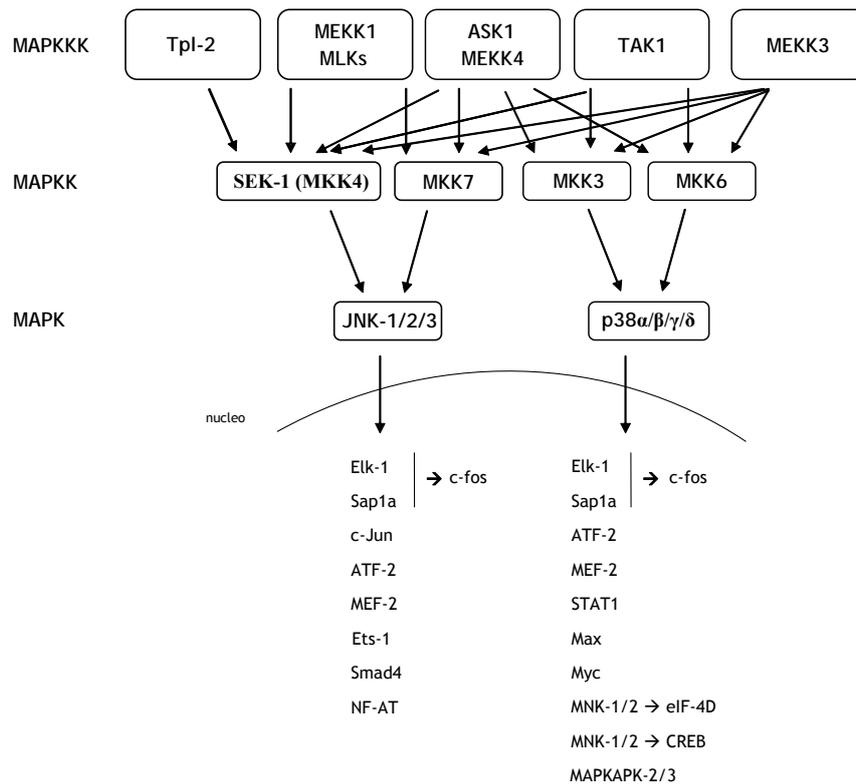


Figura 12. Vía de señalización de las Stress-Activated MAP Kinases JNK y p38. La cascada de fosforilaciones activadoras de las MAPK incluye un primer nivel de proteínas (MAPKKK) que fosforilan a un segundo (MAPKK) quienes, a su vez, fosforilan a las MAPK. Tpl-2, *Tumor Progression Locus-2*, JNK, *c-Jun N-terminal Kinase*; ASK, *Apoptosis Signal-regulating Kinase*; MEK, *MAPK/ERK Kinase*; MLK, *Mixed-Lineage protein Kinase*; TAK, *TGF- β Activated Kinase*; SEK, *SAPK/ERK Kinase*; MAPK, *Mitogen-Activated Protein Kinase*; MAPKK, *MAPK Kinase*; MAPKKK, *MAPKK Kinase*; Elk, *Ets-domain protein*; ATF-2, *Activating Transcription Factor-2*; MEF-2, *Mouse Embryonic Fibroblast-2*; MAPKAPK, *MAPK-Activated Protein Kinase*, Mnk-1/2, *MAPK iNteracting Kinases*, Msk-1/2, *Mitogen- and Stress-activated protein Kinase*; NF-AT, *Nuclear Factor Activator of T lymphocytes*.

4.2.3. p38 MAPK

La MAPK p38 es activada por fosforilación dual en treonina/tirosina por las MAPKK MKK3 y MKK6 y, en ocasiones, también por MKK4 (Han, Enslin et al. 1998). La regulación de estas MAPKK tiene lugar gracias a la fosforilación en serina/treonina de las MAPKKK Tak1, Ask1 y Mlk3 (Tibbles 1996). A su vez, la fosforilación de estas quinasas depende de señales reguladoras que incluyen la activación de proteínas G como Rac1 y Cdc42 (Frost, Xu et al. 1996) (Figura 12).

Hasta la fecha se conocen 4 isoformas de p38 las cuales comparten una alta homología aminoacídica: p38 α (también conocida como CSAIDS *binding protein*, CSFBP o SAPK2a), p38 β (SAPK2b o p38-2), p38 γ (SAPK3 o ERK6) y p38 δ (SAPK4) (Jiang, Li et al. 1997). p38 α y β se expresan de manera ubícua mientras que la expresión de las isoformas γ y δ se encuentra limitada a determinados tejidos como el cerebro. Por el momento poco se conoce acerca de la función de las isoformas γ y δ puesto que la mayoría de los inhibidores comerciales, como el SB203580, sólo son capaces de inhibir a las isoformas α y β (Lee, Kwack et al. 2000).

Las quinasas p38 pueden activar a los miembros del TCF Elk-1 y Sap1 α , a CHOP (un miembro de la familia de factores de transcripción C/EBP), ATF-2/6 y a algunos factores MEF2 como por ejemplo MEF2C (Kyriakis and Avruch 2001). También induce otros genes inmediatos como Mnk1, Msk2, MAPKAPK-2, MAPKAPK-3 Msk1 y hnRNP. El principal sustrato de MAPKAPK-2 es la hsp27 (*heat shock protein 27*), una proteína implicada en la reorganización del citoesqueleto (Lathey, Kanangat et al. 1994). Algunos estudios sugieren también que la inducción de p38 por LPS puede regular la transcripción de IL-1 β y del TNF- α a través de la estabilización de su mRNA (Lee, Laydon et al. 1994).

Así pues, la activación de AP-1 en respuesta a citocinas y estrés genotóxico está mediada en gran parte por las MAPK JNK y p38. Las consecuencias fisiológicas de la activación de AP-1 son apoptosis, inflamación, respuesta a estrés celular y producción de citocinas (Yang, Tournier et al. 1997). Si embargo, otras muchas proteínas cruciales para la supervivencia de células cancerosas son también sustratos de JNK, incluyendo p53, c-myc y varios miembros de la familia de Bcl-2 como Bcl-2, Bcl-X, Bad, Bax y Bak (Noguchi, Takeno et al. 1999; Kharbanda, Saxena et al. 2000). También se ha demostrado que la actividad de p38 media la agregación de las plaquetas, la regulación del crecimiento hepatocítico y la organización del citoesqueleto de actina (Polanowska-Grabowska and Gear 2000). Además, p38 muestra capacidad de regular la inducción de la apoptosis y la diferenciación celular (Nagata, Takahashi et al. 1998).

La inactivación de estas MAPK ocurre de una forma relativamente rápida y está mediada por fosfatasas como la proteína fosfatasa-1, la proteína fosfatasa 2A y MKP-1 (Chu, Solski et al. 1996).

4.3. Fosfatasa de las MAPK (MKP)

La activación de las MAPK por fosforilación se ve contrarrestada por una defosforilación mediada por fosfatasa. Teniendo en cuenta que las vías de señalización de las MAPK regulan la expresión génica en la respuesta inmunitaria, las fosfatasa actuarían como importantes reguladoras negativas en muchos aspectos de la respuesta celular (Hunter 1995; Keyse 2000). Existen varias familias distintas de fosfatasa actuando sobre distintos residuos proteicos: específicas de residuos serina/treonina (PSP), específicas de residuos tirosina (PTP) o fosfatasa de especificidad dual (DSP).

Las fosfatasa serina/treonina (PSP) incluyen a PP1, PP2A, PP2B (también llamada Calcineurina) y PP2C, las cuales se diferencian entre sí a nivel de su regulación y especificidad de sustrato. Todas ellas conservan las mismas características en la subunidad catalítica entre especies y pueden ser reguladas positivamente por fosforilación por la PKA y la glicógeno sintasa quinasa-3 (GSK-3).

Las fosfatasa tirosina (PTP) tienen un grupo cisteína conservado en su dominio catalítico e incluyen a varias proteínas que actúan como receptores o fosfatasa citoplasmáticas (Denu and Dixon 1998). Las fosfatasa duales (DSP) tienen un grupo cisteína conservado encargado de la función catalítica, además de algunas características también conservadas en su estructura tridimensional. Existen dos grupos de fosfatasa duales, uno inducido por la vía de las MAPK (conocido como *Mitogen-activated protein Kinase Phosphatases*, MKP), responsable de la defosforilación de las MAPK y que suponen un mecanismo de retroalimentación negativa de la propia vía, y otro grupo constituido por Cdc25. Las MKP inactivan a las MAPK a través de la defosforilación tanto del residuo fosfotreonina como del fosfotirosina en bucle de activación. El grupo consistente en la proteína Cdc25 juega un papel crítico en el control del ciclo celular eliminando los grupos fosfato inhibidores de los residuos treonina y tirosina de la zona N-terminal de las Cdk (Busino, Chiesa et al. 2004).

Hasta la fecha se han descrito 13 DSP de MAPK (DS-MKP) distintas y se han clasificado en cuatro subgrupos en función de su especificidad de sustrato, distribución tisular, localización subcelular y regulación de sus dianas (Ishibashi, Bottaro et al. 1994) (Tabla I). Las DS-MKP de tipo I, que tienen un dominio fosfatasa de especificidad dual (DSP), incluyen a las proteínas VHR (ERK), DSP2 (p38, JNK) (Aoyama, Nagata et al. 2001) y MKP-6 (ERK/JNK) (Marti, Krause et al. 2001). Las DS-MKP de tipo II tienen un dominio N-terminal MKB (*MAPK binding*) además del dominio

DSP. Este grupo incluye a las proteínas MKP-1 (ERK=JNK=p38) (Chu, Solski et al. 1996), PAC1 (ERK=p38>JNK) (Ward, Gupta et al. 1994; Chu, Solski et al. 1996), MKP-2 (ERK=JNK>p38) (Misra-Press, Rim et al. 1995; Chu, Solski et al. 1996), VH3/B23, MKP-3 (ERK>>JNK=p38) (Muda, Theodosiou et al. 1998), PYST2 (Groom, Sneddon et al. 1996) y MKP-4 (ERK>p38=JNK) (Muda, Boschert et al. 1997). En la mayoría de tipos celulares la fosfatasa MKP-1 defosforila a p38 y JNK pero bajo estímulos determinados puede también inactivar a ERK (Franklin and Kraft 1997). Las DS-MKP de tipo III sólo incluyen a MKP-5 (JNK=p38>>ERK) quien tiene dominios Nt, MKB y DSP (Tanoue, Moriguchi et al. 1999). Por último, las de tipo IV tienen una secuencia PEST (rica en prolina, ácido glutámico, serina y treonina) en el dominio DSP. Este grupo incluye a las fosfatasas VH5/M3/6 (Muda, Theodosiou et al. 1998) y MKP-7 (Masuda, Shima et al. 2001), ambas específicas para JNK y p38 pero no para ERK.

Miembro	Especificidad	Localización subcelular
Fosfatasas PSP PP1 PP2A PP2B o Calcineurina PP2C	Serina/Treonina	
Fosfatasas PTP	Tirosina	
Fosfatasas DSP	Dual: Ser/Thr y Tyr	
Tipo I VHR DSP2 MKP-6 (MKP-L)	ERK p38, JNK ERK, JNK	Membrana
Tipo II MKP-1 (CL100/DUSP1) PAC1 o DUSP2 MKP-2 o TYP-1 (DUSP4) DUSP5 (B23, hVH3) MKP-3 (PYST1, DUSP6) MKP-X (PYST2, DUSP7) (MKP-4, DUSP9)	ERK, p38, JNK ERK=p38> JNK ERK=JNK> p38 ERK ERK>>p38=JNK ERK ERK>p38=JNK	Nuclear Nuclear Nuclear Nuclear Citoplasmática Citoplasmática Citoplasmática
Tipo III MKP-5 (DUSP10)	JNK=p38>>ERK	Nuclear/Citoplasmática
Tipo IV MKP-7 M3/6 (hVH5)	JNK, p38 JNK, p38	Citoplasmática Citoplasmática
Cdc25	CDK	

Tabla I. Miembros de la familia de las fosfatasas (entre paréntesis la nomenclatura en humanos)

La distribución de estas fosfatasas es altamente restrictiva, así, por ejemplo, la expresión de MKP-7 es muy baja en células hematopoyéticas y linfoides, y además su secuencia contiene motivos funcionales como NES (*nuclear export signal*) y señales de localización nuclear (NLS) sugiriendo que esta fosfatasa podría estar actuando

como molécula lanzadera para otras proteínas (Masuda, Shima et al. 2001). La expresión de MKP-5 ha sido relacionada con la defosforilación de JNK en respuesta al LPS, limitando así los niveles de TNF- α e IL-6 en células RAW (Theodosiou, Smith et al. 1999). Por otro lado, la localización subcelular de las fosfatasa MKP-3, MKP-4, MKP-7, M3/6 y Pyst2 está restringida al citoplasma mientras que la de de MKP-1, PAC1, MKP-2 y B23 es meramente nuclear. La expresión ubíca de MKP-1 *in vivo* es fisiológicamente relevante en determinados tipos celulares como los macrófagos, los mastocitos, los osteoclastos y el epitelio del intestino y el pulmón, ya que en ellos es capaz de defosforilar eficientemente a la MAPK ERK (Engelbrecht, de Wet et al. 2003).

El gen de *mkp-1*, originalmente llamado *erp/3CH134* en ratones y CL100 en humanos, está considerado un gen supresor de tumores ya que se ha visto mutado en determinados tipos de tumores (Scimeca, Servant et al. 1997). Inicialmente MKP-1 fue identificado debido a su inducción por estímulos como factores de crecimiento y estrés celular, como un mecanismo de retroalimentación negativa para la actividad de las MAPK (Lewis, Groom et al. 1995). También se ha demostrado que la PKA, el Ca²⁺ y la PKC contribuyen a la activación de MKP-1 (Waskiewicz and Cooper 1995; Scimeca, Servant et al. 1997). Además, algunos autores han descrito que la activación de la MAPK p42/44 ERK es importante para la inducción de la expresión de MKP-1, sin embargo se ha visto que es dependiente de tipo celular (Cook, Beltman et al. 1997; Valledor, Xaus et al. 1999; Sanchez-Tillo, Comalada et al. 2007).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El objetivo general de este estudio ha sido el de investigar los mecanismos implicados en la proliferación y activación de los macrófagos en el contexto de la activación alternativa. Nos hemos centrado más específicamente en los siguientes aspectos:

1. El estudio de las similitudes y diferencias entre las activaciones clásica y alternativa tanto a nivel celular como molecular, oncretamente de la dicotomía proliferación/activación en el macrófago.
2. El estudio de las vías de señalización inducidas por la IL-4 en la parada de la proliferación dependiente de M-CSF.
3. El papel de las MAPK en la activación alternativa del macrófago.

RESULTADOS

La IL-4 para la proliferación de los macrófagos dependiente de M-CSF induciendo p21^{Waf1} vía STAT6.

RESUMEN

Los macrófagos derivados de la médula ósea proliferan en presencia de su factor de crecimiento específico, el M-CSF. La incubación de estas células con interferón- γ (IFN- γ) o con interleucina-4 (IL-4) bloquea dicha proliferación. Mientras que la carencia de M-CSF detiene el ciclo celular en una etapa temprana de la fase G₁, el tratamiento con IFN- γ o con IL-4 lo hace más tardíamente, en el umbral entre G₁ y S. Tanto el IFN- γ como la IL-4 inducen la expresión del inhibidor de Cdk p21^{Waf1}. Usando modelos de ratón deficientes de esta proteína (*knockout*) así como la tecnología del iRNA, hemos visto que p21^{Waf1} es necesario para la parada de la proliferación dependiente de IL-4, pero no para la dependiente de IFN- γ . Así mismo, la IL-4 inhibe también la actividad de las quinasas Cdk-2 y Cdk-4, las cuales son necesarias tanto para la entrada como para la posterior progresión a través de la fase S del ciclo celular. La vía de señalización usada a partir de la interacción de la IL-4 con su receptor para inducir la expresión de p21^{Waf1} está mediada por STAT6. En conclusión, hemos comprobado que, a pesar de que tanto la IL-4 como el IFN- γ son capaces de parar la proliferación dependiente de M-CSF en los macrófagos, lo hacen a través de distintos mecanismos.

RESULTADOS

La IL-4 para la proliferación de los macrófagos dependiente de M-CSF en la fase G₀/G₁.

En presencia del M-CSF los macrófagos proliferan de manera dosis dependiente (Fig. 1A) mientras que la carencia de este factor de crecimiento induce una parada de la proliferación en la fase G₀/G₁ (Xaus, Cardo et al. 1999). El estímulo activador de tipo Th1 IFN- γ inhibe la proliferación dependiente de M-CSF (Fig. 1A). También hemos observado que la IL-4, una citocina de tipo Th2, inhibe la proliferación, confirmando la dicotomía entre proliferación y activación previamente descrita en nuestro grupo (Xaus, Cardo et al. 1999). Tras 24-48h de exposición a estas citocinas y al M-CSF, se realizó un conteo celular y se observó un menor número de células

comparado con el obtenido en la muestra tratada sólo con el factor de crecimiento (Fig. 1B). Para excluir cualquier efecto relacionado con la base genética del ratón, comprobamos nuestros resultados en macrófagos derivados de ratones Balb/c, obteniendo resultados similares (Fig. 1C).

Mediante una tinción con Anexina V, un marcador de apoptosis temprana, determinamos los niveles de apoptosis (Fig. 1D). En las células tratadas con IL-4 o IFN- γ no se observó un menor número de células ni una mayor entrada en apoptosis. Este resultado demuestra que las dosis de citocinas usadas durante este estudio no comprometen la viabilidad celular.

Para determinar el perfil del ciclo en el que se encontraban las células realizamos tinciones de DNA. Tanto el IFN- γ como la IL-4 pararon la proliferación en la fase G₀/G₁ incluso cuando las células no habían sido previamente sincronizadas (Fig. 1E). Estos resultados indican que el tratamiento con estas citocinas ejerce un efecto en las primeras etapas del ciclo celular.

La IL-4 induce un aumento de la expresión del inhibidor de Cdk p21^{Waf1}.

Dado que el tratamiento con IL-4 e IFN- γ detiene la célula en el umbral entre G₁ y S quisimos analizar la expresión de las Cdk de la fase G₁ así como otras proteínas implicadas en la progresión a través de esta fase. La parada del ciclo inducida por la retirada del factor de crecimiento M-CSF es debida a la inhibición de la expresión de las ciclinas D1 y E (Fig. 2A) (Matsushime, Roussel et al. 1991). Así mismo, tanto el IFN- γ como la IL-4 causan la inhibición de la ciclina E. Sin embargo, mientras la IL-4 bloquea la expresión de la ciclina D1, el IFN- γ no es capaz de modificarla, lo cual sugiere un mecanismo de acción distinto para las dos citocinas. El análisis de la expresión de las Cdk-2 y -4 reveló que ni el IFN- γ ni la IL-4 actúan regulando sus niveles de expresión (Fig. 2B). A continuación determinamos la expresión de los inhibidores de Cdk. La carencia de M-CSF hizo disminuir significativamente los niveles de p19^{INK4D}, p15^{INK4B} y p16^{INK4A} (Fig. 2C). Tanto la IL-4 como el IFN- γ indujeron la expresión de p21^{Waf1} a la vez que inhibieron la de p27^{Kip1}, p18^{INK4C}, p19^{INK4D} y p16^{INK4A}. Curiosamente, mientras que la IL-4 indujo la expresión de p15^{INK4B}, el IFN- γ la inhibió.

Teniendo en cuenta estas observaciones analizamos la cinética de inducción de estos dos inhibidores de Cdk con IL-4 y con M-CSF. La inducción de p21^{Waf1} por la IL-4 en presencia de M-CSF ocurre de manera muy temprana (Fig. 2D). Sin embargo, la inducción de p15^{INK4B} por M-CSF con y sin IL-4 fue idéntica durante las primeras 3h de tratamiento. Tomando estas dos cinéticas de expresión, enfocamos nuestro trabajo

en determinar el papel de p21^{Waf1} como mediador de la inhibición de la proliferación producida por la IL-4 (Harper, Adami et al. 1993).

En estudios previos se había observado que el IFN- γ inhibía la expresión del protooncogén c-myc (Xaus, Cardo et al. 1999), el cual es necesario para entrar en el ciclo celular. Sorprendentemente, la IL-4 no sólo no redujo los niveles de c-myc sino que los aumentó significativamente (Fig. 2E). En conjunto, estos resultados sugieren que, aunque las activaciones clásica y alternativa afectan al ciclo celular del macrófago inhibiéndolo, este tipo de activaciones probablemente usan distintas vías de señalización para ejercer su función.

La IL-4 induce p21^{Waf1} que interacciona con Cdk-2 y -4.

