

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE MEDICINA
Dpto. de BIOQUÍMICA MÉDICA Y
BIOLOGÍA MOLECULAR

15

339

11 ENE. 1999

Alvaro Caffre

**ESTRÉS OXIDATIVO EN LEUCOCITOS: IMPLICACIÓN
DE LA NADPH-OXIDASA,
DE LA CALCINEURINA,
Y DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN
NF- κ B Y STAT 3**

MODESTO J. CARBALLO ÁLVAREZ
SEVILLA 1999

15
439



DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA MÉDICA Y
BIOLOGÍA MOLECULAR
UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE MEDICINA

**ESTRÉS OXIDATIVO EN LEUCOCITOS: IMPLICACIÓN
DE LA NADPH-OXIDASA,
DE LA CALCINEURINA,
Y DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN
NF- κ B Y STAT 3**

Memoria que presenta Modesto Carballo Álvarez para optar al grado de
Doctor en Biología por la Universidad de Sevilla

Director: Dr. Francisco Sobrino Beneyto

Profesor Titular de la Universidad de Sevilla, Facultad de Medicina

Sevilla, Diciembre de 1998

Francisco Sobrino, Doctor en Ciencias Químicas, Profesor Titular de la
Universidad de Sevilla, Facultad de Medicina,

CERTIFICA: Que Modesto Carballo Álvarez licenciado en Biología por la Universidad de
Sevilla, ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación correspondiente a su
Tesis Doctoral con el título:

**“Estrés oxidativo en leucocitos: implicación de la NADPH-oxidasa, de la
calcineurina, y de los factores de transcripción NF- κ B y STAT3”**

Revisado este trabajo, el que suscribe considera el trabajo realizado
satisfactorio y autoriza su presentación para ser juzgado.

Y para que así conste y a los efectos oportunos, firmo el presente certificado
en Sevilla a 19 de Diciembre 1998



A handwritten signature in black ink, appearing to read "Francisco Sobrino Beneyto".

Fdo.: Francisco Sobrino Beneyto

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Modesto Carballo Álvarez". Below it is a shorter, more stylized signature.

A mi abuelo, Francisco Álvarez Medina

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas, familiares y amigos, a las que he de agradecer todo el apoyo y ánimo que he recibido durante la realización de este trabajo, pero hay una persona que se destaca por encima de todas las demás, esa persona eres tú, abuelo. Quiero agradecerte todo lo que me has dado, apoyo, consejos y eso que te rebosa y te sobra, Fe. Tú has sido amigo, padre y desde luego abuelo. Cuantas veces te has levantado para tomarme la lección, cuantas explicaciones, cuantos ratos me has dedicado, por esto y por mucho más te doy las gracias. Abuelo hay otras personas que también me han ayudado mucho. Está mi madre, a la que agradezco todos sus consejos y el hacerme saber que siempre estará para lo que me haga falta, a la abuela que sin tener estudios me ha aconsejado muchas veces mejor que nadie, a mis hermanos que nunca han dejado de estar ahí y a la niña que tantas visitas me hacía cuando estudiaba en mi cuarto que ahora es el suyo. Gracias también a mi suegra Ángeles, por interesarse por mi trabajo, a mi cuñado Germán por su ayuda gráfica, y a mi reciente sobrina Tábata.

Abuelo quiero que sepas que este trabajo nunca hubiera sido posible sin la ayuda de Paco. Llegue al Departamento, el 26 de Noviembre de 1994 de la mano de Manuel Dorado, al que agradezco me pusiera en contacto con él. A Paco le agradezco que me dejase trabajar en su laboratorio y me dirigiese esta tesis. Con Paco he aprendido muchas cosas, pero sobre todo a investigar. Gracias Paco por enseñarme.

Abuelo la otra gran parte de mi formación científica y humana se la debo a mis compañeros del "*Yema Club*". Agradezco a Paco Bedoya, y Elizabeth Pintado la confianza que me han dado, a Remedios Ramírez, Juan Jiménez, y María Luisa Pita sus consejos y críticas. Agradezco a toda la gente SONCHA: Rocío, Yolanda, Karim, César, Juan, Gladys, Fredy, Rajaa, Pablo su amistad y ayuda, pero sobre todo a Manuel Conde y Gracia Márquez que fueron mis primeros y más directos maestros. Le agradezco también a la gente del Servicio Regional de Inmunología y Alergia en el Hospital Virgen Macarena de Sevilla: M^a Jesús, Inés, Julio, Mercedes, Fidel, Carmen, Mónica su ayuda y simpatía, a la gente de extracciones de sangre: Isabel Torres y María Siles su colaboración desinteresada. Gracias a los donantes de sangre anónimos. También quiero dar las gracias muy especialmente a los profesores José Conde y Javier Monteseirín por su acogida en ese Servicio.

Les llega el turno ahora a mis amigos que nada tienen que ver con mi trabajo, aquellos que sin saber que es un inmunobloting, ni para que sirve, han estado aguantando todos mis rollos. Gracias a Pilar, Chica, Juanma, Juan David, Juan Carlos. Gracias también a Carmen, Joaquín, Tere, y Maricarmen por todo su cariño. Gracias a todo ellos.

También agradezco la ayuda a personas de otros Departamentos, como a Francisco González-Vilchez y Rosario Vilaplana del Departamento de Química Inorgánica por su colaboración, a José Martín-Nieto de la Universidad de Alicante, División de Genética por su espléndida ayuda a la hora de que estos angloparlantes nos acepten nuestra pequeña contribución a la Ciencia. Gracias de veras Pepe.

No, abuelo, no me he olvidado de ella. A mi mujer le debo el llegar a donde he llegado, el ser Bichólogo y a ella le doy las gracias por haberme aguantado tanto, mis gritos, mis malos modos y cuando lo pagaba con ella. Gracias bonita por todo.



La inspiración existe, pero tiene que encontrarte trabajando
PICASSO

Los resultados aquí presentados se recogen en las siguientes referencias:

1.- Modesto Carballo, Vilaplana, R., Márquez, G., Conde, M., Bedoya, F. J., González-Vilchez, F., and Sobrino, F. (1997) A newly synthesized molecule derived from ruthenium cation, with antitumour activity, activates NADPH oxidase in human neutrophils *Biochem. J.* **328**, 559-564

2.- Modesto Carballo, Márquez, G., Conde, M., Martín-Nieto, J., Monteseirín, J., Conde, J., Pintado, E., and Sobrino, F. (1999) Characterization of calcineurin in human neutrophils. Inhibitory effect of hydrogen peroxide on its enzyme activity and on NF- κ B DNA binding *J. Biol. Chem.* **274**, 93-100

3.- Modesto Carballo, Conde, M., El Bekay, R., Bedoya, F. J., Camacho, M. J., Monteseirín, J., Conde, J., Sobrino, F. (1999) Oxidative stress triggers STAT3 tyrosine phosphorylation and nuclear translocation in human lymphocytes *J. Biol. Chem.* (en prensa)

ABREVIATURAS	11
INTRODUCCIÓN	13
1.- CÉLULAS	14
1.1.- Neutrófilos	14
1.2.- Linfocitos	15
2.- PRODUCCIÓN DE RADICALES LIBRES DE OXÍGENO. EL ESTALLIDO RESPIRATORIO	18
3.- INTERMEDIARIOS REACTIVOS DE OXÍGENO (ROIs)	19
4.- NADPH-OXIDASA	20
5.- FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN	23
5.1.- Factor nuclear kappa B (NF- κ B)	23
5.2.- Factor nuclear de células T (NF-AT)	26
6.- CALCINEURINA	29
6.1.- Nuevos aspectos sobre la calcineurina y la inmunosupresión	32
7.- VÍA DE LAS JAK-STAT	34
7.1.- Proteínas JAKs (Quinasas Jano)	34
7.2.- Proteínas STATs (Transductoras de Señales y Activadoras de la Transcripción)	36
7.3.- STAT3	37
7.4.- Inhibidores de la vía JAK/STAT	37
OBJETIVOS	41
MATERIAL Y MÉTODOS	42
1.- Preparación de neutrófilos y linfocitos	43
2.- Obtención de proteínas citosólicas y de membrana en neutrófilos humanos	44
3.- Medida de la producción de anión superóxido en neutrófilos humanos	44
4.- Revelado de proteínas por quimioluminiscencia en membranas: método de quimioluminiscencia con luminol e iodofenol	45
5.- Medición del calcio intracelular (Fura-2AM)	46
6.- Medida de la actividad calcineurina en neutrófilos humanos	48

7.- Obtención de proteínas citosólicas y nucleares de linfocitos humanos para experimentos de western blotting e inmunoprecipitación	51
8.- Análisis del cambio en la movilidad electroforética	53
9.- Relación de tampones	60
RESULTADOS	64
1.- Una nueva molécula derivada de cationes de rutenio, con actividad antitumoral, activa la NADPH oxidasa en neutrófilos humanos.	65
2.- Caracterización de la calcineurina en neutrófilos humanos. Efecto inhibitor del peróxido de hidrógeno sobre su actividad enzimática y sobre la unión del NF- κ B al ADN.	72
3.- El estrés oxidativo provoca la fosforilación en tirosina y la translocación al núcleo del STAT3 en linfocitos humanos.	82
DISCUSIÓN	111
1.- Regulación de la producción de anión superóxido por la NADPH-oxidasa de neutrófilos humanos, tratado con sustancias anticancerígenas.	113
2.- Papel de los peróxidos en la modulación de la actividad calcineurina de neutrófilos humanos. La inactivación del NF- κ B por H ₂ O ₂ está en concordancia con la inactivación de la calcineurina.	115
3.- Activación del factor de transcripción STAT3 por H ₂ O ₂ en linfocitos humanos.	122
CONCLUSIONES	125
BIBLIOGRAFÍA DE LA INTRODUCCIÓN Y LA DISCUSIÓN	126
LISTA DE PUBLICACIONES DURANTE LA TESIS	148
NOTAS	150

ABREVIATURAS

CaM	Calmodulina
CAT	Cloranfenicol acetil transferasa
CGD	Enfermedad granulomatosis crónica
CN	Calcineurina
COX-2	Ciclooxigenasa - 2
CsA	Ciclosporina A
CSF-1	Factor estimulador de colonias 1
CyP	Ciclofilina
DAG	1,2-diacilglicerol
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
FAD	Flavín-adenin-dinucleótido
FeO ²⁺	Radical ferrilo
FKBP12	Proteína enlazante del FK 506
fMLP	Formil-metionil-leucil-fenilalanina
GAS	Secuencia de oligonucleótidos activada por IFN- γ
GM-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos
GTP	Guanosina trifosfato
\cdot H	Radical hidronio
H ⁺	Ión hidrógeno
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HIV	Virus de la inmunodeficiencia humana
HOCl	Ácido hipocloroso
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular - 1
IFN- α	Interferón alfa
IFN- γ	Interferón gamma
IL-2	Interleuquina-2
IL-2R	Receptor de la interleuquina-2
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
IP ₃	Inositol 1,4,5-trifosfato
ISRE	Elementos de respuesta estimulados por IFN
JAK	Quinasa Jano

MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
MHC-1	Complejo mayor de histocompatibilidad tipo 1
NAC	<i>N</i> -acetilcisteína
NADPH	Nicotinamida adenin dinucleótido fosfato
NF-AT	Factor nuclear de las células T activadas
NF-κB	Factor nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico
¹ O ₂	Oxígeno singlete
O ₂ ^{·-}	Anión superóxido
·OH	Radical hidroxilo
OH ⁻	Ión hidróxido
ONOO ⁻	Peroxinitrito
PAF	Factor activador de plaquetas
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PDTC	Pirrolidina ditiocarbamato
PIP ₂	Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato
PKC	Proteína quinasa C
PLC	Fosfolipasa C
PMA	Forbol 12-miristato 13-acetato
PMN	Polimorfonucleares
PTKs	Proteína tirosina quinasas
PTPasa	Proteína tirosina fosfatasa
ROI	Intermediarios reactivos de oxígeno
RSOO [·]	Radical tiol peroxi
SIE	Elemento inducible sis
SOD	Superóxido dismutasa
STAT	Señales de transducción y activadoras de la transcripción
TCR	Receptor de las células T
TNF-α	Factor de necrosis tumoral-alfa
VCAM-1	Molécula de adhesión de células vasculares

INTRODUCCIÓN

La vida aeróbica tiene una ventaja sobre la vida anaeróbica en términos de eficiente conversión de la energía metabólica. Sin embargo, el oxígeno molecular no es sólo una ventaja sino también una amenaza para organismos aeróbicos, porque durante su metabolismo se forman intermediarios de oxígeno y derivados que son potencialmente dañinos. Estos metabolitos de oxígeno ejercen el llamado **ESTRÉS OXIDATIVO** en las células aeróbicas. Por eso los organismos aeróbicos están equipados con una serie de enzimas ubicuos que controlan la toxicidad del oxígeno. Por otro lado, los mismos metabolitos tóxicos de oxígeno son usados por leucocitos fagocíticos para matar a microorganismos invasores. En el curso de esta acción, los fagocitos provocan y padecen al mismo tiempo un estrés oxidativo.

1.- CÉLULAS

Las células del sistema inmunitario están presentes normalmente como células circulantes en la sangre y linfa, como grupos anatómicamente definidos en órganos linfoides, y como células dispersas en los tejidos. La organización anatómica de estas células y su capacidad para circular e intercambiarse entre la sangre, la linfa y los tejidos es de una importancia primordial para la generación de respuestas inmunitarias.

Después de una perturbación específica de la membrana por estímulos, bien en forma de partículas (ej. microorganismos) o estímulos solubles (ej. ésteres de forbol), las células incrementan el consumo de oxígeno, y comienzan a generar metabolitos reactivos de oxígeno. El oxígeno consumido no es usado para la respiración celular, como engañosamente sugiere el término “estallido respiratorio”, definido más adelante, sino que es convertido principalmente a anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

La liberación extracelular de metabolitos reactivos de oxígeno provocada por una serie de estímulos, es una respuesta bien caracterizada de células fagocíticas. Sin embargo, recientes observaciones indican que las células no fagocíticas también generan estos metabolitos (1-7).

1.1.- Neutrófilos

Los neutrófilos son el tipo de granulocitos más común y son llamados así porque contienen abundantes gránulos citoplásmicos. Se les llama también leucocitos polimorfonucleares (PMN) por su núcleo multilobulado, de 2 a 5 lóbulos conectados entre sí, lo que hace que parezca que tienen múltiples núcleos.

Los neutrófilos juegan un papel central en la protección del individuo contra la infección; son las primeras células de la sangre que migran hacia las lesiones inflamatorias, donde se

acumulan en grandes cantidades eliminando microorganismos y sustancias patógenas a través de una serie de respuestas rápidas y muy reguladas. Éstas incluyen reorganización del citoesqueleto, quimiotaxis, fagocitosis de microorganismos invasores o partículas extrañas, secreción de enzimas proteolíticas, síntesis de lípidos, como el leucotrieno B₄ y el factor activador de plaquetas (PAF) y generación de intermediarios reactivos de oxígeno (ROIs) (8). Aunque los neutrófilos son probablemente la fuente más eficiente de O₂⁻, virtualmente todas las células eucariotas producen ROI, principalmente como productos laterales de reacciones de transferencia de electrones en mitocondrias y retículo endoplásmico (9).

Además de su papel microbicida en fagocitos, se ha sugerido que los ROI no sólo actúan como “moléculas señales” en neutrófilos, sino también en otras células (10, 11). En principio, los ROI constituyen un buen candidato de “moléculas señales” porque son pequeñas, difunden rápidamente y son altamente reactivas. Recientes trabajos sugieren un papel para los ROI en la transducción de señales en neutrófilos (11, 12). Éstos, al ser estimulados, producen ROI y ello conlleva un aumento de la fosforilación en tirosina de varias proteínas. Oxidantes exógenos son capaces de imitar esta respuesta, mientras que antioxidantes la pueden bloquear.

Los neutrófilos y macrófagos reducen el oxígeno molecular con NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) para producir O₂⁻ y posteriormente derivados de intermediarios reactivos de oxígeno (H₂O₂, HOCl, [•]OH) cuya función es hacer que fagociten a microorganismos (13-16).

1.2.- Linfocitos

Los dos tipos de linfocitos más importantes en la sangre son los linfocitos B, que producen anticuerpos específicos al ser activados, y los linfocitos T, que tienen varios papeles en la inmunidad mediada por células y en inmunoregulación. La activación de las células T en respuesta a la estimulación con antígenos ha sido bien documentada (17). Uno de los eventos más importantes es la liberación de calcio intracelular, que juega un importante papel en diversas actividades celulares (18). La interacción del receptor de las células T (TCR) con un antígeno apropiado provoca la activación de la fosfolipasa C (PLC), que hidroliza el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂) a inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) y 1,2-diacilglicerol (DAG). El IP₃ moviliza los depósitos de Ca²⁺ intracelulares, mientras que el DAG activa la proteína quinasa C (PKC). La importancia del Ca²⁺ en la transducción de señales vía TCR, puede ser demostrada por el hecho de que si quitamos el Ca²⁺ extracelular podemos bloquear la activación de las células T (19). Además los mismos eventos iniciados por el receptor mediante la activación de la PLC pueden también ser iniciados por



el tratamiento con un ionóforo de Ca^{2+} , que eleva los niveles de Ca^{2+} intracelular y con un éster de forbol (PMA), que activa la PKC (20) (Fig. 1).

Esta interacción de linfocitos T con antígenos dispara una compleja cascada de señales que pone en marcha el programa de inducción de genes que conducen a la activación de las células T. Durante este proceso, las células T expresan el factor de crecimiento autocrino interleuquina 2 (IL-2) que promueve la proliferación celular por interacción con su receptor, también expresado en células T activadas.

Los linfocitos también son expuestos a los ROI derivados de macrófagos y neutrófilos durante la respuesta inflamatoria. Además de estos ROI exógenos, es cada vez más evidente que los linfocitos producen ROI y son usados como “moléculas señales”. La activación de los linfocitos T vía TCR, aumenta los niveles intracelulares de los ROI, que junto con antioxidantes regulan la activación en estas células (21-23). Los ROI activan varios sistemas de señalización en los linfocitos por ejemplo, elevación del calcio intracelular, activación de la PKC, aumento de la fosforilación en tirosina y activación de la vía Ras (24-27). Una de las dianas de acción de los ROI es sin duda el factor de transcripción NF- κ B, que está involucrado en la regulación transcripcional de varios genes activados durante las respuestas inmune e inflamatoria (21, 22, 28).

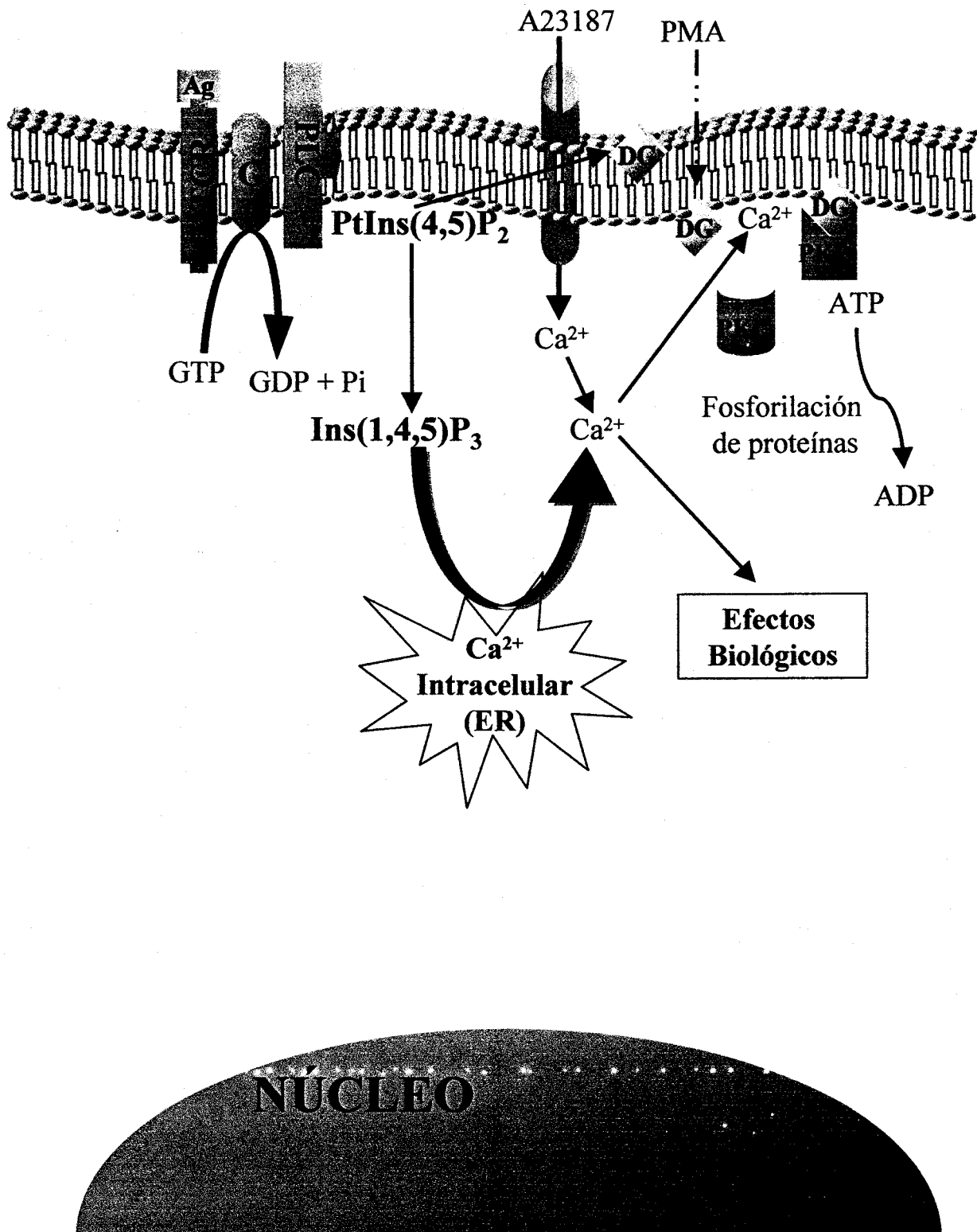
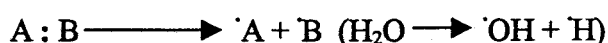


Figura 1. Liberación de Ca²⁺ intracelular. Importante papel en las actividades de las células T.

