



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

Activación diferencial de la MAP cinasa p38 entre  
macrófagos susceptibles y resistentes a la Toxina Letal de  
*Bacillus anthracis*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

LAURA MONTERO LEÓN

T U T O R

DR. MARTÍN GUSTAVO PEDRAZA ALVA



2008



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

Director de Tesis

Dr. Martín Gustavo Pedraza Alva

Comité tutorial

Dr. José Luis Puente García

Dr. Luis Felipe Jiménez García

Dr. Ismael Secundino Velásquez

Dra. María Alejandra Bravo de la Parra

Agradecemos el apoyo de CONACyT y DGAPA

# ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN .....	4
1.1 Sistema Inmune .....	4
1.2 El Macrófago .....	6
1.3 Receptores Tipo Toll.....	7
1.3.1 Toll-Like Receptor 2.....	9
1.3.2 Toll-Like Receptor 4.....	10
1.4 Receptores Tipo Nod.....	11
1.4.1 Receptores NOD1 y NOD2 .....	13
1.5 Cascada de señalización de las MAPK.....	13
1.7 Cascada de señalización de NFκB.....	16
1.8 El Inflamosoma .....	19
1.9 El Ántrax .....	21
2. HIPÓTESIS.....	26
3. OBJETIVOS .....	26
4. METODOLOGÍA.....	27
4.1 Anticuerpos.....	27
4.2 Purificación de macrófagos.....	27
4.3 Estimulación celular .....	27
4.4 Extractos totales.....	28
4.5 Extractos nucleares .....	28
4.6 Inmunoblot.....	29
4.7 ELISA .....	29
4.8 EMSA .....	31
4.9 Citometría de flujo.....	31
5. RESULTADOS.....	33
5.1 Activación diferencial de la MAP cinasa p38 en macrófagos de ratones susceptibles y resistentes. ....	33
5.2 Activación de NFκB en macrófagos susceptibles y resistentes a la toxina letal.....	34
5.3 Niveles de expresión de TLR2, TLR4, MKK3, MKK6 y NOD2 en macrófagos susceptibles y resistente a la toxina letal de <i>B. anthracis</i> . ....	36
5.4 La pre-estimulación con componentes bacterianos potencia la secreción de IL-1β mediada por la TL de <i>B. anthracis</i> en macrófagos susceptibles. ....	39
5.5 Activación diferencial de distintos substratos de la MAP cinasa p38 en macrófagos susceptibles y resistentes a la toxina letal de <i>B. anthracis</i> . ....	43
6. DISCUSIÓN.....	47
7. CONCLUSIONES.....	52
8. REFERENCIAS.....	53
ABREVIATURAS.....	3
ÍNDICE.....	1
RESUMEN .....	2

## RESUMEN

El ántrax es una enfermedad crónica y algunas veces letal de animales y humanos causada por la ingestión de esporas de *Bacillus anthracis*. A pesar de que los principales factores de virulencia de *B. anthracis* y su genoma ha sido secuenciado, la manera en que ántrax mata a su hospedero aún se desconoce.

La susceptibilidad a la toxina letal de *B. anthracis* es regulado por diversos factores genéticos, de acuerdo con esto existen cepas de ratones susceptibles o resistentes a la toxina letal. Estudios *in vivo* muestran que los macrófagos son las células efectoras que median la letalidad a la toxina letal, ya que ratones susceptibles carentes de macrófagos, adquieren resistencia a la muerte inducida por la toxina letal. *In vitro*, se ha mostrado que la citólisis de macrófagos susceptibles inducida por la toxina letal involucra la inactivación de la vía de señalización de la MAP cinasa p38 y la activación de caspasa-1.

Aquí mostramos que componentes de bacterias Gram-negativas (LPS), Gram-positivas (LTA) y bacterias intracelulares (MDP) regulan de manera diferencial la activación de la MAP cinasa p38 en macrófagos susceptibles y macrófagos resistentes. Consistente con esto, encontramos que en respuesta a LPS y LTA la MAP cinasa p38 fosforila de manera diferencial distintas proteínas en macrófagos susceptibles y resistentes a la toxina letal. Sin embargo, la activación de p38 en macrófagos inducida por diversos componentes bacterianos predispone específicamente a los macrófagos susceptibles a los efectos de la toxina letal. Lo cual sugiere que la fosforilación de sustratos específicos por p38 en macrófagos resistente podría regular de manera directa o indirecta la actividad de Caspasa-1 y/o la expresión de diversos genes que promuevan la sobrevivencia celular. Todo lo anterior indica que la MAP cinasa p38 juega un papel importante en la susceptibilidad o resistencia a la toxina letal de *B. anthracis*.

## ABREVIATURAS

AP	Antígeno Protector
FE	Factor Edemático
FL	Factor Letal
IL	Interleucina
LPS	Lipopolisacárido
LTA	Ácido lipoteicoico
MAPK	Proteínas cinasas activadas por mitógenos
MDP	Muramil Dipéptido
NFκB	Factor Nuclear κB
NLR	Receptores tipo Nod
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
PRR	Receptores de reconocimiento de patrones
TL	Toxina Letal
TLR	Receptores tipo Toll
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Sistema inmune

El Sistema Inmune (SI) tiene la capacidad de mantener la homeostasis del organismo, esta capacidad se debe a la propiedad que éste posee de distinguir entre antígenos propios y no propios. Una vez que detecta a un microorganismo, el SI enlista la participación de una variedad de células y moléculas para generar una respuesta apropiada, y así eliminar o neutralizar al microorganismo.

El SI en vertebrados se divide en dos categorías, el SI innato y SI adaptativo. El SI innato detecta la presencia y la naturaleza de la infección, controlando el inicio y determinando la respuesta inmune, siendo así la primera línea de defensa del organismo. Los componentes principales de la inmunidad innata son: barreras físicas y químicas, como epitelios, sustancias antimicrobianas y pH producidas en las superficies epiteliales; células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos) y células asesinas naturales (NK, del inglés Natural Killer); proteínas sanguíneas, entre las que se incluyen miembros del sistema del complemento y otros mediadores de la inflamación; y proteínas denominadas citocinas, que regulan y coordinan muchas de las acciones de las células que intervienen en la inmunidad celular. Una respuesta inmune específica, como la producción de anticuerpos contra un patógeno particular, es conocida como respuesta inmune adaptativa, debido a que ésta ocurre durante el tiempo de vida de un individuo como una adaptación contra la infección del patógeno [1]. Los componentes de la inmunidad adaptativa son los linfocitos T y B. Los linfocitos B responden a los antígenos diferenciándose en células productoras de anticuerpos; mientras que algunos linfocitos, como los linfocitos T citotóxicos, promueven la destrucción intracelular de microbios y la lisis de células infectadas por virus. Otros, como los linfocitos T cooperadores o Th (del inglés, T helper), secretan citocinas cuya función es promover la activación,

proliferación y diferenciación de células T, así como de otras células incluyendo células B y macrófagos.

Se han identificado cuatro subpoblaciones funcionales de linfocitos cooperadores, llamadas Th1, Th2, Th17 y T<sub>Reg</sub>, las cuales producen distintos patrones de citocinas. Las células Th1 participan en la respuesta contra bacterias intracelulares, secretan IL-2 e INF $\gamma$ , el cual está involucrado en la respuesta inflamatoria mediada por monocitos/macrófagos. Mientras que las células Th2 confieren protección contra helmintos y producen IL-4, IL-5 e IL-13, fortalecen la producción de anticuerpos y promueven la proliferación y función de las células cebadas y eosinófilos. Las células Th17 secretan IL-17 e IL-22 están involucradas en la respuesta a bacterias extracelulares, y células T<sub>Reg</sub> que regulan la respuesta de los linfocitos T mediante la producción de IL-10 y TGF- $\beta$  [2].

## **1.2 El macrófago**

Aquí nos enfocaremos a ciertos aspectos de la inmunidad innata. Los mecanismos que utiliza la inmunidad innata se presentan antes de que tenga lugar un encuentro con los microorganismos del ambiente, y son activados rápidamente por estos posibles patógenos antes de que se desarrolle la respuesta inmune adaptativa. De las células que componen el SI innato, los macrófago juegan un papel de gran importancia en el SI. Los macrófagos y monocitos circulantes en sangre forman parte del sistema fagocítico mononuclear. Los monocitos circulan en la sangre cerca de 8 horas, tiempo durante el cual aumentan su tamaño (ya que adquieren más organelos, especialmente lisosomas) y migran a los tejidos, donde se diferencian en macrófagos tejido específicos. Algunos macrófagos toman residencia en tejidos particulares, mientras que otros permanecen motiles y son llamados libres o vagabundos.

Los macrófagos juegan un papel indispensable en la homeostasis y la defensa en la inmunidad innata y adquirida, contribuyen en la fagocitosis y subsecuente degradación de células apoptóticas, microorganismos y posiblemente células

neoplásicas (1) y producen citocinas que reclutan y activan a otras células inflamatorias. Los macrófagos colaboran con las células T, ya que al ser estimulados por éstos, se activan y destruyen a los microorganismos fagocitados. En el caso de las células B, los anticuerpos producidos por estas células o miembros del complemento se unen al antígeno, lo cual ayuda a que los macrófagos puedan fagocitarlo con mayor eficiencia. La activación de los macrófagos puede ser pro-inflamatoria o anti-inflamatoria, contribuyendo a la destrucción del tejido o a la regeneración de una herida, respectivamente. Así, los macrófagos juegan un papel esencial en iniciar, instruir y terminar la respuesta inmune adaptativa (4).

Los macrófagos pueden ser clasificados en dos principales grupos: Macrófagos clásicamente activados (M1), donde los estímulos de activación son  $INF\gamma$  y LPS, y los macrófagos activados alternativamente (M2), que son subdivididos en M2a (obtenidos después de la exposición a IL-4 o IL-13), M2b (complejos inmunes en combinación con IL-1 $\beta$  o con LPS) y M2c (IL-10, TGF $\beta$  o glucocorticoides). Los macrófagos M1 exhiben potentes acciones microbicidas y promueven una fuerte respuesta Th1 mediada por IL-12, aunque macrófagos M2 apoyan las funciones efectoras asociadas a Th2. Más allá de la infección los macrófagos M2 juegan un papel importante en la resolución de la inflamación a través de su capacidad de endocitosis y la síntesis de factores trópicos, acompañada por una reducida secreción de citocinas pro-inflamatorias. Los macrófagos asociados a tumores muestran funciones similares [3].

Los macrófagos reconocen a los patógenos a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, del inglés pattern recognition receptors) que detectan componentes microbianos altamente conservados, llamados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, del inglés pathogen-associated molecular patterns). Estos PAMPs representan moléculas vitales para la sobrevivencia de los microorganismos, tales como flagelina, estructuras únicas de

los ácidos nucleicos de bacterias y virus (CpG, DNA, dsRNA), lipopolisacárido (LPS), ácido lipoteicoico (LTA) y la peptidoglicana (PGN), entre otros [4].

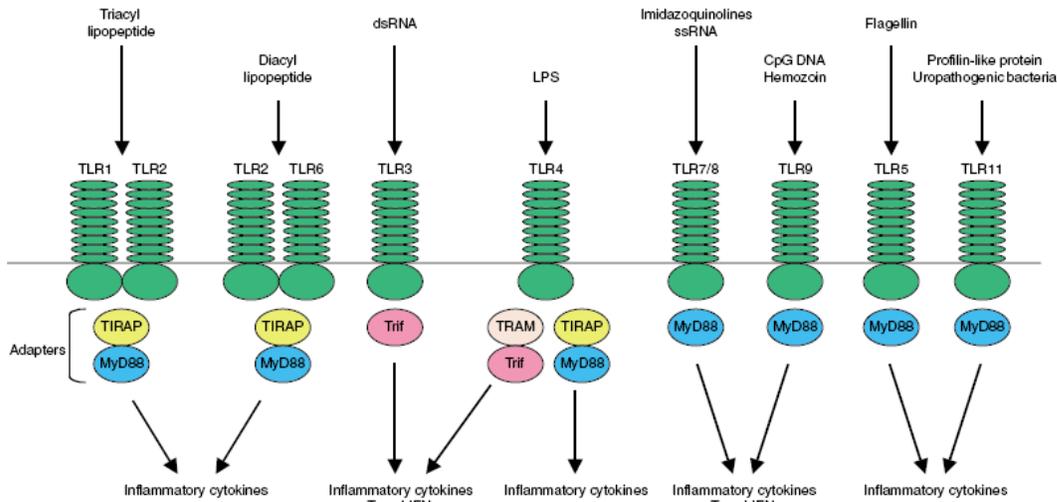
### **1.3 Receptores tipo Toll**

Los receptores tipo toll de mamíferos (TLR, del inglés Toll-like receptor) que se encuentran en la superficie celular y dentro de endosomas, han sido reconocidos por su habilidad de reconocer una amplia serie de agonistas [5]. Estos receptores funcionan como reguladores clave de la inmunidad innata y adaptativa. Los TLRs son receptores transmembranales tipo I, los cuales son expresados en numerosos tipos celulares incluyendo macrófagos y células dendríticas. Estos funcionan como receptores de reconocimiento de patógenos (PPRs), reconociendo patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) [6].

Los macrófagos de ratón expresan un total de 13 TLRs [7]. Los TLRs son caracterizados por la presencia de un dominio extracelular rico en repeticiones de leucina (LRR) y un dominio de receptor Toll/IL-1 intracelular (TIR), [8] (Fig. 1).

El dominio LRR está involucrado en el reconocimiento del agonista y la transducción de señales, confiriéndole a cada TLR una especificidad distinta por los PAMPs, llevando así a la activación específica de una vía de señalización. La porción del dominio TIR del TLR es requerida para la señalización intracelular. Este dominio TIR se expande cerca de 200 aminoácidos, su secuencia varía entre los distintos miembros de la familia. Tres cajas particulares pueden ser identificadas, las cuales están altamente conservadas en los distintos miembros de la familia. La caja1 (FDAFISY) es considerada la secuencia firma de la familia, en la caja 2 (GYKLC—RD—PG) y 3 (con un aminoácido W alrededor de aminoácidos básicos) se encuentran aminoácidos críticos para la señalización [9].

Interesantemente, se han reportado polimorfismos en ciertos TLRs y en los adaptadores de la vía que confieren susceptibilidades a enfermedades infecciosas [10].



**Fig. 1. Receptores tipo Toll.** Representación esquemática de los miembros de la familia de receptores tipo toll, así como sus agonistas y la vía de señalización que desencadenan [5].

En este trabajo nos centramos en la respuesta obtenida por dos de estos receptores, pues es de nuestro interés la señalización que desencadenan los agonistas de TLR2 y TLR4.

### 1.3.1 Toll-Like Receptor 2

TLR2 reconoce al ácido lipotecoico de bacterias Gram-positivas, además de lipoproteínas y lipopéptidos de un amplio rango de patógenos incluidos *Borrelia burgdorferi*, *Treponema pallidum*, *Mycoplasma fermentans*, *Staphylococcus aureus*, lipoarabinomano presente en la pared celular de micobacterias y porinas presentes en *Nesseria* spp. y anclas de GPI y glicoinositosfosfolípido de *Tripanosoma cruzi* [11-14]. Ya que TLR2 tiene la habilidad de heterodimerizar con TLR1 y TLR6, su rango de detección incrementa [12, 13]. Las lipoproteínas que son triaciladas son reconocidas por TLR1/TLR2 [15]. El heterodímero TLR2/TLR6 responde a lipopéptidos diacilados y también puede responder a Zimosan un

componente de la membrana celular de hongos [16, 17]. Los resultados obtenidos con células deficientes en la expresión de TLR2 sugieren que éste actúa en general como un receptor de componentes de bacterias Gram positivas [15, 18]. La señalización a través de TLR2 es dependiente de MyD88 (del inglés, myeloid differentiation factor 88), resultando en la activación de la vía de las MAP cinasas (del inglés, Mitogen-Activated Protein) y el factor transcripcional NFκB que lleva a la inducción de citocinas inflamatorias [19].

### 1.3.2 Toll-Like Receptor 4

El lipopolisacárido es el mayor componente de la membrana externa de bacterias Gram-negativas. Este es un potente inmunoestimulador y es la molécula causante del shock endotóxico. LPS está constituido por el lípido A, el cual es el componente endotóxico, un corazón de oligosacárido y un antígeno O. LPS se une a la proteína de unión de LPS en el suero (LBP), la cual transfiere los monómeros de LPS a CD14 (glicoproteína anclada a glicosilfosfatidil inositol (GPI), la cual concentra a LPS permitiendo la unión al complejo TLR4/MD2 [20, 21] (Fig. 2).

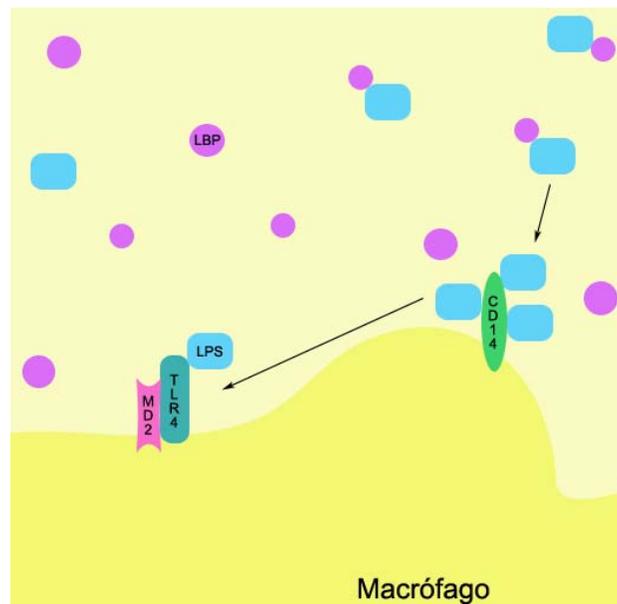


Fig 2. Unión de LPS al complejo TLR2/MD2

En respuesta al LPS, la vía de señalización dependiente de MyD88 induce la activación del factor transcripcional NFκB, el cual regula la transcripción de citocinas proinflamatorias, tales como el factor de necrosis tumoral (TNF)-α, IL-1 e IL-6. Éste también puede activar a las MAPKs, notablemente p38 y la cinasa del N-terminal JUN (JNK). Estas cinasas están involucradas en la transcripción de genes y también regulan la estabilidad de mRNA [22].

