

Tesis de Posgrado

Mecanismos moleculares de sensibilización y protección de la apoptosis inducida por TNF-alfa

Franco, Diana Lorena

2003

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Franco, Diana Lorena. (2003). Mecanismos moleculares de sensibilización y protección de la apoptosis inducida por TNF-alfa. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3645_Franco.pdf

Cita tipo Chicago:

Franco, Diana Lorena. "Mecanismos moleculares de sensibilización y protección de la apoptosis inducida por TNF-alfa". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2003. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3645_Franco.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Fisiología, Biología Molecular y
Celular

Tesis Doctoral

**Mecanismos moleculares de sensibilización y
protección de la apoptosis inducida por
TNF- α**

Diana Lorena Franco

Directores: Dr. Omar A. Coso y Dra. Mónica
A. Costas

Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad de Buenos Aires

3 6 4 5 2 1

Noviembre del 2003



A mi mamá y a mi papá

Agradecimientos:

A Omar porque creiste en mi y me diste la posibilidad de realizar este proyecto, porque fuiste a las mil y un reuniones en el Conicet para pedir que me cambiaran la beca, porque valoraste siempre mi opinión y me ayudaste a sobrellevar todas mis angustias, mis locuras y caprichos.

A Moni porque siempre me transmitiste esa fuerza, porque siempre me escuchaste y valoraste mi opinión, porque siempre me diste ánimos.

Bueno a ambos en resumen les quiero super agradecer por haberme enseñado lo que se, por haberme soportado que no es poca cosa, y porque siempre me apoyaron, y me dieron libertad para crecer.

A ARK por su apoyo incondicional a nuestro grupo, que no es poca cosa.

A Hoch porque me ayudaste, aunque claro la paciencia tiene un límite y ya lo entendí.

A Caro que aunque su presencia es muy nueva en el laboratorio me ayudaste con un montón de cosas, mil gracias.

A Nacho porque laburar con vos fue y es un placer. La verdad Nacho sos una de las personas más buenas y simples que conozco y me encantó poder compartir con vos mesada y demás menesteres.

A Santiago Werbach porque SIEMPRE me ayudaste, porque me enseñaste todo sobre cada una de las técnicas que sé, porque siempre me cuidaste y me apoyaste, y te preocupaste de mi alimentación. MUCHAS GRACIAS SANTI.

A Romi por tu buena onda. A Geogina y a Fernanda por su ayuda en esta última etapa del trabajo sobretodo cuidandome las células alla en el Lanari.

A Guada porque las charlas con vos eran un remanso en tanta locura.

A Anabella no se bien por qué, creo que porque sos mas una guía “espiritual” de cómo se resuelven ciertas cosas y porque tu ejemplo siempre me dio fuerzas para seguir con todo.

A Vale por sus consejos de madre conocedora y por su gran ayuda.

A Lore, Mariano, María Ana y Lidia por convidarme siempre con un mate, con algo rico y con su buena onda.

A Pagani por los innumerables mates que me convidaste, por toda tu gran ayuda con el confocal y por tu paz.

A Silvana y A Laura por los almuerzos compartidos, los tesitos y demas cosas ricas.

Al LFBM, a los Arks, a los Archis, a los Uchiteles, a los Iusem, a Myriam y a las señoras que nos ayudan con los materiales y con la limpieza del laboratorio.

A Emiliano Merlo por su gran ayuda y las charlas.

Al Conicet por haberme cambiado la beca sin sacármela.

A la Fundación Antorchas por haber confiado en nuestro proyecto brindándonos primero dinero a Mónica y a Omar y luego otorgándome una beca para finalizar el doctorado.

Pero quería agradecer especialmente a:

Luciana porque sin todas nuestras charlas y todaaaaaaaaaaaaa tu inmensa ayuda siempre que lo necesite no hubiera llegado a terminar ni la facultad. Bueno igual creo que sabes lo mucho que te quiero y lo agradecida que estoy y todo lo que te voy a extrañar.

A Horacio que siempre me ayudó con los temas computadoriles y de diseño que nunca supe manejar y que finalmente algo tuve que aprender.

A Tamara porque tambien siempre me ayudaste muchísimo tanto en el laboratorio como fuera de él. Me encantó conocerte y poder llevarme del laboratorio entre otras cosas una gran e íntima amiga con la cual tengo infinidad de cosas muy parecidas. Bueno Tamara te quiero muchooooooooo!!! y te voy a extrañar. Pablo, también te voy a extrañar, gracias por tu dulzura y buena onda.

A mamá, papá, Carolina, Esteban, Solcito y Martín por haberme ayudado siempre, porque me aguantan y me dan aliento día a día, porque me cuidan tanto. Porque sin dudas sin mi papá y mi mamá nunca hubiera llegado hasta aca, que aunque al principio mucho no les gustó la idea siempre me apoyaron y me ayudaron en los caprichos de la nena y que sé que ahora están tan contentos.

A He y Violeta que son los soles de mi vida, que los amo tanto. He no tengo palabras para agradecerte tu cuidado, dedicación, preocupación, tu confianza y apoyo y por sobre todo tu inmenso amor. Y a mi Violetita querida gracias por no romperme la compu y dejarme terminar.

La verdad muchísimas gracias a todos!!!!!!!!!!!!!!

Abreviaturas	2
Resumen en castellano	3
Resumen en inglés	5
Introducción	6
1. Citoquinas	7
1.1 Efectos centrales de las citoquinas	8
1.2 TNF- α	9
1.2.1 Acciones biológicas del TNF- α	10
1.2.2 Receptores de TNF- α	12
2. Apoptosis	14
2.1. Receptores de la muerte	15
2.1.1. Transducción de señales vía CD95 y TNFR1	16
2.2. Caspasas	17
2.2.1. Activación de caspasas	18
2.2.2 ¿Cómo las caspasas destruyen la célula?	19
2.3. La familia de proteínas Bcl-2	19
2.3.1. Mecanismos de acción	21
3. El factor de transcripción NF- κ B	23
3.1. Descripción molecular	23
3.2. Proteínas I κ B	24
3.3. Quinasas I κ B	25
3.4. Activación inducible de NF- κ B	27
3.4.1. NF- κ B regula numerosos genes involucrados en distintas respuestas celulares	29
3.5. Rol de NF- κ B en apoptosis y tumorigénesis	30
4. Glucocorticoides	31
4.1. Características generales de receptores nucleares	31
4.1.2. Tres grandes familias	32
4.1.3. Estructura molecular	33
4.1.4. El receptor de glucocorticoides (GR)	34
4.1.4.1. Mecanismos de acción del GR	34
4.1.4.2. Fosforilación y translocación al núcleo del GR	35
4.1.4.3. Dimerización y unión al ADN del GR	35
4.1.4.4. Transactivación del GR	36
4.1.4.5. Represión de la activación génica	37
4.1.4.6. Acciones biológicas de los glucocorticoides	38
5. Cascada de señales mediadas por proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK)	39
5.1. Familia de Erk1/2	41
5.2. Familia de proteínas JNKs	41
5.2. Familia de proteínas p38	42
5.3. Localización subcelular de MAPKs	42
Objetivos	45
Materiales y Métodos	47
1. Cultivo de células	48
2. Ensayos de citotoxicidad	48
3. Ensayos de apoptosis	48
3.1. Tinción con yoduro de propidio para evaluar el contenido subdiploide de ADN	48

3.2. Tinción con naranja de acridina y bromuro de etidio	49
3.3. Fragmentación internucleosomal del ADN	49
4. Transfección de células en cultivo	50
4.1. Transfección transitoria de células en cultivo por liposomas catiónicos	50
4.2. Transfección de células en cultivo mediante la técnica de fosfato de calcio	50
4.3. Estimulación de las células transfectadas	51
5. Análisis de la expresión de genes reporteros	51
5.1. Cosecha de las células	51
5.2. Ensayos de detección de la actividad luciferasa	52
5.3. Medición de la actividad de β -galactosidasa	52
6. Ensayo de actividad de MAPKs	52
7. Clonado del fragmento que codifica para el extremo amino terminal del GR	54
7.1. Diseño de los primers	54
8 Amplificación del fragmento que codifica para el extremo N-terminal del GR por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	54
9. Purificación de fragmentos a partir de geles de agarosa	55
10. Preparación de los fragmentos para subclonado en el vector pGEX4T3	55
11. Ligaciones	55
12. Transformación de bacterias competentes	55
13. Preparación de plásmido en pequeña escala	56
14. Mapeo de clones positivos	56
15. Purificación de la proteína de fusión GST-GR	56
16. Preparación de plásmidos a gran escala	57
17. Cuantificación del ADN plasmídico	57
18. Ensayos de Western Blot	57
18.1. Obtención de extractos proteicos y citoplasmáticos	57
18.2. Determinación de la concentración de proteínas en extractos celulares	58
18.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y disociantes (SDS-PAGE)	58
18.4. Transferencia a membranas de nitrocelulosa	59
18.5. Ensayo inmunoquímico	59
19. Ensayos de co-inmunoprecipitación	60
20. Análisis inmunohistoquímico	60
21. Ensayos de cambio en la movilidad electroforética (EMSA)	60
21.1 Preparación de los extractos nucleares	60
21.2 Marcación del oligonucleótido doble cadena	61
21.3. Purificación del oligonucleótido marcado	61
21.4. Ensayo de EMSA	62
21.5. Ensayo de <i>super shift</i>	62
Resultados	63
1. El estrés osmótico sensibiliza a la apoptosis inducida por TNF- α en células HeLa	64
2. Expresión de proteínas de la familia Bcl-2 en células HeLa	68
3. Activación de varias MAPKs	70
4. Activación del factor de transcripción NF- κ B	71
5. Rol de p38 en la activación del factor de transcripción NF- κ B	73
6. Rol de NF- κ B en el modelo de apoptosis	75
7. Rol de p38 en el modelo de apoptosis	77
8. Rol de los glucocorticoides	80
9. Fosforilación del receptor de glucocorticoides por MAPKs <i>in vitro</i>	82
10. Activación de JNK y p38 por dosis no citotóxicas de TNF- α	85

11. Activación de p38 y JNK en el modelo de apoptosis inducida por TNF- α en células L-929	86
12. Interacción <i>in vivo</i> del GR con miembros de la familia de MAPKs	88
13. Rol de p38 y JNK en la actividad transcripcional del GR	90
14. La activación del GR por p38 incrementa su localización nuclear	93
15. Análisis de la movilidad electroforética	95
16. Rol de p38 en la protección de los GC a la apoptosis inducida por TNF- α	97
Conclusiones	100
Discusión	103
1. Modelo de sensibilización por estrés osmótico de células resistentes a la apoptosis inducida por TNF- α	104
1.1. Rol del estrés osmótico en la inducción de apoptosis	104
1.2. Rol de NF- κ B en el modelo	105
1.3. Rol de MAPKs en el modelo	106
1.4. Rol de la familia de proteínas Bcl-2 en el modelo	108
2- Modelo de células naturalmente sensibles a la apoptosis inducida por TNF- α : Rol de los GC y MAPKs	109
2.1. Rol de MAPKs en este modelo	110
2.2. Influencia de la interacción entre el GR y MAPKs en el destino celular	112
Bibliografía	116

TNF- α : Factor de necrosis tumoral α .

TNFR: Receptor de TNF- α

IL: Interleuquina

NF- κ B: Factor nuclear- κ B

I κ B: Inhibidor de NF- κ B

IKK: Quinasa de IKK

GR: Receptor de glucocorticoides

GC: Glucocorticoides

MAPKs: Proteínas quinasas activadas por mitógenos

SAPKs: Proteínas quinasas activadas por estrés

JNK: Jun quinasa

Erk1/2: Proteínas quinasas activadas por señales extracelulares

p38: p38 quinasa

RESUMEN

La mayoría de las células son resistentes a la apoptosis inducida por TNF- α y se sensibilizan cuando se inhibe la actividad transcripcional de NF- κ B o bien en presencia de inhibidores de la síntesis proteica capaces de inhibir la expresión de genes anti-apoptóticos. En esta tesis analizamos el rol del estrés osmótico en la apoptosis inducida por TNF- α . Nosotros encontramos que éste es capaz de sensibilizar a células HeLa resistentes a la apoptosis inducida por TNF- α y que esta sensibilización involucra, un aumento de la actividad de varias MAPKs, la inhibición de la expresión de Bcl-2 y el aumento en una etapa tardía de la actividad de NF- κ B. La muerte ocurre a pesar del aumento de la actividad de NF- κ B, cuya inhibición por otro lado causa un aumento mayor de la apoptosis. La proteína quinasa p38 parecería estar involucrada en la activación de NF- κ B ya que su inhibición provoca un aumento significativo del efecto del estrés osmótico en la apoptosis inducida por TNF- α .

Se ha demostrado previamente que dosis bajas de TNF- α tienen un rol sensibilizador a la acción de los glucocorticoides en su protección de la apoptosis inducida por esta citoquina. En este trabajo estudiamos las señales inducidas por TNF- α que podrían estar involucradas en la regulación de la actividad del receptor de glucocorticoides. Analizamos el rol de las MAPKs en la regulación de las actividades biológicas del receptor de glucocorticoides, en un modelo de células sensibles a la apoptosis inducida por TNF- α , donde los glucocorticoides son capaces de proteger a las células de dicha muerte. Nosotros observamos que las cinco MAPKs mejor caracterizadas hasta el momento son capaces de fosforilar al GR *in vitro* y que cuatro miembros de esta familia, JNK, p38, Erk6 y Erk1/2 son capaces de interactuar *in vivo*. Asimismo vimos que p38 induce la activación transcripcional del GR, incrementa su

localización nuclear y su unión a sus secuencias blanco presentes en el ADN. De acuerdo con nuestros resultados, existen mecanismos moleculares que involucran la participación de MAPKs inducidas por TNF- α , por los cuales la citoquina puede regular la actividad del GR y la sensibilidad a su acción protectora de la apoptosis en el modelo de apoptosis inducida por TNF- α .

ABSTRACT

Most cells are naturally resistant to TNF- α -induced cell death and become sensitized when NF- κ B transactivation is blocked or in the presence of protein synthesis inhibitors that prevent the expression of anti-apoptotic genes. We analyzed the role of osmotic stress on TNF- α -induced cell death. We found that it sensitizes the naturally resistant HeLa cells to TNF- α -induced apoptosis with the involvement of an increase in the activity of several kinases, the inhibition of Bcl-2 expression and a late increase on NF- κ B activation. Cell death occurs regardless of the enhanced NF- κ B activity whose inhibition produces an increase in apoptosis. The inhibition of p38 kinase, also involved in NF- κ B activation, significantly increases the effect of osmotic stress on TNF- α -induced cell death.

It was previously shown that a low dose of TNF- α has a priming effect on the glucocorticoid-mediated inhibition to TNF- α -induced apoptosis. We analyzed TNF- α induced signals that could be involved in the regulation of GR activities. We also investigated the role of MAPKs in the regulation of GR biological activities in L-929 cells. These cells are sensitive to TNF- α -induced apoptosis which is prevented by ligand activated GR. We observed that five MAPK family members can phosphorylate GR *in vitro* and four members of this family: JNK, p38, Erk6 and Erk1/2 can physically interact with GR *in vivo*. We also found that p38 increases the transcriptional activity of GR, its nuclear localization and its binding to DNA specific sequences. According to our results, there are molecular mechanism that involves MAPKs induced by TNF- α by which the cytokine may modulate the activity of GR and the sensitivity to their protective role on TNF- α -induced apoptosis.

INTRODUCCION

PREAMBULO

Las células responden a cambios en el medio ambiente mediante respuestas que abarcan desde simples cambios bioquímicos hasta severas transformaciones morfológicas que son consecuencia de cambios bioquímicos varios. Esto incluye respuestas adaptativas en un individuo unicelular o un rearrreglo de la arquitectura de un órgano en un individuo pluricelular en desarrollo, entre otras muchas. Una célula puede permanecer quiescente, dividirse, diferenciarse e incluso morir de acuerdo a lo que ella misma es capaz de sentir está ocurriendo en el medio externo. Este fenómeno de adaptación de las células a las señales que recibe del exterior es fundamental en el desarrollo normal de un organismo. Estudiar los mecanismos que lo regulan es importante no sólo desde el punto de vista básico sino dado que errores en esos mecanismos dan como consecuencia severas patologías. Sea uno u otro el destino que la célula adopte, la "decisión" involucra casi siempre un cambio en el patrón de expresión de sus genes. Estos "saben" que es lo que ocurre en el exterior gracias a los sistemas de transducción de las señales. El modo en que un mismo sistema funciona en distintas células puede tener similitudes, y de hecho los científicos aún extrapolan con frecuencia datos obtenidos en un tipo celular a observaciones hechas en otro distinto. Sin embargo dos conceptos han emergido entre quienes estudian sistemas de transducción de señales involucrados en la alternativa de sobrevivir o muerte programada en la última década, estos son: 1) La importancia del contexto celular, 2) La necesidad de estudiar la integración de las señales transducidas por diferentes caminos dado que éstos funcionan en fino equilibrio y sutiles diferencias en el balance de sus niveles de activación puede acarrear consecuencias notorias para la célula. En el presente trabajo de tesis nos hemos enfocado en dos sistemas celulares, células HeLa y L-929 en los cuales el agregado de la citoquina TNF- α induce efectos diferentes. Nos hemos centrado en estudiar los caminos de transducción de señales que involucran a las proteínas quinasas activadas por mitógenos, a los receptores de glucocorticoides y a los factores de transcripción de la familia NF- κ B. A modo de introducción brindaremos una descripción del estado del conocimiento actual de dichos temas.

1-Citoquinas

Las citoquinas son proteínas producidas principalmente por el sistema inmune con importantes funciones regulatorias, que ejercen su acción en forma autócrina, endócrina o parácrina al interactuar con receptores específicos presentes en diferentes tipos celulares. Esta interacción conduce a la activación, proliferación, diferenciación o muerte de su célula blanco.

Originalmente fueron consideradas como factores moduladores dentro del sistema inmune, producidos por tipos celulares específicos, principalmente macrófagos y células T, en respuesta a una infección y con un blanco de acción restringido. Actualmente, existen numerosas evidencias de que estas proteínas pueden actuar sobre otros tejidos no inmunes como el sistema nervioso central o el sistema endócrino modulando la síntesis de neurotransmisores, neuropéptidos y hormonas, así como la síntesis y expresión de otras citoquinas y sus receptores.

Dentro del sistema inmune, las citoquinas producidas por linfocitos y macrófagos en respuesta a una infección tienen un rol en la activación y diferenciación linfocitaria. Existen sin embargo numerosas patologías y síndromes de inflamación asociados a la producción crónica o de altos niveles de citoquinas, en particular las citoquinas inflamatorias como interleuquina-1 (IL-1), IL-6 o el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) con graves consecuencias para la salud del individuo, y que inclusive pueden llevar a la muerte.

Dado que el sistema inmune no se encuentra totalmente autorregulado, el equilibrio homeostático de la producción y funcionalidad de las citoquinas es mantenido a través de la interacción entre los sistemas nervioso, endócrino e inmune constituyendo el sistema neuroinmunoendócrino.

1.1. Efectos centrales de las citoquinas

Las citoquinas, además de ser mediadores de la inflamación, juegan un rol fisiológico como factores tróficos o neuromoduladores, ocasionando cambios a nivel endócrino y en el comportamiento del individuo. Se encuentran bien caracterizados los efectos centrales que ocasionan las citoquinas (de origen central o periférico) y en particular la IL-1 y el TNF- α durante una infección, como hipertermia, aumento de la fase lenta del sueño, astenia, adinamia, anorexia y los efectos periféricos como

artralgias, liberación de reactantes de fase aguda por parte del hígado e inhibición de la secreción ácida y del vaciamiento gástrico (Kent et al., 1992)

En cuanto a sus acciones sobre el sistema neuroendócrino, las citoquinas actuarían como mensajeros del estado de homeostasis del organismo: en respuesta a una infección, el sistema inmune estaría capacitado para captar estímulos que no serían reconocidos por el SNC y periférico y sólo serían captados por las células inmunes (ej. bacterias, virus, tumores, antígenos y la integridad de todas las membranas celulares). Este reconocimiento sería transformado por las células inmunes en información: citoquinas, las cuales tienen acción sobre el sistema neuroendócrino. En respuesta, el SNC y periférico libera hormonas, neurotransmisores y neuropéptidos, que son reconocidas por las células del sistema inmune provocando cambios inmunológicos específicos (Blalock, 1984).

Dado que el presente trabajo se centra en las interacciones regulatorias entre el TNF- α , proteínas quinasas reguladas por mitógenos (MAPK) y los glucocorticoides (GC), se describirán las propiedades y acciones más importantes de esta citoquina.

1.2. TNF- α

El TNF- α , originalmente descrito por su actividad antitumoral, es una citoquina producida principalmente por los macrófagos y monocitos. El gen de TNF- α está localizado en el brazo corto del cromosoma 6, ligado al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). La proteína madura secretada tiene una masa molecular de 17 kDa y ejerce su acción biológica a través de la formación de trímeros por unión a receptores específicos, probablemente por *cross-linking* de tres receptores de superficie.

Otra molécula relacionada al TNF- α es la linfotoxina o TNF- β cuya producción está restringida a las células B y T. Aunque estructuralmente presenta cierta homología con el TNF- α su rol biológico no está aún bien definido, pues, existen evidencias de que ambas tienen actividades similares *in vitro*, pero las acciones mediadas por la linfotoxina son menos potentes, o bien antagónicas con TNF- α (Armitage et al., 1994). Todos los efectos de TNF que se describen a continuación en este trabajo corresponden a TNF- α .

1.2. 1. Acciones biológicas del TNF- α

El estudio de esta citoquina ha sido considerado de gran importancia en los últimos años desde puntos de vista básicos y aplicados por sus múltiples efectos biológicos tales como: (a) Actividad proinflamatoria, siendo el principal mediador del *shock* séptico. (b) Actividad inmunológica. (c) Actividad antitumoral. Su actividad antitumoral se relaciona con su acción citotóxica y se ha demostrado que esta citoquina puede inducir apoptosis. El rol de esta citoquina en el proceso de apoptosis se discutirá en el capítulo de Apoptosis.

a) *Actividad proinflamatoria-rol en shock séptico.*

El *shock* séptico constituye una respuesta sistémica a una infección la cual provoca una elevada tasa de mortalidad (Morrison et al., 1987). Aproximadamente el 70 % de los *shocks* sépticos en humanos son causados por endotoxinas de bacterias Gram-negativas y el otro 30 % por exotoxinas liberadas por bacterias Gram-positivas. Los principales mediadores de las patologías del *shock* séptico son el TNF- α e IL-1, las cuales son liberadas masivamente por los monocitos, macrófagos y otros leucocitos en respuesta a las toxinas bacterianas (Tracey, et al 1986).

El TNF- α es considerado el principal mediador de los síntomas observados en el *shock* séptico, incluyendo hipotensión, fiebre, trombosis intravascular, edema pulmonar, necrosis de diversos tejidos y hemorragia, que finalmente llevan a la muerte. Estos efectos pueden inducirse experimentalmente, por la administración de lipopolisacárido bacteriano (LPS), que es un constituyente de la pared bacteriana, responsable de la activación de los monocitos para la producción de las citoquinas inflamatorias.

Existen numerosas evidencias que sustentan esta idea: TNF- α es la primera citoquina que aparece en la circulación en la sepsis experimental, en endotoxemia en humanos y en animales de laboratorio. La aparición sistémica de TNF- α es detectada a los 45 minutos y alcanza un pico a los 90 minutos post inyección de LPS, coincidiendo con el desarrollo de los síntomas clínicos de sepsis. Otras citoquinas involucradas en la patogénesis de la sepsis son IL-1 e IL-6 también producidas por macrófagos, más tardíamente que el TNF- α . La administración de altas dosis de TNF- α recombinante a animales produce un síndrome con todas las características de la sepsis (Tracey, et al, 1986). La administración de dosis subletales de TNF- α mimetiza los cambios

hemodinámicos vistos en sepsis (Schirmer et al., 1989). Además, el efecto letal debido a la administración intravenosa de endotoxina en ratones es bloqueado por el pretratamiento con anticuerpo policlonal anti-TNF- α (Tracey, et al, 1987). Se demostró también que la neutralización de TNF- α tiene un efecto de atenuación en la síntesis de IL-1 e IL-6, sugiriendo que TNF- α es un intermediario en la producción de estas otras citoquinas mediadoras de sepsis (Van Der Poll y Sauerwein, 1993). Algunos estudios han demostrado la eficacia de los tratamientos con anticuerpos anti-TNF- α en ciertos modelos de sepsis (Mathison et al., 1988; Van Der Poll y Sauerwein, 1993). Sin embargo, TNF- α parece no ser crítico para todas las formas de sepsis, dado que los anticuerpos anti-TNF- α no confieren protección en la peritonitis séptica experimental (Bagby et al., 1991). Es probable que IL-1 interactúe con TNF- α para inducir el clásico síndrome séptico, ya que ambos sinergizan en la producción de toxicidad sistémica (Okusawa et al., 1988), y el tratamiento con el antagonista del receptor de IL-1 resulta en una protección contra la endotoxemia letal y la sepsis sin afectar la concentración de TNF- α en suero (Ohlsson et al., 1990).

Estas evidencias, sustentan la idea de que la sintomatología que acompaña al *shock* séptico, que no es revertida por el uso de antibióticos, es consecuencia directa de la sobreproducción de citoquinas inflamatorias más que de la infección bacteriana. De acuerdo con esto, resulta evidente y necesaria la existencia de mecanismos estrictos de control de la producción y modulación de la acción biológica de la citoquinas, a través de diversos mecanismos del propio sistema inmune y también neuroinmunoendócrinos.

b) Actividad inmunológica

En respuesta a una infección, la presentación del antígeno así como la activación linfocitaria se realiza en el contexto del MHC. El TNF- α induce la expresión de estas moléculas: MHC clase I, al actuar sobre las células endoteliales y fibroblastos de la dermis (Collins et al., 1986) y MHC clase II en macrófagos y células β del páncreas (Chang y Lee, 1986). En las células endoteliales, el TNF- α induce la expresión de ICAM-1 y de otras moléculas de adhesión como VCAM-1 y ELAM-1, incrementando de este modo, la unión de células T y de células presentadoras de antígeno (Mackay y Imhof, 1993; Wride y Sanders, 1995).

Esta citoquina también manifiesta una acción directa sobre las células del sistema inmune provocando diversos efectos:

Células T: Existen evidencias de que el TNF- α es comitogénico sobre los timocitos de ratón, y además se ha observado su expresión en el timo de estos animales (Ranges et al., 1988). En las células T activadas, esta citoquina induce la expresión de receptores para IL-2 y la producción de interferón γ (IFN- γ), aumentando de este modo la respuesta de las células T a IL-2 (Yokota et al., 1988).

Células B: De acuerdo con estudios realizados *in vitro*, se ha demostrado que el TNF- α es un factor de crecimiento para las células B humanas (Jirillo et al., 1995) y además de su función mitogénica, estimula la secreción de inmunoglobulina M (IgM) en presencia de IL-2 y de *Staphylococcus aureus strain 1* (SAC) (Jirillo et al., 1995).

Macrófagos: El TNF- α actúa directamente sobre estas células induciendo la síntesis de IL-1, e indirectamente al estimular la unión de macrófagos a las células endoteliales favorece la presentación de antígeno, así como la activación de las células T y B. Por otro lado, esta citoquina también ejerce una función antiparasitaria: macrófagos activados por TNF- α resultan efectivos en la eliminación de diversos parásitos como *Plasmodium chabaudi*, *Leishmania major*, *Trypanosoma cruzi* y *Schistosoma mansoni*, vía la síntesis de óxido nítrico (NO) (Liew et al., 1990; Wirth y Kierszenbaum, 1988). Según estudios recientes, se ha detectado la expresión de esta citoquina en la membrana de sus células productoras: monocitos y macrófagos, conjuntamente con otras citoquinas como IL-1, IL-6 e IL-8. En este contexto, el contacto célula-célula a través de receptores específicos en las células polimorfos nucleares (PMN), podría favorecer su actividad fagocítica (Jirillo et al., 1995).

1.2.2. Receptores de TNF- α

El TNF- α tiene dos receptores diferentes, ambos de amplia distribución en todos los tejidos, localizados en la superficie celular: TNFR1 (p55), el cual se expresa constitutivamente en bajos niveles y TNFR2 (p75) el cual se induce fuertemente durante el curso de una respuesta inflamatoria (Hohmann et al., 1990; Rothe et al., 1993). Ambos tipos de receptores se encuentran también en forma soluble y son capaces de unir TNF- α compitiendo con los receptores de superficie. Este podría ser uno de los mecanismos de regulación de la actividad biológica de esta citoquina.

El subtipo de receptor p55 presenta alta homología con: *nerve growth factor receptor* (NGFR), CD40, CD27, CD30, antígeno Fas, todos ellos miembros de la superfamilia de receptores, que al interactuar con sus ligando inducen apoptosis (Armitage et al., 1994; Smith et al., 1993).

La similitud estructural de ambos receptores del TNF- α está limitada a los dominios extracelulares (Tartaglia y Goeddel, 1992). Los dominios intracelulares de los subtipos p55 y p75 son muy diferentes, lo cual indica que utilizan distintas vías de transducción de señales. La exposición de células a TNF- α resulta en la activación de dos factores de transcripción: AP-1 (Brenner et al., 1989) y NF- κ B (Osborn et al., 1989). Estos factores de transcripción median la inducción de citoquinas, genes inmunorregulatorios, genes proinflamatorios así como también de metaloproteasas. En la mayoría de los tipos celulares la activación del factor de transcripción NF- κ B ocurre primordialmente a través del TNFR1 (Schutze et al., 1992).

Ambos receptores carecen de dominios enzimáticos, y su capacidad de transducir señales es dependiente de la interacción con proteínas que se asocian en sus dominios citoplasmáticos (Vandnabeele et al., 1995).

La unión del TNF- α con TNFR1 induce la trimerización del mismo y la asociación de proteínas adaptadoras llamadas *death domains* (DD) a los dominios citoplasmáticos del receptor (Figura 1). Posteriormente se produce la interacción de estas proteínas con TRADD (*TNF-receptor 1-associated death domain protein*), que funciona como un adaptador para el reclutamiento de otras proteínas como es el caso de la serina treonina quinasa RIP (*receptor-interacting protein*) y TRAF2 (*TNFR-associated protein*) (Hsu et al., 1995; Rothe et al., 1994). Este complejo proteico luego activa a la quinasa (IKK) que fosforila al factor inhibitorio κ B, lo que induce su degradación por el proteosoma y la subsecuente activación del factor de transcripción NF- κ B y de la cascada de JNK/AP-1, como se describirá más adelante. Por otro lado, la trimerización del receptor de TNF dada por la unión de su ligando, puede resultar en el reclutamiento de TRADD, que es capaz de interactuar con la proteína FADD (*Fas-associated protein with death domain*), quien activa la maquinaria apoptótica (Hsu et al., 1996).

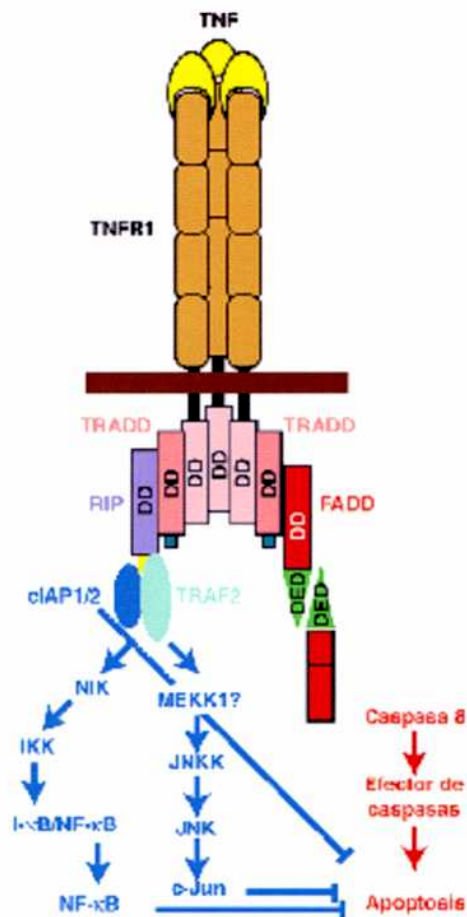


Figura 1. Señales pro- y anti-apoptóticas mediadas por el receptor de necrosis tumoral α (TNF- α). Ashkenazi et al., 1998.

2- Apoptosis

La apoptosis o muerte celular programada es un tipo de muerte celular muy coordinada que comienza con la formación de burbujas en la membrana, el vaciamiento celular, la fragmentación de proteínas, condensación de la cromatina y degradación del ADN, seguido por la encapsulación de estos fragmentos en cuerpos apoptóticos los cuales son rápidamente fagocitados por las células vecinas. Bioquímicamente las células apoptóticas se caracterizan por la reducción de su potencial transmembrana, la acidificación intracelular, la producción de radicales libres, la externalización de los

residuos de fosfatidilserina en la membranas, y la degradación del ADN en fragmentos internucleosomales.

La apoptosis desempeña un papel central tanto en el desarrollo como en la homeostasis de cualquier organismo multicelular (Steller et al., 1995; Jacobson et al., 1997). Las células mueren por apoptosis durante la morfogenesis o sinaptogenesis en embriones en desarrollo y en el animal adulto durante el *turnover* de tejidos, o al final de una respuesta inmune. Dado que el rol fisiológico de la apoptosis es crucial, un mal funcionamiento de este proceso puede ser mortal. Tal es el caso en las enfermedades de Alzheimer y Parkinson donde se produce la apoptosis descontrolada de ciertas neuronas cerebrales. Por otro lado la imposibilidad de las células que se están dividiendo de iniciar la apoptosis luego de un daño severo en el ADN contribuye a inducir cáncer (Thompson et al., 1997).

2.1. Receptores de la muerte

Las señales de sobrevida provenientes del medio celular así como los sensores internos para la integridad celular mantienen normalmente la maquinaria apoptótica de la célula en estado permanente de “chequeo”. Cuando una célula pierde contacto con las células que la rodean o tiene un daño irreparable interno, la célula inicia el proceso de apoptosis. Los mamíferos han evolucionado otro tipo de mecanismo que les permite al organismo dirigir a una sola célula a su propia destrucción. Este tipo de apoptosis “instructiva” es muy importante especialmente en el sistema inmune. Los receptores de la muerte, localizados en la superficie celular son los encargados de transmitir las señales apoptóticas iniciadas por la unión con sus ligandos específicos. Estos detectan la presencia de señales extracelulares de muerte y en respuesta, activan rápidamente la maquinaria apoptótica ocasionando la muerte específica de la célula dentro de horas.

Estos receptores pertenecen a la superfamilia de receptores de TNF, por lo tanto poseen dominios extracelulares ricos en cisteínas (Smith et al, 1994). Así mismo poseen secuencias citoplasmáticas idénticas llamadas dominios de muerte (DD).

Los receptores de la muerte mejor caracterizados son CD95 (también llamado Fas o Apo 1) y TNFR1 (también llamado p55) (Smith et al., 1994). Otros receptores de la muerte son CAR1 (Brojatsch et al., 1996); *death receptor 3* (DR3 también llamado Apo3, WSL-1, TRAMP, o LARD) (Chinnaiyan et al, 1996; Marsters et al,1996; Kitson et al,1996; Bodmer et al,1997; Screaton et al,1997); DR4 (Pan et al.,1997); y DR5

(también llamado Apo2, TRAIL-R2, TRICK 2, o KILLER) (Walczak et al., 1997; Screaton et al., 1997;; Schneider et al., 1997). El receptor del factor de crecimiento nervioso (NGFR) también contiene un dominio de muerte (Liepinsh et al., 1997). Los ligandos que activan a estos receptores con excepción de NGFR, son moléculas estructuralmente relacionadas que pertenecen a la superfamilia de TNF (Smith et al, 1994). El ligando CD95 (CD95L) se une al CD95; TNF y la linfotoxina α se unen al TNFR1; el ligando Apo3 se une al DR3; el ligando Apo2 se une a DR4 y DR5.

2.1.1. Transducción de señales vía CD95 y TNFR1

Receptor CD95

El receptor CD95 y su ligando desempeñan un papel muy importante en tres tipos de apoptosis fisiológicas: a) participan de la delección periférica de linfocitos T activados al final de la respuesta inmune; b) intervienen en la eliminación de células infectadas por virus o en la eliminación de células cancerosas por células T citotóxicas o por células *natural killer* (NK); y c) participan de la eliminación de células inflamatorias en sitios inmunoprivilegiados como el ojo. Estas evidencias sobre el rol biológico de CD95 provienen de ciertas cepas de ratón y de pacientes humanos que poseen genes defectivos de CD95 o CD95L.

La unión del ligando al receptor CD95 induce la trimerización del mismo y el reclutamiento de dominios de muerte al receptor (Huang et al, 1996). Luego una proteína adaptadora llamada FADD (*Fas-associated death domain*) se une a través de su propio DD a los DD que se encuentran unidos al receptor. FADD contiene un dominio efector de muerte que es capaz de unirse a un dominio análogo presente en la forma inactiva de la caspasa-8 (Boldin et al 1996), lo que provoca la activación a través de su propio clivaje (Muzio et al, 1998). Caspasa-8 luego activa a una caspasa efectora, como por ejemplo caspasa-3 provocando entonces la apoptosis de la célula.

Receptor TNFR1

El TNF- α es capaz de inducir apoptosis vía la activación de proteasas intracelulares llamadas caspasas, las cuales se describen más adelante, a través de la unión a su receptor TNFR1 (Voelkel-Johnsos et al., 1995). En particular se vio que

FADD se une al complejo TNFR1-TRADD e induce la activación de caspasa-8 desencadenando apoptosis (Figura 1).

Se sabe que el TNF- α es una proteína que ejerce efectos citotóxicos y citostáticos contra líneas celulares tumorales, de ahí el nombre de esta citoquina. La acción selectiva de esta monoquina contra líneas tumorales no es debido a diferencias en el número de receptores con alta afinidad por TNF- α , ya que muchas células normales muestran las respuestas características a TNF- α sin estar inhibido su crecimiento. La citotoxicidad selectiva del TNF- α contra líneas tumorales y los otros efectos de esta molécula estarían mediados por la activación de vías bioquímicas independientes, en las cuales el factor de transcripción NF- κ B juega un rol crucial (Reid et al., 1995). La citotoxicidad inducida por TNF- α está mediada, en parte, por estrés oxidativo. Las mitocondrias son la principal fuente de especies de oxígeno reactivo (ROS) en células no fagocíticas, y estas organelas son los primeros blancos de esta citoquina (Polla et al., 1996). Un ejemplo de ello es el primer evento que ocurre luego de la unión del TNF- α a su receptor en células sensibles a TNF- α : la generación mitocondrial del anión superóxido (O_2^-) (Hennet et al., 1993).

