



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

TRANSDUCCION DE SEÑALES POR INTEGRINAS
EN MONOCITOS

T E S I S
PARA OBTENER EL TITULO DE:
**LICENCIATURA EN INVESTIGACION
BIOMEDICA BASICA**
P R E S E N T A :
GERARDO GONZALEZ NUÑEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. CARLOS ROSALES LEDEZMA

297789

MEXICO, D.F.

2000



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Quiero dedicar esta Tesis

a mí Mamá

por todo lo que hizo

y

por lo mucho que nos quiso

Quiero Agradecer

a mí

Papá

por su incondicional apoyo

Y

cariño.

A mí Hermano Alonso
por los increíbles momentos que hemos pasado.

A Marianita
por la gran felicidad que nos ha dado

A

Mí tía Raque

por el amor y el cariño de mamá que nos ha dado

Al Robert

por todo lo que ha hecho por nosotros

A

Mario Roberto

Y

Diego

A mis tías

Liz y Licha

por su apoyo

A

**Mí niña de los ojos bonitos
que tanto me apoyó y con quién he pasado unos
momentos maravillosos
Te quiero Ale.**

A mis

**amigos de toda la vida
Marquito, Osvi, Erika y Mirosh
por todo lo que hemos vivido juntos**

A

**Mis tías:
Tita, Luchis, Cristina, Vero, Gris y Lolo**

A

**Mis Primas
Nelly y Güeris**

Por todo su cariño.

Al

Dr. Carlos Rosales

por su infinita paciencia y por todo lo que me ha enseñado

**Quiero agradecer a Nancy Mora su amistad y apoyo técnico
en la realización de ésta tesis.**

**Quiero agradecer también el apoyo y amistad
de mis compañeros de laboratorio:**

Dra. Gaby

Merit

Héctor

Erick

Yuri

Yasmín

Índice

1. Sistema Inmune	3
2. Mecanismos Generales de Defensa	3
2.1 Respuesta Inmunológica	4
2.1.1 Respuesta Celular	4
2.1.2 Respuesta Humoral	5
2.1.3 Anticuerpos	6
3. Inflamación	7
4. Moléculas de Adhesión	9
4.1 Cadherinas	9
4.2 Moléculas de Adhesión de la Superfamilia de las Inmunoglobulinas	11
4.3 Selectinas	12
4.4 Receptores Integrinas	12
5. Interacción de los Leucocitos con las Células Endoteliales	14
6. Transducción de Señales	16
6.1 Vía de Transducción de Receptores Acoplados a Proteínas G	16
6.2 Vía de Transducción de Señales de Receptores Tirosina Cinasas (Vía Ras)	20
6.3 Vía de Transducción de Señales de Receptores de Citocinas (Vía Jak-Stat)	22

6.4 Vía de Transducción de Señales de Receptores para Hormonas Esteroides	22
6.5 Vía de Transducción de Señales de Receptores Integrinas	23
7.Objetivo	29
8.Materiales y Métodos	30
9.Resultados	40
10.Discusión	67
11.Conclusiones	76
12.Apéndice I	78
13. Bibliografía	79

1.-Sistema Inmune.

Todos los organismos están expuestos a agentes infecciosos (bacterias, virus, etc), partículas del ambiente (polen, polvo) y muchos otros más. Para poder enfrentar a todos estos agentes externos los vertebrados han desarrollado una serie de mecanismos para defenderse de ellos. Al conjunto de células y moléculas cuya función sea la de proteger al organismo se le denomina sistema de defensas. Estas defensas pueden ser naturales (innatas) y de respuesta general o bien pueden ser adquiridas y específicas (inmunológicas) (1-3).

2. Mecanismos Generales de Defensa

Existen dos mecanismos generales de defensa: el primero de ellos comprende a todos los elementos que se encuentran presentes en el organismo antes de la exposición al agente invasor. Entre ellos tenemos a las barreras físicas (mucosa, piel, vellosidades), las células fagocíticas, las células asesinas naturales, los eosinófilos y otras células de la sangre. Este mecanismo actúa como la primera línea de defensa y no es específica para un agente infeccioso en particular. El otro mecanismo se denomina inmunidad y a diferencia del primero sólo es activado después del reconocimiento específico de un agente extraño en particular. La inmunidad tiene como características su alta especificidad, memoria y el aumento en la capacidad de defensa con la exposición sucesiva al agente invasor (1-3).

La activación de este mecanismo se conoce como respuesta inmunológica, y es mediada por los linfocitos, que son los glóbulos blancos más pequeños de la sangre. Los linfocitos son células que se producen en la médula ósea y que migran a tejidos del sistema linfático como los ganglios linfáticos, el timo y el bazo (1, 2).

1.-Sistemama Inmune.

Todos los organismos están expuestos a agentes infecciosos (bacterias, virus, etc), partículas del ambiente (polen, polvo) y muchos otros más. Para poder enfrentar a todos estos agentes externos los vertebrados han desarrollado una serie de mecanismos para defenderse de ellos. Al conjunto de células y moléculas cuya función sea la de proteger al organismo se le denomina sistema de defensas. Estas defensas pueden ser naturales (innatas) y de respuesta general o bien pueden ser adquiridas y específicas (inmunológicas) (1-3).

2. Mecanismos Generales de Defensa

Existen dos mecanismos generales de defensa: el primero de ellos comprende a todos los elementos que se encuentran presentes en el organismo antes de la exposición al agente invasor. Entre ellos tenemos a las barreras físicas (mucosa, piel, vellosidades), las células fagocíticas, las células asesinas naturales, los eosinófilos y otras células de la sangre. Este mecanismo actúa como la primera línea de defensa y no es específica para un agente infeccioso en particular. El otro mecanismo se denomina inmunidad y a diferencia del primero sólo es activado después del reconocimiento específico de un agente extraño en particular. La inmunidad tiene como características su alta especificidad, memoria y el aumento en la capacidad de defensa con la exposición sucesiva al agente invasor (1-3).

La activación de este mecanismo se conoce como respuesta inmunológica, y es mediada por los linfocitos, que son los glóbulos blancos más pequeños de la sangre. Los linfocitos son células que se producen en la médula ósea y que migran a tejidos del sistema linfático como los ganglios linfáticos, el timo y el bazo (1, 2).

Los linfocitos se dividen en dos clases. Los linfocitos T que maduran en el timo y los linfocitos B que provienen de la médula ósea. Los linfocitos T, a su vez, existen de dos tipos: los ayudadores (CD4) y los citotóxicos (CD8). Los linfocitos ayudadores, que expresan la molécula CD4, producen una serie de sustancias (citocinas) importantes en la regulación de la respuesta inmunológica. Los linfocitos citotóxicos, que expresan la molécula CD8, son responsables de eliminar a otras células. Los linfocitos B son por su parte los productores de los anticuerpos (inmunoglobulinas) (1, 2).

2.1 Respuesta Inmunológica.

Se denomina antígeno a toda sustancia que puede ser reconocida por el sistema inmunológico (1, 2). La respuesta inmunológica se inicia con el reconocimiento del antígeno y termina con la eliminación de éste. La respuesta inmunológica puede ser de dos tipos: El primero es mediado por células, principalmente linfocitos T y macrófagos. Éste es por lo tanto denominado respuesta celular. El otro tipo es mediado por anticuerpos y por lo tanto es conocida como respuesta humoral (1-3).

2.1.1 Respuesta Celular.

La respuesta inmunológica mediada por células protege principalmente de virus y microorganismos intracelulares. Esta respuesta es mediada por los linfocitos T citotóxicos. Estos linfocitos contienen gránulos con sustancias que al ser liberadas forman poros en la membrana de otras células. La respuesta se inicia cuando células son infectadas por ejemplo con un virus. Los virus al utilizar la maquinaria celular sintetizan proteínas virales. Algunas de estas proteínas son

expuestas en la superficie de la célula infectada acopladas a una molécula del complejo principal de histocompatibilidad clase uno (MHC-I). Los linfocitos T citotóxicos reconocen al antígeno, acoplado a la molécula MHC-I, a través de su receptor específico de antígeno (TCR). Al darse el reconocimiento del antígeno, el linfocito T citotóxico se activa y libera los gránulos que lisan a la célula infectada.

2.1.2. Respuesta Humoral

La molécula de inmunoglobulina (anticuerpo) puede estar en la membrana del linfocito y funciona como su receptor específico de antígeno. La unión del antígeno al receptor de membrana del linfocito B es el evento inicial de la activación de estos linfocitos. El antígeno puede inducir al linfocito B a proliferar o bien puede inducirlo a responder a los linfocitos T. La inmunoglobulina de membrana acoplada al antígeno es internalizada. En el caso de tratarse de un antígeno proteico éste es procesado por el linfocito B como una célula presentadora (fagocitando los antígenos, procesándolos y exhibiéndolos en su superficie los péptidos acoplados a la molécula del complejo principal de histocompatibilidad clase dos (MHC II) para ser presentados a los linfocitos T). Los linfocitos T ayudadores reconocen a este antígeno acoplado al MHC clase II y se activan, secretando citocinas, las cuales inducen la proliferación y diferenciación de linfocitos B. Estas citocinas también inducen la síntesis y el tipo de anticuerpo que va a ser secretado. En el caso de que el antígeno no sea proteico no se requiere la presencia de linfocitos ayudadores, ya que los antígenos no proteicos por sí mismos son capaces de inducir la proliferación y diferenciación de los linfocitos B. Un ejemplo de este tipo de antígenos son los liposacáridos de origen bacteriano que constituyen el elemento al que responde el sistema inmune celular.

2.1.3 Anticuerpos (Inmunoglobulinas).

Los anticuerpos son moléculas protéicas que tienen la capacidad de reconocer a una amplia gama de antígenos. Cada molécula de anticuerpo reconoce a un sólo antígeno. Los anticuerpos son producidos por los linfocitos B y pueden estar en la membrana de estos, funcionando como receptores o pueden ser secretados (1-3).

Existen varias clases de anticuerpos, pero todos ellos presentan una estructura común que consta de dos polipéptidos grandes (aproximadamente 50 kDa), denominados cadenas pesadas y dos polipéptidos más pequeños (aproximadamente de 25 kDa) denominados cadenas ligeras. Ambas cadenas presentan regiones repetidas denominadas dominios de inmunoglobulinas. Los dominios de inmunoglobulinas están formados por unos 110 aminoácidos con estructura beta plegada con tres o cuatro hebras de cadenas antiparalelas.

Los anticuerpos constan de una parte de unión al antígeno denominada "Fab" y una parte denominada "Fc" (que significa: fracción que se puede cristalizar) responsable de la activación del complemento y de la asociación de los anticuerpos con los receptores para inmunoglobulinas en la membrana de los leucocitos (1, 2, 4).

Los anticuerpos tienen diversas funciones efectoras como: la neutralización del antígeno, activación del complemento, opsonización, fagocitosis, producción de inflamación y citotoxicidad dependiente de anticuerpos. La neutralización del antígeno se da por ejemplo cuando virus o algunas toxinas secretadas por microorganismos son cubiertos por anticuerpos. De esta forma los anticuerpos pueden obstruir la interacción del virus o la toxina con receptores celulares. El resultado es la inactivación de estos agentes dañinos. Las regiones Fc de las inmunoglobulinas son reconocidas por la proteína del sistema de complemento C1q. Esta

interacción dispara la activación de la cascada clásica del complemento, formándose un complejo de proteínas que produce poros en la membrana celular. Los anticuerpos también favorecen la fagocitosis mediante un fenómeno llamado opsinización. Este fenómeno consiste en la unión de anticuerpos a la partícula extraña, las células fagocíticas (neutrófilos, monocitos) presentan receptores de membrana que reconocen la porción Fc de las inmunoglobulinas. Después de que el receptor reconoce la porción Fc de la inmunoglobulina acoplada al antígeno, este es fagocitado y procesado. Algunos leucocitos como los linfocitos citotóxicos y las células NK son capaces de lisar a células específicas cubiertas por anticuerpos. A este proceso se le conoce como citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos.

3. Inflamación

La inflamación es un mecanismo de defensa inespecífico del organismo que consiste en el reclutamiento y activación de leucocitos durante procesos infecciosos o durante la reparación de tejidos. Esta respuesta se puede iniciar por la interacción de anticuerpos con su antígeno o por el reconocimiento de antígenos presentes en la superficie de microorganismos. Durante el proceso inflamatorio se da una relajación del músculo liso que controla el tono vascular con la consecuente vasodilatación y disminución de la presión a nivel local. Esto va acompañado de un aumento en el flujo sanguíneo en las regiones dañadas para llevar más oxígeno y glucosa, también aumenta la permeabilidad capilar. También se secretan sustancias como quimiocinas que atraen a los leucocitos, lo que permite que puedan atravesar el endotelio y llegar a los sitios afectados (1, 2, 5).

Durante la primera etapa del proceso inflamatorio se da el movimiento de líquido del

interacción dispara la activación de la cascada clásica del complemento, formándose un complejo de proteínas que produce poros en la membrana celular. Los anticuerpos también favorecen la fagocitosis mediante un fenómeno llamado opsinización. Este fenómeno consiste en la unión de anticuerpos a la partícula extraña, las células fagocíticas (neutrófilos, monocitos) presentan receptores de membrana que reconocen la porción Fc de las inmunoglobulinas. Después de que el receptor reconoce la porción Fc de la inmunoglobulina acoplada al antígeno, este es fagocitado y procesado. Algunos leucocitos como los linfocitos citotóxicos y las células NK son capaces de lisar a células específicas cubiertas por anticuerpos. A este proceso se le conoce como citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos.

3. Inflamación

La inflamación es un mecanismo de defensa inespecífico del organismo que consiste en el reclutamiento y activación de leucocitos durante procesos infecciosos o durante la reparación de tejidos. Esta respuesta se puede iniciar por la interacción de anticuerpos con su antígeno o por el reconocimiento de antígenos presentes en la superficie de microorganismos. Durante el proceso inflamatorio se da una relajación del músculo liso que controla el tono vascular con la consecuente vasodilatación y disminución de la presión a nivel local. Esto va acompañado de un aumento en el flujo sanguíneo en las regiones dañadas para llevar más oxígeno y glucosa, también aumenta la permeabilidad capilar. También se secretan sustancias como quimiocinas que atraen a los leucocitos, lo que permite que puedan atravesar el endotelio y llegar a los sitios afectados (1, 2, 5).

Durante la primera etapa del proceso inflamatorio se da el movimiento de líquido del

espacio intravascular al espacio extravascular. Esto es con el fin de diluir al agente extraño reduciendo así su concentración. Dentro de este líquido se encuentran diversos factores neutralizantes para agentes extraños como pueden ser: inhibidores de proteasas, anticuerpos y factores de coagulación. Esta acumulación de líquido rico en proteínas se llama edema. Posterior a la formación del edema, se da la infiltración de los leucocitos polimorfonucleares. Si persiste el estímulo inicial, la inflamación se convierte en crónica. En esta etapa la inflamación se caracteriza por la infiltración de linfocitos y macrófagos (5).

La inflamación está regulada principalmente por citocinas. Las citocinas son moléculas protéicas que regulan el crecimiento, diferenciación y activación de distintos tipos de células.

Entre las citocinas que participan en la activación y mantenimiento de la respuesta inflamatoria se encuentran el interferón gamma ($IFN\gamma$), el factor de necrosis tumoral alfa ($TNF\alpha$), la interleucina uno (IL-1) y la interleucina seis (IL-6)(1, 5).

Los leucocitos son atraídos a los sitios de inflamación mediante un fenómeno conocido como quimiotaxis, donde los leucocitos siguen gradientes de concentración de sustancias químicas (quimioatrayentes). Entre las principales quimioatrayentes se encuentran: péptidos derivados de bacterias (como el f-Met-Leu-Phe), metabolitos del ácido araquínico (como prostaglandinas y leucotrienos), el factor C5a del complemento y la interleucina 8(2).

En los sitios donde se desarrolla la inflamación, la dilatación vascular inicial y la salida del líquido juegan un papel muy importante ya que disminuyen la velocidad del flujo sanguíneo marginando así a los leucocitos. Posteriormente se da una interacción entre los leucocitos y las células del endotelio, provocando el rodamiento, detención y migración de los leucocitos fuera del torrente sanguíneo (diapedesis) (5, 6). Uno de los pasos críticos del proceso inflamatorio es la

salida de los leucocitos del torrente circulatorio para dirigirse a las venas postcapilares. Para esto los leucocitos comienzan a interactuar con las paredes de las venas rodando a lo largo del endotelio (5, 6). Durante esta fase los leucocitos presentan una forma esférica. El mecanismo mediante el cual los leucocitos reconocen el sitio de inflamación involucra un aumento en la adhesividad entre los leucocitos y el endotelio; y la participación de moléculas especializadas en la superficie de las células (1, 7). Las moléculas responsables del reconocimiento del sitio inflamado se llaman moléculas de adhesión.

4. Moléculas de Adhesión

Las moléculas de adhesión juegan un papel importante en el proceso inflamatorio, ya que son las responsables de mediar el reclutamiento y extravasación de leucocitos. Existen cuatro familias de moléculas de adhesión que son: las cadherinas, los receptores de la superfamilia de inmunoglobulinas, las integrinas y las selectinas (7, 8) (figura 1).

4.1 Cadherinas

Las cadherinas son moléculas de adhesión dependientes de calcio que intervienen en uniones célula - célula. Son glicoproteínas que atraviesan la membrana celular. En su porción extracelular constan de cinco regiones repetidas en tandem donde se encuentra los sitios de unión a calcio que la dan rigidez a la estructura de la cadherina. Poseen una porción transmembranal y también una cola citoplásmica a la que se unen proteínas intracelulares llamadas cateninas formando un complejo que se une al citoesqueleto (figura 1). Hay dos clases de cadherinas según su asociación con componentes del citoesqueleto. Las que se encuentran asociadas a actina en el

salida de los leucocitos del torrente circulatorio para dirigirse a las venas postcapilares. Para esto los leucocitos comienzan a interactuar con las paredes de las venas rodando a lo largo del endotelio (5, 6). Durante esta fase los leucocitos presentan una forma esférica. El mecanismo mediante el cual los leucocitos reconocen el sitio de inflamación involucra un aumento en la adhesividad entre los leucocitos y el endotelio; y la participación de moléculas especializadas en la superficie de las células (1, 7). Las moléculas responsables del reconocimiento del sitio inflamado se llaman moléculas de adhesión.

4. Moléculas de Adhesión

Las moléculas de adhesión juegan un papel importante en el proceso inflamatorio, ya que son las responsables de mediar el reclutamiento y extravasación de leucocitos. Existen cuatro familias de moléculas de adhesión que son: las cadherinas, los receptores de la superfamilia de inmunoglobulinas, las integrinas y las selectinas (7, 8) (figura 1).