Dado que la IL-4 induce la expresión del inhibidor de Cdk p21^{Waf1} pero no la de las propias Cdk, quisimos comprobar si esta inducción afectaba a la actividad quinasa de dichas Cdk. Para ello hicimos ensayos quinasa *in vitro* y, como cabía esperar, la IL-4 inhibió la actividad mediada por el M-CSF de estas proteínas (Fig. 3A). Hicimos también ensayos de coinmunoprecipitación contra estas dos quinasas para detectar a continuación p21^{Waf1} por *western blot*. Efectivamente, cuando las células fueron tratadas con IL-4 o IFN- γ , p21^{Waf1} coinmunoprecipitó tanto con Cdk-2 como con Cdk-4 (Fig. 3B).

Para determinar si estos efectos de la IL-4 sobre la proliferación también implicaban la expresión o represión de otros genes usamos modelos de ratones deficientes de p21^{Waf1} en ensayos de proliferación con M-CSF e IL-4. En los ratones control la IL-4 paró la proliferación dependiente de M-CSF, mientras que en los ratones deficientes de p21^{Waf1} fue incapaz de disminuir su proliferación (Fig. 3C).

Para confirmar estos datos, y debido a que en los anteriores ensayos realizados la IL-4 no conseguía inhibir completamente la proliferación de estos macrófagos deficientes de p21^{Waf1}, probablemente debido a su base genética, llevamos a cabo ensayos usando la tecnología del RNA de interferencia (iRNA) en nuestro modelo de ratón C57Bl/6. Comparados con los controles (mock o siGL3), en los macrófagos tratados con M-CSF e IL-4, el siRNA inhibió eficientemente la inducción de la expresión del gen p21^{Waf1} (Fig. 4A). De nuevo, la inhibición de dicho gen consiguió revertir la parada de la proliferación de los macrófagos tratados con IL-4 demostrando así que p21^{Waf1} es un elemento clave en la inhibición de la proliferación mediada por la IL-4.

A continuación quisimos comprobar la actividad de Cdk-2 en los macrófagos deficientes de p21^{Waf1} (Fig. 4B). Como esperábamos, en las células sin p21^{Waf1} ni el tratamiento con IL-4 ni con IFN- γ consiguió reducir los niveles de actividad de esta quinasa.

La IL-4 para la proliferación de manera STAT6 dependiente.

Una vez comprobada la implicación de p21^{Waf1} en la inhibición de la proliferación quisimos determinar qué vía era la responsable de su inducción. Para ello realizamos ensayos de western blot contra la forma activa de la proteína Akt, principal efectora de la vía de la PI3k. No sólo no observamos una mayor presencia de esta proteína al tratar las células con IL-4, sino que el tratamiento de las células con Wortmanina, un inhibidor de la vía de la PI3K, tampoco consiguió bloquear la expresión de p21^{Waf1} inducida por la IL-4 (Fig. 5A). Llevamos a cabo ensayos similares para comprobar los niveles de expresión de p21^{Waf1} en células tratadas con inhibidores para las 3 vías principales de las MAPK. Ninguno de ellos consiguió bloquear la expresión de p21^{Waf1} sugiriendo que su inducción debía estar mediada por otra vía distinta (Fig. 5B).

Por último, quisimos determinar si el factor de transcripción STAT6 era el responsable de la inducción de p21^{Waf1} y para ello usamos ratones deficientes de este factor y las comparamos con células control. Las células provenientes de los ratones carentes de STAT6 fueron incapaces de inducir la expresión de p21^{Waf1} al ser estimuladas con IL-4 (Fig. 5C) demostrando así la relación entre la IL-4, STAT6 y p21^{Waf1} en la parada de la proliferación. Para comprobar si STAT6 podría estar uniéndose al promotor de p21^{Waf1} realizamos ensayos EMSA con una secuencia específica para este factor de transcripción extraída del promotor de p21^{Waf1} (Fig. 5D). Efectivamente, los extractos de células inducidas con IL-4 generaron un retardo al ser incubadas con dicha secuencia mientras que los mismos extractos de células deficientes de STAT6 no lo mostraron. Además, la incubación de las muestras con un anticuerpo anti-STAT6 generó un complejo de masa superior en las células control demostrando así que la proteína unida a la secuencia usada era STAT6 y no otra.

Para confirmar la especificidad de la unión de STAT6 con la secuencia usada se realizaron ensayos de competición con oligonucleótidos fríos así como con diferentes sondas mutadas. Sólo la sonda original fría fue capaz de competir con la sonda radiactiva (Fig. 5E).

La activación alternativa del macrófago es dependiente de STAT6.

Para concluir el estudio quisimos comprobar la dicotomía entre activación alternativa y proliferación previamente descrita en nuestro grupo para la activación clásica el macrófago (Xaus, Cardo et al. 1999). Para ello, realizamos ensayos de expresión de diversos genes por PCR cuantitativa. Como esperábamos, los principales genes marcadores de la activación alternativa inducidos por la IL-4 no se indujeron por IFN- γ , y viceversa, los genes marcadores de activación clásica se indujeron por IFN- γ pero no por IL-4 (Fig. 6A). Más aún, al usar células carentes de STAT6 la inducción de los genes dependientes de IL-4 se vio drásticamente reducida (Fig. 6B).

Puesto que algunos autores han sugerido que la presentación antigénica por las moléculas de Clase II es una de las pocas características compartidas por las activaciones clásica y alternativa (Gordon 2003), quisimos comprobar dicha afirmación con ensayos de PCR y de expresión en superficie. Sorprendentemente, no hayamos inducción de los genes de Clase II al estimular las células con IL-4 ni pudimos detectar expresión en superficie de dicha molécula en comparación con las células activadas por IFN- γ (Fig. 6C).

DISCUSIÓN

En este estudio demostramos por primera vez que la IL-4, la principal citocina responsable de la activación alternativa de los macrófagos, bloquea la proliferación de estas células. Esta observación contrasta con el efecto proliferativo de la IL-4 en los linfocitos T y B (Brown and Hural 1997) o la inducción de apoptosis en los mastocitos (Yeatman, Jacobs-Helber et al. 2000; Bailey, Kashyap et al. 2004). Esta parada del ciclo celular por la IL-4 ocurre en un punto concreto, el umbral entre G₁ y S, lo cual sucede también cuando las células son tratadas con IFN- γ . Sin embargo, los mecanismos usados para llegar a este punto parecen ser distintos. La parada de la proliferación inducida por la IL-4 requiere de la expresión de p21^{Waf1} el cual no es necesario para la parada por IFN- γ (Xaus, Cardo et al. 1999). Los experimentos realizados usando iRNA y modelos *knockout* para p21^{Waf1} han demostrado que esta es la proteína crítica para que se lleve a cabo este efecto de bloqueo de la IL-4. Otros estudios han sugerido que p27^{Kip1} podría jugar un papel importante en la parada de la proliferación mediada por p21^{Waf1} (Liu, Estes et al. 2000). Sin embargo, bajo nuestras condiciones experimentales, no hemos hallado ninguna implicación de p27^{Kip1} en este

proceso. Más aún, hemos visto que en los macrófagos derivados de ratones *knockout* para p27^{Kip1} la IL-4 seguía parando la proliferación.

La inducción de p21^{Waf1} por la IL-4 es dependiente de STAT6 como demostramos en ensayos realizados con células *knockout* para este factor de transcripción. Además, en este estudio mostramos que STAT6 puede unirse a secuencias presentes en el promotor de p21^{Waf1} de manera específica. Estos datos confirman los estudios realizados previamente en células tumorales en las que los efectos antiproliferativos de la IL-4 están mediados por STAT6 (Gooch, Christy et al. 2002).

La inhibición de la expresión de las fosfatasa de las MAPK mediada por el IFN- γ alarga la actividad de las MAPK e inhibe la proliferación del macrófago en respuesta al M-CSF

RESUMEN

Los macrófagos proliferan en respuesta a factores de crecimiento específicos como el M-CSF. En presencia de distintas citocinas y factores activadores, los macrófagos detienen su ciclo celular, se activan y participan en el desarrollo de la respuesta inmunitaria. Hemos visto en estudios anteriores que la activación de ERK-1/2 es necesaria para la proliferación del macrófago en respuesta a factores de crecimiento. Un patrón rápido de activación e inactivación de ERK-1/2 se correlaciona con esta respuesta proliferativa. Algunas señales que llevan a la activación del macrófago y a la parada de su proliferación implican un patrón de activación más largo de estas quinasas. El IFN- γ es el principal activador endógeno de tipo Th1 para el macrófago. En este estudio mostramos que la estimulación con IFN- γ alarga el patrón de activación de ERK inducido por M-CSF, en estas células. Estos efectos se correlacionan con la inhibición por esta citocina de varios miembros de la familia de las MAPK fosfatasa, como la MKP-1, -2 y -4. Además, la inhibición de la expresión de MKP-1 usando la tecnología del siRNA así como inhibidores sintéticos, lleva a un alargamiento de la actividad de ERK y a una parada de la proliferación dependiente del M-CSF. Estos datos sugieren que los cambios sutiles en la cinética de actividad de los miembros de la familia de las MAPK contribuyen en los efectos antiproliferativos del IFN- γ en los macrófagos.

RESULTADOS

En los macrófagos, la activación de la vía de señalización de ERK en respuesta al M-CSF se induce fuertemente a los 5-10 minutos después de recibir el estímulo y desciende significativamente después de los 30 minutos (Fig 1a). Para determinar la influencia del IFN- γ sobre la activación de ERK pretratamos las células durante 5' con IFN- γ antes de añadirles el M-CSF. Bajo estas condiciones, la actividad de ERK se alargo significativamente hasta las 3h después del estímulo (Fig 1a). Utilizando el mismo tratamiento vimos que la actividad de p38 también se vio alargada (Fig 1b) mientras que la de JNK-1 no estuvo afectada (Fig 1c). El tratamiento sólo con IFN- γ

sirvió como control para ver que esta citocina activaba débilmente tanto a ERK como a JNK-1 a partir de las dos horas de tratamiento (Figs 1d y e), sugiriendo que el alargamiento de ERK con M-CSF e IFN- γ no está mediado necesariamente por la activación directa del IFN- γ . Por el contrario el IFN- γ es capaz de activar directamente a p38 lo que sugiere que el alargamiento de su actividad con M-CSF e IFN- γ es la consecuencia de un efecto aditivo. Además, comprobamos mediante microscopía confocal que el IFN- γ potenciaba la entrada en el núcleo de ERK mediada por la actividad del M-CSF (Fig 1g).

Para determinar el mecanismo por el cual se alargaba la actividad de ERK medimos la expresión de fosfatasas reguladoras de las MAPK. Primero medimos la capacidad del M-CSF para inducir la expresión de estas fosfatasas (Fig 2a). A continuación, medimos el efecto que el IFN- γ tenía sobre esta inducción dependiente del M-CSF. Vimos que esta citocina era capaz de bloquear la expresión temprana de MKP-1, -2 y -4. (Fig 2b). Sorprendentemente, la expresión de MKP-5 y -7 se vio aumentada más tardíamente al añadir IFN- γ a las células (Fig 2c), explicando quizá porqué el alargamiento de la actividad de ERK no se prolonga mucho en el tiempo después de la estimulación con IFN- γ .

Contrariamente a lo que ocurre en otras células del sistema inmunitario, en los macrófagos, la activación está asociada a una parada de la proliferación (Xaus, Cardo et al. 1999). El tratamiento con IFN- γ inhibe la proliferación inducida por el M-CSF en los macrófagos de manera dependiente de STAT1 (Fig 3a). Para ampliar el estudio de este mecanismo ensayamos la capacidad del IFN- γ para inhibir la proliferación añadiéndolo en el mismo momento que el M-CSF o más tarde y a distintos tiempos (Fig 3b). Vimos que el IFN- γ mantenía su capacidad inhibidora durante las dos primeras horas de tratamiento después del M-CSF y, a partir de este momento, iba perdiendo gradualmente su efecto. Esto sugiere que esta parada dependiente de IFN- γ esta regulada muy tempranamente durante la primera fase del ciclo celular.

Basándonos en estudios previos que sugieren que la inducción de p21^{Waf1} dependiente de IFN- γ juega un papel importante en la protección frente a apoptosis (Xaus, Cardo et al. 1999), quisimos ver si este inhibidor de Cdk era también el responsable de la parada de la proliferación mediada por esta citocina. Demostramos que, pese a que la inducción de p21^{Waf1} por IFN- γ es dependiente de STAT1 (Fig 3c), éste no juega un papel esencial en la parada de la proliferación, como se observa en los ensayos realizados con macrófagos derivados de ratones deficientes de p21^{Waf1}

(Fig 3d). Así, podemos concluir que el efecto antiproliferativo del IFN- γ en los macrófagos es dependiente de STAT1 pero independiente de p21^{Waf1}.

Estudios previos de diversos grupos han sugerido que cinéticas de activación diferenciales de ERK tienen como consecuencia distintas respuestas a nivel celular. Así, un patrón de activación rápido y corto se relaciona con procesos proliferativos mientras que una cinética más prolongada en el tiempo se asocia a procesos activadores (Jaworowski, Christy et al. 1996; Valledor, Comalada et al. 2000). Basándonos en esta premisa, y viendo que el IFN- γ alteraba el patrón de actividad de ERK, alargándolo, quisimos comprobar si este efecto contribuía a llevar a cabo el efecto antiproliferativo que esta citocina tiene sobre los macrófagos.

Para comprobar esta teoría y teniendo en cuenta los resultados previamente obtenidos, comprobamos la capacidad del IFN- γ de alargar la actividad de ERK en células carentes de STAT1 (Fig 4a). Efectivamente, mientras que la inducción de la actividad de esta quinasa era idéntica tanto en células control como en aquellas derivadas de ratones *knockout* para STAT1, el alargamiento mediado por IFN- γ se demostró únicamente en las células control. En correlación con este resultado, la inducción de la fosfatasa MKP-1 no se vio alterada por el tratamiento con IFN- γ en las células STAT1^{-/-} en comparación con las células control (Fig 4b).

Por otro lado, también comprobamos que el IFN- γ mantenía su capacidad antiproliferativa en macrófagos derivados de ratones *knockout* para p38 α y para JNK-1, sugiriendo que estas MAPK no están implicadas en este proceso (datos no mostrados).

Viendo que, de las fosfatasas estudiadas, MKP-1 tenía una cinética de expresión estrechamente relacionada con la inactivación de ERK y que además se inhibía por IFN- γ , decidimos usar la tecnología de siRNA para inhibir su inducción en respuesta al M-CSF (Fig 5a). Esta inhibición se tradujo en un aumento en la intensidad y el tiempo de activación de ERK (Fig 5b) así como en una inhibición parcial de la proliferación de los macrófagos (Fig 5c). Curiosamente, la inhibición de MKP-1 no afectó a la expresión de c-myc (datos no mostrados), lo cual sugiere que el bloqueo de la proliferación no es dependiente de los cambios en la expresión de este gen. En conjunto, estos resultados sugieren una implicación clave de MKP-1 en el alargamiento de la actividad de ERK así como en la parada del ciclo celular. Sin embargo, los estudios realizados con células derivadas de ratones *knockout* para este gen no corroboran esta hipótesis. Aunque, curiosamente, se ha comprobado que la expresión de otra fosfatasa, MKP-4, anticipa su expresión y aumenta sus niveles en

dichas células *knockout* para MKP-1, sugiriendo la existencia de algún tipo de mecanismo compensatorio *in vivo*.

DISCUSIÓN

En este estudio hemos demostrado que la activación clásica del macrófago por el IFN- γ tiene como consecuencia una actividad más intensa y prolongada de los miembros de la familia de las MAPK en respuesta al M-CSF. El mecanismo a través del cual sucede es una combinación del efecto directo del M-CSF y del IFN- γ conjuntamente, acompañado de la inhibición de la expresión de una serie de fosfatasa. El M-CSF tiene la capacidad de inducir la expresión de varias MKP que probablemente actúen de forma conjunta para asegurar una correcta regulación e inactivación de las MAPK de manera dependiente del tiempo y la compartimentación celular. A su vez, el IFN- γ tiene la capacidad e inhibir selectivamente a la MKP-1, -2 y -4 teniendo como consecuencia un alargamiento de la actividad de las MAPK. Sin embargo, la actividad de JNK-1 inducida por M-CSF no se ve alterada en presencia del IFN- γ , lo cual hace pensar que existen otras MKP responsables de su defosforilación. Además, el alargamiento de la actividad de ERK y p38 no es indefinido, por lo que deben de existir también otras MKP que no están reguladas por el IFN- γ . De hecho, nuestros estudios demuestran que esta citocina tiene la capacidad de inducir la expresión de MKP-5 y -7 por sí misma a tiempos tardíos durante la respuesta del macrófago.

En estudios previos hemos visto que p38 α parece ser crítica para la expresión de los genes inducidos por el IFN- γ . Sin embargo, tras este estudio no podemos concluir que el alargamiento de su actividad quinasa esté relacionado con la respuesta antiproliferativa del IFN- γ , ya que esta citocina continuaba inhibiendo la proliferación en los macrófagos deficientes de p38 α . Por el contrario, la proliferación del macrófago sí parece ser susceptible a cambios en la actividad de ERK, como mostramos aquí. Además, hemos observado que la cinética de activación de esta MAPK está estrechamente relacionada con respuestas específicas del macrófago. Así, las señales mitogénicas como el M-CSF, la IL-3 o el GM-CSF inducen una activación rápida y corta de ERK-1/2, mientras que señales activadoras como el LPS, la IL-4 o el IFN- γ conllevan una cinética de activación más alargada en el tiempo (Jaworowski, Christy et al. 1996; Valledor, Comalada et al. 2000).

Hemos visto que MKP-1 es una firme candidata para explicar el patrón de defosforilación de ERK en respuesta al M-CSF. No sólo su cinética de expresión coincide con la de inactivación de la MAPK, sino que el IFN- γ también inhibe dicha expresión. El uso de tecnología del siRNA confirmó estos datos ya que, al inhibir MKP-1, el IFN- γ perdía parcialmente su capacidad antiproliferativa y de alargamiento de la actividad de ERK. No obstante, experimentos realizados con macrófagos derivados de ratones *knockout* para MKP-1 no corroboraron estos datos, posiblemente por la existencia de un mecanismo compensatorio llevado a cabo por la fosfatasa MKP-4, la cual, en estas células, mostró unos niveles de expresión mayores y más tempranos que los observados en las células control.

JNK-1 es necesario para la respuesta del macrófago a la IL-4

RESUMEN

Los macrófagos desarrollan funciones esenciales durante la infección y la resolución de la inflamación. La IL-4 es la principal citocina activadora de tipo Th2 que induce un fenotipo antiinflamatorio llamado activación alternativa. La señalización por la IL-4 implica la activación de STAT6. Sin embargo, la IL-4 tiene también la capacidad de activar a miembros de la familia de las MAPK. Hemos observado una fuerte y temprana activación de JNK-1 tras la estimulación con IL-4 en los macrófagos derivados de médula ósea, mientras que ERK-1/2 y p38 se activan débilmente y a tiempos más tardíos. En este estudio hemos determinado la contribución de las MAPK en la activación del macrófago en respuesta a la IL-4 usando inhibidores selectivos y modelos de ratones *knockout*. Nuestros resultados indican que JNK-1 regula la expresión mediada por la IL-4 de genes implicados en la activación alternativa, como la *arginasa 1*. Curiosamente, hemos observado que, tras el tratamiento con la IL-4, JNK-1 y STAT6 se translocan al núcleo y coinmunoprecipitan. Finalmente, hemos visto que STAT6 y JNK-1 se encuentran unidas al promotor de la *arginasa 1* y que JNK-1 es necesaria para el reclutamiento de cofactores como el CBP/p300. Estos datos demuestran una interacción entre JNK-1 y STAT6.

RESULTADOS

La IL-4 induce una rápida y corta activación de JNK-1 pero no de ERK-1/2 ni de p38.

Basándonos en estudios previos (Wery-Zennaro, Zugaza et al. 2000; Liao, Wang et al. 2004), quisimos estudiar si la activación alternativa inducida por la IL-4 tenía alguna relación con la vía de las MAPK. Vimos que los macrófagos estimulados con la IL-4 inducían un patrón de actividad de JNK-1 rápido y corto mientras que ERK-1/2 y p38 α se inducían débilmente a tiempos más largos de exposición a esta citocina (Fig. 1A, B y C). Tanto JNK-2 como las demás isoformas de p38 no se inducen en el macrófago (Valledor, Sánchez-Tilló et al. 2008).

Para determinar si existía un mecanismo de autorregulación negativa de esta actividad inducida por la IL-4, analizamos la expresión de varias fosfatasa de MAPK (MKP). Al contrario que el M-CSF, que es capaz de inducir tanto la actividad de las

MAPK como la expresión de la mayoría de las MKP, la IL-4 sólo indujo la expresión de la MKP-2 y la MKP-5. Estos datos sugieren que la IL-4 podría estar regulando el estado fosforilativo de las MAPK a través de la inducción de algunas MKP específicas expresadas a distintos tiempos (Fig 1D).

La expresión de JNK-1 inducida por la IL-4 contribuye a la regulación de genes selectivos sin afectar a la estabilidad de su mRNA.