LPS puede activar también la transcripción de IRF 3 (del inglés, INF-regulatory factor), llevando a la expresión de interferones tipo I (INFα/β) y otros genes son inducidos por INF independiente de MyD88 y Mal (del inglés, MyD88 adaptor-like molecule) [23-25]. Esta expresión se efectúa mediante la activación independiente de MyD88, induciendo el reclutamiento de otra molécula adaptadora –TRIF-.

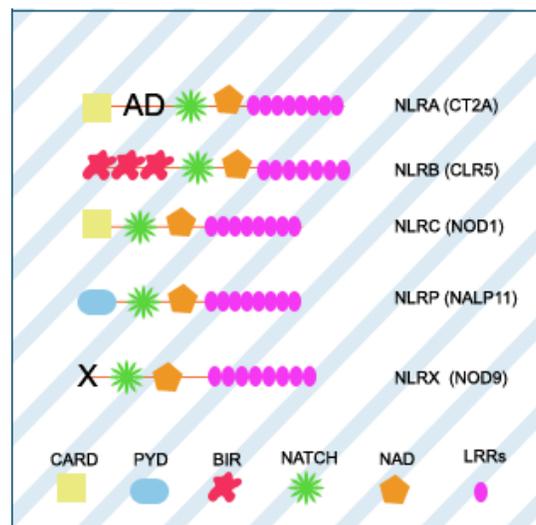
TLR4 es también capaz de responder a patógenos fungales, como *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans*, además de taxol, la proteína de fusión del virus sincital respiratorio e interesantemene al ácido lipoteicoico (LTA) [26-30].

Aunque TLR2 Y TLR4 muestran la misma vía de señalización río abajo, e inducen algunas de las mismas citocinas como IL-1 y TNFα, existen evidencias que sugieren que sus caminos de señalización divergen para inducir distintos grupos de genes inflamatorios. Por ejemplo, la activación de TLR4 induce la expresión de RNA mensajeros de IL-12p40, IL-6 e INFγ, mientras que TLR2 no es capaz de inducir la expresión de estos mismos genes, favoreciendo la inducción de IL-12p35 sobre IL-12p40 [19]. Estas diferencias pueden ser atribuidas a diferencias en la intensidad (ya sea por una mayor o menor afinidad por su agonista) de las señales mediadas por TLR2 y TLR4 o pueden deberse a que TLR2 heterodimeriza con TLR1 y TLR6 [31].

#### **1.4 Receptores tipo Nod**

Otro tipo de PRRs son los receptores tipo Nod (NLR, del inglés Nod-like receptor), éstos comprenden una amplia familia de PRRs intracelulares que son caracterizados por la presencia de un dominio NOD (del inglés, nucleotide-binding and oligomerization domain) requerido para la unión de nucleótidos y auto-oligomerización [32]. En general la organización de estas proteínas incluye: en el extremo N-terminal, una región de unión efectora involucrada en la interacción proteína-proteína: el dominio de reclutamiento de Caspasa (CARD), el dominio de pirina (PYD), que regula las interacciones hemofílicas de proteína-proteína, o un dominio de repeticiones del inhibidor de baculovirus (BIR); un dominio central de NOD cuya función es la oligomerización y finalmente en el extremo C-terminal una serie de repeticiones ricas en leucinas (LRR), que constituyen el motivo para detectar patrones conservados de microorganismos y para modular la actividad de los NLRs [33].

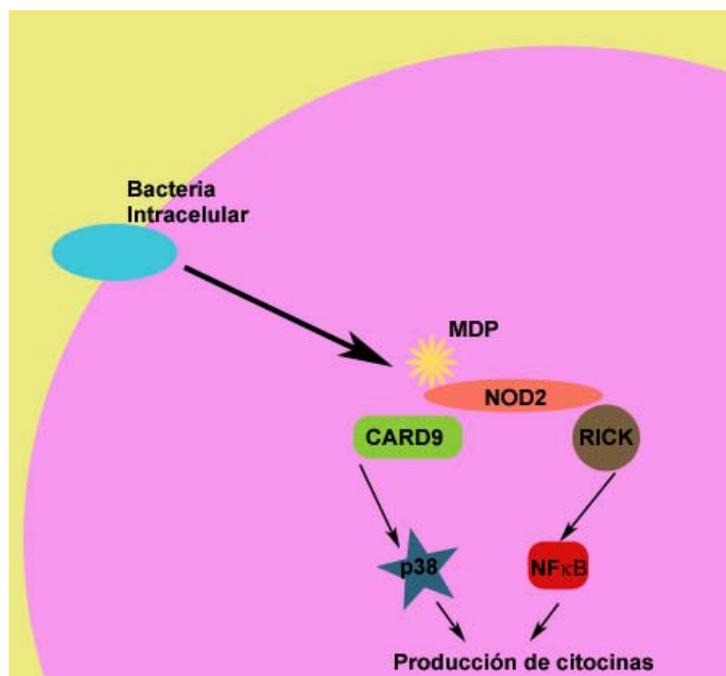
Los NLRs pueden ser clasificados dentro de cinco subfamilias basados en los dominios efectores en el extremo N-terminal; la subfamilia NLRA, que contienen un dominio ácido; NLRB, que contienen el dominio BIR; NLRC, que contienen el dominio CARD; NLRP, que contiene el dominio PYD y por último NLRX, que poseen dominios sin ninguna homología con los dominios de cualquier otra de las subfamilias [34] (Fig. 3).



**Fig. 3. Miembros de la familia NLR.** La estructura tripartita de las proteínas NLR. En el extremo C-terminal se encuentra el dominio de repeticiones ricas en leucinas (LRR) involucradas en el reconocimiento de patógenos, un dominio central NACH (Naip, CIITA, HET-E y PH-I), el cual media la auto-oligomerización, por lo menos un dominio de interacción proteína-proteína en el extremo N-terminal, responsable de la transducción de señales, el cual es variable entre los miembros de la familia [34].

#### 1.4.1 Receptores NOD1 y NOD2

NOD1 y NOD2, son receptores que detectan moléculas bacterianas producidas durante la síntesis y/o degradación de la peptidoglicana [35]. NOD2 es activado por muramil dipéptido (MDP), un componente presente en todos los tipos de peptidoglicanos de bacterias tanto Gram-positivas como Gram-negativas, mientras que NOD2 reconoce al ácido  $\gamma$ -D-glutamil-*meso*-diaminopimelico (meso-DAP) presente en todas las bacterias Gram-negativas y en ciertas bacterias Gram-positivas como *Listeria* y *Bacillus* [36, 37]. El reconocimiento directo o indirecto del ligando por las LRRs de NOD1 y NOD2 induce el reclutamiento de RICK a través de interacciones CARD homotípicas, lo cual induce la señalización de NF $\kappa$ B y de la vía de las MAP cinasas [35, 38, 39].



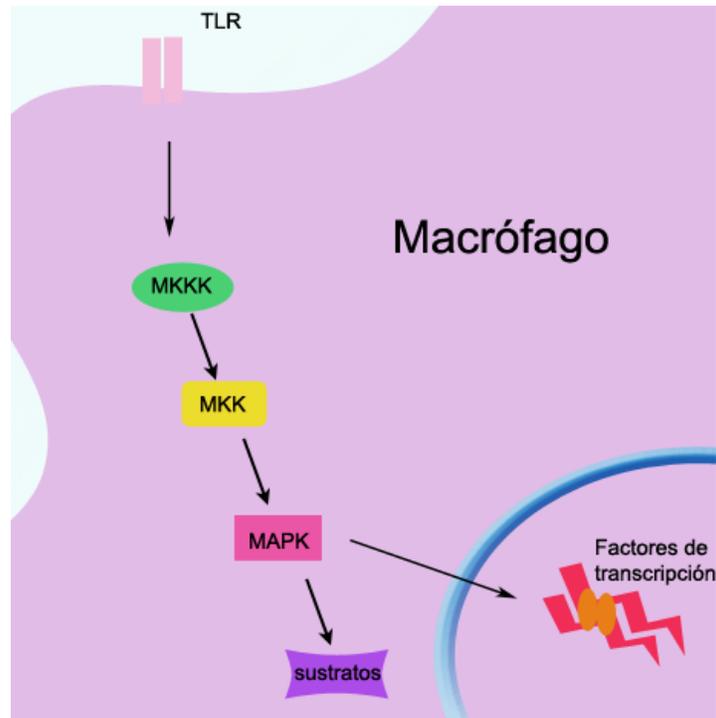
**Fig. 4. Cascada de activación de la MAP cinasa p38 y NFκB vía NOD2.**

### **1.5 Cascada de señalización de las MAPK**

Como se mencionó anteriormente, los TLRs así como los NLRs activan la cascada de señalización de las MAP cinasas, la cual regula importantes procesos celulares incluyendo la expresión de genes, la proliferación, sobrevivencia, muerte y motilidad celular, ya que responden a un amplio rango de cambios extracelulares e intracelulares cooperando con otras vías de transducción de señales, traduciendo estos cambios en alteraciones en la expresión de genes y la regulación de la función celular [1]. La vía de las MAP cinasas juega una función esencial en la regulación de la respuesta inmune innata y adaptativa [40].

Los mamíferos expresan al menos cuatro grupos de MAPKs, la cinasa relacionada a señales extracelulares (ERK)-1/2, la cinasa del amino terminal Jun (JNK1/2/3), proteínas p38 (p38α/β/γ/δ) y ERK5, que son activadas por MAP cinasas cinasas (MAPKK) específicas: MEK1/2 activan a ERK1/2, MKK3/6 activan a p38, MKK4/7 (JNKK1/2) activan a JNKs, y MEK5 activa a ERK5. Las MAPKs contienen un motivo (TXY) dentro de su región de activación. La fosforilación de ambas, treonina y tirosina dentro de esta región por las MAPKK es esencial y suficiente para su activación [41].

La actividad de las MAPKs es regulada a través de tres bloques, los cuales están compuestos de las mismas MAP cinasas, de MAPK cinasa (MAPKK, MKK o MEK), y por último de las MAPKK cinasas (MAPKKK, MKKK o MEKK) [40] (Fig. 4).



**Fig. 5. Cascada de señalización de las MAP cinasas.** La vía de señalización de las MAP cinasas se divide en tres grandes bloques. Las MKKK que fosforilan a MKK y éstas, a su vez, activan a las MAPK, que lleva a la activación de sustratos específicos para cada MAP cinasa, así como factores de transcripción.

Las MAPKKKs son muy diversas en su estructura y pueden ser diferencialmente reguladas por una variedad de estímulos río arriba. Presumiblemente cada MAPKKK le confiere a la célula una sensibilidad a distintos estímulos, lo cual incrementa la complejidad y diversidad de la señalización de las MAP cinasas [1]. Las MAPKKK pueden ser activadas por la cinasa STE20 o por pequeñas proteínas unidas a GTP [42], se ha identificado que las cinasas p38 y JNK son activadas por la familia Rho de GTPasas, incluyendo a Rac y Cdc42 [40, 43]. A su vez las MAPKK son activadas por fosforilación, la cual la realizan las MAPKKK, lo que lleva a la activación de las MAPKs. Una vez que se activan por esta cascada de fosforilación, las MAPKs reconocen sitios fosfoaceptores similares, compuestos de

serina o treonina seguido por una prolina, y el aminoácido que está rodeando este sitio incrementa la especificidad de reconocimiento por el sitio catalítico de la enzima. Muchas MAPKs activan a cinasas efectoras específicas – proteínas cinasas activadas por MAPK (MAPKAPKs) - [40, 41].

La activación de las MAP cinasas, la magnitud y la duración de su activación, así como su inhibición son eventos críticos para mediar una respuesta inmune apropiada. Se sabe que la inhibición de las MAP cinasa recae en una nueva familia de proteínas llamada MKP (del inglés MAP Kinase Phosphatases) o DUSP (del inglés, Dual Specificity Phosphatases), donde MKP1, DUSP2, MKP5, MKP7 y VH5 tienen preferencia por p38/JNK, para ERK se conoce a MKP3 [44-46].

La familia de la MAPK p38, la cual está formada por las isoformas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  y ERK6 con un motivo de activación TGY (Thr-Gly-Tyr), juegan un papel central como transductores de respuestas a señales de estrés ambiental, como hipoxia, choque osmótico, radiación UV, choque térmico, en la síntesis de citocinas pro-inflamatorias (como TNF- $\alpha$  e IL-1) y en menor grado en la síntesis de factores de crecimiento. La señalización de p38 ha sido implicada en respuestas que incluyen apoptosis, sobrevivencia, inflamación y diferenciación [47-50].

En humanos p38 $\alpha$  y p38 $\beta$  se expresan de manera ubicua, p38 $\gamma$  se expresa principalmente en músculo esquelético, mientras que p38 $\delta$  se expresa en altos niveles en pulmón, riñón, glándulas endocrinas e intestino delgado. Las cuatro isoformas de p38 se activan diferencialmente por varias MKKs, debido a su expresión diferencial [51-53]. Donde MKK6 puede activar a todas las isoformas, en tanto que MKK3 activa a p38 $\alpha$ , p38 $\gamma$  y p38 $\delta$ . Particularmente MKK4 puede activar a p38 $\alpha$  y p38 $\delta$  en tejidos específicos [54].

La activación de la MAP cinasa p38, lleva a la activación de diversos sustratos, entre éstos se identificó que p38 estimula a la MAPKAP cinasa-2 (MK2) en situaciones de estrés celular [55]. También se conoce que p38 fosforila a la proteína asociada a microtúbulos (tau) en sitios relevantes fisiológicamente [56].

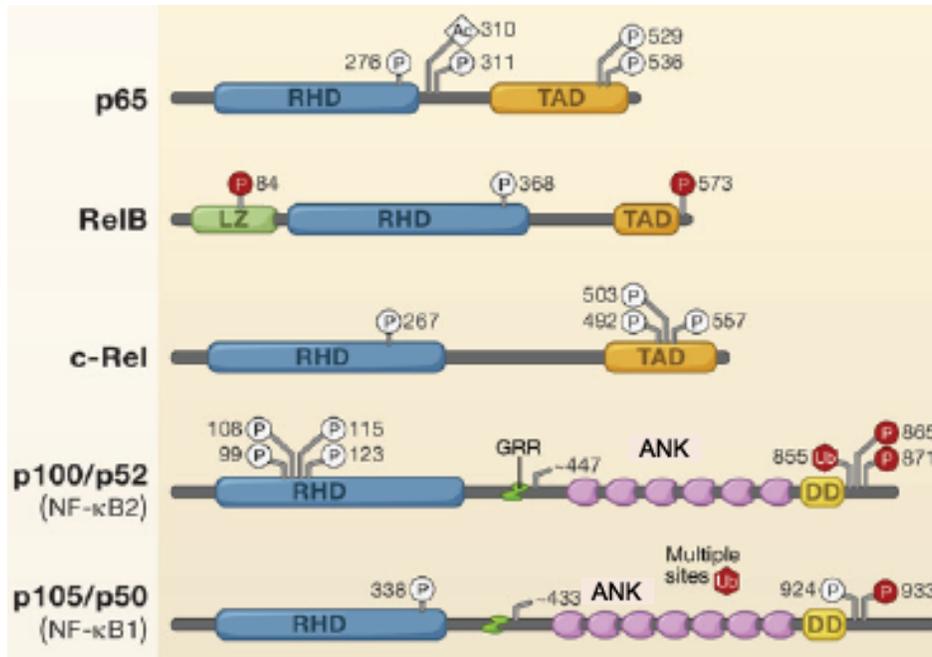
La fosforilación de estatmina por p38, acopla las señales intracelulares de estrés con la regulación de la dinámica de microtúbulos [57]. La MAP cinasa p38 además está involucrada en la fosforilación de la fosfolipasa citosólica A2 (cPLA2), jugando un papel importante en iniciar y regular la producción de eicosanoides, los cuales son moléculas mediadoras de la inflamación [58].

La MAP cinasa p38 fosforila y aumenta la actividad de muchos factores de transcripción, incluyendo a ATF-1, ATF2, MEF2C y MEF2A, Sap-1, Elk-1, NFκB, CHOP/GADD153, Ets-1, Myc, HSF-1, y p53 [54].

### **1.7 Cascada de señalización de NFκB**

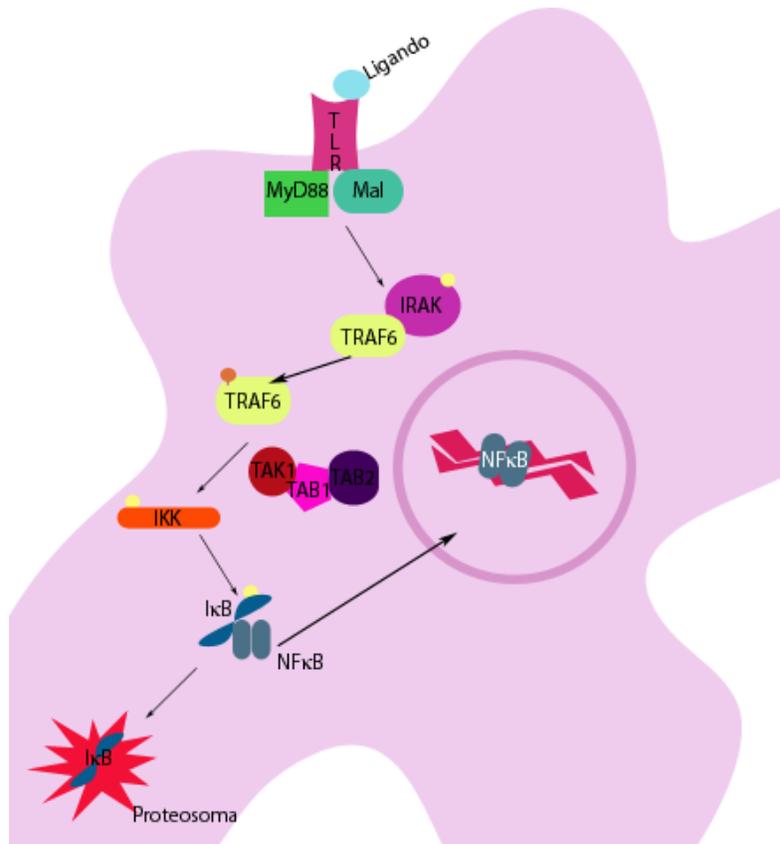
El reconocimiento de patógenos por los TLRs, así como los NLRs conllevan a la activación de las células que despliegan estos receptores. Las señales generadas por estos receptores promueven cambios en la expresión de genes, que llevan al aumento de moléculas efectoras, como citocinas y moléculas de adhesión [59, 60]. Este proceso depende de la activación de varios factores de transcripción, entre los cuales NFκB juega un papel crítico.