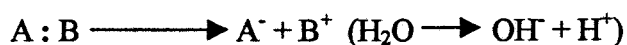
2.- PRODUCCIÓN DE RADICALES LIBRES DE OXÍGENO. EL ESTALLIDO RESPIRATORIO

El término "radical libre" se refiere a cualquier especie química capaz de tener existencia independiente y que contiene uno o más electrones desapareados. La presencia de estos electrones desapareados conlleva a que la especie en cuestión sea atraída a un campo magnético (es decir que sea paramagnética) y que la especie sea altamente reactiva. Los radicales libres se forman cuando un enlace covalente entre dos átomos se rompe, permaneciendo cada electrón del enlace unido a cada átomo. Este proceso se llama "fisión homolítica". Como ejemplo de este proceso se puede considerar la rotura de un enlace O-H en la molécula de H₂O, produciéndose el radical hidroxilo (OH) y el radical hidronio (H). Otra posibilidad es la "fisión heterolítica", en la que un átomo recibe a ambos electrones: la rotura de H₂O de forma heterolítica produce un ión hidrógeno (H⁺) y un ión hidróxido (OH⁻), que no son radicales libres.

FISIÓN HOMOLÍTICA



FISIÓN HETEROLÍTICA



Los radicales libres de oxígeno sintetizados por el neutrófilo derivan de un precursor común, el O₂⁻. Este O₂⁻ es generado durante el estallido respiratorio, mecanismo definido por Babior en 1978 (29) como un "proceso propio de las células fagocíticas, que tiene lugar en respuesta a un estímulo apropiado y que conlleva la producción de agentes microbicidas altamente reactivos por la reducción parcial del oxígeno". Del O₂⁻ se pueden generar otros agentes reactivos. Así, por una reacción de dismutación, dos moléculas de O₂⁻ interaccionan formándose una molécula de H₂O₂ y otra de O₂ y, siguiendo la llamada reacción de Haber-Weiss, una molécula de O₂⁻ reacciona con una de H₂O₂ formándose el radical [•]OH, oxígeno singlete (¹O₂) y otros ROI.

SOD



(Reacción de Haber-Weiss)

3.- INTERMEDIARIOS REACTIVOS DE OXÍGENO (ROIs)

Los ROI son considerados generalmente citotóxicos, porque pueden causar daños oxidativos a los componentes celulares. Sin embargo a bajas concentraciones, los ROI pueden funcionar como mediadores fisiológicos de las respuestas celulares (10), actuando como segundos mensajeros naturales en algunas vías de señalización. Por ejemplo, el H_2O_2 imita el efecto estimulador de la insulina sobre el transporte de glucosa y sobre la síntesis de lípidos en adipocitos (30, 31). Recientemente, la producción de ROI ha sido detectada en una variedad de células estimuladas con citoquinas tales como el factor de crecimiento transformante $\beta 1$ (1, 2), interleuquina 1 (IL-1) (3), y el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) (3, 4), con factores de crecimiento peptídicos tales como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (5, 6), el factor de crecimiento fibroblástico (4, 6) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF) (32), con agonistas de receptores tales como PMA (33) y con compuestos derivados del rutenio (34).

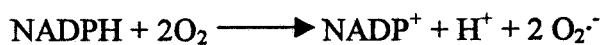
El término ROI comprende muchas especies incluyendo el oxígeno singlete (1O_2), el radical anión superóxido ($O_2^{\cdot -}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), peróxidos de lípidos, óxido nítrico (NO), peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$), radical tiol peroxi ($RSOO^{\cdot}$), radical ferrilo (FeO^{2+}) y el radical hidroxilo (OH) (35-38). Sin embargo la naturaleza química de los ROI generados en respuesta a la activación de varios receptores no ha sido bien caracterizada. El H_2O_2 ha sido el componente mayoritario de los ROI detectado en células activadas (39); es una molécula pequeña, difusible y omnipresente que puede ser sintetizada así como destruida rápidamente en respuesta a estímulos externos. Por tanto cumple los requisitos fundamentales para funcionar como mensajero intracelular. Además, los ROI tanto intra como extracelulares pueden ser rápidamente eliminados por varias enzimas, incluyendo la superóxido dismutasa (SOD), catalasa, y el sistema de la glutatión peroxidasa, permitiendo un control riguroso de la concentración intracelular de los ROI y una rápida terminación de la señal.

La generación de ROI en respuesta a varios estímulos externos ha sido relacionada con la activación de factores de transcripción tales como c-jun y c-fos del complejo AP-1 (4, 40, 41) y NF- κB (42, 43), con la vía de las MAP quinasas (MAPK) (5, 7, 44), con la fosfolipasa A_2 (45) por disparar la apoptosis (46), con la transcripción del virus del SIDA (HIV) (47) y con la inhibición de las proteínas tirosina fosfatasas (PTPasas) (48-50). El grado de fosforilación en tirosina es determinado por la actividad de dos familias de enzimas competidoras, las tirosina quinasas (PTKs) y las tirosina fosfatasas. Estudios *in vitro* (48) e *in vivo* (45) han sugerido que los ROI pueden inhibir la actividad de ciertas tirosina fosfatasas por oxidación de un residuo conservado de cisteína en su dominio catalítico. El hecho de que el H_2O_2 pueda inducir una rápida fosforilación en tirosina de múltiples proteínas celulares (42, 51-54) sugiere que los ROIs pueden regular proteínas tirosina

quinasa y proteínas tirosina fosfatasa. La p21^{ras} también es sensible a cambios en el estado celular redox (25).

4.- NADPH-OXIDASA

La producción de los ROI está mediada por un complejo enzimático multicomponente, la NADPH-oxidasa, también llamada “oxidasa del estallido respiratorio”, presente en la membrana de neutrófilos y otros leucocitos (55). El grupo funcional de la oxidasa facilita la transferencia de un electrón del NADPH citosólico al oxígeno molecular, produciendo O₂^{·-}, precursor de oxidantes altamente reactivos que actúan como potentes agentes microbicidas (14, 55).



La dismutación de O₂^{·-} por acción del enzima superóxido dismutasa (SOD), genera H₂O₂, y ambas moléculas pueden después generar otros intermediarios reactivos de oxígeno, incluyendo HOCl, ·OH, e ión ONOO⁻ (56). La importancia de la oxidasa en el organismo se demuestra por las infecciones recurrentes y graves que padecen los enfermos con granulomatosis crónica (CGD), que es consecuencia de una alteración hereditaria de la actividad NADPH-oxidasa (57-59).

La NADPH-oxidasa es inactiva en células en reposo, pero llega a ser activa cuando se expone a bacterias o estímulos solubles. El enzima consta tanto de factores proteicos citosólicos como de factores asociados a la membrana plasmática. Entre ellos está un citocromo b₅₅₈, que es una flavohemoproteína unida a membrana (60-62) que contiene posibles sitios de unión para el NADPH, FAD y dos grupos hemos (63-66), y además representa el componente enzimático de la NADPH-oxidasa. Está compuesto por una glicoproteína de 91 kDa (gp91^{phox}) y una proteína de 22 kDa (p22^{phox}) (63, 64). Los componentes citosólicos (p47^{phox}, p67^{phox} y una proteína unida a GTP de pequeño peso molecular, Rac) activan la producción de O₂^{·-} y pueden ser considerados como las subunidades reguladoras del flavocitocromo.

En células en reposo sus componentes están distribuidos entre el citosol y las membranas. Cuando las células son activadas los componentes citosólicos migran a la membrana, donde se asocian con el citocromo b₅₅₈ para formar la oxidasa catalíticamente activa (67-69), (Fig. 2).