A continuación quisimos investigar la implicación de la MAPK JNK-1 en la activación alternativa del macrófago. Para ello analizamos por PCR cuantitativa la expresión de varios genes marcadores de dicha activación como la arginasa 1, varias quimiocinas, la citocina IL-10, el receptor de la manosa (MR), el receptor basurero CD163, SOCS-1 y los genes reguladores del ciclo celular p21^{Waf1} y c-myc. Una vez determinadas las cinéticas de expresión de estos genes evaluamos la implicación de JNK-1 usando el inhibidor químico SP600125 para bloquear su acción.

Vimos que la inhibición de JNK-1 tenía como consecuencia la inhibición de algunos grupos de genes mientras que otros permanecían inalterados (Fig 2A), sugiriendo que la relación entre JNK-1 y la IL-4 podría ser dependiente de promotor. Paralelamente llevamos a cabo los mismos experimentos usando inhibidores para las otras MAPK. No vimos diferencias significativas en la expresión de estos genes al inhibir ERK-1/2 ni p38.

Para confirmar la inhibición mediada por el SP600125, realizamos experimentos similares usando como modelo los macrófagos derivados de ratones deficientes de JNK-1. Curiosamente, sólo hayamos niveles similares de inhibición para las quimiocinas *CCL22*, *CCL24*, la *arginasa1* y *c-myc* (Fig. 2B), quizá debido a la existencia de mecanismos compensatorios en el modelo *knockout* que sustituirían parcialmente la carencia de JNK-1.

Basándonos en estudios previos (Sze, Lui et al. 2007; Valledor, Sánchez-Tilló et al. 2008), quisimos comprobar si la acción de JNK-1 sobre la expresión de estos genes era debida a una variación en la estabilidad de sus mRNA. Sin embargo, al inhibir la acción de JNK-1 con SP600125 no observamos ningún cambio en la vida media del mRNA de estos genes (Fig. 3). Estos datos sugieren que JNK-1 debe estar mediando su efecto sobre la expresión de los genes testados a un nivel transcripcional.

JNK-1 interacciona directamente con STAT6.

Basándonos en estudios previos (Chung, Uchida et al. 1997; Goh, Haque et al. 1999; Haq, Halupa et al. 2002), quisimos comprobar si STAT6 podía estar sirviendo de sustrato de fosforilación para JNK-1. Para ello usamos inmunoprecipitaciones de STAT6 en muestras control y las usamos como sustrato para JNK-1 en un ensayo quinasa *in vitro*. Vimos que la proteína JNK-1 inmunoprecipitada a partir de muestras tratadas con IL-4 durante 15 minutos era capaz de fosforilar a STAT6 en el ensayo planteado mientras que la obtenida a partir de una muestra sin tratar apenas mostraba actividad quinasa (Fig. 4A). Además, para confirmar la interacción entre STAT6 y JNK-1 *in vivo*, realizamos ensayos de coimmunoprecipitación. Vimos que en aquellas muestras donde habíamos precipitado JNK-1 eramos también capaces de detectar STAT6 por *western blot* (Fig. 4B). Sorprendentemente, comprobamos que STAT6 coimmunoprecipitaba con JNK-1 incluso en las muestras no tratadas con IL-4, sugiriendo que su interacción podía estar ocurriendo también en la forma defosforilada de JNK-1.

Basándonos en estudios previos (Gollob, Schnipper et al. 1999; Maiti, Sharma et al. 2005), quisimos comprobar si la interacción entre JNK-1 y STAT6 podía estar afectando a la fosforilación en tirosina de STAT6 o a su capacidad de unión al DNA. Sin embargo, al inhibir JNK-1 con SP600125 en las células estimuladas con IL-4, no observamos ningún cambio en el estado fosforilativo de las tirosinas de STAT6 (Fig. 5A).

En relación a estos datos, evaluamos la capacidad de STAT6 de unirse al promotor de la *arginasa 1* mediante ensayos de inmunoprecipitación de cromatina. Como era de esperar, la inhibición de la actividad de JNK-1 en las muestras tratadas con IL-4 no alteró en absoluto la capacidad de STAT6 de unirse a dicho promotor (Fig. 5B). Estos datos están en concordancia con los de la figura 5A ya que se ha descrito que tanto la capacidad de unir DNA como la de dimerizar de los miembros de la familia de factores de transcripción STAT viene determinada por su fosforilación en tirosina.

JNK-1 es necesaria para el reclutamiento del cofactor CBP/p300 en el promotor de la *arginasa 1*.

Para evaluar si la acción de JNK-1 sobre STAT6 podía tener relación con el reclutamiento de cofactores en los promotores dependientes de IL-4, realizamos ensayos de inmunoprecipitación de cromatina. Vimos que el tratamiento con IL-4

inducía la unión de JNK-1 al promotor de la *arginasa 1* (Fig. 6A). Además, comprobamos que, aunque el cofactor CBP/p300 ya estaba unido a este promotor en condiciones basales, el estímulo con IL-4 potenciaba dicha unión.

Basándonos en estos resultados, finalmente quisimos comprobar si la unión de JNK-1 al promotor de la *arginasa 1* estaba afectando a la interacción del cofactor CBP/p300 con el DNA. Vimos que, efectivamente, la inhibición de la actividad de JNK-1 con SP600125 daba como resultado una total inhibición de la unión de CBP/p300 con el promotor de la *arginasa 1*, sugiriendo que la acción de JNK-1 es necesaria para el reclutamiento de cofactores que en último término potenciarán la expresión de determinados genes inducidos por la IL-4.

DISCUSIÓN

En este estudio hemos documentado la relación entre la vía de transducción de la quinasa JNK-1 y la regulación de la señalización de JAK/STAT6 mediada por la IL-4. Nuestros resultados indican que p38, ERK y JNK son activadas a partir del tratamiento de las células con IL-4, aunque siguiendo cinéticas de inducción e intensidad de respuesta muy distintas. Así, JNK-1 se induce fuertemente a tiempos muy cortos de estimulación mientras que ERK-1/2 y p38 α lo hacen más débilmente y a tiempos tardíos.

La interacción entre las MAPK y los dos tipos de IFN ha sido previamente descrita (Goh, Haque et al. 1999; Plataniias 2003; Sun and Ding 2006; Valledor, Sánchez-Tilló et al. 2008). Sin embargo, existe mucha controversia respecto a la relación entre las vías de las MAPK y la señalización por IL-4 en diferentes tipos celulares (Levings, Bessette et al. 1999; Hashimoto, Gon et al. 2001; Hunt, Williams et al. 2002; Canfield, Lee et al. 2005; Ip, Wong et al. 2006; So, Oh et al. 2007). Además, hasta la fecha no existen estudios que relacionen la activación alternativa del macrófago con estas vías de señalización. Así, hemos descrito por primera vez la posibilidad de que JNK-1 sea activada por la IL-4 en los macrófagos. Más aún, nuestros resultados muestran que esta activación potencia la expresión de varios genes, incluida la *arginasa 1*, que es uno de los principales marcadores de la activación alternativa.

Más allá de estos datos, también hemos estudiado los mecanismos a través de los cuales JNK-1 media esta inducción génica. Hemos hallado que JNK-1 es capaz de interactuar directamente con STAT6 incluso en ausencia de un estímulo por IL-4.

Sin embargo, el tratamiento con esta citocina hace aumentar la interacción entre estas dos proteínas, y probablemente el estado de fosforilación de STAT6, como demuestran los ensayos realizados *in vitro*.

Usando inhibidores químicos y modelos *knockout* para JNK-1 hemos podido comprobar que la acción de JNK-1 sobre la expresión de los genes dependientes de STAT6 no incluye ningún efecto sobre la estabilidad de los mRNA de estos genes. Aunque en este estudio demostramos que JNK-1 tiene un claro efecto aditivo sobre la inducción de la expresión de determinados genes marcadores de la activación alternativa del macrófago, el mecanismo a través del cual ejerce dicha función no está totalmente claro. Sin embargo, hemos demostrado que JNK-1 es capaz de alcanzar regiones promotoras de genes inducidos por la IL-4 de manera dependiente de STAT6. Más aún, algunos cofactores como CBP/p300 necesitan de la actividad de JNK-1 para poder unirse a sus regiones específicas de DNA y así llevar a cabo su función. En conjunto, nuestros experimentos sugieren que la acción de JNK-1 sobre la inducción de los genes dependientes de STAT6 en el macrófago estaría relacionada con la capacidad de atraer y/o activar a determinados cofactores y reclutarlos en regiones promotoras formando así la maquinaria transcripcional necesaria para la completa expresión de estos genes.

DISCUSIÓN

Los macrófagos son células fagocíticas que juegan un papel crítico tanto en la respuesta inmunitaria natural como en la adaptativa. En una primera fase de la respuesta natural, estas células son capaces de reconocer agentes patógenos externos así como partículas extrañas, y fagocitarlas. En consecuencia, liberan agentes proinflamatorios y citocinas para resolver la infección de manera local, y quimiocinas que actuarán induciendo un determinado tipo de respuesta celular. Otra consecuencia de la capacidad fagocítica del macrófago es la posibilidad de presentar antígenos en superficie para que puedan ser reconocidos por los linfocitos T, participando así también en la respuesta inmunitaria específica.

Dada la importancia del macrófago en la defensa del organismo, es de vital importancia que exista una buena homeostasis que regule la cantidad y estado de estas células en el cuerpo. En los individuos adultos, los monocitos son generados en la médula ósea y al llegar a los tejidos se diferencian en macrófagos, incluyendo la microglía en el sistema nervioso central (SNC), las células de Kupffer en el hígado, las células de Langerhans en la dermis o los macrófagos alveolares, peritoneales, etc. Allí, permanecerán quiescentes en ausencia de estímulos o proliferarán en presencia de factores mitogénicos locales o autocrinos como el M-CSF, el GM-CSF o la IL-3. Esta especificidad se ve reflejada en distintas respuestas celulares y en la activación de vías de señalización diferentes con un subconjunto de proteínas común. Así, por ejemplo, los macrófagos medulares y la microglía son poblaciones altamente proliferativas mientras que los peritoneales o los monocitos circulantes no lo son (Celada and Maki 1992).

Tras un estímulo activador los macrófagos detienen su proliferación y pasan a ejercer funciones celulares específicas. Así, citocinas como el IFN- γ o el LPS, activan al macrófago de manera clásica. Éstos macrófagos se conocen comúnmente como células M1 (polarizadas en un entorno de tipo Th1) y se caracterizan por producir un incremento en la secreción de citocinas proinflamatorias como el TNF- α , la IL-1 β y la IL-6, o inducir la actividad de NOS2 aumentando así la producción de especies reactivas del oxígeno. En conjunto, esta respuesta contribuye a controlar de manera eficiente el crecimiento y la diseminación de los agentes patógenos invasores.

Por otro lado, citocinas como la IL-4 o la IL-13 inducen en el macrófago una activación alternativa. A estas células se las conoce como macrófagos de tipo M2, y se caracterizan por un aumento en la expresión del receptor de la manosa y de otros receptores basurero, así como por una inducción de la actividad arginasa (Gordon 2003) que tiene como consecuencia un aumento en los niveles de prolina, glutamato

y poliaminas. En conjunto, estos metabolitos son fundamentales para llevar a cabo procesos de reparación y remodelación tisular.

En este estudio, nos hemos querido centrar en el análisis de los mecanismos moleculares que dirigen esta activación alternativa del macrófago. Clásicamente, se ha considerado al macrófago como una de las principales células efectoras responsables de la defensa del organismo frente a invasiones. Esta idea se basa, no sólo en la capacidad fagocítica y presentadora de antígenos de esta célula, sino también en su gran potencial como productora de citocinas proinflamatorias. Sin embargo, poco se conocía acerca de los mecanismos homeostáticos responsables de la resolución de la inflamación y remodelación tisular tras una invasiva respuesta inmunitaria localizada. Así, durante los últimos diez años, varios grupos de investigación, incluido el nuestro, han focalizado sus esfuerzos en el estudio de estos procesos.

Actualmente, la llamada activación alternativa (Stein, Keshav et al. 1992) es ya un término ampliamente aceptado que define un proceso de activación diferencial de las células presentadoras, principalmente los macrófagos, iniciado por un pequeño y bien definido grupo de citocinas como la IL-4 o la IL-13, en contraposición a la activación clásica inducida por el IFN- γ o el LPS. Así mismo, existe la creencia de que la función biológica de esta activación alternativa podría ser la de llevar a cabo la limpieza, reparación y remodelación tisular de los tejidos y las zonas afectadas por una respuesta inmunitaria de tipo clásico. Es decir, a pesar de que ambas activaciones son del todo excluyentes tanto a nivel celular como molecular (Ohmori and Hamilton 1997), nada descarta la posibilidad de que pudieran producirse secuencialmente en el tiempo en un mismo subgrupo de células. De hecho, estudios recientes realizados en nuestro laboratorio han demostrado que el macrófago derivado de médula ósea posee una total plasticidad y reversibilidad en cuanto a su capacidad de polarización. Esto implica que los macrófagos polarizados a tipo M1 durante días son capaces de desarrollar una respuesta completa de tipo M2 si se les estimula con IL-4, y viceversa, los macrófagos de tipo M2 pueden ser también revertidos a tipo M1 bajo un estímulo con IFN- γ (datos no mostrados). Estas capacidades del macrófago testada *in vitro* sugiere la posibilidad de que pueda darse la misma situación *in vivo* durante una respuesta inflamatoria local.

Sin embargo, a día de hoy aún existe cierta controversia acerca de la relevancia biológica de los macrófagos polarizados a tipo M2, ya que también se ha demostrado ampliamente la necesidad de que exista este tipo de activación para resolver

infecciones frente a nemátodos (Anthony, Urban et al. 2006) o parásitos intracelulares como la *Leishmania* (Iniesta, Carcelen et al. 2005; Kropf, Fuentes et al. 2005).

De esta manera, y aunque sin pretender alejarnos demasiado de las causas biológicas que pudieran inducir una respuesta de este tipo o de la relevancia a nivel local que pudieran tener las consecuencias de la misma, nosotros hemos centrado nuestros esfuerzos en establecer un sistema comparativo entre ambos tipos de activación a fin de determinar las bases celulares y moleculares por las que se definen estos procesos.

Así, en este estudio, hemos utilizado cultivos primarios no transformados de macrófagos derivados de la médula ósea de ratón, con el fin de mimetizar las condiciones biológicas que se dan en los modelos animales. Los cultivos de macrófagos obtenidos *in vitro* no han sido activados previamente y responden a factores de crecimiento. En ausencia de éstos permanecen en quiescencia y posteriormente pueden entrar nuevamente en el ciclo celular en presencia de factores mitogénicos. Así mismo, estas células pueden ser activadas de manera clásica y alternativa, ser diferenciadas, e incluso inducidas a entrar en apoptosis, motivos por los cuales constituyen un excelente modelo de trabajo para nuestros objetivos.

Basándonos pues en estudios previos realizados en nuestro grupo que definían el antagonismo de los procesos de proliferación y activación clásica en el macrófago (Xaus, Comalada et al. 2001), nuestro principal objetivo fue, por un lado, comprobar si esta dicotomía entre proliferación y activación seguía cumpliéndose también al inducir una activación alternativa, y por el otro, intentar definir los mecanismos moleculares responsables de ambos procesos.

Existe un gran número de trabajos que relacionan la vía de señalización de la MAPK ERK con procesos de proliferación en diferentes tipos celulares (Hickman and Samson 1999; Valledor, Comalada et al. 2000; Calipel, Lefevre et al. 2003; Han, Saijo et al. 2003; Hickman, Yang et al. 2006). Curiosamente, los cambios en la cinética de activación de esta MAPK parecen estar también relacionados con procesos de activación en el macrófago. Así, una rápida fosforilación y defosforilación de ERK como la que causa el tratamiento con el M-CSF, el GM-CSF o la IL-3 llevaría a la célula a proliferar, mientras que una fosforilación más prolongada en el tiempo como la provocada por la decorina, el LPS o la PC-PLC (*phosphatidylcholine-specific*

phospholipase C) induciría su activación (Valledor, Xaus et al. 1999; Valledor, Comalada et al. 2000; Xaus, Comalada et al. 2001; Nyunoya, Monick et al. 2005).

En este estudio hemos visto que el IFN- γ puede mediar su efecto antiproliferativo en el macrófago utilizando la vía de la MAPK ERK-1/2. El tratamiento de estas células con IFN- γ y M-CSF simultáneamente provoca un alargamiento temporal de la cinética de activación de esta MAPK (Figura 13). Más aún, en estudios recientes de nuestro laboratorio hemos observado que este alargamiento de la actividad puede ser reproducido añadiendo IL-4 (en lugar de IFN- γ) simultáneamente al M-CSF.

Nuestro trabajo ha demostrado que dicho alargamiento en la actividad de ERK-1/2 está causado por la inhibición de la expresión de una o varias fosfatasa de las MAPK (conocidas como MKP), cuya expresión depende del M-CSF. De nuevo, el tratamiento con IL-4 conlleva también un bloqueo de la expresión de estas proteínas. Sin embargo, aunque las MKP inhibidas por el IFN- γ y la IL-4 no coinciden totalmente, sí parece existir alguna relación entre ambos estímulos. Según nuestros resultados, MKP-1 es la principal candidata para defosforilar a ERK-1/2, aunque no hemos descartado que existan mecanismos de solapamiento de función con otras fosfatasa de su misma familia y grupo, como podría ser MKP-4 (Bazuine, Carlotti et al. 2004). Curiosamente, tanto el IFN- γ como la IL-4 son capaces de bloquear la expresión de estas dos fosfatasa inducidas por el M-CSF, y ambas lo hacen de manera dependiente de STAT. En consecuencia, en macrófagos derivados de ratones *knockout* para STAT1 y para STAT6 estimulados con IFN- γ e IL-4, respectivamente, no se observó ningún alargamiento de la actividad de ERK-1/2.

Estos resultados concuerdan con otros anteriormente descritos por algunos autores en los que se sugiere que una cinética de activación diferencial de la misma proteína puede inducir distintas respuestas a nivel celular (Lanteri-Minet, de Pommeroy et al. 1993; Minassian, Zitoun et al. 1996; Valledor, Comalada et al. 2000; Rueda, Navarro et al. 2002; Suzu, Hiyoshi et al. 2007). Aunque a día de hoy aún se desconocen los mecanismos moleculares gracias a los cuales el IFN- γ es capaz de inhibir la proliferación del macrófago más allá del alargamiento de la actividad de ERK, existen diversas teorías al respecto.

Por un lado, no es extraño pensar que la presencia de ERK activa en la célula durante un mayor periodo de tiempo pueda ser el único motivo necesario para la fosforilación diferencial de unos u otros factores de transcripción, quizá en función de su afinidad por dicha quinasa. En consecuencia, un patrón de expresión génico

distinto podría perfectamente inducir procesos de proliferación o de activación de manera excluyente.

Otra posibilidad que se ha barajado recientemente en nuestro laboratorio se basa en la capacidad que tienen algunas quinasas de estabilizar de manera indirecta la vida media de determinados mRNAs (Chiaberge, Cassarino et al. 1998; Mondal, Sirenko et al. 2000; Briata, Forcales et al. 2005). Es posible que, de la misma manera que sucede con p38 α (Valledor et al. 2008), una actividad más prolongada de ERK en el citosol permita mantener activos factores de estabilización del mRNA durante más tiempo. Como consecuencia, los genes implicados en la regulación del ciclo celular que hasta el momento mantenían su expresión en niveles basales podrían ahora transcribirse para llevar a cabo su función.

Por otro lado, aunque sin oponerse necesariamente a estos resultados, hemos visto que el tratamiento con IL-4 detiene específicamente la proliferación dependiente del M-CSF en el umbral entre las fases G₁/S del ciclo celular de los macrófagos, del mismo modo en que lo hace el IFN- γ . Esta observación contrasta con los estudios previos realizados en linfocitos T y B en los que la IL-4 parece tener, por el contrario, un efecto mitogénico (Brown and Hural 1997). Sin embargo, en otras células de tipo no inmunitario como por ejemplo las células cancerosas de mama, gástricas y renales, la IL-4 modula directamente su proliferación (Obiri, Hillman et al. 1993; Morisaki, Uchiyama et al. 1994; Cheon, Chung et al. 1996; Gooch, Lee et al. 1998).

A pesar de que tanto la IL-4 como el IFN- γ utilizan receptores asociados a proteínas del tipo JAK/STAT para iniciar sus cascadas de señalización intracelulares, pudimos comprobar que los mecanismos que resultaban en esa parada de la proliferación eran distintos para ambos estímulos. Estos receptores asociados a proteínas JAK son capaces de señalar a través de tres vías distintas, la vía de la PI3K/Akt, las vías de las MAPK, y su principal vía, la de la familia de factores de transcripción STAT. Sin embargo, así como la señalización por el IFN- γ ha sido ampliamente descrita en relación a estas tres vías, poco se conoce acerca de aquellas inducidas por la IL-4 en macrófagos, y menos aún de sus efectos a nivel celular y fisiológico.