2.2. Caspasas

El principal componente de la maquinaria apoptótica está constituido por una familia de proteasas llamadas caspasas, las cuales son los efectores universales de la muerte apoptótica.

Las caspasas son cistein proteasas que poseen secuencias aminoacídicas, estructuras y especificidad de sustrato similares (Nicholson y Thornberry, 1997)

Las caspasas son sintetizadas como proenzimas (de 30-50 kDa) que no tienen actividad catalítica y que contienen 3 dominios: un dominio N-terminal, una subunidad grande (~20 kDa) y una subunidad pequeña (~10 kDa). La activación provoca un procesamiento proteolítico entre los dominios, seguido de la asociación de las subunidades grande y pequeña y la formación de un heterodímero. Este procesamiento proteolítico, puede estar mediado por otra proteasa o puede ser autocatalítico.

Las caspasas son proteasas muy específicas que clivan después de un aminoácido aspártico. El reconocimiento de por lo menos cuatro aminoácidos hacia el extremo amino terminal del sitio de clivaje es un requerimiento necesario para el clivaje

eficiente. El motivo del tetrapéptido reconocido varía entre las distintas caspasas y ayuda a explicar la diversidad de sus funciones biológicas. Se vio también que no todas las proteínas que contienen una secuencia tetrapéptida óptima son clivadas lo que estaría hablando de que la estructura terciaria podría influir en el reconocimiento del sustrato.

Todos estos requerimientos muestran que las caspasas son altamente eficientes en el reconocimiento de sus sustratos cosa que se pone de manifiesto con la observación de que la apoptosis no está acompañada por la degradación indiscriminada de proteínas, todo lo contrario un grupo selecto de proteínas es clivada en una forma muy coordinada, normalmente en un solo sitio provocando la pérdida o el cambio en su función.

2.2.1. Activación de caspasas

Las caspasas pueden dividirse en:

- a) caspasas iniciadoras las cuales en respuesta a señales pro-apoptóticas disparan el desensamblado celular, en general a través de la activación de caspasas efectoras.
- b) caspasas efectoras las cuales participan directamente en el desensamblado celular.

Activación de caspasas iniciadoras: Hay evidencias que muestran que la activación de caspasas iniciadoras involucra la unión de las mismas con cofactores específicos, un mecanismo comunmente observado con las proteasas. Esta unión es desencadenada por señales proapoptóticas. La activación de la procaspasa-8 requiere la asociación con su cofactor FADD a través de los DED (*death effector domain*), mientras que la activación de la procaspasa-9 involucra la formación de un complejo con su cofactor Apaf-1 (*apoptotic protease-activating factor-1*) a través de CARD (*caspase recruitment domain*). La activación de caspasa-9 también requiere del citocromo-c y de deoxyadenosina trifosfato (dATP), indicando que la activación de caspasas puede requerir de múltiples cofactores.

Activación de caspasas efectoras: Tanto evidencias genéticas como bioquímicas avalan un modelo de cascada para la activación de las caspasas efectoras: una señal proapoptótica provoca la activación de una caspasa iniciadora, la cual a su vez activa a una caspasa efectora provocando la muerte celular. Distintos tipos de caspasas

iniciadoras median diferentes conjuntos de señales, por ejemplo caspasa-8 está asociada a la apoptosis desencadenada por receptores de muerte (Ashkenazi et al, 1998); mientras que la caspasa-9 está involucrada en la muerte inducida por agentes citotóxicos (Hakem et al, 1998). Este modelo permite explicar como distintas señales provocan los mismos cambios morfológicos y bioquímicos.

2.2.2. ¿Cómo las caspasas destruyen a la célula?

Como mencionamos anteriormente las caspasas destruyen a la célula a través del clivaje discreto de un grupo de proteínas usando una variedad de estrategias distintas. Ellas pueden: a) inactivar inhibidores de proteínas que promueven cambios apoptóticos por ejemplo CAD/I^{CAD}. En células no apoptóticas CAD (*caspase activated deoxyribonuclease*) se encuentra inactiva en un complejo con I^{CAD}. Durante la apoptosis, I^{CAD} se inactiva por caspasas dejando a CAD libre permitiéndole funcionar como nucleasa del ADN; b) destruir estructuras celulares como por ejemplo la laminina nuclear, o a través del clivaje de proteínas que están involucradas en la regulación del citoesqueleto (gelsolina, FAK (*focal adhesion kinase*) y PAK2 (*p-21-activated kinase 2*)); y c) desregulando proteínas mediante la separación de los dominios regulatorios y catalíticos provocando la pérdida o ganancia de función. Por ejemplo mediante la inactivación de proteínas que están involucradas en la reparación del ADN (como DNA-PK α), en el procesamiento del ARN mensajero (como U1-70K) y en la replicación del ADN (como el factor de replicación C).

En resumen las caspasas rompen los contactos célula-célula, reorganizan el citoesqueleto, inhiben la replicación del ADN y su reparación, interrumpen el procesamiento del ARN, destruyen el ADN, rompen las estructuras nucleares, inducen a la célula a mostrar señales que las marcan para ser fagocitadas, y desintegran a la célula en cuerpos apoptóticos.

2.3. La familia de proteínas Bcl-2

El proto-oncogen BCL-2 se descubrió inicialmente en linfomas humanos de células B. La familia de proteínas de Bcl-2 incluye moléculas pro y anti-apoptóticas, de hecho la relación entre ambos subtipos ayuda a determinar en parte la susceptibilidad de las células a las señales de muerte (Oltvai et al., 1993).

Por lo menos 15 miembros de la familia de Bcl-2 se han identificado en células de mamíferos y muchas otras en virus (Corey et al., 1995). Todos los miembros de esta familia poseen al menos uno de los cuatro motivos conservados, conocidos como dominios de homología a Bcl-2 (BH1-BH4) (Figura 2). La mayoría de los miembros anti-apoptóticos contienen al menos BH1 y BH2, y aquellos más parecidos a Bcl-2 poseen los cuatro dominios BH. Las dos subfamilias pro-apoptóticas difieren bastante con respecto a Bcl-2. Mientras que Bax, Bak y Bok, contienen BH1, BH2, y BH3 y se parecen bastante a Bcl-2, los otros siete miembros pro-apoptóticos poseen sólo una parte central del dominio BH3 (Figura 2).

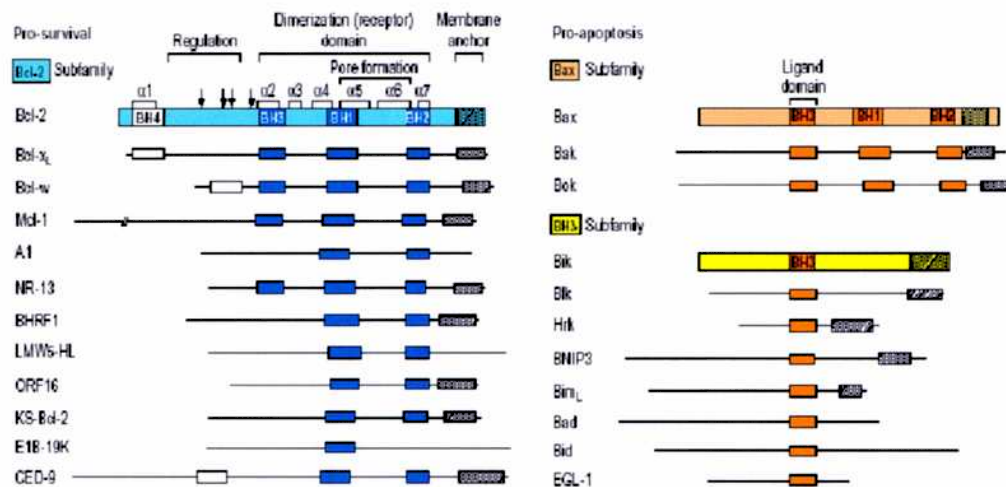


Figura 2 Familia de proteínas Bcl-2. Se muestran tres subfamilias: Bcl-2, Bax y BH3. Adams et al., 1998.

Una característica importante de los miembros de esta familia es su capacidad de formar homo-y heterodímeros, lo que sugiere una competencia neutralizante entre ambos subtipos. Hay evidencias que sugieren que la heterodimerización no es requerida para las funciones anti-apoptóticas de esta familia (Cheng et al., 1996-), mientras que es esencial para las actividades pro-apoptóticas (Chittenden et al., 1995) a través de las interacciones entre los dominios BH3.

Otra característica de algunos de los miembros de esta familia como Bcl-x_L, Bcl-2 y Bax corresponde a su habilidad de formar canales en bicapas lipídicas en experimentos realizados *in vitro*. Asimismo se vio que los canales creados por Bax y Bcl-2 tienen distintas características incluida la selectividad de algunos iones

Los miembros pro- y anti-apoptóticos de esta familia se localizan en compartimentos subcelulares distintos en ausencia de una señal de muerte. Los miembros anti-apoptóticos son inicialmente proteínas integrales de membrana que se encuentran en mitocondria, retículo endoplasmático o membrana nuclear, mientras que algunos de los miembros pro-apoptóticos se encuentran en el citoplasma o en el citoesqueleto. Luego de una señal de muerte, los miembros pro-apoptóticos que han sido analizados hasta el momento sufren un cambio conformacional que les permite llegar e integrarse en las membranas, especialmente en la membrana externa de la mitocondria.

2.3.1. Mecanismos de acción

Existen varios mecanismos posibles de acción para los distintos miembros de esta familia:

1) La relación de los miembros pro- y anti-apoptóticos es muy importante en determinar la susceptibilidad de una célula a sufrir apoptosis. La importancia de este mecanismo de inactivación, dado por la interacción entre sus dominios BH3, se ve reflejada por ejemplo en que la relación de Bcl-2 a Bax varía durante el desarrollo de distintos linajes celulares.

2) Hay evidencias que muestran que los miembros anti-apoptóticos de esta familia están involucrados en la mantención de la integridad de las organelas. Por ejemplo Bcl-2 directa o indirectamente previene la liberación de citocromo c de la mitocondria el cual, junto a ATP, pueden facilitar el cambio estructural de Apaf-1 (*apoptotic protease-activating factor-1*) lo que a su vez permite el reclutamiento de pro-caspasa-9 y su activación (Zou et al.,1997; Kroemer, 1997; Green et al.,1998) (Figura 3).

3) Asimismo existen evidencias bioquímicas que sugieren que los miembros anti-apoptóticos podrían funcionar inhibiendo directamente la habilidad de ciertas moléculas de activar caspasas. Por ejemplo Bcl-x_L puede inhibir la asociación de Apaf-1 con la pro-caspasa-9 y de esta manera impedir la activación de esta caspasa (Figura 3). Por otro lado una señal de muerte puede provocar la interacción de un miembro de la familia BH3 o de un miembro de la familia Bax con Bcl-x_L, impidiendo entonces la neutralización de Apaf-1.

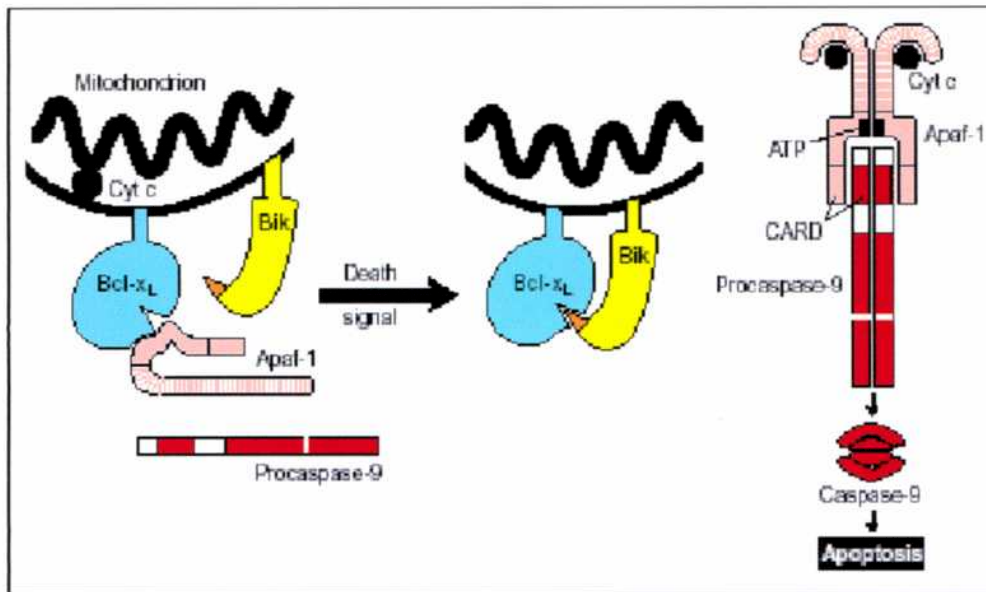


Figura 3. Modelo de regulación de Apaf-1 por miembros de la familia de Bcl-2. Bcl-x_L u otro miembro anti-apoptótico se puede unir a Apaf-1 y prevenir entonces la activación de pro-caspasa-9. Una señal de muerte puede por ejemplo provocar la interacción de un miembro de la familia BH3 (en este caso Bik) o de un miembro de la familia de Bax con Bcl-x_L, impedir la neutralización de Apaf-1. Adam et al., 1998.

4) Si bien la mayoría de las proteínas pro-apoptóticas antagonizan directamente con las proteínas anti-apoptóticas, el grupo de proteínas Bax puede provocar la muerte independientemente de la activación de caspasas a través del daño de organelas, siendo la mitocondria un blanco posible. Esto probablemente esté mediado por su capacidad formadora de poros, los cuales podrían alterar la permeabilidad mitocondrial.

La familia de proteínas Bcl-2 es regulada por citoquinas, por señales de muerte y por señales de sobrevida a distintos niveles. Varios genes anti-apoptóticos son inducidos transcripcionalmente por ciertas citoquinas (Adams y Cory, 1998). Sin embargo se ha observado que las señales de sobrevida inducidas por citoquinas involucran una regulación post-traducciona. La fosforilación de los miembros anti-apoptóticos, puede aumentar o inhibir su actividad. La activación sostenida de quinasas, algunas de las cuales se describen más adelante, luego de la activación de caspasas se ha relacionado con apoptosis (Ip et al. 1998), y la fosforilación de los miembros de la familia de Bcl-2 parecerían ser sus blancos. Sin embargo, la mayoría de los eventos de fosforilación parecen ser inactivantes y entonces promovedores de la muerte celular.

3. El factor de transcripción NF- κ B

3.1. Descripción molecular

El factor nuclear kappa B (NF- κ B) es un factor de transcripción expresado en un amplio número de tejidos, y de particular importancia para las células del sistema inmune. Originalmente fue identificado como una proteína de unión al *enhancer* del gen que codifica para la cadena liviana kappa en células B (Sen y Baltimore, 1986), sin embargo actualmente es sabido que el factor de transcripción NF- κ B regula positivamente la expresión de numerosos genes involucrados en respuestas inmunes e inflamatorias en mamíferos, como ser citoquinas, moléculas de adhesión celular, factores del complemento e inmunoreceptores (Baeuerle y Henkel, 1995), por lo tanto, esta molécula juega un rol crítico en la primera línea de defensa contra las amenazas de la salud del organismo. Asimismo NF- κ B juega un rol central en la regulación de apoptosis y proliferación celular ya que activa la expresión de genes como c-IAP-1, Bcl-X_L, Fas ligando, c-myc y ciclina D1 (Karin et al., 2002).

NF- κ B se encuentra en el citoplasma de la mayoría de los tipos celulares como homodímeros o heterodímeros de una familia de proteínas estructuralmente relacionadas y evolutivamente conservadas (Baldwin et al., 1996). Cada miembro de esta familia contiene una región amino-terminal conservada llamada dominio de homología a Rel (RHD) dentro de la cual se encuentra el dominio de unión al ADN, el dominio de dimerización, la señal de localización nuclear y el sitio de unión a las proteínas inhibitorias I κ B. Hasta el presente se han identificado cinco proteínas pertenecientes a la familia NF- κ B en mamíferos: c-Rel (Rel), Rel A (p65), Rel B, NF- κ B1 (p50 y su precursor p105) y NF- κ B2 (p52 y su precursor p100). Los tres primeros son producidas como proteínas transcripcionalmente activas, mientras que los dos últimos son sintetizadas como moléculas precursoras largas de 105 kDa y 100 kDa respectivamente, las cuales son procesadas a formas más pequeñas y transcripcionalmente activas. Los mecanismos por los cuales los precursores p105 y p100 son procesados no están completamente entendidos pero hay evidencias que sugieren que involucran mecanismos post-traduccionales y co-traduccionales (Karin y Ben-Neriah, 2000). Lo que si parece estar claro es que el procesamiento de p105 es constitutivo, mientras que el de p100 es regulado (Xiao et al. 2001).

Si bien la mayoría de los dímeros son activadores de la transcripción, los homodímeros p50/p50 y p52/p52 pueden reprimir la transcripción de sus genes blancos. El dímero p50/p65 se encuentra ampliamente distribuido en numerosos tipos celulares, mientras que los otros miembros presentan una distribución restringida, por ejemplo Rel B se expresa en regiones específicas del timo, ganglios linfáticos y placas de Peyer y c-Rel se expresa sólo en células hematopoyéticas y linfocitos (Li et al. 2002).

La gran cantidad de combinaciones de diferentes heterodímeros, sugiere la posibilidad de que se pueda generar un amplio número de complejos proteicos capaces de regular la expresión génica, mediada por NF- κ B, partiendo solo de un pequeño grupo de genes. Este fenómeno se conoce como “control combinatorio”.

3.2. Proteínas I κ B

Las proteínas I κ B constituyen una familia caracterizada por poseer repeticiones de 33 aminoácidos llamados *ankirin repeats* responsables de mediar las interacciones proteína-proteína. Esta familia está formada por siete miembros: I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ , I κ B γ , Bcl-3 y las proteínas Rel precursoras p100 y p105 (Ghosh et al., 1998). Resulta interesante destacar que p100 puede funcionar tanto como proteína I κ B, como proteína Rel formando parte específicamente del heterodímero con Rel B, ya que su procesamiento permite la liberación del heterodímero p50:Rel B (Solan et al., 2002).

La proteína inhibitoria mejor caracterizada es I κ B α , ya que fue la primera en ser clonada (Davis et al., 1991; Haskill et al., 1991). I κ B α es una proteína de unos 37 kDa que tiene una organización tripartita, también vista en I κ B β : un dominio N terminal que es fosforilado en respuesta a señales, un dominio central de interacción proteína/proteína y un dominio C terminal involucrado en la recaptación de esta molécula (Verma et al., 1995).

De acuerdo al punto de vista tradicional las proteínas I κ B son capaces de retener a NF- κ B en el citoplasma debido a que las secuencias de localización nuclear quedan enmascaradas al formarse el complejo NF- κ B/I κ B. Por eso la degradación de I κ B permite la exposición de estas secuencias de localización nuclear y el pasaje al núcleo de NF- κ B. Sin embargo una cantidad de estudios recientes demuestran que el complejo I κ B α / NF- κ B permanece en un continuo movimiento desde el citoplasma al núcleo y viceversa (Birbach et al., 2002). El complejo I κ B ϵ / NF- κ B se comporta de modo

similar al complejo formado por $I\kappa B\alpha$, pero el complejo $I\kappa B\beta$ / NF- κ B permanece en citoplasma debido a que el factor $I\kappa B\beta$ es capaz de enmascarar ambas secuencias de localización nuclear del dímero, a diferencia del factor $I\kappa B\alpha$ que es capaz de enmascarar la señal de localización nuclear sólo de p65.

A su vez los diferentes complejos $I\kappa B$ /NF- κ B difieren en la cinética de activación de NF- κ B. Frente a un estímulo $I\kappa B\alpha$ se degrada rápidamente permitiendo la translocación de NF- κ B al núcleo y la inducción de genes que poseen elementos de respuesta a NF- κ B entre los cuales se encuentra el propio $I\kappa B\alpha$, dando lugar a una fuerte inhibición de la respuesta mediada por NF- κ B. A diferencia de $I\kappa B\alpha$, $I\kappa B\beta$ es menos sensible a la degradación inducida por estímulo y no posee elementos de respuesta a NF- κ B en su promotor. De este modo la cinética de activación de los complejos $I\kappa B\beta$ / NF- κ B es más lenta, pero una vez degradado $I\kappa B\beta$ la actividad de NF- κ B se mantiene por períodos de tiempo más largos (Hoffmann et al., 2002).

3.3. Quinasas de $I\kappa B$

Uno de los eventos esenciales para la liberación y activación de NF- κ B es la fosforilación de $I\kappa B$, mediada por la quinasa de $I\kappa B$ (IKK). IKK es un complejo de más de 700 kDa constituido por 3 proteínas quinasas, $IKK1/IKK\alpha$, $IKK2/IKK\beta$, y $IKK\gamma/NEMO$. $IKK\alpha$, e $IKK\beta$ son las subunidades catalíticas, mientras que $IKK\gamma$ tiene un rol regulatorio y es requerida para la activación del complejo por distintas cascadas de señales. Las quinasas $IKK\alpha$ e $IKK\beta$ son capaces de fosforilar $I\kappa B\alpha$, $I\kappa B\beta$, e $I\kappa B\epsilon$ *in vitro*, pero se comportan de forma distinta *in vivo*. En células de mamíferos la actividad de $IKK\alpha$ e $IKK\beta$ depende de su habilidad para dimerizar a través de los motivos de cierre de leucinas. Una vez que $IKK\alpha$ e $IKK\beta$ dimerizan, entonces pueden asociarse con $IKK\gamma$ a través de un motivo corto de interacción localizado en el extremo C-terminal de cada subunidad catalítica. La asociación de los dímeros de $IKK\alpha$ e $IKK\beta$ con $IKK\gamma$ resulta en la formación de un gran complejo, compuesto de heterodímeros de $IKK\alpha:IKK\beta$ los cuales se mantienen unidos a través de la interacción con 2 moléculas de $IKK\gamma$ (Miller and Zandi, 2001). Además de su rol en el ensamblado del complejo $IKK\gamma$ es como se mencionó anteriormente, un regulador importante de la función del

complejo ya que conecta a IKK con sus activadores a través de un motivo de dedos de Zinc que se encuentra en su extremo carboxilo-terminal.

Si bien el ensamblado del complejo es un requisito para la activación de IKK, la activación de este complejo por estímulos proinflamatorios como por estímulos inmunes innatos depende de la fosforilación de algunas de las dos subunidades catalíticas en dos serinas conservadas. Esta fosforilación puede ser llevada a cabo por una proteína quinasa que se encuentra por arriba en la cascada de activación o bien puede autofosforilarse o fosforilar a la quinasa asociada debido a la proximidad de las subunidades catalíticas dentro del complejo. Experimentos genéticos han demostrado que ciertas señales activan IKK a través de la fosforilación de IKK α , mientras que la mayoría de los estímulos proinflamatorios activan a IKK a través de la fosforilación de IKK β . Esto sugiere que IKK α e IKK β desempeñen distintas funciones regulatorias. Esta hipótesis se confirmó a través de la generación de ratones mutantes deficientes en algunas de las dos subunidades. Ratones deficientes en IKK β mueren por apoptosis masiva en el hígado, de modo similar al ratón deficiente en la subunidad p65/RelA de NF- κ B (Li et al., 1999; Beg et al., 1995), pero lo más interesante fue que se vio que la letalidad que estaba asociada con la pérdida de IKK β o p65/Rel A era prevenida por la pérdida de expresión de TNFR1, indicando que el TNF- α era el responsable de dicha muerte. Estos resultados mostraron de manera contundente que IKK β es requerida para la activación de los dímeros de NF- κ B que contienen p65/RelA en células del hígado y que estos complejos son necesarios para la expresión de genes anti-apoptóticos cuyos productos suprimen la apoptosis mediada por TNF- α . El análisis de ratones nulos para IKK α no reveló nada acerca del rol de esta subunidad en la regulación de la actividad de NF- κ B y en las respuestas inmunes. Células derivadas de los ratones deficientes en IKK α , muestran una activación normal de IKK y no difieren en la cinética de activación de NF- κ B, con respecto a fibroblastos normales, pero existe una disminución en la capacidad de unión al ADN y en la inducción de algunos genes blanco de NF- κ B (Sizemore et al., 2002). Sin embargo otros tipos de estudios revelaron que la IKK parece estar involucrada específicamente en las respuestas mediadas por células B y en la organización de órganos linfoides (Ghosh y Karin, 2002). La anulación de la expresión de la subunidad IKK γ en ratones es letal en etapas tempranas del desarrollo (Rudolph et al., 2000) lo que concuerda con el rol esencial de esta subunidad sugerido por experimentos bioquímicos e *in vitro*.

Recientemente se ha descubierto un complejo de alto peso molecular alternativo al complejo IKK. Este complejo contiene IKK ϵ , el cual es homólogo a IKK α y a IKK β pero no se une a ninguna de estas dos últimas subunidades. IKK ϵ parecería estar involucrado en la activación de NF- κ B mediada por ésteres de forbol y por la activación mediada por el receptor de células T (TCR) (Peters et al., 2000). El descubrimiento de este nuevo complejo adiciona una nueva complejidad en el mecanismo de activación de NF- κ B.

El complejo IKK es el punto de convergencia de numerosas cascadas de señalización que conducen a la activación de NF- κ B. Los mecanismos moleculares a través del cual se activa el complejo IKK aún se desconocen. Sin embargo se ha descrito que numerosas quinasas activadas por receptor como MKK1, MKK3, NIK, PKC θ , son capaces de activar el complejo IKK *in vitro*. El alto número de activadores del complejo IKK, que hasta el momento se han documentado, reflejan una de las características más sobresalientes de NF- κ B: la capacidad de ser activado por una gran variedad de estímulos de naturaleza muy distinta. Por último, teniendo en cuenta las evidencias experimentales aquí mencionadas podemos decir que el complejo IKK desempeña un papel sumamente importante en la regulación de la actividad y función de NF- κ B.

3.4. Activación inducible de NF- κ B

Uno de los aspectos más interesantes de NF- κ B es que puede ser activado por una amplia variedad de estímulos asociados al estrés, a la respuesta inmune e inflamatoria y al daño celular, entre los cuales se puede mencionar citoquinas proinflamatorias, como IL-1 β y el TNF- α ; productos bacterianos y virales como lipopolisacáridos (LPS), esfingomielinasa, RNA doble cadena, la proteína Tax del virus de la leucemia de células T de humanos (HTLV-1); estímulos proapoptóticos y necróticos como radicales libres de oxígeno, luz ultravioleta y radiación γ (Baeuerle y Baichwal, 1997). Las vías de activación se pueden clasificar en tres grupos diferentes. El primero a través del receptor de TNF- α , el segundo a través de los receptores tipo Toll o receptores de reconocimiento de patrones específicos (PRRs) y el tercer grupo constituye la activación de NF- κ B por estimulación del receptor T.

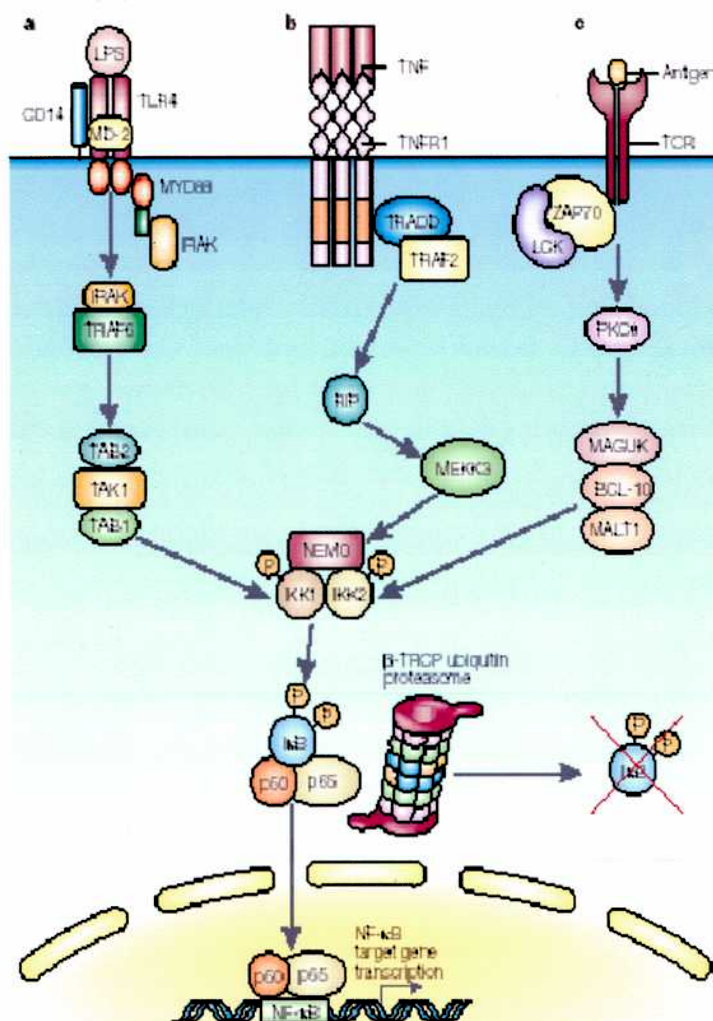


Figura 4. Vías de activación de NF- κ B. A) Activación a través de los receptores tipo Toll o IL-1. B) Activación inducida por TNF- α a través del receptor TNFR1. C) Activación a través de la vía del receptor de las células T (TCR). Qiutang y Verma, 2002.

La activación de NF- κ B se logra a través de la inducción de la degradación proteolítica de I κ B en el citoplasma de la célula (Figura 4): las señales extracelulares inician una cascada de señalización que llevan a la activación de IKK α o IKK β , que fosforilan a I κ B en residuos de serina específicos en la región aminoterminal (Ser32 y Ser36 para I κ B α , Ser19 y Ser23 para I κ B β) (DiDonato et al., 1997; Mercurio et al., 1997). Una vez fosforilado I κ B es selectivamente ubiquitinado y degradado por la maquinaria del proteosoma 26S (Chen et al., 1995). Este proceso deja al descubierto las señales de localización nuclear, posibilitando que NF- κ B interactúe con la maquinaria de importación y translocación al núcleo, donde se une a secuencias consenso de determinados genes para activar su transcripción (Alkalay et al., 1995) (Figura 4). Una

vez dentro del núcleo NF- κ B debe acceder a los promotores y *enhancers* de los genes que regula, antes de que pueda estimular su transcripción.

La respuesta de NF- κ B ocurre prácticamente en todas las células. La especificidad y la selectividad de este proceso es crucial para que NF- κ B sea capaz de regular distintos genes en respuesta a diferentes estímulos. En parte esto podría deberse a la activación diferencial de distintos complejos de NF- κ B, que tienen distintas especificidades de unión al DNA, por ende, llevando a la modulación de genes diferentes, y por lo tanto, a diversas acciones biológicas (Perkins, 1997).

3.4.1. NF- κ B regula numerosos genes involucrados en distintas respuestas celulares

El factor de transcripción NF- κ B está involucrado en la inducción de numerosos genes, como se muestra en la tabla 2 (Kopp y Ghosh, 1995).

En particular, NF- κ B estimula la producción de citoquinas esenciales para la respuesta inmune: IL-1, IL-6, TNF- α , linfotóxica e interferón γ . Estas citoquinas tienen múltiples efectos y contribuyen al proceso de inflamación.

Tabla 1. Inducción de genes que responden a NF- κ B		
Tipo de proteínas	Proteínas inducidas	Respuesta celular involucrada
Citoquinas	IL-1, IL-2, IL-2R, IL-6, IL-8, G-CSF, GM-CSF, TNF α , TNF β , INF β	Activación de células del sistema inmune
Moléculas de adhesión	VCAM-1, ELAM-1, ICAM-1	Migración celular y reparación
Proteínas de fase aguda	Angiotensinógeno, proteína amiloide del suero, glicoproteína α 1, proteína C3 del complemento, factor B del complemento	Inflamación
Proteínas Rel e I κ B	I κ B α , p105, c-Rel	Regulación de la respuesta

NF- κ B		
Proteínas inhibitorias de la apoptosis	Bcl2, TRAF1, TRAF2, A20, IEX-1L	Inhibición de la apoptosis
Proteínas proapoptóticas	Ligando de Fas, p53	Apoptosis
Protooncogenes	c-Myc, ciclina D1	Tumorigénesis

NF- κ B juega un papel crucial en muchas enfermedades inflamatorias, como la artritis reumatoidea y el asma. También está implicado en otras enfermedades como la arterosclerosis, el mal de Alzheimer (Kaltschmidt et al., 1997) y cáncer (Gilmore et al., 1996; Luque et al., 1997). En células asociadas a estas enfermedades, NF- κ B presenta localización nuclear constitutiva y está aumentada su actividad transcripcional.

3.5. Rol de NF- κ B en apoptosis y tumorigénesis

Además de su rol como regulador de la respuesta inflamatoria e inmune, las subunidades de NF- κ B son importantes reguladores de la apoptosis y la proliferación celular, por lo que permitiría a esta molécula funcionar como un importante regulador de la tumorigénesis (Barkett et al., 1999).

El fenotipo de ratones p65^{-/-}, que mueren durante el desarrollo embrionario debido a una apoptosis masiva de hepatocitos, sugiere que en lugar de promover el crecimiento celular, NF- κ B jugaría un rol importante en la protección de las células al mecanismo de apoptosis. Otra evidencia a favor del rol protector de NF- κ B es la sensibilidad a apoptosis por TNF- α que adquieren células que expresan una forma dominante negativa de I κ B α , o aquellas líneas celulares que no expresan p65. Aparentemente esta función protectora del NF- κ B no se da solamente en células estimuladas con TNF- α , sino también células tratadas con radiación ionizante o agentes quimioterapéuticos. Esto sugiere que NF- κ B jugaría un rol antiapoptótico en varios sistemas (Wang et al. 1996).

Son varios los genes antiapoptóticos que son inducidos por el factor de transcripción NF- κ B, incluyendo genes inhibidores de la apoptosis (IAPs), factores tipo

Bcl2, factor 1 y 2 asociados a receptor de TNF (TRAF1 y TRAF2), A20, una proteína dedos de zinc inducible por TNF, e IEX-1L, un gen inducible en forma inmediata y temprana por radiación (Barkett et al., 1999). De esta manera ha evolucionado en ciertas células cancerígenas un mecanismo por el cual NF- κ B en tumores sufre una activación descontrolada y podría proveer esta señal antiapoptótica (Rayet y Gelinas, 1999; Foo et al., 1999).

NF- κ B contribuye a la tumorigénesis de otras maneras que inhibiendo la apoptosis: esta molécula es capaz de activar protooncogenes como c-Myc y la ciclina D1. De esta manera, existe una vía directa en el cual está involucrado este factor de transcripción en la proliferación celular (Pahl et al., 1999; Guttridge et al., 1999).

Por otro lado, y bajo ciertas circunstancias, el factor de transcripción NF- κ B puede promover la muerte celular (Barkett et al., 1999). Por ejemplo en cooperación con AP-1, NF- κ B puede inducir la expresión del ligando de Fas en células T. Más aún, en células CD4⁺ y CD8⁺ puede inducir o reprimir la apoptosis dependiendo de la naturaleza del activador (Barkett et al., 1999). También puede inducir apoptosis en células *natural killer* (NK) (Armant et al., 1995), puede tener un rol dual en neuronas (McEwen, 1999) o linfocitos (Zacharchuk et al., 1990) dependiendo del estímulo.

Los mecanismos moleculares precisos que determinan que la molécula de NF- κ B tenga un rol apoptótico o antiapoptótico aún no se conocen con claridad, pero es probable que una respuesta u otra dependa del tipo celular y del tipo de señales, así como del contexto en que se encuentre la maquinaria de transcripción (Perkins, 2000).

4. Glucocorticoides

4.1. Características generales de receptores nucleares

Los receptores nucleares son factores de transcripción inducibles por ligandos específicos capaces de modular la transcripción, activándola o reprimiéndola. Se encuentran presentes en vertebrados, artrópodos y nematodos y regulan numerosos eventos fisiológicos de alta complejidad, que terminan gatillando una serie de respuestas durante el desarrollo. (Moras y Gronemeyer, 1998).

Los receptores nucleares son proteínas que regulan la transcripción uniéndose selectivamente a secuencias específicas en el ADN, mayoritariamente como dímeros, a

través de dos módulos característicos de dedos de zinc y una región de dimerización que determina si se forman homodímeros o heterodímeros. Poseen una función de activación (AF) que les confiere el potencial de transactivación a dominios heterólogos de unión al ADN.

Los ligandos específicos que se unen a estas proteínas en los dominios de unión del ligando (LBD) tienen la propiedad de inducir la transactivación intrínseca de estas moléculas. Entre los ligandos para receptores nucleares se encuentran esteroides, retinoides, vitamina D, hormona tiroidea, prostanoides y farnesoides. Debido a que esta familia de moléculas contiene receptores intracelulares, se convierten en mediadores directos de la acción de hormonas. Si bien algunos receptores se encuentran inicialmente en el citoplasma formando complejos con proteínas que actúan como chaperonas y subsecuentemente translocan al núcleo luego de la interacción con su ligando, la mayoría están prelocalizados en el núcleo, presumiblemente unidos al ADN (Freedman, 1999).

4.1.2. Tres grandes familias

Dentro de esta superfamilia de receptores nucleares se han identificado diferentes subfamilias: los receptores de tipo I (“clásicos” o “esteroideos”) incluyen aquellos para progesterona (PR), estrógenos (ER), andrógenos (AR), glucocorticoides (GR) y mineralocorticoides (MR); los receptores de tipo II incluyen aquellos para la hormona tiroidea (TR), ácidos *trans* retinoicos (RAR), ácido 9-*cis* retinoico (RXR) y vitamina D₃ (VDR); los receptores de tipo III incluyen los receptores huérfanos cuyos ligandos aún no han sido caracterizados. Los receptores de tipo I, en ausencia de ligando, están secuestrados y asociados con proteínas de shock térmico y, en este estado, no modulan la transcripción de sus promotores. En cambio, los receptores de tipo II son capaces de unirse al DNA en ausencia de ligando y generalmente ejercen un efecto de represión sobre sus promotores, un fenómeno conocido como silenciamiento (Tsai y O'Malley, 1994). Los receptores de tipo I se unen a repeticiones palindrómicas, en forma de homodímeros, únicamente en presencia de ligando, mientras que los receptores de tipo II se unen constitutivamente a sus elementos de respuesta, que contienen repeticiones directas. Además, éstos exhiben patrones de dimerización promiscuos y muchos involucran heterodimerizaciones con RXR. Ese tipo de interacciones podría modular la gran amplitud de respuestas transcripcionales ante un

determinado ligando específico (McKenna et al., 1999). Lo cual constituye otro ejemplo de control combinatorio.