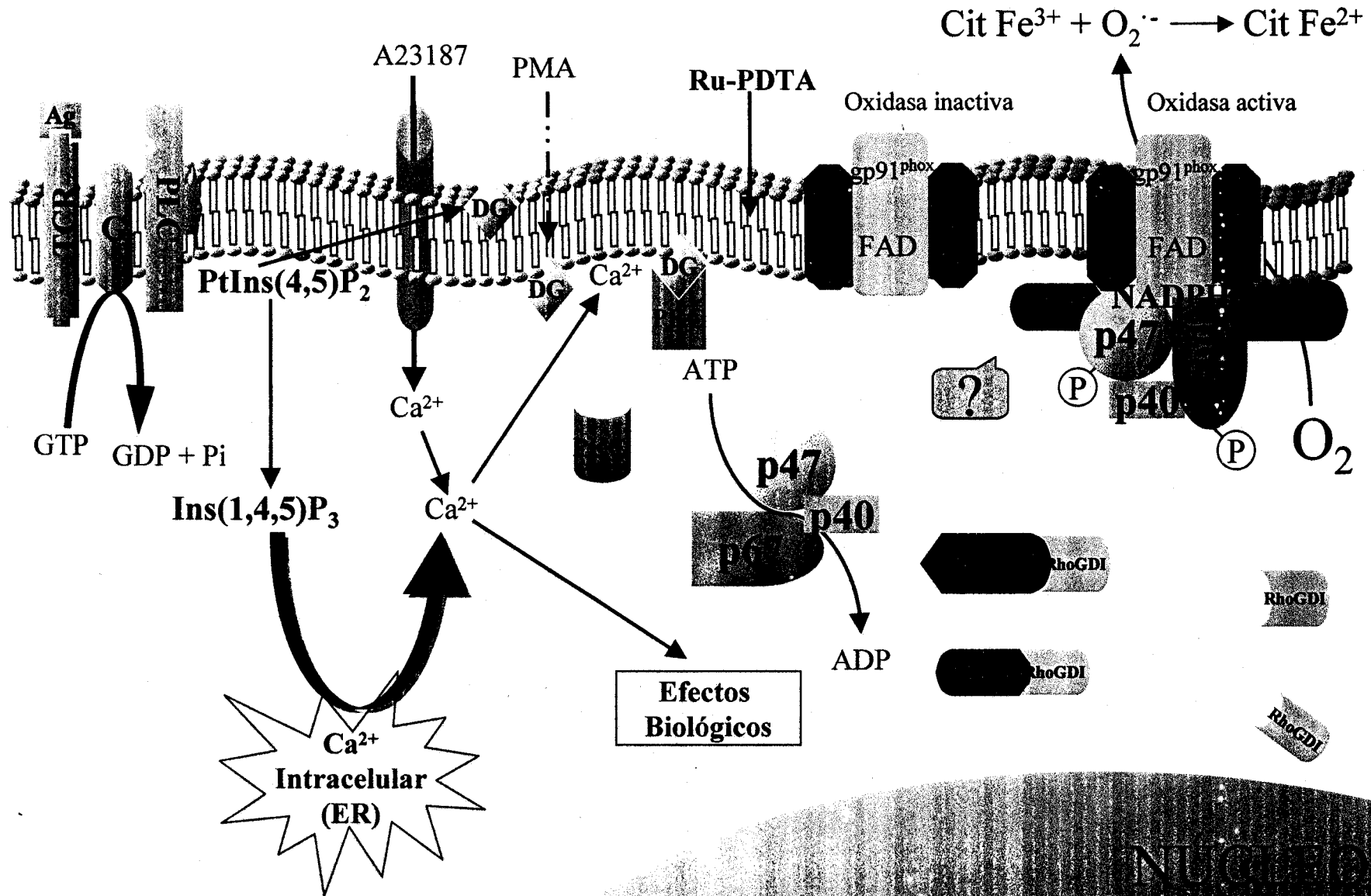


Figura 2. Mecanismo de producción de $O_2^{\cdot -}$ por neutrófilos estimulados con distintos agentes.

Individuos con la enfermedad CGD tienen mutaciones en p47^{phox}, p67^{phox} o en una de las subunidades del citocromo b₅₅₈. La proteína p47^{phox}, que no parece esencial para la actividad NADPH-oxidasa, funciona como proteína adaptadora reguladora y aumenta unas 100 veces la unión de p67^{phox} a la oxidasa (70). La proteína p47^{phox} parece actuar acoplado p67^{phox} a la subunidad de 22 kDa del flavocitocromo b₅₅₈ (71-73).

p47^{phox} y p67^{phox} se encuentran en el citosol de células en reposo formando un complejo con un tercer componente, p40^{phox} (74, 75), el cual funciona como una proteína inhibidora. p47^{phox} y p67^{phox} pueden translocarse a la membrana plasmática (76-79), y esto se correlaciona con la activación de la célula. En un sistema libre de células, p47^{phox} y p67^{phox} forman un complejo con el flavocitocromo b₅₅₈ en una proporción 1:1:1 (80).

La proteína de bajo peso molecular unida a GTP, Rac, se encuentra en dos isoformas (Rac1 y Rac2) que son idénticas en la secuencia de aminoácidos en un 92 % (81). Las dos isoformas difieren principalmente en su extremo C terminal; Rac1 pero no Rac2 contiene un extremo C terminal polibásico. En células en reposo, Rac está localizada en el citosol formando un complejo con una proteína inhibidora, RhoGDI (82-85). En células activadas, Rac2, la isoforma más abundante en neutrófilos (68, 69, 86), se asocia con la membrana plasmática (68); esta translocación se correlaciona con la actividad NADPH-oxidasa (68, 86, 87). Sin embargo hay trabajos que discuten esta hipótesis (88, 89). La translocación de Rac no requiere ni p47^{phox} ni p67^{phox} y ocurre con cinéticas diferentes a las de estos otros componentes citosólicos (90-93), sugiriendo que la unión de Rac a la membrana plasmática es regulada por mecanismos diferentes a aquellos que regulan el ensamblaje de p47^{phox} y p67^{phox}.

La activación de los neutrófilos por el péptido fMLP (formil-metionil-leucil-fenilalanina), o el inductor tumoral PMA (forbol 12-miristato 13-acetato), conduce a un incremento en la fosforilación de múltiples proteínas en los residuos de serina, treonina y tirosina (94, 95). El significado funcional de estas fosforilaciones y las pertinentes proteínas quinasas es desconocido (55, 96). Una de estas proteínas es la p47^{phox} que es fosforilada en varias serinas (97-100). Esta fosforilación es requerida para su translocación a la membrana y para la activación de la NADPH-oxidasa (101-103). La translocación de p67^{phox} también es esencial para la activación de la NADPH-oxidasa ya que pacientes con CGD deficientes en esta proteína no producen O₂⁻. La fosforilación de p67^{phox} en el estallido respiratorio participa en la regulación de la NADPH-oxidasa por vías tanto dependientes como independientes de una proteína quinasa C (104). Se ha propuesto que p67^{phox} regularía la transferencia de electrones del NADPH por reducción de la flavina, mientras que p47^{phox} controlaría el flujo de electrones de la flavina a los grupos hemos (70).

5.- FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN

En enfermedades inflamatorias crónicas, tales como el asma, la artritis reumatoide, la enfermedad inflamatoria del intestino y la psoriasis, varias citoquinas atraen a células inflamatorias e inmunes al sitio de la lesión y así amplifican y perpetúan el estado inflamatorio (105). Estas células activadas producen muchos otros mediadores de la inflamación. Lo que causa estas enfermedades es aún un misterio, pero el desarrollo de la enfermedad resulta de una mezcla de factores genéticos y ambientales.

La comprensión de los mecanismos moleculares, a través de los cuales las señales ambientales alteran la expresión de genes, ha aumentado considerablemente. Hay factores específicos de genes que regulan la transcripción de genes diana por unirse a secuencias específicas de reconocimiento, las cuales normalmente están localizadas por encima de la región promotora 5' del gen (106). Estos factores incrementan la transcripción del gen, aumentando la formación de ARN mensajero y de proteínas. Muchos de estos factores de transcripción son específicos de células y son cruciales en la diferenciación celular y en la regulación de procesos celulares específicos tales como la proliferación. Otros factores de transcripción son ubicuos, y sus actividades pueden ser moduladas por señales ambientales. Son estos últimos factores de transcripción los que pueden tener un papel clave en las respuestas inflamatoria e inmune. Un factor de transcripción ubicuo de particular importancia en las respuestas inmune e inflamatoria es el factor nuclear κ B (NF- κ B) (107).

5.1.- Factor nuclear kappaB (NF- κ B)

El factor de transcripción NF- κ B regula a una gran variedad de genes implicados en las respuestas inmunes e inflamatorias. NF- κ B fue identificado primero como un regulador de la expresión del gen de la cadena ligera kappa de las inmunoglobulinas en linfocitos B de ratón (108), pero posteriormente se ha encontrado en muchos tipos diferentes de células, siendo requerido para la expresión del receptor de la IL-2 (IL-R2), del complejo principal de histocompatibilidad-1 (MHC-1), de genes de numerosas citoquinas (IL-2, IL-6, GM-CSF, interferon- γ TNF- α), de genes que codifican enzimas (iNOS, COX-2) y de genes que codifican moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1, E-selectin), etc (109, 110). Asimismo se ha descrito que el NF- κ B se une específicamente a la región del ADN "enhancer/promoter" del HIV (111, 112).

Se han caracterizado varias proteínas NF- κ B diferentes (28, 113). Las subunidades del NF- κ B pertenecen a la familia de proteínas Rel. La forma activada de NF- κ B es un heterodímero que normalmente consta de dos proteínas, una subunidad p65 (también llamada rel A) y una subunidad

p50 (también llamada NF- κ B1) que procede de una forma precursora p105. Otras subunidades, tales como rel, rel B, v-rel, y p52 (también llamada NF- κ B2) (114-117) pueden también formar parte del NF- κ B activado y así es como las diferentes formas del NF- κ B pueden activar diferentes genes dianas.

En células no estimuladas, NF- κ B se encuentra en el citoplasma y está unido a una proteína inhibidora, I κ B que evita que entre en el núcleo. Del I κ B existen varias formas: I κ B- α , I κ B- β , I κ B- γ , I κ B- δ , I κ B- ϵ (118, 119). Cuando estas células son estimuladas, quinasas específicas fosforilan residuos de serina del I κ B (residuos 32, y 36) (120-122), causando su rápida degradación por vía ubiquitinización proteosomal (118, 123, 124). La liberación de NF- κ B de I κ B provoca la entrada del NF- κ B en el núcleo, donde se une a secuencias específicas (GGGACTTTCC) del promotor de los genes diana (125). Puesto que el gen del I κ B- α (antes llamado MAD-3) tiene una secuencia de reconocimiento κ B en su región promotora, NF- κ B induce la síntesis de I κ B- α , el cual entra en el núcleo para unirse al NF- κ B activado y llevarlo al citoplasma, de esta forma termina la activación de la expresión génica (126) (Fig. 3).

Muchos estímulos activan al NF- κ B, incluyendo citoquinas proinflamatorias, activadores de PKC, virus y oxidantes (28, 107, 113). Varias vías de transducción de señales pueden estar involucradas, pero todos estos estímulos actúan por medio de proteínas quinasa que fosforilan (y por tanto degradan) al I κ B. Quinasas específicas del I κ B han sido caracterizadas recientemente (127-131). Los mecanismos de transducción que conducen a la translocación del NF- κ B no son del todo conocidos, pero parece implicar a una serie de quinasas, tales como la tirosina quinasa de células T, ZAP-70 (24), que es la responsable del tratamiento con H₂O₂ y requiere la expresión de CD3 para la respuesta. Además, ZAP-70 es conocido por asociarse con las cadenas ζ y ϵ del receptor de las células T después del tratamiento con H₂O₂ (43). Antioxidantes, tales como pirrolidina ditiocarbamato (PDTC) y N-acetilcisteína (NAC) pueden bloquear la activación de algunas de estas proteínas quinasa (132), lo que sugiere que los ROI tienen un papel intermediario (42). Baeuerle y *col.* son los máximos exponentes de la hipótesis que postula a los ROI como segundos mensajeros. Apoyando esto, bajas dosis de H₂O₂ activan al NF- κ B (10, 133). Sin embargo hay datos que apoyan la tesis opuesta. Durante infecciones crónicas o enfermedades autoinmunes, los linfocitos son expuestos a largos periodos de estrés oxidativo, y esto normalmente está asociado con una disminución de las funciones de los linfocitos T (134). Fleshcer y *col.* (135) han mostrado que células T normales de sangre periférica expuestas al estrés oxidativo durante 2 días *in vitro* tienen una capacidad disminuida para activar al NF- κ B después de la