En este estudio hemos comprobado que la IL-4 ejerce sus efectos antiproliferativos gracias a la expresión del inhibidor de Cdk p21^{Waf1} (Figura 13). Al respecto, existen innumerables referencias bibliográficas que relacionan la inhibición del ciclo celular con la expresión de p21^{Waf1} (Khanna, Plummer et al. 2005; Trivedi,

Roberts et al. 2005; Cho, Bae et al. 2008). Algunos autores sugieren incluso que dicha expresión podría estar inducida por la actividad de ERK (Park, Ahn et al. 2002; Shirako, Hirayama et al. 2007) mientras que otros relacionan a ERK con un efecto represor sobre esta proteína (Han, Sidell et al. 2005).

Contrariamente a estos datos, de nuestro estudio se puede concluir que en los macrófagos ERK no guarda relación con la expresión de p21^{Waf1} inducida por la IL-4, ya que este efecto lo debe a la acción del factor de transcripción STAT6 que se asocia a las quinasas JAK de su receptor. Sin embargo, a pesar de que el IFN- γ también es capaz de inducir la expresión de p21^{Waf1} de manera dependiente de STAT (STAT1), esta inducción no está directamente relacionada con la parada del ciclo celular, como demuestran los ensayos de proliferación realizados en macrófagos derivados de ratones deficientes de p21^{Waf1}. Por el contrario, parece que en nuestro modelo celular, la inducción de p21^{Waf1} por el IFN- γ está más relacionada con un efecto protector frente a estímulos apoptóticos (Xaus, Cardo et al. 1999).

Aún así, no deja de ser sorprendente el hecho de que el IFN- γ necesite parar la proliferación del macrófago en el umbral entre las fases G₁/S del ciclo celular para ejercer dicho efecto protector frente a la apoptosis (Xaus, Cardo et al. 1999). Existen estudios al respecto que sugieren que una parada del ciclo celular antes de su entrada en la fase S podría volver a cierto tipo de células resistentes a estímulos apoptóticos (Zhu and Anasetti 1995; Kranenburg, van der Eb et al. 1996; Lissy, Van Dyk et al. 1998). En esta línea de investigación, nuevos ensayos realizados en nuestro laboratorio han demostrado que la IL-4 es, en efecto, capaz de proteger al macrófago frente a una apoptosis inducida por la retirada prolongada de su estímulo mitogénico, el M-CSF. Sin embargo, es interesante apuntar que aunque esta inducción de la apoptosis mediada por la retirada del M-CSF sucede, evidentemente, en condiciones de quiescencia, nada tiene que ver con la expresión de p21^{Waf1}. Por el contrario, es p27^{Kip1} quien se expresa durante ese tiempo para mantener a la célula parada en un punto muy temprano de la fase G₁. Es posible que esta diferencia en el punto de restricción de la fase en el que se encuentra la célula al iniciarse la señal de muerte sea la que le confiera una mayor o menor susceptibilidad frente a la apoptosis.

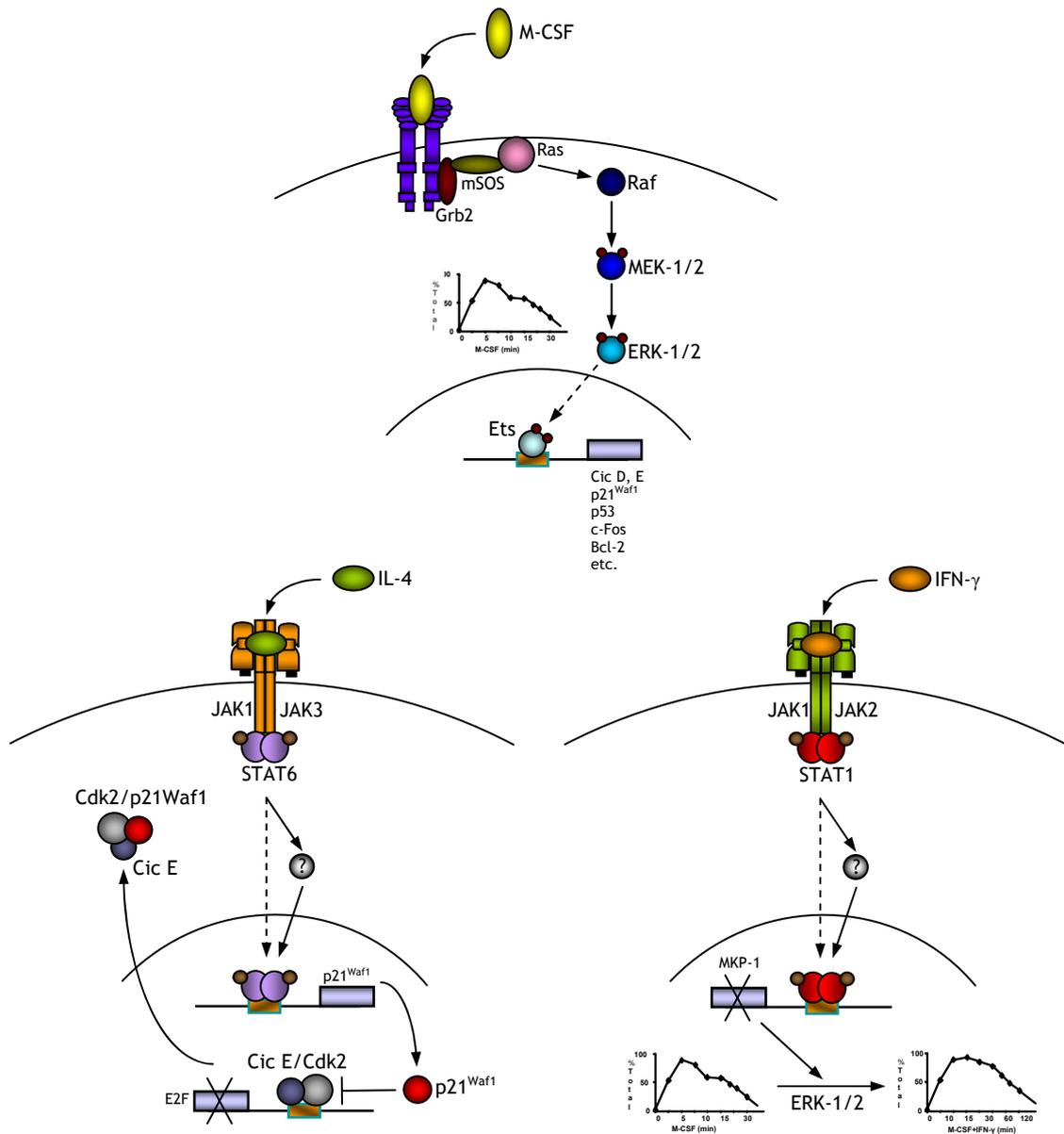


Figura 13. Vías de señalización utilizadas por el IFN- γ y la IL-4 para inhibir la proliferación inducida por el M-CSF. El M-CSF induce en el macrófago una rápida activación e inactivación de la MAPK ERK-1/2, que fosforilará a factores de transcripción, activándolos. Estos factores son responsables de la expresión de un gran número de genes implicados en la entrada y progresión a través del ciclo celular. El tratamiento de estas células con IL-4 induce la expresión p21^{Waf1} que inhibirá la acción de los complejos Cdk/Cic necesarios para la entrada en la fase S del ciclo celular. Por otro lado, el tratamiento con IFN- γ inhibe la expresión de la fosfatasa de MAPK MKP-1, lo que conducirá a un alargamiento de la cinética de actividad de ERK-1/2 y, en consecuencia, la parada de la proliferación del macrófago.

Así mismo, se han publicado numerosos estudios relacionando la expresión de c-myc con la entrada y progresión a través del ciclo celular. Al respecto, parece existir una aceptación generalizada respecto a la cualidad de c-myc como protooncogén, en tanto en cuanto, su sobreexpresión está directamente relacionada con procesos de transformación celular (Facchini and Penn 1998; Gartel and Shchors 2003; Adhikary and Eilers 2005). Sin embargo, no existen estudios similares realizados en macrófagos. Más aún, hasta la fecha no ha sido descrito ningún proceso tumoral relacionado con este tipo de células.

En estudios realizados en nuestro grupo y en los presentados en esta tesis, hemos observado que la expresión de c-myc en respuesta a estímulos activadores no sigue una tendencia bien definida. Así, mientras estímulos como el IFN- γ o la sanglifherina A bloquean la proliferación e inhiben la expresión de c-myc (Sanchez-Tillo, Wojciechowska et al. 2006) y datos no mostrados), otros como la IL-4 o el LPS ejercen su efecto antiproliferativo aumentando a la vez sus niveles de expresión. Conjuntamente, estos datos sugieren que, en nuestro modelo, c-myc podría estar comportándose de manera similar a ERK y jugando a la vez un papel importante tanto en procesos de proliferación como de activación. En cualquier caso, sería necesario profundizar más en su regulación para poder dilucidar su papel en la biología del macrófago.

Una vez estudiado el efecto inhibitorio de la IL-4 sobre la proliferación del macrófago así como los mecanismos moleculares que utiliza para llevarlo a cabo, quisimos comprobar si, en efecto, esta parada del ciclo celular se correlacionaba con una activación de tipo alternativa, y contrastar así la dicotomía previamente postulada para la activación clásica frente a la proliferación.

En efecto, la IL-4 fue capaz de inducir la expresión de la práctica totalidad de los genes ensayados por PCR cuantitativa. Estos datos se correlacionaban con los estudios previos realizados por otros autores (Mantovani 2002, Gordon 2003). Además, vimos que esta inducción era totalmente dependiente de STAT6 puesto que en macrófagos derivados de ratones *knockout* para esta proteína, la inducción por la IL-4 de dichos genes se mantuvo completamente inhibida.

Entre los posibles genes existentes para definir la activación alternativa del macrófago, escogimos un grupo variado de ellos, entre los que se encontraban la Arginasa 1 (gen implicado en el metabolismo de la arginina y principal marcador de la activación alternativa), diversas quimiocinas, citocinas y receptores, así como genes relacionados con el ciclo celular (Mantovani 2002).

Contrariamente a lo sugerido por algunos autores (Gordon 2003), los genes que conforman las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC II) no se vieron inducidas por el efecto de la IL-4. Este hecho sugiere que, en efecto, hay diferencias funcionales muy significativas entre los macrófagos de tipo M1 y M2, y respalda la teoría de que posiblemente existe una activación diferencial en el tiempo sobre una misma población de macrófagos. Así, los macrófagos polarizados a tipo M1 serían los encargados de responder contra una infección desarrollando un proceso inflamatorio (presentación antigénica) y posteriormente esos mismo macrófagos podrían polarizarse al tipo M2 para resolver la inflamación a nivel local (reparación y remodelación tisular) (Arnold, Henry et al. 2007).

A continuación, basándonos en estudios previos que sugerían la importancia de la vía de las MAPK sobre la activación clásica (Chan and Riches 2001; Yao, Xu et al. 2006; Zhu, Yang et al. 2006; Cho, Bae et al. 2008), quisimos determinar la implicación de estas vías de señalización iniciadas por la IL-4 en la activación alternativa.

Así, mientras la actividad de JNK-1 se induce por la IL-4 desde los primeros 5 minutos de tratamiento y es rápidamente inactivada antes de 30 minutos, las MAPK ERK-1/2 y p38 α sólo muestran una débil actividad a partir de las dos horas de tratamiento con IL-4. Los niveles de actividad de JNK-2 así como de las demás isoformas de p38 son indetectables en macrófagos (Valledor et al. 2008). Este dato nos sugirió que probablemente JNK-1 era la mejor candidata para mediar procesos de activación en nuestro modelo.

Estos datos se correlacionan con las observaciones previas acerca del efecto de la IL-4 sobre las fosfatasa de las MAPK (MKP). Es interesante apuntar que las diferencias existentes entre el IFN- γ y la IL-4 en la inducción/represión de algunas MKP podría también tener relación con la inducción diferencial de MAPK entre ambas citocinas. Así, por ejemplo, la IL-4 induce fuertemente la expresión de la MKP-2 desde los 30 minutos de tratamiento, mientras el IFN- γ no sólo no la induce sino que reprime la expresión mediada por el M-CSF.

Tomando estos resultados conjuntamente, y teniendo en cuenta estudios recientes que relacionan la actividad de algunas MAPK sobre miembros de la familia de proteínas STAT (Gollob, Schnipper et al. 1999; Haq, Halupa et al. 2002), quisimos comprobar si JNK-1 actuaba conjuntamente con STAT6 en la activación alternativa del macrófago.

La inducción de la actividad de JNK-1 por la acción de la IL-4 tiene como resultado un aumento en la expresión de los genes dependientes de STAT6 responsables de dicha activación alternativa. Estos datos están en concordancia con otros obtenidos en modelos similares para STAT1 y STAT3 (Wen, Zhong et al. 1995; Goh, Haque et al. 1999; Gamero and Lerner 2000) en los que se sugiere que, si bien la acción de estas MAPK sobre la transcripción de genes dependientes de proteínas STAT es sinérgica, su acción no es una condición necesaria para dicha transcripción. En efecto, como ocurre con JNK-1, es necesaria la actividad de STAT6 para el inicio de la transcripción de los genes inducidos por la IL-4 (Figura 14).

Es evidente pensar que el mecanismo de acción que deriva en este incremento de la transcripción génica dependiente de las MAPK no puede ser otro que un proceso de fosforilación. Habiendo comprobado previamente que p38 α podía aumentar los niveles del mRNA de determinados genes a través de la estabilización de su mRNA (Valledor et al. 2008), probamos si JNK-1 llevaba a cabo su acción mediante un mecanismo similar. Sin embargo, el uso de inhibidores de su actividad no supuso una variación en la vida media de los mRNA de los genes analizados.

Puesto que los factores de transcripción de la familia STAT se fosforilan en tirosina gracias a la acción de las quinasas JAK (Shuai, Ziemiecki et al. 1993; Silvennoinen, Saharinen et al. 1997), sólo resta pensar que deben existir residuos serina/treonina de estas proteínas susceptibles de ser fosforilados por las MAPK. Al respecto, se ha descrito que STAT6 tiene en su dominio transactivador varios residuos serina que pueden regular tanto positiva como negativamente su actividad (Wick and Berton 2000; Wang, Schattenberg et al. 2004).

Así pues, en este estudio hemos probado, por primera vez, que JNK-1 es capaz de fosforilar directamente a STAT6 *in vitro* y de colocalizar con él tanto en el citoplasma como en el núcleo, unido a la cromatina de regiones promotoras de genes transcritos por este factor de transcripción. Más aún, utilizando macrófagos derivados de ratones *knockout* para STAT6, nuestros resultados parecen apuntar hacia la posibilidad de que esta proteína hace las veces de lanzadera para JNK-1 facilitando que esta quinasa acceda a las regiones promotoras de los genes de respuesta a IL-4.

Basándonos en estos datos cabría pensar que una fosforilación en el dominio transactivador de STAT6 podría mejorar su actividad transcripcional, tal como ocurre con STAT1 y STAT3 (Wen, Zhong et al. 1995). Sin embargo, debido a la ausencia de

reactivos comerciales no hemos podido comprobar que JNK-1 fosforile directamente a STAT6 en serina *in vivo*.

Si bien es cierto que la actividad de JNK-1 es también necesaria para el correcto reclutamiento del cofactor CBP/p300 en la región promotora de la *arginasa 1*, a día de hoy no podemos asegurar que sea la acción de la MAPK sobre STAT6 y no directamente sobre este cofactor la que induce un aumento de la transcripción de genes responsables de la activación alternativa del macrófago. Al respecto, existen varios trabajos que sugieren que CBP/p300 debe ser fosforilado en serina para poder ejercer su función de coactivador (Yuan and Gambée 2000; Schwartz, Beck et al. 2003; Huang and Chen 2005), mientras que otros afirman que dicha fosforilación tiene un efecto inhibitorio (Yang, Hong et al. 2001; Poizat, Puri et al. 2005). Incluso existen estudios que sugieren que miembros de la familia de las MAPK podrían ser los responsables de esa fosforilación activadora (Chen, Wang et al. 2007).

En conjunto, todos estos datos sugieren que aunque los procesos de proliferación, activación y apoptosis son mecanismos que pueden darse de manera independiente en muchos tipos celulares (p.e. linfocitos T y B), en los macrófagos no sólo deben estar estrechamente relacionados sino que podrían estar regulados por un mismo estímulo independiente, como sería el caso del IFN- γ o la IL-4 (Yeatman, Jacobs-Helber et al. 2000; Bailey, Kashyap et al. 2004) y datos no mostrados).

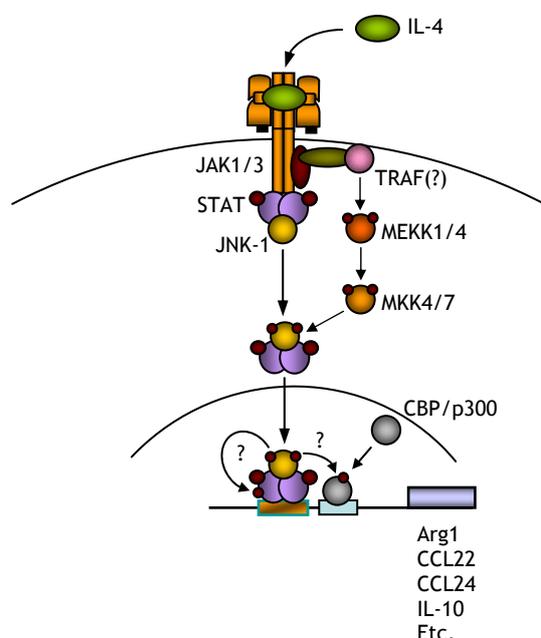


Figura 14. Esquema de la vía de acción de JNK-1 y STAT6. JNK-1 está unido a STAT6 de forma constitutiva en el macrófago. El tratamiento con IL-4 induce la activación de JNK y de STAT6. Juntos, se

translocarán al núcleo, donde STAT6 iniciará la transcripción de los genes dependientes de IL-4. JNK-1 podría fosforilar a STAT6 haciendo que aumentara su capacidad transcripcional o induciéndole así una conformación más favorable para interactuar con cofactores. Por otro lado, la actividad de estos mismos cofactores también podría verse favorecida por una fosforilación en serina.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La IL-4 inhibe la proliferación del macrófago dependiente del M-CSF induciendo la expresión de p21^{Waf1} a través de STAT6.
2. La IL-4 induce la expresión de los principales genes responsables de la activación alternativa del macrófago a través de la acción directa del factor de transcripción STAT6.
3. El IFN- γ inhibe la proliferación del macrófago dependiente del M-CSF induciendo un alargamiento en la cinética de activación de la MAPK ERK-1/2 a través de la inhibición de la fosfatasa MKP-1.
4. Las mismas vías de señalización inducidas por la IL-4 y el IFN- γ en el macrófago tienen distintas consecuencias celulares.
5. La IL-4 induce la actividad de la MAPK JNK-1 potenciando así la inducción de la expresión de los principales genes marcadores de la activación alternativa del macrófago dependientes de STAT6.
6. JNK-1 está constitutivamente unida a STAT6 en el macrófago y es capaz de translocarse al núcleo con ella para potenciar sus efectos transcripcionales.
7. JNK-1 fosforila a STAT6 *in vitro* y es necesaria para el reclutamiento/activación de CBP/p300 en la zona de unión de STAT6 del promotor de la *arginasa 1*.

ANEXO

Las publicaciones científicas derivadas del trabajo realizado durante esta tesis son las siguientes:

- Luis Arpa, Annabel F. Valledor, Jorge Lloberas and Antonio Celada. “IL-4 blocks M-CSF-dependent macrophage proliferation by inducing p21Waf1 in a STAT6-dependent way” (Eur. J. Immun., submitted).
- Luis Arpa, Annabel F. Valledor, Jorge Lloberas and Antonio Celada. “JNK is required for the macrophage response to IL-4” (in preparation).
- Annabel F. Valledor, Luis Arpa, Ester Sánchez-Tilló, Mònica Comalada, Cristina Casals, Jordi Xaus, Carme Caelles, Jorge Lloberas, and Antonio Celada. “IFN- γ -mediated inhibition of MAPK phosphatase expression results in prolonged MAPK activity in response to M-CSF and inhibition of proliferation” (Blood, in press).
- Annabel F. Valledor, Ester Sánchez-Tilló, Luis Arpa, Jin Mo Park, Carme Caelles, Jorge Lloberas, and Antonio Celada. “Selective roles of MAPKs during the macrophage response to IFN- γ ”. J Immunol. 2008 Apr 1;180(7):4523-9).
- Chun Kim, Yasuyo Sano, Kristina Todorova, Bradley Carlson, Luis Arpa, Antonio Celada, Toby Lawrence, Kinya Otsu, Janice Brissette, J Simon C Arthur and Jin Mo Park. “Multifaceted roles of p38 α signaling in inflammation and gene regulation” (in preparation).
- Yeramian A, Martin L, Arpa L, Bertran J, Soler C, McLeod C, Modolell M, Palacín M, Lloberas J, Celada A. “Macrophages require distinct arginine catabolism and transport systems for proliferation and for activation” Eur J Immunol. 2006 Jun;36(6):1516-26.
- Yeramian A, Martin L, Serrat N, Arpa L, Soler C, Bertran J, McLeod C, Palacín M, Modolell M, Lloberas J, Celada A. “Arginine transport via cationic amino acid transporter 2 plays a critical regulatory role in classical or alternative activation of macrophages” J Immunol. 2006 May 15;176(10):5918-24.