4.1 Cadherinas

Las cadherinas son moléculas de adhesión dependientes de calcio que intervienen en uniones célula - célula. Son glicoproteínas que atraviesan la membrana celular. En su porción extracelular constan de cinco regiones repetidas en tandem donde se encuentra los sitios de unión a calcio que la dan rigidez a la estructura de la cadherina. Poseen una porción transmembranal y también una cola citoplásmica a la que se unen proteínas intracelulares llamadas cateninas formando un complejo que se une al citoesqueleto (figura 1). Hay dos clases de cadherinas según su asociación con componentes del citoesqueleto. Las que se encuentran asociadas a actina en el

citoesqueleto y las que se asocian a filamentos intermedios. Dentro de la primera clase se encuentran la E-cadherina, la N-cadherina, la P-cadherina, la R-cadherina y la B-cadherina(9, 10). En la segunda clase encontramos a la desmogleína y a las desmocollinas (10).

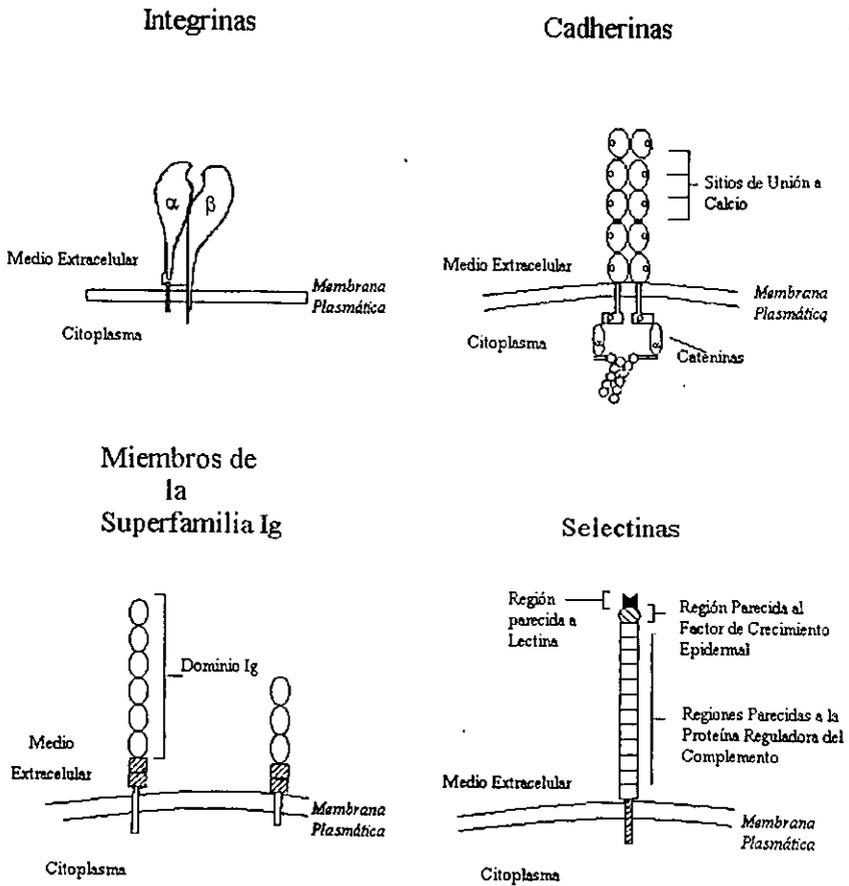


Figura 1. Familias de moléculas de adhesión. La Figura muestra la estructura general de cada tipo de molécula. Las moléculas no están dibujadas a escala

4.2 Moléculas de Adhesión de la Superfamilia de Inmunoglobulinas.

Estas moléculas se caracterizan por presentar una región amino - terminal extracelular, uno o más dominios de inmunoglobulina (Ig), un dominio transmembranal, y un dominio citoplásmico (figura 1). A diferencia de las cadherinas estas moléculas no requieren calcio para presentar rigidez. Muchas de las moléculas de esta superfamilia de inmunoglobulina están involucradas en adhesión y señalamiento en leucocitos (9, 10). Por ejemplo las moléculas CD2, CD4, CD8, TCR pertenecen a esta familia de receptores. Todas ellas se encuentran en linfocitos T. CD2 es una molécula de adhesión intercelular que se encuentra en linfocitos T maduros y también se le conoce como LFA-2. CD4 es una molécula accesoria que ayuda a la interacción de células T con células presentadoras y se presenta en linfocitos maduros que reconocen a las moléculas MHC clase II. CD4 también participa como una molécula de adhesión célula -célula y también es capaz de transducir señales. CD8 también se expresa en linfocitos citotóxicos maduros y permite la interacción de linfocitos T con células que expresan MHC clase I. CD8 también es capaz de transducir señales.

Otros miembros de la superfamilia de las Ig son la molécula intercelular de adhesión uno (ICAM-1), la molécula de intracelular de adhesión dos (ICAM-2), la molécula intercelular de adhesión 3 (ICAM-3), la molécula neuronal de adhesión celular (NCAM) y la molécula vascular de adhesión celular (VCAM).

4.3 Selectinas

Las selectinas son moléculas de adhesión que presentan en la parte más lejana de la membrana celular, una región de unión a carbohidratos parecida a lectinas. Ésta va seguida de una región parecida al factor de crecimiento epidermal. Después presentan varias regiones ricas en cisteínas parecidas a las de las proteínas reguladoras del complemento (figura 1). Las selectinas requieren calcio para el reconocimiento de polisacáridos acilados. Su principal función es la adherencia de los leucocitos a las células endoteliales durante la inflamación. Las selectinas reconocen principalmente a grupos de carbohidratos como al grupo sanguíneo de Lewis, el cuál es un grupo que pertenece a otro sistema diferente al clásico grupo sanguíneo ABO (9-11).

Pertenecen a esta familia la E-selectina, que se expresa en las células endoteliales en respuesta a citocinas. La P-selectina que se encuentra en plaquetas y células endoteliales, su expresión es regulada por histamina y trombina. La L-selectina que se encuentra en leucocitos y que es necesaria para la unión del leucocito al endotelio.

4.4 Integrinas

Las integrinas son moléculas de adhesión que se expresan en la superficie de la célula y que intervienen en la adhesión de la célula a la matriz extracelular y en la adhesión célula-célula. Estas moléculas participan en una gran variedad de procesos como: el desarrollo embrionario, el crecimiento, la inflamación, la activación de leucocitos, la metástasis de células tumorales y la apoptosis.(12, 13). Las integrinas son glicoproteínas formadas por dos cadenas (denominadas α y β) que se encuentran unidas de forma no covalente. Cada cadena tiene un dominio extracelular, un dominio transmembranal y una cola citoplásmica (figura 1). Se requieren de las dos cadenas

para la unión al ligando. Las regiones citoplásmicas participan en la unión al citoesqueleto. Existen más de quince cadenas α y más de ocho cadenas β , pero las cadenas β se pueden combinar con más de una cadena α . Estas diferentes combinaciones dan lugar a muchas integrinas y además son las que determinan la especificidad de unión al ligando. Una integrina puede reconocer a más de un ligando (10, 14). La mayor parte de los ligandos de las integrinas son proteínas de la matriz extracelular, sin embargo algunas de ellas reconocen contrareceptores expresados en la superficie de otras células.

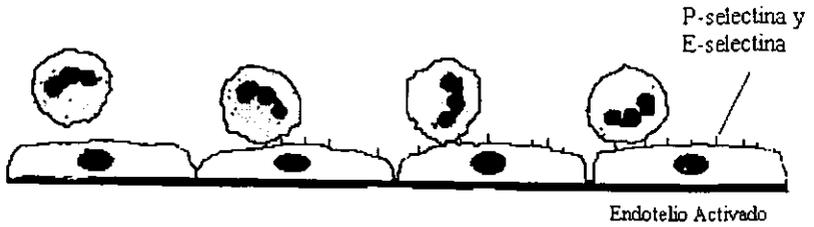
Además de las capacidades adhesivas de las integrinas, existen evidencias de que son capaces de transducir señales al interior de la célula (9, 11, 15) comportándose como receptores clásicos. Es decir al unirse a sus ligandos transmiten señales al interior de la célula generando diversas respuestas.

5. Interacción de los Leucocitos con las Células Endoteliales

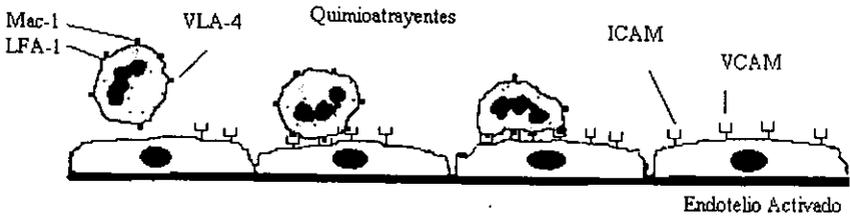
Las interacciones de los leucocitos con otras células se llevan a cabo mediante moléculas especializadas (receptores) que se expresan en la superficie de los leucocitos y que reconocen en forma específica a otras moléculas (ligandos) en la superficie de otras células. La unión rápida de los leucocitos al endotelio capilar es mediada por selectinas. La unión de los leucocitos al endotelio activado es mediado primero por las selectinas P y E(16). Estas moléculas son las que permiten el rodamiento de los leucocitos sobre el endotelio. Los leucocitos al exponerse a quimioatrayentes, se hacen adhesivos al endotelio a través de la activación de integrinas(9, 10, 16, 17). Las integrinas de la familia $\beta 2$ como Mac-1 y LFA-1 son las responsables de esta adhesión fuerte(18, 19). La adhesión fuerte de los leucocitos al endotelio es promovida también por la expresión en el endotelio de moléculas de la familia de las inmunoglobulinas, como por ejemplo ICAM-1; que es el ligando de las integrinas $\beta 2$. Este incremento en la adhesión origina que el leucocito se detenga e inmediatamente sufra cambios morfológicos pasando de una forma esférica a una forma extendida y aplanada. Después se da la extravasación mediante diapedesis hacia el sitio donde se encuentra el daño o la inflamación (figura 2).

1.- Rodamiento de leucocitos sobre el endotelio vascular mediado por selectinas

IL-1
TNF α
LPS



2.- Interacción de las Integrinas Mac-1 y LFA-1 con ICAM y VCAM



3.- Adhesión fuerte y migración al sitio inflamado

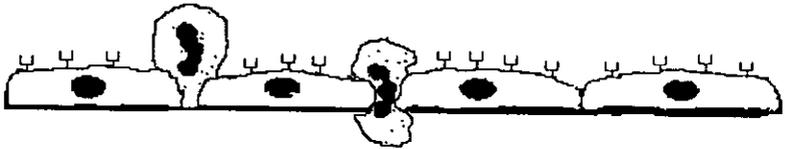


Figura 2. Interacciones moleculares durante la adhesión de leucocitos al endotelio (1). Agentes inflamatorios como interleucina uno (IL-1), factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) y liposacáridos (LPS) inducen la expresión de moléculas en el endotelio (P-selectina y E-selectina). Estas moléculas hacen rodar al leucocito sobre el endotelio (2). Los quimioatrayentes dirigen al leucocito al sitio inflamado y lo estimulan para que active a sus integrinas (Mac-1, LFA-1 y VLA-4). Estas integrinas interaccionan con moléculas de la superfamilia de las Ig (VCAM e ICAM) (3). Estas integrinas median la adhesión fuerte y ayudan en la diapedesis.

6. Transducción de Señales

Se llama transducción de señales a la serie de sucesos bioquímicos que retransmiten la señal desde el receptor en la membrana al interior de la célula, es decir la señal externa es convertida en una señal interna que alterará el comportamiento de la célula. Los cambios bioquímicos dentro de la célula son las vías de transducción de señales. Existen muchas vías de transducción de señales. Entre las principales se encuentran: las vías acopladas a proteínas G, la vía de receptores de cinasas de residuos de tirosina, la vía de transducción de señales mediada por integrinas. Las diferentes vías de transducción de señales pueden interactuar entre si produciendo efectos de sinergismo, antagonismo o potenciación.

6.1 Vía de Transducción de Señales de Receptores Acoplados a Proteínas G

Los receptores acoplados a proteínas G constituyen una de las familias más extensas de receptores de membrana. Los receptores acoplados a proteínas G regulan una gran variedad de respuestas según los diferentes ligandos que unen (hormonas protéicas, neurotransmisores, péptidos, aminoácidos, derivados de ácidos grasos, etc). Un mismo ligando puede activar a varios receptores de esta familia. Los receptores constan de una cadena polipeptídica que atraviesa siete veces la membrana celular, la cual se asocia a una proteína que une nucleótidos de guanina (y por lo tanto denominada proteína G). Algunas proteínas G a su vez se acoplan a canales iónicos o enzimas (20, 21). Las proteínas G presentan dos estados, un estado de activación cuando unen GTP y al hidrolizar el GTP pasan a un estado de desactivación dependiente de la unión con GDP. Las proteínas G están compuestas de tres cadenas polipeptídicas llamadas α , β , y γ . La cadena α es la que hidroliza el GTP e interactúa con enzimas o canales iónicos. Las cadenas β y γ forman

un dímero que mantiene a la proteína G en la cara citoplásmica de la membrana.

Una de las vías de transducción de señal mejor descritas para proteínas G es la que se encuentra asociada a la enzima adenilato ciclasa, donde la unión del ligando al receptor acoplado a proteína G provoca la activación de esta enzima. Cuando el receptor une a su ligando la subunidad α intercambia GDP por GTP y se disocia de las subunidades β y γ . La subunidad α se asocia con el dominio intracelular de la adenilato ciclasa y la activa directamente. La adenilato ciclasa comienza a producir AMP cíclico a partir de ATP. La hidrólisis de GTP a GDP por parte de la subunidad α lleva a la disociación de ésta subunidad de la adenilato ciclasa permitiendo así la reasociación de la subunidad α con las subunidades β y γ de la proteína G y consecuentemente la síntesis de AMP cíclico cesa. El AMP cíclico por su parte activa a otras cinasas como la proteína cinasa dependiente de AMP cíclico (PKA). PKA fosforila residuos de serina y treonina en otras proteínas (figura 3). Otra cinasa que es activada por AMP cíclico es la fosforilasa, que a su vez activa a la glucógeno fosforilasa. También la cinasa dependiente de calcio que fosforila a la glucógeno sintetasa es activada, la cuál lleva a cabo el último paso de la síntesis de la glucosa. Otra función del AMP cíclico es la de regular canales iónicos especiales en neuronas que responden al olfato.

Otras vías de señalización mediada por proteínas G son: las de la fosfolipasa A2 y la fosfolipasa C, las cuales son activadas por distintas proteínas G. En el caso de la fosfolipasa C, al ser activada por la proteína G, produce diacil glicerol (DAG) y también produce inositol trifosfato (IP₃). El inositol trifosfato es reconocido por receptores en el retículo endoplásmico y produce la liberación de calcio desde este compartimiento al citosol. El diacil glicerol activa a la proteína cinasa C (PKC), la cual se transloca a la membrana y fosforila a otras proteínas. La

proteína G que está acoplada a otros receptores activa a la fosfolipasa A2, induciendo la liberación de ácido araquidónico, que es metabolizado por enzimas como la cicloxigenasa y la lipoxigenasas para generar prostaglandinas y leucotrienos(20).

Una gran cantidad de hormonas y neurotransmisores utilizan vías de transducción de señales mediadas por proteínas G para regular procesos y funciones celulares. Un ejemplo son las hormonas epinefrina y norepinefrina, las cuáles son secretadas en situaciones de estrés, que permiten la liberación de glucosa y ácidos grasos necesarios para responder a estímulos como el miedo o el ejercicio excesivo. Estas hormonas interactúan con los receptores β -adrenérgicos.

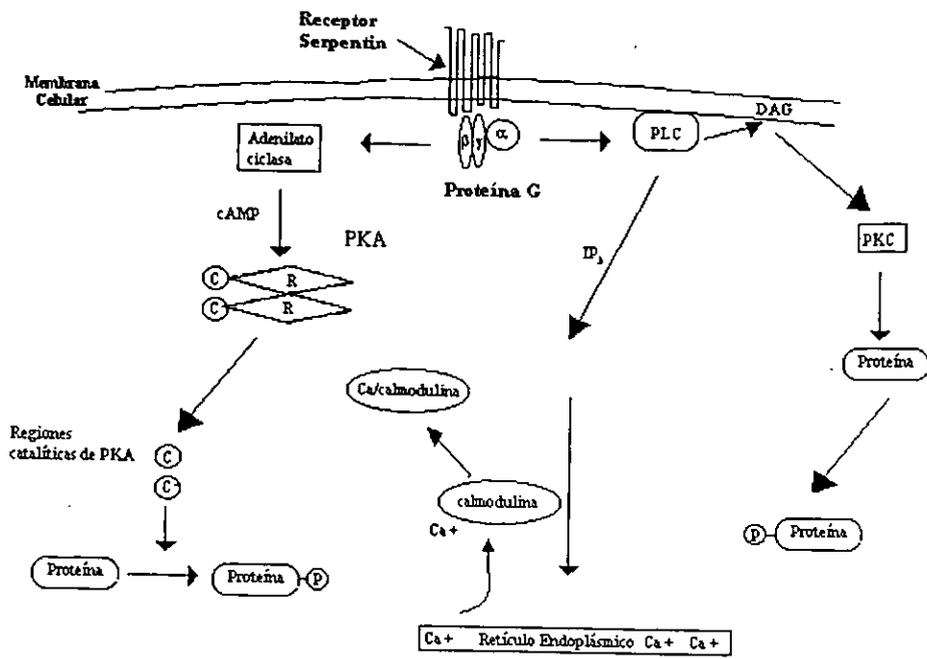


Figura 3. Vías de transducción de señales de receptores acoplados a proteínas G. La interacción del ligando con el receptor “serpentina” (o de 7 dominios transmembranales) acoplado a proteína G provoca la disociación de la subunidad α de β y γ , la subunidad α puede activar directamente a enzimas como la adenilato ciclasa, la cual produce AMP cíclico. El AMP cíclico puede activar a proteínas cinasas como PKA la cual fosforila a otras proteínas. Otra de las vías mediada por proteínas G consiste en la activación de la fosfolipasa C (PLC) y la subsecuente producción de diacil glicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP_3). El DAG activa a la proteína cinasa C (PKC), esta enzima fosforila a otras proteínas. El inositol trifosfato produce la liberación de calcio intracelular al ser reconocido por receptores en el retículo endoplásmico. El calcio se asocia a la calmodulina y este complejo activa a otras proteínas.