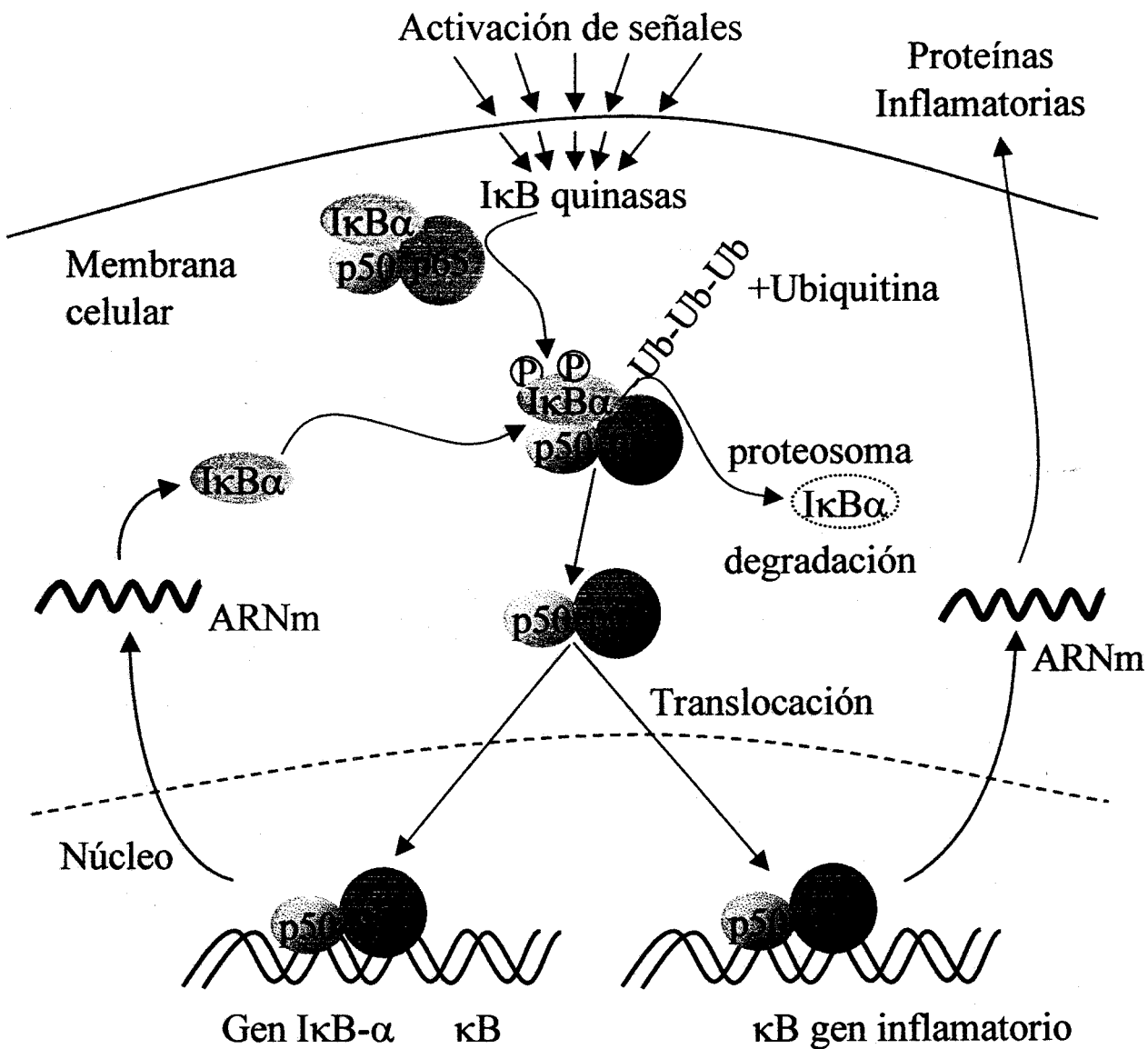


Figura 3. Activación del factor de transcripción NF-κB y degradación de la proteína inhibidora IκB.

estimulación mediada por el TCR. Por tanto la preexposición al estrés oxidativo disminuye la actividad transcripcional del NF- κ B en linfocitos, en otras células como los neutrófilos está aún por estudiar.

5.2.- Factor nuclear de células T (NF-AT)

La regulación transcripcional del gen IL-2 ha sido ampliamente analizada junto con su promotor, una región de 275 pb localizado más arriba del sitio de comienzo de la transcripción del gen. Entre los factores que se unen a esta secuencia, están el AP-1, NF- κ B, Oct-1, y la familia de proteínas NF-AT (factor nuclear de las células T) (136, 17) (Fig. 4).

El factor de transcripción NF-AT juega un papel esencial en la regulación transcripcional de genes de citoquinas durante la respuesta inmune (17, 137, 138), sobre todo en la expresión del gen de la IL-2 (139). Sitios de unión para el NF-AT también han sido encontrados en las regiones promotoras del GM-CSF (factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos), del TNF- α , IL-3, IL-4 y IL-5 (140-147).

NF-AT está compuesto de un complejo cuya unión específica a secuencias promotoras está mediada por una subunidad citosólica y un componente nuclear inducible que comprende a miembros de la familia de proteínas AP-1. La subunidad citoplásmica está codificada por una familia de genes constituida por al menos 4 miembros NF-AT relacionados estructuralmente, NF-ATp/NF-AT1, NF-ATc, NF-AT3, NF-ATx/NF-AT4/NFATc3 (137, 148). Estas proteínas de la familia NF-AT son altamente homólogas en sus dominios de unión al ADN, y muestran una débil similitud a los dominios de unión al ADN de proteínas de la familia Rel (149-151). También contienen una segunda región (~300 aminoácidos) de moderada secuencia conservada, localizada justo al lado del extremo N-terminal del dominio de unión al ADN y que Anjana Rao la denomina la región homóloga del NF-AT. Esta región contiene varias secuencias ricas en serina y prolina cuya presencia y localización en la proteína están conservadas en los cuatro miembros de la familia NF-AT (149, 152, 153).

Los miembros de esta familia de proteínas se translocan al núcleo al ser desfosforilados por la fosfatasa calcineurina (CN), que ha sido activada por movilizaciones de calcio durante la activación celular. En el núcleo, NF-AT puede interactuar con el componente nuclear inducible formado por las proteínas Fos y Jun para unirse cooperativamente y transactivar los sitios del NF-AT *in vitro* (17, 138, 154, 155, 156) (Fig. 5).

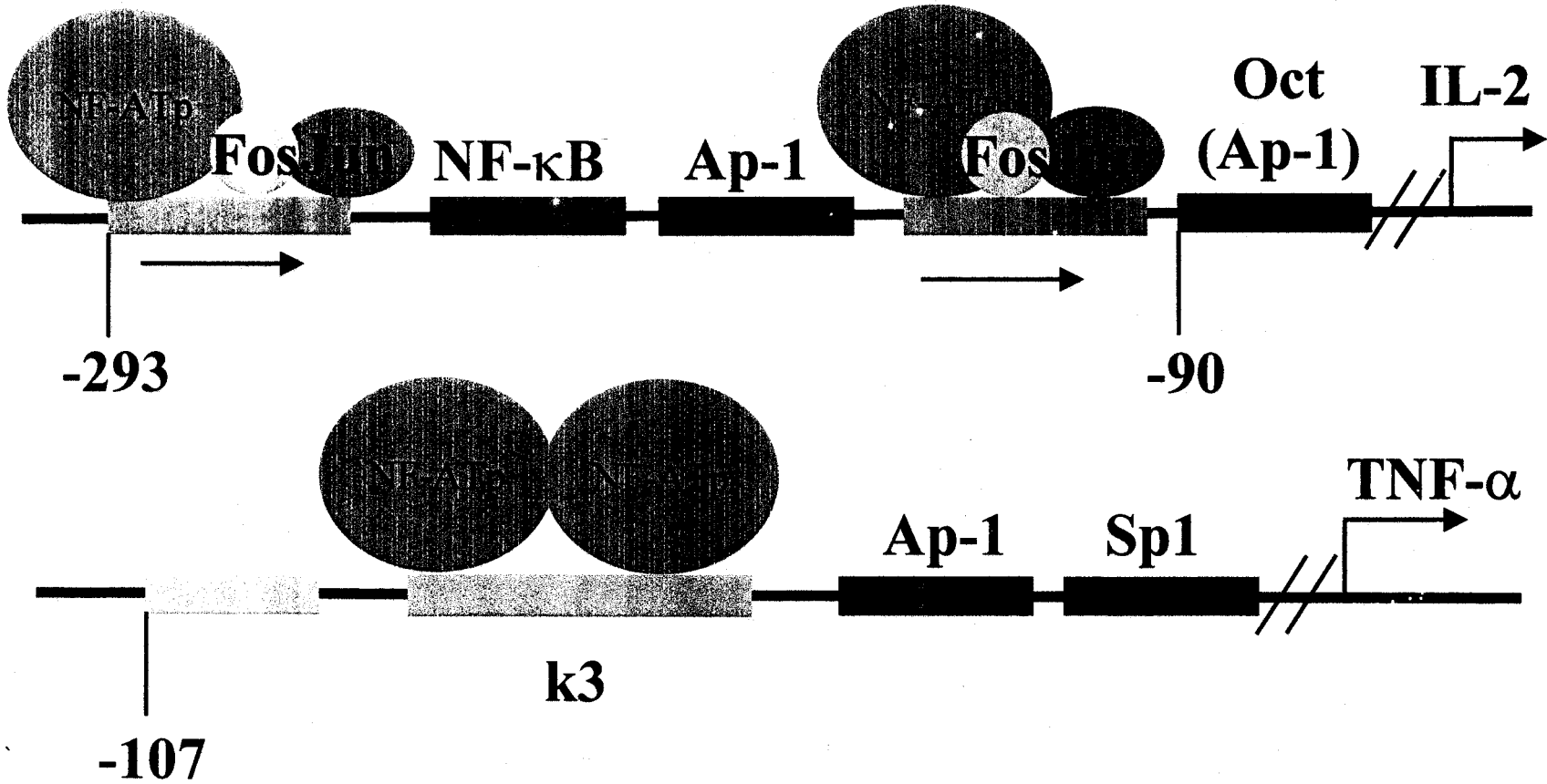


Figura 4. Organización de los sitios de unión para el NF-AT y otros factores de transcripción en las regiones reguladoras de genes de citoquinas.