- Kropf P, Fuentes JM, Fähnrich E, Arpa L, Herath S, Weber V, Soler G, Celada A, Modolell M, Müller I. “Arginase and polyamine synthesis are key factors in the regulation of experimental leishmaniasis in vivo” *FASEB J.* 2005 Jun;19(8):1000-2. Epub 2005 Apr 5.

REFERENCIAS

- Adams, D. O. (1976). "The granulomatous inflammatory response. A review." Am J Pathol 84(1): 164-91.
- Adhikary, S. and M. Eilers (2005). "Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins." Nat Rev Mol Cell Biol 6(8): 635-45.
- Agarwal, S., M. Mathur, et al. (1999). "MDM2/p53 co-expression in oral premalignant and malignant lesions: potential prognostic implications." Oral Oncol 35(2): 209-16.
- Akimoto, T., F. Numata, et al. (1998). "Abrogation of bronchial eosinophilic inflammation and airway hyperreactivity in signal transducers and activators of transcription (STAT)6-deficient mice." J Exp Med 187(9): 1537-42.
- Akira, S. and T. Kishimoto (1997). "NF-IL6 and NF-kappa B in cytokine gene regulation." Adv Immunol 65: 1-46.
- Albanese, C., J. Johnson, et al. (1995). "Transforming p21ras mutants and c-Ets-2 activate the cyclin D1 promoter through distinguishable regions." J Biol Chem 270(40): 23589-97.
- Alessi, D. R., M. Andjelkovic, et al. (1996). "Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1." Embo J 15(23): 6541-51.
- Alldrige, L. C. and C. E. Bryant (2003). "Annexin 1 regulates cell proliferation by disruption of cell morphology and inhibition of cyclin D1 expression through sustained activation of the ERK1/2 MAPK signal." Exp Cell Res 290(1): 93-107.
- Anthony, R. M., J. F. Urban, Jr., et al. (2006). "Memory T(H)2 cells induce alternatively activated macrophages to mediate protection against nematode parasites." Nat Med 12(8): 955-60.
- Aoyama, K., M. Nagata, et al. (2001). "Molecular cloning and characterization of a novel dual specificity phosphatase, LMW-DSP2, that lacks the cdc25 homology domain." J Biol Chem 276(29): 27575-83.
- Arcaro, A., S. Volinia, et al. (1998). "Human phosphoinositide 3-kinase C2beta, the role of calcium and the C2 domain in enzyme activity." J Biol Chem 273(49): 33082-90.
- Arcaro, A., M. J. Zvelebil, et al. (2000). "Class II phosphoinositide 3-kinases are downstream targets of activated polypeptide growth factor receptors." Mol Cell Biol 20(11): 3817-30.
- Arellano, M. and S. Moreno (1997). "Regulation of CDK/cyclin complexes during the cell cycle." Int J Biochem Cell Biol 29(4): 559-73.
- Arimura, A., M. vn Peer, et al. (2004). "The transcriptional co-activator p/CIP (NCoA-3) is up-regulated by STAT6 and serves as a positive regulator of transcriptional activation by STAT6." J Biol Chem 279(30): 31105-12.
- Arnold, L., A. Henry, et al. (2007). "Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis." J Exp Med 204(5): 1057-69.
- Aronica, M. A., S. Goenka, et al. (2000). "IL-4-dependent induction of BCL-2 and BCL-X(L) in activated T lymphocytes through a STAT6- and pi 3-kinase-independent pathway." Cytokine 12(6): 578-87.
- Baccala, R., D. H. Kono, et al. (2005). "Interferons as pathogenic effectors in autoimmunity." Immunol Rev 204: 9-26.

- Bailey, D. P., M. Kashyap, et al. (2004). "Interleukin-4 elicits apoptosis of developing mast cells via a Stat6-dependent mitochondrial pathway." Exp Hematol 32(1): 52-9.
- Bakiri, L., D. Lallemand, et al. (2000). "Cell cycle-dependent variations in c-Jun and JunB phosphorylation: a role in the control of cyclin D1 expression." Embo J 19(9): 2056-68.
- Baldwin, A. S., Jr. (2001). "Series introduction: the transcription factor NF-kappaB and human disease." J Clin Invest 107(1): 3-6.
- Bazuine, M., F. Carlotti, et al. (2004). "Mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase-1 and -4 attenuate p38 MAPK during dexamethasone-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes." Mol Endocrinol 18(7): 1697-707.
- Beier, F., R. J. Lee, et al. (1999). "Identification of the cyclin D1 gene as a target of activating transcription factor 2 in chondrocytes." Proc Natl Acad Sci U S A 96(4): 1433-8.
- Bennett, B. L., R. Cruz, et al. (1997). "Interleukin-4 suppression of tumor necrosis factor alpha-stimulated E-selectin gene transcription is mediated by STAT6 antagonism of NF-kappaB." J Biol Chem 272(15): 10212-9.
- Bernabei, P., E. M. Coccia, et al. (2001). "Interferon-gamma receptor 2 expression as the deciding factor in human T, B, and myeloid cell proliferation or death." J Leukoc Biol 70(6): 950-60.
- Besson, A., M. Gurian-West, et al. (2004). "p27Kip1 modulates cell migration through the regulation of RhoA activation." Genes Dev 18(8): 862-76.
- Blume-Jensen, P. and T. Hunter (2001). "Oncogenic kinase signalling." Nature 411(6835): 355-65.
- Boehlk, S., S. Fessele, et al. (2000). "ATF and Jun transcription factors, acting through an Ets/CRE promoter module, mediate lipopolysaccharide inducibility of the chemokine RANTES in monocytic Mono Mac 6 cells." Eur J Immunol 30(4): 1102-12.
- Boehm, U., T. Klamp, et al. (1997). "Cellular responses to interferon-gamma." Annu Rev Immunol 15: 749-95.
- Boguski, M. S. and F. McCormick (1993). "Proteins regulating Ras and its relatives." Nature 366(6456): 643-54.
- Boothby, M., A. L. Mora, et al. (2001). "IL-4 signaling, gene transcription regulation, and the control of effector T cells." Immunol Res 23(2-3): 179-91.
- Bottazzi, M. E., X. Zhu, et al. (1999). "Regulation of p21(cip1) expression by growth factors and the extracellular matrix reveals a role for transient ERK activity in G1 phase." J Cell Biol 146(6): 1255-64.
- Boulton, T. G. and M. H. Cobb (1991). "Identification of multiple extracellular signal-regulated kinases (ERKs) with antipeptide antibodies." Cell Regul 2(5): 357-71.
- Boulton, T. G., S. H. Nye, et al. (1991). "ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF." Cell 65(4): 663-75.
- Bourgin, C., R. Bourette, et al. (2000). "Expression of Mona (monocytic adapter) in myeloid progenitor cells results in increased and prolonged

- MAP kinase activation upon macrophage colony-stimulating factor stimulation." *FEBS Lett* 480(2-3): 113-7.
- Briata, P., S. V. Forcales, et al. (2005). "p38-dependent phosphorylation of the mRNA decay-promoting factor KSRP controls the stability of select myogenic transcripts." *Mol Cell* 20(6): 891-903.
- Brown, M. A. and J. Hural (1997). "Functions of IL-4 and control of its expression." *Crit Rev Immunol* 17(1): 1-32.
- Brugarolas, J., C. Chandrasekaran, et al. (1995). "Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency." *Nature* 377(6549): 552-7.
- Buschle, M., D. Campana, et al. (1993). "Interferon gamma inhibits apoptotic cell death in B cell chronic lymphocytic leukemia." *J Exp Med* 177(1): 213-8.
- Buschmann, T., O. Potapova, et al. (2001). "Jun NH2-terminal kinase phosphorylation of p53 on Thr-81 is important for p53 stabilization and transcriptional activities in response to stress." *Mol Cell Biol* 21(8): 2743-54.
- Busino, L., M. Chiesa, et al. (2004). "Cdc25A phosphatase: combinatorial phosphorylation, ubiquitylation and proteolysis." *Oncogene* 23(11): 2050-6.
- Cadalbert, L., C. M. Sloss, et al. (2005). "Conditional expression of MAP kinase phosphatase-2 protects against genotoxic stress-induced apoptosis by binding and selective dephosphorylation of nuclear activated c-jun N-terminal kinase." *Cell Signal* 17(10): 1254-64.
- Caelles, C., J. M. Gonzalez-Sancho, et al. (1997). "Nuclear hormone receptor antagonism with AP-1 by inhibition of the JNK pathway." *Genes Dev* 11(24): 3351-64.
- Calipel, A., G. Lefevre, et al. (2003). "Mutation of B-Raf in human choroidal melanoma cells mediates cell proliferation and transformation through the MEK/ERK pathway." *J Biol Chem* 278(43): 42409-18.
- Camps, M., A. Nichols, et al. (2000). "Dual specificity phosphatases: a gene family for control of MAP kinase function." *Faseb J* 14(1): 6-16.
- Canfield, S., Y. Lee, et al. (2005). "Cutting edge: IL-4 induces suppressor of cytokine signaling-3 expression in B cells by a mechanism dependent on activation of p38 MAPK." *J Immunol* 174(5): 2494-8.
- Cano, E. and L. C. Mahadevan (1995). "Parallel signal processing among mammalian MAPKs." *Trends Biochem Sci* 20(3): 117-22.
- Capsoni, F., F. Minonzio, et al. (1994). "Fc receptors expression and function in mononuclear phagocytes from AIDS patients: modulation by IFN-gamma." *Scand J Immunol* 39(1): 45-50.
- Carnero, A. and G. J. Hannon (1998). "The INK4 family of CDK inhibitors." *Curr Top Microbiol Immunol* 227: 43-55.
- Casals, C., M. Barrachina, et al. (2007). "Lipopolysaccharide up-regulates MHC class II expression on dendritic cells through an AP-1 enhancer without affecting the levels of CIITA." *J Immunol* 178(10): 6307-15.
- Celada, A., F. E. Borrás, et al. (1996). "The transcription factor PU.1 is involved in macrophage proliferation." *J Exp Med* 184(1): 61-9.

- Celada, A., P. W. Gray, et al. (1984). "Evidence for a gamma-interferon receptor that regulates macrophage tumoricidal activity." J Exp Med 160(1): 55-74.
- Celada, A., M. J. Klemsz, et al. (1989). "Interferon-gamma activates multiple pathways to regulate the expression of the genes for major histocompatibility class II I-A beta, tumor necrosis factor and complement component C3 in mouse macrophages." Eur J Immunol 19(6): 1103-9.
- Celada, A. and R. A. Maki (1992). "Transforming growth factor-beta enhances the M-CSF and GM-CSF-stimulated proliferation of macrophages." J Immunol 148(4): 1102-5.
- Celada, A. and C. Nathan (1994). "Macrophage activation revisited." Immunol Today 15(3): 100-2.
- Celada, A. and R. D. Schreiber (1987). "Internalization and degradation of receptor-bound interferon-gamma by murine macrophages. Demonstration of receptor recycling." J Immunol 139(1): 147-53.
- Clark, A. R., J. L. Dean, et al. (2003). "Post-transcriptional regulation of gene expression by mitogen-activated protein kinase p38." FEBS Lett 546(1): 37-44.
- Clausen, B. E., C. Burkhardt, et al. (1999). "Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice." Transgenic Res 8(4): 265-77.
- Collins, I. and M. D. Garrett (2005). "Targeting the cell division cycle in cancer: CDK and cell cycle checkpoint kinase inhibitors." Curr Opin Pharmacol 5(4): 366-73.
- Comalada, M., A. F. Valledor, et al. (2003). "Macrophage colony-stimulating factor-dependent macrophage proliferation is mediated through a calcineurin-independent but immunophilin-dependent mechanism that mediates the activation of external regulated kinases." Eur J Immunol 33(11): 3091-100.
- Comalada, M., J. Xaus, et al. (2004). "Macrophage colony-stimulating factor-, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-, or IL-3-dependent survival of macrophages, but not proliferation, requires the expression of p21(Waf1) through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway." Eur J Immunol 34(8): 2257-67.
- Compston, J. E. (2002). "Bone marrow and bone: a functional unit." J Endocrinol 173(3): 387-94.
- Cook, S. J., J. Beltman, et al. (1997). "Regulation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 expression by extracellular signal-related kinase-dependent and Ca²⁺-dependent signal pathways in Rat-1 cells." J Biol Chem 272(20): 13309-19.
- Coqueret, O. and H. Gascan (2000). "Functional interaction of STAT3 transcription factor with the cell cycle inhibitor p21WAF1/CIP1/SDI1." J Biol Chem 275(25): 18794-800.
- Crews, C. M., A. Alessandrini, et al. (1992). "The primary structure of MEK, a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product." Science 258(5081): 478-80.

- Chan, E. D. and D. W. Riches (2001). "IFN-gamma + LPS induction of iNOS is modulated by ERK, JNK/SAPK, and p38(mapk) in a mouse macrophage cell line." Am J Physiol Cell Physiol 280(3): C441-50.
- Chang, F., L. S. Steelman, et al. (2003). "Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention." Leukemia 17(7): 1263-93.
- Chatila, T. A. (2004). "Interleukin-4 receptor signaling pathways in asthma pathogenesis." Trends Mol Med 10(10): 493-9.
- Chen, J., P. K. Jackson, et al. (1995). "Separate domains of p21 involved in the inhibition of Cdk kinase and PCNA." Nature 374(6520): 386-8.
- Chen, Y. J., Y. N. Wang, et al. (2007). "ERK2-mediated C-terminal serine phosphorylation of p300 is vital to the regulation of epidermal growth factor-induced keratin 16 gene expression." J Biol Chem 282(37): 27215-28.
- Cheon, J., D. J. Chung, et al. (1996). "Inhibitory effects of interleukin-4 on human renal cell carcinoma cells in vitro: in combination with interferon-alpha, tumor necrosis factor-alpha or interleukin-2." Int J Urol 3(3): 196-201.
- Chiaberge, S., E. Cassarino, et al. (1998). "The phosphorylation of protein S6 modulates the interaction of the 40 S ribosomal subunit with the 5'-untranslated region of a dictyostelium pre-spore-specific mRNA and controls its stability." J Biol Chem 273(42): 27070-5.
- Chin, Y. E., M. Kitagawa, et al. (1996). "Cell growth arrest and induction of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 WAF1/CIP1 mediated by STAT1." Science 272(5262): 719-22.
- Chinenov, Y. and T. K. Kerppola (2001). "Close encounters of many kinds: Fos-Jun interactions that mediate transcription regulatory specificity." Oncogene 20(19): 2438-52.
- Cho, Y. S., J. M. Bae, et al. (2008). "HIF-1alpha controls keratinocyte proliferation by up-regulating p21(WAF1/Cip1)." Biochim Biophys Acta 1783(2): 323-33.
- Christopher, M. J. and D. C. Link (2007). "Regulation of neutrophil homeostasis." Curr Opin Hematol 14(1): 3-8.
- Chu, Y., P. A. Solski, et al. (1996). "The mitogen-activated protein kinase phosphatases PAC1, MKP-1, and MKP-2 have unique substrate specificities and reduced activity in vivo toward the ERK2 sevenmaker mutation." J Biol Chem 271(11): 6497-501.
- Chung, J., E. Uchida, et al. (1997). "STAT3 serine phosphorylation by ERK-dependent and -independent pathways negatively modulates its tyrosine phosphorylation." Mol Cell Biol 17(11): 6508-16.
- Dai, X. M., X. H. Zong, et al. (2004). "Incomplete restoration of colony-stimulating factor 1 (CSF-1) function in CSF-1-deficient Csf1op/Csf1op mice by transgenic expression of cell surface CSF-1." Blood 103(3): 1114-23.
- Daum, G., I. Eisenmann-Tappe, et al. (1994). "The ins and outs of Raf kinases." Trends Biochem Sci 19(11): 474-80.

- David, M., D. Ford, et al. (2001). "Induction of the IL-13 receptor alpha2-chain by IL-4 and IL-13 in human keratinocytes: involvement of STAT6, ERK and p38 MAPK pathways." Oncogene 20(46): 6660-8.
- Dawson, C. H., B. L. Brown, et al. (1997). "A 70-kDa protein facilitates interleukin-4 signal transduction in the absence of the common gamma receptor chain." Biochem Biophys Res Commun 233(1): 279-82.
- De Cesare, D., S. Jacquot, et al. (1998). "Rsk-2 activity is necessary for epidermal growth factor-induced phosphorylation of CREB protein and transcription of c-fos gene." Proc Natl Acad Sci U S A 95(21): 12202-7.
- de Waal Malefyt, R., C. G. Figdor, et al. (1993). "Effects of IL-13 on phenotype, cytokine production, and cytotoxic function of human monocytes. Comparison with IL-4 and modulation by IFN-gamma or IL-10." J Immunol 151(11): 6370-81.
- Decker, T., P. Kovarik, et al. (1997). "GAS elements: a few nucleotides with a major impact on cytokine-induced gene expression." J Interferon Cytokine Res 17(3): 121-34.
- Defrance, T., J. P. Aubry, et al. (1987). "Human recombinant interleukin 4 induces Fc epsilon receptors (CD23) on normal human B lymphocytes." J Exp Med 165(6): 1459-67.
- DeGregori, J., T. Kowalik, et al. (1995). "Cellular targets for activation by the E2F1 transcription factor include DNA synthesis- and G1/S-regulatory genes." Mol Cell Biol 15(8): 4215-24.
- Deng, C., P. Zhang, et al. (1995). "Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control." Cell 82(4): 675-84.
- Denu, J. M. and J. E. Dixon (1998). "Protein tyrosine phosphatases: mechanisms of catalysis and regulation." Curr Opin Chem Biol 2(5): 633-41.
- Derijard, B., J. Raingeaud, et al. (1995). "Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms." Science 267(5198): 682-5.
- Dey, A., L. Kim, et al. (1999). "Gamma interferon induces expression of Mad1 gene in macrophage, which inhibits colony-stimulating factor-1-dependent mitogenesis." J Cell Biochem 72(2): 232-41.
- Dong, C., D. D. Yang, et al. (1998). "Defective T cell differentiation in the absence of Jnk1." Science 282(5396): 2092-5.
- Donzelli, M. and G. F. Draetta (2003). "Regulating mammalian checkpoints through Cdc25 inactivation." EMBO Rep 4(7): 671-7.
- Dubucquoi, S., P. Desreumaux, et al. (1994). "Interleukin 5 synthesis by eosinophils: association with granules and immunoglobulin-dependent secretion." J Exp Med 179(2): 703-8.
- el-Deiry, W. S., T. Tokino, et al. (1993). "WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression." Cell 75(4): 817-25.
- Engelbrecht, Y., H. de Wet, et al. (2003). "Glucocorticoids induce rapid up-regulation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and dephosphorylation of extracellular signal-regulated kinase and impair proliferation in human and mouse osteoblast cell lines." Endocrinology 144(2): 412-22.

- Ettinger, R., D. J. Panka, et al. (1995). "Fas ligand-mediated cytotoxicity is directly responsible for apoptosis of normal CD4+ T cells responding to a bacterial superantigen." J Immunol 154(9): 4302-8.
- Evan, G. I., A. H. Wyllie, et al. (1992). "Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein." Cell 69(1): 119-28.
- Facchini, L. M. and L. Z. Penn (1998). "The molecular role of Myc in growth and transformation: recent discoveries lead to new insights." Faseb J 12(9): 633-51.
- Fang, F., G. Orend, et al. (1996). "Dependence of cyclin E-CDK2 kinase activity on cell anchorage." Science 271(5248): 499-502.
- Farrar, M. A. and R. D. Schreiber (1993). "The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor." Annu Rev Immunol 11: 571-611.
- Farrar, M. A., J. Tian, et al. (2000). "Membrane localization of Raf assists engagement of downstream effectors." J Biol Chem 275(40): 31318-24.
- Ferrick, D. A., M. D. Schrenzel, et al. (1995). "Differential production of interferon-gamma and interleukin-4 in response to Th1- and Th2-stimulating pathogens by gamma delta T cells in vivo." Nature 373(6511): 255-7.
- Fixe, P. and V. Praloran (1997). "Macrophage colony-stimulating-factor (M-CSF or CSF-1) and its receptor: structure-function relationships." Eur Cytokine Netw 8(2): 125-36.
- Franklin, C. C. and A. S. Kraft (1997). "Conditional expression of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase MKP-1 preferentially inhibits p38 MAPK and stress-activated protein kinase in U937 cells." J Biol Chem 272(27): 16917-23.
- Frantz, S., K. A. Vincent, et al. (2005). "Innate immunity and angiogenesis." Circ Res 96(1): 15-26.
- Frost, J. A., S. Xu, et al. (1996). "Actions of Rho family small G proteins and p21-activated protein kinases on mitogen-activated protein kinase family members." Mol Cell Biol 16(7): 3707-13.
- Frucht, D. M., T. Fukao, et al. (2001). "IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge." Trends Immunol 22(10): 556-60.
- Fruman, D. A., R. E. Meyers, et al. (1998). "Phosphoinositide kinases." Annu Rev Biochem 67: 481-507.
- Furukawa, Y. (2002). "Cell cycle control genes and hematopoietic cell differentiation." Leuk Lymphoma 43(2): 225-31.
- Gamero, A. M. and A. C. Larner (2000). "Signaling via the T cell antigen receptor induces phosphorylation of Stat1 on serine 727." J Biol Chem 275(22): 16574-8.
- Gartel, A. L. and S. K. Radhakrishnan (2005). "Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences." Cancer Res 65(10): 3980-5.
- Gartel, A. L. and K. Shchors (2003). "Mechanisms of c-myc-mediated transcriptional repression of growth arrest genes." Exp Cell Res 283(1): 17-21.
- Gaubatz, S., J. A. Lees, et al. (2001). "E2F4 is exported from the nucleus in a CRM1-dependent manner." Mol Cell Biol 21(4): 1384-92.