NFκB representa un grupo de proteínas estructuralmente relacionadas y evolutivamente conservadas, con cinco miembros en mamíferos: Rel (c-Rel), RelA (p65), RelB, NFκB1 (p50 y su precursor p105), NFκB2 (p100/p52), siendo la forma más abundante en las células el heterodímero p50:p65 [59, 61] (Fig.6).



**Fig. 6. Miembros de la familia de NFκB.** Se indica con **P** los sitios de fosforilación, con **Ub** los sitios de ubiquitinación y **Ac** los sitios de acetilación. RHD, dominio de homología a Rel; TAD, dominio de transactivación; LZ, dominio “zipper” de leucinas; GRR, región rica en glicinas y DD, dominio de muerte; ANK, repeticiones de anquirinas [62].

Los eventos de señalización que llevan a la activación de NFκB en el macrófago ocurren cuando un agonista se une a su TLR, lo cual resulta en el reclutamiento de las moléculas MyD88 y Mal [63, 64]. La presencia del dominio de muerte en MyD88 permite su interacción con miembros de la familia IRAK (del inglés, IL-1 receptor associated kinase). La fosforilación de IRAK-1 resulta en su asociación con TRAF6 (del inglés, TNF-receptor associated-factor 6). La subsiguiente ubiquitinación de TRAF6 activa al inhibidor de la cinasa κB (IκB), IKKα e IKKβ vía un complejo de cinasas TAK1-TAB1-TAB2. Estos IKKs son responsables de la fosforilación de IκB (inhibidora de NFκB) lo que promueve a través de la ubiquitinación su subsiguiente degradación. El factor transcripcional NFκB es entonces libre de translocarse al núcleo y, por lo tanto, de iniciar la transcripción de genes con la región promotora κB (Fig. 7) [25, 65].



**Fig. 7. Mecanismo de activación de NFκB.** Los círculos rojos representan ubiquitinaciones, mientras que los amarillos representan fosforilaciones.

Una amplia variedad de genes son regulados por NFκB, ya sea genes que codifican para quimiocinas (IL-8, MIP-1α, MCP1, RANTES y eotaxin), moléculas de adhesión (ICAM, VCAM y E-selectina), proteínas de fase aguda (SAA), y enzimas efectoras inducibles (iNOS y COX-2), así como genes que codifican para péptidos antimicrobianos, como β-defensinas. Además posee la habilidad de activar genes que codifican para proteínas que inhiben la apoptosis, como c-IAP-1, c-IAP-2, A1 (Bfl1), Bcl-XL, apoptóticas como el ligando de Fas, y reguladores de la proliferación celular como ciclina D1 y c-myc. Además de citocinas pro-inflamatorias (IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, TNF-α, LTα, LTβ, y GM-CSF) [59, 60, 66].

## 1.8 El Inflamosoma

La inflamación es un proceso coordinado, el cual es inducido por infecciones microbianas o por daño al tejido (quemaduras o traumas). La principal función de la inflamación es resolver la infección o reparar el daño regresando así a un estado de homeostasis. Pero si esta inflamación no es controlada puede contribuir al desarrollo de diversas enfermedades crónicas como aterosclerosis, artritis reumatoide, cirrosis, entre otras [67].

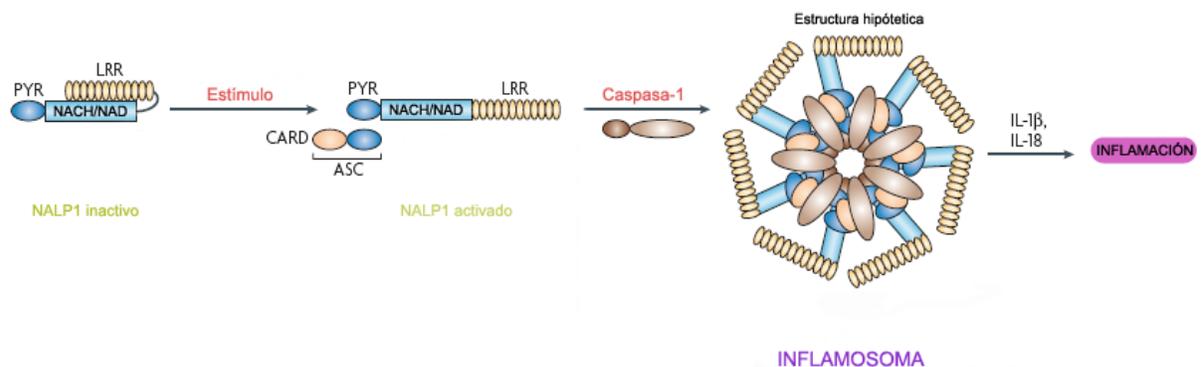
Por medio de los PPRs los macrófagos detectan y responden a señales de daño iniciando una cascada inflamatoria que conlleva a la secreción de citocinas pro-inflamatorias, como IL-1 $\beta$  e IL-18. Estas contribuyen a la respuesta inmune innata ayudando a contener la infección, debido que estimulan la fiebre, el reclutamiento y activación de células inmunes, además de la producción de citocinas secundarias y, finalmente, llevan a la activación de la respuesta inmune adaptativa [4].

La síntesis, procesamiento y liberación de IL-1 $\beta$  por macrófagos, requiere de dos estímulos. Un estímulo inflamatorio, como LPS, que hace que las células transcriban y sinteticen pro-IL-1 $\beta$ ; y un segundo estímulo, como ATP, nigericina, toxinas bacterianas (por ejemplo, SipB de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, IpaB de *Shigella flexneri*), o el encuentro con linfocitos T citotóxicos, que promueve su corte y liberación [68]. Por otro lado, IL-18 responde también a estos estímulos inflamatorios, con la diferencia de que ésta ya es expresada de manera constitutiva y sólo requiere de estos estímulos para promover su activación, que al igual que IL-1 $\beta$  su activación es mediada por Caspasa-1 [69].

Para que Caspasa-1 pueda procesar y activar a estas interleucinas, necesita del inflamosoma, un complejo macromolecular ensamblado por miembros de la familia de proteínas NLR, los cuales se asocian directamente a Caspasa-1 por medio de

la interacción de sus dominios CARD, lo cual promueve su activación ya que induce la dimerización de los monómeros inactivos de Caspasa-1 (pro-Caspasa-1 de 45 kDa). Este procesamiento autocatalítico de Caspasa-1 genera dos subunidades, p20 y p10 [70].

Se sabe que la secreción de IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , e IL-18 dependiente de Caspasa-1 requieren de ASC (del inglés, Apoptosis-associated Speck-like Protein Containing a Caspase-recruitment Domain (CARD); también conocido como PYCARD), un miembro de la familia NLR [71, 72]. ASC es una proteína adaptadora de 22 kDa con un dominio PYD en el extremo N-terminal, y un dominio CARD en el extremo C-terminal [73]. La proteína ASC usando su dominio PYD interactúa con el dominio PYD de otros NLRs y con su dominio CARD puede interactuar con el dominio CARD de procaspasa-1 (Fig. 8) [70, 74].



**Fig. 8. Mecanismo de formación del Inflamosoma [75].**

Recientemente, se ha demostrado que la activación de Caspasa-1 no sólo lleva a la inflamación, en ciertas instancias causa una forma inflamatoria de muerte celular llamada piroptosis, caracterizada por daño al DNA, pérdida de la integridad de la membrana plasmática y activación de Caspasa-1; sin embargo se mantiene la integridad de la membrana mitocondrial [75].

La piroptosis es un paso importante en el proceso inflamatorio, ya que éste sirve como un mecanismo por el cual los macrófagos activados liberan rápidamente una gran cantidad de su contenido de citocinas, como IL-1 $\beta$ , dentro del espacio

extracelular para estimular la inflamación. Además, durante la infección por patógenos intracelulares la piroptosis puede jugar un papel importante en la prevención de una carga excesiva del patógeno [75].

## 1.9 El Ántrax

Un modelo de estudio de las respuestas desencadenadas por los PPRs en células del sistema inmune lo constituye *Bacillus anthracis*, una bacteria que produce una toxina capaz de formar poros, agente causal del ántrax que al igual que muchos otros patógenos utiliza los mecanismos propios del macrófago en su favor. El ántrax humano es clasificado por el portal de entrada a su hospedero, generando tres tipos:

Ántrax cutáneo, que comprende la vasta mayoría de los casos de ántrax en los humanos, es una infección localizada generalmente con síntomas sistémicos moderados y caracterizada por pústulas indoloras que son rodeadas por edema, el cual puede ser bastante extensivo. Las pústulas se ulceran a los 5 ó 6 días y desarrollan las características de escarcha negra del ántrax cutáneo. El porcentaje de recuperación para ántrax cutáneo es de 99% para casos tratados con antibióticos.

Ántrax gastrointestinal, este tipo de enfermedad se desarrolla pocos días después de la ingestión de comida contaminada con esporas, provocando náuseas, vómito y dolor abdominal. Se desarrollan lesiones intestinales con diarrea hemorrágica, los ganglios linfáticos mesentéricos se inflaman y desarrollan hemorragias, además de que se pueden formar ascitis. La mortalidad en este caso excede un 50% de los casos.

Por último, ántrax por inhalación, es el más raro, pero el más peligroso, esta enfermedad de ántrax ocurre después de la inhalación de esporas en el aire, las cuales son fagocitadas por macrófagos alveolares. Las esporas sobreviven a la

fagocitosis y germinan dentro del fagosoma, y son transportadas de los alvéolos pulmonares a los ganglios linfáticos regionales, donde germinan y las bacterias se multiplican. El bacilo entonces viaja al torrente sanguíneo, donde es temporalmente removido por el sistema retículoendotelial. Antes de la muerte, la cual sucede de 2 a 5 días después de la infección, ocurre un ataque súbito de síntomas caracterizados por hipotensión, edema, y un shock fatal debido a una septicemia extensiva y toxemia [76, 77].

Tres proteínas secretadas por *B. anthracis* juegan un papel central en la patogenicidad causada por esta bacteria: el antígeno protector (AP), el factor edemático (FE), y el factor letal (FL) [77].

El antígeno protector (753 aminoácidos) es muy importante en la intoxicación por *B. anthracis*, debido a que el anclaje y la entrada al citosol del FE y FL dependen de éste. EL AP está formado por 4 dominios. El dominio 1 (residuos 1-258) incluye el mayor fragmento proteolítico, PA20 (residuos 1-167), y el sitio de unión putativo para FL y FE (residuos 168-258), el corte proteolítico en este sitio es necesario para su actividad biológica. El dominio 2, está involucrado en la formación del heptámero de moléculas PA63 (pre-poro) y en la inserción a la membrana. El dominio 3, por su proximidad al dominio 1, también está involucrado en la unión del FE y FL. El extremo C-terminal de la molécula, el cual comprende el dominio 4 (residuos 596-735), contiene la región de unión a la célula [76].

Cinco regiones de homología fueron identificadas entre el extremo N-terminal del FE y el extremo N-terminal del FL, lo cual sugiere que ésta es la porción que se une competitivamente al AP. La unión de estos factores al AP, lleva a la generación de dos toxinas, en donde el AP combinado con el FE constituyen la toxina edemática (TE), en tanto que el AP y el FL forman la toxina letal (TL) [76].

El mecanismo de entrada de estas toxinas se da después de la unión del AP a su receptor TEM8 (del inglés, Tumor Endotelial Marker 8) y co-receptor CMG2 (del

inglés, Capillary Morphogenesis Gene 2), donde el AP es cortado en los residuos 164-167, RKKR [78]. La eliminación de AP20 del extremo N-terminal del AP permite la formación de oligómeros, cada uno consiste en siete moléculas de AP63 (pre-poro) exponiendo el sitio de unión al FE o al FL, para formar las toxinas, en donde cada AP tiene la capacidad de unir a tres factores ya sea letal o edemático [79]. El complejo es internalizado a la célula por endocitosis mediada por receptor, en donde las condiciones ácidas del endosoma disparan la inserción del pre-poro PA63 dentro de la membrana, formando un canal conductivo a iones, y se sabe que éste permite la translocación del FL o el FE al citosol [76, 80].

Una vez que las toxinas son internalizadas producen diversos efectos en la célula. Por ejemplo, el edema característico del ántrax es resultado de la actividad de adenilato ciclasa inducida por el FE, el cual en presencia de calcio y de la proteína de unión a calcio, calmodulina, cataliza la producción de AMP cíclico (cAMP) intracelular. La acumulación de cAMP intracelular en respuesta al FE induce la producción de IL-6 e inhibe la producción de TNF- $\alpha$  en monocitos. Se sabe que la toxina edemática no contribuye de manera directa a la muerte del hospedero, en particular su presencia incrementa la susceptibilidad a la infección, afectando a una amplia variedad de células, en particular interrumpiendo la respuesta de los monocitos en la producción de citocinas y suprimiendo las funciones de los neutrófilos [76].

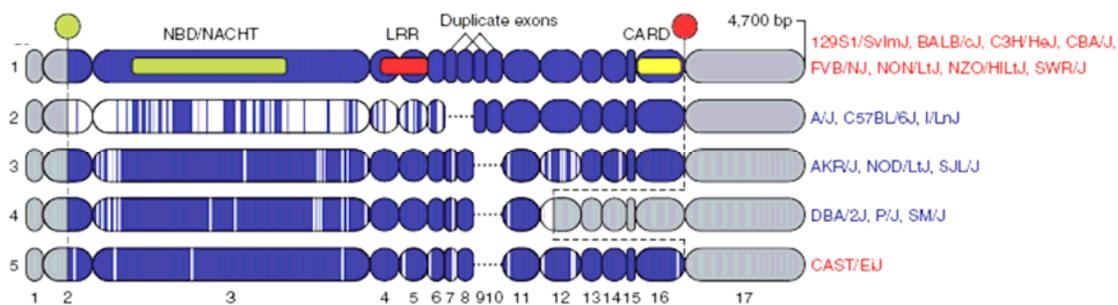
El factor letal, una metaloproteasa dependiente de zinc, tiene una alta especificidad para las proteínas MKKs, cortando entre la extensión de su extremo N-terminal y el dominio catalítico [81, 82]. Ya que el extremo N-terminal es requerido para la interacción con MAP cinasas y MKKKs, este corte previene la activación de las MAP cinasas [83, 84]. Se sabe que la toxina letal, es la mayor responsable de la letalidad del ántrax.

Experimentos realizados en ratones demostraron que los macrófagos son importantes en la letalidad mediada por *B. anthracis*, ya que después de eliminar a

los macrófagos de ratones susceptibles con inyecciones de partículas de sílice, estos ratones adquirieron resistencia a los efectos de la TL [85, 86]. Estudios *in vitro*, al igual que estudios *ex vivo*, han mostrado una relación directa entre la susceptibilidad de los macrófagos hacia la toxina letal de *B. anthracis* de distintas cepas de ratones con la susceptibilidad de los animales a la muerte inducida por la TL [87, 88].

Se han encontrado diferencias genéticas en la sensibilidad de los macrófagos de ratones a los efectos de FL [89]. Macrófagos de cepas C3H/HeN son muy sensibles a la citólisis inducida por FL, mientras que macrófagos A/J son muy resistentes. Otro ejemplo son células J774 derivadas de BALB/cJ las cuales son susceptibles a la citólisis inducida por FL, mientras que células IC-21 derivadas de C57BL/6J son resistentes [90].

Estas diferencias en la susceptibilidad o resistencia se le han adjudicado al gen *Nalp1b*, ya que el análisis de la secuencia completa del cDNA de *Nalp1b* en 18 cepas de ratones demostró la existencia de 5 alelos extremadamente polimórficos que correlacionan perfectamente con el fenotipo de susceptibilidad a la TL. Muchas cepas acarrean el alelo 1, siendo estas cepas susceptibles a TL, este alelo codifica una proteína de 1,233 amino ácidos. Todos los macrófagos resistentes acarrean el alelo 2, 3 ó 4. Sólo una cepa de macrófagos susceptibles no tiene el alelo 1, la cual porta el alelo 5 (Fig. 9)



**Fig. 9. Alelos del gen *NALP1b*.** Los óvalos representan los exones. Las áreas azules representan los ORF. El círculo verde: codón de inicio. El círculo rojo: codón de paro. Las áreas grises representan las zonas sin transcribir. Las áreas blancas representan polimorfismos relativos al alelo 1. En color rojo están representadas las cepas

susceptibles, mientras que en azul se encuentran las cepas resistentes a la toxina letal de *B. anthracis* [91].

Se cree que el alelo funcional *Nalp1b* causa la susceptibilidad de los macrófagos a la TL, esto se basa en las siguientes observaciones: La susceptibilidad es dominante en los ratones F1 que acarrean el alelo 1. Los alelos resistentes *Nalp1b* son relativamente polimórficos con respecto a los alelos susceptibles. El alelo 4 codifica presumiblemente una proteína truncada, por lo tanto, la expresión de un alelo *Nalp1b* susceptible en macrófagos resistentes debe hacerlos susceptibles [91].