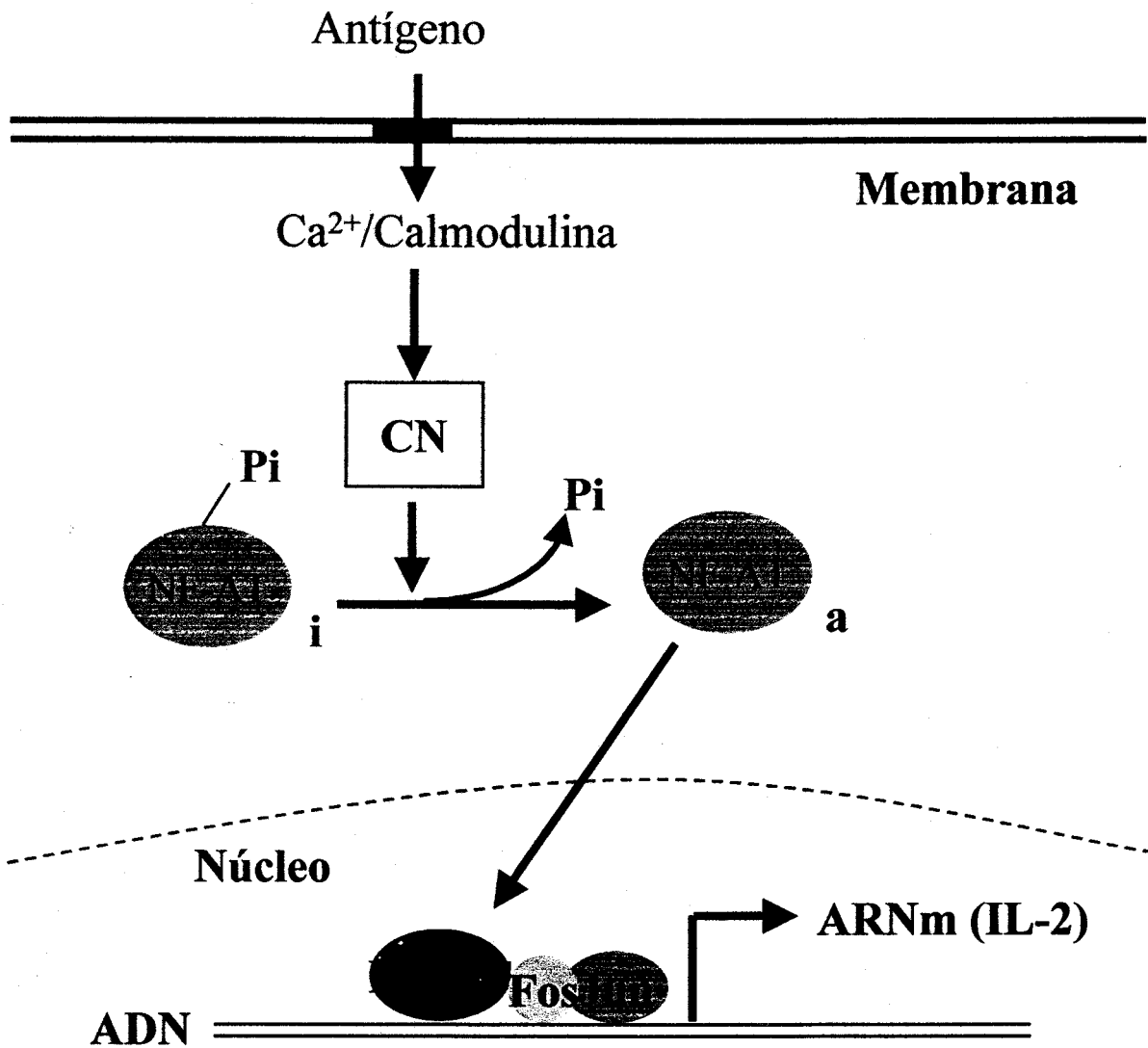


Figura 5. Interacción entre el NF-AT y las proteínas Fos y Jun durante la transcripción del gen de la IL-2

Un rasgo central de la regulación de esta familia de proteínas fue deducido de su pronunciada sensibilidad a las drogas inmunosupresoras ciclosporina A (CsA) y FK 506. Estas drogas (que son potentes inhibidores de la transcripción de genes de citoquinas en células activadas) inhiben la transcripción de genes reporteros (luciferasa y CAT) así como la aparición en el núcleo del NF-AT unido al ADN (157-161). CsA y FK 506 actúan por unión a receptores inmunofilinas intracelulares inhibiendo la actividad fosfatasa de la CN (161, 162). La sobreexpresión de calcineurina sustituye los requerimientos de calcio por transactivación dependiente de NF-AT y hace a las células T menos sensibles a CsA y FK 506 (158, 163, 164). Estos resultados sugieren que la CN juega un importante papel en la transcripción de genes inducibles durante la respuesta inmune, en parte por impedir la translocación al núcleo del NF-AT (165, 166) (Fig. 6).

6.- CALCINEURINA

La calcineurina (CN) es un enzima clave en la cascada de transducción de señales, que conducen a la activación de las células T (161-164, 167). Además es un importante regulador de factores de transcripción tales como NF-AT, NF- κ B y AP-1, los cuales están involucrados en la expresión de un gran número de genes de expresión tempranos. La CN, también conocida como fosfatasa 2B, es una serina, treonina fosfatasa altamente conservada dependiente de calmodulina (CaM) y Ca^{2+} (168-170) y que está ubicuamente expresada, siendo especialmente abundante en el cerebro. Esta fosfatasa heterodimérica está compuesta por dos subunidades: una subunidad catalítica unida a CaM de 59 kDa (CNA) y una subunidad reguladora unida a calcio, de 19 kDa (CNB). La subunidad CNA, consta de un centro catalítico, un dominio de unión a la subunidad CNB, un dominio de unión a la CaM y un extremo C-terminal. Este último parece tener una actividad autoinhibitoria, ya que ciertas proteólisis del enzima, eliminando 17 kDa de la región C-terminal, hacen al enzima constitutivamente activa (171). El hecho de que péptidos sintéticos correspondientes a regiones del extremo C-terminal inhiban la actividad fosfatasa de la CN *in vitro*, hace suponer una función de autoinhibición de este dominio (172-174) (Fig. 7).

La CN ha sido identificada como diana molecular de los agentes inmunosupresores CsA y FK 506 (161, 163, 164, 167). Ambas drogas inmunosupresoras se asocian con proteínas de unión intracelulares, denominadas inmunofilinas; los complejos inmunosupresores-inmunofilinas [CsA-ciclofilina (CyP) y FK506-FKBP12] se unen a la CN e inhiben su actividad fosfatasa (175). Se ha demostrado que los sitios de unión sobre la CN para estos complejos inmunosupresores-inmunofilinas no son idénticos, pero están solapados (176). Estudios bioquímicos (177), de biología molecular (176, 178) y estructural (179, 180) muestran que CsA-CyP y FK 506-FKBP inhiben la actividad CN de una manera no competitiva.

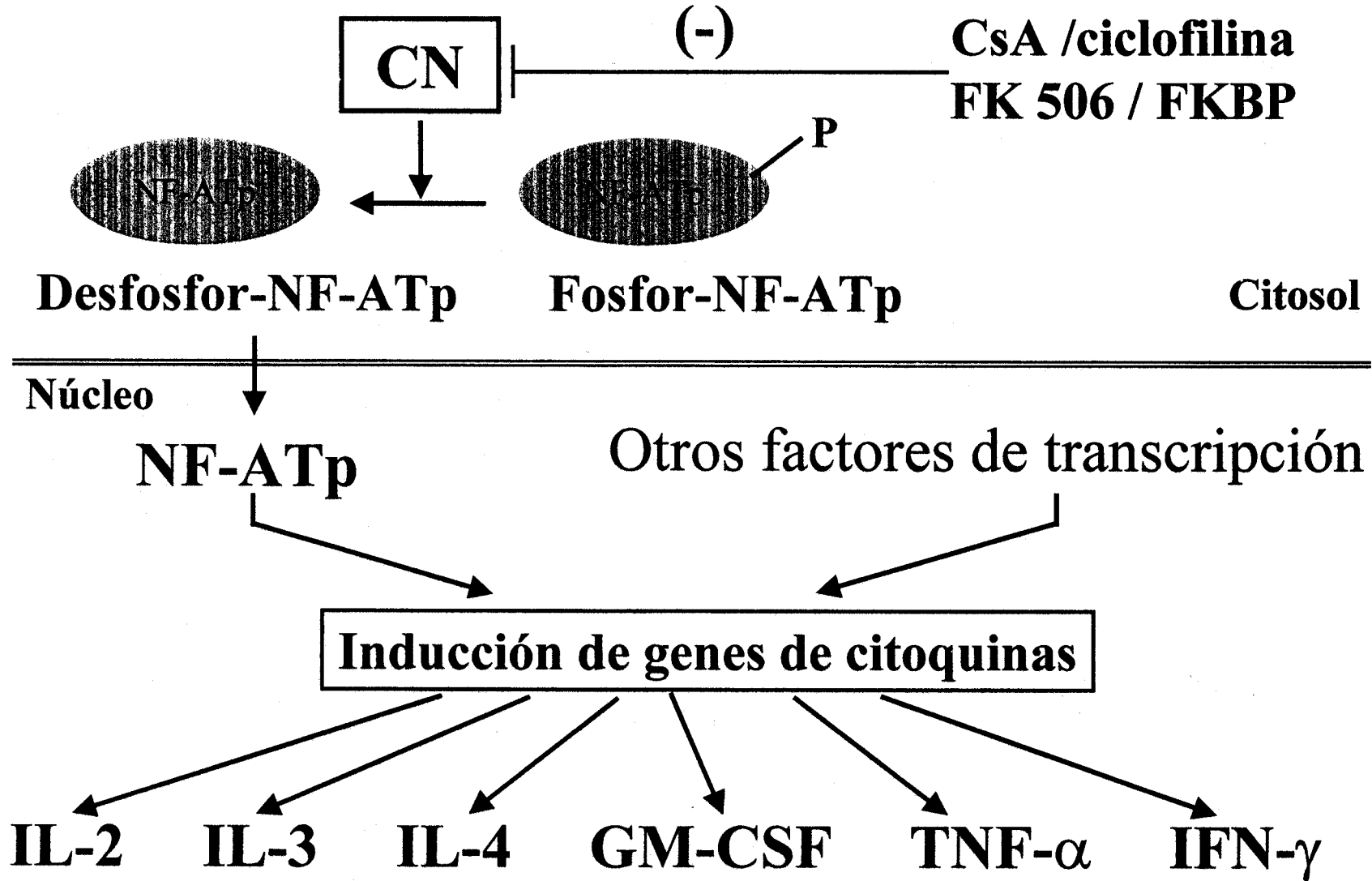
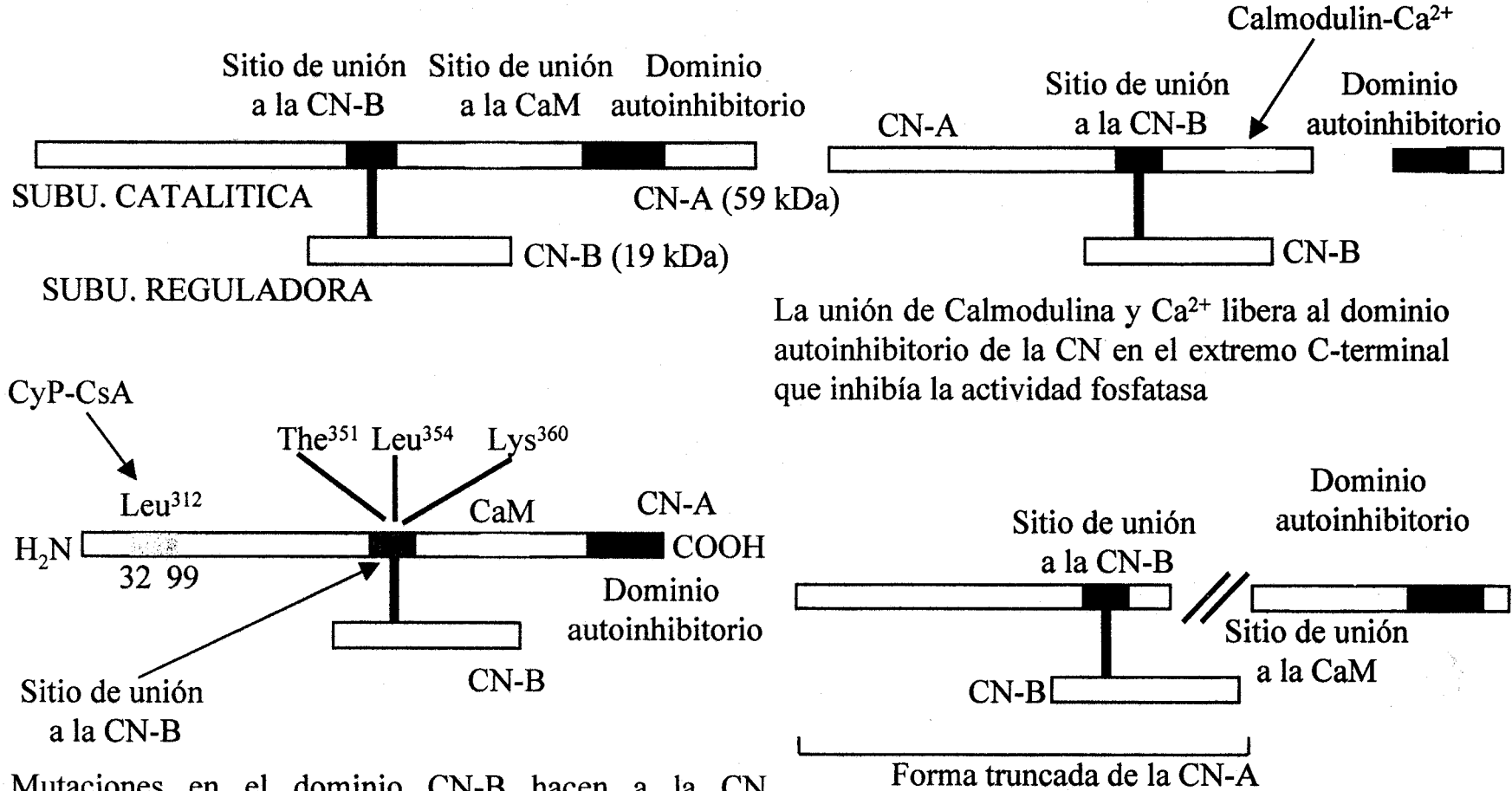