- Gingras, S., J. Simard, et al. (1999). "p300/CBP is required for transcriptional induction by interleukin-4 and interacts with Stat6." Nucleic Acids Res 27(13): 2722-9.
- Goenka, S., S. H. Cho, et al. (2007). "Collaborator of Stat6 (CoaSt6)-associated poly(ADP-ribose) polymerase activity modulates Stat6-dependent gene transcription." J Biol Chem 282(26): 18732-9.
- Goenka, S., C. Marlar, et al. (2003). "Differential roles of C-terminal activation motifs in the establishment of Stat6 transcriptional specificity." J Biol Chem 278(50): 50362-70.
- Goes, N., T. Sims, et al. (1995). "Disturbed MHC regulation in the IFN-gamma knockout mouse. Evidence for three states of MHC expression with distinct roles for IFN-gamma." J Immunol 155(10): 4559-66.
- Goh, K. C., S. J. Haque, et al. (1999). "p38 MAP kinase is required for STAT1 serine phosphorylation and transcriptional activation induced by interferons." Embo J 18(20): 5601-8.
- Gollob, J. A., C. P. Schnipper, et al. (1999). "The functional synergy between IL-12 and IL-2 involves p38 mitogen-activated protein kinase and is associated with the augmentation of STAT serine phosphorylation." J Immunol 162(8): 4472-81.
- Gooch, J. L., B. Christy, et al. (2002). "STAT6 mediates interleukin-4 growth inhibition in human breast cancer cells." Neoplasia 4(4): 324-31.
- Gooch, J. L., A. V. Lee, et al. (1998). "Interleukin 4 inhibits growth and induces apoptosis in human breast cancer cells." Cancer Res 58(18): 4199-205.
- Gordon, S. (2003). "Alternative activation of macrophages." Nat Rev Immunol 3(1): 23-35.
- Gordon, S. and P. R. Taylor (2005). "Monocyte and macrophage heterogeneity." Nat Rev Immunol 5(12): 953-64.
- Grana, X. and E. P. Reddy (1995). "Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs)." Oncogene 11(2): 211-9.
- Gray, M. J., M. Poljakovic, et al. (2005). "Induction of arginase I transcription by IL-4 requires a composite DNA response element for STAT6 and C/EBPbeta." Gene 353(1): 98-106.
- Gredinger, E., A. N. Gerber, et al. (1998). "Mitogen-activated protein kinase pathway is involved in the differentiation of muscle cells." J Biol Chem 273(17): 10436-44.
- Gregory, M. A. and S. R. Hann (2000). "c-Myc proteolysis by the ubiquitin-proteasome pathway: stabilization of c-Myc in Burkitt's lymphoma cells." Mol Cell Biol 20(7): 2423-35.
- Groom, L. A., A. A. Sneddon, et al. (1996). "Differential regulation of the MAP, SAP and RK/p38 kinases by Pyst1, a novel cytosolic dual-specificity phosphatase." Embo J 15(14): 3621-32.
- Guermonez, P., J. Valladeau, et al. (2002). "Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells." Annu Rev Immunol 20: 621-67.
- Gupta, S., T. Barrett, et al. (1996). "Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors." Embo J 15(11): 2760-70.

- Gupta, S., D. Campbell, et al. (1995). "Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway." Science 267(5196): 389-93.
- Hamerman, J. A. and L. L. Lanier (2006). "Inhibition of immune responses by ITAM-bearing receptors." Sci STKE 2006(320): re1.
- Hamilton, J. A. (1997). "CSF-1 signal transduction: what is of functional significance?" Immunol Today 18(7): 313-7.
- Hamilton, J. A., G. A. Whitty, et al. (1996). "Endogenous IFN-alpha beta suppresses colony-stimulating factor (CSF)-1-stimulated macrophage DNA synthesis and mediates inhibitory effects of lipopolysaccharide and TNF-alpha." J Immunol 156(7): 2553-7.
- Han, A., K. Saijo, et al. (2003). "Bam32 links the B cell receptor to ERK and JNK and mediates B cell proliferation but not survival." Immunity 19(4): 621-32.
- Han, S., N. Sidell, et al. (2005). "Fibronectin stimulates human lung carcinoma cell proliferation by suppressing p21 gene expression via signals involving Erk and Rho kinase." Cancer Lett 219(1): 71-81.
- Han, Z. S., H. Enslin, et al. (1998). "A conserved p38 mitogen-activated protein kinase pathway regulates Drosophila immunity gene expression." Mol Cell Biol 18(6): 3527-39.
- Haq, R., A. Halupa, et al. (2002). "Regulation of erythropoietin-induced STAT serine phosphorylation by distinct mitogen-activated protein kinases." J Biol Chem 277(19): 17359-66.
- Harper, J. W., G. R. Adami, et al. (1993). "The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases." Cell 75(4): 805-16.
- Harris, T. E., J. H. Albrecht, et al. (2001). "CCAAT/enhancer-binding protein-alpha cooperates with p21 to inhibit cyclin-dependent kinase-2 activity and induces growth arrest independent of DNA binding." J Biol Chem 276(31): 29200-9.
- Hart, P. H., C. S. Bonder, et al. (1999). "Differential responses of human monocytes and macrophages to IL-4 and IL-13." J Leukoc Biol 66(4): 575-8.
- Hashimoto, S., Y. Gon, et al. (2001). "IL-4 and IL-13 induce myofibroblastic phenotype of human lung fibroblasts through c-Jun NH2-terminal kinase-dependent pathway." J Allergy Clin Immunol 107(6): 1001-8.
- Herrero, C., L. Marques, et al. (2001). "IFN-gamma-dependent transcription of MHC class II IA is impaired in macrophages from aged mice." J Clin Invest 107(4): 485-93.
- Hesse, M., M. Modolell, et al. (2001). "Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism." J Immunol 167(11): 6533-44.
- Hickman, M. J. and L. D. Samson (1999). "Role of DNA mismatch repair and p53 in signaling induction of apoptosis by alkylating agents." Proc Natl Acad Sci U S A 96(19): 10764-9.
- Hickman, S. P., J. Yang, et al. (2006). "Defective activation of protein kinase C and Ras-ERK pathways limits IL-2 production and proliferation by CD4+CD25+ regulatory T cells." J Immunol 177(4): 2186-94.

- Hirosumi, J., G. Tuncman, et al. (2002). "A central role for JNK in obesity and insulin resistance." Nature 420(6913): 333-6.
- Horvai, A. E., L. Xu, et al. (1997). "Nuclear integration of JAK/STAT and Ras/AP-1 signaling by CBP and p300." Proc Natl Acad Sci U S A 94(4): 1074-9.
- Howard, M., J. Farrar, et al. (1982). "Identification of a T cell-derived b cell growth factor distinct from interleukin 2." J Exp Med 155(3): 914-23.
- Hu-Li, J., E. M. Shevach, et al. (1987). "B cell stimulatory factor 1 (interleukin 4) is a potent costimulant for normal resting T lymphocytes." J Exp Med 165(1): 157-72.
- Hu, X., P. K. Paik, et al. (2006). "IFN-gamma suppresses IL-10 production and synergizes with TLR2 by regulating GSK3 and CREB/AP-1 proteins." Immunity 24(5): 563-74.
- Huang, W. C. and C. C. Chen (2005). "Akt phosphorylation of p300 at Ser-1834 is essential for its histone acetyltransferase and transcriptional activity." Mol Cell Biol 25(15): 6592-602.
- Hunt, A. E., L. M. Williams, et al. (2002). "IL-4 regulation of p38 MAPK signalling is dependent on cell type." Cytokine 18(6): 295-303.
- Hunter, T. (1995). "Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signalling." Cell 80: 225-236.
- Ihle, J. N. (1995). "The Janus protein tyrosine kinase family and its role in cytokine signaling." Adv Immunol 60: 1-35.
- Ihle, J. N. (1996). "STATs: signal transducers and activators of transcription." Cell 84(3): 331-4.
- Iniesta, V., J. Carcelen, et al. (2005). "Arginase I induction during Leishmania major infection mediates the development of disease." Infect Immun 73(9): 6085-90.
- Ip, W. K., C. K. Wong, et al. (2006). "Interleukin (IL)-4 and IL-13 up-regulate monocyte chemoattractant protein-1 expression in human bronchial epithelial cells: involvement of p38 mitogen-activated protein kinase, extracellular signal-regulated kinase 1/2 and Janus kinase-2 but not c-Jun NH2-terminal kinase 1/2 signalling pathways." Clin Exp Immunol 145(1): 162-72.
- Ip, Y. T. and R. J. Davis (1998). "Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)--from inflammation to development." Curr Opin Cell Biol 10(2): 205-19.
- Ishibashi, T., D. P. Bottaro, et al. (1994). "A novel dual specificity phosphatase induced by serum stimulation and heat shock." J Biol Chem 269(47): 29897-902.
- Iwasaki, H., K. Shimoda, et al. (1999). "Production of soluble granulocyte colony-stimulating factor receptors from myelomonocytic cells." J Immunol 163(12): 6907-11.
- Izuhara, K., R. A. Feldman, et al. (1994). "Interaction of the c-fes proto-oncogene product with the interleukin-4 receptor." J Biol Chem 269(28): 18623-9.
- Jaworowski, A., E. Christy, et al. (1996). "Differences in the kinetics of activation of protein kinases and extracellular signal-related protein kinase 1 in colony-stimulating factor 1-stimulated and

- lipopolysaccharide-stimulated macrophages." Biochem J 320 (Pt 3): 1011-6.
- Jaworowski, A., N. J. Wilson, et al. (1999). "Roles of the mitogen-activated protein kinase family in macrophage responses to colony stimulating factor-1 addition and withdrawal." J Biol Chem 274(21): 15127-33.
- Jiang, H., M. B. Harris, et al. (2000). "IL-4/IL-13 signaling beyond JAK/STAT." J Allergy Clin Immunol 105(6 Pt 1): 1063-70.
- Jiang, Y., Z. Li, et al. (1997). "Structure-function studies of p38 mitogen-activated protein kinase. Loop 12 influences substrate specificity and autophosphorylation, but not upstream kinase selection." J Biol Chem 272(17): 11096-102.
- Kammer, W., A. Lischke, et al. (1996). "Homodimerization of interleukin-4 receptor alpha chain can induce intracellular signaling." J Biol Chem 271(39): 23634-7.
- Kane, L. P., V. S. Shapiro, et al. (1999). "Induction of NF-kappaB by the Akt/PKB kinase." Curr Biol 9(11): 601-4.
- Karin, M. (1995). "The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases." J Biol Chem 270(28): 16483-6.
- Karin, M. and T. Hunter (1995). "Transcriptional control by protein phosphorylation: signal transmission from the cell surface to the nucleus." Curr Biol 5(7): 747-57.
- Karin, M., Z. Liu, et al. (1997). "AP-1 function and regulation." Curr Opin Cell Biol 9(2): 240-6.
- Kepler, T. B. and C. Chan (2007). "Spatiotemporal programming of a simple inflammatory process." Immunol Rev 216: 153-63.
- Kerppola, T. K. and T. Curran (1994). "Maf and Nrl can bind to AP-1 sites and form heterodimers with Fos and Jun." Oncogene 9(3): 675-84.
- Keyse, S. M. (2000). "Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signalling." Curr. Opin. Cell Biol. 12: 186-192.
- Khanna, A. K., M. Plummer, et al. (2005). "Recombinant p21 protein inhibits lymphocyte proliferation and transcription factors." J Immunol 174(12): 7610-7.
- Kharbanda, S., S. Saxena, et al. (2000). "Translocation of SAPK/JNK to mitochondria and interaction with Bcl-x(L) in response to DNA damage." J Biol Chem 275(1): 322-7.
- Khokhlatchev, A. V., B. Canagarajah, et al. (1998). "Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation." Cell 93(4): 605-15.
- Kile, B. T. and W. S. Alexander (2001). "The suppressors of cytokine signalling (SOCS)." Cell Mol Life Sci 58(11): 1627-35.
- Kim, J. J., B. C. Park, et al. (2001). "Mitogenic and metabolic effects of type I IGF receptor overexpression in insulin receptor-deficient hepatocytes." Endocrinology 142(8): 3354-60.
- Kisseleva, T., S. Bhattacharya, et al. (2002). "Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges." Gene 285(1-2): 1-24.
- Kitaura, H., M. Shinshi, et al. (2000). "Reciprocal regulation via protein-protein interaction between c-Myc and p21(cip1/waf1/sdi1) in DNA replication and transcription." J Biol Chem 275(14): 10477-83.

- Klimp, A. H., E. G. de Vries, et al. (2002). "A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer." Crit Rev Oncol Hematol 44(2): 143-61.
- Kops, G. J. and B. M. Burgering (1999). "Forkhead transcription factors: new insights into protein kinase B (c-akt) signaling." J Mol Med 77(9): 656-65.
- Koyasu, S. (2003). "The role of PI3K in immune cells." Nat Immunol 4(4): 313-9.
- Kramer, D. L., B. D. Chang, et al. (2001). "Polyamine depletion in human melanoma cells leads to G1 arrest associated with induction of p21WAF1/CIP1/SDI1, changes in the expression of p21-regulated genes, and a senescence-like phenotype." Cancer Res 61(21): 7754-62.
- Kramer, J. L., I. Baltathakis, et al. (2002). "Differentiation of functional dendritic cells and macrophages from human peripheral blood monocyte precursors is dependent on expression of p21 (WAF1/CIP1) and requires iron." Br J Haematol 117(3): 727-34.
- Kranenburg, O., V. Scharnhorst, et al. (1995). "Inhibition of cyclin-dependent kinase activity triggers neuronal differentiation of mouse neuroblastoma cells." J Cell Biol 131(1): 227-34.
- Kranenburg, O., A. J. van der Eb, et al. (1996). "Cyclin D1 is an essential mediator of apoptotic neuronal cell death." Embo J 15(1): 46-54.
- Kropf, P., J. M. Fuentes, et al. (2005). "Arginase and polyamine synthesis are key factors in the regulation of experimental leishmaniasis in vivo." Faseb J 19(8): 1000-2.
- Kuan, C. Y., D. D. Yang, et al. (1999). "The Jnk1 and Jnk2 protein kinases are required for regional specific apoptosis during early brain development." Neuron 22(4): 667-76.
- Kuhn, R., K. Rajewsky, et al. (1991). "Generation and analysis of interleukin-4 deficient mice." Science 254(5032): 707-10.
- Kyriakis, J. M. and J. Avruch (1996). "Protein kinase cascades activated by stress and inflammatory cytokines." Bioessays 18(7): 567-77.
- Kyriakis, J. M. and J. Avruch (2001). "Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation." Physiol Rev 81(2): 807-69.
- Lambert, P. F., M. J. Ludford-Menting, et al. (1997). "The nfkb1 promoter is controlled by proteins of the Ets family." Mol Biol Cell 8(2): 313-23.
- Lanteri-Minet, M., J. de Pommery, et al. (1993). "Differential time course and spatial expression of Fos, Jun, and Krox-24 proteins in spinal cord of rats undergoing subacute or chronic somatic inflammation." J Comp Neurol 333(2): 223-35.
- Lathey, J. L., S. Kanangat, et al. (1994). "Dysregulation of cytokine expression in monocytes from HIV-positive individuals." J Leukoc Biol 56(3): 347-52.
- Lee, J., H. Ryu, et al. (2003). "Translational control of inducible nitric oxide synthase expression by arginine can explain the arginine paradox." Proc Natl Acad Sci U S A 100(8): 4843-8.

- Lee, J. C., J. T. Laydon, et al. (1994). "A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis." Nature 372(6508): 739-46.
- Lee, Z. H., K. Kwack, et al. (2000). "Activation of c-Jun N-terminal kinase and activator protein 1 by receptor activator of nuclear factor kappaB." Mol Pharmacol 58(6): 1536-45.
- Lei, K. and R. J. Davis (2003). "JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis." Proc Natl Acad Sci U S A 100(5): 2432-7.
- Leslie, N. R., A. Gray, et al. (2000). "Analysis of the cellular functions of PTEN using catalytic domain and C-terminal mutations: differential effects of C-terminal deletion on signalling pathways downstream of phosphoinositide 3-kinase." Biochem J 346 Pt 3: 827-33.
- Letzelter, F., Y. Wang, et al. (1998). "The interleukin-4 site-2 epitope determining binding of the common receptor gamma chain." Eur J Biochem 257(1): 11-20.
- Levine, A. J. (1997). "p53, the cellular gatekeeper for growth and division." Cell 88(3): 323-31.
- Levings, M. K., D. C. Bessette, et al. (1999). "Interleukin-4 synergizes with Raf-1 to promote long-term proliferation and activation of c-jun N-terminal kinase." Blood 93(11): 3694-702.
- Levy, D. E. and J. E. Darnell, Jr. (2002). "Stats: transcriptional control and biological impact." Nat Rev Mol Cell Biol 3(9): 651-62.
- Lewis, T., L. A. Groom, et al. (1995). "XCL100, an inducible nuclear MAP kinase phosphatase from *Xenopus laevis*: its role in MAP kinase inactivation in differentiated cells and its expression during early development." J Cell Sci 108 (Pt 8): 2885-96.
- Li, R., S. Waga, et al. (1994). "Differential effects by the p21 CDK inhibitor on PCNA-dependent DNA replication and repair." Nature 371(6497): 534-7.
- Liang, J., J. Zubovitz, et al. (2002). "PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest." Nat Med 8(10): 1153-60.
- Liao, Y. F., B. J. Wang, et al. (2004). "Tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1beta, and interferon-gamma stimulate gamma-secretase-mediated cleavage of amyloid precursor protein through a JNK-dependent MAPK pathway." J Biol Chem 279(47): 49523-32.
- Lin, Y. W., S. M. Chuang, et al. (2003). "ERK1/2 achieves sustained activation by stimulating MAPK phosphatase-1 degradation via the ubiquitin-proteasome pathway." J Biol Chem 278(24): 21534-41.
- Lipoldova, M. and P. Demant (2006). "Genetic susceptibility to infectious disease: lessons from mouse models of leishmaniasis." Nat Rev Genet 7(4): 294-305.
- Lissy, N. A., L. F. Van Dyk, et al. (1998). "TCR antigen-induced cell death occurs from a late G1 phase cell cycle check point." Immunity 8(1): 57-65.
- Litterst, C. M. and E. Pfizner (2002). "An LXXLL motif in the transactivation domain of STAT6 mediates recruitment of NCoA-1/SRC-1." J Biol Chem 277(39): 36052-60.