Dado que se ha demostrado que la actividad de Caspasa-1 se requiere para que el alelo *Nalp1b* confiera susceptibilidad a la toxina letal, se ha postulado que la actividad descrita para Caspasa-1 es la que conduce a la muerte del macrófago, pues la eliminación de esta proteína en macrófagos de la cepa susceptible, confiere resistencia a los efectos de la toxina letal [91]. Sin embargo, ésta no es la única molécula implicada, pues también se demostró la importancia de la actividad de cinasa de MKK6, ya que macrófagos susceptibles que expresan una mutante no susceptible al corte por la TL de la cinasa MKK6, son resistentes a la muerte inducida por la TL. En este mismo estudio, se demostró que esta capacidad sólo la posee MKK6, ya que macrófagos susceptibles que acarrean una mutante no susceptible al corte por la TL de MKK3 no son capaces de revertir la susceptibilidad a la toxina letal, y debido a que las MKK3 y 6 activan a la MAP cinasa p38 y que ésta, a través de la fosforilación, regula la actividad de múltiples sustratos, entre los que se encuentran diversos factores de transcripción que son importantes reguladores de la sobrevivencia celular, se postula que la vía de señalización de la MAP cinasa p38 podría estar desempeñando una función importante en la resistencia a los efectos de la TL de *B. anthracis* [92].

## 2. HIPÓTESIS

La MAP cinasa p38 regula negativamente la activación de Caspasa-1 en macrófagos de ratones resistentes (C57BL/6J) a la toxina letal de *Bacillus anthracis*.

## 3. OBJETIVOS

- Comparar la cinética de activación de la MAPK cinasa p38 en respuesta a componentes bacterianos (LPS, LTA y MDP) entre macrófagos de la cepa susceptible (BALB/cJ) y macrófagos de la cepa resistente (C57BL/6J) a la toxina letal de *Bacillus anthracis*.
- Determinar si la MAP cinasa p38 previene la activación de Caspasa-1 en respuesta a componentes bacterianos (LPS, LTA y MDP) en macrófagos de la cepa susceptible (BALB/cJ) a la toxina letal de *Bacillus anthracis*.
- Determinar si la activación de MAP cinasa p38 inducida por componentes bacterianos (LPS, LTA y MDP) induce la fosforilación diferencial de blancos especiales entre macrófagos de la cepa susceptible (BALB/cJ) y macrófagos de la cepa resistente (C57BL/6J) a la toxina letal de *Bacillus anthracis*.

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1 Anticuerpos

Los anticuerpos utilizados en este estudio se obtuvieron de Cell Signaling (anti-p38 MAPK fosforilada (Thr180/Tyr182), anti-p38, anti-MAPK-CDK sustratos (PXSP o SPXR/K), anti-caspasa 3 y anti-PARP), de Santa Cruz Biotechnology, INC (anti-I $\kappa$ B, anti-caspasa 1 p20 (M-19) y anti-actina), y de eBioscience (anti-CD14, anti-TLR-2, anti-TLR-4).

### 4.2 Purificación de macrófagos

Para la purificación de macrófagos peritoneales se inyectaron ratones de las cepas BALB/c y C57BL/6J (Harlan) en la zona peritoneal con un mililitro de tioglicolato de Sodio al 3% (SIGMA-Aldrich), se mantuvieron en condiciones de esterilidad durante 3 días y se sacrificaron por medio de dislocación cervical de acuerdo a los lineamientos del comité de Bioética del Instituto de Biología, UNAM. Para cosechar los macrófagos de la cavidad peritoneal, ésta se lavó 3 veces con 5 ml de PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4.3 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.4 mM, pH 7.3) a 4° C, las células se centrifugaron a 125 x g durante 5 minutos, se recuperaron en 5 ml de RPMI completo (10% de Suero Fetal Bovino, 2 mM de L-glutamina, 1 U/ml de penicilina, 1  $\mu$ g/ml de estreptomocina y glucosa 4.5 mg/ml), se contaron y plaquearon  $1 \times 10^6$  células en 5 ml de RPMI completo durante 1 hr a 37 °C con un 5% de CO<sub>2</sub> y 90% de humedad, esto es para permitir la adhesión de los macrófagos a la placa. Las células no adheridas se eliminaron lavando con PBS. Las células adherentes se cultivaron en RPMI completo durante 24 hr a 37°C para su posterior estimulación.

### 4.3 Estimulación celular

Las células se estimularon en 2 ml de RPMI completo con 100 ng/ml LPS (lipopolisacárido proveniente de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, SIGMA-Aldrich), 10 mg/ml LTA (ácido lipoteicoico proveniente de *Staphylococcus*

*aureus*, SIGMA-Aldrich) o 10 mg/ml MDP (muramil dipéptido), por los tiempos indicados. En algunos casos se agregó el inhibidor de la MAP cinasa p38 SB203580 (a una concentración final de 5  $\mu$ M) o la misma cantidad del solvente 30 minutos antes del estímulo; en otros casos se añadió la Toxina Letal (TL, PA [1 $\mu$ g/ml] + LF [200nm/ml]), de List Biological Laboratories, INC) al mismo tiempo o 30 minutos después del estímulo y por último en algunos casos se añadió ATP 20 min antes de completar el estímulo (a una concentración final de 5 mM). Después de los estímulos los macrófagos se lavaron con PBS frío y se prepararon extractos totales o nucleares, y en algunos casos se colectaron los sobrenadantes de cultivo y se congelaron a -70°C hasta su uso.

#### **4.4 Extractos totales**

Las células se resuspendieron en buffer de lisis (Tris 20 mM pH 7.4, NaCl 250 mM,  $\beta$ -glicerolfosfato 25 mM, PPINa 2 mM, EDTA 2 mM pH 7.4, Triton X-100 1%, Glicerol 10%) suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas (Antipaina 5  $\mu$ g/ml, Aprotinina 5  $\mu$ g/ml, DTT 0.5 mM, Leupeptina 5  $\mu$ g/ml, Pepstantina 5  $\mu$ g/ml, PMSF 1 mM, 200 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ), se incubaron durante 15 minutos a 4 °C y se centrifugaron a 14,000 x g durante 10 minutos a 4 °C, se recuperaron los sobrenadantes y los lisados se guardaron a -70 °C para su posterior análisis.

#### **4.5 Extractos nucleares**

Los extractos nucleares se prepararon de acuerdo al protocolo de [93]. Los macrófagos se cosecharon agregando PBS/EDTA (20 mM) frío durante 10 minutos, se centrifugaron a 125 x g durante 5 minutos, y se resuspendieron en 1 ml de PBS, posteriormente los macrófagos se centrifugaron a 10,000 x g durante 20 segundos. Los macrófagos se resuspendieron en 200  $\mu$ l de buffer hipotónico (Hepes 10 mM pH 7.6, KCL 10 mM, EDTA 0.1 mM, EGTA 0.1 mM, Espermidina 0.75 mM, Epermita 0.15 mM) suplementado con inhibidores (PMSF 0.5 mM, Aprotinina 2  $\mu$ g/ml, Leupeptina 2  $\mu$ g/ml, Pepstatina 2  $\mu$ g/ml,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  10 mM, DTT 1 mM) y se incubaron durante 15 minutos en hielo. Las células se lisaron añadiendo 25  $\mu$ l de NP40 al 10% agitando vigorosamente por 10 segundos. Se

centrifugaron a 13,000 x g durante 40 segundos, los núcleos se extrajeron incubando en un buffer de extracción nuclear (Hepes 20 mM pH 7.6, NaCl 0.4 M, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM) suplementado con inhibidores (PMSF 0.5 mM, Aprotinina 4 µg/ml, Leupeptina 4 µg/ml, Pepstatina 4 µg/ml, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 10 mM, DTT 1 mM), se agitaron durante 15 minutos a 4°C y centrifugaron a 13,000 x g durante 5 minutos, se recuperaron los sobrenadantes y se congelaron a -70°C para su posterior análisis.

#### **4.6 Inmunoblot**

Las proteínas fueron cuantificadas por el método de Bradford [94], y se resolvieron 40 µg de proteína por SDS-PAGE a 40 mA durante 75 minutos, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0.22 µm previamente humedecida en Buffer de transferencia (Tris 25 mM, Glicina 200 mM y Metanol al 20%) a 100 Volts durante 90 minutos. Posteriormente, las membranas fueron bloqueadas con leche descremada al 5% en TBS-T (Tris/HCl 20 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, Tween 20 0.1%) durante 1 hr a temperatura ambiente. Subsecuentemente, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario en una dilución adecuada dependiendo el anticuerpo en BSA al 5% (Albumina Sérica Bovina) o leche al 5% en TBS-T durante toda la noche a 4 °C con agitación suave. Posteriormente, las membranas se lavaron 3 veces durante 5 minutos con TBS-T, una vez hecho esto se agregó el anticuerpo secundario diluido 1:4000 en leche al 5% en TBS-T durante 1 hora a temperatura ambiente. Las membranas se lavaron 3 veces con TBS-T por 5 minutos para ser reveladas con el método de quimioluminiscencia (ECL, Amersham).

#### **4.7 ELISA (Ensayo Inmunoenzimático en Fase Sólida)**

##### **a) IL-1β**

La determinación de la concentración de IL-1β en los sobrenadantes de cultivo se evaluó mediante un ensayo de ELISA de acuerdo a las instrucciones de la casa comercial eBioscience, el cual se realizó en una placa de 96 pozos. A cada pozo se le agregó el anticuerpo de captura para IL-1β (1000 pg/ml) en “buffer de

captura” y se incubaron toda la noche a 4 °C. Los pozos se lavaron 5 veces con “buffer de lavado” (PBS-Tween al 0.5%). Se bloquearon con “solución de ensayo” y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente, se lavaron 5 veces con “buffer de lavado”, y a cada pozo se le añadieron 100 µl de sobrenadantes celulares incubándolos toda la noche a 4°C, transcurrido el tiempo se lavaron los pozos 5 veces con “buffer de lavado”. Después de los lavados a cada pozo se añadió el anticuerpo policlonal anti-IL-1β conjugado a biotina a una dilución final de 1:250 en “solución de ensayo” y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente, transcurrido el tiempo los pozos se lavaron 5 veces con “buffer de lavado”. Posteriormente, se agregó Avidin-HRP a una dilución de 1:250 en “solución de ensayo” y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente, una vez que finalizó el tiempo los pozos se lavaron 5 veces con “buffer de lavado”, se añadieron 100 µl del sustrato (Tetrametilbencidina) y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente protegiéndolos de la luz directa. Posteriormente se paró la reacción añadiendo 50 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N y se leyó la absorbancia en un Espectrofotómetro a 450nm.

#### b) Unión de NFκB

Para determinar la actividad de NFκB se utilizó el ensayo de ELISA de la compañía ACTIVE MOTIF, siguiendo las instrucciones de la casa comercial. El ensayo de ELISA para NFκB se realizó en una placa de 96 pozos en donde ya se encuentra integrado a la placa un oligonucleótido sintético de doble cadena que contiene la secuencia consenso de unión para NFκB, a cada pozo se le añadieron 2.5 µg de extractos nucleares. En algunos casos se agregaron 20 pmol/pozo de oligonucleótido silvestre u oligonucleótido mutado en la secuencia de unión de NFκB, para determinar la especificidad de unión DNA-proteína, la reacción se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente, transcurrido el tiempo los pozos se lavaron 3 veces con 200 µl de “buffer de lavado”. Después de los lavados, se añadió anticuerpo anti-p65 a una dilución 1:1000 (0.2 µg/ml) en “buffer de unión” durante 1 hora a temperatura ambiente, transcurrido el tiempo los pozos se lavaron 3 veces con 200 µl de “buffer de lavado”. Posteriormente se agregó el

anticuerpo anti-IgG conjugado a HRP (peroxidasa de rábano) a una dilución de 1:1000 en “buffer de unión de anticuerpo” durante 1 hora a temperatura ambiente sin agitación, una vez que finalizó el tiempo se agregaron 100 µl de “solución de sustrato” por pozo y se incubó de 2-10 minutos a temperatura ambiente protegiendo la placa de la luz directa. Posteriormente, se añadieron 100 µl de “solución de paro” a cada pozo para detener la reacción y se leyó la absorbancia en un Espectrofotómetro a 450nm.

#### **4.8 EMSA** (Ensayo de retardamiento de movilidad electroforética)

Para determinar la unión de las proteínas nucleares al DNA se realizaron ensayos de retardamiento de movilidad electroforética, en donde los ensayos de unión se hicieron en hielo durante 20 minutos utilizando 2.5 µg de extractos nucleares y 100 000 CPMs de oligonucleótido marcado radioactivamente con P<sup>32</sup> (el cual posee la secuencia consenso de unión para NFκB) en un volumen de 20 µl que contiene 20 mM HEPES, pH 7.6, 0.4 M NaCl, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1mM EGTA, 0.5 mM PMSF, 4µg/ml Aprotinina, 4 µg/ml Leupeptina, 4 µg/ml Pesptantina, 10 mM de Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 1 mM DTT, 1µg/µl poly(dI-dC), 1mg/ml de BSA, oligonucleótido silvestre (2.8pmol) u oligonucleótido mutado (2.8pmol) no radioactivo, MgCl<sub>2</sub> 12.3 mM. Posteriormente, se agregaron 2 µl de Azul de Bromofenol y las muestras se corrieron en un gel de 4% Acrilamida a 16 mAmps durante 1.5 hora. Finalmente el gel se secó y se expuso a un film de rayos X a -70 °C.

#### **4.9 Citometría de flujo**

Los niveles de expresión de CD14, TLR-2 y TLR-4 en macrófagos peritoneales se determinaron mediante citometría de flujo con los anticuerpos anti-CD14 (acoplado a isotiocinato de fluoresceína, FITC), anti-TLR-2 (acoplado a ficoeritrina) y anti-TLR-4 (acoplado a ficoeritrina), respectivamente. Las células (0.5X10<sup>6</sup>) se incubaron con los anticuerpos por 30 minutos a 4 °C en 100 µl de solución FACS (PBS, 2% de FCS y 0.02% NaN<sub>3</sub>) a una dilución final de 1:200 en presencia del anticuerpo anti-CD16/32. Al terminar la tinción las células se fijaron con PFA al 2%, y los niveles de fluorescencia se determinaron por medio de citometría de flujo

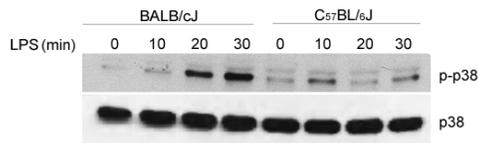
utilizando el programa Cell Quest en un citómetro de flujo FACSort (BD). Los datos se analizaron con el programa Flow Jo.

## 5. RESULTADOS

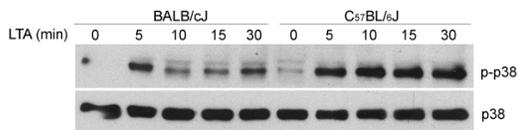
### 5.1 Activación diferencial de la MAP cinasa p38 en macrófagos de ratones susceptibles y resistentes.

Estudios previos indican que, además de la activación de Caspasa-1 en macrófagos de ratones susceptibles [91], la toxina letal de *Bacillus anthracis* necesita inactivar la vía de señalización de la MAP cinasa p38 para inducir la muerte del macrófago [84]. Sin embargo, se desconoce si existen diferencias en la vía de señalización de la MAP cinasa p38 entre macrófagos de ratones susceptibles (BALB/cJ) y resistentes (C57BL/6J) a la toxina letal. Por ello determinamos la cinética e intensidad de activación de la MAP cinasa p38 en macrófagos de ambas cepas en respuesta a distintos componentes bacterianos por medio de inmunoblot. LPS, un producto de la membrana externa de bacterias Gram-negativas indujo una activación fuerte y sostenida de p38 a los 20 y 30 minutos en macrófagos susceptibles, mientras que en los macrófagos resistentes la activación de p38 fue transitoria, y de menor intensidad, activándose a los 10 minutos y regresando la activación a los 30 minutos (Fig. 10A). En respuesta a LTA, un producto de la pared de bacterias Gram-positivas, los macrófagos de la cepa susceptible mostraron una activación transitoria de p38, encontrando un máximo nivel de actividad de p38 después de 5 minutos que decrece posteriormente. En contraste, en macrófagos resistentes LTA indujo una activación sostenida de p38. Además, la activación de p38 fue más intensa en macrófagos resistentes que en macrófagos susceptibles (Fig. 10B). El patrón de activación de p38 en respuesta a muramil dipéptido, un componente de la PGN de bacterias intracelulares, es mayor en macrófagos susceptibles que en macrófagos resistentes, aunque ambos se activan desde los 15 minutos hasta los 60 minutos (Fig. 10C). Estos resultados muestran que los componentes de bacterias Gram-negativas (LPS), Gram-positivas (LTA) o intracelulares (MDP) regulan de manera diferencial la activación de la MAP cinasa p38 en macrófagos susceptibles y resistentes a la toxina letal de *Bacillus anthracis*.