6. 2 Vía de Transducción de Señales de Receptores con Actividad de Cínasa de Residuos de Tirosinas (Vía de Ras)

Los receptores de muchos factores de crecimiento constan de una proteína que atraviesa la membrana y que tiene un dominio extracelular glicosilado y un dominio citoplásmico con actividad enzimática de cinasa de residuos de tirosina. Esto es que fosforilan a proteínas en residuos de tirosina. El receptor del factor de crecimiento epidermal (EGF) fue el primer receptor de esta clase que se describió (22). Factores de crecimiento con receptores de este tipo son: el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) y el del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), entre otros. Todos estos receptores se autofosforilan, cuando el ligando se une a ellos. El receptor se fosforila en residuos específicos de tirosina, los cuales se convierten en sitios de reconocimiento de proteínas intracelulares con dominios SH2 (del inglés Src homology domain) que sólo reconocen a la tirosina fosforilada(23). La proteína adaptadora Grb2 contiene dominios de unión SH2 y se une al receptor fosforilado. A este complejo molecular se une mSos1, que es una proteína activadora de la GTPasa Ras.(24, 25). Ras se activa entonces mediante el intercambio de GDP por GTP. A su vez Ras activado ejerce efecto sobre la cinasa de residuos de serinas y treoninas Raf-1(26). Raf-1 se activa y fosforila a la cinasa MEK. MEK a su vez fosforila y activa a la cinasa mitógeno activada (MAPK)(26-28). MAPK puede translocarse al núcleo y fosforilar a factores nucleares de transcripción entre ellos c-myc, AFT-2, Elk -1 y SAP-1(25-27, 29) Raf-1 puede también activar directamente al factor nuclear de transcripción NF- κ B (10) (figura 4).

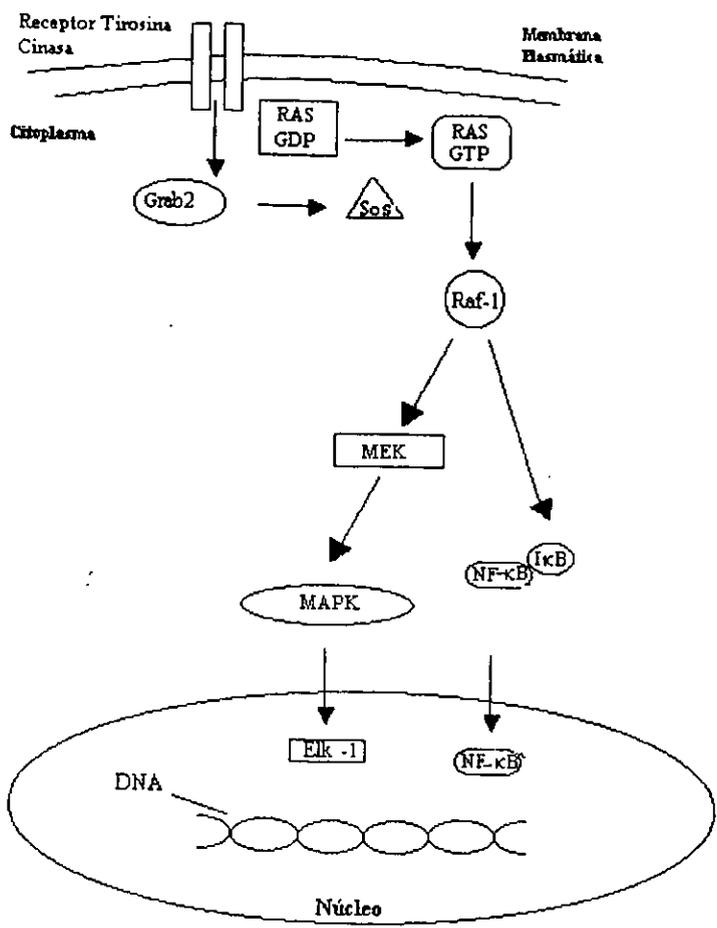


Figura 4. Via de transducción de señales de los receptores para factores de crecimiento. Al reconocer su ligando los receptores se autofosforilan y se da la unión de la proteína Grab2 a través de sus dominios SH2. Esto lleva a la activación de Ras, la cual se activa mediante el intercambio de GDP por GTP. La molécula Sos ayuda a este intercambio de nucleótidos. Ras activa entonces a la cinasa Raf-1 que a su vez es capaz de activar a MEK o directamente al factor nuclear NF-κB disociándolo de la proteína inhibidora IκB. Por su parte la cinasa MEK fosforila a MAPK. MAPK se transloca al núcleo y activa a varios factores nucleares, como Elk-1.

6.3 Vía de Transducción de Señales de Receptores de Citocinas (Vía Jak – STAT).

Esta vía de señalamiento es utilizada por los receptores de algunas citocinas, entre las que se encuentra el interferon γ . El receptor de interferon γ es un homodímero que consta de dos subunidades. Ambas subunidades están relacionadas con el tipo I de proteínas de receptor del interferon α y β .

Al ser agrupados los receptores, en el plano de la membrana celular, por la unión al interferon γ se activan cinasas de la familia Janus (como Jak-1 y Jak-2) que están unidas en la porción citoplásmica del receptor. Estas cinasas fosforilan residuos de tirosina en regiones de los receptores agrupados. Posteriormente, las proteínas STAT se unen a los residuos de tirosina fosforilados a través de sus regiones SH2. Luego las proteínas STAT son también fosforiladas por las cinasas Jak-1 que siguen unidas al receptor. Las proteínas STAT poseen mayor afinidad por los residuos fosforilados de otras proteínas STAT que a las de los residuos fosforilados del receptor, esto lleva a que se disocien del receptor y se dimericen. Esta disociación de las proteínas STAT permite la asociación de nuevas moléculas STAT al receptor fosforilado. Los dímeros formados por las proteínas STAT se unen a factores de transcripción como p48, el cual entra al núcleo y promueve la transcripción de genes (1, 30, 31).

6.4 Vías de Transducción de Señales de Receptores para Hormonas Esteroides

Todas las hormonas esteroides (tiroxina, ácido retinoico, aldosterona, etc) se sintetizan a partir del colesterol, por lo que les es muy fácil atravesar la membrana plasmática e interactúan con sus receptores localizados en el citoplasma. Al unirse el ligando (hormona) al receptor se forma un complejo, que migra al núcleo de la célula. Estos complejos pueden unirse a secuencias

reguladoras de DNA y así regulara la transcripción de genes. También pueden afectar la estabilidad de RNA mensajeros específicos(21).

Los receptores para hormonas esteroides constan de varias regiones diferentes(32). Contienen una región amino terminal variable, una región central rica en cisteínas que permite la unión de dedos de zinc (lo que sugiere que el dominio central es el encargado de unirse al DNA), una región carboxi terminal que realiza la translocación al núcleo y una región de aminoácidos responsables de la interacción con una proteína de estrés calórico. En cuanto a estructura y función los receptores de hormonas esteroides se pueden dividir en dos grupos: El primer grupo incluye al receptor de los glucocorticoides, progesterona, andrógenos y mineralocorticoides. El segundo grupo comprende a los receptores de estrógenos, hormona tiroidea, ácido retinóico y el de la vitamina D3(33).

6.5 Vía de Transducción de Señales de Receptores Integrinas

Diversos cambios bioquímicos en el interior de la célula se han observado después del entrecruzamiento de integrinas en varios tipos celulares. Entre estos tenemos: la activación de canales de protones (el antiporter Na^+/H^+), el aumento del pH intracelular(34), el aumento de el calcio intracelular(35), la modulación de los niveles de AMP cíclico (36) y la inducción de fosforilación de proteínas en tirosinas(37). Estos resultados sugieren que las integrinas no sólo están relacionadas con la adhesión a la matriz extracelular, si no que también tienen la capacidad de transmitir señales extracelulares y convertirlas en intracelulares (9, 12, 38). Entre los primeros eventos que ocurren al entrecruzar integrinas se encuentran la fosforilación de proteínas en residuos de tirosinas. Este fenómeno se observó al entrecruzar integrinas $\alpha\beta3$ en células de

carcinoma, donde se encontró fosforilación en residuos de tirosina en proteínas comprendidas en la región de 110 - 130 kDa(37, 39). Así mismo en fibroblastos NIH3T3 extendidos en fibronectina se encontró fosforilación en residuos de tirosina en la misma región(40, 41). Estos efectos son mediados por integrinas, ya que el uso de anticuerpos contra otras moléculas de superficie de la membrana, o por medio de adhesión a superficies de polilisina no producen esta fosforilación en residuos de tirosina. Posteriormente se encontró que la fosforilación que ocurre en la zona de 110 a 130 kDa se debe a una cinasa, la cual se denominó FAK por su concentración en los sitios de adhesión focal(40-43). La fosforilación de FAK en respuesta a la agrupación de integrinas y adhesión celular a proteínas de la matriz extracelular ha sido demostrada en varias líneas celulares, lo que sugiere que esta vía es empleada por diversas integrinas(40, 41, 44). El entrecruzamiento de integrinas causa la activación de la cinasa FAK. Esta cinasa se fosforila después de la agrupación de integrinas o de que la célula se adhiera(39). FAK es una cinasa de 125 kDa que se localiza en los sitios de unión entre la matriz extracelular y la célula conocidos como puntos de adhesión focal(41, 45). En estos sitios FAK colocaliza con proteínas como talina y tensina(44). Otra evidencia de la conexión entre integrinas y FAK es la unión de péptidos sintéticos basados en la región citoplásmica de la subunidad β y la región N- terminal de FAK(46). FAK también puede ser fosforilada a través de otras vías de diferentes receptores, como el de factores de crecimiento o de receptores acoplados a proteínas G. FAK es fosforilada en residuos de tirosina y serinas(47). FAK, al igual que los receptores con capacidad de cinasas de residuos de tirosina cinasas se autofosforila; esta autofosforilación es la reguladora de los eventos subsecuentes. La región de autofosforilación de FAK se parece a la región consenso de unión para las cinasas Src (48). De hecho Src se une a FAK en esta región después de su

autofosforilación inducida por integrinas en fibroblastos 3T3(49). Esta asociación es estable e independiente de suero y adhesión. La interacción de Scr con FAK autofosforilada resulta en la unión de Grb2 a FAK(50), lo cual ha sugerido que las integrinas activan la vía de Ras para llevar a la activación de MAPK. Sin embargo este hecho no se ha resuelto completamente todavía pues hay reportes que indican que MAPK puede ser activada por integrinas en forma independiente de Ras(10, 51, 52). FAK puede interactuar con una gran variedad de otras proteínas que contengan una región SH2 (que reconoce tirosinas fosforiladas) o una región SH3 (que reconoce regiones ricas en prolinas). Entre estos están la subunidad p85 α de la cinasa de fosfo inositol 3(53), la P130^{cas}, la paxilina y la GTPasa GRAF. Proteínas como P130^{cas}, paxilina y tensina también son fosforiladas a través de la adhesión mediada por interinas(41). Así mismo FAK no es la única cinasa de residuos de tirosina que se activa en respuesta a integrinas, algunas otras cinasas de tirosina que también pueden ser activadas por integrinas durante la inflamación y migración de monocitos son c-Abl (54) y Syk(29, 55). La adhesión celular mediada por integrinas en ausencia de factores de crecimiento es capaz de activar a la proteína cinasa mitógeno activada (MAPK) (figura 5)(51, 56). MAPK es una cinasa que interviene en muchas cascadas bioquímicas desencadenadas por otros tipos de receptores (ver sección 6.2). La activación de MAPK por integrinas ha sido confirmada mediante experimentos de adhesión no específica en soportes de polilisina, donde no hay activación de MAPK(51, 56). Se ha demostrado la activación de MAPK en células puestas sobre superficies con anticuerpos específicos a varias integrinas, pero no sobre anticuerpos contra otras moléculas de superficie, como las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) y la molécula CD44(51, 56). La activación de MAPK por integrinas ha sido demostrada en varios tipos celulares, entre ellos fibroblastos, células epiteliales,

tipos celulares, entre ellos fibroblastos, células epiteliales, keratinocitos y células endoteliales.

Tal como se indicó arriba hay evidencia de la activación de MAPK mediada por integrinas en forma independiente de la vía clásica de Ras(51, 52). Posibles mecanismos responsables de esta activación incluyen la activación de la proteína cinasa C (PKC) a través de segundos mensajeros como el diacil glicerol (DAG)(57), y la activación de la fosfolipasa A₂, la cual genera metabolitos de ácido araquínódico que activan a PKC(58). Otro posible mecanismo para la activación de Raf independiente de la vía Ras es la unión de la cinasa asociada a integrinas (ILK), que tiene la capacidad de asociarse a Raf e inducir la actividad de MAPK(59, 60).

En monocitos el entrecruzamiento de integrinas $\beta 1$ induce la expresión de genes de productos importantes en inflamación. Muchos de estos genes tempranos tienen regiones de unión al factor de transcripción NF- κ B en sus regiones reguladoras 5'(38). Además de factores nucleares, MAPK también tiene sustratos citoplásmicos como pp^{90rsk} (59), el cual se introduce al núcleo y contribuye a la regulación de la transcripción de genes. Otros sustratos posibles de MAPK parecen ser los microtúbulos(61). Existen reportes de que la fosfolipasa A₂ también puede ser un sustrato de MAPK(62).

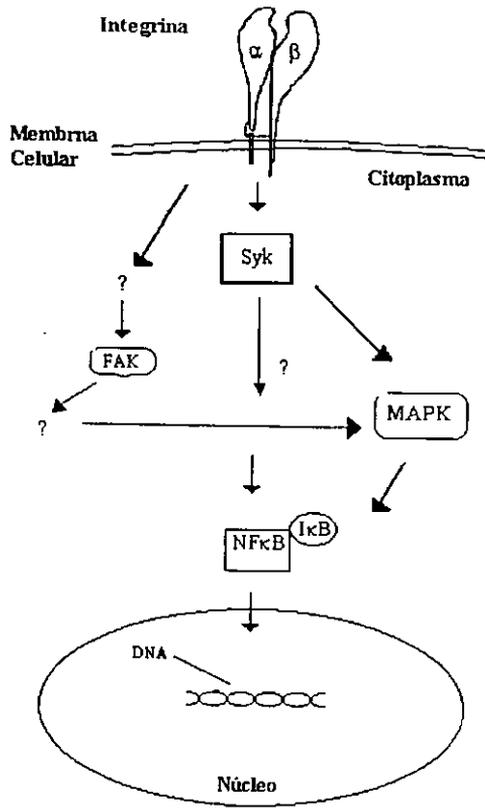


Figura 5. Vía de transducción de señales mediada por receptores de integrinas. El entrecruzamiento de integrinas produce la activación de la cinasa de tirosinas Syk la cual produce fosforilación de proteínas en residuos de tirosinas. Syk puede ser la responsable de la activación de la cinasa mitógeno activada (MAPK), así como la expresión de genes tempranos a través de la activación del factor nuclear $\text{NF}\kappa\text{B}$. Así mismo el entrecruzamiento de integrinas produce la activación de la cinasa de adhesión focal (FAK) la cual puede asociarse a componentes de la vía de Ras. Muchos de los pasos intermedios de la vía mediada por integrinas no se conocen (?).

Aunque la vía de señalización de receptores integrinas comparte algunos elementos de la vía de señalización de receptores de factores de crecimiento muchos de los componentes de la vía de integrinas no han sido descritos y la vía permanece aun sin ser bien dilucidada (figura 5). Existen evidencias de la participación de elementos de la vía de Ras en la señalización por integrinas(63, 64), pero también existen evidencias de vías de señalización mediadas por integrinas independientes de Ras(51, 52). Como se mencionó arriba el entrecruzamiento de integrinas en varios tipos celulares llevaban a la activación de MAPK, pero en monocitos no esta clara la participación de esta enzima y mucho menos si tiene una relación directa con el factor NF- κ B que es el responsable de la inducción de genes tempranos. Por lo tanto, este trabajo de tesis se enfocó a analizar la participación de MAPK en la vía de señalamiento de integrinas que conduzca la activación de NF- κ B, en monocitos.

7. Objetivo:

Identificar componentes de la vía de transducción de señales mediada por integrinas $\beta 1$ en monocitos.

8. Material y Métodos

Cultivo Celular

La línea celular monocítica THP-1 se mantiene en medio RPMI-1640 (Gibco BRL) suplementado con 5 % de suero fetal bovino (Gibco BRL), L- Glutamina 2 mM, penicilina (50 unidades / ml) y estreptomycin (50 µg/ml) (Gibco BRL). Estas células crecen en suspensión.

Estimulación de células THP-1

Procedimiento:

Se colocan las células THP-1 en tubos falcon de 50 ml y se centrifugan a 258 x g por 5 min a 4° C. Se retira el medio y las células se resuspenden en 40 ml de PBS [1 mM KH₂PO₄ (J.T.Baker), 5.6 mM Na₂HPO₄ (J.T.Baker), 154 mM NaCl (J.T.Baker), pH 7.2] estéril frío. Las células se centrifugan nuevamente a 258 x g por 5 min y se retira el PBS. Las células se resuspenden a una concentración de 3.3 x 10⁶ /ml en medio RPMI-1640 sin suero. A 3 ml de esta suspensión celular se le añade el anticuerpo anti integrina TS2/16 (β1) o IB4 (β2) a una concentración final de 5 µg/ml. La mezcla se incuba 1 hora en hielo. Posteriormente se centrifuga a 258 x g por 5 minutos. Se quita el medio con el anticuerpo y las células se resuspende en 3 ml de medio sin suero con el anticuerpo anti-IgG de ratón a 5 µg/ml. La mezcla se incuba 30 min en hielo. Las células son entonces estimuladas poniéndolas a 37°C durante 3 min. La estimulación se detiene adicionando 10 ml de PBS frío. Después de centrifugar a 258 x g por 5 minutos y de retirar el sobrenadante, las células se resuspende en 100 µl de buffer de lisis RIPA [150 mM NaCl (J.T Baker), 1 % Triton (Sigma), .5 % Deoxicolato de Sodio(Sigma), 0.5 % EDTA (Sigma), 50 mM

Hepes (Sigma)] con inhibidores de fosfatasa (1 mM Na_2VO_4) e inhibidores de proteasas [50 μg /ml Aprotinina (Sigma), 25 μg /ml leupeptina (Sigma), 25 μg /ml pepstatina A (Sigma) y 2 mM PMSF (Sigma)] se dejan 15 min en hielo. Posteriormente el lisado celular se centrifuga a 12622 x g por 5 min y el sobrenadante se pasa a un tubo limpio. Este lisado puede ser congelado a -70°C o ser utilizado inmediatamente en ensayos de electroforesis y ensayos de Western.