4.1.3. Estructura molecular

La estructura de los receptores nucleares comprende una serie de dominios altamente conservados: una función de activación en el extremo amino-terminal (dominio AF-1 o $\tau 1$), un dominio de unión al ADN (DBD), una región bisagra (D) y un dominio de unión del ligando en el extremo carboxilo-terminal (LBD), donde también se encuentra una segunda función de activación (AF-2 o $\tau 2$) (Danielian et al., 1992; Ham y Parker, 1989; Godowski et al., 1988) (Figura 5). Otras funciones fueron propuestas para el LBD, incluyendo la de unión del ligando (Dobson et al., 1989), interacción con proteínas de shock térmico (hsp) (Housley et al., 1990) y localización nuclear (Picard y Yamamoto, 1987).

El proceso de activación por ligando requiere la activación del receptor por la hormona, un cambio en la estructura del receptor y una disociación de las proteínas de shock térmico, translocación al núcleo (en el caso de GR, MR, AR y PR), la dimerización, y la unión del receptor a su secuencia específica en el ADN. El proceso por el cual los receptores, una vez activados y unidos a sus secuencias específicas, regulan la activación de la transcripción, está mucho menos caracterizado.



Figura 5. Familia de receptores esteroideos. NTD (*N-terminal domain*); DBD (*DNA-binding domain*); HBD (*hormone-binding domain*); hGR (*human glucocorticoid receptor*); hMR (*human mineralocorticoid receptor*); hPR (*human progesterone receptor*); hAR (*human androgen receptor*); hER (*human estrogen receptor*).

4.1.4. El receptor de glucocorticoides (GR)

Uno de los miembros mejor estudiados de esta superfamilia de receptores hormonales nucleares es el receptor de glucocorticoides (GR), el cual juega un papel muy importante tanto en el desarrollo como en la fisiología. Los glucocorticoides (GC) median sus efectos a través de la unión a sus receptores intracelulares, los cuales se encuentran en la mayoría de los tipos celulares.

El gen del receptor de glucocorticoides humano (hGR) se clonó en el año 1991. Este gen está localizado en el cromosoma 5 y contiene 9 exones. Al menos tres promotores regulan su actividad, permitiendo la expresión tejido-específica. Por *splicing alternativo* se obtienen 2 tipos de RNA mensajero: hGRα y hGRβ, los cuales a su vez se traducen en dos proteínas distintas, una de 777 aminoácidos (hGRα) y otra de 742 aminoácidos (hGRβ).

4.1.4.1. Mecanismos de acción del GR

En ausencia de ligando, el GR forma parte de un gran complejo con otras proteínas, del cual se disocia luego de la unión a su hormona. La chaperona hsp90 forma parte de este gran complejo, y se une al LBD del GR. Esta asociación mantiene al receptor en una conformación que le permite unirse a su ligando, pero es transcripcionalmente inactiva (Cadepond et al., 1991). Además de esta chaperona hay otros factores como p23, p60, hsp40 y hsp70 que son requeridos para la formación de un complejo estable entre el GR y la hsp90 (Pratt et al., 1998) (Figura 6).

4.1.4.2. Fosforilación y translocación al núcleo del GR

El receptor de glucocorticoides se encuentra fosforilado en ausencia de ligando, y luego de la unión a su agonista se hiperfosforila cosa que no ocurre con un antagonista (Orti, et al., 1989). En el GR de ratón se han identificado 8 sitios de fosforilación y la mayoría de ellos se encuentra en la región amino-terminal del dominio de activación 1 (Bodwell et al., 1991; Bodwell et al., 1998). Cinco de estos sitios de fosforilación se encuentran conservados en el GR humano y todos ellos son residuos de serina que se encuentran en las posiciones 113, 141, 203, 211, 226. Tres de estos residuos de serina están seguidos de un residuo de prolina, formando un motivo potencial de fosforilación para las serina/treonina prolina quinasas. Miembros de esta familia de proteínas quinasas como las quinasas dependientes de ciclina (cdk), MAPKs y glicogenosintetasa quinasa 3 (Gsk-3), son capaces de fosforilar el GR de ratón en sitios específicos *in vitro* (Krstic et al., 1997; Rogatsky et al., 1998; Rogatsky et al., 1998).

Se han identificado dos dominios en el hGR que están involucrados en la translocación que ocurre luego de la unión al ligando. El primer dominio (NL1) se encuentra en la parte C-terminal del DBD y se extiende hasta el límite entre el DBD y el LBD. NL1 posee una alta homología con la señal de localización nuclear del antígeno T del virus SV-40 y está 100 % conservado entre ratones y humanos. El LBD inhibe la función de NL1, y esta inhibición es abolida por la unión del ligando. El segundo dominio (NL2) se encuentra en el LBD, pero su localización exacta se desconoce. La translocación nuclear mediada por NL2 es menor que la translocación mediada por NL1, y es hormona dependiente.

4.1.4.3. Dimerización y unión al ADN del GR

El GR, luego de la unión a su ligando transloca al núcleo y se une a secuencias de ADN llamadas elementos respondedores a glucocorticoides (GRE) (Wrange et al., 1989) en forma de homodímero (Figura 6). La mayor parte del receptor que se encuentra unido al ligando en solución es monomérico y la dimerización ocurre solo después de la unión al ADN (Luisi et al., 1991). La región bisagra D ubicada dentro del dominio de unión al ADN es la responsable de la dimerización luego de la unión al ADN (Luisi et al., 1991).

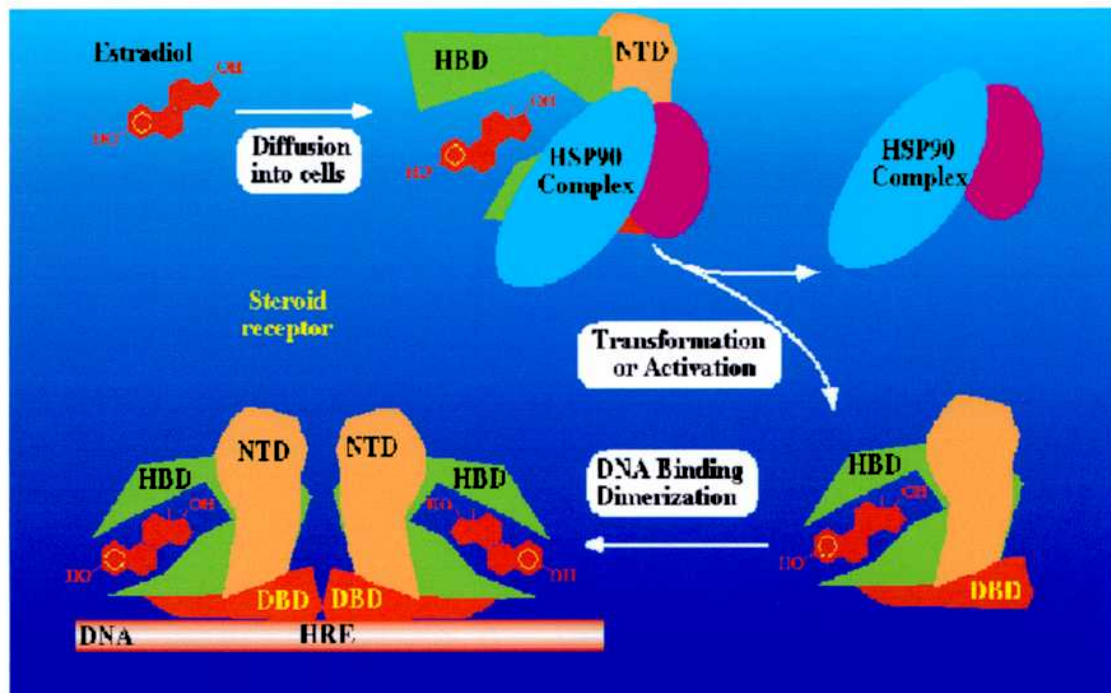


Figura 6. Activación y translocación del GR. El GR se encuentra en el citoplasma en estado inactivo, formando un complejo con otras proteínas entre las que se encuentra la hsp-90. El GR se activa por interacción con el ligando, lo que permite su disociación de las otras proteínas, y los dímeros de GR-GR translocan al núcleo para inducir la transcripción de sus genes blanco.

4.1.4.4. Transactivación del GR

La transactivación de los genes blancos del GR requiere la presencia de dos dominios en el receptor, el dominio de activación 1 (AF-1 o τ -1) y el dominio de activación 2 (AF-2 o τ -2). Como se mencionó anteriormente el primero se encuentra en el extremo N-terminal y su función es independiente de hormona, mientras que el segundo, τ -2, se encuentra en el LBD y su función requiere de la unión del ligando al receptor. Hasta el presente no está del todo entendido como la unión del receptor de glucocorticoides a sus sitios GRE permite la iniciación de la transcripción, pero hay

evidencias que muestran que la maquinaria de transcripción básica sería reclutada al promotor (Beato et al., 1996) y que la activación transcripcional del GR dependería de coactivadores, los cuales facilitan el reclutamiento de la maquinaria basal de transcripción o el remodelamiento de la cromatina (McKenna et al., 1999; Jenkins et al., 2001).

4.1.4.5. Represión de la activación génica

Además de su capacidad de transactivar la expresión de genes, el hGR es capaz de transreprimir la expresión de genes blancos a través de tres mecanismos distintos: a) en el primer caso el GR puede unirse a secuencias en el ADN llamadas GREs negativos (nGREs) presentes en los promotores de genes específicos, como por ejemplo en el promotor de osteocalcina, en el de prolactina y en el de POMC (Morrison et al., 1993; Sakai et al., 1988). La unión del hGR a estas secuencias impide la unión de otro factor de transcripción que induce la transcripción; b) en segundo lugar el hGR se puede unir a elementos GRE que están superpuestos con el sitio de unión de otros factores de transcripción, a estos sitios se los llama GREs compuestos. Por ejemplo en el promotor del gen de proliferina se encuentra un sitio GRE compuesto, formado por la superposición del sitio GRE con un sitio de unión del factor de transcripción AP-1. A este sitio se puede unir el hGR y provocar el aumento o represión de la transactivación inducida por AP-1 dependiendo del tipo celular y de la composición del dímero AP-1 (Pearce et al., 1993; Harrison et al., 1995) y c) los receptores de glucocorticoides pueden transreprimir la expresión génica a través de la interacción proteína-proteína sin necesidad de unirse al ADN. En particular el GR es capaz de reprimir de este modo genes que están regulados por AP-1 y NF- κ B. El gen de la collagenasa cuya expresión está modulada por AP-1 fue uno de los primeros genes cuya represión por interacción con otro factor de transcripción fue demostrada (Jonat et al., 1990). Se vio que el efecto represivo estaba mediado por monómeros de GR, y análisis mutacionales mostraron que el LBD y el DBD participaban en esta acción. Por otro lado el receptor de glucocorticoides activado es capaz de reprimir la actividad del factor de transcripción NF- κ B (Caldenhoven et al., 1995; Ray et al., 1994; Scheinman et al., 1995) inhibiendo la actividad de la subunidad p65/Rel A, con la cual puede interactuar físicamente. Dado que las mismas regiones del GR están involucradas en la represión de AP-1 y NF- κ B, el

mecanismo de transrepresión parece ser un mecanismo común de regulación de la actividad transcripcional.

Otra de las formas por la cual los GC ejercen su acción inhibitoria sobre el factor NF- κ B, es mediante la inducción de la proteína inhibitoria I κ B α que mantiene secuestrado al factor de transcripción en el citoplasma celular, manteniéndolo inactivo. Se demostró que el GR activado por la hormona, induce la transcripción del gen que codifica para I κ B α y el aumento de la síntesis de esta proteína, con la posterior asociación a los dímeros de RelA preexistentes en el núcleo (Auphan et al., 1995; Scheinman et al., 1995a). Sin embargo, la inducción de I κ B no siempre se observa, ya que depende del tipo celular en estudio (Brojstan et al., 1996).

4.1.4.6. Acciones biológicas de los glucocorticoides

La glándula adrenal juega un importantísimo rol orquestando la homeostasis en mamíferos. Los GC son un ejemplo de hormonas esteroideas sintetizadas por el cortex de esta glándula, los cuales tienen un numeroso rango de funciones incluyendo la regulación de la gluconeogenesis y el metabolismo de lípidos, acciones inmunosupresoras y antiinflamatorias, estimulación de la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas especialmente en el hígado, inhibición de la síntesis de citoquinas, inhibición de la proliferación de fibroblastos, mantención del normal funcionamiento cardiovascular y de la presión sanguínea, regulación de la absorción de calcio y su redistribución, maduración de tejidos en particular el hígado, páncreas, y pulmón y efectos en las funciones cognitivas. Si bien estas son las funciones generales de los GC, estas hormonas son especialmente importantes para combatir el estrés. Frente a estímulos estresantes como cambios extremos de temperatura, temor, hambre y lesión física, se produce un aumento de la síntesis y liberación de GC.

Los GC son los más potentes agentes antiinflamatorios e inmunosupresores. Ellos inhiben la síntesis de la mayoría de las citoquinas hasta ahora conocidas y de varias moléculas de superficie celular requeridas para la función inmunológica. Por esta razón análogos sintéticos de esta hormona son sumamente eficaces para el tratamiento de diversas enfermedades, como por ejemplo el asma y la artritis reumatoidea.

Diversos estudios demuestran que los glucocorticoides son capaces de modular negativamente la expresión de ciertos genes, como los que codifican para algunas

citoquinas. Se sabe que los GC suprimen la proliferación de linfocitos T humanos, ya que inhiben la síntesis del factor de crecimiento de células T (TCGF) en linfocitos periféricos (Arya et al., 1984). Se vio, por ejemplo, que monocitos preincubados en dexametasona (DEX) (un glucocorticoide sintético) no secretaban IL-1 (Arend y Massoni, 1986; Knudsen et al., 1987). Otros estudios demostraron que los macrófagos sensibles a endotoxinas no expresan TNF- α si son tratados primeramente con dexametasona (Beutler et al., 1986). Villiger et al. en 1992 demuestran que la dexametasona baja los niveles de expresión de la proteína 1 quemoatractante de monocitos (MCP-1). Está demostrado también que los GC regulan negativamente la expresión del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), IL-8 e IL-6 en fibroblastos humanos. Estas citoquinas son esenciales en la regulación de hematopoyesis y la respuesta inmune (Tobler et al., 1992; Waage et al., 1990). Otro ejemplo de la regulación negativa que ejercen los GC es sobre la molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM-1), quien juega un rol crucial en el reclutamiento y migración de los leucocitos a los sitios de inflamación (Caldenhoven et al., 1995).

Otras de las habilidades de los glucocorticoides es su capacidad de inducir, *in vitro*, apoptosis de timocitos y llevar, *in vivo*, a una reducción del tamaño del timo (King et al., 1995). Además influyen sobre los timocitos y linfocitos T modificando sus respuestas biológicas a las señales mediadas por los receptores de las células (TCR).

5. Cascada de señales mediada por proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK)

Las MAPKs son proteínas quinasas activadas por mitógenos que están involucradas en la transmisión intracelular de señales extracelulares. Las MAPK se activan por fosforilación dual de residuos de treonina y tirosina, los cuales se encuentran separados por un residuo, formando el motivo TXY, donde X representa distintos aminoácidos. La identidad del aminoácido ubicado entre la treonina y tirosina define las distintas subfamilias de MAPKs. La familia de MAPKs está formada por 4 subfamilias: la familia de las proteínas quinasas activadas por señales extracelulares (Erk1 y Erk2) (Seeger et al., 1995). Ambas proteínas quinasas se activan por fosforilación del motivo consenso treonina-glutámico-tirosina (TEY) y por ser la primera subfamilia caracterizada es frecuentemente referida con el nombre de la gran familia (MAPKs). Estas proteínas se activan fuertemente por factores de crecimiento del tipo EGF

(epidermal growth factor o Factor de crecimiento epidérmico) o PDGF (Platelet derived growth factor o Factor de crecimiento derivado de plaquetas); el segundo subgrupo de MAPKs corresponde a la familia de las proteínas quinasas capaces de fosforilar en forma específica el factor de transcripción c-jun es por eso que recibió el nombre de Jun-quinasa o JNK (por c-Jun-N-terminal Kinase) (Derijard et al., 1994). Todas las JNKs son activadas por fosforilación dual de residuos de treonina-prolina-tirosina (TPY); el tercer subgrupo de MAPKs corresponde a la familia de proteínas quinasas p38 que resultaron ser homólogas de la MAPK de levaduras HOG-1 (Cano et al., 1995; Martin-Blanco et al., 2000). Estas proteínas se activan por fosforilación dual de residuos treonina y tirosina en su motivo consenso treonina-glicina-tirosina (TGY). Las proteínas JNK y p38 son activadas principalmente por citoquinas proinflamatorias (como IL-1, TNF- α) y por señales de estrés como estrés osmótico, inhibidores de la síntesis proteica (cicloheximida o anisomicina), y factores que dañan el ADN como la radiación y la luz U.V. Es por eso que estos dos últimos subgrupos de MAPKs se los engloba bajo el nombre de SAPKs (por Stress Activated Protein Kinases o Proteínas quinasas activadas por estrés) (Davis, 2000). El último subgrupo de MAPKs corresponde a la familia de Erk5 la cual ha sido recientemente identificada y está siendo intensamente estudiada (Wu et al., 1996). Más recientemente se han identificado otras dos MAPKs nuevas llamadas Erk7 y Erk8 (Abe et al., 2001; Abe, et al., 2002).

Cada familia está regulada por tres cascadas de proteínas análogas que se activan secuencialmente unas a otras por fosforilación dual de residuos de treonina y tirosina. La activación de estas proteínas es iniciada tanto por pequeñas proteínas que se unen a GTP (small GTP-binding protein) o por proteínas adaptadoras, las cuales transmiten la señal directa o indirectamente a una MAPK quinasa quinasa (MAPKKK). Luego, la señal es transmitida hacia abajo en la cascada por enzimas que se encuentran en la siguiente hilera, las cuales se conocen como MAPK quinasa (MAPKK) y finalmente la señal es transmitida a las MAPK las cuales al activarse son capaces de fosforilar a sus sustratos específicos (Figura 7).

Las MAPKs fosforilan a sus sustratos en residuos de serinas o treoninas presentes exclusivamente en motivos Ser-Pro o Thr-Pro (Seeger et al., 1995; Derijard et al., 1994; Cano et al., 1995). Entre los sustratos de las MAPKs se encuentran otras proteínas quinasas, fosfolipasas, factores de transcripción y proteínas del citoesqueleto. La fosforilación específica dada por las MAPKs sobre sus sustrato les permite regular

una gran variedad de eventos celulares que incluyen proliferación, diferenciación, desarrollo, apoptosis y la respuesta a estrés.

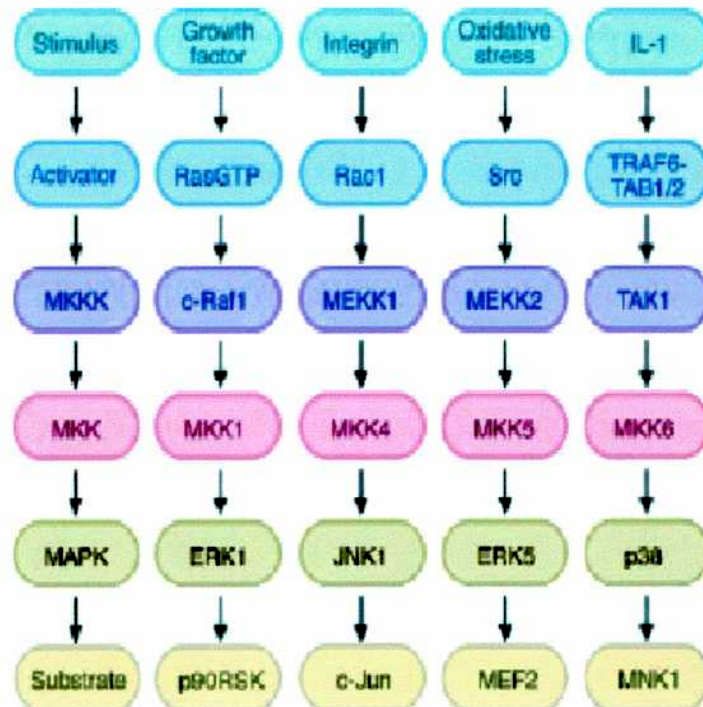


Figura 7. Esquema de las cascadas de transducción de señales de la familia de proteínas MAPKs. Johnson y Lapadat, 2002.

5.1. Familias de proteínas Erk1/2

Erk1 y Erk2 se expresan en distintos tipos celulares y están involucradas en la regulación de la meiosis, mitosis y las funciones postmitóticas. También se vio que estas proteínas están involucradas en el aprendizaje y memoria del sistema nervioso central. Como se mencionó anteriormente muchos estímulos distintos son capaces de activar a Erk1 y Erk2 entre los que se encuentran factores de crecimiento, citoquinas, infecciones virales, ligandos que se unen a receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas, agentes transformantes y carcinógenos.

La cascada de activación “clásica” de Erk1 y Erk2 está compuesta por una pequeña proteína G y tres quinasas sucesivas: Ras-Raf-MEK-Erk1/2 (Figura 7).

5.2. Familia de proteínas JNKs

Las JNKs de mamíferos conocidas hasta el momento son codificadas por tres genes, *jnk1*, *jnk2*, y *jnk3*, los cuales dan lugar a productos proteicos de 46 y 54 kDa por *splicing alternativo*. Como se mencionó anteriormente las proteínas JNKs son capaces de fosforilar específicamente el factor de transcripción c-jun el cual forma parte del complejo de transcripción AP-1. La regulación del camino de transducción de señales que activa a JNK es extremadamente complicada y se encuentra influenciada por muchas MAPKKK distintas. Hasta el momento se encontraron 13 MAPKKK que pueden regular a las JNKs (Johnson et al., 2002). Esta diversidad de MAPKKK permite que una gran variedad de estímulos activen a esta quinasa. Las JNKs están involucradas en la regulación de la apoptosis y la respuesta inflamatoria.

5.3. Familia de proteínas p38

La familia de proteínas quinasa p38 está compuesta por cuatro isoformas de la proteína p38: p38 α , p38 β , p38 γ (Erk6), y p38 δ (también conocidas como SAPK2a, 2b, 3 y 4 respectivamente). Las cuatro isoformas comparten entre un 60-70 % de identidad en sus secuencias aminoacídicas. Todas las isoformas son fosforiladas y activadas fuertemente por la MAPKK, MKK6 *in vitro*. Otras MAPKK muestran una especificidad más restricta, por ejemplo MKK3 activa p38 α , p38 γ , y p38 δ , mientras que MKK4 sólo activa p38 α .

Dentro de los sustratos de esta quinasa se encuentran factores de transcripción y proteínas quinasas. Hay por lo menos seis proteínas quinasas que pueden ser reguladas por p38 y por p38. Dentro de este grupo se encuentran: MAPKAPK2 (MAP-activated-protein kinase 2); MAPKAPK3; MNK1 (MAPK-interacting kinase1); MNK2; PRAK y MSK (mitogen- and stress-activated protein kinase).

La p38 quinasa está involucrada en la regulación de diversos procesos celulares como, apoptosis, regulación de la respuesta inmune en particular durante la inflamación, los procesos de oogenesis y desarrollo del ala en *Drosophila* y en la proliferación, diferenciación y supervivencia en distintos tipos celulares de vertebrados.

5.4. Localización subcelular de MAPKs

Las MAPKs se localizan predominantemente en el citoplasma en células quiescentes. Sin embargo, la estimulación de las células con distintas señales provoca un aumento de estas proteínas en el núcleo. Esto se ha observado para Erk 1/2 (Lenormand et al., 1993) y JNK (Hochbaum y Coso comunicación personal). Tanto proteínas nucleares como citoplasmáticas son blanco de acción de las MAPKs. Estos datos apoyan la teoría de que las MAPKs pueden translocar la membrana nuclear y que esta translocación estaría vinculada a su estado de activación. Hay evidencias que muestran que Erk1/2 es capaz de translocar al núcleo en forma de dímero y que el dímero fosforilado en treonina y tirosina constituiría la forma activa (Khokhlatchev et al., 1998).

Para transducir precisamente las señales, las proteínas necesitan reconocer e interactuar con proteínas específicas que se encuentran por arriba o por debajo en la cascada de señalización. Hay evidencias que muestran que las proteínas de anclaje o andamiaje facilitarían la eficiencia y la fidelidad de la transducción de señales y la regulación de la localización de ciertas proteínas. Recientemente se ha identificado un dominio de anclaje necesario para la interacción con proteínas quinasas en p38 α . Por otro lado nuevas evidencias muestran que la proteína MAPKAPK2 un sustrato de p38 α se localiza primariamente en el núcleo pero luego de una señal de estrés es capaz de translocar al citoplasma. Esta translocación permite el pasaje de p38 α al citoplasma y su permanencia en este compartimento celular está mediada por la interacción con MAPKAPK2 que actuaría también como proteína de anclaje de la misma en este caso (New et al., 2003).

Puntos para recordar:

- **La mayoría de las células son resistentes a la apoptosis inducida por $\text{TNF-}\alpha$, y su sensibilización requiere del uso de inhibidores de la síntesis proteica o la inhibición del factor de transcripción $\text{NF-}\kappa\text{B}$.**
- **El rol del factor de transcripción $\text{NF-}\kappa\text{B}$ en la apoptosis es complejo ya que hay evidencias que sustentan un rol pro- y anti-apoptótico. Aparentemente su papel en este proceso está determinado por el contexto celular**
- **El GR es un factor de transcripción nuclear que participa en la regulación de numerosos eventos. El rol de los GC en la regulación de la apoptosis tampoco está claro hasta la fecha ya que si bien en ciertos tipos celulares es capaz de inducir apoptosis en otros puede tener un rol protector, como por ejemplo en el modelo de apoptosis de fibroblastos de ratón L-929 los cuales son sensibles a la apoptosis inducida por $\text{TNF-}\alpha$.**

Si bien el cortisol actúa como primera señal en la activación de las funciones regulatorias del receptor, la activación transcripcional del GR también es modulada por fosforilación, siendo esta última llevada a cabo entre otras por, proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs).

- **Las MAPKs constituyen una familia de proteínas quinasas cuya función y regulación se ha conservado a lo largo de la evolución desde organismos unicelulares hasta humanos. Estas quinasas están entre los intermediarios más importantes en la transducción de señales que van desde la membrana celular al núcleo y por lo tanto están involucradas en la regulación de una gran cantidad de eventos celulares entre los que se encuentran: el control de la expresión génica, mitosis, metabolismo y apoptosis.**

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Si bien los fibroblastos de ratón L-929 constituyen un blanco de acción apoptótica por TNF- α , otras líneas celulares no lo son, y deben ser sensibilizadas con antibióticos inhibidores de la traducción. Se desconoce si en estos modelos los GC antagonizan la acción de TNF- α dado que en éstos, la inducción de apoptosis no requiere de la expresión *de novo* de genes. La sensibilización por el uso de antibióticos podría interpretarse como una inhibición de la expresión de genes antiapoptóticos, aunque, resulta importante destacar que el uso de los mismos, tiene un efecto inductor de SAPKs, cuyo rol en la apoptosis inducida por TNF- α aún no está del todo claro. Es por eso que sería importante determinar su posible acción sensibilizadora, por ejemplo vía la fosforilación de proteasas, proteínas antiapoptóticas, así como determinar si existen cambios en el estado de fosforilación del GR y si éste es capaz de afectar su actividad y por lo tanto su rol en los distintos modelos de apoptosis. De acuerdo con los antecedentes previamente mencionados se plantearon como **objetivos principales** de esta tesis:

- Estudiar los mecanismos de apoptosis inducidos por TNF- α en células resistentes al mismo, sensibilizadas con estrés osmótico: Determinar el rol que juegan en este proceso distintos componentes de la familia de las MAPKs y el factor de transcripción NF- κ B.
- Estudiar los mecanismos involucrados en la regulación de la actividad protectora de los GC en la apoptosis inducida por TNF- α en células sensibles al mismo. Determinar el rol que juegan en este proceso distintos componentes de la familia de las MAPKs.

MATERIALES Y METODOS

1- Cultivo de células

Las células de carcinoma humano HeLa, fibroblastos de ratón L-929 y células de hígado embrionarias humanas Hek 293, fueron cultivadas en placas de 100 cm² conteniendo 9 ml de medio DMEM (Gibco BRL) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), glutamina 2 mM (Gibco BRL), penicilina 100 µg/ml y estreptomicina 80 µg/ml (Gibco BRL), en una estufa a 37 °C y 5 % de CO₂. Las células fueron plaqueadas a una densidad de 5x10⁵ células por placa y repicadas con tripsina 0.25 % en PBS 1X aproximadamente cada tres días.

2- Ensayo de citotoxicidad

El día previo al ensayo se plaquean 1,5x10³ células L-929 en DMEM baja glucosa conteniendo 2 % SFB o células HeLa en DMEM alta glucosa conteniendo 10 % SFB, en placas de 96 pocillos. Al día siguiente se estimuló con diferentes dosis de TNF-α humano (TNF-α) (Calbiochem) y NaCl 100 mM a las células HeLa y con TNF-α y dexametasona (Dex) a las células L-929. Luego de 18 hs de incubación las células fueron fijadas con metanol 70 % y teñidas con cristal violeta 0,5 %. La absorbancia correspondiente a las células teñidas sobrevivientes se determinó a 570 nm.

El porcentaje de células sobrevivientes se determinó con respecto a las condiciones basales es decir células que no fueron tratadas.

3- Ensayo de apoptosis

3.1- Tinción con yoduro de propidio para evaluar el contenido subdiploide de ADN

Las células HeLa y L-929 fueron cultivadas al 80 % de confluencia en placas de 100 mm² conteniendo 9 ml de medio DMEM (Gibco BRL) suplementado con 10 % o 2 % de suero fetal bovino libre de esteroides respectivamente. Luego se las estimuló con los distintos tratamientos (10 ng/ml de TNF-α; 100 mM de NaCl y TNF-α + NaCl para las células HeLa y 10 ng/ml de TNF-α; 500 nM de Dex y TNF-α + Dex para las células L-929) por 14 hs. Posteriormente las células fueron levantadas con tripsina 0.25 % en PBS 1X y centrifugadas a 1500 rpm 5 min. El pellet se lavó dos veces con PBS 1X y se fijó en etanol 70 %. Finalmente una suspensión de 2x 10⁶ células aproximadamente se las lavó con PBS

1X y se las incubó toda la noche en 1 ml de una solución fluorocrómica hipotónica (100 µg/ml de ioduro de propidio; 0,1 % citrato de sodio; 0,1 % Triton X-100) a 4 °C en oscuridad. Al cabo de este tiempo los núcleos se analizaron por citometría de flujo a una longitud de onda de 585 nm. La frecuencia de células apoptóticas se determinó mediante el análisis de contenido de ADN subdiploide (sub-G0/G1) en los histogramas utilizando el programa Win MDI 2.8

3 2- Tinción con naranja de acridina y bromuro de etidio

Se plaquearon 2×10^5 células HeLa en medio DMEM en placas de 6 pocillos y se las estimuló con 10 ng/ml TNF- α ; 100 mM NaCl ambos simultáneamente durante 18 hs. Luego se tiñeron con naranja de acridina, el cual penetra en las células vivas y se intercala entre las bases del ADN confiriéndoles un color verde, mientras que el bromuro de etidio sólo entra en las células muertas y tiñe la cromatina de un color naranja oscuro. La morfología de las células muertas y las sobrevivientes se observó con un microscopio de fluorescencia.

3 3- Fragmentación internucleosomal del ADN

Aproximadamente 5×10^6 células HeLa se plaquearon en DMEM suplementado con 10 % SFB en placas de 100 mm. Se las trató con los distintos estímulos: 10 ng/ml de TNF- α ; 100 mM de NaCl y ambos simultáneamente durante 18 hs. Luego de levantarlas con tripsina 0,25 % en PBS 1X las células fueron centrifugadas a 3000 rpm durante 5 min y el pellet se resuspendió con 250 µl de solución de lisis (5 mM Tris-HCl pH 7,5; 20 mM EDTA; 0,5 % Triton X-100) y se las incubó durante 30 min en hielo. Al cabo de este tiempo las células se centrifugaron a 12.000 rpm durante 15 min a 4 °C. Luego la fase acuosa se transvasó a eppendorfs nuevos donde se la precipitó con 30 mM de acetato de sodio y 0,7 volúmenes de isopropanol durante 2 hs a -70 °C y se centrifugó a 12.000 rpm durante 15 min a 4 °C. Los pellets se resuspendieron en 500 µl de buffer TE (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA pH 8) y se los trató con ribonucleasa A (0,5 mg/ml) durante 30 min a 37 °C y luego se agregó proteinasa K (100 mg/ml) y se incubó por 30 min más a 37 °C. Luego se realizó una extracción con fenol-cloroformo-isoamílico de cada una de las muestras y la fase acuosa se precipitó con 2 volúmenes de etanol. Finalmente se centrifugó y los pellets de ácidos nucleicos se resuspendieron en 10 µl de agua destilada.

Las muestras se resuspendieron en el buffer de siembra (100 µl de buffer TE; 0,5 % de SDS; 20 µl de azul de bromofenol) y se corrieron en un gel de agarosa 2 % * en el cual también se sembró un marcador de peso molecular de 123 pb (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA). La corrida electroforética fue llevada a cabo a 100 V en buffer TBE 1X (8.9 mM de Tris base; 8.9 mM de ácido bórico; 2 mM de EDTA) durante 2 hs. El ADN se visualizó y fotografió con luz ultravioleta utilizando un equipo FOTODYNE.

Gel de agarosa 2 %: 2 g de agarosa (Promega); 100 ml de agua destilada; 0,5 µg/ml de bromuro de etidio

4- Transfección de células en cultivo

4 1- Transfección transitoria de células en cultivo con liposomas catiónicos

El principio general de este método de transfecciones es la adsorción del ADN a lípidos cargados que luego se fusionan con las células.

El día previo a la transfección se plaquean 1.8×10^5 células L-929 o 2×10^5 células HeLa en DMEM conteniendo 10 % SFB, en placas de seis pocillos, de 3 cm de diámetro. Al día siguiente se agregan el ADN (entre 2-3 µg de ADN por pocillo) y los liposomas, siguiendo el protocolo de Life Technologies. Por último el día siguiente a la transfección se estimulan las células con los diferentes tratamientos durante 12 hs, cuando se transfecta con el plásmido reportero kB-Luc, o 14 hs cuando se transfecta con el plásmido reportero MTV-luc (salvo que se indique lo contrario).

4 2- Transfección transitoria de células en cultivo mediante la técnica de fosfato de calcio

Para estas transfecciones se crecieron células Hek 293 en placas de 10 cm (aproximadamente en un 60 % de confluencia) en 9 ml de medio DMEM. A las 24 horas se realizó la transfección utilizando una masa total de 2 µg de ADN.

Se mezclan 1 ml de solución A (10 µl de ADN *carrier*; 0.86 ml de agua mili Q estéril; 125 µl de CaCl_2 2 M) con 2 µg de DNA plasmídico (incluyendo 1 µg del plásmido de interés y 1µg del plásmido RSV-β-gal) en un tubo. Luego se coloca 1 ml de solución B (1 ml de buffer HN; 22.5 µl del buffer fosfato) en otro tubo. Con una pipeta se burbujea la solución B mientras en este tubo se va agregando gota a gota la solución A (la cual ya contiene el ADN bien mezclado).

Se deja 30 minutos en la campana de flujo laminar

Luego, se agregan los 2 ml finales en cada placa (no se retira el medio sino que se agregan estos 2 ml a ese medio).

Al día siguiente se ven las células al microscopio para evaluar su estado y se remueve el medio, y se lo cambia por medio fresco con antibióticos y suero.

Un día después de la cambiada de medio las células pueden estimularse.

Buffer HN: 50 mM Hepes; 280 mM NaCl (25 ml 1 M Hepes; 28 ml 5 M NaCl; 400 ml ddH₂O. Ajustar el pH a 7.1 y llevar el volumen a 500 ml con ddH₂O. Mantener a 4 °C)

Buffer 70 mM de NaH₂PO₄.H₂O: 966 mg NaH₂PO₄; 100 ml ddH₂O. Esterilizar por filtración y guardar a 4 °C.

Buffer CaCl₂ 2 M: 294 g CaCl₂.H₂O. Llevar a 1 L con ddH₂O. Esterilizar por filtración y mantener a temperatura ambiente.

4.3- Estimulación de las células transfectadas

Luego de 5 horas de transfección en el caso de utilizar el método de los liposomas el medio se aspira y se agregan 2 ml de DMEM suplementado con suero libre de esteroides al 10% o 10 ml de medio respectivamente.

A las 24 horas de la transfección se procede a la estimulación de las células con 10 ng/ml de TNF- α (Calbiochem), 100 mM de NaCl y 500 nM de dexametasona (DEX), según se indica en cada figura de los resultados. En los casos en que se utilizó el inhibidor de p38 quinasa SB203580 (Calbiochem) se lo utilizó en una concentración de 10 μ M y la sulfazalacina (SZ) inhibidor del factor de transcripción NF-kB se los pre-incubó durante 30 min y luego se estimuló según se indique en las figuras.

5- Análisis de la expresión de genes reporteros

5.1- Cosecha de las células

1- A las 14 hs post-estimulación, se lavan las monocapas dos veces con PBS 1X (.8 g NaCl; 0.2 g KCl; 1.44 g Na₂HPO₄; 0.24 g KH₂PO₄ . Agregar 800 ml de H₂O, ajustar el pH a 7,4 con HCl y llevar el volumen a 1 l).

2- Se agregan 200 μ l de buffer de lisis (5X Reporter Lysis Buffer, Promega) a cada pocillo y se incuba 10 min a temperatura ambiente.

- 3- Se trasvasan los lisados a tubos eppendorf y se centrifugan a 10.000 rpm durante 10 min.
- 4- Se recuperan los sobrenadantes sobre los que se ensaya la actividad enzimática.

5.2- Ensayos de detección de la actividad luciferasa

Para medir la actividad presente en los extractos se toman 15 µl de extracto y se pasa a tubos para luminómetro de 5 ml. Luego se agregan 50 µl del reactivo para el ensayo de luciferasa (kit: *Luciferase Assay System Freezer 1-Pack*, de Promega). Inmediatamente después de agregar el reactivo para el ensayo de luciferasa, se coloca el tubo en el luminómetro y se inicia la lectura, que dura 30 segundos para cada tubo. Se anotan los valores obtenidos de las Unidades Relativas de Luciferasa (URL) y se procede al análisis de los datos, normalizando estos valores con los obtenidos para el ensayo de β -galactosidasa, es decir el cociente entre URL y los valores de β -gal.

5.3 - Medición de la actividad de β -galactosidasa.