- Liu, J., M. L. Estes, et al. (2000). "Anti-sense oligonucleotide of p21(waf1/cip1) prevents interleukin 4-mediated elevation of p27(kip1) in low grade astrocytoma cells." Oncogene 19(5): 661-9.
- Liu, Y. and C. A. Janeway, Jr. (1990). "Interferon gamma plays a critical role in induced cell death of effector T cell: a possible third mechanism of self-tolerance." J Exp Med 172(6): 1735-9.
- Lobrich, M. and P. A. Jeggo (2007). "The impact of a negligent G2/M checkpoint on genomic instability and cancer induction." Nat Rev Cancer 7(11): 861-9.
- Lukas, J. and J. Bartek (2004). "Cell division: the heart of the cycle." Nature 432(7017): 564-7.
- Luttrell, D. K. and L. M. Luttrell (2003). "Signaling in time and space: G protein-coupled receptors and mitogen-activated protein kinases." Assay Drug Dev Technol 1(2): 327-38.
- MacMicking, J., Q. W. Xie, et al. (1997). "Nitric oxide and macrophage function." Annu Rev Immunol 15: 323-50.
- Maddika, S., S. R. Ande, et al. (2007). "Cell survival, cell death and cell cycle pathways are interconnected: implications for cancer therapy." Drug Resist Updat 10(1-2): 13-29.
- Maiti, N. R., P. Sharma, et al. (2005). "Serine phosphorylation of Stat6 negatively controls its DNA-binding function." J Interferon Cytokine Res 25(9): 553-63.
- Maldonado, J. L., L. Timmerman, et al. (2004). "Mechanisms of cell-cycle arrest in Spitz nevi with constitutive activation of the MAP-kinase pathway." Am J Pathol 164(5): 1783-7.
- Mantovani, A., A. Sica, et al. (2004). "The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization." Trends Immunol 25(12): 677-86.
- Mantovani, A., S. Sozzani, et al. (2002). "Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes." Trends Immunol 23(11): 549-55.
- Marques, L., M. Brucet, et al. (2004). "STAT1 regulates lipopolysaccharide- and TNF-alpha-dependent expression of transporter associated with antigen processing 1 and low molecular mass polypeptide 2 genes in macrophages by distinct mechanisms." J Immunol 173(2): 1103-10.
- Marshall, C. J. (1995). "Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation." Cell 80(2): 179-85.
- Marti, F., A. Krause, et al. (2001). "Negative-feedback regulation of CD28 costimulation by a novel mitogen-activated protein kinase phosphatase, MKP6." J Immunol 166(1): 197-206.
- Masuda, K., H. Shima, et al. (2001). "MKP-7, a novel mitogen-activated protein kinase phosphatase, functions as a shuttle protein." J Biol Chem 276(42): 39002-11.
- Matsuoka, S., M. C. Edwards, et al. (1995). "p57KIP2, a structurally distinct member of the p21CIP1 Cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene." Genes Dev 9(6): 650-62.

- Matsushime, H., M. F. Roussel, et al. (1991). "Colony-stimulating factor 1 regulates novel cyclins during the G1 phase of the cell cycle." Cell 65(4): 701-13.
- McCarthy, S. A., D. Chen, et al. (1997). "Rapid phosphorylation of Ets-2 accompanies mitogen-activated protein kinase activation and the induction of heparin-binding epidermal growth factor gene expression by oncogenic Raf-1." Mol Cell Biol 17(5): 2401-12.
- Medema, R. H., G. J. Kops, et al. (2000). "AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1." Nature 404(6779): 782-7.
- Melemed, A. S., J. W. Ryder, et al. (1997). "Activation of the mitogen-activated protein kinase pathway is involved in and sufficient for megakaryocytic differentiation of CMK cells." Blood 90(9): 3462-70.
- Meraz, M. A., J. M. White, et al. (1996). "Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway." Cell 84(3): 431-42.
- Metwali, A., A. Blum, et al. (2002). "Interleukin-4 receptor alpha chain and STAT6 signaling inhibit gamma interferon but not Th2 cytokine expression within schistosome granulomas." Infect Immun 70(10): 5651-8.
- Mikita, T., D. Campbell, et al. (1996). "Requirements for interleukin-4-induced gene expression and functional characterization of Stat6." Mol Cell Biol 16(10): 5811-20.
- Minami, Y., T. Kono, et al. (1993). "Association of p56lck with IL-2 receptor beta chain is critical for the IL-2-induced activation of p56lck." Embo J 12(2): 759-68.
- Minassian, C., C. Zitoun, et al. (1996). "Differential time course of liver and kidney glucose-6 phosphatase activity during long-term fasting in rat correlates with differential time course of messenger RNA level." Mol Cell Biochem 155(1): 37-41.
- Misra-Press, A., C. S. Rim, et al. (1995). "A novel mitogen-activated protein kinase phosphatase. Structure, expression, and regulation." J Biol Chem 270(24): 14587-96.
- Miyajima, A., T. Kitamura, et al. (1992). "Cytokine receptors and signal transduction." Annu Rev Immunol 10: 295-331.
- Miyazaki, T., A. Kawahara, et al. (1994). "Functional activation of Jak1 and Jak3 by selective association with IL-2 receptor subunits." Science 266(5187): 1045-7.
- Mondal, K., O. I. Sirenko, et al. (2000). "Differential role of tyrosine phosphorylation in adhesion-induced transcription, mRNA stability, and cytoskeletal organization in human monocytes." J Leukoc Biol 67(2): 216-25.
- Morisaki, T., A. Uchiyama, et al. (1994). "Interleukin 4 regulates G1 cell cycle progression in gastric carcinoma cells." Cancer Res 54(4): 1113-8.
- Morrison, D. K. and R. E. Cutler (1997). "The complexity of Raf-1 regulation." Curr Opin Cell Biol 9(2): 174-9.

- Muda, M., U. Boschert, et al. (1997). "Molecular cloning and functional characterization of a novel mitogen-activated protein kinase phosphatase, MKP-4." J Biol Chem 272(8): 5141-51.
- Muda, M., A. Theodosiou, et al. (1998). "The mitogen-activated protein kinase phosphatase-3 N-terminal noncatalytic region is responsible for tight substrate binding and enzymatic specificity." J Biol Chem 273(15): 9323-9.
- Mueller, T. D., J. L. Zhang, et al. (2002). "Structure, binding, and antagonists in the IL-4/IL-13 receptor system." Biochim Biophys Acta 1592(3): 237-50.
- Muller, R. (1995). "Transcriptional regulation during the mammalian cell cycle." Trends Genet 11(5): 173-8.
- Munder, M., K. Eichmann, et al. (1998). "Alternative metabolic states in murine macrophages reflected by the nitric oxide synthase/arginase balance: competitive regulation by CD4+ T cells correlates with Th1/Th2 phenotype." J Immunol 160(11): 5347-54.
- Munder, M., M. Mallo, et al. (1998). "Murine macrophages secrete interferon gamma upon combined stimulation with interleukin (IL)-12 and IL-18: A novel pathway of autocrine macrophage activation." J Exp Med 187(12): 2103-8.
- Murata, T., P. D. Noguchi, et al. (1996). "IL-13 induces phosphorylation and activation of JAK2 Janus kinase in human colon carcinoma cell lines: similarities between IL-4 and IL-13 signaling." J Immunol 156(8): 2972-8.
- Murata, T., J. Taguchi, et al. (1998). "Interleukin-13 receptor alpha' but not alpha chain: a functional component of interleukin-4 receptors." Blood 91(10): 3884-91.
- Murphy, L. O., J. P. MacKeigan, et al. (2004). "A network of immediate early gene products propagates subtle differences in mitogen-activated protein kinase signal amplitude and duration." Mol Cell Biol 24(1): 144-53.
- Murphy, L. O., S. Smith, et al. (2002). "Molecular interpretation of ERK signal duration by immediate early gene products." Nat Cell Biol 4(8): 556-64.
- Myatt, S. S. and E. W. Lam (2007). "Promiscuous and lineage-specific roles of cell cycle regulators in haematopoiesis." Cell Div 2: 6.
- Nagata, Y., N. Takahashi, et al. (1998). "Activation of p38 MAP kinase and JNK but not ERK is required for erythropoietin-induced erythroid differentiation." Blood 92(6): 1859-69.
- Nair, J. S., C. J. DaFonseca, et al. (2002). "Requirement of Ca²⁺ and CaMKII for Stat1 Ser-727 phosphorylation in response to IFN-gamma." Proc Natl Acad Sci U S A 99(9): 5971-6.
- Nelms, K., A. D. Keegan, et al. (1999). "The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions." Annu Rev Immunol 17: 701-38.
- Nguyen, H., D. M. Gitig, et al. (1999). "Cell-free degradation of p27(kip1), a G1 cyclin-dependent kinase inhibitor, is dependent on CDK2 activity and the proteasome." Mol Cell Biol 19(2): 1190-201.
- Nimer, S., J. Zhang, et al. (1996). "Transcriptional regulation of interleukin-3 expression in megakaryocytes." Blood 88(1): 66-74.

- Nishida, K., O. Yamaguchi, et al. (2004). "p38alpha mitogen-activated protein kinase plays a critical role in cardiomyocyte survival but not in cardiac hypertrophic growth in response to pressure overload." Mol Cell Biol 24(24): 10611-20.
- Noben-Trauth, N., L. D. Shultz, et al. (1997). "An interleukin 4 (IL-4)-independent pathway for CD4+ T cell IL-4 production is revealed in IL-4 receptor-deficient mice." Proc Natl Acad Sci U S A 94(20): 10838-43.
- Noelle, R., P. H. Krammer, et al. (1984). "Increased expression of Ia antigens on resting B cells: an additional role for B-cell growth factor." Proc Natl Acad Sci U S A 81(19): 6149-53.
- Noguchi, T., S. Takeno, et al. (1999). "Clinicopathological and immunohistochemical study of cancer arising from Barrett's esophagus." Oncol Rep 6(6): 1293-7.
- Nyunoya, T., M. M. Monick, et al. (2005). "Macrophages survive hyperoxia via prolonged ERK activation due to phosphatase down-regulation." J Biol Chem 280(28): 26295-302.
- O'Garra, A., L. Steinman, et al. (1997). "CD4+ T-cell subsets in autoimmunity." Curr Opin Immunol 9(6): 872-83.
- Obiri, N. I., W. Debinski, et al. (1995). "Receptor for interleukin 13. Interaction with interleukin 4 by a mechanism that does not involve the common gamma chain shared by receptors for interleukins 2, 4, 7, 9, and 15." J Biol Chem 270(15): 8797-804.
- Obiri, N. I., G. G. Hillman, et al. (1993). "Expression of high affinity interleukin-4 receptors on human renal cell carcinoma cells and inhibition of tumor cell growth in vitro by interleukin-4." J Clin Invest 91(1): 88-93.
- Ogawa, M. (1993). "Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells." Blood 81(11): 2844-53.
- Ohara, J. and W. E. Paul (1988). "Up-regulation of interleukin 4/B-cell stimulatory factor 1 receptor expression." Proc Natl Acad Sci U S A 85(21): 8221-5.
- Ohmori, Y. and T. A. Hamilton (1997). "IL-4-induced STAT6 suppresses IFN-gamma-stimulated STAT1-dependent transcription in mouse macrophages." J Immunol 159(11): 5474-82.
- Pagano, M., S. W. Tam, et al. (1995). "Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27." Science 269(5224): 682-5.
- Papin, C., A. Eychene, et al. (1995). "B-Raf protein isoforms interact with and phosphorylate Mek-1 on serine residues 218 and 222." Oncogene 10(8): 1647-51.
- Pardee, A. B. (1989). "G1 events and regulation of cell proliferation." Science 246(4930): 603-8.
- Park, K. S., Y. Ahn, et al. (2002). "Extracellular zinc stimulates ERK-dependent activation of p21(Cip/WAF1) and inhibits proliferation of colorectal cancer cells." Br J Pharmacol 137(5): 597-607.
- Park, K. S., N. G. Lee, et al. (2003). "The ERK pathway involves positive and negative regulations of HT-29 colorectal cancer cell growth by

- extracellular zinc." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 285(6): G1181-8.
- Pavletich, N. P. (1999). "Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors." J Mol Biol 287(5): 821-8.
- Payne, D. M., A. J. Rossomando, et al. (1991). "Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase)." Embo J 10(4): 885-92.
- Payton, M. and S. Coats (2002). "Cyclin E2, the cycle continues." Int J Biochem Cell Biol 34(4): 315-20.
- Penna, G., M. Vulcano, et al. (2002). "Cutting edge: differential chemokine production by myeloid and plasmacytoid dendritic cells." J Immunol 169(12): 6673-6.
- Pestka, S., C. D. Krause, et al. (2004). "Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors." Immunol Rev 202: 8-32.
- Pesu, M., K. Takaluoma, et al. (2000). "Interleukin-4-induced transcriptional activation by stat6 involves multiple serine/threonine kinase pathways and serine phosphorylation of stat6." Blood 95(2): 494-502.
- Peter, M. (1997). "The regulation of cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs)." Prog Cell Cycle Res 3: 99-108.
- Pixley, F. J. and E. R. Stanley (2004). "CSF-1 regulation of the wandering macrophage: complexity in action." Trends Cell Biol 14(11): 628-38.
- Platanias, L. C. (2003). "The p38 mitogen-activated protein kinase pathway and its role in interferon signaling." Pharmacol Ther 98(2): 129-42.
- Platanias, L. C. and E. N. Fish (1999). "Signaling pathways activated by interferons." Exp Hematol 27(11): 1583-92.
- Poizat, C., P. L. Puri, et al. (2005). "Phosphorylation-dependent degradation of p300 by doxorubicin-activated p38 mitogen-activated protein kinase in cardiac cells." Mol Cell Biol 25(7): 2673-87.
- Polanowska-Grabowska, R. and A. R. Gear (2000). "Heat-shock proteins and platelet function." Platelets 11(1): 6-22.
- Polyak, K., J. Y. Kato, et al. (1994). "p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest." Genes Dev 8(1): 9-22.
- Polyak, K., M. H. Lee, et al. (1994). "Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals." Cell 78(1): 59-66.
- Posada, J. and J. A. Cooper (1992). "Requirements for phosphorylation of MAP kinase during meiosis in *Xenopus* oocytes." Science 255(5041): 212-5.
- Pouyssegur, J., V. Volmat, et al. (2002). "Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signalling." Biochem Pharmacol 64(5-6): 755-63.
- Puddu, P., L. Fantuzzi, et al. (1997). "IL-12 induces IFN-gamma expression and secretion in mouse peritoneal macrophages." J Immunol 159(7): 3490-7.
- Pugazhenthhi, S., E. Miller, et al. (1999). "Insulin-like growth factor-I induces bcl-2 promoter through the transcription factor cAMP-response element-binding protein." J Biol Chem 274(39): 27529-35.

- Qui, M. S. and S. H. Green (1992). "PC12 cell neuronal differentiation is associated with prolonged p21ras activity and consequent prolonged ERK activity." Neuron 9(4): 705-17.
- Racke, F. K., K. Lewandowska, et al. (1997). "Sustained activation of the extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase pathway is required for megakaryocytic differentiation of K562 cells." J Biol Chem 272(37): 23366-70.
- Radi, R., J. S. Beckman, et al. (1991). "Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide." J Biol Chem 266(7): 4244-50.
- Ramana, C. V., N. Grammatikakis, et al. (2000). "Regulation of c-myc expression by IFN-gamma through Stat1-dependent and -independent pathways." Embo J 19(2): 263-72.
- Rank, K. B., D. B. Evans, et al. (2000). "The N-terminal domains of cyclin-dependent kinase inhibitory proteins block the phosphorylation of cdk2/Cyclin E by the CDK-activating kinase." Biochem Biophys Res Commun 271(2): 469-73.
- Reilly, J. T. (2002). "Class III receptor tyrosine kinases: role in leukaemogenesis." Br J Haematol 116(4): 744-57.
- Reimann, T., D. Buscher, et al. (1994). "Lipopolysaccharide induces activation of the Raf-1/MAP kinase pathway. A putative role for Raf-1 in the induction of the IL-1 beta and the TNF-alpha genes." J Immunol 153(12): 5740-9.
- Rhee, S. G. and Y. S. Bae (1997). "Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes." J Biol Chem 272(24): 15045-8.
- Robbins, D. J., E. Zhen, et al. (1993). "Regulation and properties of extracellular signal-regulated protein kinases 1, 2, and 3." J Am Soc Nephrol 4(5): 1104-10.
- Roberts, J. M. and C. J. Sherr (2003). "Bared essentials of CDK2 and cyclin E." Nat Genet 35(1): 9-10.
- Robinson, C. J., C. M. Sloss, et al. (2001). "Inactivation of JNK activity by mitogen-activated protein kinase phosphatase-2 in EAhy926 endothelial cells is dependent upon agonist-specific JNK translocation to the nucleus." Cell Signal 13(1): 29-41.
- Rock, C. O., J. L. Cleveland, et al. (1992). "Macrophage growth arrest by cyclic AMP defines a distinct checkpoint in the mid-G1 stage of the cell cycle and overrides constitutive c-myc expression." Mol Cell Biol 12(5): 2351-8.
- Ross, S., A. Tienhaara, et al. (2002). "GC box-binding transcription factors control the neuronal specific transcription of the cyclin-dependent kinase 5 regulator p35." J Biol Chem 277(6): 4455-64.
- Rossig, L., A. S. Jadidi, et al. (2001). "Akt-dependent phosphorylation of p21(Cip1) regulates PCNA binding and proliferation of endothelial cells." Mol Cell Biol 21(16): 5644-57.
- Roussel, M. F. (1999). "The INK4 family of cell cycle inhibitors in cancer." Oncogene 18(38): 5311-7.

- Rueda, D., B. Navarro, et al. (2002). "The endocannabinoid anandamide inhibits neuronal progenitor cell differentiation through attenuation of the Rap1/B-Raf/ERK pathway." J Biol Chem 277(48): 46645-50.
- Russell, S. M., A. D. Keegan, et al. (1993). "Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-4 receptor." Science 262(5141): 1880-3.
- Sabapathy, K., Y. Hu, et al. (1999). "JNK2 is required for efficient T-cell activation and apoptosis but not for normal lymphocyte development." Curr Biol 9(3): 116-25.
- Sakatsume, M., K. Igarashi, et al. (1995). "The Jak kinases differentially associate with the alpha and beta (accessory factor) chains of the interferon gamma receptor to form a functional receptor unit capable of activating STAT transcription factors." J Biol Chem 270(29): 17528-34.
- Sanchez-Tillo, E., M. Comalada, et al. (2006). "Macrophage-colony-stimulating factor-induced proliferation and lipopolysaccharide-dependent activation of macrophages requires raf-1 phosphorylation to induce mitogen kinase phosphatase-1 expression." J Immunol 176(11): 6594-602.
- Sanchez-Tillo, E., M. Comalada, et al. (2007). "JNK1 is required for the induction of Mkp1 expression in macrophages during proliferation and lipopolysaccharide-dependent activation." J Biol Chem 282(17): 12566-73.
- Sanchez-Tillo, E., M. Wojciechowska, et al. (2006). "Cyclophilin A is required for M-CSF-dependent macrophage proliferation." Eur J Immunol 36(9): 2515-24.
- Sanchez, I. and B. D. Dynlacht (2005). "New insights into cyclins, CDKs, and cell cycle control." Semin Cell Dev Biol 16(3): 311-21.
- Sanchez, I., R. T. Hughes, et al. (1994). "Role of SAPK/ERK kinase-1 in the stress-activated pathway regulating transcription factor c-Jun." Nature 372(6508): 794-8.
- Sandhu, C., J. Garbe, et al. (1997). "Transforming growth factor beta stabilizes p15INK4B protein, increases p15INK4B-cdk4 complexes, and inhibits cyclin D1-cdk4 association in human mammary epithelial cells." Mol Cell Biol 17(5): 2458-67.
- Sangfelt, O., S. Einhorn, et al. (1996). "Wild-type p53-induced apoptosis in a Burkitt lymphoma cell line is inhibited by interferon gamma." Int J Cancer 67(1): 106-12.
- Santamaria, D. and S. Ortega (2006). "Cyclins and CDKS in development and cancer: lessons from genetically modified mice." Front Biosci 11: 1164-88.
- Scimeca, J. C., M. J. Servant, et al. (1997). "Essential role of calcium in the regulation of MAP kinase phosphatase-1 expression." Oncogene 15(6): 717-25.
- Scharenberg, A. M. and J. P. Kinet (1996). "The emerging field of receptor-mediated inhibitory signaling: SHP or SHIP?" Cell 87(6): 961-4.

- Schmidt-Weber, C. B., A. Rao, et al. (2000). "Integration of TCR and IL-4 signals through STAT6 and the regulation of IL-4 gene expression." Mol Immunol 37(12-13): 767-74.
- Schmitz, M. L., S. Bacher, et al. (2001). "I kappa B-independent control of NF-kappa B activity by modulatory phosphorylations." Trends Biochem Sci 26(3): 186-90.
- Schreck, R., P. Rieber, et al. (1991). "Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1." Embo J 10(8): 2247-58.
- Schwartz, C., K. Beck, et al. (2003). "Recruitment of p300 by C/EBPbeta triggers phosphorylation of p300 and modulates coactivator activity." Embo J 22(4): 882-92.
- Sebolt-Leopold, J. S. (2004). "MEK inhibitors: a therapeutic approach to targeting the Ras-MAP kinase pathway in tumors." Curr Pharm Des 10(16): 1907-14.
- Seder, R. A. and W. E. Paul (1994). "Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells." Annu Rev Immunol 12: 635-73.
- Seger, R. and E. G. Krebs (1995). "The MAPK signaling cascade." Faseb J 9(9): 726-35.
- Seth, A., F. A. Gonzalez, et al. (1992). "Signal transduction within the nucleus by mitogen-activated protein kinase." J Biol Chem 267(34): 24796-804.
- Sevilla, L., C. Aperlo, et al. (1999). "The Ets2 transcription factor inhibits apoptosis induced by colony-stimulating factor 1 deprivation of macrophages through a Bcl-xL-dependent mechanism." Mol Cell Biol 19(4): 2624-34.
- Sewing, A., B. Wiseman, et al. (1997). "High-intensity Raf signal causes cell cycle arrest mediated by p21Cip1." Mol Cell Biol 17(9): 5588-97.
- Shankaranarayanan, P., P. Chaitidis, et al. (2001). "Acetylation by histone acetyltransferase CREB-binding protein/p300 of STAT6 is required for transcriptional activation of the 15-lipoxygenase-1 gene." J Biol Chem 276(46): 42753-60.
- Shaulian, E. and M. Karin (2001). "AP-1 in cell proliferation and survival." Oncogene 20(19): 2390-400.
- Sherr, C. J. (1996). "Cancer cell cycles." Science 274(5293): 1672-7.
- Sherr, C. J. and J. M. Roberts (1995). "Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases." Genes Dev 9(10): 1149-63.
- Sherr, C. J. and J. M. Roberts (1999). "CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression." Genes Dev 13(12): 1501-12.
- Sherr, C. J. and J. M. Roberts (2004). "Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases." Genes Dev 18(22): 2699-711.
- Shi, Y. and M. Gaestel (2002). "In the cellular garden of forking paths: how p38 MAPKs signal for downstream assistance." Biol Chem 383(10): 1519-36.
- Shimoda, K., J. van Deursen, et al. (1996). "Lack of IL-4-induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted Stat6 gene." Nature 380(6575): 630-3.