Electroforesis

Procedimiento:

Se monta la cámara de electroforesis (Bio-Rad) para hacer minigeles siguiendo las instrucciones del fabricante. Se hacen geles de 7.5 % de acrilamida para los ensayos de Western anti fosfotirosina y de 12 % de acrilamida para los de MAPK. Para los geles de 7.5% de acrilamida se pone: 1.25 ml de la disolución amortiguadora de corrida [48 mM de HCl, 3 M Tris base (Sigma), pH 8.9 en agua destilada], 1.875 ml de la solución de acrilamida al 40 % [38.96 gr acrilamida (Bio-Rad), 1.04 gr Bis-Acrilamida (Bio-Rad) en agua destilada], 100 μl de SDS 10 % (Sigma), 6.67 ml de agua, 100 μl de persulfato de amonio (Bio-Rad) y 10 μl de TEMED (Bio-Rad). Se pone la mezcla en el aparato y se le agregan 60 μl de n-butanol (J.T Baker) para eliminar las burbujas y dejar uniforme el borde superior del gel de acrilamida y se espera a que polimerice. Una vez que polimerizó la acrilamida se lava el n-butanol y se coloca el peine para formar pozos de 0.5 mm. Posteriormente se hace la mezcla para el gel concentrador al 3 %, la cual consta de: 1.25 ml de solución amortiguadora espaciadora [Solución amortiguadora de corrida: Solución amortiguadora espaciadora: 500 mM Tris base (Sigma), pH 6.7 en agua destilada], 0.75 ml de

acrilamida al 40 %, 100 μ l de SDS 10 % (Sigma), 7.8ml de agua, 100 μ l de persulfato de amonio (Bio-Rad) y 10 μ l de TEMED (Bio-Rad). Esta mezcla se agrega y se espera a que polimerice. Para los geles de 12% se mezcla 1. 25 ml de solución amortiguadora de corrida, 3 ml de acrilamida al 40 %, 100 μ l de SDS 10 % (Sigma), 5. 5 ml de agua, 100 μ l de persulfato de amonio (Bio-Rad) y 10 μ l de TEMED (Bio-Rad) y se pone 60 μ l de n-butanol (J.T Baker) y se espera a que polimerice. Posteriormente se prepara un gel concentrador al 3% como en los geles de 7. 5%. Una vez hechos los geles, éstos se montan en la cámara de electroforésis y se añade la solución amortiguadora de electrodo [Solución amortiguadora de electrodo: 25 mM Tris base (Sigma), 190 mM glicina (Bio- Rad) y 1 % SDS en agua]. Se colocan las muestras en la solución amortiguadora para muestras [Solución de Muestra: 5ml de solución espaciadora, 10 % SDS (Sigma), 4 ml Glicerol (J.T Baker), 0.05 % azul de bromofenol .en agua destilada] después de haber sido hervidas durante 5 minutos a 100 °C y se corre a 20 mAmps por cada gel. En el caso de los geles al 7.5 % el tiempo de corrida es aproximadamente de 1 hr, mientras que para los de 12 % es de 1 hr 30 minutos.

Ensayo de Western

Procedimiento:

Se coloca la membrana de difloruro de polivinilideno (PVDF) (Millipore) en metanol (Merck), para que se sature, por 1 min. Posteriormente se coloca la membrana en la solución amortiguadora de transferencia [Solución amortiguadora de transferencia: 25 mM de Tris-HCl (Sigma), 192 mM Glicina (Bio-Rad) y 20 % de Metanol (Merck) pH =8. 3] por lo menos 15 min

antes de usarse. Una vez terminada la electroforésis, se desmonta el gel del aparato y se procede a preparar el dispositivo para la transferencia. Para armarlo se coloca una esponja seguida de papel filtro, después se coloca el gel, posteriormente se coloca la membrana, y por último un papel filtro seguido de una esponja. La transferencia se realiza en el aparato para minigeles de Bio-Rad colocándo la membrana hacia el electrodo positivo a 500 mAmps por 2 horas. Al terminar la transferencia se enjuaga la membrana con agua destilada y se pone en un recipiente con la solución de bloqueo para ensayos de Western anti-fosfotirosinas [5 % leche en polvo descremada (Carnation) en TBS conteniendo 0.05 % Tween 20 (sigma)] o anti-MAPK [5 % leche en polvo descremada (Carnation), 1 % de albúmina sérica bovina, 0.05 % de Tween (Sigma) en PBS pH 7.2], se deja en un agitador Red Rocker (Hoefler Instruments) durante 24 h.

24 h después se agrega el anticuerpo primario a la membrana. Para para ensayos de Western anti-fosfotirosina se pone el anticuerpo AFT8 a una concentración de 7 µg/ml en solución de bloqueo. Se deja el anticuerpo incubando una hora. Posteriormente se hacen 6 lavados a intervalos de 5 minutos con TBS [10 mM Tris (Sigma), 50 mM NaCl (J.T.Baker) pH=7.3] a la membrana. Después se coloca a la membrana el anticuerpo secundario IgG de cabra anti-IgG de ratón, marcado con peroxidasa (Cappel) a una concentración de 5 µg/ml en la solución de bloqueo. Se deja incubando una hora. Posteriormente se hacen 6 lavados a la membrana a intervalos de 5 minutos con TBS. Una vez terminados los lavados se pone a incubar la membrana con un sustrato quimioluminiscente "Super Signal" (PIERCE) por 5 minutos. Por último se expone la membrana a la placa fotográfica por 5 minutos.

Para ensayos de Western anti-MAPK, se pone a la membrana como anticuerpo primario anti-erk (Transduction Laboratories) a una concentración final de 75 ng / ml en la solución de bloqueo. Se

deja una hora incubando. Posteriormente se hacen 6 lavados a la membrana a intervalos de 5 minutos con PBS [1 mM KH_2PO_4 (J.T.Baker), 5.6 mM Na_2HPO_4 (J.T.Baker), 154 mM NaCl (J.T.Baker) pH=7.2]. Después se pone a la membrana el segundo anticuerpo IgG de cabra anti IgG de ratón marcado con peroxidasa (Cappel) a una concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en la solución de bloqueo. Se deja una hora en incubación. Posteriormente se hacen 6 lavados a la membrana a intervalos de 5 minutos con PBS. Una vez terminados los lavados se pone la membrana a incubarse con un sustrato quimioluminiscente "Super Signal" (PIERCE) por 5 minutos. Por último se expone la membrana a la placa fotográfica por 5 minutos.

Immunoprecipitación de MAPK

Procedimiento:

Un día antes de la inmunoprecipitación se lava la sefarosa (Pharmacia Biotech) con PBS [1 mM KH_2PO_4 (J.T.Baker), 5.6 mM Na_2HPO_4 (J.T.Baker), 154 mM NaCl (J.T.Baker) pH=7.2]. Esto se hace centrifugando un minuto a 579 x g y resuspendiendo en PBS (se hacen 5 lavados) finalmente se le pone un volumen de PBS igual al volumen de sefarosa. 24 horas después se ponen 50 μl de proteína A sefarosa por cada muestra que se prepara, se pone el anticuerpo anti-MAPK (Transduction Laboratories) 1 μg por muestra. Se deja incubando a 4°C en un agitador de rueda "Roto Torque" (Cole - Palmer) por 2 horas.

Durante el período de incubación de la sefarosa y el anticuerpo anti-MAPK se realiza la estimulación de las células THP-1 con anticuerpos anti integrinas como se describió en esta misma sección anteriormente, 3 min después las células se lisan. Una vez terminados estos lisados se les adiciona 100 μl de proteína A sefarosa-anticuerpo y se deja 2 horas incubando en el

agitador rotador "Roto Torque"(Cole-Palmer). Dos horas después se centrifuga los lisados con la proteína A-anticuerpo anti MAPK 4 min 579 x g, se quita el sobrenadante y se resuspende en 100 µl de solución amortiguadora [25 mM Tris HCl (Sigma). PH= 7.5]. Se hicieron 4 lavados igual a este. Posteriormente se resuspende la sefarosa en 25 µl de solución para muestra [5 ml de solución espaciadora, 10 ml SDS 10 % (Sigma),4 ml Glicerol (J.T Baker), 0.05 % azul de bromofenolen agua destilada]. Se hierve 5 min y posteriormente se centrifuga 5 min a 12622 x g. Por último se pone el sobrenadante en un gel para electroforesis al 12 %, y se realiza el ensayo de Western anti-MAPK,antifosfotirosina y MAPKactivado.

Ensayo de Western anti-MAPK Activado

Procedimiento:

Las células THP-1 son estimuladas con anticuepos anti-integrinas e inmunoprecipitadas como se describió anteriormente. Los inmunoprecipitados, se corren en un gel al 12 %. Mientras se hace la electroforesis se satura la membrana PVDF (Millipore) 1 min en metanol. (Merck). Posteriormente se pone la membrana 15 min en la solución de transferencia [Solución amortiguadora de transferencia: 25 mM de Tris-HCl (Sigma), 192 mM Glicina (Bio-Rad) y 20 % de Metanol (Merck) pH =8. 3] antes de usarse. Se arma el dispositivo de transferencia siguiendo las instrucciones del fabricante colocándo la membrana hacia el electrodo positivo por 2 h a 500 mAmps. Posteriormente se pone la membrana en solución de bloqueo [5 % leche en polvo descremada (Carnation), 1 % de albúmina sérica bovina (BSA), 0 .05 % de Tween (Sigma) en PBS] 24 h a 4°C. Al día siguiente se coloca a la membrana el primer anticuerpo (anti-active

MAPK) (Promega) a una concentración final de 25 ng/ ml , el cual detecta la forma fosforilada de MAPK, en la solución de bloqueo. Se deja incubando 1 h. Posteriormente se realizan 6 lavados a la membrana a intervalos de 5 minutos con PBS [1 mM KH_2PO_4 (J.T.Baker), 5.6 mM Na_2HPO_4 (J.T.Baker), 154 mM NaCl (J.T.Baker) pH=7.2]. Después se pone a la membrana el segundo anticuerpo anti-IgG de conejo marcado con peroxidasa (Cappel) a una concentración de 5 μg / ml en la solución de bloqueo. Se deja la membrana 1 h en incubación. Posteriormente se hacen 6 lavados a la membrana a intervalos de 5 min con PBS. Una vez terminados los lavados se pone a incubar la membrana con un sustrato quimioluminiscente "Super Signal" (PIERCE) por 5 min. Por último se expone la membrana a la placa fotográfica por 5 min.

Transfección

Plásmidos. Para evaluar la eficiencia de transfección se utiliza el plásmido pG13 (Promega), el cuál expresa constitutivamente el gen de la luciferasa a partir del promotor de SV40. Para la realización de los ensayos de activación del factor nuclear se utiliza el plásmido 3XMHC-luc. Este plásmido posee tres secuencias repetidas de reconocimiento para el factor NF- κB (region H-2K^b κB fusionado río arriba del promotor al promotor *fos* (65) (ver apéndice I).

Procedimiento:

Se utilizan células THP-1, que son transfectadas transitoriamente por el método de DEAE-dextran. Para esto se colocan las células en tubos falcon de 50 ml y se centrifugan a 258 x g por 5 min, después se resuspenden las células en PBS [1 mM KH_2PO_4 (J.T.Baker), 5.6 mM Na_2HPO_4 (J.T.Baker), 154 mM NaCl (J.T.Baker) pH=7.2] y se cuentan. Las células nuevamente se

centrifugan a 258 x g por 5 min y se pone el equivalente de 3×10^6 /ml de células por 0.5 ml en tubos falcon de 15 ml. Se añaden 3.75 ml de medio RPMI-1640 sin suero, 250 µl de la solución amortiguadora [1M Tris -HCL (Sigma) pH =7.2] y 5 µg de plásmido al tubo con las células.

Posteriormente se añaden 500 µl de DEAE- dextran [(Pharmacia Bio Process) en agua a una concentración de 2 mg/ml] a las células. Se incuban las células a 37 °C por 1 h Se centrifugan las células a 258 x g por 5 min y se resuspenden las células en 5 ml de RPMI-1640 con 0.1 mM de cloroquina (Sigma). Se dejan las células 1 h incubando a 37 °C. Se centrifugan las células nuevamente a 258 x g por 5 min y se resuspenden en 4ml de RPMI-1640 sin suero. Se hacen estos lavados 4 veces. Se vuelven a centrifugar las células a 258 xg y resuspender en 4ml de medio RPMI-1640 con suero. Se dejan las células 48 hr a 37°C.

Ensayos de actividad de Luciferasa

Procedimiento:

Se realiza una transfección con el plásmido que lleva al gen reportero de la luciferasa (3XMHC-luc) y se deja 48 hr. 24 h después se toman las células y se pasan a tubos falcon de 15 ml. Se centrifugan las células a 258 x g por 5 min. Se resuspenden las células en 1 ml de medio RPMI-1640 sin suero. Se añade el anticuerpo primario (TS2/16 ó IB4) a una concentración final de 5 µg/ml a las células. Se dejan las células 1 h en hielo. Posteriormente se centrifugan las células a 258 x g por 5 min y las células se resuspenden en 2 ml de medio RPMI-1640 con el segundo anticuerpo (anti-IgG de ratón) a una concentración final de 5 µg/ml y se deja 4 horas y 30 min en un incubador a 37° C. Se centrifugan las células a 258 x g por 5 min y se resuspenden las células

en 60 μ l de la solución de lisis [0.1 M Tris - HCl, pH 7.8, 1 % triton X- 100, 1 mM ditioneitol y 2 mM EDTA]. Se dejan las células 15 min en hielo. Después los lisados celulares se centrifugan a 12622 x g por 2 min. Se toman los sobrenadantes y se pasan a tubos ependorf. Se añaden 100 μ l de la disolución amortiguadora [30 mM triglicina, pH 7.8, 3 mM ATP, 15 mM MnSO₄, 10 mM de ditioneitol], 100 μ l de sustrato (250 μ M D- luciferina, pH 6.5) a los tubos con los sobrenadantes. La actividad de luciferasa se mide en un luminómetro (Monolight 2010 luminometer Ann Arbor, MI), durante 20 segs. En algunos de los ensayos, las células transfectadas fueron expuestas a una concentración de 30 μ M del inhibidor específico de la cinasa MEK. (PD98059) de Biolabs, por 1 h antes de la estimulación y durante toda la estimulación. También en algunos ensayos las células fueron expuestas a 10 μ g/ml de Citocalacina B (inhibidor de la polimerización de filamentos de actina) por 15 min antes de la estimulación con anticuerpos anti integrinas. La citocalacina también se encuentra presente durante la estimulación.

Cultivo de Bacterias y Purificación de Plásmido:

Procedimiento:

Se añaden 5 ml de un cultivo de bacterias saturado a 500 ml de medio LB (Sigma) y se deja incubando toda la noche a 37° C. Las bacterias se centrifugan a 2800 x g en frascos de 250 ml. Se elimina el sobrenadante y las bacterias se resuspenden en 10 ml de Solución I [50 mM glucosa, 25 mM Tris. HCl pH 8, 10 mM EDTA] con 5 mg/ml de lisozima (Sigma). Se dejan las bacterias 5 min a temperatura ambiente. Se adiciona 20 ml de solución II [0.2N de NaOH, 1% SDS] al frasco donde estan las bacterias y se dejan 5 min en hielo. Posteriormente se añade 15 ml

de solución III [5 M acetato de potasio, ácido acético glacial, agua destilada] fría a las bacterias y se dejan 5 min en hielo. Se centrifugan los lisados de bacterias 20 minutos a $7164 \times g$ a 4°C . Se transfiere el sobrenadante a otro frasco y se le adicionan 0.6 volúmenes de isopropanol (J.T Baker). Se deja la mezcla 15 minutos a temperatura ambiente. El DNA precipitado se recupera por centrifugación a $4032 \times g$ durante 30 minutos a 4°C . El DNA se disuelve en TE [10 mM Tris- HCl, pH 8, 1 mM EDTA]. Posteriormente se agregan 4 gr de CsCL y 300 μl de bromuro de etidio. La mezcla se pasa a tubos (Quick- Seal Polyallomer de 13 x 51 mm. Beckman #342412) para gradientes de cloruro de cesio. Los tubos se sellan con calor y se ponen en un rotor NVT901(Beckman). El rotor se cierra a una presión de 120 libras / pulgada cuadrada. Los tubos se centrifugan a $5164 \times g$ durante 3 horas a 20°C . Al terminar de centrifugar se añade TE a los tubos y 1 ml de 1- butanol (J.T Baker). Se pasa la mezcla a bolsas de diálisis y se deja dializar en TE por 2 h. Se pasa el contenido de la bolsa de diálisis a tubos ependorf. Se añade 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de RNAasa a los tubos Ependorf y se deja a 37°C por una hora. Se agrega 200 μl de fenol a los tubos, se agita en el vortex. Se añade 300 μl de cloroformo a los tubos, se agita en el vortex y se centrifuga a $12622 \times g$ durante 5min. Se recupera la fase superior donde se encuentra el DNA. Se añade nuevamente cloroformo, se agita en vortex y se centrifuga durante 5 min a $12622 \times g$. Se recupera la parte superior. Se hace nuevamente esto dos veces. Se añade 1/10 de volumen de acetato de sodio 3M (J.T Baker), 2.5 volúmenes de etanol 100% al tubo. Se deja 24 h a 20°C . Al día siguiente se centrifuga a $12622 \times g$ durante 5 min. Se disuelve el DNA en agua y se guarda a 20°C .

9. Resultados:

Activación del Factor Nuclear NF- κ B

Resultados previos muestran que el entrecruzamiento de integrinas $\beta 1$ produce la expresión de genes tempranos y que además estos genes tempranos poseen regiones de reconocimiento para el factor NF- κ B en sus regiones 5'(38). Se pensó confirmar si se daba la activación del factor NF- κ B en la línea monocítica THP-1 al estimular con un anticuerpo contra integrinas $\beta 1$ (TS2/16) para poder identificar a los posibles componentes de la vía de señalización de integrinas $\beta 1$. Para esto se utilizó una técnica ya estandarizada en el laboratorio que determina la expresión de un gen reportero en consecuencia de la activación del factor nuclear NF- κ B. Esta técnica consiste en la transfección de un plásmido reportero que contiene tres regiones repetidas de unión del factor nuclear seguidas de un promotor y del gen de la luciferasa. Las células transfectadas son incubadas con el anticuerpo contra integrinas $\beta 1$ y 4 h y media más tarde son lisadas. Para medir la actividad del factor nuclear se añade un sustrato (luciferina) al lisado celular donde se produce una reacción luminosa que es detectada por un luminómetro. Esta reacción sólo se podrá efectuar si el estímulo desencadenado por las integrinas $\beta 1$ lleva a la activación del factor NF- κ B, el cuál se unirá a la región de unión de este factor en el plásmido reportero llevando así a la expresión de la proteína luciferasa que actuará sobre su proteína sustrato (luciferina) produciendo luz. Para asegurarnos de que el estímulo que se produjera fuera debido al entrecruzamiento de integrinas y no a receptores Fc, se utilizó un anticuerpo del mismo isotipo que TS2/16. El anticuerpo que se utilizó fue el W6/32, el cual reconoce al complejo principal de histocompatibilidad uno.

Como se aprecia en la figura 1, el entrecruzamiento de integrinas $\beta 1$ lleva a la activación del factor nuclear NF- κB . Esta activación es de 3 a 4 veces superior a la encontrada en células no estimuladas. Así mismo el anticuerpo W6/32 no produjo ninguna estimulación.