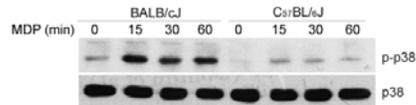
**A**



**B**



**C**

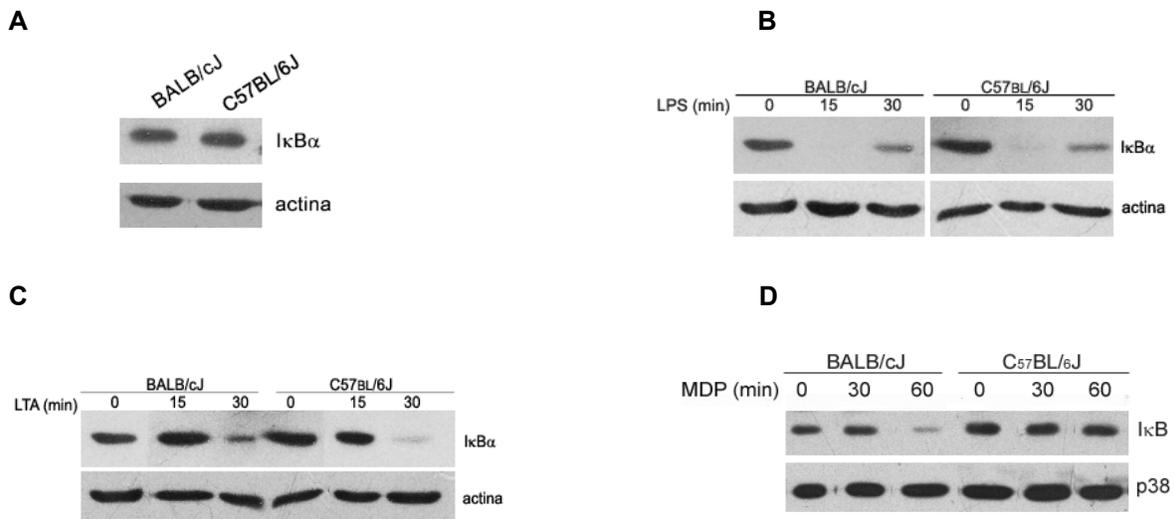


**Fig. 10. Activación diferencial de la MAP cinasa p38 en macrófagos susceptibles y resistentes a la TL.** Macrófagos de la cepa susceptible (BALB/cJ) o de la cepa resistente (C57BL/6J) se trataron con diferentes derivados bacterianos: endotoxina (LPS, 100 ng/ml) (A); ácido lipoteicoico (LTA, 10 mg/ml) (B), y muramil dipéptido (MDP, 10 mg/ml) (C), por los tiempos indicados. La activación de la MAP cinasa de p38 se determinó en extractos celulares totales por medio de inmunoblot utilizando un anticuerpo específico contra la MAP cinasa p38 fosforilada (p-p38). Los niveles totales de la MAP cinasa p38 se determinaron utilizando un anticuerpo contra p38 (p-38).

## 5.2 Activación de NFκB en macrófagos susceptibles y resistentes a la toxina letal.

Se sabe que la respuesta a componentes bacterianos por medio de receptores tipo toll además de activar la vía de señalización de la MAP cinasa p38, activa de manera paralela la vía de señalización del factor transcripcional NFκB [5]. Dado que encontramos diferencias en la cinética e intensidad de activación de p38 en respuesta a distintos componentes bacterianos, se determinó si también existían diferencias en la activación de NFκB en macrófagos susceptibles y resistentes a la toxina letal. Para esto, se estimularon macrófagos de ambas cepas con distintos componentes bacterianos y se determinó los niveles de IκB por medio de inmunoblot. Tanto los niveles basales de IκB (Fig 11A), así como la cinética de degradación de IκB entre macrófagos susceptibles y resistentes estimulados con LPS (Fig. 11B) o con LTA (Fig. 11C) es similar. En cambio, en macrófagos susceptibles estimulados con MDP la degradación de IκB ocurre hasta los 60

minutos, mientras que los macrófagos resistentes no degradan a I $\kappa$ B a este tiempo (Fig. 11D).



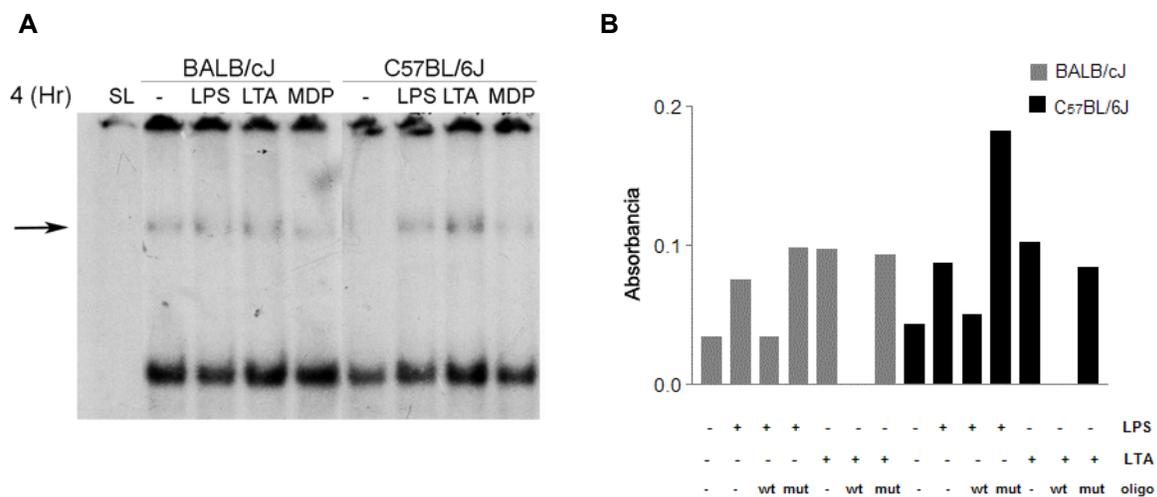
**Fig.11. Degradación del inhibidor del factor transcripcional NF $\kappa$ B (I $\kappa$ B) y activación de NF $\kappa$ B en macrófagos susceptibles y resistentes a TL.** Los niveles basales de I $\kappa$ B $\alpha$  se determinaron por medio de inmunoblot utilizando un anticuerpo específico contra I $\kappa$ B $\alpha$  (I $\kappa$ B $\alpha$ ) (A). Los niveles de I $\kappa$ B se determinaron en extractos celulares totales de macrófagos de la cepa susceptible (BALB/cJ) o de la cepa resistente (C57BL/6J) tratados por los tiempos indicados con: endotoxina (LPS, 100 ng/ml) (B); ácido lipoteicoico (LTA, 10 mg/ml) (C), y muramil dipéptido (MDP, 10 mg/ml) (D), por medio de inmunoblot utilizando un anticuerpo específico contra I $\kappa$ B (I $\kappa$ B). Como control de carga se determinaron los niveles de la MAP cinasa p38 (p38) y actina.

Para corroborar que la activación de NF $\kappa$ B es similar entre macrófagos susceptibles y resistentes determinamos los niveles de activación de NF $\kappa$ B en el núcleo de macrófagos estimulados con diversos componentes bacterianos durante 4 horas mediante EMSA, utilizando un oligonucleótido de doble cadena de DNA con una región consenso de unión para NF $\kappa$ B. De acuerdo con la degradación de I $\kappa$ B, los niveles de activación de NF $\kappa$ B entre macrófagos susceptibles y resistentes estimulados con LPS, LTA o MDP son similares (Fig. 12A).

A continuación determinamos los niveles de p65 en el complejo DNA-NF $\kappa$ B (una subunidad de NF $\kappa$ B) en macrófagos susceptibles y resistentes. Los niveles de p65 en el complejo DNA-NF $\kappa$ B de macrófagos estimulados con LPS o LTA durante 4

horas son similares entre macrófagos resistentes y macrófagos susceptibles (Fig. 12B). Esta interacción es específica ya que solamente se compite cuando se agrega un exceso de oligonucleótido silvestre, mas no cuando se agrega un oligonucleótido mutado en la secuencia de unión de NFκB (Fig. 12B).

Estos resultados indican que no hay diferencias significativas en la activación del factor transcripcional NFκB entre macrófagos susceptibles y resistentes a la toxina letal de *B. anthracis*.



**Fig.12. Activación del factor transcripcional NFκB en macrófagos susceptibles y resistentes a toxina letal.** La unión de NFκB al DNA se determinó mediante EMSA (ensayo de retardamiento electroforético) (A) y la unión de p50 al DNA se determinó mediante un ELISA (B), en extractos nucleares preparados de macrófagos de la cepa susceptible (BALB/cJ) o de la cepa resistente (C57BL/6J) tratados por 4 horas con: endotoxina (LPS, 100 ng/ml), ácido lipoteicoico (LTA, 10 mg/ml) y muramil dipéptido (MDP, 10 mg/ml). La especificidad de la interacción se determinó compitiendo con un exceso molar (20 veces) de oligonucleótido silvestre (wt) o mutado en el sitio de unión de p50 (mut).

### 5.3 Niveles de expresión de TLR2, TLR4, MKK3, MKK6 y NOD2 en macrófagos susceptibles y resistente a la toxina letal de *B. anthracis*.

Como se refirió anteriormente, los TLRs son receptores que median el reconocimiento bacteriano en la superficie celular o en endosomas e inducen la respuesta inmune innata del hospedero [4]. TLR2 responde a lipoproteínas y

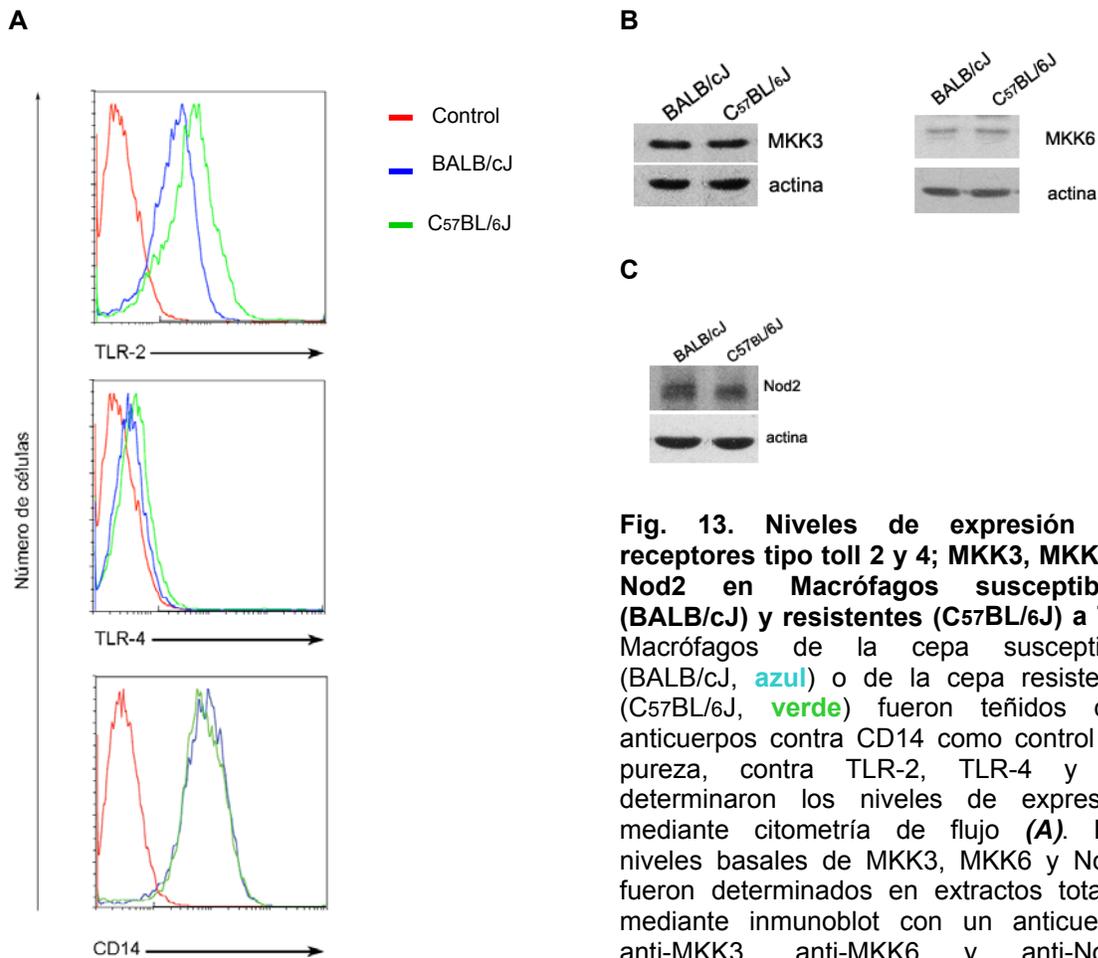
lipopéptidos de un amplio rango de patógenos [11], mientras que TLR4 es el receptor de LPS, el cual es el mayor componente de la membrana externa de bacterias Gram-negativas [21]. Ya que los niveles de activación e intensidad de p38 en respuesta a LPS y LTA son distintos en macrófagos susceptibles y resistentes, analizamos si esto se debía a diferencias en los niveles de expresión de TLRs en la superficie celular. Los macrófagos peritoneales de ratones resistentes mostraron mayores niveles de TLR2 en la superficie (MIF=42.9) que los macrófagos de ratones susceptibles (MIF=22.6). En tanto que los niveles de TLR4 (MIF=5.8 en BALB/cJ y MIF=4.7 en C57BL/6J) y CD14 (MIF=72 en BALB/cJ y MIF=68.8 en C57BL/6J) son similares entre macrófagos de ambas cepas (Fig.13A).

Estos resultados sugieren que las diferencias en la activación de la MAP cinasa p38 observadas entre macrófagos susceptibles y resistentes estimuladas con LTA podrían deberse a los niveles de expresión de TLR2 en la superficie celular. Sin embargo, el que la activación de NFκB inducida por LTA sea similar entre ambas cepas indica que las diferencias en los niveles de TLR2 no tienen un efecto similar sobre las distintas vías de señalización activadas por este receptor. Por lo tanto, determinamos si existían diferencias en los niveles de expresión de la cinasas que activan a p38, MKK3 y MKK6, por medio de inmunoblot. Los niveles de MKK3 y MKK6 son similares en los macrófagos de ambas cepas de ratones (Fig. 13B).

Dado que también observamos diferencias en la activación de p38 en respuesta a muramil dipéptido determinamos los niveles por medio de inmunoblot de Nod2, el cual es un receptor miembro de la familia de NLRs que reconoce MDP (muramil dipéptido) el motivo mínimo de la peptidoglicana de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas [36]. La activación de Nod2 promueve la activación de las MAP cinasas p38 y Jnk de manera dependiente de Card9 [95]; por otro lado, la activación de Nod2 lleva a la activación del factor transcripcional NFκB a través de la molécula efectora RICK [96]. Los niveles de Nod2 son similares en macrófagos de ambas cepas (Fig. 13C), lo cual confirma que las diferencias en la activación de

p38 inducida por MDP observadas entre macrófagos susceptibles y resistentes no se deben a diferencias en los niveles de NOD2.

En conjunto estos resultados sugieren que las diferencias en la vía de señalización de la MAP cinasa p38 en macrófagos de ratones susceptibles a la toxina letal de *B. anthracis* no es atribuible a las diferencias en los niveles de expresión de receptores para los diferentes componentes bacterianos, ni a los niveles de expresión de los diferentes componentes de la vía de señalización, sino que podrían deberse a diferencias generadas por polimorfismos en los genes que codifican para dichas moléculas que afectan su actividad o su localización celular.

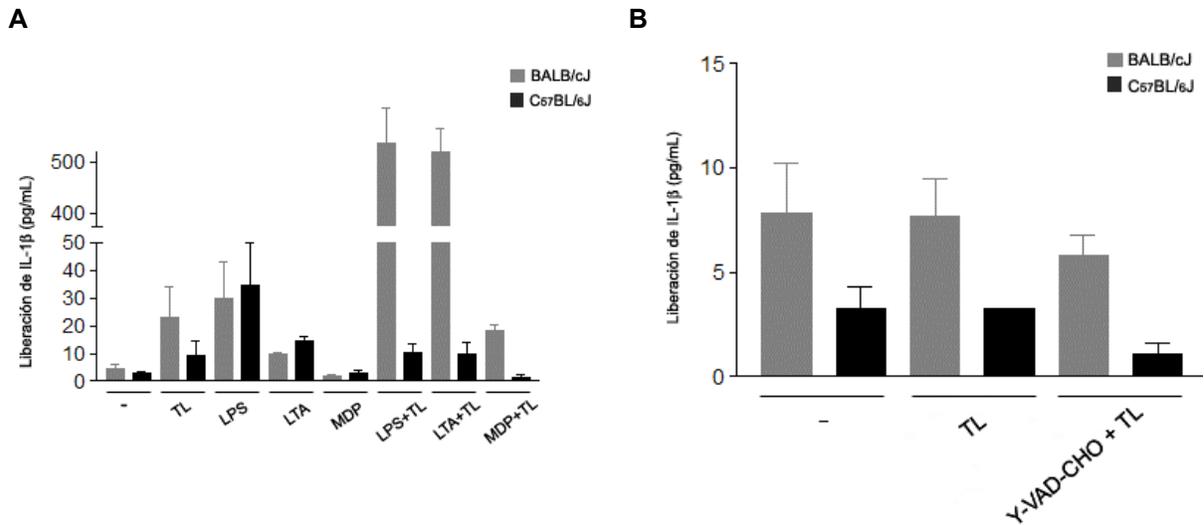


**Fig. 13. Niveles de expresión de receptores tipo toll 2 y 4; MKK3, MKK6 y Nod2 en Macrófagos susceptibles (BALB/cJ) y resistentes (C57BL/6J) a TL.** Macrófagos de la cepa susceptible (BALB/cJ, azul) o de la cepa resistente (C57BL/6J, verde) fueron teñidos con anticuerpos contra CD14 como control de pureza, contra TLR-2, TLR-4 y se determinaron los niveles de expresión mediante citometría de flujo (A). Los niveles basales de MKK3, MKK6 y Nod2 fueron determinados en extractos totales mediante inmunoblot con un anticuerpo anti-MKK3, anti-MKK6 y anti-Nod2 respectivamente (B) y (C). Como control de carga se determinaron los niveles de actina.