- Shin, I., F. M. Yakes, et al. (2002). "PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27(Kip1) at threonine 157 and modulation of its cellular localization." Nat Med 8(10): 1145-52.
- Shirako, E., N. Hirayama, et al. (2007). "Up-regulation of p21(CIP1) expression mediated by ERK-dependent and -independent pathways contributes to hepatocyte growth factor-induced inhibition of HepG2 hepatoma cell proliferation." J Cell Biochem.
- Shuai, K., A. Ziemiecki, et al. (1993). "Polypeptide signalling to the nucleus through tyrosine phosphorylation of Jak and Stat proteins." Nature 366(6455): 580-3.
- Siegel, R. M. (2006). "Caspases at the crossroads of immune-cell life and death." Nat Rev Immunol 6(4): 308-17.
- Silvennoinen, O., P. Saharinen, et al. (1997). "Cytokine receptor signal transduction through Jak tyrosine kinases and Stat transcription factors." Apmis 105(7): 497-509.
- Smerz-Bertling, C. and A. Duschl (1995). "Both interleukin 4 and interleukin 13 induce tyrosine phosphorylation of the 140-kDa subunit of the interleukin 4 receptor." J Biol Chem 270(2): 966-70.
- Smith, S. J., P. S. Fenwick, et al. (2006). "Inhibitory effect of p38 mitogen-activated protein kinase inhibitors on cytokine release from human macrophages." Br J Pharmacol 149(4): 393-404.
- Snapper, C. M., P. V. Hornbeck, et al. (1988). "Interleukin 4 induces membrane Thy-1 expression on normal murine B cells." Proc Natl Acad Sci U S A 85(16): 6107-11.
- Snedecor, G. and W. Cochran (1967). Statistical methods, Iowa State University Press, Ames, Iowa.
- So, E. Y., J. Oh, et al. (2007). "Ras/Erk pathway positively regulates Jak1/STAT6 activity and IL-4 gene expression in Jurkat T cells." Mol Immunol 44(13): 3416-26.
- Southan, G. J., C. Szabo, et al. (1994). "Inhibition of the induction of nitric oxide synthase by spermine is modulated by aldehyde dehydrogenase." Biochem Biophys Res Commun 203(3): 1638-44.
- Stanley, E. R., K. L. Berg, et al. (1997). "Biology and action of colony-stimulating factor-1." Mol Reprod Dev 46(1): 4-10.
- Starr, R., T. A. Willson, et al. (1997). "A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling." Nature 387(6636): 917-21.
- Stein, J. and C. W. Rettenmier (1991). "Proteolytic processing of a plasma membrane-bound precursor to human macrophage colony-stimulating factor (CSF-1) is accelerated by phorbol ester." Oncogene 6(4): 601-5.
- Stein, M., S. Keshav, et al. (1992). "Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation." J Exp Med 176(1): 287-92.
- Stout, R. D. and J. Suttles (2004). "Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments." J Leukoc Biol 76(3): 509-13.
- Sun, D. and A. Ding (2006). "MyD88-mediated stabilization of interferon-gamma-induced cytokine and chemokine mRNA." Nat Immunol 7(4): 375-81.

- Sun, X. J., P. Rothenberg, et al. (1991). "Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein." Nature 352(6330): 73-7.
- Sun, X. J., L. M. Wang, et al. (1995). "Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling." Nature 377(6545): 173-7.
- Suzu, S., M. Hiyoshi, et al. (2007). "M-CSF-mediated macrophage differentiation but not proliferation is correlated with increased and prolonged ERK activation." J Cell Physiol 212(2): 519-25.
- Suzu, S. and K. Motoyoshi (2002). "Signal transduction in macrophages: negative regulation for macrophage colony-stimulating factor receptor signaling." Int J Hematol 76(1): 1-5.
- Suzuki, A., Y. Tsutomi, et al. (1999). "Mitochondrial regulation of cell death: mitochondria are essential for procaspase 3-p21 complex formation to resist Fas-mediated cell death." Mol Cell Biol 19(5): 3842-7.
- Sze, K. L., W. Y. Lui, et al. (2007). "Post-transcriptional regulation of CLMP mRNA is controlled by tristetraprolin in response to TNFalpha via c-Jun N-terminal kinase signaling." Biochem J.
- Takeda, K., T. Tanaka, et al. (1996). "Essential role of Stat6 in IL-4 signalling." Nature 380(6575): 627-30.
- Tamir, A., J. Howard, et al. (1999). "Fli-1, an Ets-related transcription factor, regulates erythropoietin-induced erythroid proliferation and differentiation: evidence for direct transcriptional repression of the Rb gene during differentiation." Mol Cell Biol 19(6): 4452-64.
- Tanaka, N., M. Ishihara, et al. (1996). "Cooperation of the tumour suppressors IRF-1 and p53 in response to DNA damage." Nature 382(6594): 816-8.
- Tanoue, T., T. Moriguchi, et al. (1999). "Molecular cloning and characterization of a novel dual specificity phosphatase, MKP-5." J Biol Chem 274(28): 19949-56.
- Tanoue, T., T. Yamamoto, et al. (2001). "A Novel MAPK phosphatase MKP-7 acts preferentially on JNK/SAPK and p38 alpha and beta MAPKs." J Biol Chem 276(28): 26629-39.
- te Poele, R. H., A. L. Okorokov, et al. (1999). "RNA synthesis block by 5, 6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole (DRB) triggers p53-dependent apoptosis in human colon carcinoma cells." Oncogene 18(42): 5765-72.
- Testa, J. R. and A. Bellacosa (2001). "AKT plays a central role in tumorigenesis." Proc Natl Acad Sci U S A 98(20): 10983-5.
- Theodosiou, A., A. Smith, et al. (1999). "MKP5, a new member of the MAP kinase phosphatase family, which selectively dephosphorylates stress-activated kinases." Oncogene 18(50): 6981-8.
- Thornhill, M. H., S. M. Wellicome, et al. (1991). "Tumor necrosis factor combines with IL-4 or IFN-gamma to selectively enhance endothelial cell adhesiveness for T cells. The contribution of vascular cell adhesion molecule-1-dependent and -independent binding mechanisms." J Immunol 146(2): 592-8.
- Toutou, R., J. Richardson, et al. (2001). "A degradation signal located in the C-terminus of p21WAF1/CIP1 is a binding site for the C8 alpha-subunit of the 20S proteasome." Embo J 20(10): 2367-75.

- Treisman, R. (1996). "Regulation of transcription by MAP kinase cascades." Curr Opin Cell Biol 8(2): 205-15.
- Trivedi, P. P., P. C. Roberts, et al. (2005). "NK cells inhibit T cell proliferation via p21-mediated cell cycle arrest." J Immunol 174(8): 4590-7.
- Turnbull, I. R. and M. Colonna (2007). "Activating and inhibitory functions of DAP12." Nat Rev Immunol 7(2): 155-61.
- Underhill, D. M. and H. S. Goodridge (2007). "The many faces of ITAMs." Trends Immunol 28(2): 66-73.
- Vaday, G. G., S. Franitza, et al. (2001). "Combinatorial signals by inflammatory cytokines and chemokines mediate leukocyte interactions with extracellular matrix." J Leukoc Biol 69(6): 885-92.
- Vadiveloo, P. K., G. Vairo, et al. (1996). "Differential regulation of cell cycle machinery by various antiproliferative agents is linked to macrophage arrest at distinct G1 checkpoints." Oncogene 13(3): 599-608.
- Vairo, G., P. K. Vadiveloo, et al. (1995). "Deregulated c-myc expression overrides IFN gamma-induced macrophage growth arrest." Oncogene 10(10): 1969-76.
- Valineva, T., J. Yang, et al. (2005). "The transcriptional co-activator protein p100 recruits histone acetyltransferase activity to STAT6 and mediates interaction between the CREB-binding protein and STAT6." J Biol Chem 280(15): 14989-96.
- Valledor, A. F., F. E. Borrás, et al. (1998). "Transcription factors that regulate monocyte/macrophage differentiation." J Leukoc Biol 63(4): 405-17.
- Valledor, A. F., M. Comalada, et al. (2000). "The differential time-course of extracellular-regulated kinase activity correlates with the macrophage response toward proliferation or activation." J Biol Chem 275(10): 7403-9.
- Valledor, A. F., E. Sanchez-Tillo, et al. (2008). "Selective Roles of MAPKs during the Macrophage Response to IFN- γ ." J Immunol 180(7): 4523-9.
- Valledor, A. F., E. Sánchez-Tilló, et al. (2008). "Selective roles of MAPKs during the macrophage response to IFN- γ ." Journal of Immunology.
- Valledor, A. F., J. Xaus, et al. (2000). "Protein kinase C epsilon is required for the induction of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in lipopolysaccharide-stimulated macrophages." J Immunol 164(1): 29-37.
- Valledor, A. F., J. Xaus, et al. (1999). "Macrophage colony-stimulating factor induces the expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 through a protein kinase C-dependent pathway." J Immunol 163(5): 2452-62.
- van Boxel-Dezaire, A. H., M. R. Rani, et al. (2006). "Complex modulation of cell type-specific signaling in response to type I interferons." Immunity 25(3): 361-72.
- van Dam, H. and M. Castellazzi (2001). "Distinct roles of Jun: Fos and Jun: ATF dimers in oncogenesis." Oncogene 20(19): 2453-64.
- Varinou, L., K. Ramsauer, et al. (2003). "Phosphorylation of the Stat1 transactivation domain is required for full-fledged IFN-gamma-dependent innate immunity." Immunity 19(6): 793-802.

- Venanzoni, M. C., L. R. Robinson, et al. (1996). "ETS1 and ETS2 in p53 regulation: spatial separation of ETS binding sites (EBS) modulate protein: DNA interaction." Oncogene 12(6): 1199-1204.
- Vivo, C., F. Levy, et al. (2001). "Control of cell cycle progression in human mesothelioma cells treated with gamma interferon." Oncogene 20(9): 1085-93.
- Wadewitz, A. G., M. A. Winer, et al. (1993). "Developmental and cell lineage specificity of raf family gene expression in mouse testis." Oncogene 8(4): 1055-62.
- Wang, H., C. Liu, et al. (2000). "The interferon- and differentiation-inducible p202a protein inhibits the transcriptional activity of c-Myc by blocking its association with Max." J Biol Chem 275(35): 27377-85.
- Wang, L., I. Tassiulas, et al. (2008). "'Tuning' of type I interferon-induced Jak-STAT1 signaling by calcium-dependent kinases in macrophages." Nat Immunol 9(2): 186-93.
- Wang, L. M., A. D. Keegan, et al. (1993). "Common elements in interleukin 4 and insulin signaling pathways in factor-dependent hematopoietic cells." Proc Natl Acad Sci U S A 90(9): 4032-6.
- Wang, X., X. Meng, et al. (2007). "Knockout of Mkp-1 enhances the host inflammatory responses to gram-positive bacteria." J Immunol 178(8): 5312-20.
- Wang, X. and T. J. Murphy (2000). "The inducible cAMP early repressor ICERIIgamma inhibits CREB and AP-1 transcription but not AT1 receptor gene expression in vascular smooth muscle cells." Mol Cell Biochem 212(1-2): 111-9.
- Wang, Y., M. G. Malabarba, et al. (2004). "Interleukin 4 regulates phosphorylation of serine 756 in the transactivation domain of Stat6. Roles for multiple phosphorylation sites and Stat6 function." J Biol Chem 279(24): 25196-203.
- Wang, Y., J. M. Schattenberg, et al. (2004). "Hepatocyte resistance to oxidative stress is dependent on protein kinase C-mediated down-regulation of c-Jun/AP-1." J Biol Chem 279(30): 31089-97.
- Wang, Z. E., G. M. Myles, et al. (1993). "Identification of the ligand-binding regions in the macrophage colony-stimulating factor receptor extracellular domain." Mol Cell Biol 13(9): 5348-59.
- Ward, Y., S. Gupta, et al. (1994). "Control of MAP kinase activation by the mitogen-induced threonine/tyrosine phosphatase PAC1." Nature 367(6464): 651-4.
- Waskiewicz, A. J. and J. A. Cooper (1995). "Mitogen and stress response pathways: MAP kinase cascades and phosphatase regulation in mammals and yeast." Curr Opin Cell Biol 7(6): 798-805.
- Wasylyk, B., S. L. Hahn, et al. (1993). "The Ets family of transcription factors." Eur J Biochem 211(1-2): 7-18.
- Watowich, S. S., H. Wu, et al. (1996). "Cytokine receptor signal transduction and the control of hematopoietic cell development." Annu Rev Cell Dev Biol 12: 91-128.

- Wei, L. H., A. T. Jacobs, et al. (2000). "IL-4 and IL-13 upregulate arginase I expression by cAMP and JAK/STAT6 pathways in vascular smooth muscle cells." Am J Physiol Cell Physiol 279(1): C248-56.
- Wen, Z., Z. Zhong, et al. (1995). "Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation." Cell 82(2): 241-50.
- Wery-Zennaro, S., J. L. Zugaza, et al. (2000). "IL-4 regulation of IL-6 production involves Rac/Cdc42- and p38 MAPK-dependent pathways in keratinocytes." Oncogene 19(12): 1596-604.
- Wick, K. R. and M. T. Berton (2000). "IL-4 induces serine phosphorylation of the STAT6 transactivation domain in B lymphocytes." Mol Immunol 37(11): 641-52.
- Wiktor-Jedrzejczak, W. and S. Gordon (1996). "Cytokine regulation of the macrophage (M phi) system studied using the colony stimulating factor-1-deficient op/op mouse." Physiol Rev 76(4): 927-47.
- Williams, G. T. and W. J. Williams (1983). "Granulomatous inflammation--a review." J Clin Pathol 36(7): 723-33.
- Wisdom, R., R. S. Johnson, et al. (1999). "c-Jun regulates cell cycle progression and apoptosis by distinct mechanisms." Embo J 18(1): 188-97.
- Woetmann, A., J. Brockdorff, et al. (2003). "Protein phosphatase 2A (PP2A) regulates interleukin-4-mediated STAT6 signaling." J Biol Chem 278(5): 2787-91.
- Wu, X., S. J. Noh, et al. (1996). "Selective activation of MEK1 but not MEK2 by A-Raf from epidermal growth factor-stimulated Hela cells." J Biol Chem 271(6): 3265-71.
- Wurster, A. L., V. L. Rodgers, et al. (2002). "Interleukin-4-mediated protection of primary B cells from apoptosis through Stat6-dependent up-regulation of Bcl-xL." J Biol Chem 277(30): 27169-75.
- Wymann, M. P. and L. Pirola (1998). "Structure and function of phosphoinositide 3-kinases." Biochim Biophys Acta 1436(1-2): 127-50.
- Xaus, J., N. Besalduch, et al. (2003). "High expression of p21 Waf1 in sarcoid granulomas: a putative role for long-lasting inflammation." J Leukoc Biol 74(2): 295-301.
- Xaus, J., M. Cardo, et al. (1999). "Interferon gamma induces the expression of p21waf-1 and arrests macrophage cell cycle, preventing induction of apoptosis." Immunity 11(1): 103-13.
- Xaus, J., M. Comalada, et al. (2001). "Decorin inhibits macrophage colony-stimulating factor proliferation of macrophages and enhances cell survival through induction of p27(Kip1) and p21(Waf1)." Blood 98(7): 2124-33.
- Xaus, J., M. Comalada, et al. (2001). "Molecular mechanisms involved in macrophage survival, proliferation, activation or apoptosis." Immunobiology 204(5): 543-50.
- Xaus, J., A. F. Valledor, et al. (1999). "Adenosine inhibits macrophage colony-stimulating factor-dependent proliferation of macrophages through the induction of p27kip-1 expression." J Immunol 163(8): 4140-9.

- Xu, S. Q. and W. S. El-Deiry (2000). "p21(WAF1/CIP1) inhibits initiator caspase cleavage by TRAIL death receptor DR4." Biochem Biophys Res Commun 269(1): 179-90.
- Yang, D., C. Tournier, et al. (1997). "Targeted disruption of the MKK4 gene causes embryonic death, inhibition of c-Jun NH2-terminal kinase activation, and defects in AP-1 transcriptional activity." Proc Natl Acad Sci U S A 94(7): 3004-9.
- Yang, J., S. Aittomaki, et al. (2002). "Identification of p100 as a coactivator for STAT6 that bridges STAT6 with RNA polymerase II." Embo J 21(18): 4950-8.
- Yang, R. B., M. R. Mark, et al. (1998). "Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling." Nature 395(6699): 284-8.
- Yang, W., Y. H. Hong, et al. (2001). "Regulation of transcription by AMP-activated protein kinase: phosphorylation of p300 blocks its interaction with nuclear receptors." J Biol Chem 276(42): 38341-4.
- Yao, Y., Q. Xu, et al. (2006). "ERK and p38 MAPK signaling pathways negatively regulate CIITA gene expression in dendritic cells and macrophages." J Immunol 177(1): 70-6.
- Yeatman, C. F., 2nd, S. M. Jacobs-Helber, et al. (2000). "Combined stimulation with the T helper cell type 2 cytokines interleukin (IL)-4 and IL-10 induces mouse mast cell apoptosis." J Exp Med 192(8): 1093-103.
- Yeramian, A., L. Martin, et al. (2006). "Macrophages require distinct arginine catabolism and transport systems for proliferation and for activation." Eur J Immunol 36(6): 1516-26.
- Yeramian, A., L. Martin, et al. (2006). "Arginine transport via cationic amino acid transporter 2 plays a critical regulatory role in classical or alternative activation of macrophages." J Immunol 176(10): 5918-24.
- Yoshida, A., Y. Koide, et al. (1994). "IFN-gamma induces IL-12 mRNA expression by a murine macrophage cell line, J774." Biochem Biophys Res Commun 198(3): 857-61.
- Yoshimoto, T. and W. E. Paul (1994). "CD4pos, NK1.1pos T cells promptly produce interleukin 4 in response to in vivo challenge with anti-CD3." J Exp Med 179(4): 1285-95.
- Yoshimoto, T., C. R. Wang, et al. (1998). "Reduced T helper 1 responses in IL-12 p40 transgenic mice." J Immunol 160(2): 588-94.
- Yu, S. J., H. S. Kim, et al. (2004). "IL-4 inhibits proliferation of renal carcinoma cells by increasing the expression of p21WAF1 and IRF-1." Exp Mol Med 36(4): 372-9.
- Yuan, L. W. and J. E. Gambée (2000). "Phosphorylation of p300 at serine 89 by protein kinase C." J Biol Chem 275(52): 40946-51.
- Zhang, H., G. J. Hannon, et al. (1994). "p21-containing cyclin kinases exist in both active and inactive states." Genes Dev 8(15): 1750-8.
- Zhang, P., E. L. Hogan, et al. (1998). "Activation of JNK/SAPK in primary glial cultures: II. Differential activation of kinase isoforms corresponds to their differential expression." Neurochem Res 23(2): 219-25.

- Zhang, X., J. Blenis, et al. (1995). "Requirement of serine phosphorylation for formation of STAT-promoter complexes." Science 267(5206): 1990-4.
- Zhao, Q., X. Wang, et al. (2006). "MAP kinase phosphatase 1 controls innate immune responses and suppresses endotoxic shock." J Exp Med 203(1): 131-40.
- Zhou, B. P., Y. Liao, et al. (2001). "HER-2/neu induces p53 ubiquitination via Akt-mediated MDM2 phosphorylation." Nat Cell Biol 3(11): 973-82.
- Zhu, L. and C. Anasetti (1995). "Cell cycle control of apoptosis in human leukemic T cells." J Immunol 154(1): 192-200.
- Zhu, Y. N., Y. F. Yang, et al. (2006). "Differential expression of inducible nitric oxide synthase and IL-12 between peritoneal and splenic macrophages stimulated with LPS plus IFN-gamma is associated with the activation of extracellular signal-related kinase." Int Immunol 18(6): 981-90.