La enzima β -galactosidasa es sensible a los ciclos de congelado y descongelado del extracto. Por esto se realiza el ensayo inmediatamente luego de producir los extractos.

1- En tubos eppendorf se mezclan: un volumen de buffer β -gal 2X (0.2 M Fosfato de sodio pH 7,4; 2 mM $MgCl_2$; 0.1 M β -mercaptoetanol; 1.33 mg/ml (ONPG) Orto-nitro-fenil-galactopiranosido) y un volumen del extracto de células transfectadas. Las reacciones se realizaron en un volumen final de 100 µl.

2- Se incuba a 37 °C hasta la aparición de color amarillo.

3- Se detiene la reacción con 1 volumen (respecto del volumen de reacción) de 1 M Na_2CO_3 que intensifica el color amarillo de la reacción.

4- Se cuantifica la aparición del producto coloreado (orto-nitro-fenol) midiendo la absorbancia a 415 nm en un lector de Elisa.

6- Ensayo de actividad de MAPKs

Los ensayos de actividad de MAPKs se realizaron según el protocolo descrito por Coso et al, 1995. Brevemente lo que se hizo fue transfectar células HeLa (2×10^5 células por pocillo) con 0,5 µg de pCDNA-HA-Erk-6 utilizando la técnica de los liposomas catiónicos y

se ajustó la cantidad total de plásmido a 3 µg por pocillo usando plásmido vacío. Dos días después de la transfección las células fueron hambreadas durante 2 hs en medio sin suero. Luego las células fueron tratadas con 10 ng/ml de TNF-α; 100 mM de NaCl o ambos durante 20 min, lavadas con PBS y lisadas con el buffer de lisis (25 mM Hepes pH 7,5; 0,3 M NaCl; 1,5 mM MgCl₂; 0,2 mM EDTA, 0,5 mM DTT; 1 % Triton X-100; 0,5 % vanadato de sodio; 1 mM PMSF; 20 µg/ml de leupeptina) a 4 °C. Tanto las proteínas quinasas JNK, p38 como la proteína de fusión HA-Erk-6 fueron inmunoprecipitadas de los lisados celulares mediante la incubación con los anticuerpos específicos para cada caso (Santa Cruz y Covance respectivamente) durante 2 hs a 4 °C. Las proteínas inmunoprecipitadas se recuperaron del resto de las proteínas del lisado celular mediante el uso de bolitas de sefarosa que se unen a inmunoglobulinas (Pharmacia), luego se lavaron 1 vez con buffer 1 (PBS 1X; 1 % NP-40; 2mM de vanadato de sodio) una vez con buffer 2 (100 mM Tris pH 7,5; 0,5 M LiCl) y una vez con buffer de reacción de quinasas (12,5 mM MOPS pH 7,5; 12,5 mM β-glicerofosfato; 7,5 mM MgCl₂, 0,5 mM EGTA; 0,5 mM de fluoruro de sodio; 0,5 mM de vanadato de sodio). Posteriormente para ensayar la actividad quinasa, las proteínas inmunoprecipitadas (JNK, p38, HA-Erk-6, Erk-2, según corresponda) fueron resuspendidas en 30 µl del buffer de reacción conteniendo 1 µCi de [³²P]-γ-ATP, 20 µM de ATP frío y 1µg de sustrato (GST-ATF2 o GST-GR según se indique) e incubadas 30 min a 30 C. La reacción se paró con el agregado de 10 µl del buffer Laemli 5X (0.3125 M Tris pH 6.8; 10 % SDS; 25 % glicerol; 0,05 % Bromo Fenol Blue; 10 % β-mercaptoetanol). Por último las muestras se incubaron durante 5 min a 95 °C y se sembraron en un gel de poliacrilamida 12 % *. Luego el gel se secó 2 hs. a 80 °C y finalmente se lo expuso a una placa radiográfica durante 1 día a temperatura ambiente.

La fosforilación de los sustratos se analizó mediante la autoradiografía del gel.

* Gel de poliacrilamida al 12 % (gel de resolución): 3.3 ml de agua destilada; 2,5 ml de buffer (1,5 M Tris-HCl pH: 8,6); 4 ml de acrilamida 30 %/ bisacrilamida 0,8 %; 10 µl de TEMED; 100 µl de SDS 10 % y 100 µl de persulfato de amonio 10%.

Gel de poliacrilamida concentrador: 3 ml de agua destilada; 1,25 ml de buffer (0,5 M Tris-HCl pH: 6,8); 0,65 ml de acrilamida 30 %/ bisacrilamida 0,8 %; 10 µl de TEMED; 50 µl de SDS 10 % y 50 µl de persulfato de amonio 10%.

Este ensayo también se realizó con células Hek 293 y con células L-929, transfectadas con plásmidos que expresan los ADN copias de las distintas quinasas fusionadas a un epítope de HA.

7- Clonado del fragmento que codifica para el extremo amino terminal del GR

7.1- Diseño de los primers

Los *primers* utilizados para la amplificación del fragmento que codifica para el extremo amino terminal del receptor de glucocorticoides (GR) son:

Primer 5': GCGGATCCTCCATGGGGCTGTATATGGG- BamH1

Primer 3': GCGAATTCCTAGCCCAGTTTCTCTTGCTTAATTACCCCGGG-EcoR1

Las secuencias de los *primers* se diseñaron de tal forma que la secuencia que codifica para GR, quede flanqueada por dos sitios de corte para enzimas de restricción, BamH1 y EcoR1, de forma tal de poder clonar este fragmento más fácilmente en el vector deseado, en nuestro caso el pGEX4T3

Como templado se utilizó un plásmido que tiene clonado el receptor de glucocorticoides humano cedido por el Dr. Yamamoto. Los primers amplifican una secuencia de 650 pb que corresponde a los aminoácidos 106 al 318 (650 pb) primer 5' BamH1 y primer 3' EcoR1.

8- Amplificación del fragmento que codifica para el extremo N-terminal del GR por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 50 µl con 1 U de enzima Taq Polimerasa (Promega), 1X de buffer de reacción, 2 mM de MgCl₂, 2,5 mM de dNTPs, 1 µg de cada uno de los *primers*, tomando como templado 10 ng del plásmido pGR que contiene la secuencia codificante del receptor de glucocorticoides.

Se utilizó un termociclador programado para seguir el siguiente programa:

- 1- 10 min a 94 °C (desnaturalización inicial del ADN)
- 2- 1 min a 94 °C (desnaturalización de cada ciclo)
- 3- 1 min a 55 °C (pegado de los primers al templado)
- 4- 1 min a 72 °C (elongación)
- 5- Volver al ciclo 2 y repetir 29 veces
- 6- 10 min a 72 °C (elongación final)

El producto de PCR se resuspendió en el buffer de siembra 6X (0.25 % p/v de Azul de bromo fenol; 0.25 % p/v de Xylen Cyanol; 0.30 % p/v de glicerol) antes de sembrar.

El producto de PCR y un marcador de peso molecular en nuestro caso el 1 Kb Ladder (New England Biolabs) se sembraron en un gel de agarosa 1 % en buffer TBE 1X (8,9 mM Tris base; 8,9 mM ácido bórico; 2 mM EDTA) con 0.5 µg/ml de bromuro de etidio. La corrida electroforética se realizó a 100 V durante 1 h. Los geles fueron visualizados y fotografiados con luz ultravioleta, utilizando un equipo FOTODYNE.

9- Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa

La banda correspondiente al fragmento de interés se cortó del gel bajo luz UV y luego se purificó utilizando el kit Geneclean (Bio 101). Este se basa en la utilización de una suspensión de partículas de alta afinidad al ADN doble cadena de más de 150 pb.

10- Preparación de los fragmentos para subclonado en el vector pGEX4T3

El fragmento de interés una vez purificado del gel así como el vector pGEX4T3 se cortaron con las enzimas de restricción adecuadas y se los volvió a purificar utilizando el kit de Geneclean (Bio 101).

Las digestiones con las enzimas de restricción se realizaron en las condiciones de temperatura y salinidad indicadas por el manual del fabricante (Promega). Se utilizaron las unidades enzimáticas y los buffers allí recomendados.

11- Ligaciones

Las reacciones de ligación se realizaron a 20 °C durante 24 hs, en 20 µl de buffer de ligación (BRL), en presencia de 500 µl de ATP y 1 U de DNA ligasa del fago T4.

12- Transformación de bacterias competentes

Cultivos de *E.coli* de las cepas DH5α y BL21 se procesaron según Hanahan et al., 1983, para obtener bacterias competentes.

Se usó el protocolo de transformación de Sambrook et al., 1989.

13- Preparación de plásmido en pequeña escala

Se utilizó el método de Birnboim y Doly (Birnboim y Doly, 1979).

14- Mapeo de clones positivos

Los clones fueron analizados usando las enzimas de restricción BamH1 y EcoR1. Los fragmentos luego se corrieron en geles de agarosa y se visualizaron bajo luz UV.

15- Purificación de la proteína de fusión GST-GR

1) Se transforma el plásmido pGEX4T3 que ya tiene ligado el gen de interés en bacterias competentes, preferentemente en la cepa BL21 Lys.

2) Se crecen las bacterias toda la noche en 20 ml de LB amp o SB Amp en agitación a 37 °C.

3) A la mañana siguiente se transfieren las bacterias a 500 ml de LB fresco suplementado con ampicilina.

4) 60min. más tarde se le agrega IPTG a una concentración final de 0.2 mM.

5) 3 hs más tarde se cosechan las bacterias por centrifugación durante 30 min a 3000 rpm.

6) El pellet se resuspende en 10 ml de solución A: 1 % triton X 100; 1 mM EDTA; 1 mM PMSF; (2 mg/ml de Aprotinina y 2 mg/ml de Leupeptina es opcional) en PBS.

7) Se congela y descongela 2 veces.

8) Se sonica 3 veces (10 seg cada vez).

9) Se centrifuga durante 15 min a 14000 rpm a 4 °C.

10) Se toma el sobrenadante y se le agregan entre 300-500 µl de *Glutathion* agarosa previamente lavada (Pharmacia).

11) Se agita 60 min a 4 °C.

12) Se centrifuga 5 min a 3000 rpm a 4 °C.

13) El pellet se resuspende en 1 ml de solución A y se lo transfiere a un tubo eppendorf.

14) Luego se lava 3 veces con la solución A.

15) Se lava otras 2 veces con la solución A sin Triton X-100.

16) Se resuspenden las bolitas en 300 μ l de solución B: 10 mM *glutathion*; 1 mM PMSF; (2 mg/ml de Aprotinina y 2 mg/ml de Leupeptina opcional) en TRIS 50 mM pH 8.0. Se incuban entre 5 y 10 min a 4 °C en un agitador .

17) Se le da un spin y se colecta el sobrenadante.

18) El paso 17 se repite 2 veces guardando los sobrenadantes.

19) Se cuantifica la proteína corriéndola en gel de poliacrilamida y se la compara con estándares de seroalbúmina bovina

20) Se agrega a cada sobrenadante, una vez cuantificado, 1 volumen de una solución de congelado 2X: 20 % glicerol; 1 mM DTT; 1 mM EDTA. Se los alicuota y se los guarda a -70 °C.

El mismo protocolo se utilizó para purificar otras proteínas de fusión como GST-ATF2.

16- Preparación de plásmidos a gran escala

Los plásmidos usados para transfectar líneas celulares en cultivo fueron preparados por medio del sistema de maxipreparaciones de QIAGEN.

17- Cuantificación del ADN plasmídico

Una vez disuelto en TE o agua, el ADN plasmídico fue cuantificado midiendo la absorbancia de la solución a 260 nm en un Gene Quant (Pharmacia). Las concentraciones se calcularon multiplicando el valor de absorbancia obtenido por el factor de dilución por la constante de absorptividad molar.

18- Ensayos de Western blot

18 1- Obtención de extractos proteicos citoplasmáticos y nucleares

Se plaquero 5×10^6 células L-929 en medio DMEM con 10 % de suero libre de esteroides. A las 48 hs post plaqueo las células se estimularon de la siguiente forma: 1 h con dexametasona; 1 h 20 min con TNF- α ; se pre-incubó 20 min con TNF- α y luego se agregó dexametasona durante 1 h. Las incubaciones que se realizaron con 10 μ M de SB203580 se lo pre-incubó durante 30 min y luego se agregaron los distintos estímulos. Una vez cumplido el tiempo de estimulación las células fueron lavadas una vez con PBS 1X frío

y luego levantadas con 400 µl de buffer hipotónico (10 mM Tris-HCl pH 6,7; 0,2 mM MgCl₂) con inhibidores de proteasas (1 mM DTT; 1 mM PMSF; 1 mM pepstatina; 1 mM leupeptina). Se incubó a las células durante 5 min en hielo y luego se rompieron por rotura mecánica suave pasándolas 3 min por tip amarillo. Posteriormente se centrifugó a 1.500 rpm durante 10 min a 4 °C y se trasvasó el sobrenadante a otros tubos eppendorff ya que ahí se encuentran las proteínas citoplásmicas. Al pellet se lo lavó dos veces con PBS 1X y luego se lo incubó con 200 µl de buffer de lisis (20 mM Tris-HCl pH 6,7; 70 mM NaCl; 1 mM EDTA; 10 % glicerol; 1 % Triton X-100; 0,5 % NP-40) durante 30 min en hielo. Por último se centrifugó a 12.000 rpm durante 5 min a 4 °C y el sobrenadante se trasvasó a otros tubos ya que ahí se encuentran las proteínas nucleares.

18 2- Determinación de la concentración de proteínas en extractos celulares

La determinación de la concentración de proteínas se realizó utilizando el método de Bradford. Brevemente se mezclaron 5 µl del extracto (diluídos en 395 µl de H₂O) con 100 µl del reactivo de Bradford 5X (Bio-Rad). La concentración se determinó a partir de la medición de la absorbancia a una longitud de onda de 580 nm en un espectrofotómetro y la extrapolación de la misma en una curva estándar de BSA (0.5-10 µg/µl).

18.3- Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y disociantes (SDS-PAGE)

Se prepararon geles de poliacrilamida al 12 %* (para detectar Bax, p38, JNK, Erk6) o al 10 %** (para detectar GR) de 1,5 mm de espesor. Luego de la siembra de las muestras, la corrida electroforética fue llevada a cabo en una cuba de electroforesis (mini Protean II, Bio-Rad) a 150 V constante en buffer de electroforesis (15.1g Tris; 94 g glicina; 50 ml de SDS 10 %) durante 2 hs.

Preparación de geles:

* Gel de poliacrilamida al 12 % (gel de resolución): 3.3 ml de agua destilada; 2,5 ml de buffer (1,5 M Tris-HCl pH: 8,6); 4 ml de acrilamida 30 %/ bisacrilamida 0,8 %; 10 µl de TEMED; 100 µl de SDS 10 % y 100 µl de persulfato de amonio 10%.

**** Gel de poliacrilamida al 10 % (gel de resolución):** 4 ml de agua destilada; 2,5 ml de buffer (1,5 M Tris-HCl pH: 8,6); 3,3 ml de acrilamida 30 %/ bisacrilamida 0,8 %; 10 µl de TEMED; 100 µl de SDS 10 % y 100 µl de persulfato de amonio 10%.

Gel de poliacrilamida concentrador: 3 ml de agua destilada; 1,25 ml de buffer (0,5 M Tris-HCl pH: 6,8); 0,65 ml de acrilamida 30 %/ bisacrilamida 0,8 %; 10 µl de TEMED; 50 µl de SDS 10 % y 50 µl de persulfato de amonio 10%.

18.4- Transferencia a membranas de nitrocelulosa

Las proteínas separadas por electroforesis se transfirieron a membranas de PDVF (Amersham Biosciences, Piscataway) o Hy Bond (Amersham) utilizando un equipo Mini trans blot (Bio-Rad). Esto permite transferir proteínas cargadas negativamente, mediante una corriente eléctrica, desde el gel a la membrana. Para realizar la transferencia se utilizó el siguiente buffer (3.02 g de Tris; 15.01g de glicina; 20 % metanol) y la misma se realizó a 100 V durante una hora, en hielo.

Luego las membranas se incubaron con buffer de bloqueo TPBS (0,1 %Tween-20;PBS 1X) 5 % leche durante 2 hs a temperatura ambiente.

18.5- Ensayo inmunoquímico

Las membranas una vez bloqueadas se lavaron 3 veces (dos de 5 min y una de 10 min) con buffer TPBS (0,1 % Tween-20, PBS 1X) y posteriormente se incubaron 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo específico diluido 1:1000 en TPBS. Luego las membranas se lavaron nuevamente 3 veces (dos de 5 min y una de 10 min) con buffer TPBS y se incubaron con el anticuerpo secundario policlonal específico (anti-Igs de conejo; anti-Igs de cabra o anti-Igs de ratón según corresponda de Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA) conjugado con peroxidasa diluido 1:20000 en TPBS. El revelado se realizó con el kit de quimioluminiscencia ECL (Amersham Biosciences).

Anticuerpos utilizados: Anticuerpo policlonal de conejo anti-Bax; Anticuerpo policlonal anti- p38; anticuerpo policlonal anti-JNK; anticuerpo monoclonal de ratón anti-HA; anticuerpo policlonal anti-Erk1/2; anticuerpo policlonal de conejo anti-GR; anticuerpo policlonal de conejo anti-tubulina; anticuerpo policlonal de conejo anti-PCNA.

19- Ensayos de co-inmunoprecipitación

Aproximadamente 6×10^6 células Hek 293 en medio DMEM cultivadas en placas de 100 mm se lavaron con PBS 1X y luego se colectaron con 1 ml del buffer de co-inmunoprecipitación (10 ml de 1M HEPES pH7.5; 10 ml de 0.5 M EGTA pH 8.0; 4.32 g de 1M betaglicerofosfato; 5 ml de NP-40 ; 625 μ l de 2M $MgCl_2$) al cual se le agregaron los siguientes inhibidores 1 mM DTT y 1 mM PMSF. Luego se inmunoprecipitó la proteína deseada con el anticuerpo específico durante 2 hs a 4 °C. Las proteínas inmunoprecipitadas se recuperaron del resto de las proteínas del lisado celular mediante el uso de bolitas de sefarosa que se unen a inmunoglobulinas (Pharmacia). Estas bolitas se incubaron con los lisados durante 40 min a los cuales se los agitó por inversión cada 5 min. Finalmente las proteínas inmunoprecipitadas se lavaron 1 vez con PBS (el cual contiene 1 % de NP-40 y 2 mM de vanadato) y se resuspendieron en 40 μ l de este mismo buffer a los que se le agregó 10 μ l del buffer Laemli 5X (0.3125 M Tris pH 6.8; 10 % SDS; 25 % glicerol; 0,05 % Bromo Fenol Blue; 10 % β -mercaptoetanol). Por último las muestras se incubaron durante 5 min a 95 °C y se sembraron en un gel de poliacrilamida 12 %. Luego se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se realizó el ensayo inmunoquímico (ambos protocolos explicados dentro del apartado Ensayos de Western Blot)

20- Análisis inmunohistoquímico

Para realizar los ensayos de inmunofluorescencia se utilizó el protocolo descrito en Misteli y Spector (1999). Los anticuerpos utilizados fueron contra la proteína p38 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA) y los anticuerpos secundarios acoplados a Cy3 y/o Cy5.

Las imágenes de microscopía confocal fueron obtenidas usando un microscopio Zeiss Axiovert LSM 510 y Olympus FV 300.

21- Ensayos de cambio de la movilidad electroforética (EMSA)

21.1- Preparación de los extractos proteicos nucleares

La preparación de extractos proteicos nucleares se realizó según el protocolo descrito por Trapp et al., 1994. Brevemente lo que se hizo fue lo siguiente: Células L-929 fueron estimuladas 40 min con los diferentes estímulos, lavadas dos veces con PBS 1X y

levantadas de la placa utilizando un *rubber* y el buffer TNE frío (Tris-HCl pH 7,5 10 mM; EDTA 1 mM; NaCl 150 mM) con inhibidores de proteasas. Se centrifugó 5 min a 1500 rpm a 4 °C y el pellet se resuspendió en 200 µl de TNE y se incubó con 800 µl de la solución A (10 mM Hepes pH 7,9; 1,5 mM MgCl₂ y 10 mM KCl) en presencia del cocktail de inhibidores de proteasas durante 10 min en hielo. Luego se agregó 50 µl de NP-40 10 % y se incubaron las muestras por 2 min. Las células se centrifugaron 5 min a 1500 rpm a 4 °C. El pellet se lavó con 1 ml de solución A y luego se resuspendió en 80 µl de la solución B (10 mM Hepes pH 7,9; 1,5 mM MgCl₂; 0,2 mM EDTA; 20 % glicerol y 0,42 M KCl) en presencia del cocktail de inhibidores de proteasas. Luego de una incubación con agitación de 15 min a 4 °C las células se centrifugaron a 12.000 rpm 15 min a 4 °C.

Finalmente se recuperó el sobrenadante el cual se alicuotó y guardó a -80 °C.

20.2- Marcación del oligonucleótido doble cadena

El oligonucleótido doble cadena utilizado en los ensayos de EMSA corresponde al sitio de unión del receptor de glucocorticoides (GRE) (5'AGCTTCGTAGCTAGAACATCATGTTCTGG 3') (Trapp et al., 1994).

Para la marcación se preparó una mezcla de 50 ng de oligonucleótido doble cadena con 50 µCi de [³²P]-γ-ATP; 1 µl de enzima T₄PNK (Promega); 2 µl de buffer T₄PNK 10X y H₂O destilada c.s.p. 20 µl. Luego se incubó 1h a 37 °C.

20.3- Purificación del oligonucleótido doble cadena marcado

En un gel de poliacrilamida nativo 20 %* se sembró el oligonucleótido marcado con 15 µl de glicerol. La corrida electroforética se realizó a 200 V por 3 hs. Luego se colocó una placa radiográfica sobre el gel y se determinó la posición del oligonucleótido doble cadena y se recortó el gel en dicha posición. El fragmento del gel se incubó en buffer de elución (0,5 M acetato de amonio; 10 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA y 0,1 % SDS) 18 hs a 37 °C. Posteriormente el oligonucleótido marcado se precipitó con etanol 100 % durante 1 h. a -70 °C y se centrifugo a 12.000 rpm por 30 min a 4 °C. Por último luego de un lavado con etanol 80 % el pellet se dejó secar y se resuspendió en agua a una concentración final de 1 ng/µl.

* Gel de poliacrilamida nativo 20 %: 12,7 ml de agua destilada; 20 ml de buffer TBE 5X (89 mM Tris-Base; 89 mM ácido bórico; 2 mM EDTA); 66 ml de acrilamida 30%/bisacrilamida 0,8 %; 35 µl de TEMED; 700 µl de persulfato de amonio 10 %

20.4- Ensayo EMSA

El extracto proteico nuclear (4 µg de proteína) se llevó a un volumen final de 10 µl con solución C (10 mM Hepes pH 7,9; 0,25 mM EDTA; 20 % glicerol; 60 mM KCl; 0,125 mM EGTA) con inhibidores de proteasas. Luego se incubó con 200 ng de poly dI-dC (Sigma), 1 ng de oligonucleótido marcado y agua destilada c.s.p. 20 µl, durante 20 min a temperatura ambiente. Luego la mezcla se sembró en un gel de poliacrilamida al 5 %* y la corrida electroforética se realizó a 150 V por 2,5 hs. Luego el gel se secó 1 h. a 80 °C y finalmente se lo expuso a una placa radiográfica durante 1 día a -80 °C.

Gel de poliacrilamida al 5 %: 38,83 ml de agua destilada; 2,5 ml TAE 5X; 8,3 ml de acrilamida 30 %/ bisacrilamida 0,8 %; TEMED 17,5 µl; 400 µl de persulfato de amonio.

20.5- Ensayos de super shift

Para realizar los ensayos de super shift, los extractos proteicos nucleares, 4 µg de cada uno, se pre-incubaron durante 1 h. a temperatura ambiente y luego se incubaron con 200 ng de poly dI-dC (Sigma), 1 ng de oligonucleótido marcado y agua destilada c.s.p. 20 µl, durante 20 min a temperatura ambiente. Finalmente las mezclas fueron sembradas y corridas igual que en el ensayo de EMSA.

RESULTADOS

1. El estrés osmótico sensibiliza a la apoptosis inducida por TNF- α en células HeLa.

Si bien hay ciertos tipos celulares, tales como los fibroblastos de ratón L-929, que son naturalmente sensibles a la muerte por TNF- α , en la mayoría de los tipos celulares el TNF- α induce apoptosis sólo si las células son previamente sensibilizadas a esta acción biológica por medio de antibióticos inhibidores de la síntesis proteica que actúan tanto a nivel traduccional como transcripcional, tales como la cicloheximida o la actinomicina D respectivamente (Figura 8). En base a estas observaciones se ha postulado la existencia de genes anti-apoptóticos inducidos por TNF- α . De acuerdo a esto, la citoquina dispararía una doble señal sobre su célula blanco: por un lado una cascada que lleva a la muerte celular y por otro, la inducción de un mecanismo protector. El predominio de uno u otro estímulo, así como qué determina el destino final de la célula aún no ha sido del todo esclarecido y dependería del estado de activación de otras vías, del entorno en que se encuentra la célula y del tipo celular. Se sabe que la activación de caspasas llevaría a la muerte, mientras que la activación del factor de transcripción NF- κ B, y la posterior inducción de sus genes blanco tendría un rol protector.

En cuanto a las MAPKs existen reportes que les adjudican tanto un rol protector como uno inductor de la apoptosis dependiendo de que MAPKs se están activando y del contexto celular (Xia et al., 1995).

Con el objetivo de analizar si otras vías no relacionadas con la inhibición de la síntesis *de novo* de proteínas o la inhibición del factor NF- κ B, podían estar involucradas en la apoptosis inducida por TNF- α , investigamos el rol que podría tener el estrés osmótico en este proceso.

Existen evidencias que muestran que los antibióticos utilizados para sensibilizar a las células a la muerte por TNF- α (cicloheximida y anisomicina) además de poseer un efecto inhibitorio bien conocido también inducen en la célula otros cambios bioquímicos, no muy bien descriptos, que llevan a la inducción y al incremento en la actividad de SAPKs (proteínas quinasas activadas por estrés) una subfamilia de las MAPK, (Zhen-gang et al., 1996) esto nos llevo a especular que, además del efecto conocido sobre el arresto de la síntesis protéica, los antibióticos podrían sensibilizar a las células por activación de SAPKs.

El tratamiento solo de NaCl no tiene ningún efecto en la sobrevivencia de las células mientras que si es capaz de sensibilizar a las células HeLa a la muerte inducida por TNF- α en forma dosis dependiente tal como lo hace la cicloheximida (Figura 8).

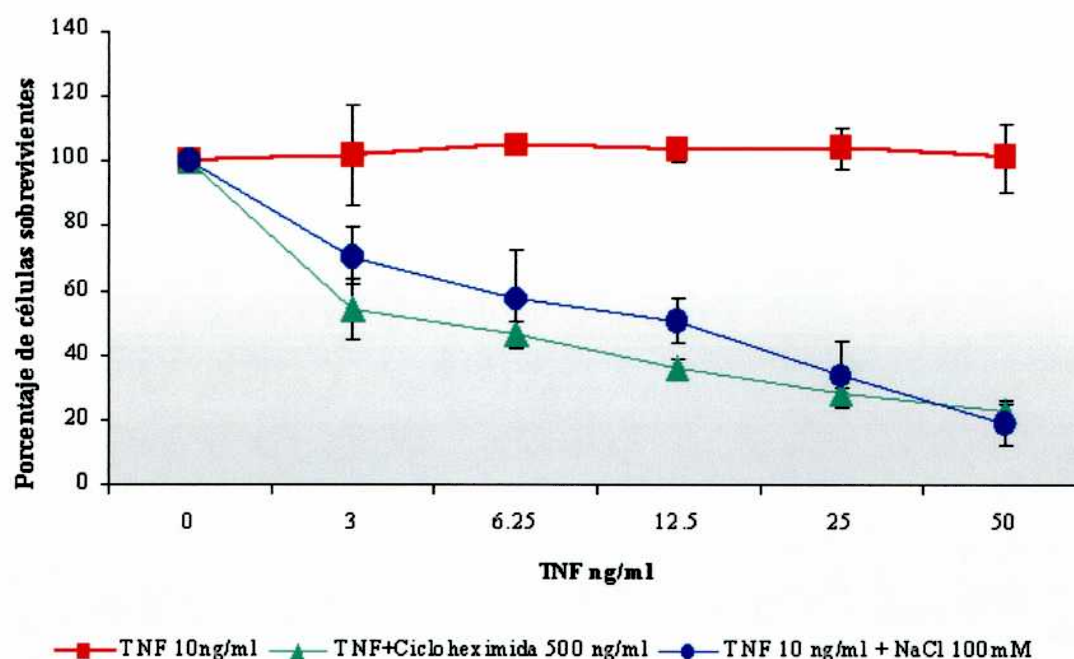


Figura 8. Sensibilización de células HeLa a la muerte inducida por TNF- α Células HeLa fueron estimuladas con TNF- α solo o en presencia de 0.5 μ g/ml de cicloheximida, o 100 mM de NaCl durante 18 hs. Luego se tiñó con cristal violeta y las células sobrevivientes se midieron a una Abs. de 570 nm.

El TNF- α puede inducir muerte celular a través de dos mecanismos distintos como son la necrosis y apoptosis dependiendo del tipo celular. Estos dos modos de muerte celular pueden distinguirse por alteraciones de varios parámetros en células apoptóticas que incluyen, la fragmentación del ADN, la integridad de las membranas y la reorientación de fosfatidilserina hacia la cara externa de la membrana celular, (Kerr et al., 1972 y Pedob et al., 1992). Por lo tanto se procedió a analizar algunas de estas características celulares en nuestro modelo.

En primer lugar se evaluaron los niveles de apoptosis a través de la técnica de determinación del contenido de ADN subdiploide por incorporación de yoduro de propidio y posterior análisis por citometría de flujo. Para ello se estimularon células HeLa con TNF- α ; NaCl o ambos. En la figura 9 se puede observar que a las 18 hs de cultivo el tratamiento con TNF- α o NaCl no inducen un incremento en el porcentaje de núcleos subdiploides o células apoptóticas con respecto a las células no tratadas, mientras que el tratamiento simultáneo produjo un aumento de más del 25 % de núcleos subdiploides con respecto a las condiciones basales.

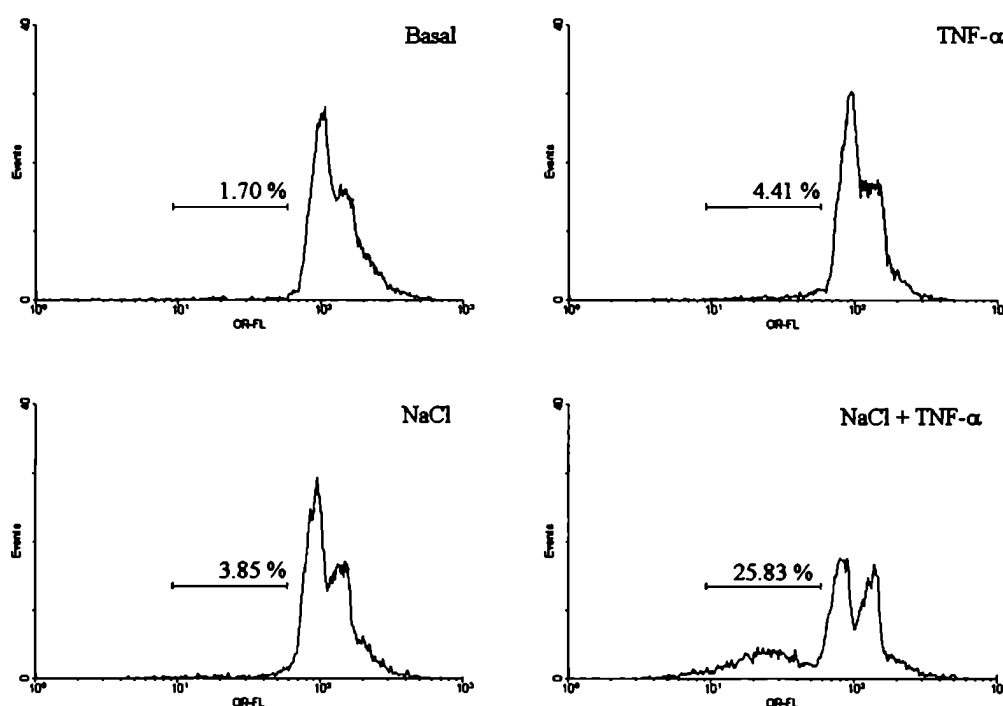


Figura 9. El NaCl sensibiliza a la apoptosis inducida por TNF- α en células HeLa. Núcleos hipodiploides se observaron en células HeLa tratadas con 10 ng/ml TNF- α y 100 mM NaCl, pero no en células estimuladas solo con NaCl o TNF- α . Luego de 12 hs de tratamiento las células fueron levantadas y los núcleos teñidos con yoduro de propidio y analizados por citometría de flujo. La marca en los histogramas indica el porcentaje de células apoptóticas.

Otra forma de evaluar la calidad del ADN de células apoptóticas es mediante el análisis de la fragmentación internucleosomal de ADN por incorporación de bromuro de etidio y posterior corrida en gel de agarosa. En la figura 10 se muestra que células HeLa tratadas con TNF- α y NaCl durante 18 hs presentan el patrón de fragmentación de ADN internucleosomal típico de células apoptóticas mientras que

las células tratadas solo con TNF- α ó solo con NaCl presentan un patrón igual que las células sin tratar es decir su ADN no está fragmentado.

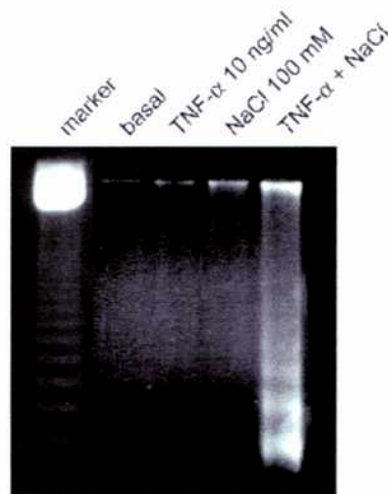


Figura 10. Fragmentación del ADN inducido por el tratamiento simultáneo de NaCl y TNF- α . Células HeLa fueron estimuladas con 10 ng/ml de TNF- α , 100 mM de NaCl o ambos simultáneamente durante 14 hs. Luego se extrajo el ADN y se lo corrió en un gel de agarosa 1,5 % teñido con bromuro de etidio.

En segundo lugar y teniendo en cuenta que la pérdida de integridad de membrana plasmática es una característica morfológica que distingue a la muerte celular por necrosis de la apoptosis se decidió evaluar la morfología de las células HeLa tratadas con TNF- α ; NaCl o ambos simultáneamente mediante la tinción de las mismas con naranja de acridina el cual penetra en las células vivas y se intercala entre las bases del ADN confiriéndoles un color verde, y bromuro de etidio que sólo entra en las células muertas y tiñe la cromatina de un color naranja oscuro. La morfología de las células muertas y las sobrevivientes se observó con un microscopio de fluorescencia. En la figura 11 se puede observar que la integridad de las membranas de las células tratadas con ambos estímulos o cada uno por separado no se perdió. Asimismo vemos que con el tratamiento solo de TNF- α ó NaCl la mayoría de las células están vivas y por eso se las ve verdes, mientras que con el tratamiento conjunto de ambos estímulos la mayoría de las células están apoptóticas y por eso las vemos rojas

Estos datos sugieren que el estrés osmótico sensibiliza a células naturalmente resistentes a la muerte celular inducida por TNF- α a través de un mecanismo apoptótico.

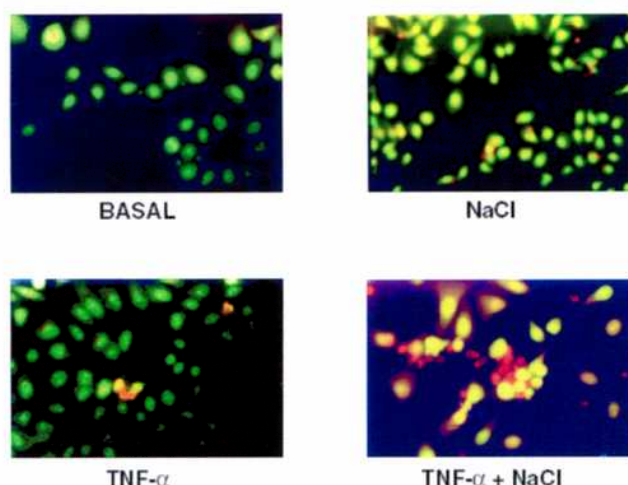


Figura 11. Análisis morfológico de células sensibilizadas con NaCl a la apoptosis inducida por TNF- α . Células HeLa fueron estimuladas con 10 ng/ml de TNF- α ; 100 mM de NaCl o ambos simultáneamente durante 18 hs. Luego las células se tiñeron con bromuro de etidio y naranja de acridina. Las células apoptóticas (células teñidas de rojo) muestran condensación respecto de las células viables teñidas de verde

2. Expresión de proteínas de la familia de Bcl-2 en células HeLa

La familia de proteínas Bcl-2 está compuesta tanto de proteínas pro-apoptóticas como anti-apoptóticas. Su expresión y consiguiente asociación regula la apoptosis en muchos tipos celulares. Es por eso, que la alteración específica de la expresión de uno de sus miembros puede modificar la sensibilidad de las células a la inducción de apoptosis.

Se sabe también que en algunos modelos donde TNF- α induce apoptosis, sin necesidad de sensibilizar previamente, lo hace a través de la activación de caspasa 8 (Monney et al., 1998)) y que en estos modelos Bcl-2 tiene un pobre papel protector. En contraste, suficientes evidencias apoyan un rol protector de Bcl-2 en los modelos de apoptosis que involucran la activación de caspasa 9 por productos mitocondriales, como por ejemplo la liberación del citocromo c (Gross et al., 1999).

Teniendo en cuenta estos antecedentes es que se decidió evaluar la expresión de dos miembros de esta familia: Bcl-2 y Bax en nuestro modelo de apoptosis. Células HeLa se estimularon con TNF- α ; NaCl y la combinación de ambos estímulos durante 18 hs. Luego las células fueron fijadas, permeabilizadas e incubadas con un anticuerpo policlonal anti-Bcl-2 y marcadas con un segundo anticuerpo acoplado a un fluoróforo en nuestro caso FITC. La intensidad de fluorescencia se analizó por citometría de flujo. Como se puede observar en la figura 12 A, la expresión de la proteína Bcl-2 se encuentra significativamente inhibida por el tratamiento simultáneo

con TNF- α y NaCl, mientras que las mismas dosis por separado de NaCl o TNF- α no tienen ningún efecto en la expresión de dicha proteína.