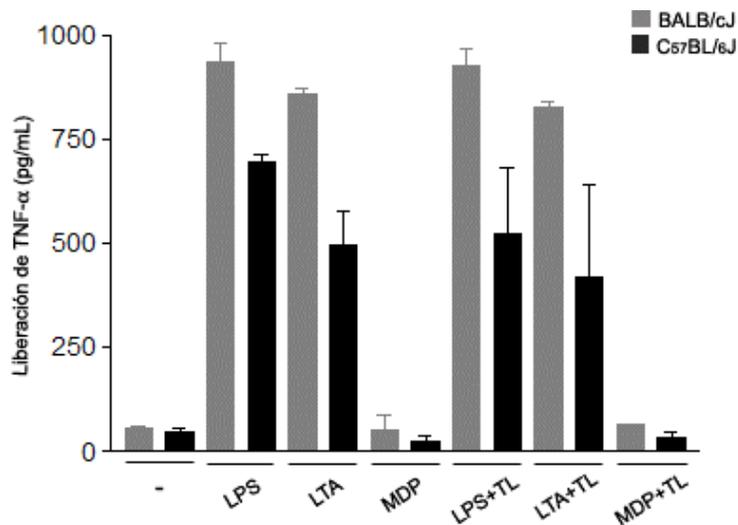
#### **5.4 La pre-estimulación con componentes bacterianos potencia la secreción de IL-1 $\beta$ mediada por la TL de *B. anthracis* en macrófagos susceptibles.**

Dado que observamos diferencias tanto en la intensidad como en la duración de la actividad de p38 entre macrófagos de la cepa susceptible y resistente y ya que la muerte inducida por la toxina letal en macrófagos susceptibles requiere inactivar a la MAP cinasa p38 y por otro lado activar a Caspasa-1, analizamos si p38 regula la actividad de Caspasa-1. Como el procesamiento de pro-IL-1 $\beta$  a su forma activa requiere de Caspasa-1 [97], determinamos los niveles de IL-1 $\beta$ , mediante un ensayo de ELISA, como medida indirecta de la actividad de Caspasa-1 en sobrenadantes de cultivo de macrófagos susceptibles y resistentes en la cual se indujo la activación de p38 a través de diversos componentes bacterianos por 30 minutos antes de ser tratados con la TL durante 8 horas. El tratamiento con TL resultó en una producción mayor de IL-1 $\beta$  en macrófagos susceptibles comparada con los macrófagos resistentes (Fig.14A). En respuesta a LPS y LTA tanto macrófagos susceptibles como resistentes mostraron niveles similares de IL-1 $\beta$ , mientras que MDP no tuvo efecto en los niveles de IL-1 $\beta$ , independientemente de la cepa (Fig. 14A). Contrario a lo que esperábamos, el tratamiento de macrófagos susceptibles con LPS, LTA o MDP seguido de TL resultó en un inducción exacerbada de IL-1 $\beta$ , más de 10 veces los niveles observados en ausencia de TL. En cambio, el tratamiento de macrófagos resistentes con estos componentes bacterianos en presencia de TL resultó en una reducción de los niveles de IL-1 $\beta$ , comparado con los observados en respuesta a LPS y LTA en ausencia de TL (Fig. 14A). De acuerdo con el hecho de que la producción de IL-1 $\beta$  depende de la activación de Caspasa-1 [70], los niveles de IL-1 $\beta$  en respuesta a la TL disminuyeron en presencia del inhibidor de Caspasa-1, Y-VAD-CHO (Fig 14B), sin embargo, la disminución no fue total, ya que se sabe que el corte de IL-1 $\beta$  es mediado también por la actividad de Caspasa-8 [98], por lo cual es necesario realizar más estudios. Por otro lado, los niveles de TNF- $\alpha$ , cuya producción es

independiente de Caspasa-1, fueron similares en macrófagos susceptibles y resistentes en respuesta a LPS y LTA en presencia o ausencia de la TL (Fig 15A).

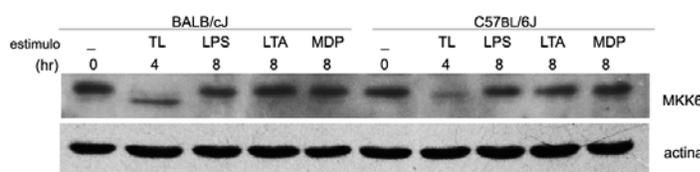


**Fig. 14. La activación de la MAP cinasa p38 no previene la producción de la citocina IL-1 $\beta$  en macrófagos susceptibles o resistentes a TL.** **A)** La producción de IL-1 $\beta$  se determinó en sobrenadantes de cultivo de macrófagos de la cepa susceptible (BALB/cJ) o de la cepa resistente (C57BL/6J) tratados por 8 horas con: toxina letal (TL, PA [1  $\mu$ g/ml] + LF [200 nm/ml]) y/o endotoxina (LPS, 100 ng/ml), ácido lipoteicoico (LTA, 10 mg/ml) 30 minutos antes de agregar la toxina letal **B)** La producción de IL-1 $\beta$  se determinó en sobrenadantes de cultivo de macrófagos de la cepa susceptible (BALB/cJ) o de la cepa resistente (C57BL/6J) tratados por 8 horas con: toxina letal (TL, PA [1  $\mu$ g/ml] + LF [200 nm/ml]) en presencia o ausencia del inhibidor de Caspasa 1 (Y-VAD-CHO) (20  $\mu$ M).



**Fig. 15. La producción de TNF- $\alpha$  en macrófagos susceptibles a la TL no depende de la MAP cinasa p38.** La producción de TNF $\alpha$  se determinaron en sobrenadantes de cultivo de macrófagos de la cepa susceptible (BALB/cJ) o de la cepa resistente (C57BL/6J) tratados por 8 horas con: toxina letal (TL, PA [1  $\mu$ g/ml] + LF [200 nm/ml]) y/o endotoxina (LPS, 100 ng/ml), ácido lipoteicoico (LTA, 10 mg/ml) 30 minutos antes de agregar la toxina letal.

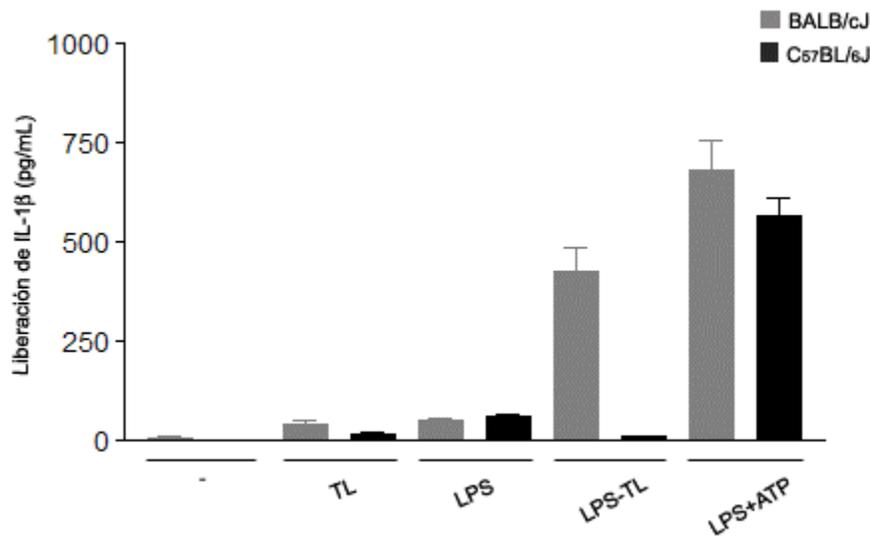
En conjunto, estos resultados sugieren que aunque los diferentes componentes bacterianos inducen la activación de p38 tanto en macrófagos susceptibles como resistentes (Fig. 10A, 10B y 10C), ésta no previene el efecto de la TL en macrófagos susceptibles al contrario promueve una mayor producción de IL-1 $\beta$ . Las diferencias en la producción de IL-1 $\beta$  entre macrófagos susceptibles y resistentes no se debe a diferencias en la entrada de la TL al macrófago, ya que de acuerdo con datos previamente publicados, la toxina letal corta a la cinasa MKK6 en ambas cepas de macrófagos (Fig. 16); sin embargo, la producción de IL-1 $\beta$  como resultado de la activación de Caspasa-1 sólo se observa en macrófagos susceptibles (Fig. 14B), lo que concuerda con el hecho de que el alelo Nalp1b regula la activación de Caspasa-1 y de la producción de IL-1 $\beta$  en respuesta a la TL en macrófagos susceptibles [81].



**Fig. 16. Corte de MKK6 en macrófagos susceptibles y resistentes a TL.** Macrófagos de la cepa susceptible y resistente fueron estimulados 30 minutos con derivados bacterianos, endotoxina (LPS, 100 ng/ml), ácido lipoteicoico (LTA, 10 mg/ml) y muramil dipéptido (MDP, 10 mg/ml) y posteriormente tratados con la toxina letal (TL, PA [1  $\mu$ g/ml] + LF [200 nm/ml]) a los tiempos indicados. Los niveles de proteína MKK6 se determinaron mediante inmunoblot utilizando un anticuerpo específico. Como control de carga se determinaron los niveles de actina.

Para descartar la posibilidad de alguna deficiencia en la activación de Caspasa-1 y por tanto en la producción de IL-1 $\beta$  en los macrófagos resistentes, tomamos ventaja del hecho de que el inflamósoma formado por NALP3, pero no el formado por NALP1, se une específicamente a ATP y actúa como una ATPasa, permitiéndole interactuar con la proteína adaptadora ASC, promoviendo así la activación de Caspasa-1 y liberación de IL-1 $\beta$  e IL-18 [99]. Para esto, estimulamos macrófagos de ambas cepas con LPS durante 8 horas y posteriormente con ATP durante 20 minutos y medimos la producción de IL-1 $\beta$  por medio de ELISA. De acuerdo con los resultados de la (Fig. 14A) los macrófagos susceptibles a la TL

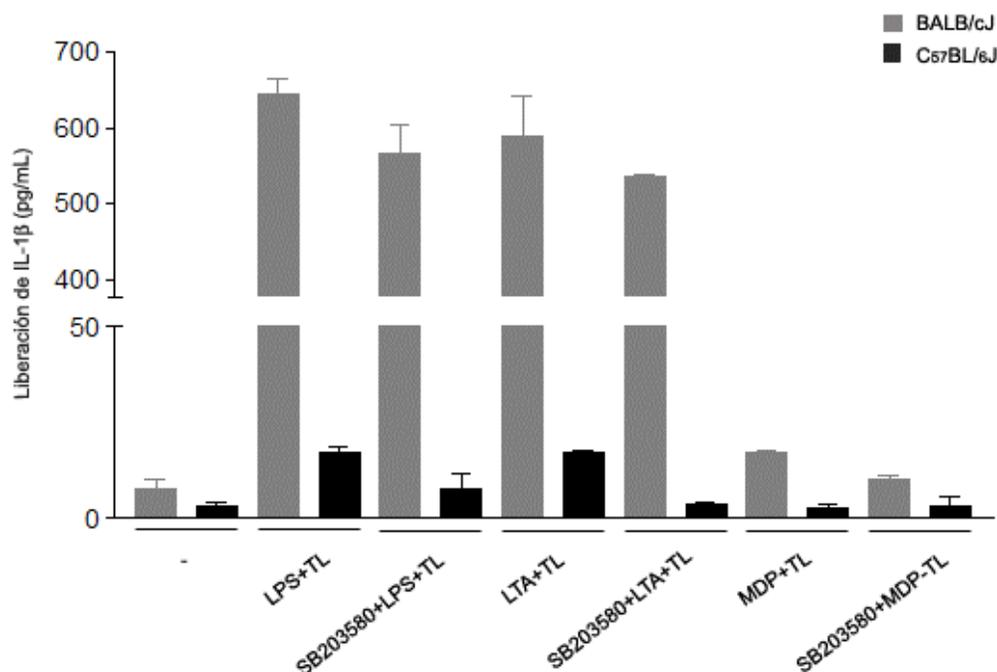
producen mayores niveles de IL-1 $\beta$  que los macrófagos resistentes cuando son estimulados con LPS o LTA y posteriormente retados con la TL, sin embargo, cuando se adiciona ATP al estímulo de LPS tanto macrófagos susceptibles como macrófagos resistentes producen niveles de IL-1 $\beta$  similares (Fig. 17). Estos resultados confirman que la producción diferencial de IL-1 $\beta$  entre las cepas en respuesta a la TL es dependiente de NALP1.



**Fig. 17. La producción diferencial de la citocina IL-1 $\beta$  entre macrófagos susceptibles o resistentes a TL depende de NALP1b.** La producción de IL-1 $\beta$  se determinó en sobrenadantes de cultivo de macrófagos de la cepa susceptible (BALB/cJ) o de la cepa resistente (C57BL/6J) tratados por 8 horas con: toxina letal (TL, PA [1  $\mu$ g/ml] + LF [200 nm/ml]) y/o endotoxina (LPS, 100 ng/ml) 30 minutos antes de agregar la toxina letal, en algunos casos se agregó ATP (5 mM) por 20 minutos,

Para descartar la posibilidad de que la activación de p38 inducida por LPS y LTA se requiera para la producción exacerbada de IL-1 $\beta$  mediada por la TL en macrófagos susceptibles, tanto macrófagos susceptibles como resistentes fueron estimulados en presencia del inhibidor de p38 (SB203580). Los niveles de IL-1 $\beta$  en los cultivos de macrófagos susceptibles tratados con LPS o LTA en presencia de la TL fueron similares independientemente del inhibidor de p38 (Fig. 18). En tanto que, el inhibidor de p38 redujo la producción de IL-1 $\beta$  en macrófagos resistentes inducida por LPS o LTA en presencia de la TL. Estos resultados indican que los componentes bacterianos predisponen específicamente a los

macrófagos susceptibles a los efectos de la TL y que esto es independiente de la actividad de p38 y sugieren que p38 en respuesta a componentes bacterianos no es capaz de regular la actividad de Caspasa-1 en macrófagos susceptibles.



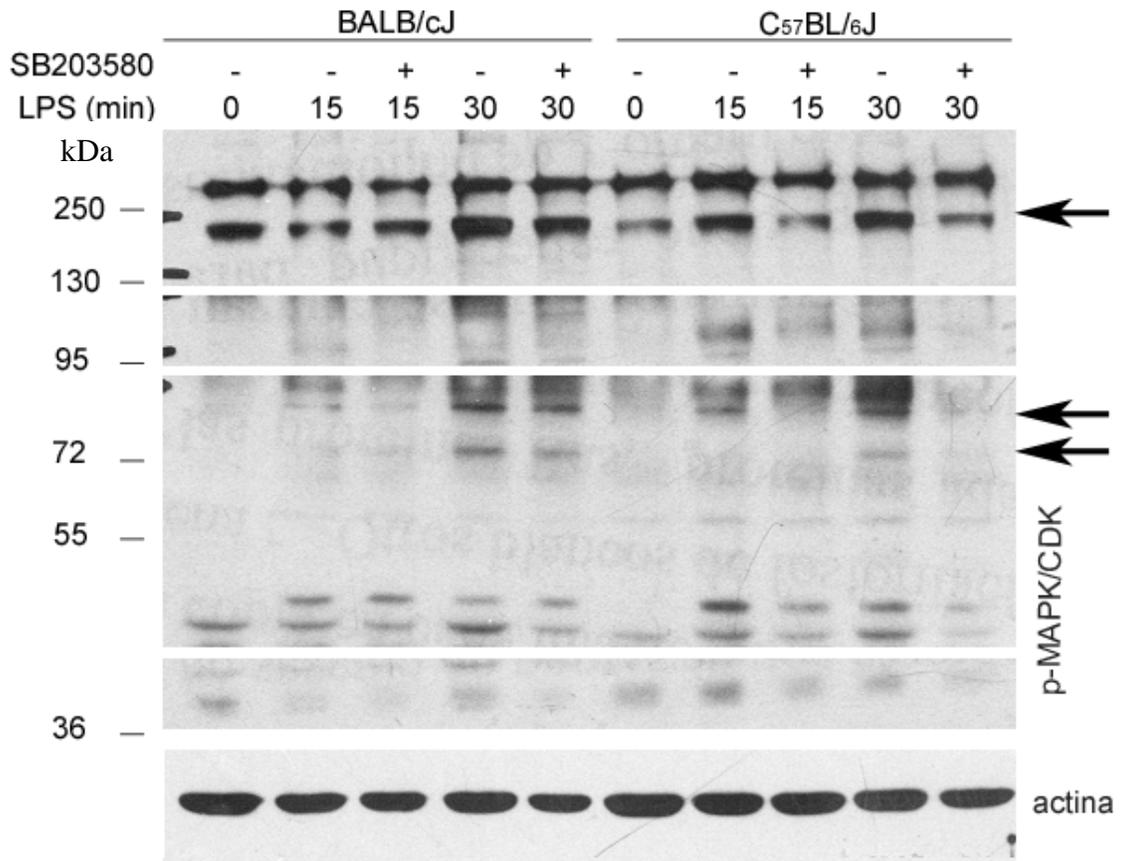
**Fig. 18.** La producción de la citocina IL-1 $\beta$  en macrófagos susceptibles a TL es independiente de la MAP cinasa p38. **A)** La producción de IL-1 $\beta$  se determinó en sobrenadantes de cultivo de macrófagos de la cepa susceptible (BALB/cJ) o de la cepa resistente (C57BL/6J) tratados por 8 horas con: toxina letal (TL, PA [1  $\mu$ g/ml] + LF [200 nm/ml]) y/o endotoxina (LPS, 100 ng/ml) 30 minutos antes de agregar la toxina letal, en algunos casos en presencia del inhibidor de la MAP cinasa p38, SB203580 (5 mM).

### 5.5 Activación diferencial de distintos sustratos de la MAP cinasa p38 en macrófagos susceptibles y resistentes a la toxina letal de *B. anthracis*.