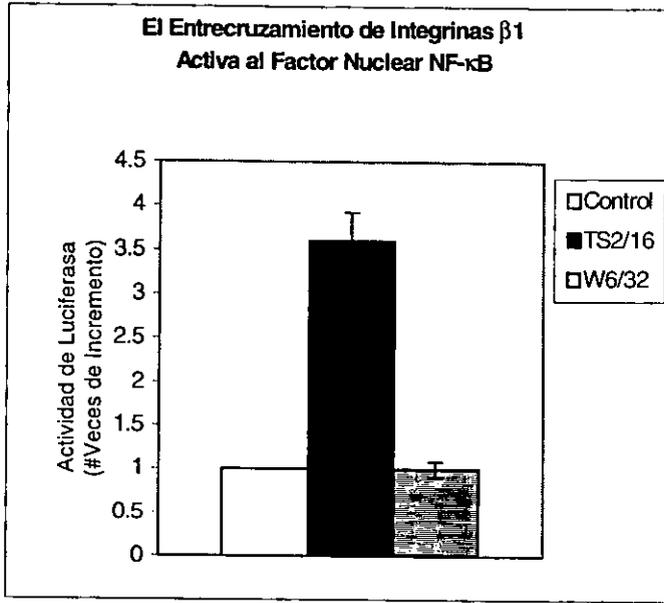


Figura 1. Activación del factor nuclear NF- κB en células THP-1 por entrecruzamiento de integrinas $\beta 1$. Las células fueron transfectadas con el plásmido reportero 3XMHC-luc. 48 h después fueron incubadas con 5 $\mu g/ml$ del anticuerpo monoclonal contra integrinas $\beta 1$ (TS2/16), 5 $\mu g/ml$ del anticuerpo monoclonal anti-MHC-I o se mantuvieron sin estimulación (control). 4 h y media más tarde las células fueron lisadas y la actividad de luciferasa fue determinada en un luminómetro como se describe en métodos. Los datos son promedio \pm error estándar de 5 experimentos.

Fosforilación de Proteínas en Tirosinas

Uno de los eventos iniciales en las vías de señalamiento de otro tipo de receptores es la fosforilación de proteínas. La fosforilación de proteínas se ha reportado que participa en los mecanismos que regulan la transcripción de genes(50). Se obtuvieron los patrones de fosforilación en residuos de tirosinas en proteínas inducidos por integrinas $\beta 1$. Esto se realizó con el fin de conocer el mecanismo de transducción de señales mediado por Integrinas $\beta 1$ y posteriormente para la identificación de las proteínas fosforiladas con base al peso molecular que presentaran en los ensayos de Western anti-fosfotirosina (pY).

Para obtener los patrones de fosforilación se estimularon células THP-1 con anticuerpos anti-integrinas $\beta 1$ (TS2/16) por 3 min, después las células fueron lisadas. Los lisados celulares se colocaron en un gel de acrilamida al 7 %. Al terminar la electroforesis se realizó el ensayo de Western anti-fosfotirosina utilizando el anticuerpo AFT8 (purificado en el laboratorio).

El entrecruzamiento de integrinas $\beta 1$ produjo un aumento significativo en la fosforilación en residuos de tirosinas en diversas proteínas. Principalmente algunas proteínas comprendidas en el rango de peso molecular entre 80 y 184 kDa (figura 2). Entre las bandas que se pudieron distinguir se encontró una de aproximadamente 180 kDa, cuyo peso molecular coincide con el receptor integrina. También se observó una banda de aproximadamente 116 kDa, cuya masa es similar a la de la proteína α -actinina. Así mismo se observó una banda de un peso aproximado de 65 kDa, el cuál coincide con el de la proteína paxilina.(figura 2).

Ensayo de Western: Anti-Fosfotirosina

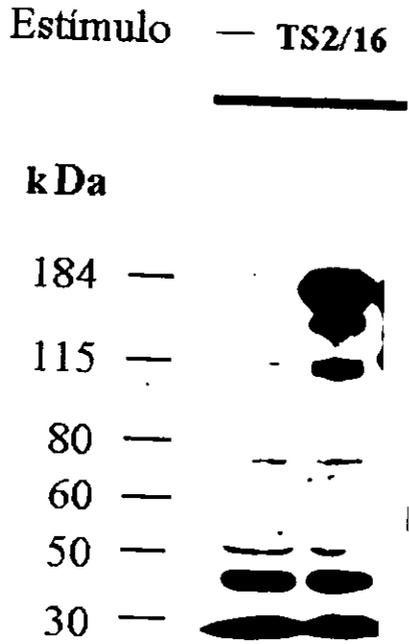


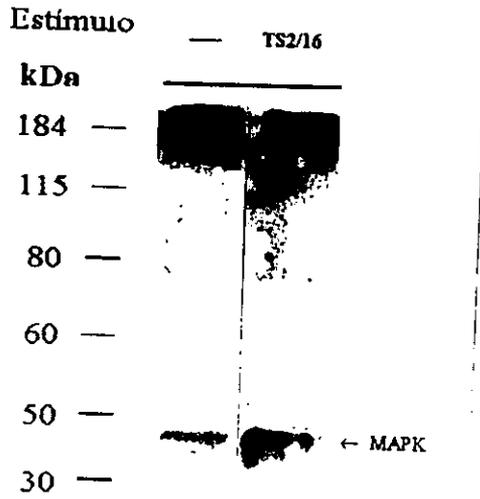
Figura 2. Ensayo de Western anti-fosfotirosina de lisados de células THP-1 estimuladas con anticuerpos anti-integrinas $\beta 1$. Células sin estímulo, control (-). Células estimuladas con anticuerpo anti- $\beta 1$ -a 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (TS2/16).

Para identificar proteínas que pudieran estar involucradas en la vía de señalización de las integrinas $\beta 1$ se confirmó si había actividad de la cinasa activada por mitógeno (MAPK). Esto se realizó porque la participación de esta cinasa en la vía de transducción de señales por integrinas no había sido reportada antes en monocitos, también debido a que el entrecruzamiento de integrinas en otros tipos celulares producen la fosforilación de MAPK.

Para determinar si MAPK estaba activada (fosforilada) en células estimuladas a través del entrecruzamiento de integrinas $\beta 1$, se hicieron ensayos de Western para detectar la forma activa de MAPK. Para esto las células THP- 1 se estimularon a con el anticuerpo TS2/16. 1 h y media más tarde se lisaron las células. Se inmunoprecipitó MAPK con un anticuerpo anti-MAPK de los lisados celulares y por último se realizó un ensayo de Western con un anticuerpo que reconoce la forma activa de MAPK (fosforilada). La estimulación de células con el anticuerpo anti integrinas $\beta 1$ resultó en la activación de MAPK (figura 3a). Para descartar la posibilidad de que el resultado obtenido fuera consecuencia de diferentes concentraciones de proteína en las muestras, se removieron de la misma membrana los anticuerpos que reconocían la forma activa de MAPK y se hizo un ensayo de Western anti-MAPK (3b). El resultado obtenido muestra que en las dos condiciones hay la misma cantidad de proteína MAPK inmunoprecipitada. (figura 3b)

a) IP: Anti-MAPK

Ensayo de Western : Anti-MAPK Activada



b) IP: Anti MAPK

Ensayo de Western : Anti MAPK



Figura 3. Ensayo de Western anti-MAPK activada (a) y anti-MAPK (b) de células THP-1 estimuladas con anticuerpos anti integrinas $\beta 1$. Las células fueron estimuladas con anticuerpos anti integrinas $\beta 1$ (TS2/16) o se mantuvieron sin estimular (-), 3 min más tarde las células fueron lisadas e inmunoprecipitadas con un anticuerpo anti MAPK. La figura es representativa de 3 experimentos independientes con resultados similares

Los resultados experimentales descritos hasta aquí, indicaban que el entrecruzamiento de integrinas $\beta 1$ producía fosforilaciones en residuos de tirosinas en una serie de proteínas. Así mismo indicaban que efectivamente la cinasa MAP era activada. Muy posiblemente MAPK es la enzima que activa al factor nuclear NF- κ B (figura 4).

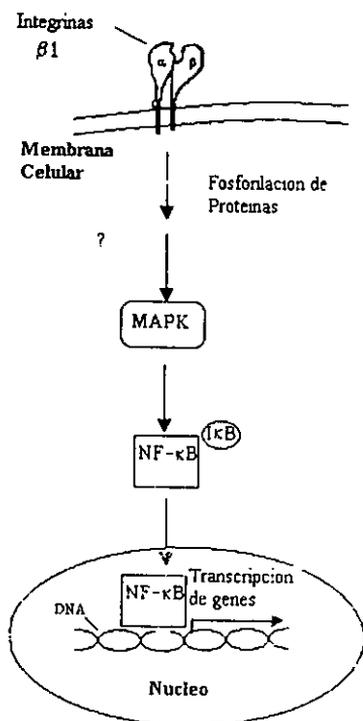
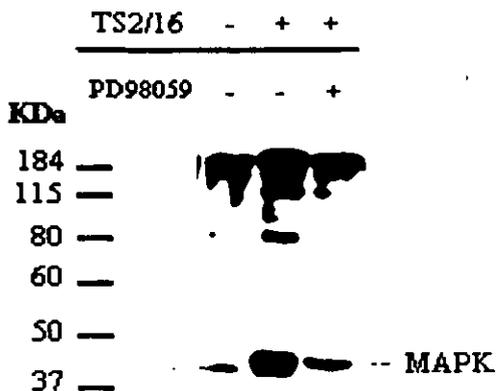


Figura 4. Modelo de la vía de transducción de señales por integrinas $\beta 1$ en monocitos, basados en los primeros resultados de esta tesis. El entrecruzamiento de integrinas con anticuerpos anti-integrinas $\beta 1$ (TS2/16) produjo una fosforilación de residuos de tirosinas en proteínas, las cuales participan en pasos intermedios de la vía que no se conocen (?). También, la estimulación por integrinas llevó a la activación de la cinasa MAP, la cual a su vez podría ser la responsable de la activación del factor nuclear NF- κ B

Continuando con el objetivo de este trabajo de tesis se pensó en buscar otros componentes que pudieran participar en la vía de transducción de señales mediadas por integrinas $\beta 1$ y que pudieran encontrarse río arriba de la cinasa MAP. Para esto se pensó que la cinasa MEK podría estar presente en esta vía, ya que la única forma hasta ahora conocida de activar a MAPK es a través de MEK(60). Para determinar la posible participación de MEK en esta vía se utilizó un inhibidor específico de esta enzima denominado PD98059 (66). Para esto las células THP-1 fueron incubadas con el inhibidor PD98059 durante 30 min antes de ser estimuladas con el anticuerpo TS2/16 por 3 min. Las células fueron después lisadas y MAPK inmunoprecipitada de estos lisados celulares. Los inmunoprecipitados se corrieron en un gel de acrilamida al 12 %. Al terminar la electroforesis se realizó un ensayo de Western anti-fosfotirosina. Se hicieron ensayos de Western anti-fosfotirosinas por varias razones, entre ellas que MAPK solamente es activada cuando se encuentra fosforilada y por tanto sería otra forma de confirmar la activación de esta cinasa.

La activación de MAPK en las células estimuladas con el anticuerpo anti integrinas $\beta 1$ (TS2/16) disminuyó notablemente en presencia de 30 μ M del inhibidor PD98059 (figura 5a), lo que sugiere la participación de la cinasa MEK en esta vía y confirma la participación de MAPK en la vía de señalización de las integrinas $\beta 1$. Para confirmar que todos los carriles hay la misma cantidad de proteínas se realizó un ensayo de Western anti-MAPK en la misma membrana después de remover los anticuerpos anti-fosfotirosina. Todas las muestras contenían la misma cantidad de MAPK (figura 5b).

a) **IP: Anti MAPK**
Blot: Anti PY



b) **IP: Anti MAPK**
Blot: Anti MAPK



Figura 5. Activación de MAPK por estimulación de integrinas $\beta 1$. a) Ensayo de Western anti-fosfotirosina. Las células THP- 1 fueron estimuladas con anticuerpos anti integrinas $\beta 1$ (TS2/16) y 3 min después se lisaron. MAPK se inmunoprecipitó de los lisados. Células sin estímulo o en presencia del disolvente DMSO (-) primero y segundo carril respectivamente, células estimuladas con anticuerpo anti integrina $\beta 1$ (carril 3) y estimuladas con anticuerpo anti integrina $\beta 1$ en presencia de 30 μ M del inhibidor de MEK (carril 4). b) Ensayo de Western anti MAPK de la misma membrana después de haber sido desnudada.

Recopilando los resultados descritos hasta el momento, añadimos al modelo propuesto en la figura 4 la participación de la cinasa MEK en la activación del factor nuclear NF- κ B (figura 6). Entonces podíamos establecer que al darse el estímulo con el anticuerpo anti integrinas β 1 se desencadenaban una serie de fosforilaciones de proteínas. La cinasa MEK es activada y esta a su vez activa a MAPK. Esta última cinasa podría ser responsable de la activación del factor nuclear NF κ B (figura 6).

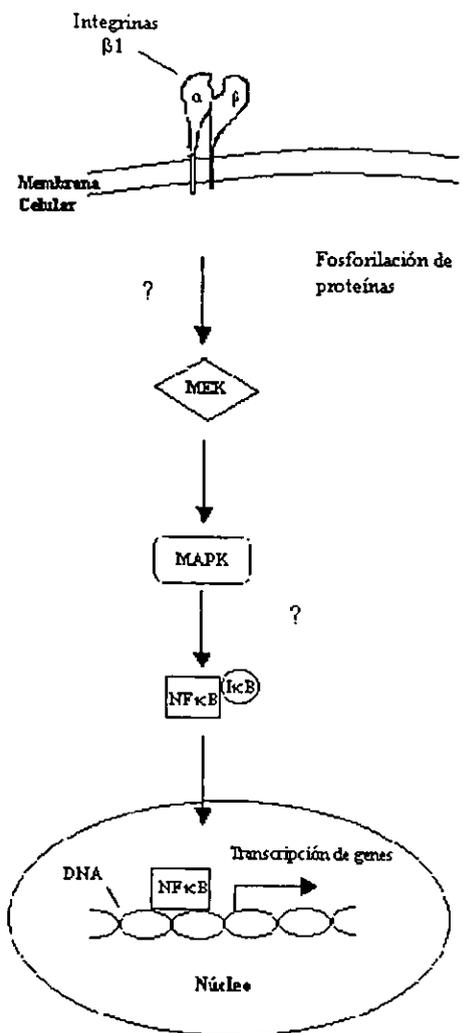


Figura 6. Modelo de la activación del factor nuclear NF-κB propuesto según los datos obtenidos experimentalmente donde se añade la participación de MAPK y MEK. El entrecruzamiento de integrinas β1 conduce a una serie de sucesos bioquímicos que resultan en la activación de MEK y MAPK. Estas cinasas a su vez podrían conducir a la activación del factor nuclear NF-κB disociándolo de su proteína inhibidora IκB.

Nuestros resultados experimentales sugerían que las cinasas MEK y MAP anteceden al factor nuclear NF- κ B en la vía de transducción de señal de las integrinas β 1 (figura 6). De ser este el caso, nosotros esperábamos que la actividad del factor NF- κ B se inhibiera en presencia del fármaco PD98059, que es un inhibidor específico de la cinasa MEK. Para esto se aprovechó que ya se tenía la técnica estandarizada para detectar la actividad del factor nuclear NF- κ B. Entonces las células THP-1 fueron transfectadas con el plásmido reportero 3XMHC-luc y 48 h más tarde fueron incubadas con 30 μ M de PD98059 durante 30 min. Al terminar la incubación con el inhibidor las células fueron estimuladas por con el anticuerpo anti integrinas β 1 y luego de 4h las células fueron lisadas. La actividad del gen reportero de luciferasa fue determinada con un luminómetro como se describe en la sección de materiales y métodos. Para mostrar que el disolvente en el que se encontraba el inhibidor no tenía ningún efecto sobre las células también se incubaron células en presencia de dimetil sulfóxido (DMSO).

El entrecruzamiento de integrinas β 1 con el anticuerpo TS2/16 en células THP-1 en presencia del inhibidor de la cinasa MEK no produjo ningún efecto sobre la activación del factor nuclear NF- κ B (figura 7).

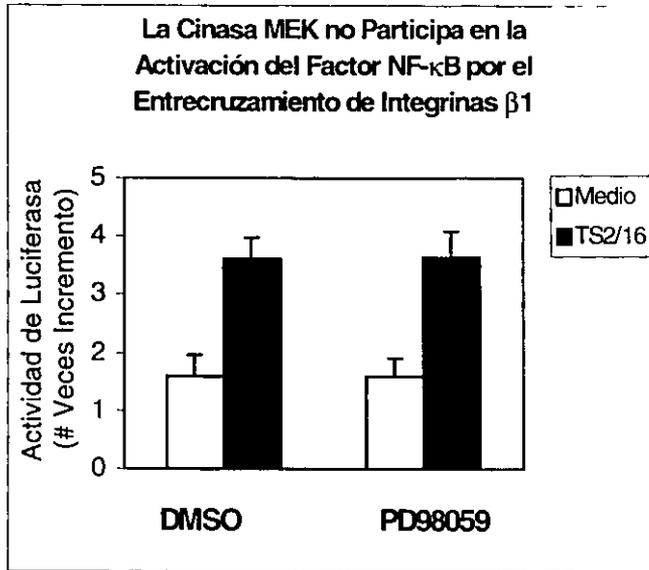


Figura 7. La cinasa MEK no se requiere para la activación del factor nuclear NF- κ B inducida por integrinas β 1. Las células fueron transfectadas con el plásmido reportero 3XMHC-luc y 48 horas después fueron incubadas por 30 min con 30 μ M del inhibidor de MEK (PD98059) o con el disolvente del inhibidor (DMSO). Las células THP-1 fueron estimuladas con anticuerpos anti integrinas β 1 (TS2/16) en presencia o ausencia de PD98059 o se dejaron sin estimular (control). Los resultados son promedio \pm error estándar de 5 experimentos.

Para descartar la posibilidad de que PD98059 no se encontrara activo, se estimularon las células THP-1 con complejos inmunes, ya que se ha reportado que el estímulo a través de receptores Fc produce la activación del factor nuclear NF- κ B de una forma dependiente de MAPK y MEK (67). Por lo tanto, el fármaco PD98059 debía inhibir la activación del factor nuclear NF- κ B producida por los receptores Fc. Como se aprecia en la figura 8, PD98059 inhibió la actividad de NF- κ B inducida por los receptores Fc. Con este resultado pudimos confirmar que el inhibidor de MEK sí está activo.

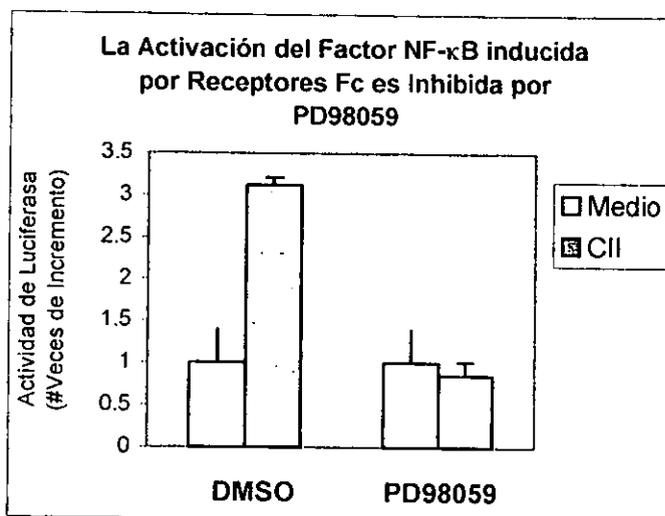


Figura 8. El fármaco PD98059 inhibe la activación del factor NF- κ B por receptores Fc. Las células THP-1 fueron transfectadas con el plásmido 3XMHC-luc y 48 h después fueron incubadas con 30 μ M de PD98059 por 30 min ó con el disolvente del inhibidor DMSO. Las células fueron estimuladas con complejos inmunes por 1 min en presencia o ausencia de PD98059 ó se dejaron sin estimular. Los resultados son promedio \pm error estándar de 3 experimentos.