Conjuntamente se evaluó la expresión de la proteína pro-apoptótica Bax por la técnica de Western Blot con un anticuerpo policlonal anti-Bax en células HeLa tratadas de la misma forma durante 12 hs. La figura 12 B muestra que el nivel de expresión de dicha proteína no se encuentra afectado en ninguno de los tratamientos. **Estos resultados están indicando que la relación de Bcl-2/Bax se ve afectada y estarían apoyando entonces un rol protector de Bcl-2 en nuestro modelo y la posible participación de la vía mitocondrial en la apoptosis inducida por NaCl y TNF- α .**

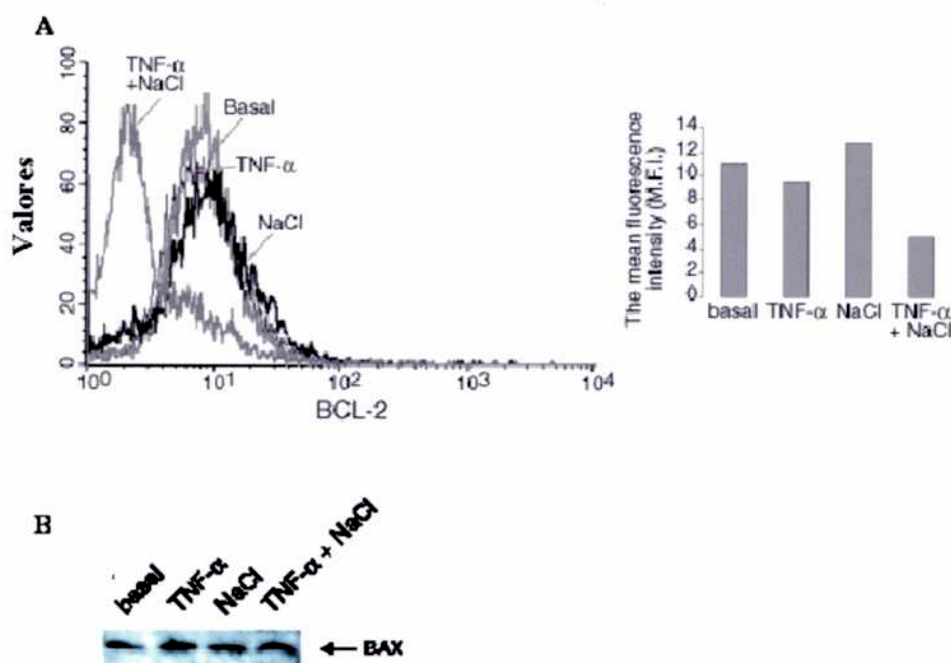


Figura 12. Análisis de la expresión de genes pro- y anti-apoptóticos. (A) Células HeLa fueron estimuladas con 10 ng/ml de TNF- α , 100 mM NaCl o ambos durante 18 hs. Luego las células fueron permeabilizadas, e incubadas con un anticuerpo anti-Bcl-2 (Santa Cruz) y marcadas con un anticuerpo anti-ratón IgG-FITC. Las células fueron analizadas por citometría de flujo. (B) Células HeLa fueron estimuladas con 10 ng/ml de TNF- α , 100 mM de NaCl o ambos durante 6 hs. La proteína Bax fue detectada mediante la técnica de Western blot utilizando el anticuerpo específico (Santa Cruz).

4. Activación de varias MAPK

Como mencionamos en la introducción hay numerosas evidencias que indican la participación de las MAPK en el control del ciclo celular y la supervivencia celular. Por otro lado también como se mencionó anteriormente sabemos que tanto el estrés, en particular la cicloheximida y NaCl, como el agregado de TNF- α activan a las SAPKs. Teniendo en cuenta estas evidencias se quiso determinar si el tratamiento simultáneo de células HeLa con NaCl y TNF- α podía activar diferencialmente distintas MAPKs y si esto podía estar relacionado con la inducción de apoptosis.

Para tal fin se analizó la actividad de p38, JNK y Erk-6 quinasa de lisados de células HeLa estimuladas con TNF- α ; NaCl o ambos durante 20 min. En la figura 13 podemos ver que el tratamiento con NaCl y TNF- α , ambos en dosis cuya combinación induce apoptosis, provoca un aumento de la actividad de las 3 MAPK analizadas si comparamos con cada estímulo por separado. Por otro lado podemos ver también que el tratamiento solo con NaCl produce un aumento de la actividad de cada una de las proteínas quinasas analizadas. Por último vemos que el TNF- α incrementa la actividad de p38 y JNK como se sabía previamente pero también aumenta la actividad de Erk-6, dato por primera vez visto en este estudio.

Para descartar que este aumento en la actividad de cada una de las proteínas quinasas se debiera a un aumento en la expresión de dichas proteínas se analizó la expresión de p38, JNK y Erk6 utilizando anticuerpos policlonales específicos para cada una de las proteínas mediante la técnica de Western blot utilizando los mismos lisados en los que se determinó la actividad de las quinasas. Como se puede observar en el panel mas bajo de la figura 13 la expresión de cada una de las proteínas quinasas es igual en todos los tratamientos.

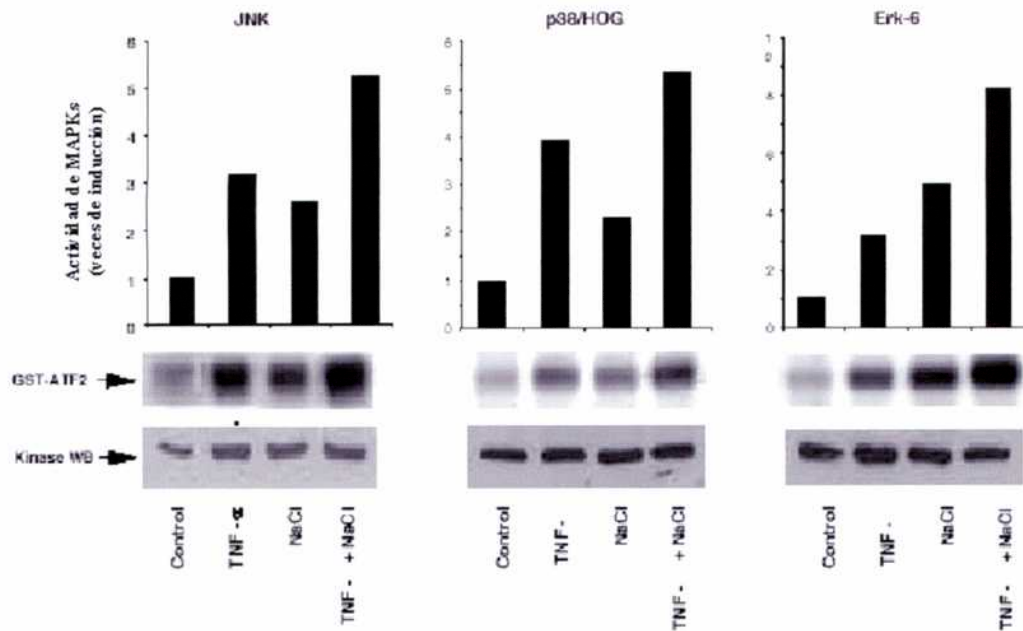


Figura 13. Activación de SAPKs en células HeLa. Células HeLa fueron estimuladas con 10 ng/ml de TNF- α , 100 mM de NaCl o ambos durante 20 min. Luego las células fueron cosechadas y las proteínas quinasas endógenas fueron inmunoprecipitadas con el anticuerpo específico para JNK o p38. En el caso de Erk6, las células fueron transfectadas con un plásmido que contiene el ADN copia correspondiente y que expresa a la proteína como una proteína de fusión con el epítopo HA. La actividad se cuantificó y se expresó como veces de inducción con respecto a los controles no estimulados. Los paneles del medio muestran las bandas correspondientes al sustrato fosforilado de un experimento representativo. Los paneles de más abajo representan Western blots que muestran la proteína quinasa total presente en el ensayo. Resultados similares se obtuvieron en tres experimentos independientes.

4. Activación del factor de transcripción NF- κ B

Existen numerosas evidencias que muestran que el estrés osmótico activa cascadas de señales que conducen a la activación del factor de transcripción NF- κ B (Raingeaud et al., 1995; Verma et al., 1995). Por otro lado hay numerosos trabajos que muestran el rol protector que tiene NF- κ B en distintos modelos de apoptosis (Beg et al., 1995; Van Antwerp et al., 1996; Liu et al., 1996; Mayo et al., 1997). En base a estos antecedentes es que se analizó el rol de este factor en nuestro modelo. Para ello células HeLa fueron transfectadas transientemente con un plásmido reportero de la actividad de este factor: el gen de la luciferasa bajo el control de un promotor con elementos de unión κ B (κ B-Luc) utilizando el método de transfecciones con liposomas catiónicos como se indica en Materiales y Métodos. Luego las células fueron estimuladas con TNF- α ; NaCl y ambos estímulos juntos durante 12 hs, tiempo en el que se detectó la muerte celular por citometría de flujo y microscopía. La transactivación se midió también a las 6 hs post estimulación cuando las células todavía se veían viables. Los niveles de activación del factor de transcripción se

determinaron a través de la cuantificación de las unidades relativas de luciferasa (U.R.L). En la figura 14 A se puede observar que a las 12 hs post-estímulo tanto el NaCl como el TNF- α por separado inducen la actividad de NF- κ B con respecto al tratamiento basal a pesar de que ambos por separado no disparan señales apoptóticas como se mostró previamente en las figuras 8, 9, 10 y 11. Asimismo el estímulo conjunto de TNF- α y NaCl, el cual constituye una señal apoptótica, incrementa significativamente la actividad de este factor pero no de una manera sinérgica.

Sin embargo cuando se midió la activación del factor de transcripción a las 6 hs el patrón de activación fue totalmente distinto al observado a las 12 hs. Como se observa en la figura 14 B, el estímulo de TNF- α produjo un aumento significativo de la transactivación, pero sorprendentemente el tratamiento con NaCl tuvo un bajo efecto estimulatorio con respecto al tratamiento basal. Por otro lado se ve que el tratamiento simultáneo con ambos estímulos produjo una inhibición de la actividad transcripcional con respecto a la observada con el tratamiento de TNF- α solo.

Estos resultados muestran que si bien ambos estímulos en conjunto producen un aumento de la actividad del factor de transcripción NF- κ B, lo hacen en una etapa tardía y con distintas cinéticas de activación. Asimismo muestran que el estrés osmótico en etapas tempranas probablemente dispare señales que conducen a una inhibición de la actividad del factor NF- κ B, esto es compatible con el rol protector para NF- κ B y con la sensibilización que produce NaCl para el disparo de apoptosis .

Asimismo sugiere que el estrés osmótico tanto como el TNF- α y ambos simultáneamente utilizarían diferentes vías que conducen a la activación del factor de transcripción NF- κ B

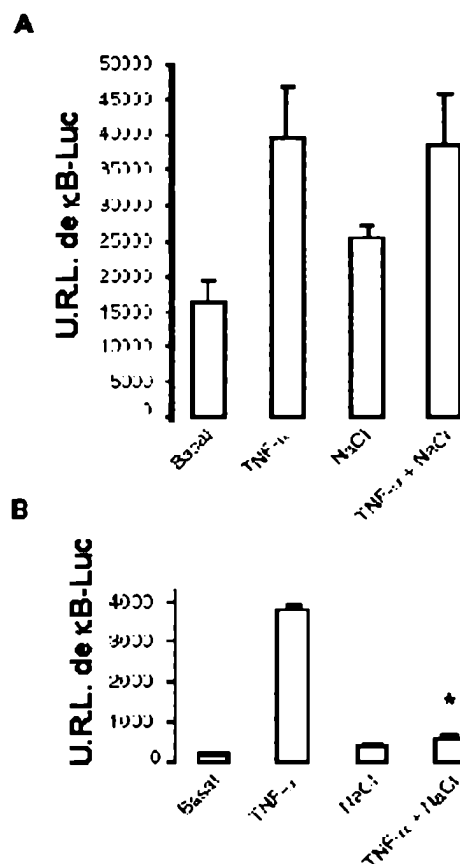


Figura 14. Activación diferencial de NF- κ B en el modelo de sensibilización por estrés osmótico a la apoptosis inducida por TNF- α . (A) Células HeLa fueron transfectadas con 0.5 μ g del plásmido reportero κ B-Luc, 0.5 μ g de RSV- β -Gal y 2 μ g de vector vacío. 24 horas post-transfección las células fueron estimuladas durante 12 hs con 10 ng/ml de TNF- α , 100 mM de NaCl o ambos simultáneamente según se indica en la figura. Las unidades relativas de luciferasa (U.R.L) fueron relativizadas con los correspondientes valores de β -galactosidasa. (B) Se procedió igual que en (A) pero las células fueron estimuladas durante 6 hs.

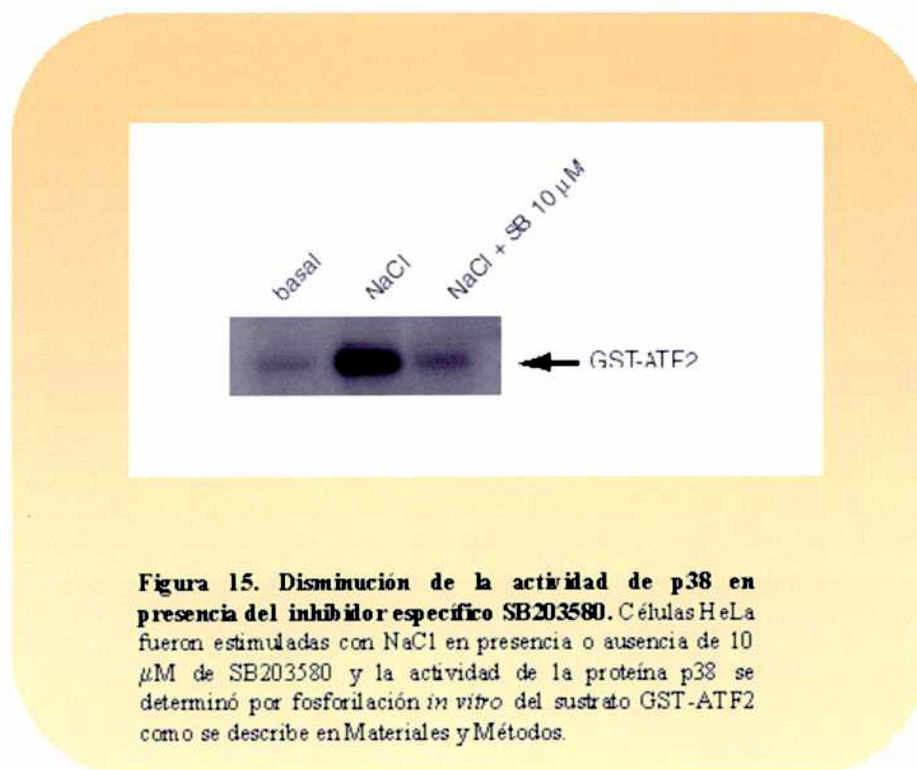
5. Rol de p38 en la activación del factor de transcripción NF- κ B

Hay evidencias que muestran que distintos estímulos de estrés son capaces de activar al factor de transcripción NF- κ B, y que varias proteínas quinasas incluida la quinasa p38 estarían involucradas en el control de su actividad. Por otro lado también hay numerosos reportes que muestran que la actividad de p38 quinasa es requerida para la activación de NF- κ B inducida por TNF- α (Bergher et al., 1998).

Teniendo en cuenta estos datos previos se quiso evaluar el rol de p38 en el modelo. Para ello se utilizó un inhibidor farmacológico específico de p38 como es el SB203580 el cual inhibe su actividad quinasa. La figura 15 muestra un ensayo de quinasas en donde se inmunoprecipitó específicamente p38 de lisados de células HeLa tratadas con NaCl y una dosis específica del inhibidor. Como podemos ver la

actividad de esta quinasa es menor en los lisados de células tratadas conjuntamente con NaCl y el inhibidor con respecto a la actividad detectada en los lisados estimulados sólo con NaCl.

De aquí en mas esta dosis es la que se utilizará en los experimentos



Una vez establecida la concentración a la cual el SB203580 inhibe la actividad de la p38 quinasa evaluamos su participación en la activación transcripcional de NF- κ B en células HeLa transfectadas con el plásmido κ b-Luc y estimuladas con los distintos tratamientos tanto a 12 hs como a 6 hs. La figura 16 A y B muestra que esta dosis de SB203580 disminuye la actividad transcripcional de NF- κ B cuando las células son estimuladas con cada uno de los tratamientos tanto a tiempos cortos como largos. **Es decir la p38 quinasa juega un rol importante en la regulación de la actividad transcripcional de NF- κ B independientemente del tipo de estímulo.**

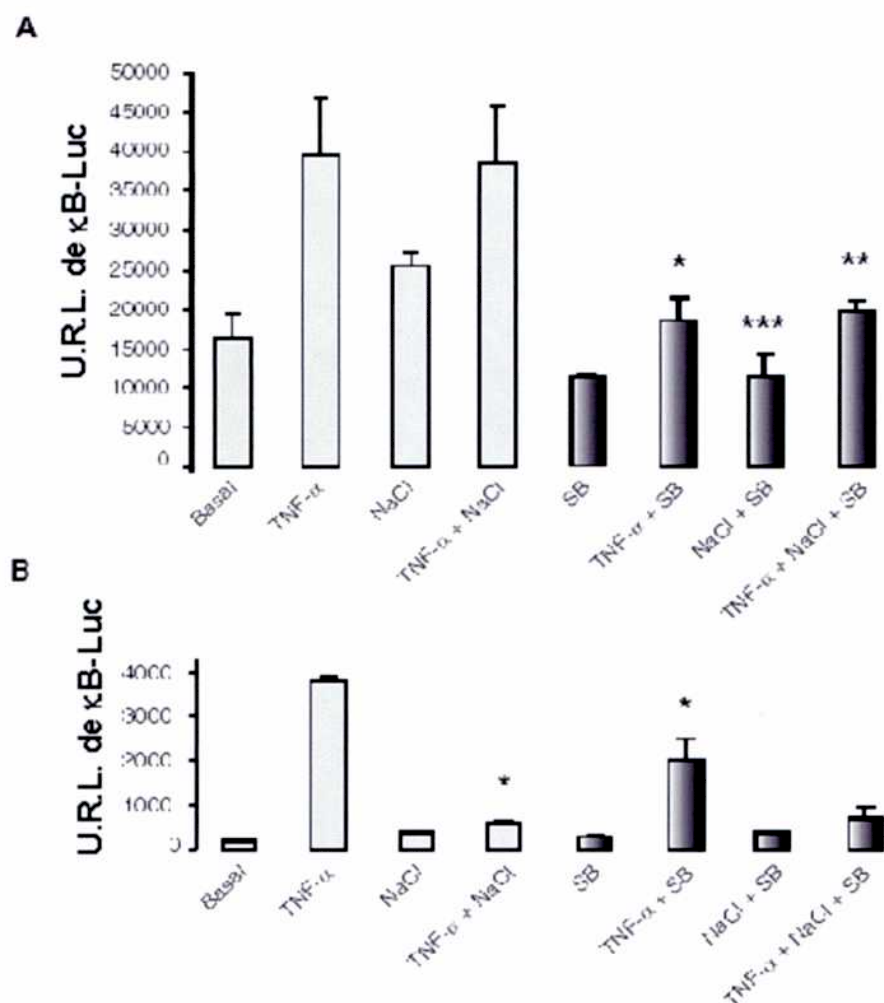


Figura 16. Rol de p38 en la actividad transcripcional de NF- κ B. (A) Células HeLa fueron transfectadas con 0.5 μ g del plásmido reportero κ B-Luc, 0.5 μ g de RSV- β -Gal y 2 μ g de vector vacío y luego fueron estimuladas durante 12 hs con 10 ng/ml de TNF- α , 100 mM de NaCl y 10 μ M SB203580 según se indica. Las unidades relativas de luciferasa (U.R.L) fueron relativizadas con los correspondientes valores de β -galactosidasa. (B) Se procedió igual que en (A) pero las células fueron estimuladas durante 6 hs. Para todas las condiciones se obtuvo un valor de $P < 0.05$ (ANOVA con el test de Fisher). *Respecto de TNF- α , **respecto de TNF- α + NaCl, *** respecto de NaCl.

6. Rol de NF- κ B en el modelo de apoptosis.

Para analizar eficientemente el rol del factor de transcripción NF- κ B en nuestro modelo de apoptosis tratamos de inhibir su actividad, para ello se utilizó sulfazalacina (SZ), el cual actúa como inhibidor de la IKK. Esta quinasa como se mencionó en la introducción fosforila específicamente al I κ B lo que induce su degradación por el proteasoma y permite la translocación de NF- κ B del citoplasma al núcleo.

Células HeLa fueron transfectadas con el plásmido reportero κ B-Luc y luego estimuladas como se muestra en la figura 17 durante 16 hs. Al cabo de este tiempo se analizó la actividad transcripcional de NF- κ B en presencia de distintas concentraciones de SZ. Como se puede observar todas las concentraciones de SZ disminuyen la actividad κ B-Luc inducida por TNF- α .

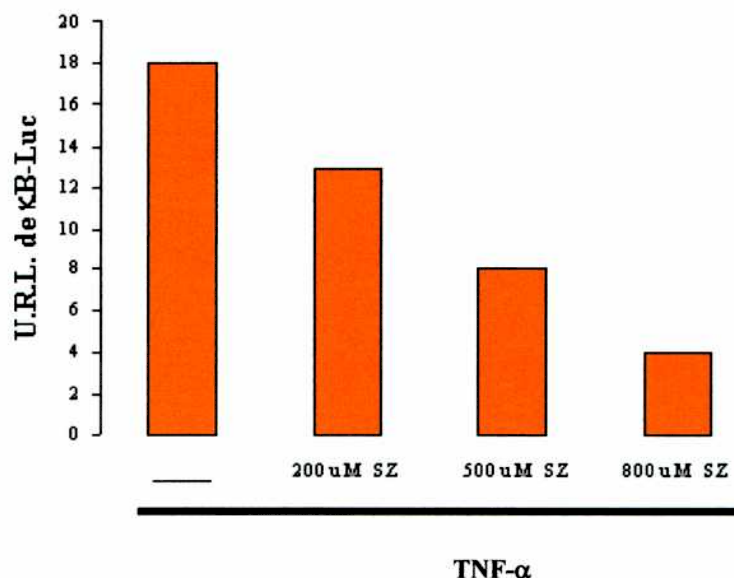


Figura 17. Curva dosis respuesta de sulfazalacina (SZ) sobre la actividad transcripcional de NF- κ B. Células HeLa fueron transfectadas con 0,5 μ g del plásmido κ B-Luc, 2,5 μ g de plásmido vacío. Un día después de la transfección las células se estimularon con 10 ng/ml de TNF- α en ausencia o presencia de distintas concentraciones de SZ (200 μ M SZ; 500 μ M SZ y 800 μ M SZ) durante 12 hs. Las unidades relativas de luciferasa (U.R.L.) se normalizaron con los correspondientes valores de la actividad β -galactosidasa. Resultados similares se obtuvieron en tres experimentos independientes.

En paralelo se midió el efecto citotóxico de la SZ (datos no mostrados). Se vio que la dosis de 200 μ M de SZ no tenía efectos citotóxicos *per se*.

Para continuar con el estudio se eligió la dosis de 200 μ M de SZ ya que como acabamos de ver inhibe la actividad del factor de transcripción NF- κ B en un 28 % y además no tiene efectos citotóxicos.

Procedimos entonces a evaluar el rol de NF- κ B en el modelo de sensibilización por NaCl a la apoptosis inducida por TNF- α . Células HeLa se estimularon con ambos estímulos (NaCl y TNF- α) en presencia o ausencia del inhibidor y los niveles de apoptosis se determinaron por tinción con yoduro de

propidio y posterior análisis por citómetro de flujo. La figura 18 muestra que la adición de SZ en una dosis que no tiene efectos basales aumenta la muerte celular inducida por el tratamiento simultáneo con NaCl y TNF- α respecto de cultivos tratados con los mismos estímulos pero sin el inhibidor. **Estos resultados muestran que NF- κ B es una señal protectora la cual se induce en condiciones apoptóticas como son la estimulación con NaCl y TNF- α pero que no es suficiente para prevenir la muerte celular.**

7. Rol de p38 en el modelo de apoptosis.

Como vimos previamente la inhibición de la actividad de p38 disminuye la transactivación de NF- κ B inducida por NaCl, TNF- α o ambos simultáneamente, es por eso que quisimos evaluar el rol de esta quinasa en el modelo de apoptosis. Células HeLa se estimularon conjuntamente con NaCl y TNF- α en presencia o ausencia de SB203580, y se evaluaron los niveles de apoptosis por citometría de flujo. La figura 18 muestra que la inhibición de la actividad de la p38 quinasa aumenta significativamente la muerte celular inducida por el tratamiento conjunto de NaCl y TNF- α .

Teniendo en cuenta que p38 activa a NF- κ B y que al inhibir a esta proteína quinasa hay un incremento de la muerte celular es que se quiso estudiar si el aumento de la muerte por inhibición de la proteína quinasa estaba dado por una inhibición de la actividad de NF- κ B. Células HeLa fueron transfectadas con un plásmido que expresa la proteína Rel A, una de las subunidades que forman el dímero NF- κ B, o un vector vacío como control y luego tratadas con los distintos estímulos como se indica en la figura 18. Podemos ver que la expresión de Rel A revierte totalmente la apoptosis inducida por la inhibición de NF- κ B dada por SZ en células tratadas con TNF- α y NaCl. Sin embargo sólo revierte parcialmente el incremento de la apoptosis inducida por la inhibición de p38 en células tratadas con TNF- α y NaCl.

Es decir que la proteína quinasa p38 sería una señal protectora. Sin embargo no podemos descartar otras vías adicionales anti-apoptóticas en donde p38 podría activar algunas cascadas de señales que no están ligadas a la activación de NF- κ B y que podrían actuar en paralelo a la activación de NF- κ B.

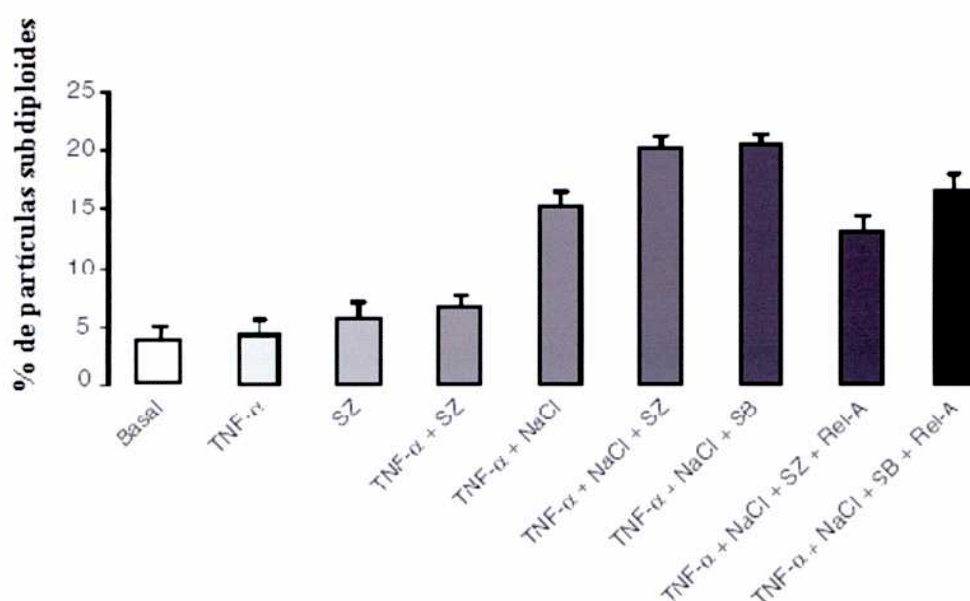


Figura 18. Efecto de la sulfazalacina (SZ) y el inhibidor de p38 SB203580 en la apoptosis inducida por TNF- α en células sensibilizadas con NaCl. Células HeLa se transfectaron con 2 μ g de plásmido CMV-RelA o 2 μ g de plásmido vacío y 0,5 μ g de plásmido RSV- β -Gal utilizando lipofectamina plus (GIBCO BRL) y luego de 48 hs post-transfección las células fueron estimuladas con 100 mM de NaCl; 10 ng/ml de TNF- α o ambos simultáneamente en presencia o ausencia de 10 μ M de SB203580 o 200 μ M de SZ tal como se indica en la figura. Después de 12 hs de tratamiento las células fueron levantadas, teñidas con yoduro de propidio y analizadas por citómetro de flujo. La eficiencia de transfección (70 %) fue determinada por tinción de las células con X-Gal. El diagrama de barras corresponde al promedio de triplicados de tres pocillos $\pm$ SD. Resultados similares se obtuvieron en tres experimentos independientes.

Los resultados de las figuras anteriores sólo son válidos si la concentración utilizada del plásmido que expresa la proteína Rel A induce efectivamente la actividad transcripcional de NF- κ B. Para probar esto se transfectaron células HeLa con este vector y se examinó la actividad del factor de transcripción utilizando un sistema reportero. La figura 19 muestra que esta dosis de Rel A claramente induce la activación de NF- κ B. Asimismo en esta figura podemos ver que el agregado de SZ en células que expresan constitutivamente Rel A no tiene efecto inhibitorio en la transactivación de NF- κ B y que el agregado de SB203580 inhibe significativamente la activación de este factor. Es decir que p38 activa al factor NF- κ B y esta activación no es totalmente dependiente de los niveles disponibles de Rel A.

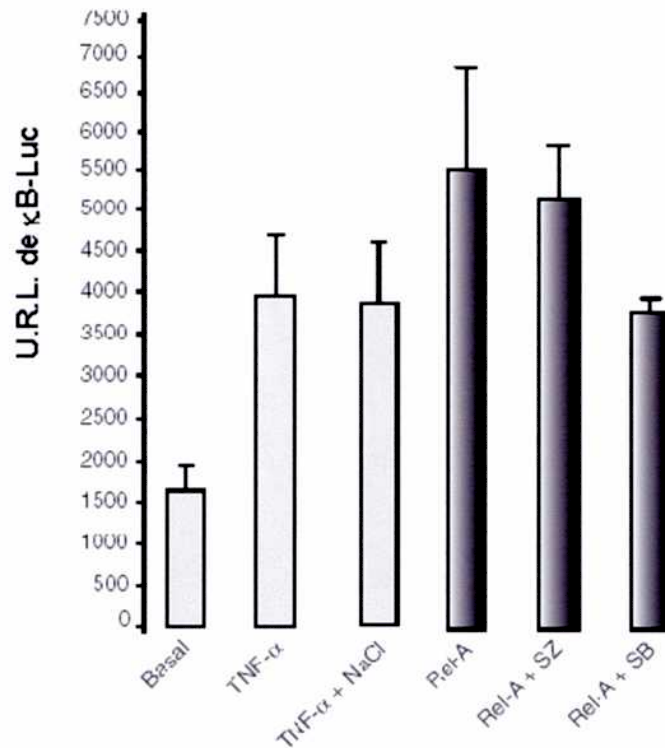


Figura 19. Efecto de RelA y SZ en la activación transcripcional de NF- κ B. Células HeLa fueron conjuntamente transfectadas con 0,5 μ g del plásmido reportero κ b-Luc, 2 μ g del plásmido CMV-RelA o plásmido vacío y 0,5 μ g del plásmido RSV- β -Gal para normalizar. Luego de 24 hs post transfección las células fueron estimuladas con 10 ng/ml de TNF- α , 100 mM de NaCl, 200 μ M de SZ y 10 μ M de SB203580 según se indica en la figura durante 14 hs. El diagrama de barras representa el promedio de tres pocillos con $\pm$ SD. Resultados similares se obtuvieron en tres experimentos independientes.

8. Rol de los glucocorticoides

Los glucocorticoides ejercen una variedad de efectos fisiológicos y estos efectos pueden ser opuestos dependiendo del tipo celular o del tipo de estímulo. Por ejemplo, los glucocorticoides promueven o protegen de la apoptosis en timocitos dependiendo del tipo de señal (Zacharchuk et al., 1990), mientras que en neutrófilos inducen apoptosis (Armant et al., 1995) y en neuronas tienen un efecto dual (McEwen, 1999).

Teniendo en cuenta estas evidencias es que se pretendió analizar el rol de los glucocorticoides en nuestro modelo de sensibilización por estrés osmótico a la apoptosis inducida por TNF- α en células HeLa. Para lo cual dichas células fueron incubadas con TNF- α y NaCl simultáneamente en presencia o ausencia de distintas concentraciones de Dexametasona (Dex) durante 14 hs y la apoptosis se evaluó por

tinción con ioduro de propidio y posterior análisis en citómetro de flujo. En la figura 20 se puede observar que los glucocorticoides en una dosis de 500 nM son capaces de revertir en un 44 %, la apoptosis inducida por TNF- α en células sensibilizadas por estrés osmótico.

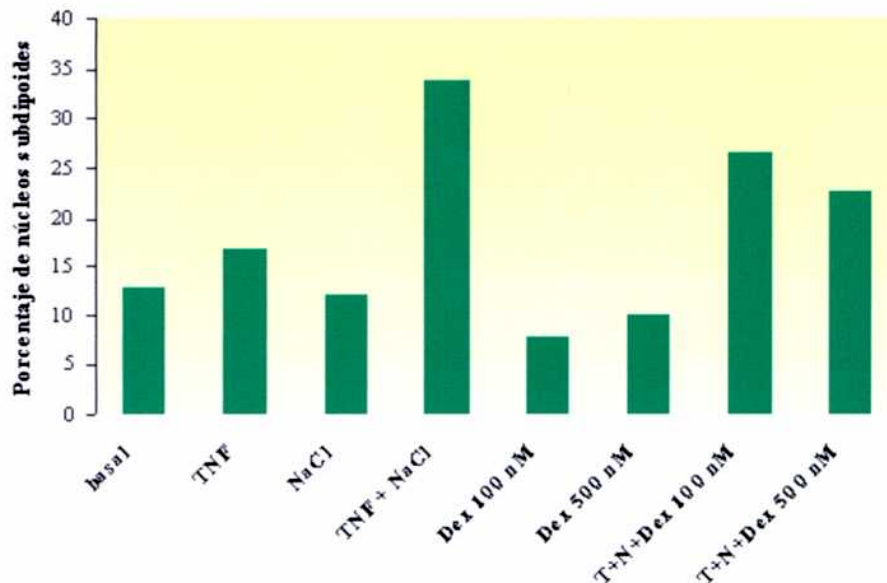


Figura 20. Efecto protector de los glucocorticoides a la apoptosis inducida por TNF- α y NaCl. Células HeLa fueron estimuladas durante 14 hs con 10 ng/ml de TNF- α ; 100 mM NaCl; 100 nM de Dex; 500 nM de Dex tal como se muestra en la figura. Luego las células fueron levantadas y teñidas con ioduro de propidio. El porcentaje de núcleos subdiploide se determinó por citometría de flujo. Resultados similares se obtuvieron en tres experimentos independientes

Como se explicó anteriormente los GC son capaces de atravesar la membrana plasmática y unirse a sus receptores que se encuentran en el citoplasma celular. Una vez activado el receptor de glucocorticoides (GR), es capaz de regular en forma negativa la actividad transcripcional de NF- κ B (Scheiman et al., 1995a; Auphan et al., 1995). Considerando que NF- κ B puede controlar la expresión de genes antiapoptóticos, resultó de particular interés determinar si el GR tenía algún efecto sobre la actividad de NF- κ B.

Para evaluar los efectos del GR sobre la actividad transcripcional del factor de transcripción NF- κ B, se realizaron transfecciones transientes de células HeLa con el gen reportero κ B-Luc. Se procedió entonces a la estimulación de las células con TNF- α , Dex y ambos simultáneamente y posteriormente se midieron los niveles de

actividad del factor de transcripción cuantificando las unidades relativas de luciferasa (U.R.L).

Como se muestra en la figura 21, el tratamiento solo con TNF- α promueve la actividad de NF- κ B, mientras que el tratamiento simultáneo de estas células con TNF- α y Dex inhibe significativamente la actividad transcripcional de NF- κ B en un 50 % para la dosis de Dex utilizada, demostrando que este esteroide es capaz de regular en forma negativa su actividad, como había sido descrito previamente.

Teniendo en cuenta que la dosis de Dex utilizada protege de la apoptosis inducida por TNF- α , estos datos sugieren entonces que los glucocorticoides protegen de la muerte inducida por esta citoquina a través de una cascada de señalización distinta que no involucra al factor NF- κ B.

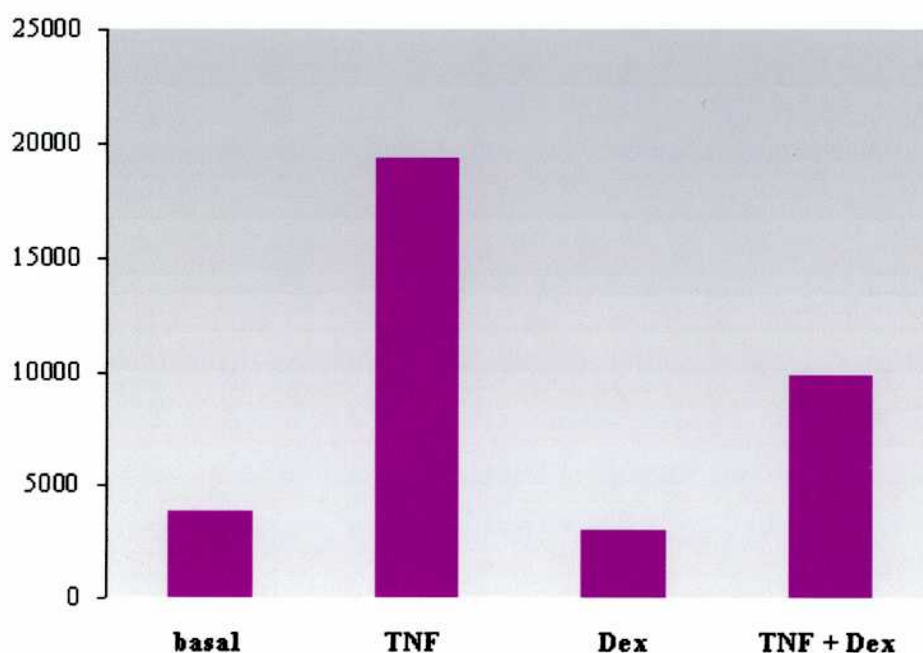


Figura 21. Efecto de los glucocorticoides en la activación de la transcripción mediada por κ B. Células HeLa fueron transfectadas con 500 ng del plásmido reportero κ B-Luc, 500 ng del plásmido RSV- β -GAL y 2 μ g del vector vacío pCMX. Luego de 24 horas post-transfección las células fueron estimuladas con 10 ng/ml de TNF- α , 500 nM de Dex o ambos durante 16 hs. Las barras representan las unidades relativas de luciferasa (U.R.L) que se normalizaron con los correspondientes valores de la actividad β -galactosidasa. Resultados similares se obtuvieron en tres experimentos independientes.