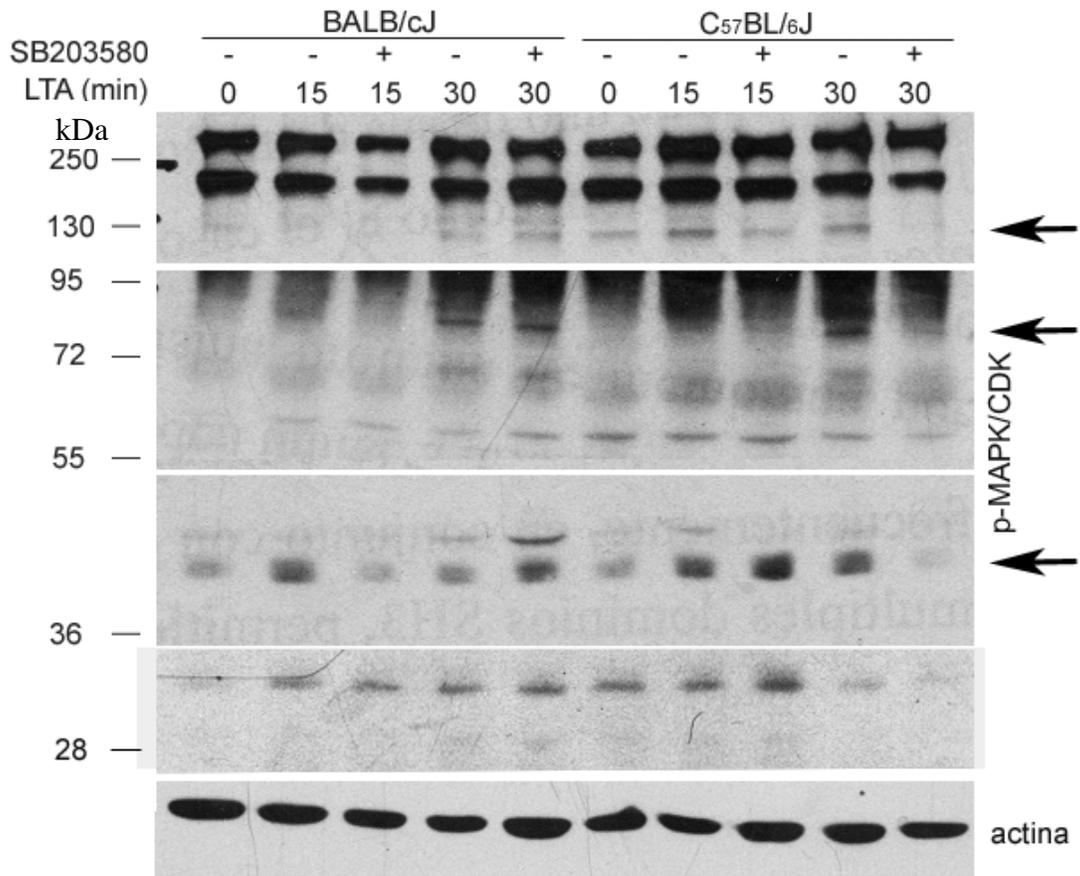
A pesar de que nuestros resultados muestran que p38 no tiene un papel indispensable en la regulación de la actividad de Caspasa-1, es importante recordar que la mutante no susceptible al corte por la TL de MKK6 confiere resistencia a los efectos citolíticos de la TL a los macrófagos de la cepa susceptible, por lo tanto p38 debe estar jugando un papel en regular la resistencia, y ya que la cinética e intensidad de activación de p38 es distinta entre los

macrófagos susceptibles y resistentes a la toxina letal, se determinó qué proteínas substratos de p38 son afectadas por estas diferencias y, por lo tanto puedan, contribuir a la resistencia de los macrófagos a la toxina letal, para ello estimulamos macrófagos con distintos componentes bacterianos a tiempos que observamos diferencias en la cinética de activación de p38 entre las dos cepas, y se determinó los niveles de fosforilación de las proteínas substrato. Debido a que el anticuerpo reconoce el patrón de fosforilación de MAP cinasas en general, añadimos un inhibidor específico de p38 (SB203580) para diferenciar los sustratos fosforilados por p38. Encontramos que macrófagos resistentes estimulados con LPS fosforilan proteínas con un peso molecular aproximado de 240 kDa y 85 kDa, las cuales sólo se fosforilan de manera dependiente de p38 a los 15 y 30 minutos por los macrófagos resistentes, mientras que en los macrófagos susceptibles la fosforilación de estas proteínas no depende de p38. También observamos la fosforilación dependiente de p38 en una proteína con un peso molecular aproximado de 75 kDa a los 30 minutos, sólo en macrófagos resistentes (Fig. 19A). En el caso de macrófagos estimulados con LTA observamos la fosforilación dependiente de p38 en proteínas con un peso aproximado de 130 kDa y 90 kDa, a los 15 y 30 minutos en macrófagos resistentes; por otro lado, encontramos a una proteína con un peso aproximado de 50 kDa, la cual es fosforilada a los 15 minutos de una manera dependiente de p38 en los macrófagos susceptibles y a los 30 minutos en lo macrófagos resistentes (Fig. 19B). Por lo cual la MAP cinasa p38 fosforila de manera diferencial distintas proteínas que podrían estar regulando la susceptibilidad o resistencia a la toxina letal en respuesta a componentes de bacterias Gram-negativas (LPS) y Gram-positivas (LTA).

A



**B**



**Fig. 19. La MAP cinasa p38 fosforila diferentes proteínas en macrófagos susceptibles y resistentes.** Macrófagos de la cepa susceptible (BALB/cJ) o de la cepa resistente (C57BL/6J) se trataron con diferentes derivados bacterianos: **A)** endotoxina (LPS, 100 ng/ml); **B)** ácido lipoteicoico (LTA, 10 mg/ml) por los tiempos indicados en ausencia (-) o presencia (+) del inhibidor de la MAP cinasa p38 SB203580 (5 mM). Los niveles de las proteínas fosforiladas por p38 se determinaron por medio de inmunoblot utilizando un anticuerpo anti-substratos de MAP cinasas fosforilados (pMAPK/CDK). Como control de carga se muestran los niveles de actina.

## 6. DISCUSIÓN

En el presente estudio mostramos que componentes de bacterias Gram-negativas (LPS), Gram-positivas (LTA) o componentes de bacterias intracelulares (MDP) regulan de manera diferencial la activación de la MAP cinasa p38, tanto en la intensidad como en la cinética de activación en macrófagos susceptibles y resistentes a la toxina letal de *B. anthracis*. Tomando en cuenta que la toxina letal de *B. anthracis*, además de activar a Caspasa-1 en macrófagos de ratones susceptibles [91], necesita inactivar la vía de señalización de la MAP cinasa p38 para inducir la muerte del macrófago [84], creemos que p38 podría estar participando en la regulación de múltiples procesos celulares que ayudarían a la sobrevivencia celular. Por lo anterior, la activación con mayor intensidad de p38 que encontramos en macrófagos de la cepa resistente en respuesta a LTA, que es un compuesto de bacterias Gram-positivas (*B. anthracis* es una bacteria Gram-positiva), sugiere que la MAP cinasa p38 podría estar regulando la sobrevivencia de los macrófagos cuando éstos son retados con la toxina letal de *B. anthracis*.

De manera importante, encontramos que esta disparidad en la activación de la MAP cinasa p38 no se debe a diferencias en los niveles de expresión de los receptores para los distintos componentes (TLR2-LTA; TLR4-LPS y NOD2- MDP), debido a que la activación del factor transcripcional NFκB, en respuesta a los diferentes componentes bacterianos es similar entre macrófagos susceptibles y resistentes, a pesar que los niveles del receptor TLR2 en macrófagos de la cepa resistente duplican el número de receptores con respecto a la cepa susceptible. En el caso de macrófagos estimulados con MDP, se encontró una activación diferencial del factor transcripcional NFκB, en donde al tiempo observado (60 minutos) sólo los macrófagos susceptibles lo activan; sin embargo, los niveles de expresión de Nod2 son semejantes entre ambas cepas. Las diferencias observadas en la activación de la MAP cinasa p38 tampoco se deben a diferencias en los niveles de expresión de las MAP cinasa cinasa (MKK) que activan a p38 (MKK3 y MKK6). Por lo cual, estas diferencias en la activación de p38 podrían

deberse a diferencias generadas por polimorfismos en los genes que codifican para dicha molécula que afecten su actividad o su localización celular.

Concordante con las diferencias en la activación de la MAP cinasa p38 en respuesta a componentes de bacterias Gram-negativas (LPS) y Gram-positivas (LTA), observamos una fosforilación diferencial de los blancos de p38 entre los macrófagos. De resaltar, es la fosforilación de varias proteínas, las cuales se fosforilan exclusivamente en macrófagos de la cepa resistente. Podríamos especular que algunas de las proteínas encontradas estarían jugando un papel importante en el control de la muerte celular, ayudando a la sobrevivencia del macrófago, y que posiblemente éstos sean los factores determinantes en la resistencia a la muerte inducida por la toxina letal. Entre estos sustratos, una proteína de aproximadamente 51 kDa, que se fosforila de manera dependiente de p38 sólo en macrófagos de la cepa resistente, coincide con el peso molecular de GSK-3 $\beta$  e interesantemente GSK-3 $\beta$  es una proteína involucrada en procesos de sobrevivencia celular. En macrófagos, la fosforilación de GSK-3 $\beta$  está dada por Akt [100], no obstante un reporte reciente demostró que GSK-3 $\beta$  puede ser fosforilada por p38 en timocitos y células 293T [101].

La fosforilación de GSK-3 $\beta$  en macrófagos de la cepa resistente produciría su inhibición y como consecuencia la acumulación de  $\beta$ -catenina en el núcleo. Se sabe que  $\beta$ -catenina se une al factor de transcripción TCF/Lef-1, estabilizando este complejo de transcripción. Entre los genes blancos que son regulados positivamente por este complejo se encuentran c-myc, fibronectina, ciclina-D1, c-jun, fra-1, E-caderina, matrisilina, conexina 43 y BCL-X<sub>L</sub> (13).

Proponemos que GSK-3 $\beta$  se estaría fosforilando por p38 en macrófagos de la cepa resistente estimulados con LTA, y esto provocaría la acumulación de  $\beta$ -catenina en el núcleo, lo cual llevaría a la activación de genes que son factores importantes en la regulación de la sobrevivencia, como BCL-X<sub>L</sub>.

Otro sustrato fosforilado de manera dependiente de p38 en macrófagos de la cepa resistente estimulados con LTA, es una proteína con un peso molecular de 86 kDa, que coincide con el peso molecular de STAT-3. En general, se sabe que las STATs son factores de transcripción que se activan cuando son fosforilados en residuos de tirosina por las cinasas de la familia de JAK (del inglés, Janus Kinases), o en residuos conservados de treonina y serina por la familia de las MAP cinasas, y regulan la expresión de diversos genes [102]. STAT-3 ha sido reportada como una proteína que modula tanto procesos pro-apoptóticos como anti-apoptóticos, dependiendo del tipo celular, resaltando sin embargo como un factor con funciones anti-apoptóticas [103]. Se ha observado que macrófagos carentes de STAT-3 son altamente susceptibles a choque endotóxico, mostrándose además un incremento en la concentración de citocinas pro-inflamatorias, tales como TNF- $\alpha$ , IL-6, INF- $\gamma$  e IL-1 $\beta$ , en suero de ratón. Así la activación de STAT-3 en macrófagos se ha mostrado indispensable para la prevención de inflamación crónica [104]. Por lo tanto, proponemos que STAT-3 sería activada por p38 sólo en macrófagos resistentes, lo cual ayudaría a la sobrevivencia de éstos ante el efecto de muerte inducido por la TL, dado su efecto anti-inflamatorio.

En general estos datos sugieren que la activación diferencial de p38 y por ende la de sus blancos, conlleva al aumento en la expresión y/o activación de diversas proteínas con efectos anti-apoptóticos, así como con efectos supresores de la inflamación, todo ello mediado por diversos factores de transcripción como  $\beta$ -catenina o STAT3 o directamente por la MAP cinasa p38. La futura identificación de los sustratos de p38 mediante espectrometría de masas, nos permitirá corroborar la participación de estas proteínas en la resistencia a los efectos citolíticos de la toxina letal en macrófagos.

Ya que en general encontramos una mayor fosforilación de varias proteínas de manera dependiente de p38, tanto con LPS como con LTA, las cuales se fosforilan exclusivamente en los macrófagos de ratones resistentes, pensamos que esto podría deberse a diferencias en la localización de p38, en donde una ubicación

adecuada permitiría la accesibilidad de ésta por sus sustratos. Esta localización diferencial de p38 podría estar regulada por la subfamilia de proteínas motoras tipo cinesinas UNC104, particularmente por KIF1C, ya que se sabe que el transporte celular de proteínas es controlado por esta subfamilia, y de que el alelo *Kif1c* funcional se encuentra sólo en macrófagos de la cepa resistente. Aunado a lo anterior macrófagos mutantes en el alelo *Kif1c* funcional son susceptibles a los efectos de la toxina letal [105]. Por lo tanto, una localización adecuada de p38, regulada por la proteína motora KIF1C, permitiría la fosforilación de sustratos que ayudarían a los macrófagos a contender con los efectos de la TL. De esta manera, la susceptibilidad o resistencia a la toxina letal estaría regulada no sólo por Nalp1b, sino también por Kif1C.

Retomando que la toxina letal de *B. anthracis* necesita inactivar la vía de señalización de la MAP cinasa p38 para inducir muerte [84], además de la activación de Caspasa-1 en macrófagos de ratones susceptibles [91], pensamos que la activación previa de p38 prevendría la activación de Caspasa-1 en macrófagos de la cepa susceptible. Contrario a los que esperábamos, en este estudio encontramos que la activación previa de p38 con LPS o LTA en macrófagos susceptibles a la TL, no previene la producción de IL-1 $\beta$ , ya que los niveles de secreción se exacerban en respuesta a la toxina letal. Lo mismo ocurre con MDP, aunque con este estímulo, la producción de IL-1 $\beta$  fue menor, esto sugiere que la activación previa de p38 en macrófagos susceptibles no previene la actividad de Caspasa-1 inducida por la TL. Sin embargo, para poder concluir esto, es necesario repetir estos experimentos en presencia de inhibidores específicos para caspasa 8, ya que recientemente se reportó que esta caspasa, en respuesta a LPS, también participa en la maduración y secreción de IL-1 $\beta$  [98]. Por otra parte, en los macrófagos resistentes estimulados con LPS, LTA o MDP la producción de IL-1 $\beta$  no se exacerbó, lo que sugiere que la producción de IL-1 $\beta$  mediada ya sea por caspasa-1 o caspasa-8 puede ser regulada por p38, resultando en una activación moderada de caspasa-1 que de acuerdo a resultados

recientemente publicados podría participar en la síntesis de lípidos para reparar el daño a las membranas causado por toxinas formadoras de poro [106].

En macrófagos, NALP1, en respuesta a la toxina letal de *B. anthracis* y a diversos componentes bacterianos se asocia directamente con Caspasa-1 por medio de sus dominios CARD. Esta asociación promueve la dimerización de la forma monomérica inactiva de pro-Caspasa-1 que culmina en su activación [107, 108]. La activación de Caspasa-1 es regulada por la proteína anti-apoptótica BCL<sub>XL</sub>. El cual a su vez se une directamente a NALP1 a través del dominio LRRs de NALP1 bajo una conformación inactiva y con ello suprime la conversión de NALP1 a su forma activa. Esta asociación inhibe también la unión de NALP1 con ASC a través de sus dominios PYD necesarios para el ensamblaje del inflamosoma, lo que conlleva a la maduración de IL-1 $\beta$  [109].

En cambio, la unión directa de ASC a Caspasa-1, lleva a la formación de un complejo macromolecular llamado piroptosoma, que monta una respuesta más robusta de IL-1 $\beta$  a la dada por el inflamosoma [110].

De manera interesante, y concordante con la activación de los sustratos de p38, encontramos una proteína de 30 kDa que coincide con el peso molecular de BCL<sub>XL</sub>, la cual es fosforilada de manera dependiente de p38 sólo en macrófagos de la cepa resistente. Por lo cual, creemos que BCL<sub>XL</sub> podría ser fosforilada a través de p38 sólo en macrófagos de la cepa resistente, y una vez fosforilado, BCL<sub>XL</sub> se separaría de NALP1 permitiendo la unión de NALP1 a Caspasa-1 y con ello la formación del inflamosoma. En tanto que en macrófagos de la cepa susceptible BCL<sub>XL</sub> al no ser fosforilado por p38, se mantendría unido a NALP1 impidiendo de esta manera la unión de NALP1 a Caspasa-1, y con ello permitiendo la unión de ASC a Caspasa-1 para formar el piroptosoma. Teniendo así, NALP1 un papel regulador de la actividad de Caspasa-1. Por lo tanto, la respuesta exacerbada de la cepa susceptible sería la que lleve a la muerte del

ratón, ya que niveles excesivos de citocinas pro-inflamatorias, como IL-1 $\beta$  e IL-18 se asocian con el desarrollo de choques sépticos [67].

## 7. CONCLUSIONES

- Componentes de bacterias Gram-negativas (LPS) o Gram-positivas (LTA) regulan de manera diferencial la activación de la MAP cinasa p38 en macrófagos susceptibles (BALB/cJ) y macrófagos resistentes (C57BL/6J) a la toxina Letal de *B. anthracis*. Sin embargo, no hay diferencias significativas en la activación del factor transcripcional NF $\kappa$ B.
- El muramil dipéptido (MDP), un componente de bacterias intracelulares, activa de manera diferencial tanto a la MAP cinasa p38 como al factor transcripcional NF $\kappa$ B en macrófagos susceptibles (BALB/cJ) y macrófagos resistentes (C57BL/6J) a la Toxina Letal.
- La activación previa de p38 con LPS o LTA en macrófagos susceptibles (BALB/cJ) a la Toxina Letal contrario a los que esperábamos, no previene la producción de IL-1 $\beta$ , sino que esta producción se exagera en respuesta a la toxina letal, de manera más modesta con MDP, lo cual sugiere que la MAP cinasa p38 en respuesta a componentes bacterianos (LPS, LTA y MDP) no es capaz de regular la actividad de caspasa-1 en macrófagos susceptibles.
- La MAP cinasa p38 fosforila de manera diferencial a distintas proteínas en macrófagos susceptibles (BALB/cJ) y macrófagos resistentes (C57BL/6J) a la Toxina Letal en respuesta a LPS y LTA.