Figura 6. Mecanismo de transducción de señales que conducen a la transcripción de genes de citoquinas en células T activadas



La unión de Calmodulina y Ca²⁺ libera al dominio autoinhibitorio de la CN en el extremo C-terminal que inhibía la actividad fosfatasa

Mutaciones en el dominio CN-B hacen a la CN resistente frente a la inhibición con FK 506. El dominio CN-B juega un importante papel en la activación de la fosfatasa y en la interacción con el complejo FK 506-FKBP12

Figura 7. Estructura de la Calcineurina

6.1.- Nuevos aspectos sobre la calcineurina y la inmunosupresión

Una de las dianas de la CN es el factor de transcripción NF-AT requerido, entre otros, para la expresión de la IL-2. Ya hemos hablado de la inhibición de la CN por drogas inmunosupresoras y por tanto de la desfosforilación del NF-AT y su translocación al núcleo. Se ha demostrado que hay una interacción física entre la CN y el NF-AT (181). NF-AT de lisados de células T se une a la CN inmovilizada. La estimulación de las células T con ionóforo de Ca^{2+} induce una disminución en el peso molecular de NF-AT que es debido a su desfosforilación. Esta desfosforilación es inhibida por el tratamiento de las células T con CsA o FK 506 antes de su estimulación. Tanto la forma fosforilada como la desfosforilada del NF-AT se enlaza a CN. Además, la unión de ambas formas de NF-AT a CN es inhibida por el tratamiento de la CN con el complejo de FK 506 y su ligando FKBP12. Estos datos tomados conjuntamente sugieren una interacción directa de la CN con el NF-AT y que esta interacción no depende de los sitios de fosforilación del NF-AT afectados por la activación (181).

Es sabido que la CN desfosforila residuos conservados de serina en el extremo N terminal del NF-AT, lo que conlleva su transporte al núcleo (182). Por otro lado también se conoce la quinasa del NF-AT. La fosforilación esta catalizada por una NF-AT quinasa nuclear (GSK-3). GSK-3 fosforila serinas conservadas necesarias para la exportación del NF-AT fuera del núcleo, es decir promueve la salida del núcleo, y por tanto se opone a señales dependiente de la CN y Ca^{2+} (182) (Fig. 8).

Esta salida del núcleo es rápida (5 min) y depende de Ca^{2+} : se requiere una concentración alta y mantenida de Ca^{2+} para retener al NF-AT en el núcleo (183). Por último la CN coopera específicamente con la PKC- θ para activar a la JNK (MAPK) (184).



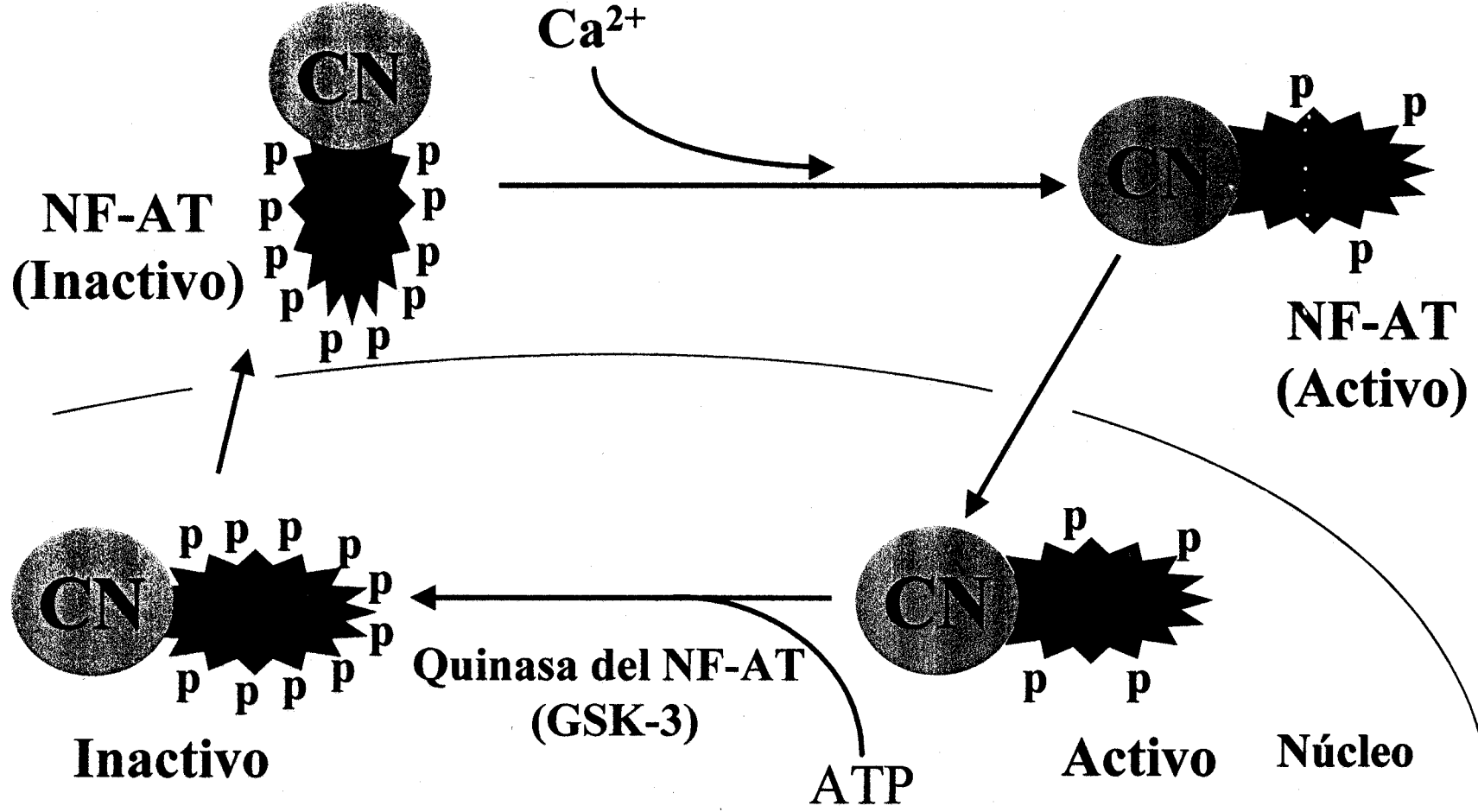


Figura 8. Mecanismo de transporte del complejo CN unido al NF-AT

7.- VÍA DE LAS JAK-STAT

La vía de las JAK-STAT fue inicialmente descubierta en experimentos dirigidos a comprender la activación transcripcional inducida por el interferón- α (IFN- α) y el interferón- γ (IFN- γ). Esta nueva vía de transducción de señales ha sido recientemente reconocida y se extiende desde la superficie celular a los genes, en el núcleo (185). En primer lugar uno o más miembros de la familia de las quinasas Jano (JAK) (186-188) asociados con un receptor transmembranal, son activados después de la unión de un ligando al receptor, lo cual conduce a la fosforilación en tirosina de uno o más miembros de la familia de factores de transcripción citoplásmicos latentes llamados STATs, por ser transductores de señales y activadores de la transcripción (189). Más tarde estas proteínas llevan acabo un doble papel, primero como transductores de señales al actuar como sustrato de las JAK, y después como activadores de la transcripción de genes al ser fosforiladas, formar homo- o heterodímeros y translocarse al núcleo (189, 190). IFN- α y IFN- γ fueron los primeros ligandos polipeptídicos descritos que disparan esta vía, pero ahora es sabido que muchos otros ligandos también activan proteínas de esta vía. Los detalles de los primeros experimentos con IFNs han sido recogidos en numerosas revisiones (185, 191-193) (Fig. 9).