9. Fosforilación del receptor de glucocorticoides por MAPK *in vitro*

Existen evidencias en la literatura que muestran que dosis bajas de TNF- α aumentan la capacidad protectora de los glucocorticoides en células naturalmente sensibles a la apoptosis inducida por ésta misma citoquina (Costas et al., 1996) lo que abre la pregunta de si este fenómeno se debe a una activación diferencial de distintas proteínas quinasas.

Como ya se mencionó anteriormente los glucocorticoides ejercen sus efectos biológicos a través de la unión con su receptor el cual se encuentra soluble en el citoplasma y puede actuar como factor de transcripción dependiente de hormona.

Si bien la señal que induce la activación transcripcional del receptor de glucocorticoides (GR) es la unión a su ligando específico, la activación transcripcional también puede estar regulada tanto positiva como negativamente por fosforilación. Al igual que otras proteínas reguladoras de la transcripción, el GR es una proteína hiperfosforilada. El GR en su estado nativo, es decir cuando no está unido a su ligando se encuentra parcialmente fosforilado y al unirse con su ligando otros eventos de fosforilación ocurren principalmente en residuos de serina y treonina, ubicados en la región reguladora de la transcripción en el extremo amino terminal. Por otro lado existen evidencias que demuestran que *in vitro* el GR sería fosforilado por proteínas quinasas de la familia de las MAPK (Rogatsky et al., 1998).

Teniendo en cuenta esta información y habiendo desarrollado en el laboratorio las técnicas para medir la actividad de casi todos los miembros de la familia de MAPKs es que se decidió evaluar si el GR podía ser sustrato de distintas MAPKs en ensayos de fosforilación *in vitro*. Para ello lo que se hizo fue obtener la proteína recombinante GST-GR, la cual fue purificada y expresada en bacterias. Esta proteína contiene los residuos 106 al 318 del extremo amino del GR, ya que en esta secuencia se encuentran los cuatro principales sitios de fosforilación descritos. Para la obtención de esta proteína de fusión se transformaron bacterias con el plásmido recombinante las cuales luego se seleccionaron mediante la utilización del antibiótico adecuado. Posteriormente estas bacterias recombinantes se crecieron en un medio rico y se purificó la proteína deseada según se detalla en Materiales y Métodos.

La figura 22 muestra un gel de poliacrilamida desnaturalizante teñido con *coomasie blue* en donde se muestra la proteína GST-GR obtenida al finalizar el procedimiento de purificación.

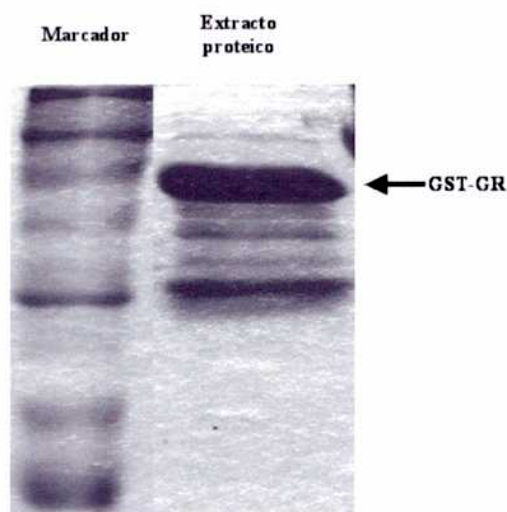


Figura 22. Purificación y expresión de la proteína de fusión GST-GR. Las proteínas purificadas según el protocolo que se detalla en Materiales y Métodos se corrieron en un gel de poliacrilamida 12 %. La corrida electroforética se llevó a cabo a 100 V en buffer de electroforesis. Por último para poder visualizar las proteínas los gels se tiñeron con Coomassie blue.

Una vez obtenido el sustrato se procedió a realizar los ensayos de fosforilación *in vitro*. Para ello se hambreadon células en un medio sin suero durante 2 hs. Al cabo de este tiempo las células se estimularon con los tratamientos indicados en la figura 23 durante 20 min para JNK, p38 y Erk6 y 5 min para Erk1/2 y Erk5. Luego las células se lisaron y se inmunoprecipitó específicamente una quinasa, ya sea endógena (para Erk2, JNK y p38) o como proteína de fusión unida a un epítipo específico (para Erk5 y Erk6), utilizando los anticuerpos adecuados para cada caso. La actividad de la quinasa inmunoprecipitada se determinó usando [32 P]- γ -ATP y GST-GR como sustrato. Las muestras luego se analizaron en un gel de poliacrilamida desnaturalizante el cual posteriormente se secó y se lo expuso a una placa autoradiográfica. La figura 23 muestra que las cinco MAPK mejor caracterizadas hasta el momento (Erk-2; JNK; p38; Erk-6 y Erk-5) son capaces de usar como sustrato a la proteína de fusión GR-GST *in vitro*. En ningún caso se vio fosforilación del GST vacío (datos no mostrados).

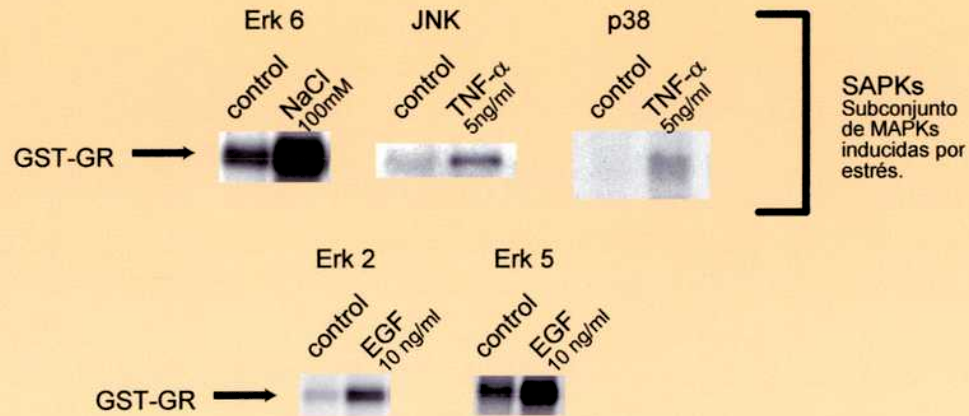


Figura 23. El GR es fosforilado *in vitro* por miembros de la familia de MAPKs. Células HeLa fueron incubadas en medio DMEM alta glucosa sin suero durante 2 hs y luego estimuladas según se indica durante 20 min para las proteínas p38, JNK, Erk6 y durante 5 min para las proteínas Erk2 y Erk5. La actividad de cada quinasa se determinó a través de ensayos de fosforilación *in vitro* utilizando [32 P]- γ -ATP y GST-GR como sustrato siguiendo el protocolo que se describió en Materiales y Métodos.

10. Activación diferencial de JNK y p38 por dosis no citotóxicas de TNF- α

Considerando que por un lado el GR resultó ser sustrato de fosforilación de distintas proteínas MAPKs y que por otro hay evidencias que muestran que dosis muy bajas de TNF- α (0.02 ng/ml) no citotóxicas pueden aumentar la actividad transcripcional del GR sin aumentar el *binding* a las secuencias de ADN (Costas et al., 1996) es que se quiso determinar si este efecto podía deberse a una activación diferencial de distintas proteínas quinasas las cuales a su vez podrían modular diferencialmente la actividad transcripcional del GR. Con este objetivo se realizaron ensayos para evaluar la actividad de las dos MAPK mejor caracterizadas en cuanto a su capacidad de activación por TNF- α que son p38 y JNK. Para ello células L-929 fueron hambreadas durante 2 hs y luego estimuladas con 0.02 ng/ml de TNF- α durante 20 min. Luego se colectaron los lisados y la actividad de cada una se evaluó de la misma forma que como se explicó anteriormente en la figura 23.

La figura 24 muestra que la activación de p38 con dosis bajas de TNF- α es mucho mayor que la activación de JNK con esta misma dosis. Lo contrario ocurre para dosis altas de TNF- α , en donde la activación de JNK se ve fuertemente incrementada con respecto a la activación de p38 (datos no mostrados).

A la luz de estos resultados resulta claro que mecanismos distintos están regulando la activación de las MAPKs JNK y p38 por TNF- α .

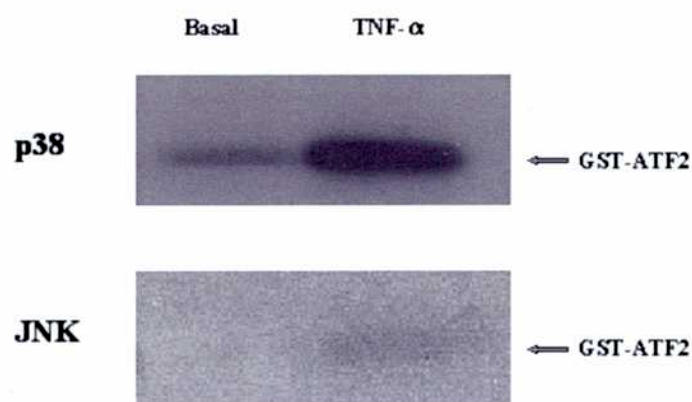


Figura 24. Dosis bajas de TNF- α activan diferencialmente a JNK y p38. Células L-929 fueron crecidas en medio sin suero durante 2 hs y luego estimuladas con 0.02 ng/ml de TNF- α durante 20 min. Al cabo de este tiempo las células fueron levantadas y las proteínas quinasas endógenas fueron inmunoprecipitadas con los anticuerpos específicos para JNK o p38. La fosforilación del sustrato GST-ATF2 se visualizó por autoradiografía. Resultados similares se obtuvieron en tres experimentos independientes.

11. Activación de p38 y JNK en el modelo de apoptosis inducida por TNF- α en células L-929

Teniendo en cuenta que como se reportó previamente los fibroblastos de ratón L-929 son naturalmente sensibles a la apoptosis inducida por TNF- α y hay evidencias que muestran que los glucocorticoides pueden inhibir este proceso (Costas et al., 1996) y que nuestros resultados muestran una activación diferencial de dos proteínas quinasas, p38 y JNK, en presencia de bajas dosis de TNF- α y que ambas MAPKs fosforilan al GR en ensayos realizados *in vitro* es que quisimos evaluar el rol de la interacción MAPKs-GR en el modelo de apoptosis inducido por TNF- α en fibroblastos de ratón L-929.

Por lo tanto se procedió a realizar ensayos de fosforilación *in vitro* inmunoprecipitando específicamente cada una de las quinasas endógenas y utilizando la proteína de fusión GST-GR como sustrato. Células L-929 fueron hambreadas durante dos horas en medio sin suero ni antibióticos y luego estimuladas con 10 ng/ml de TNF- α (dosis con la cual podemos inducir apoptosis en este modelo) 500 nM de Dex (dosis con la cual protegemos de la apoptosis inducida por TNF- α en este modelo) y la combinación de ambos durante 20 min. La figura 25 muestra que el TNF- α produce una activación de ambas quinasas, mientras que el tratamiento solo con Dex no produce aumento en la actividad de JNK pero sí de p38. El estímulo simultáneo de TNF- α y Dex produce un aumento de la actividad de ambas quinasas pero en el caso de JNK es de la misma magnitud que el producido por el estímulo de TNF- α , mientras que con p38 el aumento es mayor que cuando se estimula con TNF- α y Dex por separado

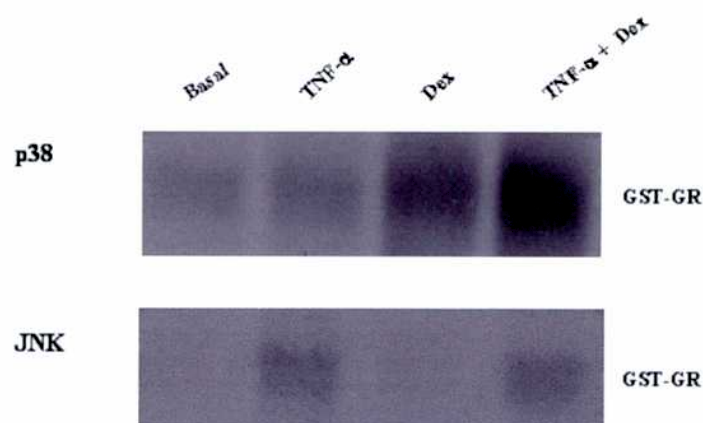


Figura 25. Activación diferencial de JNK y p38 en células L-929. Fibroblastos de ratón L-929 fueron crecidos en medio sin suero durante 2 horas. Luego las células fueron estimuladas con 10 ng/ml de TNF- α , 500 nM de Dex o ambos durante 20 min. Al cabo de este tiempo las células fueron cosechadas y las proteínas quinasas endógenas fueron inmunoprecipitadas con el anticuerpo específico para p38 o JNK (Santa Cruz). Los paneles muestran el sustrato GR fosforilado de un experimento representativo. Resultados similares se obtuvieron en tres experimentos independientes

12. Interacción *in vivo* del GR con miembros de la familia de MAPKs

Los ensayos mostrados anteriormente corresponden a interacciones del GR y MAPKs *in vitro*. Con el objeto de evaluar si el GR podía interactuar con algunos miembros de la familia de las MAPK *in vivo* se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación. Para ello se utilizaron extractos de células Hek 293 las cuales habían sido previamente transfectadas por el método de fosfato de calcio con plásmidos que expresan el ADN copia de MAPKs específicas fusionadas a un epítipo HA. Luego los lisados celulares se incubaron con el anticuerpo policlonal anti GR y fueron revelados con el anticuerpo monoclonal anti HA. En la figura 26 se puede observar la presencia de p38, JNK, Erk2 y Erk-6 en los inmunoprecipitados de GR respectivamente.

Estos datos muestran que estas proteínas quinasas interaccionan físicamente con el receptor de glucocorticoides *in vivo*.

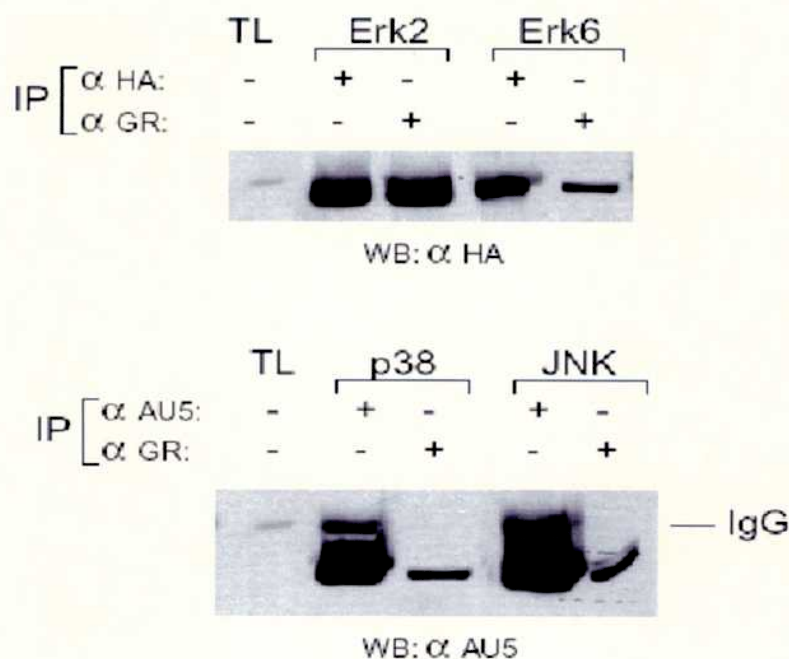


Figura 26. Asociación *in vivo* entre el GR y miembros de la familia de las MAPKs. Se realizaron ensayos de coimmunoprecipitación utilizando extractos proteicos de células Hek 293 las cuales fueron previamente transfectadas con 2 μ g de plásmido que expresa el ADN copia correspondiente a una MAPK como proteína de fusión con un epítipo (HA para Erk2 y Erk6; AU5 para p38 y JNK). Luego los extractos fueron inmunoprecipitados utilizando un anticuerpo policlonal anti GR (Santa Cruz) y revelados utilizando un anticuerpo específico que reconoce el epítipo correspondiente en las MAPKs.

Como se mencionó anteriormente el GR es una proteína soluble que se encuentra retenida en el citoplasma por la chaperona Hsp-90 (Cadepond et al., 1991). Luego de la unión a su ligando específico el GR es capaz de translocar al núcleo en donde puede activar la transcripción de sus genes blanco.

Se encuentran en la literatura trabajos que muestran que las MAPKs al ser activadas translocan del citoplasma al núcleo (Khokhlatchev et al., 1998; New et al., 2003; Hochbaum y Coso comunicación personal). Sin embargo, el descubrimiento de un número en aumento de sustratos citoplásmicos desafía esa teoría.

Con el objeto de evaluar si la p38 quinasa y el GR co-localizaban en citoplasma o núcleo y si su ubicación subcelular variaba de acuerdo a si están o no estimuladas es que se realizaron ensayos de inmunohistoquímica en fibroblastos de ratón L-929 transfectados con un plásmido que expresa el ADN copia de la proteína de fusión entre el GR y la proteína fluorescente verde (GFP-GR) conjuntamente con otro plásmido que expresa el ADN copia de la p38 fusionado a un epítopo HA. Mientras que la expresión de la primera se sigue por la fluorescencia verde, la p38 se detecta por inmunofluorescencia utilizando un primer anticuerpo anti HA hecho en ratón y un segundo anticuerpo anti ratón acoplado a un fluoróforo como Cy5. Dos días después de la transfección las células fueron estimuladas con TNF- α y Dex conjuntamente según se indica y la localización se visualizó a través de un microscopio confocal. La figura 27 muestra que en condiciones basales ambas proteínas co-localizan en el citoplasma, mientras que en condiciones estimuladoras ambas se encuentran en el núcleo. Este dato resultó interesante ya que si bien sabemos que el GR en presencia de Dex transloca del citoplasma al núcleo vemos que la p38 en presencia de un estímulo que sabemos que activa la proteína quinasa (Figura 23) se encuentra en proporción, mucho más en núcleo que en el citoplasma.

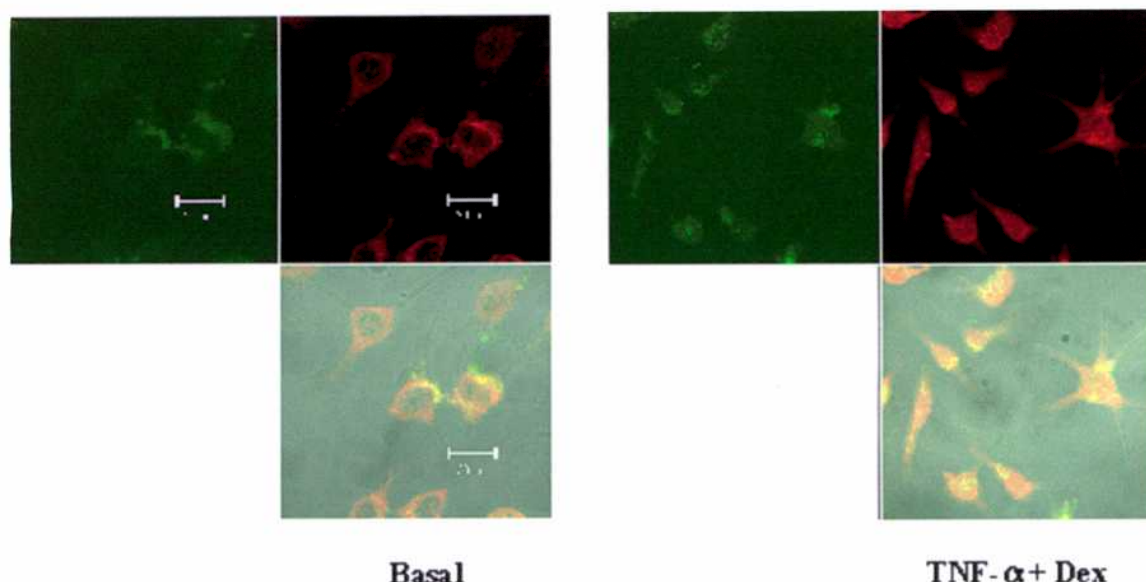


Figura 27. Localización subcelular del GR y p38. Células L-929 fueron conjuntamente transfectadas utilizando lipofectamina plus (GIBCO BRL) con 1 μ g de plásmido que expresa la proteína de fusión GFP-GR y 1 μ g de plásmido que expresa el ADN copia de p38 fusionado a un epítipo HA. 24 hs post transfección las células fueron estimuladas con 10 ng/ml de TNF- α durante 20 min y luego con 500 nM de Dex durante 1 hora. Posteriormente las células fueron fijadas, permeabilizadas e incubadas durante 1 hora con un anticuerpo policlonal anti p38. Al cabo de este tiempo las células fueron incubadas con un segundo anticuerpo acoplado a un fluoróforo Cy3/5 y la localización subcelular se analizó por microscopía confocal. La fluorescencia roja muestra a la proteína de fusión HA-p38 y la fluorescencia verde a la proteína de fusión GR-GFP. Este es un experimento representativo de tres experimentos independientes.

13. Rol de p38 y JNK en la actividad transcripcional del GR

En la literatura hay trabajos que muestran que la fosforilación del GR produce una inhibición en la actividad transcripcional de este factor (Rogatsky et al., 1998), la enzima responsable de dicha inhibición es la SAPK JNK. Quisimos evaluar esta hipótesis en nuestro modelo y extenderlo a otras MAPKs. Para ello células L-929 fueron transfectadas transientemente con un plásmido reportero de la actividad de este factor: el gen de la luciferasa bajo el control de un promotor con elementos de unión a glucocorticoides (MMTV-Luc) junto con un plásmido que expresa el ADN copia de MLK3 un activador de la vía de JNK, utilizando el método de transfecciones por liposomas catiónicos como se indica en Materiales y Métodos. Luego las células fueron estimuladas según se indica en la figura 28 durante 14 hs y finalmente se midieron los niveles de actividad del factor de transcripción cuantificando las

unidades relativas de luciferasa (U.R.L). En la figura 28 se puede observar que el tratamiento de las células con el esteroide sintético promueve la actividad transcripcional del GR en ausencia de la proteína JNK activada, pero esta activación se ve disminuida en células transfectadas con MLK3 y también estimuladas con Dex.

Por lo tanto la fosforilación del GR por JNK inhibe su activación transcripcional tal como había sido previamente reportado.

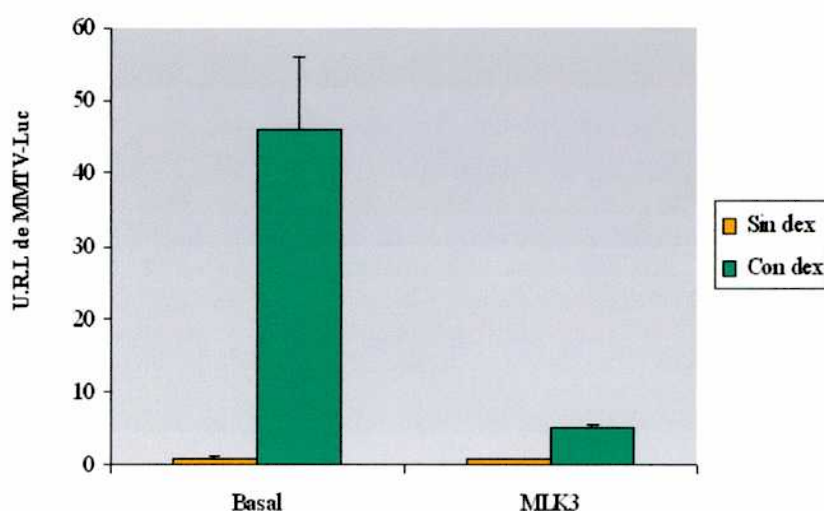


Figura 28. La activación de JNK disminuye la actividad transcripcional del GR. Células L-929 fueron transfectadas con 0.7 μ g del plásmido reportero MTV-luc, 1 μ g del plásmido que expresa el ADN copia de MLK3 un activador de la vía de JNK y 0.5 μ g del plásmido RSV- β -Gal (para normalizar los datos) utilizando el método de lipofectamina. Al día siguiente de la transfección las células fueron estimuladas con 500 nM de Dex, durante 14 hs. La actividad transcripcional del GR se determinó midiendo las U.R.L. de MMTV-luc.

Con el objeto de determinar si la fosforilación *in vitro* del receptor de glucocorticoides por la proteína quinasa p38 y su asociación *in vivo* desempeñan algún papel funcional en la transactivación del GR, células L-929 fueron transfectadas transientemente con el plásmido reportero MMTV-Luc junto con un plásmido que expresa el ADN copia de MKK6 un activador de la vía de p38 y Erk-6, utilizando el método de transfecciones por liposomas catiónicos como se indica en Materiales y Métodos. Luego las células fueron estimuladas según se indica en la figura 29 durante 14 hs y finalmente se midieron los niveles de actividad del factor de transcripción cuantificando las unidades relativas de luciferasa (U.R.L). En la figura 29 se puede observar que como se sabía previamente, el tratamiento de las células con Dex promueve la actividad transcripcional del GR en ausencia de la proteína p38 activada,

pero esta activación se ve incrementada en células transfectadas con MKK6 y también estimuladas con Dex.

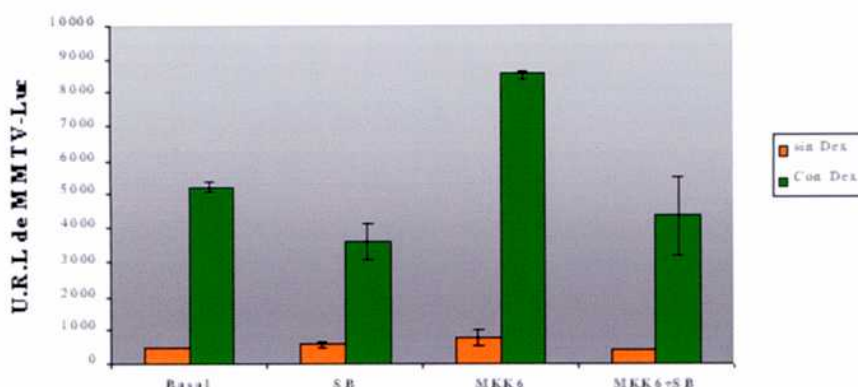


Figura 29. La proteína quinasa p38 aumenta la actividad transcripcional del GR. Células L-929 fueron transfectadas con 0.5 μ g del plásmido reportero MMTV-Luc, 1.5 μ g del plásmido que expresa el ADN copia de MKK6 un activador de la vía de p38 y 1 μ g del plásmido RSV- β -Gal para normalizar los datos, utilizando el método de lipofectamina. Al día siguiente de la transfección las células fueron estimuladas con 500 nM de Dex y 10 μ M de SB203580 según se indica, durante 14 hs. La actividad transcripcional del GR se determinó midiendo las unidades relativas de luciferasa de MMTV-luc. Este es un experimento representativo de tres experimentos independientes.

Como se reportó previamente MKK6 puede activar tanto a las proteínas quinasas p38 como a Erk6, por lo tanto para poder determinar el rol de estas quinasas en la activación transcripcional del GR se utilizó el inhibidor específico de la proteína p38 SB203580. Como se puede observar en la figura 29 el agregado del inhibidor en una dosis que sabemos que es efectiva (Figura 15) tiene un efecto inhibitorio en la transactivación del receptor de GR inducido por MKK6.

Estos resultados demuestran entonces que la proteína p38 estaría regulando positivamente la habilidad del receptor glucocorticoides de activar la transcripción.

Entonces resumiendo si bien tanto las proteínas quinasas p38 y JNK son capaces de fosforilar *in vitro* al receptor de glucocorticoides e interactuar *in vivo* con el mismo, modulan diferencialmente su actividad transcripcional, mientras que p38 la aumenta JNK la inhibe.

14. La activación del GR por p38 incrementa su localización nuclear

Con el objeto de determinar si la fosforilación del GR por la p38 quinasa *in vitro* y su asociación *in vivo* podían jugar un rol funcional en el proceso de regulación de la localización subcelular se analizó por microscopía confocal los efectos de la inhibición de la p38 en la localización del GR. Para ello células L-929 se transfectaron transientemente utilizando el método de liposomas catiónicos con un plásmido que expresa la proteína de fusión GFP-GR. Un día después de la transfección las células fueron estimuladas según se indica en la figura 30 y finalmente fijadas y analizadas con un microscopio confocal. Como se sabía previamente las células que fueron estimuladas con Dex muestran una localización nuclear del GR ya que la fluorescencia se ve en ese lugar (dato no mostrado), a diferencia de las células no tratadas donde la mayor parte del GR se encuentra en el citoplasma como se puede observar en la figura 30. Asimismo podemos ver en esta misma figura que las células que fueron tratadas conjuntamente con TNF- α y Dex también muestran una localización nuclear del receptor la cual es inhibida por el pre-tratamiento de las células con SB203580. Por lo tanto estos resultados indican que la proteína quinasa p38 estaría involucrada en la regulación de la localización subcelular del GR.

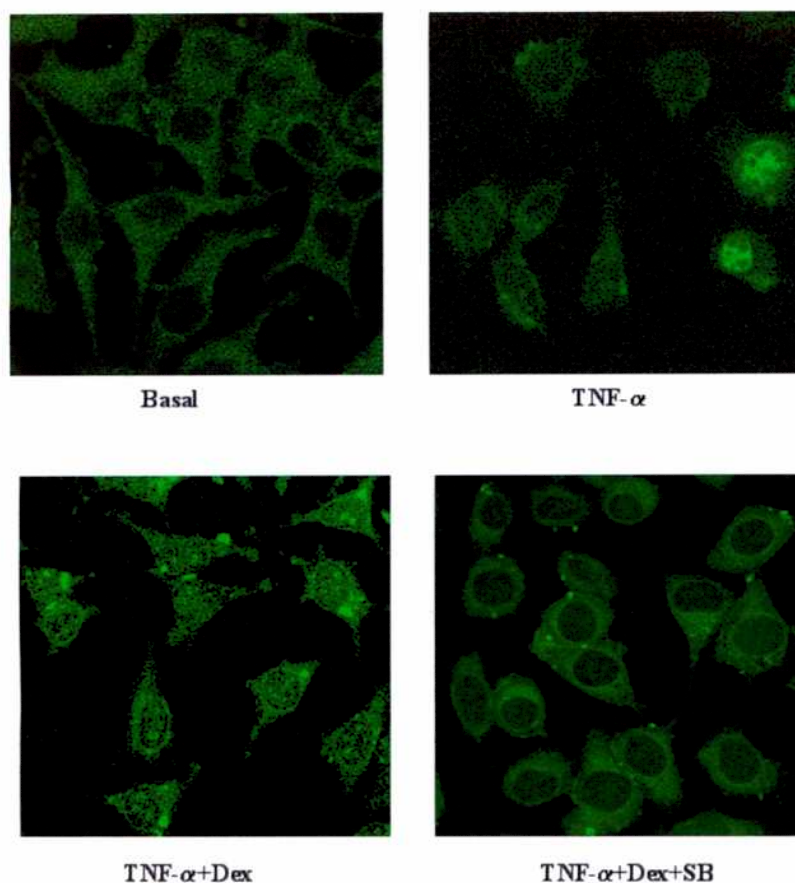


Figura 30. Efecto de la inhibición de p38 en la localización nuclear del GR. Análisis de la fluorescencia de células L-929 transfectadas utilizando lipofectamina plus (GIBCO BRL) con 1 μ g de GFP-GR y 1 μ g de vector vacío. Luego de 36 hs de cultivo en medio sin esteroides y sin lipofectamina las células fueron estimuladas con 10 ng/ml de TNF- α durante una hora veinte minutos; 500 nM de Dex durante una hora. Los cultivos que fueron tratados con ambos estímulos el TNF- α se agregó primero y a los 20 min se agregó la Dex. En el caso en que se utilizó el inhibidor SB203580 (10 μ M) se lo pre-incubó durante 30 min. La localización del GR se analizó por microscopía confocal.

Otra forma más cuantitativa y sencilla de analizar la influencia de la proteína quinasa p38 en la localización subcelular del receptor de glucocorticoides es mediante el análisis de extractos proteicos correspondientes a las fracciones nucleares y citoplasmáticos por la técnica de Western blot utilizando un anticuerpo policlonal anti-GR. Para ello células L-929 fueron estimuladas con TNF- α , Dex, o ambos simultáneamente según se indica. En la figura 31 se puede observar que los niveles de GR en núcleo aumentan en presencia de su ligando sintético Dex y éstos no se incrementan significativamente cuando las células son estimuladas con TNF- α y Dex. Sin embargo cuando las células son pre-incubadas con el inhibidor específico SB203580 y luego estimuladas con ambos estímulos los niveles nucleares del GR disminuyen.

Asimismo vemos que los niveles de GR citoplasmáticos bajan con respecto a los niveles basales cuando las células son estimuladas tanto con Dex; TNF- α + Dex y TNF- α + Dex + SB203580.

Con el objetivo de confirmar la pureza de los extractos citoplasmáticos y nucleares los lisados utilizados para evaluar la localización del GR y p38 se

desafiaron contra un anticuerpo policlonal anti-tubulina, la cual es una proteína citoplasmática y contra un anticuerpo anti-PCNA una proteína estrictamente nuclear. Como se observa en la figura 22 solo en los extractos citoplasmáticos se detecta la proteína tubulina (Figura 31), mientras que solo en los extractos nucleares se detecta la proteína PCNA (datos no mostrados).

Esos resultados indican que p38 está involucrada en el mecanismo de translocación del GR.

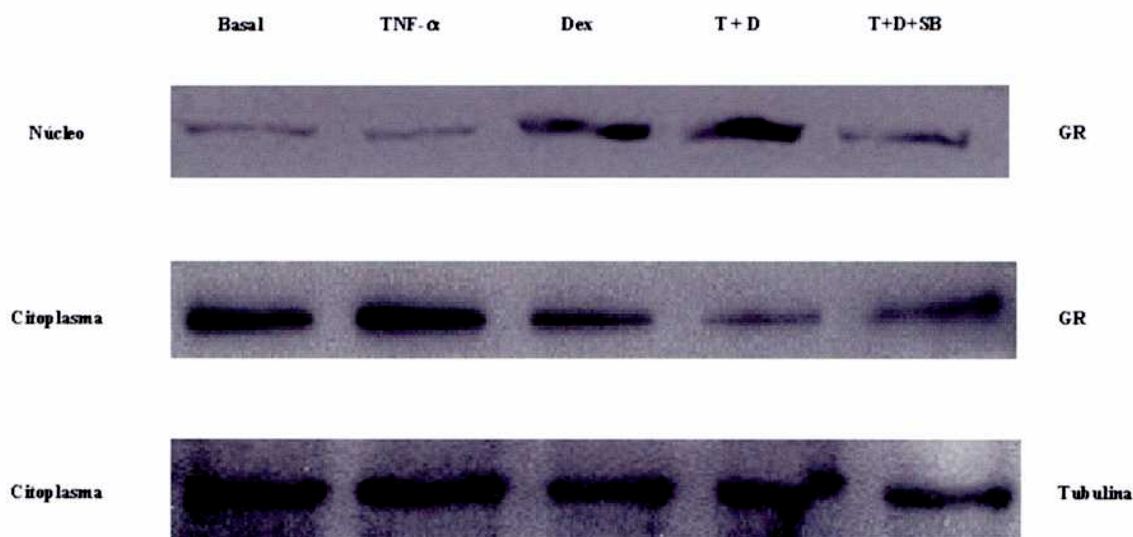


Figura 31. La proteína quinasa p38 participa en la regulación de la localización subcelular del GR. Células L-929 fueron crecidas en medio sin esteroides y luego estimuladas con 10 ng/ml de TNF- α , 300 nM de Dex y 10 μ M de SB203580. Las células que fueron tratadas con el inhibidor se las pre-incubó con el mismo durante 30 min y luego se las estimuló 20 min con TNF- α y por último 1 hora con Dex. Las células que fueron estimuladas con el tratamiento conjunto de TNF- α y Dex fueron primero estimuladas 20 min con TNF- α y luego 1 hora con Dex. El tratamiento sólo con TNF- α se realizó por 1 hora 20 min, mientras que el tratamiento solo con Dex se realizó por 1 hora. Luego las células fueron levantadas y la fracción nuclear separada de la citoplásmica, según el protocolo que se detalla en Materiales y Métodos. Las proteínas se separaron en un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 10 % y luego se realizó el Western blot utilizando los anticuerpos específicos (Santa Cruz).

15. Análisis de la movilidad electroforética

Uno de los mecanismos por los cuales se explica un aumento en la actividad de un factor de transcripción, es el aumento en los niveles activos disponibles en el núcleo de este factor y, por lo tanto, en la unión al ADN. Contrariamente, una disminución en la unión podría explicar una menor actividad transcripcional. Se procedió, entonces, a estudiar la unión del factor de transcripción GR a su región promotora GRE (elementos respondedores a glucocorticoides) bajo diferentes estímulos celulares, mediante ensayos de cambio en la movilidad electroforética (ensayos EMSA). Para ello se extrajeron las proteínas nucleares de células L-929 estimuladas con Dex, TNF- α o ambas, durante 45 min. como se indica en Materiales

y Métodos. Se incubaron estas proteínas con un oligonucleótido marcado radioactivamente correspondiente a secuencias que contienen elementos GRE, y se corrieron en un gel de poliacrilamida nativo. Se observó el retardo en la corrida de la banda correspondiente al oligonucleótido marcado unido a proteínas específicas.

Como se observa en la figura 32 Dex induce un aumento en la unión de los complejos que contienen al GR (Figura 32 A, calle 3). El tratamiento con TNF- α solo no produce ningún cambio respecto de los niveles basales, tal como puede observarse en la calle 2 (Figura 32 A). El tratamiento simultáneo con TNF- α y Dex produce una disminución en la unión de complejos que contienen al GR (Figura 32 calle 5). Para evaluar el rol de la p38 quinasa se utilizó nuevamente el inhibidor específico SB203580. Las células L-929 fueron pre-incubadas con el inhibidor 30 min. y luego estimuladas durante 45 min. con TNF- α y Dex simultáneamente. La calle 4 de la figura 32 A muestra una disminución en la unión de complejos conteniendo GR respecto del tratamiento con TNF- α y Dex. La presencia del receptor de glucocorticoides en estos complejos se confirma, según puede observarse en el ensayo de *supershift* con anticuerpo anti GR (Figura 32 B calle 1). Por otro lado para determinar la especificidad de la unión a los sitios GRE de los complejos obtenidos cuando las células son estimuladas con Dex se realizaron ensayos de competencia con un oligonucleótido que posee la misma secuencia específica que no está marcado radioactivamente y con un oligonucleótido que posee una secuencia totalmente distinta que tampoco está marcado radioactivamente. Con un exceso entre 10 y 100 veces de oligonucleótido específico no marcado vemos una competencia eficiente por la unión de los complejos que contienen al GR (Figura 32 B calles 2, 3 y 4). Por el contrario un exceso de 50 veces de un oligonucleótido no relacionado no marcado es incapaz de competir específicamente por la unión de los complejos (Figura 32 B calle 5).