El resultado de la figura 7 estaba en contra del modelo que propusimos en la figura 6, ya que esperábamos que la inhibición de MEK produciría que la cinasa MAPK no fuera activada y al no ser esta activada no fosforilaría a ninguno de sus sustratos. Este resultado sugería que la integrina $\beta 1$ podía utilizar dos vías distintas, una que la llevara a la activación del factor nuclear NF- κ B de una manera independiente de MAPK y otra vía que sí utiliza a MAPK, la cual llevaría a otras respuestas celulares (figura 9). Estos resultados son muy interesantes ya que hasta ahora no se ha reportado que una misma integrina utilice dos o más vías de señalización en monocitos.

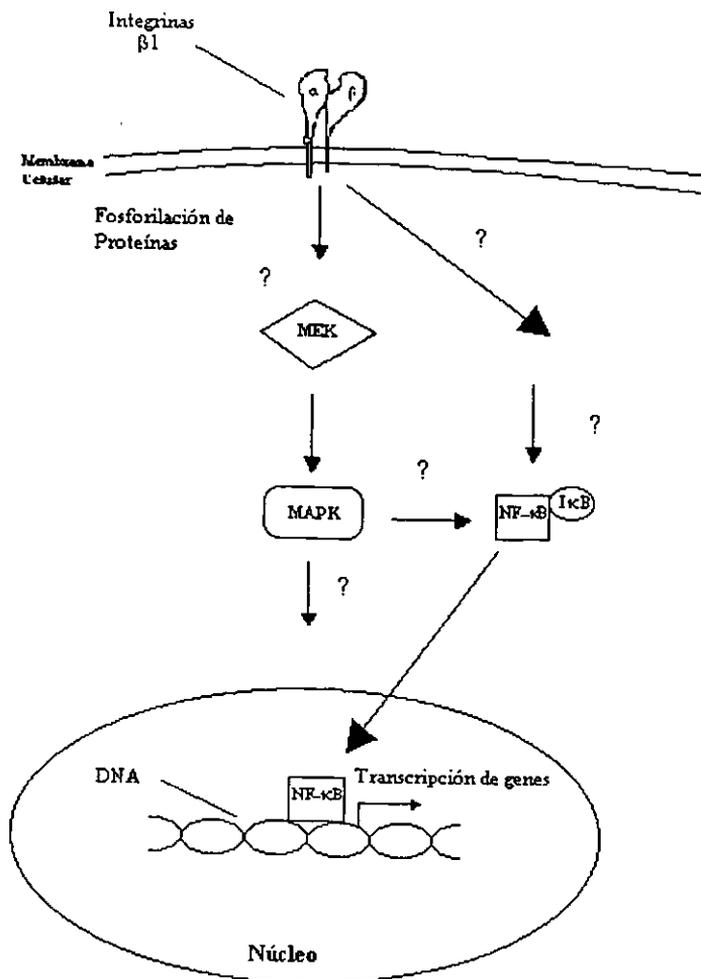


Figura 9. Modelo de las vías de señalización inducidas por el entrecruzamiento de integrinas $\beta 1$ basado en resultados experimentales. El entrecruzamiento de integrinas $\beta 1$ puede desencadenar dos vías de señalamiento distintas. Una de las vías conduce a la activación de MEK y MAPK a través de una serie de eventos intermedios no conocidos bien (?). La otra vía activa al factor nuclear NF- κ B de una manera independiente de MAPK.

Se conoce que el citoesqueleto juega un papel muy importante en muchos procesos bioquímicos, como puede ser la transducción de señales. Se ha sugerido que la activación de MAPK es mediada por cambios en la organización del citoesqueleto(68, 69). Basados en esto, probamos el posible papel que tendría el citoesqueleto en la activación del factor nuclear NF- κ B en células estimuladas por integrinas β 1.

Para probar el papel del citoesqueleto en la vía de señalización de integrinas β 1 se utilizó citocalasina B, la cual inhibe la formación de filamentos de actina. Las células THP-1 fueron transfectadas con el plásmido reportero 3XMHC-luc y 48 h más tarde fueron incubadas con 10 μ g/ml de citocalasina B durante 15 min. Después de la incubación las células fueron estimuladas con anticuerpos anti integrina β 1. 4 h y media más tarde las células fueron lisadas y la expresión del gen reportero fue medida como se describe en la sección de materiales y métodos. El tratamiento con citocalasina B produjo una fuerte inhibición de la expresión de la luciferasa dependiente del factor nuclear NF- κ B, inducida por integrinas β 1 (figura 10). Este resultado apoya la hipótesis de que el citoesqueleto juega un papel importante en la vía de transducción de señal de las integrinas β 1 que lleva a la activación del factor nuclear NF- κ B.

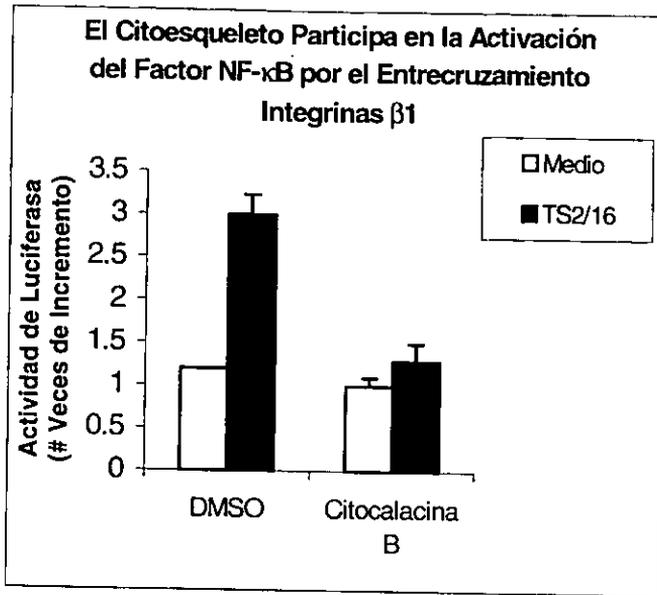


Figura 10. Activación del factor nuclear por el entrecruzamiento de integrinas β 1 en presencia de citocalacina B. Las células THP-1 fueron incubadas con 10 μ g/ml citocalacina B, o bien con el disolvente DMSO. 15 min después las células fueron estimuladas con anticuerpos anti integrinas β 1 (TS2/16) o se dejaron sin estímulo (control). 4 h más tarde las células se lisaron y se determinó la expresión de luciferasa. Los resultados son promedio \pm error estándar de 3 experimentos.

Con los resultados descritos anteriormente, el objetivo original del proyecto se había cumplido satisfactoriamente. Sin embargo, nos intrigaba mucho saber si esta vía era exclusiva de las integrinas $\beta 1$ o si otras integrinas también inducían la activación del factor nuclear NF- κ B. Las integrinas $\beta 2$ que también se expresan en monocitos, eran el mejor candidato a estudiar, ya que no existía evidencia en la literatura de la activación del factor nuclear NF- κ B inducida por estas integrinas. Otra razón para investigar esta posibilidad era el descubrir si existen diferencias entre las vías de señalización de las integrinas $\beta 1$ y $\beta 2$.

Aprovechando que contábamos con la técnica de medición del factor nuclear NF- κ B ya estandarizada así de anticuerpos contra integrinas $\beta 2$. Las células THP-1 fueron transfectadas nuevamente con el plásmido 3XMHC-luc y 48 horas más tarde fueron incubadas con un anticuerpo contra integrinas $\beta 2$ (IB4). 4 h y media más tarde las células se lisaron y la expresión del gen reportero de la luciferasa se midió como se describe en material y métodos. El entrecruzamiento de integrinas $\beta 2$ llevó a la activación del factor nuclear NF- κ B (figura 11). Esta activación fue de 3 veces superior al de las células sin estímulo. Este resultado es similar al producido por integrinas $\beta 1$ (figura 1).

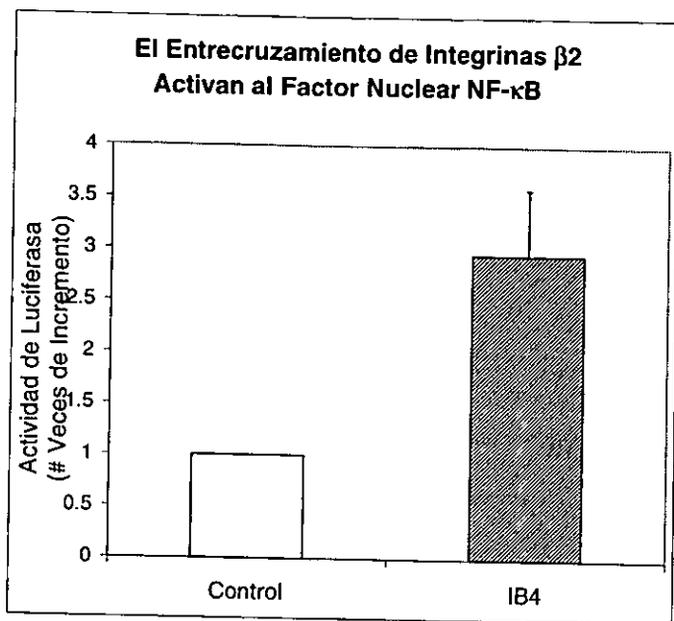


Figura 11. Activación del factor nuclear NF κ B en células THP-1 por entrecruzamiento de integrinas $\beta 2$. Las células fueron transfectadas con el plásmido reportero 3XMHC-luc. 48 horas después las células fueron incubadas con anticuerpos contra integrinas $\beta 2$ (IB4) o se mantuvieron sin estimulación (control). 4 h más tarde las células fueron lisadas y la actividad de luciferasa fue determinada en un luminómetro como se describe en métodos. Los datos son promedio \pm error estándar de 3 experimentos.

El resultado que obtuvimos de la activación del factor nuclear NF- κ B inducida por integrinas β 2 indicaba que probablemente estas integrinas comparten la vía de señalización de las integrinas β 1, o bien que tienen una vía distinta de señalización que también activa a este factor nuclear. Para explorar estas posibilidades se buscaron diferencias en las vías de señalización de ambos tipos de integrinas, comenzando por comparar los patrones de fosforilación inducidos por integrinas β 2 con los patrones de fosforilación inducidos por integrinas β 1.

La estimulación por entrecruzamiento de integrinas β 2 produjo también un patrón de fosforilación en proteínas en un rango de 120 a 184 kDa (figura 12). En particular se encontró que se fosforilaban en tirosinas, una proteína de aproximadamente 170 kDa, y otra de aproximadamente de 150 kDa en respuesta a la estimulación por integrinas β 2. Estas proteínas no se encontraron en la estimulación con integrinas β 1. La banda de aproximadamente 120 kDa se fosforiló en respuesta a ambos estímulos, pero su intensidad es mayor después del estímulo por integrinas β 2. Lo mismo se puede decir de la proteína de aproximadamente 82 kDa.

Al comparar el patrón observado por la estimulación de integrinas β 1 o β 2 se pudo observar que las principales diferencias entre ellos se encontraban en las proteínas comprendidas en el rango de 115 a 184 kDa (figura 12).

a) Ensayo de Western: Anti fosfotirosina

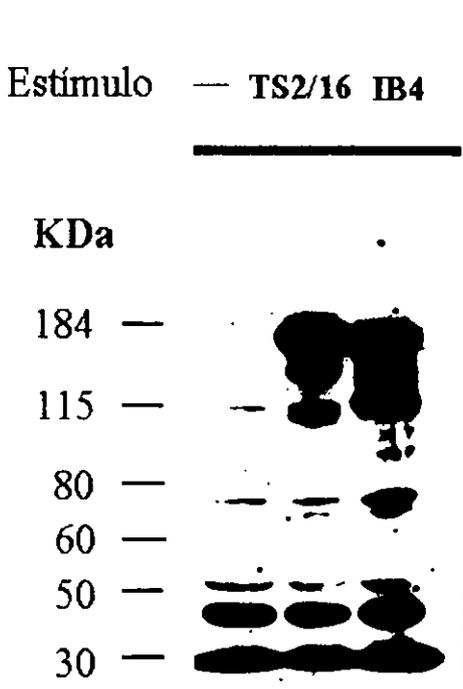
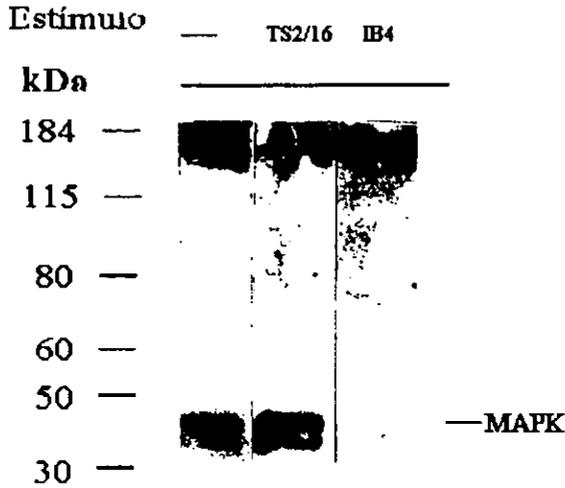


Figura 12. Ensayo de Western anti-fosfotirosina de lisados de células THP-1 estimuladas con anticuerpos anti integrinas $\beta 1$ y $\beta 2$. Células sin estímulo, control (-). Células estimuladas con anticuerpo anti $\beta 1$ a 5 $\mu\text{g/ml}$ (TS2/16). Células estimuladas con anticuerpo anti $\beta 2$ a 5 $\mu\text{g/ml}$ (IB4).

Los distintos patrones de fosforilación sugerían diferencias en las vías de señalización inducidos por ambos tipos de integrinas. Pero como ambas integrinas llevaban a la activación del factor nuclear NF- κ B decidimos explorar si algunos de los componentes de la vía de señalización de integrinas β 1 se encontraban en la vía de señalización de las integrinas β 2. Como la cinasa MAP se activa por integrinas β 1 (figuras 3 y 5), quisimos determinar directamente la activación de MAPK en las células THP-1 después de la estimulación por integrinas β 2. Para esto las células THP-1 se estimularon durante tres minutos con el anticuerpo anti-integrinas β 2 (IB4), y después las células se lisaron. Se inmunoprecipitó MAPK de los lisados con un anticuerpo anti MAPK y se realizó un ensayo de Western con un anticuerpo que reconoce la forma activa de MAPK. La estimulación de células con el anticuerpo anti-integrinas β 2 no resultó en la activación de MAPK, si no de hecho se vió una inhibición (figura 13a). Al comparar los resultados con los de la activación de MAPK inducida por integrinas β 1 (figura 3) se revela una diferencia entre ambas vías de señalización. Nuevamente se hizo un ensayo de western anti-MAPK sobre la misma membrana para descartar la posibilidad de que nuestro resultado fuera consecuencia de que hubiera diferentes concentraciones de proteína en la muestra (figura 13b). El resultado muestra que en las dos condiciones hay la misma cantidad de proteína MAPK inmunoprecipitada. (figura 13b).

a) IP: Anti MAPK

Blot: Anti Mapk Activada



b) IP: Anti MAPK

Blot : Anti MAPK



Figura 13. Ensayos de Western anti-MAPK activada (a) y anti-MAPK (b) de células THP-1 estimuladas con anticuerpos anti integrinas $\beta 2$ y anti integrinas $\beta 1$. Las células fueron estimuladas con anticuerpos anti integrinas $\beta 2$ (IB4), anticuerpos anti integrinas $\beta 1$ (TS2/16) o se mantuvieron sin estimular (-), tres minutos más tarde fueron lisadas e inmunoprecipitadas con un anticuerpo anti MAPK. La figura es representativa de tres experimentos independientes con resultados similares. b) Ensayo de Western anti-MAPK de la misma membrana.

Los datos presentados hasta aquí indicaban que el entrecruzamiento de las integrinas $\beta 2$ al igual que el entrecruzamiento de las integrinas $\beta 1$ eran capaces de inducir la activación del factor Nuclear NF- κ B, pero el entrecruzamiento de integrinas $\beta 2$ no inducían la activación de MAPK.

Ya que las integrinas $\beta 2$ no activaron a MAPK, era muy poco probable que esta cinasa participara en la activación del factor nuclear NF- κ B, por tanto el inhibidor de MEK (la cinasa que activa a MAPK) no debería tener efecto sobre la activación de NF- κ B inducida por $\beta 2$. Para confirmar esto, medimos la activación del factor nuclear NF- κ B en presencia del inhibidor de MEK, PD98059.

Las células THP-1 fueron transfectadas con el plásmido reportero 3XMHC-luc y 48 horas más tarde fueron incubadas treinta minutos con 30 μ M del inhibidor de MEK (PD98059). Al terminar la incubación con el inhibidor las células fueron estimuladas con el anticuerpo anti integrinas $\beta 2$ (IB4) y luego de 4 h fueron lisadas. La actividad del gen reportero de luciferasa fue determinada con un luminómetro como se describe en la sección de material y métodos. Para mostrar que el disolvente en el que se encontraba el inhibidor no tenía ningun efecto sobre las células éstas también se incubaron en presencia de DMSO. Tal como lo esperábamos, el entrecruzamiento de integrinas $\beta 2$ en presencia del fármaco PD98059 no inhibió la actividad del factor NF- κ B (figura 14). Estos resultados indican que tanto MAPK y MEK no participan en la vía de señalización mediada por integrinas $\beta 2$ (figura 14). Además sugieren que las integrinas $\beta 2$, al parecer igual que las integrinas $\beta 1$, utilizan una vía de señalización independiente de MAPK para la activación de NF- κ B. Comparar las figuras 8 y 14

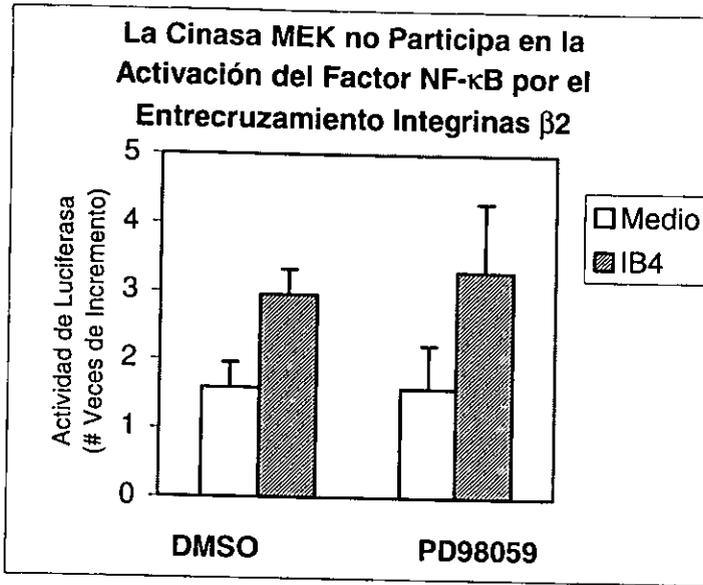


Figura 14. Activación del factor nuclear NF- κ B en células THP-1 por entrecruzamiento de integrinas β 2 en presencia del inhibidor de MEK (PD98059). Las células THP-1 fueron transfectadas con el plásmido reportero 3XMHC-luc y 48 horas después fueron incubadas por 30 min con 30 μ M del inhibidor de MEK (PD98059) o con el disolvente del inhibidor (DMSO). Las células fueron estimuladas después con el anticuerpo anti integrinas β 2 (IB4) o se dejaron sin estimular (control). 4 h más tarde las células se lisaron y se determinó la actividad de la luciferasa. Los resultados son promedio \pm error estándar de tres experimento.