## 8. REFERENCIAS:

1. Zhang, Y.L. and C. Dong, *MAP kinases in immune responses*. Cell Mol Immunol, 2005. **2**(1): p. 20-7.
2. Muraille, E. and O. Leo, *Revisiting the Th1/Th2 paradigm*. Scand J Immunol, 1998. **47**(1): p. 1-9.
3. Mosser, D.M., *The many faces of macrophage activation*. J Leukoc Biol, 2003. **73**(2): p. 209-12.
4. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi, *Pathogen recognition and innate immunity*. Cell, 2006. **124**(4): p. 783-801.
5. Kawai, T. and S. Akira, *TLR signaling*. Cell Death Differ, 2006. **13**(5): p. 816-25.
6. Janeway, C.A., Jr., *The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self*. Immunol Today, 1992. **13**(1): p. 11-6.
7. Takeda, K. and S. Akira, *Toll-like receptors in innate immunity*. Int Immunol, 2005. **17**(1): p. 1-14.
8. Rock, F.L., et al., *A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(2): p. 588-93.
9. Xu, Y., et al., *Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains*. Nature, 2000. **408**(6808): p. 111-5.
10. Carpenter, S. and L.A. O'Neill, *How important are Toll-like receptors for antimicrobial responses?* Cell Microbiol, 2007. **9**(8): p. 1891-901.
11. Khor, C.C., et al., *A Mal functional variant is associated with protection against invasive pneumococcal disease, bacteremia, malaria and tuberculosis*. Nat Genet, 2007. **39**(4): p. 523-8.
12. Ozinsky, A., et al., *Co-operative induction of pro-inflammatory signaling by Toll-like receptors*. J Endotoxin Res, 2000. **6**(5): p. 393-6.
13. Ozinsky, A., et al., *The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(25): p. 13766-71.
14. West, A.P., A.A. Koblansky, and S. Ghosh, *Recognition and signaling by toll-like receptors*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2006. **22**: p. 409-37.
15. Takeuchi, O., et al., *Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins*. J Immunol, 2002. **169**(1): p. 10-4.
16. Underhill, D.M., et al., *The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens*. Nature, 1999. **401**(6755): p. 811-5.
17. Kataoka, K., et al., *Activation of macrophages by linear (Iright-arrow3)-beta-D-glucans. Implications for the recognition of fungi by innate immunity*. J Biol Chem, 2002. **277**(39): p. 36825-31.
18. Echchannaoui, H., et al., *Toll-like receptor 2-deficient mice are highly susceptible to Streptococcus pneumoniae meningitis because of reduced bacterial clearing and enhanced inflammation*. J Infect Dis, 2002. **186**(6): p. 798-806.
19. Hirschfeld, M., et al., *Signaling by toll-like receptor 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages*. Infect Immun, 2001. **69**(3): p. 1477-82.
20. Wright, S.D., et al., *CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein*. Science, 1990. **249**(4975): p. 1431-3.

21. Takeda, K., T. Kaisho, and S. Akira, *Toll-like receptors*. *Annu Rev Immunol*, 2003. **21**: p. 335-76.
22. Poltorak, A., et al., *Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene*. *Science*, 1998. **282**(5396): p. 2085-8.
23. Servant, M.J., et al., *Identification of distinct signaling pathways leading to the phosphorylation of interferon regulatory factor 3*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(1): p. 355-63.
24. Servant, M.J., et al., *Identification of the minimal phosphoacceptor site required for in vivo activation of interferon regulatory factor 3 in response to virus and double-stranded RNA*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(11): p. 9441-7.
25. Dunne, A. and L.A. O'Neill, *Adaptor usage and Toll-like receptor signaling specificity*. *FEBS Lett*, 2005. **579**(15): p. 3330-5.
26. Shoham, S., et al., *Toll-like receptor 4 mediates intracellular signaling without TNF-alpha release in response to Cryptococcus neoformans polysaccharide capsule*. *J Immunol*, 2001. **166**(7): p. 4620-6.
27. Takeuchi, O., et al., *Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components*. *Immunity*, 1999. **11**(4): p. 443-51.
28. Netea, M.G., et al., *Recognition of fungal pathogens by Toll-like receptors*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2004. **23**(9): p. 672-6.
29. Kurt-Jones, E.A., et al., *Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus*. *Nat Immunol*, 2000. **1**(5): p. 398-401.
30. Perera, P.Y., et al., *CD11b/CD18 acts in concert with CD14 and Toll-like receptor (TLR) 4 to elicit full lipopolysaccharide and taxol-inducible gene expression*. *J Immunol*, 2001. **166**(1): p. 574-81.
31. McCoy, C.E. and L.A. O'Neill, *The role of toll-like receptors in macrophages*. *Front Biosci*, 2008. **13**: p. 62-70.
32. Inohara, N. and G. Nunez, *The NOD: a signaling module that regulates apoptosis and host defense against pathogens*. *Oncogene*, 2001. **20**(44): p. 6473-81.
33. Harton, J.A., et al., *Cutting edge: CATERPILLER: a large family of mammalian genes containing CARD, pyrin, nucleotide-binding, and leucine-rich repeat domains*. *J Immunol*, 2002. **169**(8): p. 4088-93.
34. Ting, J.P., et al., *The NLR gene family: a standard nomenclature*. *Immunity*, 2008. **28**(3): p. 285-7.
35. Kanneganti, T.D., M. Lamkanfi, and G. Nunez, *Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease*. *Immunity*, 2007. **27**(4): p. 549-59.
36. Girardin, S.E., et al., *Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(11): p. 8869-72.
37. Inohara, N., et al., *Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(8): p. 5509-12.
38. Inohara, N., et al., *Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappaB*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(21): p. 14560-7.
39. Ogura, Y., et al., *Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(7): p. 4812-8.
40. Dong, C., R.J. Davis, and R.A. Flavell, *MAP kinases in the immune response*, in *Annu Rev Immunol*. 2002. p. 55-72.

41. Chang, L. and M. Karin, *Mammalian MAP kinase signalling cascades*. Nature, 2001. **410**(6824): p. 37-40.
42. Gutkind, J.S., *Regulation of mitogen-activated protein kinase signaling networks by G protein-coupled receptors*. Sci STKE, 2000. **2000**(40): p. RE1.
43. Davis, R.J., *Signal transduction by the JNK group of MAP kinases*. Cell, 2000. **103**(2): p. 239-52.
44. Camps, M., A. Nichols, and S. Arkininstall, *Dual specificity phosphatases: a gene family for control of MAP kinase function*. Faseb J, 2000. **14**(1): p. 6-16.
45. Theodosiou, A. and A. Ashworth, *MAP kinase phosphatases*. Genome Biol, 2002. **3**(7): p. REVIEWS3009.
46. Lazzaro, T.A., K.A. McNeil, and D.L. Beggs, *A factor analytic study of the multidimensional properties of impulse control*. J Clin Psychol, 1971. **27**(4): p. 495-8.
47. Raingeaud, J., et al., *Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine*. J Biol Chem, 1995. **270**(13): p. 7420-6.
48. Derijard, B., et al., *JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain*. Cell, 1994. **76**(6): p. 1025-37.
49. Han, J., et al., *A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells*. Science, 1994. **265**(5173): p. 808-11.
50. Zarubin, T. and J. Han, *Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway*. Cell Res, 2005. **15**(1): p. 11-8.
51. Lechner, C., et al., *ERK6, a mitogen-activated protein kinase involved in C2C12 myoblast differentiation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(9): p. 4355-9.
52. Lee, J.C., et al., *p38 mitogen-activated protein kinase inhibitors--mechanisms and therapeutic potentials*. Pharmacol Ther, 1999. **82**(2-3): p. 389-97.
53. Hu, M.C., et al., *Murine p38-delta mitogen-activated protein kinase, a developmentally regulated protein kinase that is activated by stress and proinflammatory cytokines*. J Biol Chem, 1999. **274**(11): p. 7095-102.
54. Chen, Z., et al., *MAP kinases*. Chem Rev, 2001. **101**(8): p. 2449-76.
55. Ben-Levy, R., et al., *Identification of novel phosphorylation sites required for activation of MAPKAP kinase-2*. Embo J, 1995. **14**(23): p. 5920-30.
56. Reynolds, C.H., et al., *Reactivating kinase/p38 phosphorylates tau protein in vitro*. J Neurochem, 1997. **69**(1): p. 191-8.
57. Parker, C.G., et al., *Identification of stathmin as a novel substrate for p38 delta*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **249**(3): p. 791-6.
58. Kramer, R.M., et al., *p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylates cytosolic phospholipase A2 (cPLA2) in thrombin-stimulated platelets. Evidence that proline-directed phosphorylation is not required for mobilization of arachidonic acid by cPLA2*. J Biol Chem, 1996. **271**(44): p. 27723-9.
59. Ghosh, S., M.J. May, and E.B. Kopp, *NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses*. Annu Rev Immunol, 1998. **16**: p. 225-60.
60. Zhang, G. and S. Ghosh, *Toll-like receptor-mediated NF-kappaB activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity*. J Clin Invest, 2001. **107**(1): p. 13-9.

61. Kang, S.M., et al., *NF-kappa B subunit regulation in nontransformed CD4+ T lymphocytes*. Science, 1992. **256**(5062): p. 1452-6.
62. Hayden, M.S. and S. Ghosh, *Shared principles in NF-kappaB signaling*. Cell, 2008. **132**(3): p. 344-62.
63. Wesche, H., et al., *MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex*. Immunity, 1997. **7**(6): p. 837-47.
64. Fitzgerald, K.A., et al., *Mal (MyD88-adapter-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction*. Nature, 2001. **413**(6851): p. 78-83.
65. Kaisho, T. and S. Akira, *Toll-like receptor function and signaling*. J Allergy Clin Immunol, 2006. **117**(5): p. 979-87; quiz 988.
66. Karin, M. and A. Lin, *NF-kappaB at the crossroads of life and death*. Nat Immunol, 2002. **3**(3): p. 221-7.
67. Libby, P., *Inflammatory mechanisms: the molecular basis of inflammation and disease*. Nutr Rev, 2007. **65**(12 Pt 2): p. S140-6.
68. Schmitz, J., et al., *IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines*. Immunity, 2005. **23**(5): p. 479-90.
69. Akira, S., *The role of IL-18 in innate immunity*. Curr Opin Immunol, 2000. **12**(1): p. 59-63.
70. Martinon, F., K. Burns, and J. Tschopp, *The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta*. Mol Cell, 2002. **10**(2): p. 417-26.
71. Yu, J.W., et al., *Cryopyrin and pyrin activate caspase-1, but not NF-kappaB, via ASC oligomerization*. Cell Death Differ, 2006. **13**(2): p. 236-49.
72. Agostini, L., et al., *NALP3 forms an IL-1beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder*. Immunity, 2004. **20**(3): p. 319-25.
73. Moriya, M., et al., *Role of charged and hydrophobic residues in the oligomerization of the PYRIN domain of ASC*. Biochemistry, 2005. **44**(2): p. 575-83.
74. Srinivasula, S.M., et al., *The PYRIN-CARD protein ASC is an activating adaptor for caspase-1*. J Biol Chem, 2002. **277**(24): p. 21119-22.
75. Ting, J.P., S.B. Willingham, and D.T. Bergstralh, *NLRs at the intersection of cell death and immunity*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(5): p. 372-9.
76. Little, S.F. and B.E. Ivins, *Molecular pathogenesis of Bacillus anthracis infection*. Microbes Infect, 1999. **1**(2): p. 131-9.
77. Mock, M. and A. Fouet, *Anthrax*. Annu Rev Microbiol, 2001. **55**: p. 647-71.
78. Bradley, K.A., et al., *Identification of the cellular receptor for anthrax toxin*. Nature, 2001. **414**(6860): p. 225-9.
79. Moayeri, M., J.F. Wiggins, and S.H. Leppla, *Anthrax protective antigen cleavage and clearance from the blood of mice and rats*. Infect Immun, 2007. **75**(11): p. 5175-84.
80. Gordon, V.M., S.H. Leppla, and E.L. Hewlett, *Inhibitors of receptor-mediated endocytosis block the entry of Bacillus anthracis adenylate cyclase toxin but not that of Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin*. Infect Immun, 1988. **56**(5): p. 1066-9.
81. Duesbery, N.S., et al., *Proteolytic inactivation of MAP-kinase-kinase by anthrax lethal factor*. Science, 1998. **280**(5364): p. 734-7.

82. Klimpel, K.R., N. Arora, and S.H. Leppla, *Anthrax toxin lethal factor contains a zinc metalloprotease consensus sequence which is required for lethal toxin activity*. Mol Microbiol, 1994. **13**(6): p. 1093-100.
83. Xia, Y., et al., *JNKK1 organizes a MAP kinase module through specific and sequential interactions with upstream and downstream components mediated by its amino-terminal extension*. Genes Dev, 1998. **12**(21): p. 3369-81.
84. Duesbery, N.S., et al., *Suppression of ras-mediated transformation and inhibition of tumor growth and angiogenesis by anthrax lethal factor, a proteolytic inhibitor of multiple MEK pathways*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(7): p. 4089-94.
85. Hanna, P.C., D. Acosta, and R.J. Collier, *On the role of macrophages in anthrax*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(21): p. 10198-201.
86. Friedlander, A.M., *Macrophages are sensitive to anthrax lethal toxin through an acid-dependent process*. J Biol Chem, 1986. **261**(16): p. 7123-6.
87. McAllister, R.D., et al., *Susceptibility to anthrax lethal toxin is controlled by three linked quantitative trait loci*. Am J Pathol, 2003. **163**(5): p. 1735-41.
88. Roberts, J.E., et al., *Ltx1, a mouse locus that influences the susceptibility of macrophages to cytolysis caused by intoxication with Bacillus anthracis lethal factor, maps to chromosome 11*. Mol Microbiol, 1998. **29**(2): p. 581-91.
89. Friedlander, A.M., et al., *Characterization of macrophage sensitivity and resistance to anthrax lethal toxin*. Infect Immun, 1993. **61**(1): p. 245-52.
90. Singh, Y., et al., *Internalization and processing of Bacillus anthracis lethal toxin by toxin-sensitive and -resistant cells*. J Biol Chem, 1989. **264**(19): p. 11099-102.
91. Boyden, E.D. and W.F. Dietrich, *Nalp1b controls mouse macrophage susceptibility to anthrax lethal toxin*. Nat Genet, 2006. **38**(2): p. 240-4.
92. Park, J.M., et al., *Macrophage apoptosis by anthrax lethal factor through p38 MAP kinase inhibition*. Science, 2002. **297**(5589): p. 2048-51.
93. Schreiber, E., et al., *Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells*. Nucleic Acids Res, 1989. **17**(15): p. 6419.
94. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
95. Hsu, Y.M., et al., *The adaptor protein CARD9 is required for innate immune responses to intracellular pathogens*. Nat Immunol, 2007. **8**(2): p. 198-205.
96. Inohara, et al., *NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease*. Annu Rev Biochem, 2005. **74**: p. 355-83.
97. Thornberry, N.A., et al., *A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes*. Nature, 1992. **356**(6372): p. 768-74.
98. Maelfait, J., et al., *Stimulation of Toll-like receptor 3 and 4 induces interleukin-1beta maturation by caspase-8*. J Exp Med, 2008. **205**(9): p. 1967-73.
99. Duncan, J.A., et al., *Cryopyrin/NALP3 binds ATP/dATP, is an ATPase, and requires ATP binding to mediate inflammatory signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(19): p. 8041-6.
100. Monick, M.M., et al., *Lipopolysaccharide activates Akt in human alveolar macrophages resulting in nuclear accumulation and transcriptional activity of beta-catenin*. J Immunol, 2001. **166**(7): p. 4713-20.

101. Thornton, T.M., et al., *Phosphorylation by p38 MAPK as an alternative pathway for GSK3beta inactivation*. Science, 2008. **320**(5876): p. 667-70.
102. Ihle, J.N., *The Stat family in cytokine signaling*. Curr Opin Cell Biol, 2001. **13**(2): p. 211-7.
103. Takeda, K. and S. Akira, *STAT family of transcription factors in cytokine-mediated biological responses*. Cytokine Growth Factor Rev, 2000. **11**(3): p. 199-207.
104. Takeda, K., et al., *Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils*. Immunity, 1999. **10**(1): p. 39-49.
105. Watters, J.W., et al., *Kif1C, a kinesin-like motor protein, mediates mouse macrophage resistance to anthrax lethal factor*. Curr Biol, 2001. **11**(19): p. 1503-11.
106. Gurcel, L., et al., *Caspase-1 activation of lipid metabolic pathways in response to bacterial pore-forming toxins promotes cell survival*. Cell, 2006. **126**(6): p. 1135-45.
107. Poyet, J.L., et al., *Identification of Ipaf, a human caspase-1-activating protein related to Apaf-1*. J Biol Chem, 2001. **276**(30): p. 28309-13.
108. Faustin, B., et al., *Reconstituted NALP1 inflammasome reveals two-step mechanism of caspase-1 activation*. Mol Cell, 2007. **25**(5): p. 713-24.
109. Bruey, J.M., et al., *Bcl-2 and Bcl-XL regulate proinflammatory caspase-1 activation by interaction with NALP1*. Cell, 2007. **129**(1): p. 45-56.
110. Fernandes-Alnemri, T., et al., *The pyroptosome: a supramolecular assembly of ASC dimers mediating inflammatory cell death via caspase-1 activation*. Cell Death Differ, 2007. **14**(9): p. 1590-604.