De acuerdo con estas observaciones, puede concluirse que, la proteína quinasa p38 estaría provocando un incremento en la actividad transcripcional del GR a través de un aumento en los niveles activos disponibles de este factor en el núcleo.

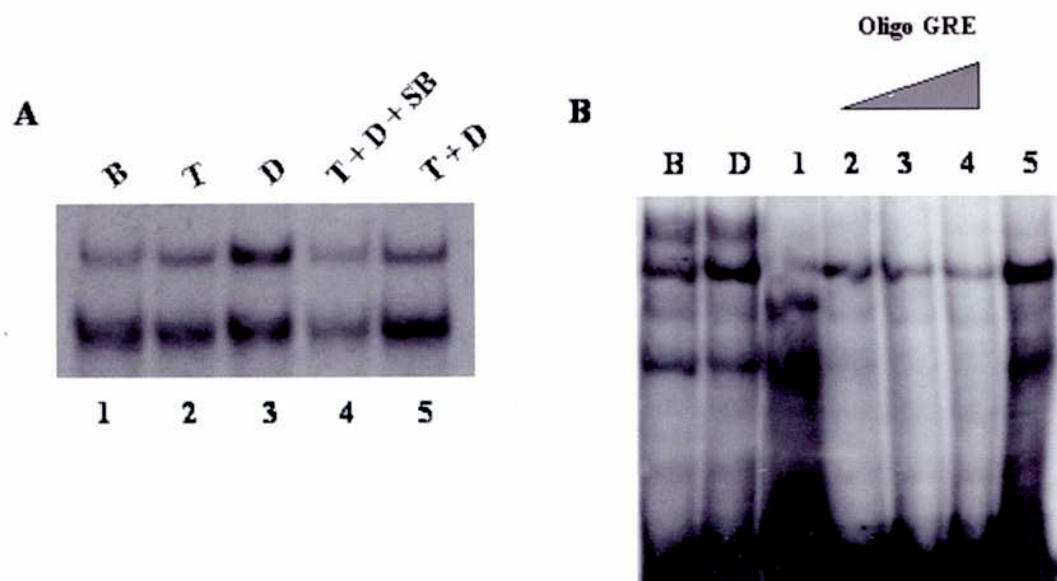


Figura 32. La p38 quínasa produce un aumento de la unión del GR al ADN. (A) Se realizaron ensayos de cambio de la movilidad electroforética usando un oligo marcado que contiene los sitios de unión del GR (Oligo GRE) y 5 μ g de extractos nucleares de células L-929 (calles 1-5) las cuales fueron estimuladas con 10 ng/ml de TNF- α (calle 2); 500 nM de Dex (calle 3); ambos simultáneamente (calle 4) y con ambos estímulos más el agregado de 10 μ M de SB203580 durante 45 min. (B) Se realizaron ensayos de cambio de la movilidad electroforética y reacciones de competencia usando el oligo GRE y 5 μ g de extractos nucleares de células L-929 las cuales fueron estimuladas con 500 nM de Dex (calles B, D, 1-5). Para las reacciones de competencia se agregaron concentraciones crecientes de oligo GRE no marcado (calles 2-4) o un oligo no específico marcado (calle 5) en las mezclas de reacción. Para confirmar la presencia del GR en estos complejos se realizaron ensayos de *supershift* para lo cual los extractos previamente estimulados con 500 nM de Dex fueron pre incubados con un anticuerpo policlonal anti GR (Santa Cruz) durante 1 hora y luego se procedió como en las otras reacciones (calle 1).

16. Rol de p38 en la protección de los GC a la apoptosis inducida por TNF- α

Teniendo en cuenta que:

- a) los fibroblastos de ratón L-929 son sensibles a la apoptosis inducida por TNF- α ;
- b) hay evidencias que muestran que los glucocorticoides son capaces de inhibir este proceso
- c) nuestros resultados indican que el GR es sustrato de distintas MAPKs y
- d) la inhibición de la proteína p38 provoca una disminución en la cantidad de GR presente en el núcleo y en la actividad transcripcional de este factor es que se quiso evaluar el rol de la misma en la protección por glucocorticoides a la apoptosis inducida por TNF- α .

Células L-929 se crecieron en medio sin esteroides y se las estimuló durante 14 hs con TNF- α , dexametasona y ambos estímulos simultáneamente. La apoptosis se evaluó por tinción de los lisados celulares con ioduro de propidio y posterior análisis en un citómetro de flujo. En la figura 33 se puede observar que como se sabía previamente el TNF- α induce un incremento en el porcentaje de núcleos subdiploides o de células apoptóticas con respecto a las células sin estimular y que el tratamiento simultáneo con Dex disminuye este porcentaje. Sin embargo cuando las células fueron pre-incubadas durante 30 min. con el inhibidor específico SB203580 y luego incubadas con ambos estímulos el porcentaje de células apoptóticas se incrementó significativamente respecto de las células tratadas con TNF- α y Dex.

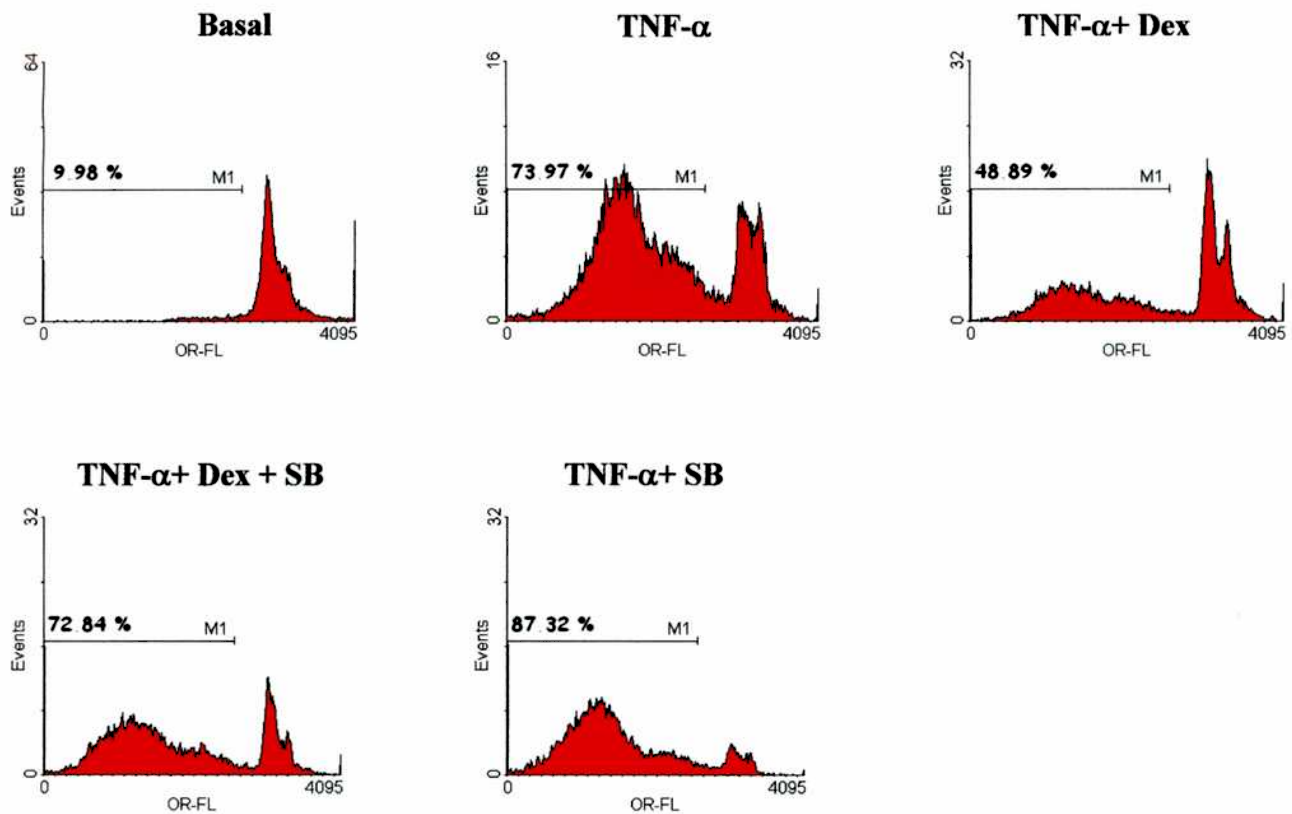


Figura 33. La protección de GR a la apoptosis inducida por TNF- α involucra a p38. Células L-929 fueron estimuladas con 10 μ M de SB203580; 10 ng/ml de TNF- α ; 500 nM de Dex o ambos según s indica en la figura. Luego de 14 hs de tratamiento las células fueron levantadas y los núcleos teñidos con yoduro de propidio y analizados por citometría de flujo. Los números sobre los macadores en el histograma representan el porcentaje de partículas subdiploides. Resultados similares se obtuvieron en tres experimentos independientes

Estos resultados muestran entonces que la proteína quinasa p38 estaría involucrada en la protección mediada por los glucocorticoides a la apoptosis inducida por TNF- α , probablemente a través del incremento de la actividad transcripcional del GR.

Por otro lado podemos observar también que el pre-tratamiento de las células con SB203580 seguido de incubación con TNF- α produce un incremento en la apoptosis respecto de las células solo tratadas con TNF- α , lo que estaría indicando que la proteína quinasa p38 actuaría en este modelo como una señal protectora la cual se induce en condiciones apoptóticas como son la estimulación con TNF- α pero previene solo parcialmente la muerte celular.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

En el modelo de células resistentes a la apoptosis inducida por TNF- α (HeLa) vimos que:

- El estrés osmótico es capaz de sensibilizar a la apoptosis inducida por TNF- α .
- La apoptosis inducida por el tratamiento simultáneo con TNF- α y NaCl involucra un cambio en la relación Bcl-2/Bax, a expensas de la reducción de los niveles de expresión del gen anti-apoptótico.
- El tratamiento con NaCl y TNF- α , ambos en dosis cuya combinación induce apoptosis, provoca un aumento de la actividad de JNK, p38 y Erk6.
- El estímulo conjunto de TNF- α y NaCl, el cual constituye una señal apoptótica, incrementa significativamente la actividad del factor de transcripción NF- κ B, en una fase tardía pero no en una fase temprana de inducción de la muerte y esto no es suficiente para prevenir la muerte celular.
- La activación de p38 es necesaria para la actividad NF- κ B y tiene un rol protector de la apoptosis inducida por TNF- α y NaCl por mecanismos adicionales a la activación de este factor de transcripción.
- Los glucocorticoides tienen un rol protector de la apoptosis inducida por TNF- α en células sensibilizadas por estrés osmótico.

En el modelo de células naturalmente sensibles a la apoptosis inducida por TNF- α (L-929) vimos que:

- Las MAPK: Erk-2, JNK, p38, Erk6 y Erk5 son capaces de fosforilar al GR *in vitro*, mientras que cuatro de estas proteínas quinasas: Erk1/2; JNK, p38 y Erk6 interaccionan físicamente con el GR *in vivo*.
- Dosis bajas de TNF- α activan diferencialmente a JNK y p38.
- JNK inhibe la activación transcripcional del GR.
- p38 aumenta la actividad transcripcional del GR.
- p38 aumenta la localización nuclear del GR
- p38 aumenta la unión del GR a las secuencias blanco presentes en el ADN

- p38 estaría involucrada en la protección mediada por los GC a la apoptosis inducida por TNF- α .

DISCUSSION

1) Modelo de sensibilización por estrés osmótico de células resistentes a la apoptosis inducida por TNF- α

1.1. Rol del estrés osmótico en la inducción de apoptosis

La apoptosis o muerte celular programada está regulada por mecanismos que son muy específicos tanto a nivel de señales como a nivel celular. Durante la apoptosis, la célula sufre una serie de cambios morfológicos y bioquímicos conservados, que incluyen entre otros la pérdida del volumen celular. Este es un evento regulatorio temprano esencial para la progresión de la apoptosis y es la característica morfológica que distingue a la apoptosis de la necrosis.

El mantenimiento del volumen celular está regulado por varios mecanismos regulatorios que incluyen transporte iónico, acumulación de osmolitos, organización del citoesqueleto y la expresión génica. Entre estos, el movimiento de iones monovalentes, como K^+ y Na^+ , demostró ser crítico y necesario para la pérdida de volumen celular y los eventos de apoptosis.

La pérdida de volumen está asociada con la salida de iones de K^+ y solo las células que presentan una disminución de su volumen celular son las que exhiben degradación del ADN, pérdida del potencial de membrana mitocondrial y la activación de caspasas efectoras (Bortner et al., 1997). Mas aún la apoptosis puede aumentarse en condiciones donde la concentración intracelular de K^+ es disminuía y puede inhibirse cuando la salida de K^+ es impedida.(Bortner y Cidlowski, 1996).

Por otro lado existen evidencias que muestran que iones en altas concentraciones como 150 mM pueden actuar como represores de la apoptosis (Montague et al., 1999).

Si bien el TNF- α al igual que otros inductores de la apoptosis pueden causar una disminución del volumen celular y pérdida de iones (Okada et al., 2001), ésto probablemente sea prevenido en condiciones hiperosmóticas como las que se logran cuando se estimula con una concentración de 100 mM de NaCl ó 300 mM de sorbitol (datos no mostrados). Estos resultados nos permiten especular que en este modelo de sensibilización hiperosmolar a la apoptosis inducida por TNF- α , la pérdida de iones probablemente no sea el evento disparador de la apoptosis.

1.2. Rol de NF- κ B en el modelo

Si bien la mayoría de las células son resistentes a la apoptosis inducida por TNF- α , hay diversas maneras de sensibilizarlas. Todas las maneras involucran la inhibición del factor de transcripción NF- κ B, o la presencia de inhibidores de la síntesis proteica que previenen la expresión de genes anti-apoptóticos.

En ciertos sistemas biológicos NF- κ B ha demostrado tener un rol anti-apoptótico. Ratones deficientes en Rel A presentan un fenotipo letal embrionario causado por la apoptosis inducida por TNF- α dentro del hígado fetal (Beg et al., 1995). La re-introducción de Rel A a hepatocitos inmortalizados derivados de estos animales protegió a estas células de la apoptosis inducida por TNF- α . Asimismo NF- κ B es capaz de inhibir la apoptosis inducida por TNF- α en fibroblastos de ratas y humanos, en células Jurkat y en células de cáncer mamario MCF7 (Van Antwerp et al., 1996; Liu et al., 1996). Por otro lado NF- κ B es capaz de proteger células tumorales transformadas con Ras de la apoptosis inducida por quimioterapia (Mayo et al., 1997).

Hay una serie de genes anti-apoptóticos inducibles por NF- κ B que han sido identificados e incluyen cIAP1, cIAP2, TRAF1, TRAF2 y IEXL-1.

Estas evidencias muestran que NF- κ B desempeñaría un rol anti-apoptótico en varios sistemas posiblemente a través de la activación de distintos grupos de genes anti-apoptóticos.

Pero también existen evidencias que correlacionan la inducción de apoptosis con una activación de NF- κ B en una gran variedad de sistemas, incluyendo el desarrollo embrionario de aves, y en las neuronas dopaminérgicas derivadas de pacientes con la enfermedad de Parkinson (Abbadie et al., 1993; Hunot et al., 1997).

Teniendo en cuenta estas evidencias el rol de NF- κ B como regulador de la apoptosis es complejo y parecería ser tejido específico.

En este trabajo se analizó un nuevo modelo de apoptosis inducida por TNF- α en células sensibilizadas por estrés osmótico. En este modelo la inhibición temprana de la actividad del factor de transcripción NF- κ B parece estar involucrada en la inducción de la apoptosis, a pesar que en una fase tardía la activación de este factor se ve incrementada (Figuras 14 y 16). Si bien estos resultados pueden sugerir que NF- κ B tiene un rol pro-apoptótico, el bloqueo de su actividad incrementa aún más la sensibilidad a la apoptosis inducida por TNF- α (Figura 18). Teniendo en cuenta estos resultados es posible pensar que la inhibición temprana de NF- κ B por NaCl podría ser el punto crítico que conduce a las células estimuladas con TNF- α a la muerte. Si bien

tardíamente hay un incremento de la actividad de este factor, probablemente como una respuesta defensiva, esta acción no es lo suficientemente fuerte como para prevenir que la muerte celular ocurra.

1.3. Rol de MAPKs en el modelo

La inhibición de la síntesis proteica confiere sensibilidad al TNF- α en la mayoría de las células tumorales que son resistentes al mismo (Beyaert y Fiers, 1994). Estas observaciones cultivaron la hipótesis de que en estos tipos celulares resistentes, el TNF- α podía inducir la síntesis de proteínas anti-apoptóticas. Por otro lado existen evidencias que muestran que los inhibidores de la síntesis proteica como la cicloheximida pueden estimular la actividad de varias proteínas quinasas inducibles por estrés como por ejemplo JNK (Kallunki et al., 1994). Con la idea de analizar si caminos adicionales de transducción de señales como por ejemplo la activación diferencial de distintas MAPKs, podían estar involucrados en la sensibilización a la apoptosis inducida por TNF- α , se evaluó la capacidad del estrés osmótico de sensibilizar a las células.

La inducción de la expresión génica mediada por estrés involucra procesos bioquímicos en los que participan múltiples caminos de transducción de señales. Dependiendo del tipo de estímulo distintas proteínas quinasas se activan, lo que provoca en última instancia la fosforilación de un factor de transcripción y la regulación de la expresión.

Las MAPKs son los principales propagadores de las señales que van desde la membrana celular al núcleo. En particular dentro de la familia de MAPKs hay un subgrupo de proteínas llamadas SAPKs, el cual involucra a la familia de JNK y p38. Tanto JNK como p38 son capaces de activarse por distintos tipos de estrés, por citoquinas y por TNF- α .

La activación de Erk 1/2 ha sido ligada a la supervivencia celular mientras que la activación de JNK y p38 a la inducción de la apoptosis (Xia et al., 1995). Esta dicotomía es una simplificación bastante grande de los hechos ya que el rol de cada cascada de MAPK es muy específico a nivel celular y depende enormemente del contexto celular. En concordancia con esto hay evidencias que muestran que el balance entre los niveles intracelulares de ceramidas y esfingosina-1-fosfato y sus efectos regulatorios sobre Erk 1/2 y JNK determina el destino celular (Cuvillier et al., 1996).

De acuerdo con esta idea la combinación de ambos estímulos, como TNF- α y NaCl, podía producir un nuevo balance en los niveles de activación de distintas quinasas involucradas en la muerte celular. Sin embargo en este trabajo vimos que todas las quinasas (JNK, p38 y Erk6) inducidas por cada uno de los estímulos mostraron un patrón de activación similar y que el máximo de activación se obtuvo por la estimulación conjunta de TNF- α y NaCl. Si bien el incremento de la actividad de alguna de estas MAPKs, puede estar participando en el control de la respuesta de muerte o sobrevida inducido por TNF- α , no podemos descartar que otros mecanismos de señalización no relacionados con las cascadas de MAPKs estén involucrados en dicho control.

p38 y JNK son activadas por los mismos tipos de estímulos que provocan la activación de NF- κ B (Raingeaud et al., 1995; Verma et al., 1995). Hay evidencias que muestran la participación de p38 en la activación de NF- κ B y el requerimiento de la actividad de p38 en la transactivación del mismo (Bergher et al., 1998). De acuerdo a nuestros propios resultados el requerimiento de p38 parece ser crítico para la activación de NF- κ B independientemente de la cinética de cada uno de los estímulos (Figura 16).

En cuanto al rol de p38 en nuestro modelo de apoptosis, vimos que su inhibición aumenta significativamente la muerte celular inducida por estrés osmótico y TNF- α . Por lo tanto en el nuevo balance de quinasas inducidas por ambos estímulos, p38 desempeña un rol protector, el cual no es suficiente para prevenir la apoptosis. Es interesante destacar que de acuerdo a nuestros resultados el efecto de la inhibición de p38 en la muerte celular no pudo ser totalmente revertido por la sobreexpresión de Rel A (Figura 18). Estos resultados son compatibles con el efecto inhibitorio del SB203580 en la transactivación de NF- κ B, el cual no pudo ser revertido cuando se sobreexpresó Rel A (Figura 19). Estos resultados nos permiten especular que el rol anti-apoptótico de p38 es mediado por NF- κ B, pero en un paso por debajo de la proteólisis de I κ B y no es totalmente dependiente de los niveles disponibles de moléculas activas del factor de transcripción NF- κ B. Luego, es poco factible que p38 medie su rol protector solamente a través del incremento de la activación de NF- κ B sino que probablemente induzca otras señales protectoras que no estén relacionadas con este factor de transcripción.

1.4. Rol de la familia de proteínas Bcl-2 en el modelo

Se reportó previamente que además de la activación de caspasas, los efectos citotóxicos del TNF- α se deben en parte a su habilidad de generar intermediarios de oxígeno reactivo (ROI) y de producir daño oxidativo (Polla et al., 1996). Estos eventos podrían ser los principales efectores de la muerte en células que son naturalmente sensibles al TNF- α . Por otro lado el TNF- α es capaz de inducir la síntesis de la enzima superóxido dismutasa la cual ha sido implicada en la protección de las células a los efectos citotóxicos del TNF- α . Las mitocondrias son la principal fuente productora de aniones superóxidos en la célula, cuya producción se ve incrementada cuando se pierde el gradiente electroquímico a través de la membrana interna de la mitocondria. De acuerdo con estas evidencias, se propuso que en células resistentes al TNF- α , el daño mitocondrial es prevenido por un aumento en la expresión de la enzima superóxido dismutasa.

Teniendo en cuenta estas evidencias es lógico pensar que cualquier señal que afecte la integridad de la membrana interna mitocondrial, o bien, que sea capaz de inhibir la producción de agentes anti-oxidantes, o las señales responsables de la protección de la integridad de la mitocondria como por ejemplo Bcl-2, podría probablemente sensibilizar a las células a la muerte celular inducida por TNF- α . En este sentido no se ha determinado aún cómo el estrés hiperosmótico afecta a algunos de estos mecanismos.

Como mencionamos en la introducción el TNF- α induce apoptosis principalmente mediante el reclutamiento de FADD en la cara citoplasmática de su receptor lo que provoca a su vez la activación de la pro-caspasa 8. Hay evidencias que muestran que en este modelo Bcl-2 tiene un pobre rol protector de la apoptosis (Monney et al., 1998).

Si bien la unión del TNF- α a su receptor representa una forma de activar la cascada de caspasas, existe un mecanismo alternativo de inducción de muerte celular, que puede depender o no de señales de membrana y es el que está mediado por la liberación del citocromo c de la mitocondria y su subsecuente asociación con Apaf-1 y pro-caspasa 9, lo que provoca la activación de caspasas efectoras. Esta última cascada de caspasas puede ser inducida por ejemplo con luz UV y en este modelo Bcl-2 posee un rol regulatorio importante ya que es capaz de prevenir directa o indirectamente la salida del citocromo c de la mitocondria y de esta manera inhibir el proceso de apoptosis.

En cuanto a la familia de proteínas Bcl-2, es sabido que pueden formar heterodímeros que promueven o inhiben la apoptosis. En este sentido, es importante conocer la relación entre los niveles de expresión de los miembros de la familia pro- y anti-apoptóticos. De acuerdo con nuestros resultados los niveles de Bcl-2 no varían cuando las células son estimuladas con TNF- α y NaCl por separado pero son inhibidos por las señales apoptóticas generadas por el estímulo conjunto de TNF- α y estrés osmótico, mientras que los niveles de la proteína pro-apoptótica Bax no se ven afectados en ninguno de los tratamientos. Estos resultados están indicando que la relación de Bcl-2/Bax se ve afectada y que probablemente esté involucrada en el aumento de la susceptibilidad a la apoptosis inducida por ambos estímulos.

Posiblemente en este modelo la disminución de la relación Bcl-2/Bax que provoca la inhibición de una señal protectora conjuntamente con una inhibición de la actividad de NF- κ B desempeñen un papel crítico en la inducción de la apoptosis.

Finalmente nosotros mostramos que el estímulo no apoptótico como el estrés osmótico puede sensibilizar a la apoptosis inducida por TNF- α en células que son resistentes a esta citoquina que constituyen en realidad un modelo representativo de la mayoría de las células del organismo. Dado que casi todos los tejidos están expuestos tanto en una respuesta normal como inflamatoria al TNF- α y a cambios en la osmolaridad de los fluidos fisiológicos, estos resultados podrían ser una contribución importante en el conocimiento de algunas condiciones patológicas que involucran hipertensión, altos niveles de citoquinas inflamatorias en plasma y daño de tejidos.

2) Modelo de células naturalmente sensibles a la apoptosis inducida por TNF- α :

Rol de los GC y MAPKs

2.1. Rol de MAPKs en este modelo

En este trabajo nosotros hemos demostrado que las cinco MAPKs mejor caracterizadas hasta el momento son capaces de fosforilar al GR *in vitro* y que cuatro miembros de esta familia: JNK, p38, Erk6 y Erk 1/2 son capaces de interactuar *in vivo* con este receptor. Esto sugiere la existencia de posibles efectos regulatorios de estas quinasas sobre el factor de transcripción. El rol que cumple la fosforilación del receptor de glucocorticoides en la función del receptor es controversial. Algunos estudios sugieren

que la mutación de un solo sitio o varios sitios de fosforilación en el GR de ratón o humano afecta levemente la habilidad de estos mutantes en activar la transcripción (Mason and Housley, 1993; Almöf et al., 1995).

Nuestros resultados sin embargo, muestran que mientras p38 induce la activación transcripcional del GR, JNK la inhibe. Si bien los mecanismos por los cuales la fosforilación de JNK inhibe la actividad transcripcional del GR no están del todo claros hasta la fecha, la fosforilación del residuo de Ser-246 del receptor parecería estar involucrada en esta acción (Rogatsky et al., 1998). Esta fosforilación podría estar alterando la localización nuclear del receptor en presencia de hormona o bien podría estar afectando la afinidad del GR por factores que están involucrados en la regulación transcripcional. Por otro lado la complejidad de un determinado promotor y el contexto pueden afectar la capacidad de distintas formas fosforiladas del GR de regular la transcripción.

Estos resultados demuestran la importancia del delicado equilibrio entre las actividades de una y otra quinasa y la especificidad de las MAPKs al transducir sus señales que van a afectar el destino de la célula ya sea hacia la supervivencia o muerte celular.

Para evaluar si las MAPKs afectaban la capacidad de transactivación del GR o si directamente afectaban la unión del receptor a sus secuencias blanco presentes en el ADN (secuencias GRE) se realizaron ensayos de *gel shift* en los cuales se pudo ver que la p38 quinasa favoreció la unión del GR a las secuencias GRE.

Una vez que el GR es fosforilado transloca al núcleo. Si bien Webster y col. mostraron que la fosforilación del receptor no es un evento necesario para que la translocación nuclear ocurra, ya que vieron que el GR de ratón que carecía de todos los sitios de fosforilación era capaz de translocar al núcleo luego de la activación con su ligando. Nuestros resultados sin embargo, muestran que la fosforilación del GR por p38 incrementa la localización nuclear del mismo. Asimismo vimos que si bien el GR transloca al núcleo en presencia de TNF- α y Dex, también lo hace en presencia sólo de Dex (experimento no mostrado), esto implica que se estarían utilizando dos caminos diferentes para dirigir al GR al núcleo. Esto podría explicarse en parte teniendo en cuenta que las interacciones con proteínas de anclaje o *docking* pueden jugar un rol muy importante en la localización o translocación de ciertas proteínas. Por ejemplo, las interacciones entre Erk1 y su proteína de anclaje MEK1 han sido reportadas como importantes para la localización citoplasmática de Erk1 (Fukuda et al., 1997). La

translocación de p38 α del núcleo al citoplasma en células activadas por estrés está mediada por su proteína de anclaje MAPKAPK2 (Ben-Levy et al., 1998b). p38 α puede redistribuir GFP-MAPKAPK3 a través de la interacción con esta proteína (Tanouse et al., 2001). También existen evidencias tanto bioquímicas como morfológicas que muestran que el GR está asociado a microtúbulos durante distintas etapas del ciclo celular, que también es capaz de unirse a filamentos de actina a través de la hsp90 (Miyata et al., 1991) y que el tratamiento de células con GC estabiliza la red de actina (Castellino et al., 1992). Estas evidencias nos permiten hipotetizar que p38 podría estar activando ya sea una proteína de anclaje o alguna proteína del citoesqueleto que esté involucrada en la translocación del GR y de esta manera incrementar su localización nuclear.

En esta segunda parte del trabajo nos centramos en estudiar el rol que tenía p38 en particular p38 α , en la regulación de la actividad del GR. Esto lo hicimos utilizando el inhibidor SB203580. Este es capaz de inhibir específicamente a p38 α y p38 β pero no a las isoformas γ (Erk6) y δ de p38. Si bien p38 α es la quinasa mejor caracterizada hasta el momento y la que se expresa en casi todos los tejidos, sería interesante poder evaluar el rol de las otras isoformas de p38, de las cuales no se tiene demasiada información aún, y que nuevas evidencias muestran que no todas se regulan de la misma manera y tienen el mismo patrón de localización dentro de la célula. Resultados recientes de nuestro laboratorio muestran que si bien p38 α y p38 γ son predominantemente nucleares, p38 δ es citoplasmática cuando las células son estimuladas con luz UV.

Por otro lado, vimos que Erk1/2, que en general siempre se la asocia con respuestas proliferativas pero no apoptóticas, era capaz de fosforilar *in vitro* e interactuar *in vivo* con el GR. TNF- α no es capaz de activar a Erk1/2, ni a Erk5, la cual vimos también, que era capaz de fosforilar al GR *in vitro*. Estas dos últimas quinasas no se encuentran dentro del subgrupo de SAPKs que se activan por estrés y por citoquinas inflamatorias. Dado que nuestro objetivo era estudiar los mecanismos moleculares por los cuales TNF- α puede regular la actividad de GR y la sensibilidad a la acción antagónica de los GC, no se estudiaron los efectos de esta quinasa en la activación transcripcional y en la localización subcelular del GR. Sin embargo Rogatsky y col. mostraron que Erk1/2 es capaz de fosforilar al GR *in vitro* y que la activación selectiva de Erk1/2 *in vivo* disminuye la actividad transcripcional del GR pero de un modo

independiente de la fosforilación, probablemente a través de la fosforilación de algún cofactor del receptor de glucocorticoides.

2.2. Influencia de la interacción entre GR y MAPKs en el destino celular.

Con el objeto de evaluar si alguna de las actividades biológicas del GR podía estar afectada por la activación de p38, decidimos evaluar la capacidad protectora de los GC en el modelo de fibroblastos L-929 en donde el TNF- α induce apoptosis y los GC la previenen. Vimos que p38 afecta la actividad biológica del GR ya que la inhibición de la misma disminuye la capacidad protectora del GR, es decir que la fosforilación del GR por p38 constituye una señal que regula positivamente la actividad del GR.

Asimismo vimos que *in vitro* los GC son capaces de activar a p38. Existen evidencias que muestran que la progesterona es capaz de activar a Erk 1/2, y los autores comentan que esto podría deberse a la interacción de la progesterona con un receptor de membrana plasmática (Daufeldt et al., 2003). Un fenómeno análogo podría ocurrir con los GC. Otra posibilidad en cuanto a la manera en que los GC activan a p38 podría ser mediante la activación de alguna otra proteína capaz de interactuar con algún componente intermediario en la cascada de activación de p38, tanto en la ya descrita como en una cascada alternativa. Esto es coincidente con el hecho de que recientemente Ge y col. han encontrado que una proteína adaptadora llamada TAB1 es capaz de activar a p38 α . Esta es la primera evidencia de que existe un mecanismo distinto en la regulación de MAPKs, además del clásico modo regulador MAPKKK-MAPKK-MAPK.

Vimos también que la estimulación de las células con dosis muy bajas de TNF- α que no tienen efectos citotóxicos *per se*, activan en mayor medida a p38 que dosis más altas que sí, son capaces de inducir apoptosis. Con JNK observamos la respuesta contraria, es decir que dosis altas de TNF- α activan mucho más a JNK que dosis bajas. Esto estaría hablando de un modo de regulación muy fino ya que un mismo estímulo en distintas concentraciones puede desencadenar respuestas muy distintas en cuanto al patrón de activación de MAPKs. En nuestro modelo de fibroblastos L-929, vemos que dosis bajas de TNF- α activan fuertemente a p38, lo cual a su vez produce un incremento de:

- a) la transactivación,

- b) la unión del receptor a sus secuencias blanco en el ADN y
- c) la localización nuclear del GR,

lo cual finalmente provoca el aumento de la capacidad protectora a la apoptosis inducida por TNF- α . Podemos hipotetizar que tendríamos en este caso un mecanismo protector de las células a los efectos citotóxicos de la citoquina disparado a dosis bajas.

Por otro lado, a concentraciones más altas de TNF- α obtenemos una mayor activación de JNK, lo que conduce a una disminución de la actividad transcripcional del GR y en consecuencia, a una menor protección a la apoptosis por parte de los GC. Esta hipótesis es coincidente con los datos mostrados por Costas y col donde la misma dosis baja de TNF- α que nosotros utilizamos produce un aumento del número de receptores de GC, un aumento de la unión del GR a sus secuencias GRE presentes en el ADN y la preincubación de las células con esta dosis baja de TNF- α aumenta la protección de los GC a la apoptosis inducida por dicha citoquina.

Cuvillier y col. observan que el cociente de actividades de Erk1/2 sobre JNK influye en el destino celular en cultivos de células Jurkat, si es mayor hay sobrevida mientras que si es menor se favorece la muerte celular programada. Si comparamos dicha observación con nuestros datos podemos especular que, en fibroblastos L-929, ocurriría un fenómeno análogo vinculado con el equilibrio entre las actividades de p38 y JNK. Bajas dosis de TNF- α inducen más p38 que JNK (cociente alto) y coinciden con la sobrevida celular mientras que a dosis altas de TNF- α el cociente se invierte y las células tienden a morir.

Dicha especulación esta apoyada por varios reportes en los cuales la asociación entre altas actividades de JNK y el control del crecimiento celular esta ampliamente documentado. Dicho control estaría dado por el disparo de la apoptosis por la vía mitocondrial en situaciones bajo las cuales los niveles de activación de JNK son altos. El establecimiento de un delicado equilibrio entre la activación de JNK y otras MAPKs sería esencial para la vida normal de la célula manteniéndola viva con niveles de replicación controlados. Se ha visto que células provenientes de ratones en los cuales los genes para JNK1 y JNK2 han sido suprimidos por "knock-out" son mucho más susceptibles a la transformación por Ras que células similares provenientes de ratones normales (Li et al., 2003). Por otro lado, múltiples intentos de establecer líneas celulares derivadas de fibroblastos NIH3T3 que expresen los activadores de JNK MLK3 y MEKK en forma estable han resultado en una muerte celular prematura (Omar Coso,

observación no publicada) y en un estudio practicado sobre 19 tumores cerebrales por Yoshida y col. se encontró que 10 de ellos poseían deletado el gen para JNK3, datos que sugieren que este gen podría ser considerado como integrante de la lista de genes supresores de tumores.

Una manera sencilla de evaluar el rol de JNK en este modelo de apoptosis sería utilizando un inhibidor específico de esta quinasas. Dado que el inhibidor comercial farmacológico específico de JNK ha salido solo recientemente a la venta, cuando ya habíamos concluido la realización práctica de los experimentos incluidos en esta presentación, esos experimentos no se incluyen, sin embargo, dichos datos son prioritarios en la continuación de esta línea de investigación.

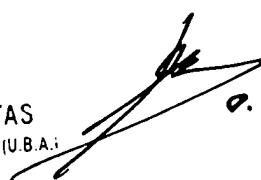
Como se mencionó anteriormente el factor de transcripción NF- κ B puede tener un rol pro- o anti-apoptótico dependiendo del tipo y contexto celular. Hay evidencias que muestran que en este modelo de células sensibles a la acción de TNF- α , el NF- κ B tendría un rol anti-apoptótico y que si bien los GC son capaces de inhibir a este factor a través de la inducción del ARN mensajero de I κ B, tanto el GR como el NF- κ B inducen distintas señales protectoras en estas células (Costas et al., 2000)

Por último, sabemos ya que diferentes MAPKs fosforilan GR y que, diferentes MAPKs como JNK y p38 tienen efectos opuestos sobre sus actividades biológicas. Teniendo en cuenta estas observaciones y el hecho de que GR es una molécula relativamente grande con varios sitios potenciales de fosforilación, sería útil disponer de una batería de mutantes del GR en la cual sus serinas y treoninas sean reemplazadas por alaninas en forma alternativa. El uso de dicho conjunto de mutantes se encuentra entre las prioridades futuras a ensayar dado que nos permitirá evaluar más detalladamente el rol de la fosforilación en las actividades biológicas del GR.

Finalmente, hemos estudiado mecanismos moleculares de interacción regulatoria entre señales de respuesta a estrés, una citoquina inflamatoria y los receptores de glucocorticoides. Observamos que, cambios sutiles en los niveles de activación de estos distintos sistemas de transducción de señales pueden determinar el destino (vida o muerte) de la célula en modos que son dependientes del tipo celular.


Lorena Franco


MONICA A. COSTAS
DOCTORA EN BIOLOGICAS (U.B.A.)


P. D. LUGO

BIBLIOGRAFIA

Abe, M.K., Kahle, K.T., Saelzler, M.P., Orth, K., Dixon, J.E., and Rosner, M.R. (2001). ERK7 is an autoactivated member of the MAPK family. *J Biol Chem.* 276, 21272-21279.

Abe, M.K., Saelzler, M.P., Espinosa, R. 3rd., Kahle, K.T., Hershenson, M.B., Le Beau, M.M., and Rosner, M.R. (2002). ERK8, a new member of the mitogen-activated protein kinase family. *J Biol Chem.* 277, 16733-16743.

Abaddie, C., Kabrun, N., Bouali, F., Smardova, J., Stehelin, D., Vanderbunder, B., and Enrietto, P.J. (1993). High levels of c-rel expression are associated with programmed cell death in the developing avian embryo and in bone marrow cells in vitro. *Cell* 75, 899-912.

Adam, J.M., and Carry, S. (1998). The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281, 1322-1326.