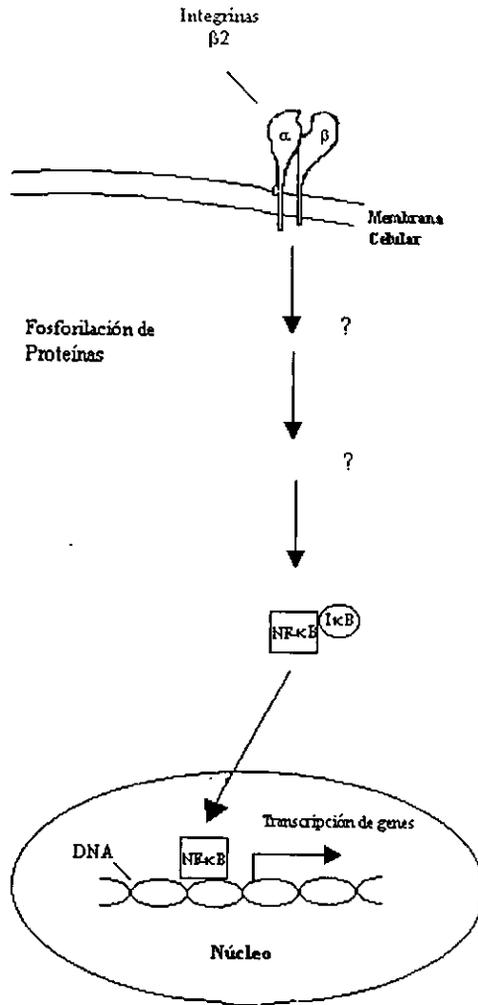


Figura 14. Modelo de la activación del factor nuclear NF-κB por el entrecruzamiento de integrinas β2 basado en los resultados obtenidos experimentalmente. Las integrinas β2 al entrecruzarse inducen la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina. Esta fosforilación a través de diversos eventos intermedios (?) conducen a la activación del factor NF-κB de una manera independiente de MAPK y MEK.

10. Discusión

Las integrinas son moléculas que se encuentran en la superficie de todas las células. Estas moléculas participan en una gran variedad de funciones celulares como: crecimiento, desarrollo embrionario, apoptosis, inflamación, metástasis y activación de leucocitos (10, 12). Las integrinas son moléculas de adhesión que funcionan como receptores de proteínas de matriz extracelular. Varios trabajos muestran que las integrinas no sólo se comportan como moléculas de adhesión, si no que son capaces de transmitir señales al interior de la célula (38, 52). Entre uno de los eventos mediados por las integrinas $\beta 1$ se encuentra la inducción de genes tempranos como c-fos, c-jun, I κ B, interleucina ocho (IL-8), y factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) (70). Muchos de estos genes presentan en sus regiones reguladoras 5', sitios de unión para el factor nuclear de transcripción NF- κ B. Estudios anteriores han mostrado que el entrecruzamiento de integrinas $\beta 1$ es capaz de inducir la activación del factor NF- κ B de una manera independiente de Ras en monocitos (52). Así mismo otros reportes en la literatura han mostrado que las integrinas $\beta 2$ no tienen la capacidad de regular la transcripción de genes tempranos (70).

Nuestros resultados presentados en esta tesis, muestran que en monocitos THP-1 el entrecruzamiento de integrinas $\beta 1$ induce la activación del factor nuclear NF- κ B. Esta activación fue de tres a cuatro veces superior al control sin estímulo (figura 1). Estos resultados confirman los datos previamente publicados sobre la activación de este factor nuclear por integrinas $\beta 1$ en monocitos (52). Dado que en la superficie celular existen otros tipos de receptores de membrana, como los receptores Fc, se utilizó un anticuerpo del mismo isotipo que el empleado para estimular. Esto para descartar que el efecto observado no se debía a los receptores Fc o al anticuerpo sino directamente de la integrina.

Se conoce que el entrecruzamiento de integrinas en células de carcinoma(37) y fibroblastos (41) induce la fosforilación de residuos de tirosina en proteínas de pesos moleculares entre 110 y 140 kDa. Para conocer el mecanismo mediante el cual se daba la activación de la integrina $\beta 1$ se analizaron los patrones de fosforilación en tirosinas de proteínas de células monocíticas THP-1 estimuladas con anticuerpos contra integrinas $\beta 1$. El patrón de fosforilación obtenido mostró una serie de bandas entre las que se encontraba: una de aproximadamente 180 kDa, la cual podría ser la cadena α del receptor de integrina; una banda de 110 kDa aproximadamente que puede ser la α -actinina. Esta proteína agrupa a la actina e interactúa con las colas citoplásmicas de las integrinas $\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 3$. Así mismo colocaliza con la α -actina en los puntos de adhesión focal. La α -actina al interactuar con las regiones citoplásmicas de las integrinas y con proteínas del citoesqueleto, la convierten en una molécula que puede mediar el flujo de señales entre el medio extracelular y el intracelular. Esta señalización puede intervenir en procesos como la división celular. Otro de los complejos que se pudo observar fue de aproximadamente 70 kDa. Este puede corresponder a la cinasa de tirosinas Syk, la cuál es propia de células hematopoyéticas. Esta cinasa posee regiones SH2. Syk se puede unir a tirosinas fosforiladas de los receptores de células B y T activándose. Además se sabe que Syk es fosforilada cuando los monocitos interactúan con proteínas de la matriz extracelular (29, 55). Syk podría ser la cinasa responsable de fosforilar a MAPK en residuos de tirosina. Acerca del complejo que se observó a 65 kDa pensamos que podría tratarse de paxilina. Esta proteína se encuentra en la membrana del lado citoplásmico y posee regiones SH2 y SH3, lo que la convierte en una molécula capaz de interactuar con otras proteínas y formar complejos convirtiéndose en una proteína adaptadora con capacidad de transmitir señales al citoesqueleto. También se puede tratar de las cinasas de

tirosinas de la familia Src (71), las cuales participan en muchas vías de transducción de señales.

A partir de los patrones de fosforilación obtenidos, uno puede darse una idea por el peso molecular de las bandas, que moléculas que pudieran estar involucradas en la vía de señalización. Pero no se puede afirmar con exactitud ya que existen moléculas que tienen pesos moleculares muy similares y que en un gel de acrilamida podrían tener aparentemente la misma movilidad. Para determinar con mayor exactitud que tipo de moléculas están presentes se pueden realizar inmunoprecipitaciones y ensayos de Western con anticuerpos específicos contra alguna de las moléculas que pensemos pudieran estar involucradas.

Nosotros quisimos determinar si la cinasa de serinas- treoninas MAP participaba en la vía de señalización de las integrinas $\beta 1$. Esto se hizo porque se ha encontrado que las vías de señalización de receptores con actividad de cinasas de tirosinas y las de las integrinas comparten algunas molécula, y tal vez sería el caso de MAPK. Además MAPK es una cinasa muy importante involucrada en procesos como el ciclo celular, proliferación, diferenciación y oncogénesis. Así mismo MAPK puede activar a diversos factores nucleares, entre ellos a NF- κ B.

Para medir la activación de MAPK en la vía de señalización de integrinas $\beta 1$ en monocitos, se pensó en hacer ensayos de Western que detectaran la forma activa de MAPK (fosforilada). Nuestros resultados mostraron que efectivamente la estimulación por integrinas $\beta 1$ sí activa a MAPK. La activación de MAPK no se había demostrado antes en monocitos. Pero este resultado es consistente con lo reportado para otros tipos celulares.

Los datos hasta aquí mostrados nos llevaron a proponer un modelo de la activación del factor NF- κ B inducido por integrinas β 1 (figura 4). Según este modelo el entrecruzamiento de las integrinas β 1 lleva a la fosforilación de proteínas y a la activación de MAPK, la cual podría ser la responsable de la activación del factor nuclear NF- κ B. Este factor a su vez es el responsable de la transcripción de genes tempranos de citocinas proinflamatorias.

La única forma hasta ahora conocida de que MAPK se active es a través de la fosforilación que le produce la cinasa MEK. Este dato, nos llevó a tratar de confirmar si MEK es el componente río arriba de MAPK y NF- κ B. Para realizar esto utilizamos un inhibidor específico de la cinasa MEK (PD98059). Durante el desarrollo de este trabajo de tesis sólo existía el PD98059 como el único inhibidor de MEK, pero ya apareció otro compuesto llamado U026 que es mucho más potente y con una especificidad similar al PD98059. Para confirmar la presencia de MEK se hicieron ensayos de Western anti-fosfotirosinas de lisados celulares estimulados con anticuerpos anti integrinas β 1 e inmunoprecipitados con anticuerpos anti MAPK en presencia del inhibidor.

Los resultados mostraron una fuerte disminución en la fosforilación de MAPK en presencia de PD98059. Estos datos claramente implican a MAPK y a MEK en la vía de señalización de la integrina β 1 (figura 5). Basados en esto propusimos un modelo de activación del factor nuclear NF- κ B donde el entrecruzamiento de integrinas β 1 inducía una serie de eventos bioquímicos (fosforilaciones) que resultaban en la activación de MEK que a su vez activaba a MAPK y posteriormente de NF- κ B (figura 6).

Para confirmar nuestro modelo de la figura 6, decidimos verificar si las cinasas MEK y MAPK eran componentes que se encontraban río arriba de NF- κ B. Para esto se midió la actividad de este factor nuclear en presencia del inhibidor de MEK. Nuestros resultados obtenidos no fueron los esperados según nuestro modelo de la figura 6, el cual predice que la activación del factor nuclear sería inhibida por PD98059. Nuestros datos no mostraron ningún efecto del inhibidor sobre la activación de NF- κ B (figura 7). Para comprobar la funcionalidad del fármaco y descartar que éste no sirviera se realizó un ensayo donde se utilizaron complejos inmunes, los cuáles se conoce que activan a MAPK y MEK en presencia del PD98059. Como se puede apreciar en la figura 8, este fármaco sí funcionaba por consiguiente tanto MEK como MAPK no participaban en la activación de NF- κ B por integrinas β 1. Esto sugería que las integrinas β 1 tiene dos vías de señalización distintas; las cuales producen efectos distintos. Una de estas vías a través de sucesos bioquímicos (fosforilaciones) resultaría en la activación de MEK y de MAPK con otro tipo de respuestas y la otra vía resultaría en la activación del factor NF- κ B de una forma independiente de MAPK. El hecho de que una integrina tenga más de una vía de señalización no ha sido reportado en monocitos. Además este resultado no es raro, si se piensa en la complejidad del comportamiento celular y su enorme regulación para generar muchísimas respuestas. Estos resultados nos llevaron a modificar nuestro modelo de la señalización inducida por integrinas β 1 tal como se muestra en la figura 8.

Existe una gran controversia sobre que molécula podría estar río arriba de MEK, ya que existe evidencia de la participación de Ras y Raf en la activación de MEK (50, 63, 64) y también existe evidencias de que la activación del factor nuclear NF- κ B es independiente de la vía de Ras (10, 51, 52). Un buen candidato de una molécula que podría ser la responsable de la activación de

NF- κ B es la enzima fosfoinositol tres cinasa (PI-3K). Esta idea se basa en experimentos utilizando inhibidores específicos de esta enzima, los cuales parecen inhibir la actividad del factor NF- κ B inducida por la estimulación por integrinas β 1 (Datos no publicados del laboratorio).

Debido a que el citoesqueleto juega un papel importantísimo en diversos procesos celulares incluyendo la transducción de señales, pensamos probar si el citoesqueleto participa en la vía de señalización por integrinas β 1. Esto se realizó porque se conoce que el citoesqueleto puede regular las vías de señalización, ya que muchos componentes de estas vías se encuentran unidos al citoesqueleto. Para esto las células THP-1 se estimularon en presencia de citocalacina B y se midió la activación del factor nuclear NF- κ B. La citocalacina B es un compuesto que impide la formación de filamentos de actina. Nuestros resultados indicaron que al disgregar el citoesqueleto se afecta la activación del factor nuclear NF- κ B (figura 9). Estos resultados implican que el citoesqueleto participa en la vía de transducción de señales mediada por integrinas β 1 que lleva a la activación del factor nuclear NF- κ B. En el caso de los leucocitos el citoesqueleto debe jugar un papel muy importante ya que sufren reorganizaciones en él durante la extravasación y migración al sitio dañado y por consiguiente estas reorganizaciones deben originar o modular determinadas respuestas.

De forma adicional al objetivo principal del trabajo de esta tesis, se pensó en comparar las vías de señalización inducidas por dos tipos de integrinas, las integrinas β 1 y β 2. Esto fue con el fin de confirmar que integrinas diferentes inducen vías de señalización distintas. Un estudio comparativo sobre las vías que activan diferentes tipos de integrinas en el mismo tipo celular no se ha realizado antes. Se escogió investigar a las integrinas β 2 porque no se conoce bien su vía de

transducción de señal y porque son el otro tipo de integrinas presentes en leucocitos. La idea de que diferentes integrinas utilicen vías de señalización distintas surge de que se observan respuestas celulares diferentes cuando una integrina interactúa con fibronectina, a través de integrinas $\beta 1$, o cuando interacciona con otras células, a través de integrinas $\beta 2$. Lo primero que se probó fue si las integrinas $\beta 2$ eran capaces de activar al factor nuclear NF- κ B de igual forma que lo hacían las integrinas $\beta 1$. Nuestros resultados muestran que las integrinas $\beta 2$ sí inducen la activación de este factor nuclear de una manera muy parecida a la activación inducida por integrinas $\beta 1$ (figura 10). Este es el primer estudio que muestra la activación del factor nuclear NF- κ B por integrinas $\beta 2$ en monocitos.

Estos resultados nos permitían concluir que ambos tipos de integrinas utilizan vías de señalización que convergen en la activación de NF- κ B. Esto a su vez sugiere que el hecho de que ambas integrinas activen al mismo factor nuclear no quiere decir que tenga la misma función, incluso puede ser un sitio de modulación entre una y otra vía. La vía de señalización mediada por integrinas $\beta 2$ es poco conocida. Pero con ayuda de técnicas ya estandarizadas para la identificación de moléculas que se sabe participan en la vía de señalamiento de integrinas $\beta 1$, se podrían encontrar algunas moléculas que participan en la vía de señalización mediada por integrinas $\beta 2$.

Para encontrar entonces posibles diferencias entre las vías de señalización de integrinas $\beta 1$ y $\beta 2$ se analizaron patrones de fosforilación en tirosinas de proteínas inducidos por ambos tipos de integrinas. Al comparar el patrón observado por la estimulación de integrinas $\beta 1$ o $\beta 2$ se puede observar que la diferencia entre ellos se encuentra principalmente en las proteínas comprendidas en el rango de 115 a 184 Kda (figura 11). La estimulación con integrinas $\beta 2$

produjo, un patrón de fosforilación en proteínas en un rango de 120 a 184 kDa (figura 11). Tres proteínas fosforiladas llamaron la atención por que no se encontraron fosforiladas al estimular las integrinas $\beta 1$. Una proteína es de aproximadamente 170 kDa, y otras dos proteínas presentan un peso molecular aproximado de 150 y 120 kDa respectivamente. Estos resultados confirmaban que cada integrina posee diferentes vías de señalización, lo cual puede estar relacionado a las diferentes funciones que tienen.

Para determinar si la vía de señalización de integrinas $\beta 2$ compartía algunos de los componentes de la vía de señalización de las integrinas $\beta 1$, decidimos probar la actividad de MAPK después de la estimulación por integrinas $\beta 2$. Se hicieron ensayos de Western contra la forma activa de MAPK (figura 12), encontrando que el entrecruzamiento de integrinas $\beta 2$ no activó a MAPK. Más aún, parecía incluso que esta estimulación inhibía la activación basal de MAPK (figura 12). Éstos resultados nuevamente apoyan el concepto de la modulación que existe entre las vías de señalamiento. Los ensayos de Western anti-MAPK activada no son una forma directa de medir la actividad de esta enzima, sería recomendable hacer ensayos de cinasa in vitro con inmunoprecipitados de MAPK a partir de lisados de células estimuladas a través de ambas integrinas.

Ya que la participación de MAPK en la vía de señalización mediada por integrinas $\beta 2$ era poco probable, ya que no se detectó en los blots anti MAPK activada, decidimos comprobarlo midiendo la activación del factor nuclear NF- κ B. Tal como esperábamos la activación del factor nuclear NF- κ B no resultó afectada por el inhibidor de MEK (PD98059).

Analizando la activación del factor nuclear NF- κ B después de la estimulación por ambos tipos de integrinas, encontramos que ni MAPK, ni MEK participan en la vía de señalización inducida por integrinas que lleva a la activación de NF- κ B (figura 13). Entonces ambos tipos de integrinas utilizan una vía independiente a MAPK para inducir la activación del factor nuclear NF- κ B (figura 14). En el caso de las integrinas β 2, no se conoce el papel que tendría la activación del factor nuclear NF- κ B. Este podría ser un punto de modulación entre ambas integrinas.