Alkalay, I., Yaron, A., Hatzubai, A., Orian, A., Ciechanover, A., Ben-Neriah, Y. (1995). Stimulation-dependent I κ B phosphorylation marks the NF- κ B inhibitor for degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92, 10599-10603.

Almöf, T., Wright, A.P.H., and Gustaffson, J.A. (1995). *J.Biol.Chem.* 270, 17535-17540.

Arend W. P. and Massoni R. J. (1986). Characteristics of bacterial lipopolysaccharide induction of interleukin 1 synthesis and secretion by human monocytes. *Clin Exp Immunol.* 64, 656-664.

Armant, M., Delespesse, G., and Sarfati, M. (1995). IL-2 and IL-7 but not IL-12 protect natural killer cells from death by apoptosis and up-regulate bcl-2 expression. *Immunology.* 85, 331-337.

Armitage, R.J. (1994). Tumor necrosis factor receptor superfamily members and their ligands. *Curr Opin Immunol.* 6, 407-413.

Arya S.K., Wong-Stall F. and Gallo R.C. (1984). Dexamethasone-mediated inhibition of human T cell growth factor and gamma-interferon messenger RNA. *J Immunol.* 133, 273-276.

Ashkenazi, A., and Dixit, V.M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281, 1305-1308.

Auphan, N., DiDonato, J.A., Rosette, C., Helmberg A., and Karin, M. (1995). Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF- κ B activity through induction of I κ B synthesis. *Science* 270, 286-290.

Baeuerle, P.A., Henkel, T. (1995). Function and activation of NF- κ B in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 12, 141-179.

Baeuerle, P.A., Baichwal, V.R. (1997). NF- κ B as a frequent target for immunosuppressive and anti-inflammatory molecules. *Adv. Immunol.* 65, 111-136.

Bagby, G.J., Plessala, K.J., Wilson, L.A., Thompson, K.J., and Nelson, S. (1991). Divergent efficacy of antibody to tumor necrosis factor- α in intravascular and peritonitis models of sepsis. *J. Infect. Dis.* 163, 83-88.

Baldwin, A. S. (1996). The NF- κ B and I κ B proteins: new discoveries and insights. *Annu. Rev. Immunol.* 14, 649-681.

Barkett, M., and Gilmore, T. D. (1999). Control of apoptosis by Rel/NF- κ B transcription factors. *Oncogene*. 18, 6910-6924.

Beato, M., and Sanchez-Pacheco, A. (1996). Interaction of steroid hormone receptors with the transcription initiation complex. *Endocr. Rev.* 17 (6) 587-609.

Beg, A.A., Sha, W.C.m Bronson, R.T., Ghosh, S., and Baltimore, D. (1995). Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the Rel A component of NF- κ B. *Nature* 376, 167-170.

Ben-Levy, R., Hooper, S., Wilson, R., Paterson, H.F., and Marshall, C.J. (1998b). Nuclear export of the stress-activated protein kinase p38 mediated by its substrate MAPKAP kinase-2. *Curr. Biol.*, 8, 1049-1057.

Berghe, W.V., Plaisance, S., Boone, E., De Bosscher, K., Schmitz, M.L., Fiers, W., and Haegeman, G. (1998) p38 and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways are required for nuclear factor- κ B p65 transactivation mediated by tumor necrosis factor. *J. Biol. Chem.* 273, 3285-3290.

Beutler, B., Krochin, N., Milsark, I. W., Leudke, C., and Cerami, A. (1986). Control of cachectin (tumor necrosis factor) synthesis: mechanisms of endotoxin resistance. *Science*. 232, 977-980.

Beyaert, R., and Fiers, W. (1994). Molecular mechanisms of tumor necrosis factor-induced cytotoxicity. *FEBS Lett.* 340, 9-16.

Birbach, A., Gold, P., Binder, B.R., Hofer, E., de Martin, R., and Schimd, J.A. (2002). Signaling molecules of the NF- κ B pathway shuttle constitutively between cytoplasm and nucleus. *J. Biol. Chem.* 277, 10842-10851.

Birnboim, H.C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513-23.

Bodmer, J.L., Burns K, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, Thome M, Bornand T, Hahne M, Schroter M, Becker K, Wilson A, French LE, Browning JL, MacDonald HR, Tschopp J. (1997). TRAMP, a novel apoptosis-mediating receptor with sequence homology to tumor necrosis factor receptor 1 and Fas(Apo-1/CD95). *Immunity* 6, 79-88.

Bodwell, J.E., Orti, E., Coull, J.M., Pappin, L.I., Smith, F., and Swift, F. (1991). Identification of phosphorylated sites in the mouse glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.* 266, 7549-7555.

Bodwell, J.E., Webster, J.C., Jewell, C.M., Cidlowski, J.A., Hu, J.M., and Munck, A. (1998). Glucocorticoid receptor phosphorylation: overview, function and cell cycle-dependence. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 65, 91-99.

Boldin, M., Goncharov, T., Golstev, Y., and Wallach, D. (1996). Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 85, 803-815.

Bortner, C., and Cidlowsky, J.A. (1996). *Am. J. Physiol.* 271, C950-961.

Bortner, C., Hughes, F.M.Jr., and Cidlowsky, J.A. (1997). *J. Biol. Chem.* 272, 32436-32442.

Brenner, D.A., O'Hara, M., Angel, P., Chojkier, M., Karin, M. (1989). Prolonged activation of jun and collagenase genes by tumor necrosis factor- α . *Nature* 337, 661-663.

Brojatsch, J., Naughton, J., Rolls, M.M., Zingler, J.A., Young, J.A.T. (1996). CAR1, a TNFR-related protein, is a cellular receptor for cytopathic avian leukosis-sarcoma viruses and mediates apoptosis. *Cell* 87, 845-855.

Brostjan, C., Anrather, J., Csizmadia, V., Stroka, D., Soares, M., Bach, F. H., and Winkler, H. (1996). Glucocorticoid-mediated repression of NF κ B activity in endothelial cells does not involve induction of IkappaB α synthesis. *J Biol Chem.* 271, 19612-19616.

Caldenhoven, E., Liden, J., Wissink, S., Van de Stolpe, A., Raaijmakers, J., Koenderman, L., Okret, S., Gustafsson, J.A., and Van der Saag, P.T. (1995). Negative cross-talk between RelA and the glucocorticoid receptor: a possible mechanism for the anti-inflammatory action of glucocorticoids. *Mol. Endocrinol.* 9 (4) 401-412.

Cano, E., and Mahdevan, L. (1995). Parallel signal processing among mammalian MAPKs. *Trends Biochem. Sci.* 20, 117.

Castellino, F., Heuser, J., Marchetti, S., Bruno, B., and Luini, A. (1992). Glucocorticoid stabilization of actin filaments: a possible mechanism for inhibition of corticotropin release. *Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 3775-3779.

Chang, R.J. and Lee, S.H. (1986). Effects of interferon- γ and tumor necrosis factor- α on the expression of an Ia antigen on a murine macrophage cell line. *J. Immunol.* 137, 2853-2856.

Chen, Z., Hagler, J., Palombella, V. J., Melandri, F., Scherer, D., Ballard, D., Maniatis, T. (1995). Signal-induced site-specific phosphorylation targets IkB α to the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev.* 9, 1586-1597.

Cheng, E.H., Levine, B., Boise, L.H., Thompson, C.G., and Hardwick, J.M. (1996). Bax-independent inhibition of apoptosis by Bcl-XL. *Nature* 379, 554-556.

Chinnaiyan, A.M., O'Rourke K, Yu GL, Lyons RH, Garg M, Duan DR, Xing L, Gentz R, Ni J, Dixit VM.(1996). Signal transduction by DR3, a death domain-containing receptor related to TNFR-1 and CD95. *Science* 274, 990-992.

Chittenden, T., Flemington, C., Houghton, A.B., Ebb, R.G., Gallo, G.J., Elangovan, B., Chinnadurai, G., and Lutz, R.J. (1995). A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions. *EMBO J.* 14, 5589-5596.

Collins, T., Lapiere, L.A., Fiers, N., Strominger, J.L., and Pober, J.S. (1986). Recombinant human tumor necrosis factor increases mRNA levels and surface expression of HLA-A,B antigens in vascular endothelial cells and dermal fibroblasts in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83, 446-450.

Corey, S., (1995) Regulation of Lymphocyte Survival by the BCL-2 Gene Family *Annu. Rev. Immunol.* 13, 513-543.

Coso O.A., Chiarello M., Kalinec G., Kyriakis J.M., Woodgett J and Gutkind S., 1995. Transforming G protein-couple receptors potently activate JNK (SAPK). *J. Biol. Chem.* 270: 5620-5624.

Costas, M., Trapp, T., Páez Pereda, M., Sauer J., Ruprecht, R., Nahmod, V. E., Reul, J. M. H. M., Holsboer, F., Arzt, E. (1996). Molecular and functional evidence for in vitro cytokine enhancement of human and murine target cell sensitivity to glucocorticoids. *J Clin Invest.* 98, 1409-1416.

Costas, M.A., Muller Igaz, L., Holsboer, F., and Arzt, E. (2000). Transrepression of NF κ B is not required for glucocorticoid-mediated protection of TNF- α -induced apoptosis on fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta* 1499, 122-129.

Cuvillier, O., Pirianov, G., Kleuser, B., Vanek, P.G., Coso, O.A., Gutkind, J.S., and Spiegel, S. (1996) Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature* 381, 800-803.

Dahlman-Wright, K., Wright, A., Gustafsson, J.A., and Carlstedt Duke, J. (1991). Interaction of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain with DNA as a dimer is mediated by a short segment of five amino acids. *J. Biol. Chem.* 266, 3107-3112.

Danielian, P. S., White, R., Lees, J. A., and Parker, M. G. (1992). Identification of a conserved region requires for hormone dependent transcriptional activation by steroid hormone receptors. *EMBO J.* 11, 1025-1033.

Daufeldt, S., Lanz, R., Allera, A. (2003). Membrane-initiated steroid signaling (MISS): genomic steroid action starts at the plasma membrane. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 85, 9-23.

Davis, N., Ghosh, S., Simmons, D. L., Tempst, P., Liou, H. C., Baltimore, D., Bose, H. R. J. (1991). Rel-associated pp40: an inhibitor of the Rel family of transcription factors. *Science.* 253, 1268-1271.

Davis, R. (2000). Signal transduction by the JNK group of MAPK Kinases. *Cell* 103, 239.

- Derijard, B., Hibi, M., Wu, I., Barret, T., Su, B., Deng, T., Karin, M., and Davis, R. (1994). A protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-jun activation domain. *Cell* 76, 1025.
- DiDonato, J. A., Hayakawa, M., Rothwarf, D. M., Zandi, E., Karin, M. (1997). A cytokine-responsive I κ B kinase that activates the transcription factor I κ B α , NF- κ B. *Nature*. 388, 853-862.
- Dobson, A. D., Coneely, O. M., Beattie, W., Maxwell, B. L., Mak, P., Tsai, M. J., Schrader, W. T., and O'Malley, B. W. (1989) Mutational analysis of the chicken progesterone receptor. *J Biol Chem*. 264, 4207-4211.
- Foo, S.Y. and Nolan, G.P. (1999). NF-kappaB to the rescue: RELs, apoptosis and cellular transformation. *Trends Genet*. 15, 229-235.
- Freedman, L. P. (1999). Increasing complexity of coactivation in nuclear receptor signaling. *Cell*. 97, 5-8.
- Fukuda, M., Gotoh, Y., and Nishida, E. (1997). Interaction of MAP kinase with MAP kinase kinase: its possible role in the control of nucleocytoplasmic transport of MAP kinase. *EMBO J*. 16, 1921-1933.
- Ge, B., Gram, H., Di Padova, F., Huang, B., New, L., Ulevitch, R.J., Luo, Y., and Han, J. (2002). MAPKK-independent activation of p38alpha mediated by TAB1-dependent autophosphorylation of p38alpha. *Science* 295, 1291.
- Ghosh, S., May, M.J., and Kopp, E.B. (1998). NF- κ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol*. 16, 225-260.
- Ghosh, S., and Karin, M. (2002). Missing pieces in the NF- κ B puzzle. *Cell* 109, 81-96.
- Gilmore, T. D., Koedood, M. Piffat, K. A., White, D. W. (1996). Rel/ NF-kappaB/IkappaB proteins and cancer. *Oncogene*. 13, 1367-1378.
- Godowski, P. J., Picard, D., and Yamamoto, K. R. (1988). Signal transduction and transcriptional regulation by glucocorticoid receptor-LexA fusion proteins. *Science*. 241, 812-816.
- Green, D.R., and Reed, J.C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309-1312.
- Gross, A., McDonnell, J.M., and Korsmeyer, S.J. (1999). BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*. 13, 1899-1911.
- Guttridge, D. C., Albanese, C., Reuther, J.Y., Pestell, R. G., and Baldwin, A. S., (1999). NF- κ B controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. *Mol. Cell Biol*. 19, 5785-5799.

Hakem, R., Hakem, A., Duncan, G.S., Henderson, J.T., Woo, M., Soengas, M.S., Elia, A., de la Pompa, J.L., Kagi, D., Khoo, W., Potter, J., Yoshida, R., Kaufman, S.A., Lowe, S.W., Penninger, J.M., and Mak, T.W. (1998). Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo. *Cell* 94, 339-352.

Ham, J., and Parker, M. G. (1989). Regulation of gene expression by nuclear hormone receptors. *Curr Opin Cell Biol.* 1, 503-511.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J.Mol. Biol.* 166, 557-580.

Harrison R.J., McNeil, G.P., and Dohner, P.R. (1995) Synergistic activation of neurotensin/neuromedin N gene expression by c-Jun and glucocorticoids: novel effects of Fos family proteins. *Mol. Endocrinol.* 9 (8) 981-993.

Haskill, S., Beg, A. A., Tompkins, S. M., Morris, J. S., Yurochko, A. D., Sampson-Johannes, A., Mondal, K., Ralph, P., Baldwin, A. S. (1991). Characterization of an immediate-early gene induced in adherent monocytes that encodes I κ B-like activity. *Cell.* 65, 1281-1289.

Hennet, T., Richter, C., Peterhans, E. (1993). Tumor necrosis factor- α induces superoxide anion generation in mitochondria in L929 cells. *Biochem J.* 289, 587-592.

Hoffmann, A., Levchenko, A., Scott, M.L., and Baltimore, D. (2002). The I κ B-NF- κ B signaling module: Temporal control and selective gene activation. *Science.* 298: 1241-1245.

Hohmman, H., Brockhaus, M., Bauerle, P. A., Remy R., Kolbeck R., and van Loon AP. (1990). Expression of the types A and B tumor necrosis factor (TNF) receptors is independently regulated, and both receptors mediate activation of the transcription factor NF-kappa B. TNF alpha is not needed for induction of a biological effect via TNF receptors. *J. Biol. Chem.* 25, 22409-22417

Housley, P. R., Sanchez, E. R., Danielsen, M., Ringold, G. M, and Pratt, W. (1990). Evidence that the conserved region in the steroid-binding domain of the glucocorticoid receptor is required for both optimal binding of the hsp90 and protection from proteolytic cleavage. *J Biol Chem.* 265, 12778-12781.

Hsu, H., Xiong, J., Goeddel, D. V. (1995). The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF- κ B activation. *Cell.* 81, 495-504.

Hsu, H., Shu, H. B., Pan, M. G., Goeddel, D. V. (1996). TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell.* 84, 299-308.

Huang, B., Eberstadt, M., Olejniczak, E.T., Medows, R.P., and Fesik, S.W. (1996). NMR structure and mutagenesis of the Fas (APO-1/CD95) death domain. *Nature* 384, 638-641.

Hunot, S., Brugg, B., Ricard, D., Michel, P.P., Muriel, M.P., Ruberg, M., Faucheux, B.A., Agid, Y., and Hirsch, E.C. (1997). Nuclear translocation of NF- κ B is increased in dopaminergic neurons of patients with parkinson disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 7531-7536.

Ip, Y.T., and Davis, R.J.(1998). Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)--from inflammation to development. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 205-219.

Jenkins, B.D., Pullen, C.B., and Darimont, B.D. (2001) Novel glucocorticoid receptor coactivator effector mechanism. *Trends Endocrinol. Metab.* 12 (3) 122-126.

Jirillo, E., Greco, B., Caradonna, L., Satalino, R., Pugliese, V., Cozzolongo, R., Cuppone, R., and Manghisi, O.G. (1995). Evaluation of cellular immune responses and soluble mediators in patients with chronic hepatitis C virus (cHCV) infection. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 17, 347-64.

Johnson, G.L., and Lapadat, R. (2002). Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways Mediated by ERK, JNK, and p38 Protein Kinases. *Science* 298, 1911-1912.

Jonat, C., Rahmsdorf, H.J., Park, K.K., Cato, A.C., Gebel, S., Ponta, H., and Herrlich, P. (1996). Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (Fos/jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell* 62, 1189-1204.

Kallunki, T., Su, B., Tsigelny, I., Sluss, H.K., Dériard, B., Moore, G., Davis, R., and Karim, M. (1994). JNK2 contains a specificity-determining region responsible for efficient c-Jun binding and phosphorylation. *Genes Dev.* 8, 2996-3007.

Kaltschmidt, B., Uherek, M., Volk, B., Baeuerle, P. A., Kaltschmidt, C. (1997). Transcription factor NF- κ B is activated in primary neurons by amyloid beta peptides and in neurons surrounding early plaques from patients with Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94, 2642-2647.

Karim, M., and Ben-Neriah, Y. (2000). Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 621-663.

Karin, M., and Lin, A. (2002). NF- κ B at the crossroads of life and death. *Nat Rev Immunol.* 3, 221-227.

Kent, S., Bluthé, R., Kelley, K. and Dantzer, R. (1992) Sickness behavior as a new target for drug development. *Trends Pharmacol Sci.* 13, 24-28.

Kerr, J.F.R., Wylile, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-257.

Khokhlatchev, A., Canagarajah, B., Wilsbacher, J., Robinson, M., Atkinson, M., Goldsmith, E., and Cobb, M. (1998). Phosphorylation of the MAP kinases ERK2 promotes its Homodimerization and Nuclear Translocation. *Cell* 93, 605.

King, L.B., Vacchio, M.S., Dixon, K., Hunziker, R., Margulies, D.H., and Ashwell, J.D. (1995). A targeted glucocorticoid receptor antisense transgene increase thymocyte apoptosis and alters thymocyte development. *Immunity* 3, 647-656.

Kitson, J., Raven T, Jiang YP, Goeddel DV, Giles KM, Pun KT, Grinham CJ, Brown R, Farrow SN. (1996). A death-domain-containing receptor that mediates apoptosis. *Nature* 384, 372-375.

Kopp, E., and Ghosh, S. (1995). NF- κ B and rel proteins in innate immunity. *Adv Immunol.* 58, 1-27.

Knudsen, P. J., Dinarello, C. A., and Strom, T. B. (1987). Glucocorticoids inhibit transcriptional and post-transcriptional expression of interleukin 1 in U937 cells. *J Immunol.* 139, 4129-4134.

Kroemer, G. (1997). The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nature Med.* 3, 614-620.

Krstic, M.D., Rogatsky, I., Yamamoto, K.R., and Garebedian, M.J. (1997). Mitogen-activated and cyclin-dependent protein kinases selectively and differentially modulate transcriptional enhancement by the glucocorticoid receptor. *Mol. Cell Biol.* 17 (7) 3947-3954.

Lenormand, P., Sardet, C., Pages, G., L'Allemain, G., Brunet, A., and Pouyssegur, J. (1993). Growth factors induce nuclear translocation of MAP Kinases (p42 and p44) but not of their activator MAP Kinase Kinase (p45) in fibroblast. *J. Cell Biol.* 122, 1079.

Li, Q., Van Antwerp, D., Mercurio, F., Lee, K.F., and Verma, I.M. (1999b). Severe liver degeneration in mice lacking the I κ B kinase 2 gene. *Science* 284, 321-325.

Li, Q., and Verma, I.M. (2002). NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2 (10): 725-734.

Li, W., Kennedy, S.G., and Ruvkin, G. (2003). daf-28 encodes a *C. elegans* insulin superfamily member that is regulated by environmental cues and acts in the DAF-2 signaling pathway. *Genes and Dev.* 2003, 17:629-637

Liepinsh, E., Otting, G., and Ibanez, C.F. (1997). NMR structure of the death domain of the p75 neurotrophin receptor. *EMBO J.* 16, 4999.

Liew, R.Y., Li, Y. and Millot, S. (1990). Tumor necrosis factor-alpha synergizes with IFN-gamma in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. *J. Immunol.* 145, 4306-4310.

Liu, Z.G., Hsu, H., Goeddel, D.V., and Karin, M. (1996). Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. *Cell* 87, 565-576.

Luisi, B.F., Xu, W.X., Otwinowski, Z., Freedman, L.P., Yamamoto, K.R., and Sigler, P.B. (1991). *Nature* 352, 497-505.

- Luque, I., G  linas, C. (1997). Rel/NF-kappa B and I kappa B factors in oncogenesis. *Semin. Cancer Biol.* 8, 103-111.
- Mackay, C.R., and Imhof, B.A. (1993). Cell adhesion in the immune system. *Immunol. Today.* 14, 99-102.
- Marsters, S., Pitti R.M., Donahue C.J., Ruppert S., Bauer K.D., and Ashkenazi A. (1996). Activation of apoptosis by Apo-2 ligand is independent of FADD but blocked by CrmA. *Curr. Biol.* 6, 1750-1752.
- Martin-Blanco, E. (2000). p38 MAPK signalling cascade: ancient roles and new functions. *Bio. Essays* 22, 637.
- Mason, S.A., and Housley, P.A. (1993) *J.Biol.Chem.* 268, 21501-21504.
- Mathison, J.C., Wolfson, E., and Ulevitch, R.J. (1988). Participation of tumor necrosis factor in the mediation of Gram negative bacterial lipopolysaccharide-induced injury in rabbits. *J.Cin. Invest.* 81, 1925-1937.
- Mayo, M.W., Wang, C.Y., cogswell, P.C., Roger-Graham, K.S., Lowe, S.W., Der, C.J., and Baldwin Jr, A.S. (1997). Requirement of NF-kB activation to supress p53-independent apoptosis induced by oncogenic Ras. *Science* 278, 1812-1815.
- McEwen, B. S. (1999). Stress and hippocampal plasticity. *Annu Rev Neurosci.* 22, 105-122.
- McKenna, N. J., Lanz, R. B., and O'Malley, B. W. (1999). Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocrine Reviews.* 20, 321-344.
- Mercurio, F., Zhu, H., Murray, B. W., Schevchenko, A., Bennett, B. L., Li, J., Young, D., Barbosa, M., Mann, M., Manning, A. M., Rao, A. (1997). IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated Ikb kinases essential for NF-kB activation. *Science.* 278, 860-866.
- Miller, B.S., and Zandi, E. (2001). Complete reconstitution of human Ikb kinase (IKK) complex in yeast. Assessment of its stoichiometry and role of IKK   on the complex activity in the absence of stimulation. *J.Biol.Chem.* 276, 36320-36326.
- Misteli, T., and Spector, D.L. (1999). RNA polymerase II targets pre-mRNA splicing factors to transcription sites in vivo. *Mol Cell.* 3, 697-705.
- Miyata, Y., and Yahara, I. (1991). Cytoplasmatic 8S glucocorticoid receptor binds to actin filaments trough the 90-kDa heat shock protein moiety. *J. Biol. Chem.* 266, 8779-8783.
- Monney, L., Olivier, R., Otter, I., Jansen, B., Poirier, G., and Borner, C. (1998). Role of an acidic compartment in tumor-necrosis-factor-  -induced production of ceramide, activation of caspase-3 and apoptosis. *Eur. J. Biochem.* 251, 295-303.

- Montague, J.W., Bortner, C., Hughes, F.M.Jr., and Cidlowsky, J.A. (1999). A necessary role for reduced intracellular potassium during the DNA degradation phase of apoptosis. *Steroids* 64, 563-569.
- Moras, D., and Gronemeyer, H. (1998). The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. *Curr Op in Cell Bio.* 10, 384-391.
- Morrison, D.C. and Ryan, J.L. (1987). Endotoxin and disease mechanism. *Annu. Rev. Med.* 38: 417-432.
- Morrison, N., and Eisman, J. (1993). Role of the negative glucocorticoid regulatory element in glucocorticoid repression of the human osteocalcin promoter. *J.Bone Miner. Res.* 8 (8) 969-975.
- Muzio, M., Stockwell, B.R., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., and Dixit, V.M. (1998). An induced proximity model for caspase-8 activation. *J. Biol. Chem.* 273, 2926-2930.
- Nicholson, D.W., and Thornberry, N.A. (1997). Caspases: killer proteases. *Trends. Biochem. Sci.* 22, 299-306.
- New, L., Jiang, Y., and Han, J. (2003). Regulation of PRAK subcellular location by p38 MAP kinases. *Mol. Biol. of the Cell* 14, 2603-2616.
- Ohlsson, K., Bjork, P., Bergenfeld, M., Hageman, R., and Thompson, R.C. (1990). Interleukin-1 receptor antagonist reduces mortality from endotoxin shock. *Nature* 348, 550-552.
- Okada, Y., Maeno, E., Shimizu, T., Dezaki, K., Wang, J., and Morishima, S. (2001). Receptor-mediated control of regulatory volume decrease (RVD) and apoptotic volume decrease (AVD). *J Physiol.* 532, 3-16.
- Okusawa, S., Gefand, J.A., Ikejima, T., Connolly, R.J., and Dinarello, C.A. (1988). Interleukin-1 induces a shock like state in rabbits: synergism with tumor necrosis factor and the effect of cyclooxygenase inhibitor. *J. Clin. Invest.* 81, 1162-1172.
- Oltvai, Z.N., and Korsmeyer, S.J. (1994). Check-points of dueling dimers foil death wishes. *Cell* 79, 189-192.
- Orti, E., Mendel, D.B., Smith, L.I., and Munck, A. (1989). Agonist-dependent phosphorylation and nuclear dephosphorylation of glucocorticoid receptors in intact cells. *J.Biol. Chem.* 264 (17) 9728-9731.
- Osborn, L., Kunkel, S., Nabel, G. J. (1989). Tumor necrosis factor α and interleukin 1 stimulate the human immunodeficiency virus enhancer by activation of the nuclear factor κ B. *Proc Natl Acad Sci USA.* 86, 2336-2340.
- Pahl, H.L. (1999). Activators and target genes of Rel/ NF- κ B transcription factors. *Oncogene* 18, 6853-6866.
- Pan, G., O'Rourke, K., Chinnaiyan, A.M., Gentz, R., Ebner, R., Ni, J., and Dixit, V.M. (1997). The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science* 276, 111-113.

Pearce, D., and Yamamoto, K.R. (1993) Mineralocorticoid and glucocorticoid receptor activities distinguished by nonreceptor factors at a composite response element. *Science* 259 (5098) 1161-1165.

Pedob, V.A., Voelber, D.R., Campbell, P.A., Cohen, J.J., Brotton, D.L., Heonen, P.M. (1992). Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes trigger specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 148, 2207-2216.

Perkins, N. D. (1997). Achieving transcriptional specificity with NF- κ B. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29, 1433-1448.

Peters, R.T. et al. (2000). IKK ϵ is part of a novel PMA-inducible I κ B kinase complex. *Mol. Cell* 5: 513-522.

Picard, D., and Yamamoto, K. R. (1987). Two signals mediate hormone-dependent nuclear localisation of the glucocorticoid receptor. *EMBO J.* 6, 3333-3340.

Polla, B. S., Jacquier-Sarling, M. R., Kantengwa, S., Mariéthoz, E., Hennet, T., Russo-Marie, F., Cossarizza, A. (1996). TNF- α alters mitochondrial membrane potential in L929 but not in TNF- α -resistant L929.12 cells: relationship with the expression of stress proteins, annexin 1 and superoxide dismutase activity. *Free Rad Res.* 25, 125-131.

Pratt, W.B., and Ditmar, K.D. (1998). Studies with purified chaperones advance the understanding of the mechanism of glucocorticoid receptor-hsp90 heterocomplex assembly. *Trends Endocrinol. Metab.* 9 (6) 244-252.

Qiutang, L., and Verma, I.M. (2002). NF- κ B in the Immune system. *Nature. Rev. Immunol.* 2, 725-734.

Ranges, G.E., Zlotnik, A., Espevik, T., Dinarello, C.A., Cerami, A., and Palladino, M.A. Jr. (1988). Tumor necrosis factor alpha/cachectin is a growth factor for thymocytes. Synergistic interactions with other cytokines. *J. Exp. Med.* 167, 1472-1478.

Rayet, B., and Gelinas, C. (1999). Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer. *Oncogene.* 18, 6938-6947.

Reid, T., Louie, P., Heller, R. A. (1995). Mechanisms of tumor necrosis factor cytotoxicity and the cytotoxic signals transduced by the p75-tumor necrosis factor receptor. *Circulatory Shock.* 44, 84-90.

Rogatsky, I., Logan, S.K., and Garebedian, M.J. (1998). Antagonism of glucocorticoid receptor transcriptional activation by the c-jun N-terminal kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 2050-2055.

Rogatsky, I., Waase, C.L., and Garebedian, M.J. (1998). Phosphorylation and inhibition of rat glucocorticoid receptor transcriptional activation by glycogen synthase kinase-3 (GSK-3). Species-specific differences between human and rat glucocorticoid receptor signalling as revealed through GSK-3 phosphorylation. *J.Biol.Chem.* 273, 14315-14321.

Rothe, J., Lesslauer, W., Lotscher, H., Lang Y., Koebel P., Kontgen F., Althage A., Zinkernagel R., Steinmetz M., and Bluethmann H. (1993). Mice lacking the tumour necrosis factor receptor 1 are resistant to TNF-mediated toxicity but highly susceptible to infection by *Listeria monocytogenes*. *Nature* 364, 798-802.

Rothe, M., Wong, S. C., Henzel, W. J., and Goeddel, D. V. (1994). A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmatic domain of the p75 Kda tumor necrosis factor receptor. *Cell*, 78, 681-692.

Rudolph, D. (2000). Severe liver degeneration and lack of NF- κ B activation in NEMO/IKK gamma deficient mice. *Genes Dev.* 14, 854-862.

Sambrook, J., Fritsch, E., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning, a laboratory manual*. En C.S.H.L. Press (eds.), Cold Spring Harbor, New York.

Sakai, D.D., Helms, S., Carlstedt-Duke, J., Gustafsson, J.A., Rottman, F.M., and Yamamoto, K.R. (1988) Hormone-mediated repression: a negative glucocorticoid response element from the bovine prolactin gene. *Genes Dev.* 2 (9) 1144-1154.

Scheinman, R.I., Gualberto, A., Jewell, C.M., Cidlowski, J.A., and Baldwin, A.S. (1995). Characterization of mechanisms involved in transrepression of NF-kappa B by activated glucocorticoid receptors. *Mol. Cell Biol.* 15 (2) 943-953.

Scheinman, R.I., Cogswell, P.C., Lofquist, A.K., and Baldwin, A.S. Jr. (1995). Role of transcriptional activation I κ B α in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. *Science* 270, 283-286.

Schirmer, W.J., Schirmer, J.M. and Fry, D.E. (1989). Recombinant human tumor necrosis factor produces hemodynamic changes characteristic of sepsis and endotoxemia. *Arch. Surg.* 124, 445-448.

Schneider P, Bodmer JL, Thome M, Hofmann K, Holler N, Tschopp J. (1997). Characterization of two receptors for TRAIL. *FEBS Lett.* 416: 329-334.

Schutze, S., Patthoff, K., Machleidt, T., Bercovic, D., Wiegmann, K., Kronke, M. (1992). TNF activates NF-kappa B by phosphatidylcholine-specific phospholipase C-induced "acidic" sphingomyelin breakdown. *Cell* 71, 765-776.

Screaton, G.R., Xu, X.N., Olsen, A.L., Cowper, A.E., Tan, R., McMichael, A.J., Bell, J.I. (1997). LARD: a new lymphoid-specific death domain containing receptor regulated by alternative pre-mRNA splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 4615-4619.

Screaton, G.R., Mongkolsapaya, J., Xu, X.N., Cowper, A.E., McMichael, A.J., Bell, J.I. (1997). TRICK2, a new alternatively spliced receptor that transduces the cytotoxic signal from TRAIL. *Curr Biol.* 7, 693-696.

Sen, R., and Baltimore, D. (1986). Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 46, 705-716.

- Sizemore, N., Lerner, N., Dombrowski, N., Sakurai, H., and Stark, G.R. (2002) Distinct roles of the I κ B kinase alpha and beta subunits in liberating nuclear factor kappa B (NF-kappa B) from I κ B and in phosphorylating the p65 subunits of NF-kappa B. *J. Biol. Chem.* 277, 3863-3869.
- Smith, C.A., Farrah, T., and Goodwin, R.G. (1994). The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* 76, 959-962
- Solan, N.J., Miyoshi, H., Carmona, E.M., Bren, G.D., and Paya, C.V. (2002). Rel B cellular regulation and transcriptional activity are regulated by p100. *J. Biol. Chem.* 277, 1405-14018.
- Steller, H. (1995) Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 267, 1445-1449.
- Tanouse, T., Maeda, R., Adachi, M., and Nishida, E. (2001). Identification of a docking groove on ERK and p38 MAP kinases that regulates the specificity of docking interactions. *EMBO J.* 20, 466-479.
- Tartaglia, L.A., and Goeddel, D.V. (1992). Two TNF receptors. *Immunol Today.* 13, 151-153.
- Thompson, C.B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267: 1456.
- Tobler, A., Meier, R., Seitz, M., Dewald, B., Baggiolini, M., and Fey, M. F. (1992). Glucocorticoids downregulate gene expression of GM-CSF, NAP-1/IL-8, and IL-6, but not of M-CSF in human fibroblasts. *Blood.* 79, 45-51.
- Tracey, K.J., Beutler, B., and Lowry, S.F. (1986). Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science* 234, 470-474.
- Tracey, K.J., Fong, Y., and Hesse, D.G. (1987). Anti cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteremia. *Nature* 330, 662-664.
- Trapp, T., Rupprecht, R., Castrén, M., Reul, J.M.H.M., Holsboer, F., (1994). Heterodimerization between mineralocorticoid and glucocorticoid receptor: a new principle of glucocorticoid action in the CNS. *Neuron.* 13: 1457-1462.
- Tsai, M. J., and O'Malley, B. W. (1994). Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem.* 63, 451-486.
- Van Antwerp, D.J., Martin, S.J., Kafri, T., Green, D.R., and Verma, I.M. (1996). Suppression of TNF-alpha-induced apoptosis by NF-kappaB. *Science* 274, 787-789.
- Van Der Poll, T., and Sauerwein, H. P. (1993). Tumour necrosis factor-alpha: its role in the metabolic response to sepsis. *Clinical Science.* 84, 247-256.
- Vandenabeele, P., Declercq, W., Beyaert, R., Fiers, W. (1995). Two tumor necrosis factor receptors: structure and function. *Trends Cell Biol.* 5, 392-399.

- Verma, I.M., Stevenson, J.K., Schwarz, E.M., Van Antwerp, D., Miyamoto, S. (1995). Rel/ NF- κ B/I κ B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes Dev.* 9, 2723-2735.
- Villiger, P.M., Terkeltaub, R., and Lotz M. (1992). Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) expression in human articular cartilage. Induction by peptide regulatory factors and differential effects of dexamethasone and retinoic acid. *J Clin Invest.* 90, 488-496.
- Voelkel-Johnson, C., Entingh, A.J., Wold, W.S.M., Gooding, L.R., Laster, S.M. (1995). Activation of intracellular proteases is an early event in TNF-induced apoptosis. *J Immunol.* 154, 1707-1716.
- Waage, A., Slupphaug, G., and Shalaby R. (1990). Glucocorticoids inhibit the production of IL6 from monocytes, endothelial cells and fibroblasts. *Eur J Immunol.* 20, 2439-2443.
- Walczak, H., Degli-Esposti, M.A., Johnson, R.S., Smolak, P.J., Waugh, J.Y., Boiani, N., Timour, M.S., Gerhart, M.J., Schooley, K.A., Smith, C.A., Goodwin, R.G., Rauch, C.T. (1997). TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *EMBO J.* 16, 5386-5397.
- Wang, C.Y., Mayo, M.W., and Baldwin, A.S. (1996). TNF-and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF- κ B. *Science.* 274, 784-787.
- Webster, J.C., Jewell, C.M., Bodwell, J.E., Munck, A., Sar, M., and Cidlowski, J.A. (1997). Mouse glucocorticoid receptor phosphorylation status influences multiple functions of the receptor protein. *J.Biol. Chem.* 272 (14) 9287-9293.
- Wirth, J.J., and Kierszenbaum, R. (1988). Recombinant tumor necrosis factor enhances macrophage destruction of *Trypanosoma cruzi* in the presence of bacterial endotoxin. *J. Immunol.* 141, 286-288.
- Wrange, O., Eriksson, P., and Perlmann, T. (1989) The purified activated glucocorticoid receptor is a homodimer. *J.Biol. Chem.* 264 (9) 5253-5259.
- Wride, M.A., and Sanders, E.J. (1995). Potential roles for tumour necrosis factor alpha during embryonic development. *Anat. Embryol.* 191, 1-10.
- Wu, X., Noh. S.J., Zhou, G., Dixon, J.E., and Guan, K.L. (1996). Selective Activation of MEK1 but Not MEK2 by A-Raf from Epidermal Growth Factor-stimulated Hela Cells. *J. Biol. Chem.* 271, 3265-3271.
- Xia, Z., Dickens, M., Raingeaud, J., Davis, R., and Greenberg, M.E. (1995). Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 270, 1326-1331.
- Xiao, G., Harthaj, E.W., and Sun, S.C. (2001). NF- κ B-inducing kinase regulates the processing of NF- κ B2 p100. *Mol. Cell* 7, 401-409.

Yokota, S., Geppert, T.D., and Lipsky, P.E. (1988). Enhancement of antigen- and mitogen-induced human T lymphocyte proliferation by tumor necrosis factor- α . *J. Immunol* 140, 531-536.

Yoshida et al., *J. Hum. Genet.* 2001 46:182-187

Zacharchuk, C., Mercep, M., Chakraboti, P., Simons, S., and Ashwell, J. D. (1990). Programmed T lymphocyte death. Cell activation- and steroid-induced pathways are mutually antagonistic. *J Immunol.* 145, 4037-4045.

Zheng-gang, L., Hailing, H., Goedel, D.V., and Karim, M. (1996). Dissection of TNF Receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF- κ B activation prevents cell death. *Cell* 87, 565-576.

Zou, H., Henzel, W.J., Liu, X., Lutschg, A., and Wang, X. (1997). Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90, 389-390.