11. Conclusiones

- Las integrinas $\beta 1$ en células monocíticas presentan vías de señalización distintas a las integrinas $\beta 2$
- Las integrinas $\beta 1$ tienen dos vías de señalización distintas en células monocíticas THP-1. Una de ellas induce la fosforilación de tirosinas en proteínas y la subsecuente activación de MEK y MAPK. La otra vía lleva a la activación del factor NF- κ B y por consiguiente a la expresión de genes tempranos de una manera independiente a MAPK pero dependiente del citoesqueleto.
- Las integrinas $\beta 2$ son capaces de activar al factor nuclear NF- κ B de una forma independiente de MAPK y MEK

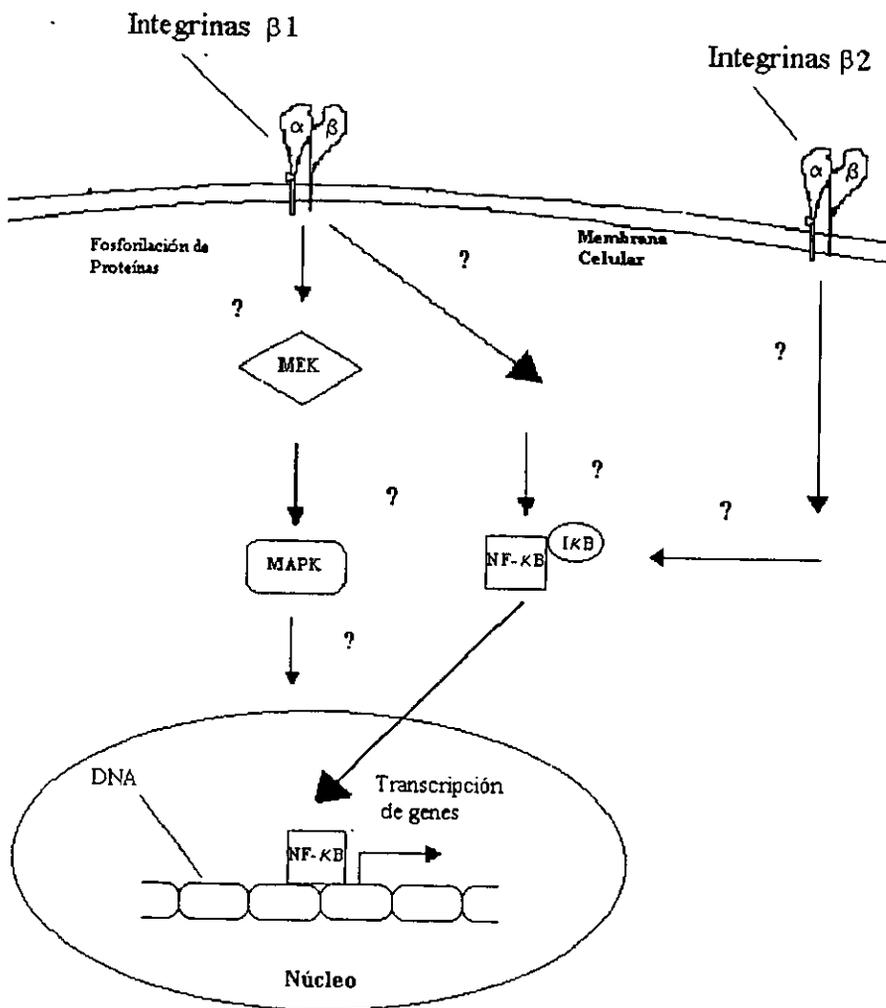
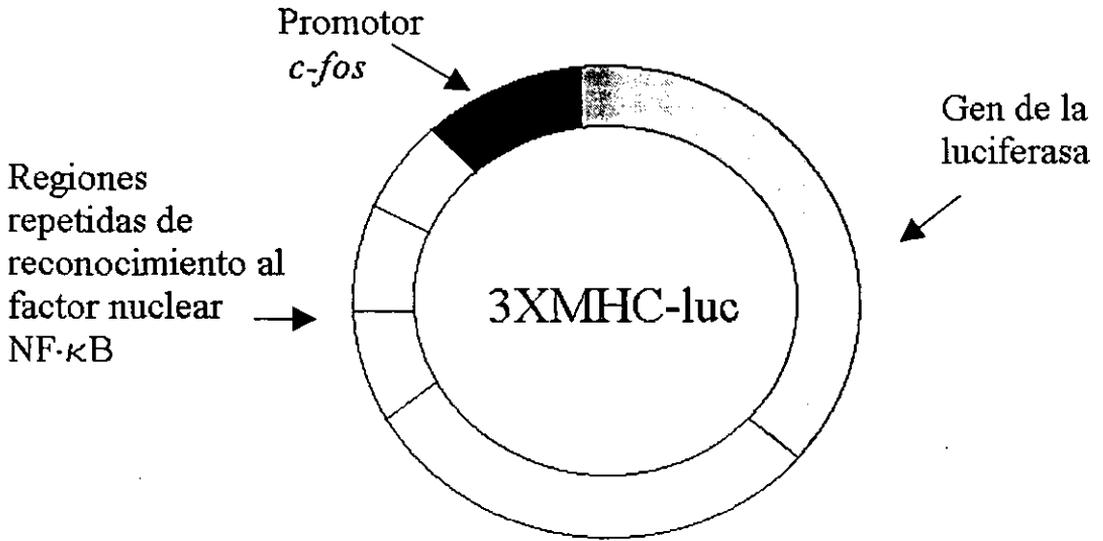


Figura 15. Modelo propuesto de las vías de señalización mediada por integrinas $\beta 1$ y $\beta 2$ en monocitos, basados en los resultados de esta tesis.

Apéndice I



Estructura del plásmido 3XMHC-luc. Los sitios de reconocimiento al factor NF-κB están constituídos por tres octámeros de guaninas del H-2K^b (65).

12. Bibliografía

1. Abbas A., Lichtman A., y Pober J. (1997). Cellular and Molecular Immunology, third edition. (S. Company). Philadelphia ,Pensilvania.
2. Roitt I. (1988). Essential Immunology. Sixth eddition. (B. Well). Oxford.
3. Janeway A. C., Travers P., Walport M., y capra J. D. (1999). Immunobiology. Fourth. (E. S. Garland). New York.
4. Unkeles J. C. (1989). Function and heterogeneciety of human Fc receptor of human immunoglobulin G. *J.Clin.Invest.* **83**: 355.
5. Anderson. (1996). Inflammation. En, 1. Anderson´s Pathology. (Mosby, ed.), St. Louis Missouri,
6. Fiebig E., Ley K., y Arfos K. (1991). Rapid leukocyte accumulation by spontaneous rolling and adhesion in the exteriorized rabbit mesentery. *Int. J. Microcirc. Clin. Exp.* **10**: 127-144.
7. Springer T. A. (1990). Adhesion receptors of the inmune system. *Nature.* **346**: 425-434.
8. Springer T. A. (1994). Traffic signal for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell.* **76**: 301-314.
9. Rosales C., y Juliano R. (1995). Signal transduction by cell adhesion receptors in leukocyte. *J. Leukocyte. Biol.* **57**: 189-198.
10. Rosales C., O'Brien V., Kornberg L., y Juliano R. (1995). Signal transduction by cell adhesion receptors. *Biochem. Biophy. Acta.* **1242**: 77-98.

**ESTA TESTIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

11. Aplin A. E., Howe A., Alahari S. K., y Juliano R. (1998). Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: The Role of integrins, cadherins, immunoglobulin - cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol. Rev.* **50**: 197-263.
12. Hynes R. O. (1992). Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell.* **69**: 11-25.
13. Meredith J. J., Takada Y., Fornaro M., Languino L. R., y Schwarts M. A. (1995). Inhibition of cell cycle progression by the alternatively spliced integrin Beta 1c. *Science.* **269**: 1570-1572.
14. Phillips D. R., Charo I. F., Parise L. V., y Fitzgerald L. A. (1988). The platelet membrane glycoprotein IIb IIIa complex. *Blood.* **71**: 831-843.
15. Clark E. A., y Hynes R. O. (1996). Ras activation is necessary for integrin mediated activation of extracellular signal - regulated Kinase 2 and cytosolic Phospholipase A2 but no for cytoskeletal organization. *J. Biol. Chem.* **271**: 14814-14818.
16. Geng J. G., Bevilacqua M. P., Moore K. L., McIntyre T. M., Prescott S. M., Kim J. M., Bliss G. A., Zimmermann G. A., y McEver R. P. (1990). Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140. *nature.* **343**:
17. Eierman D. F., Johnson C. E., y Haskill J. S. (1989). Human monocyte inflammatory mediator gene expression is selectively regulated by adherence substrates. *J. Immunol.* **142**: 1970-1976.
18. Lo S. K., Van Seventer G. A., Levin S. A., y Wright S. D. (1989). Two leukocyte receptors (CD11a/CD18 and CD11b/CD18) mediated transient adhesion to endothelium by binding to different ligands. *J. Immunol.* **143**: 3325-3329.

19. Kuijpers T. W., Hakkert B. C., Van Mourik J. A., y Ross D. (1990). Distinct adhesive properties of granulocyte and monocyte to endothelial cells under static and stirred conditions. *J. Immunol.* **145**: 2588-2594.
20. Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Keith R., y Watson J. (1983). *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing. New York.
21. Darnell J., Lodish H., y Baltimore D. (1993). *Molecular Cell Biology*. Scientific american Books.
22. Carpenter G. (1987). Receptor for epidermal growth factor and other polypeptide mitogens. *Annu.Rev. Biochem.* **56**: 881-914.
23. Dawson T., y Gish G. (1992). SH2 and SH3 : Form structure to function. *Cell.* **71**: 359-362.
24. Rosakis-Adcock M., Fernley R., Wade J., Pawson T., y Bowtell D. (1993). The SH2 and SH3 domains of mammalian Grb2 couple the EGF receptor to the Ras activator protein Msos. *Nature.* **363**: 83-85.
25. Simon M. A., Dodson G. S., y Rubin G. M. (1993). A SH3 SH2 SH3 protein is required for p21 Ras l activation and binds to sevenless and Sos protein in vitro. *Cell.* **73**: 169-177.
26. Wood K. W., Sarnacki C., Roberts T. M., y Blenis J. (1992). Ras mediated nerve growth factor receptor modulation of three signal transduction proteins kinases: MAP Kinase, Raf-1 and RSK. *Cell.* **68**: 1041-1050.
27. Kyriakis J. M., App H., Zhang X. F., Banerjee P., Brautigan D. L., Rapp V. R., y Avruch J. (1992). Raf-1 activates MAP kinase kinase. *Nature.* **358**: 417-421.

28. Kyriakis J. M., force T. L., Rapp V. R., Bonnentre J., y Avruch J. (1993). Mitogen regulation of c- Raf protein kinase activity toward Mitogen Activated Protein Kinase Kinase. *J. Biol. Chem.* **268**: 16009-16019.
29. Lin T. H., Rosales C., Mondal K., Bolen J. B., Haskill S., y Juliano R. L. (1995). Integrin mediated tyrosine phosphorylation and cytokine message induction in monocytic Cells: A possible signaling role for Syk tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* **270**: 16189-16197.
30. Darnell J. E., Kur I. M., y Sterk G. R. (1994). Jak-Stat pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signalling proteins. *Science.* **204**: 1415-1421.
31. Shual K., Ziemiecki A., Wilks A. F., Harper A. G., Sadowski H. B., Gilman M. Z., y Darnell J. E. (1993). Polypeptide signalling to the nucleus through tyrosine phosphorylation of Jak - STAT protein. *Nature.* **366**: 580-583.
32. Wrange U., y Gustafsson J. A. (1978). Separation of the hormone and DNA binding sites of the hepatic glucocorticoid receptor by means of proteolysis. *J. Biol. Chem.* **253**: 856-865.
33. Beato M. (1989). Gene regulation by steroid hormones. *Cell.* **56**: 335-344.
34. Schwartz M. A., Lechene C., y Ingberg D. E. (1991). Insoluble fibronectin activates the Na/H antiporter by clustering and immobilizing integrin $\alpha 5\beta 1$ independent of cell shape. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**: 7849-7853.
35. Schwartz M. A. (1993). Spreading of human endothelial cells on fibronectin or vitronectin triggers elevation of intracellular calcium. *J. Cell. Biol.* **120**: 1003-1010.
36. Nathan C., y Sanchez E. (1990). The Activation dependent adhesion of macrophages to laminin involves cytoskeletal anchoring and phosphorylation of the $\alpha 6\beta 1$. *J. Cell. Biol.* **111**: 2171-2181.

37. Kornberg L. S., Earp H. S., Tusner C. E., C P., y Juliano R. L. (1991). Signal transduction by integrins: increased protein tyrosine phosphorylation caused by clustering beta 1 integrins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **88**: 8392-8396.
38. Juliano R. L., y Haskill S. (1993). Signal transduction from the extracellular matrix. *J. Cell. Biol.* **120**: 577-585.
39. Kornberg L., Earp H. S., Parsons J. T., Schaller M., y Juliano R. L. (1992). Cell adhesion or integrin clustering increase phosphorylation of Focal Adhesion Tyrosine-Kinase. *J. Biol. Chem.* **267**: 23439-23442.
40. Guan J., y Sholloway D. (1992). Regulation of Focal Adhesion- Associated Protein Tyrosine Kinase by both cellular adhesion and oncogenic transformation. *Nature*. **358**: 690-692.
41. Burridge K., Turner C. E., y Romer L. H. (1992). Tyrosine phosphorylation of Paxillin and pp125 FAK accompaines cell adhesion to extracellular matrix, a role in cytoskeletal assembly. *J. Cell. Biol.* **119**: 893-903.
42. Kanner S., Reynolds A. B., Vines R. R., y Parsons J. T. (1990). Monoclonal antibodies to individual tyrosine-phosphorylated protein substrates of oncogene -encoded tyrosine kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **87**: 3328-3332.
43. Parsons J. T., y Parsons C. G. (1997). Src family proteins tyrosine kinases: cooperating with growth factor and adhesion signalling pathways. *Curr.Opin.Cell.Biol.* **9**: 187-192.
44. Hanks S. K., Calalb M. B., Harper M. C., y Patel S. K. (1992). Focal Adhesion Protein Tyrosine Kinase phosphorylated in response to cell spreading on fibronectine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **89**: 8487-8491.

45. Schaller M. D., Borgman C. A., Cobb B. S., Vines R. R., Reynolds A. B., y Parsons J. T. (1992). pp125 FAK, a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**: 5192-5196.
46. Schaller M. D., Otey C. A., Hildebrand J. D., y Parsons J. T. (1995). Focal adhesion kinase and paxillin bind to peptides mimicking beta integrins cytoplasmic domains. *J. Cell. Biol.* **130**: 1181-1187.
47. Calab M. B., Pulte T. R., y Hank S. K. (1995). Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: A role for Scr family kinases. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 954-963.
48. Songyang Z., Shoelson S. E., Chaudhuri M., Gish G., Pawson T., King F., Roberts T., Ratfnosky S., y Leichleider R. J. (1993). SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell.* **72**: 767-778.
49. Schaller M. D., Hildebrand J. D., Schannon J. D., Fox J. W., Vines R. R., y Parson J. T. (1994). Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp 125 FAK directs SH2 dependent binding of ppSrc. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 1680-1688.
50. Hunter T., y Karen M. (1992). The Regulation of transcription by phosphorylation. *Cell.* **70**: 375-387.
51. Chen Q., Lin T. H., Der C. J., y Juliano R. L. (1996). Integrin mediated activation of MEK and Mitogen Activated Protein Kinase is dependentt of Ras. *J. Biol. Chem.* **271**: 18122-18127.
52. Rosales C., y Juliano R. (1996). Integrin signalling to NFκB in monocytic leukemia cells is blocked by activated oncogenes. *Cancer Res.* **56**: 2302-2305.

53. Chen H. C., y guan J. L. (1994). Association of the Focal Adhesion Kinase with its potential substrate Phosphatidylinositol 3- Kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **91**: 10148- 10152.
54. Wang J. Y. L. (1994). ABL tyrosine kinase in signal transduction and cell cycle regulation. *Curr. Opin. genet. Dev.* **3**: 35-43.
55. Lin T. H., Yurochko A., Kornberg L., Morris J., Walker J. J., Haskill S., y Juliano R. L. (1994). The Role of protein tyrosine phosphorylation in integrin - mediated gene induction in monocytes. *J. Cell. Biol.* **126**: 1585 - 1593.
56. Lin T. H., Aplin A. E., Shen Y., Chen Q., Schaller M., Romer L., Aukhil I., y Juliano R. L. (1997). Integrin mediated activation of MAPK is independent of FAK. *J. Cell. Biol.* **136**: 1385-1395.
57. Ruen X. D., Bokoch G. M., Traynor- Kaplan A., Jenkins G. H., Anderson R. A., y Schwartz M. A. (1996). Physical association of the small GTPase Rho with 68 KDa phosphatidylinositol 4-phosphate 5- kinase in swiss 3T3 cell. *Mol. Biol. Cell.* **7**: 435-442.
58. Aurer K. L., y Jacobson B. S. (1995). $\beta 1$ Integrins signal lipid second messenger required during cell adhesion. *Mol. Biol. Cell.* **6**: 1305-1313.
59. Dedhar S. (1997). Regulation of anchorage - independent cell cycle progression and fibronectin assembly by the integrin linked kinase (ILK). 74. Keystone, Colorado.
60. Ahn N. G., Seger R., y Krebs E. G. (1992). The Mitogen Activated Protein Kinase activation. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **4**: 992-999.
61. Bershadsky A., Chausovsky A., Becker E., Lyubimova A., y Gaiger B. (1996). Involvement of microtubules in the control of adhesion - dependent signal transduction. *Curr. Biol.* **6**: 1279-1289.

62. Divecha N., y Irvine R. F. (1995). Phospholipid signaling. *Cell*. **80**: 269-278.
63. Schälaepfer D., Hanks S. K., Hunter T., y van der Geer P. (1994). Integrin mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to Focal Adhesion Kinase. *Nature*. **372**: 786-791.
64. Schalaepfer D. a. H. T. (1996). Evidence for in vitro phosphorylation of GRAB2 SH2-domain binding site on Focal Adhesion Kinase by Src - family protein tyrosine kinases. *Molec. Cell . Biol*. **16**: 5623-5633.
65. Scheinman R., Beg, A., Baldwin, A. (1993). NF- κ B p100 (Lyt-10) is a component of H2TF1 and can function as an I κ B- like molecule. *Molec.Cell.Biol*. **13**: 6089-6101.
66. Alessi D. R., Cuenda A., Cohen P., Dudley D. T., y Saltiel A. R. (1995). PD98059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase in vitro and in vivo. *J.Biol.Chem*. **270**: 27489-27494.
67. Sanchez-Mejorada G., y Rosales C. (1998). Fc γ receptor mediated mitogen activated protein kinases activation in monocytes is independent of Ras. *J.Biol. Chem*. **273**: 27610-27619.
68. Berk B. C., Corson M. A., Peterson T. E., y H T. (1995). Protein kinases as mediators of fluid shear stress stimulate signal transduction in endothelial cells: A hypotesis for calcium-dependent and calcium- independent events by flow. *J. Biomech*. **28**: 1439-1450.
69. Ishida T., Peterson T. E., Kovach N. L., y Berk B. C. (1996). MAP Kinase activation by flow in endothelial cells: Role of B1 Integrins and tyrosine kinases. *Circ. Res*. **79**: 310-316.
70. Haskill S., Jhonson C., Eirman D., Becker S., y K W. (1988). Adherence induces selective mRNA expression of monocyte mediators and proto- oncogenes. *J. Immunol*. **140**: 1690-1694.

71. Erpel T., y Court S. (1995). Src family protein tyrosine kinase and cellular signal transduction pathways. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 7: 176-182.