7.1.- Proteínas JAKs (Quinasas Jano)

Las quinasas Jano (JAKs), descubiertas en 1990, definen un subgrupo de las enzimas (tirosina quinasas) que añaden grupos fosfato a los aminoácidos tirosina presentes en las proteínas. Deben su nombre al dios de la mitología romana con dos caras, porque sus miembros contienen dos centros capacitados para añadir grupos fosfato a las proteínas. Representan una familia de tirosinas quinasas solubles que han estado fuertemente implicadas en la transducción de señales de muchas familias de citoquinas (185, 187, 188, 192, 194-199). Los cuatro miembros de la familia, que incluye a Tyk2, JAK1, JAK2, y JAK3, tienen pesos moleculares comprendidos entre 125-135 kDa. Estas quinasas comparten un gran patrón estructural con 7 dominios conservados y una secuencia idéntica del 35-45%. Entre sus rasgos más notables se incluyen la ausencia de dominios SH2 y SH3 y la presencia de dos dominios en tandem tirosina quinasa. En general estas quinasas son inactivas en células en reposo, estando asociadas con cadenas del receptor en el espacio citoplásmico. Se activan rápidamente por fosforilación en tirosina al ser estimuladas por ligandos. Todas estas quinasas, excepto JAK3, están expresadas en muchos tejidos. JAK3 parece expresarse predominantemente en linajes mielocíticos y linfocíticos. Funcionalmente, las JAK quinasas son las responsables de la activación de las proteínas STAT (194-196, 200, 201), pero también son

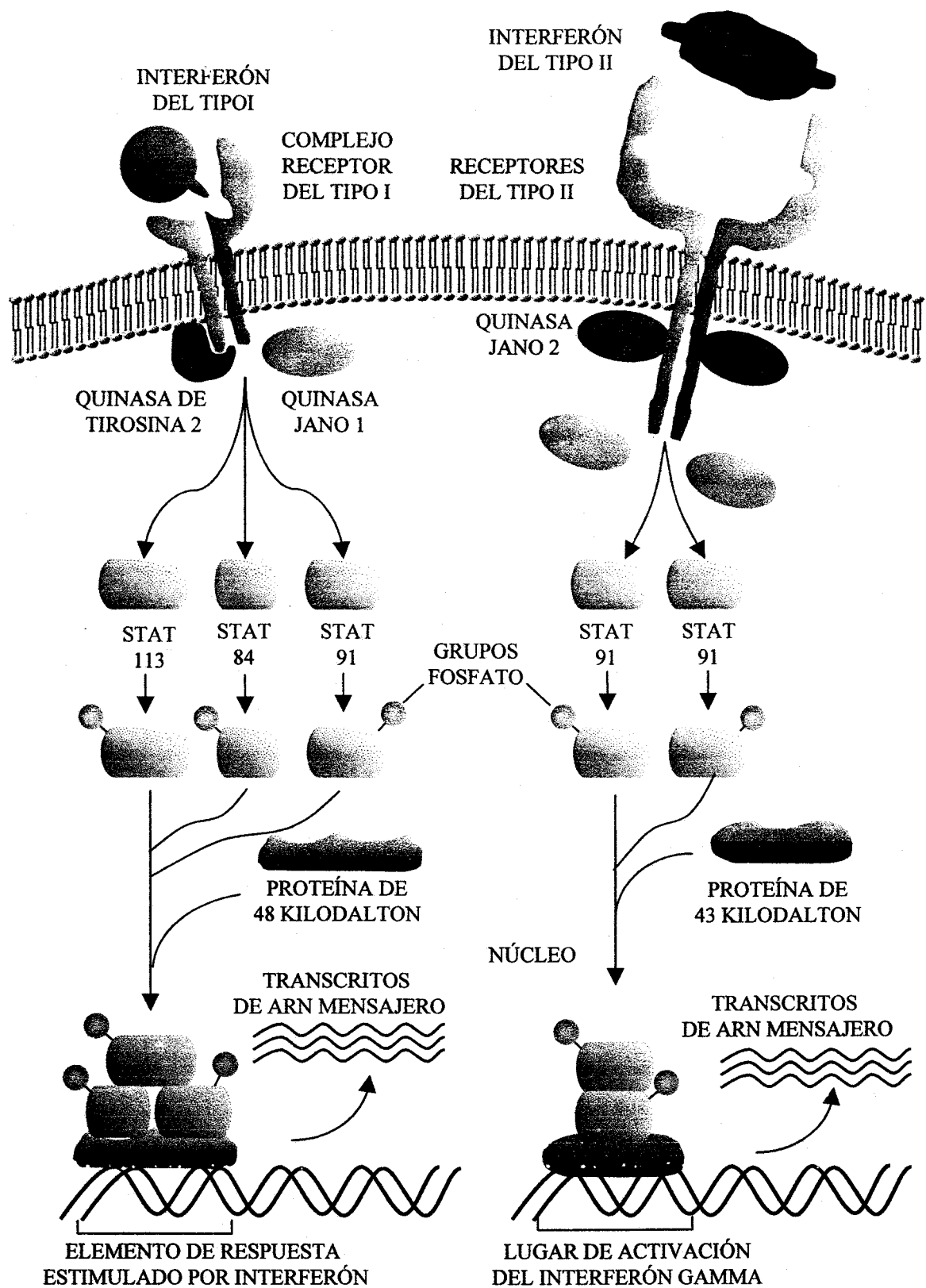


Figura 9. Mecanismo de activación de señales de la vía JAK-STAT por interferones

requeridas para iniciar multitud de vías de señalización en respuesta a citoquinas incluyendo la vía de las Ras.

7.2.- Proteínas STATs (Transductoras de Señales y Activadoras de la Transcripción)

Estas proteínas son una clase de factores de transcripción con dominios SH2 que son activados en respuesta a una fosforilación en tirosina. Se llaman así por su dual función en transducción de señales en el citoplasma y activación de la transcripción en el núcleo. Todos los miembros conocidos de esta familia de proteínas STAT tienen un único residuo de tirosina en una zona común de 700 aminoácidos que es fosforilado durante la activación citoplásmica, y todas ellas en su forma activada pueden unirse de una manera específica a secuencias de ADN. Por el momento se conocen 6 miembros de esta familia enumerándose del 1 al 6 en orden a su descubrimiento. Varias publicaciones (185, 202-205) examinan como estos componentes median la transducción de señales directamente desde el receptor al núcleo. Los primeros miembros de la familia STAT fueron identificados como proteínas de unión al ADN en la expresión de genes regulados por los IFNs (Fig. 9). De estos estudios, surgieron dos STATs y dos modelos que implicaban a estas STATs. En respuesta a IFN- α /IFN- β , se formaba rápidamente un complejo de unión al ADN formado por la STAT1, STAT2 y una proteína de unión al ADN llamada p48, que se unía a elementos de respuesta estimulados por IFN (ISRE). Por el contrario en respuesta al IFN- γ se formaba un complejo de unión al ADN formado por un homodímero de STAT1 que se unía a un único elemento de respuesta llamado secuencia activada por IFN- γ (GAS). La formación de cada complejo es dependiente de fosforilación en tirosina tanto en STAT1/STAT2 como en STAT1.

En cuanto a la estructura y función de los dominios de las STAT, lo más interesante es que contienen lugares de unión específicos para la tirosina fosfato. Estos lugares de unión tienen estructuras conservadas y se denominan dominios src-homología-2 (SH2) porque se identificaron en primer lugar en la proteína src. Estos dominios SH2 juegan tres importantes papeles: (i) son críticos para el reclutamiento de las STATs y para activar complejos de receptores, (ii) son requeridos para interactuar con las JAKs y (iii) son requeridos para la dimerización y posterior unión de las STATs al ADN. Las STATs también contienen dominios SH3.

Publicaciones recientes sugieren que las vías JAK/STAT y RAS convergen a nivel de las STATs al ser fosforiladas por las MAP quinasas. (206-210)

7.3.- STAT3

Es uno de los miembros de la familia de proteínas STATs cuya activación se produce al ser fosforilada en tirosina en el extremo C-terminal (Tyr-705) (211). La fosforilación en tirosina induce dimerización, seguida por translocación al núcleo donde se une a secuencias de respuesta al ADN y regula por tanto la expresión de genes. STAT3 puede ser activado por citoquinas tales como IFNs e interleuquinas (IL-6) (190) y en cada caso la activación es mediada por uno o más miembros de las JAK. STAT3 también puede ser activado por receptores a los cuales no se les unen citoquinas, tal es el caso del receptor que une al EGF en el que las proteínas JAK no parecen estar involucradas (190, 212, 213). También es activado por el PDGF, y por el factor estimulador de colonias 1 (CSF-1). Una vez activado STAT3 puede unirse a secuencias de respuesta en el gen c-fos, llamado elemento inducible sis (SIE), tanto como homodímero o como heterodímero. Cuatro recientes trabajos han demostrado que proteínas Src, en particular la v-src, induce fosforilación en tirosina (Tyr-705), translocación al núcleo y unión a secuencias específicas de ADN del STAT3 (214-218). Por otro lado existen evidencias del efecto del estrés oxidativo sobre las proteínas STAT. La inyección intraperitoneal de peroxovanadato, (una mezcla de vanadato sódico y H₂O₂), provoca en pocos minutos la aparición de numerosas proteínas fosforiladas en el hígado y riñón de ratones. Entre estas proteínas se encuentran las STAT (219) (Fig. 10).

7.4.- Inhibidores de la vía JAK/STAT

Uno de los descubrimientos más importantes en este campo ha sido las dos clases de reguladores que inhiben esta vía de señalización. La primera familia de proteínas incluye miembros con varios nombres: supresor de señales de citoquinas (SOCS; del inglés suppressor of cytokine signaling), proteínas de unión a las JAKs (JAB; del inglés JAK-binding protein), inhibidor de las STAT inducido por las STAT (SSI; del inglés STAT-induced STAT inhibitor), y proteínas conteniendo dominios homólogos Src (SH2) inducidos por citoquinas (CIS; del inglés cytokine-inducible Src homology 2 domain (SH2)-containing protein) (220). La segunda familia de proteínas tienen nombres como por ejemplo, proteínas inhibidoras de STAT activadas (PIAS; del inglés protein inhibitor of activated STAT) (221, 222). Además, las proteínas PIAS inhiben la activación transcripcional y unión al ADN de sus respectivas STAT (Fig. 11).

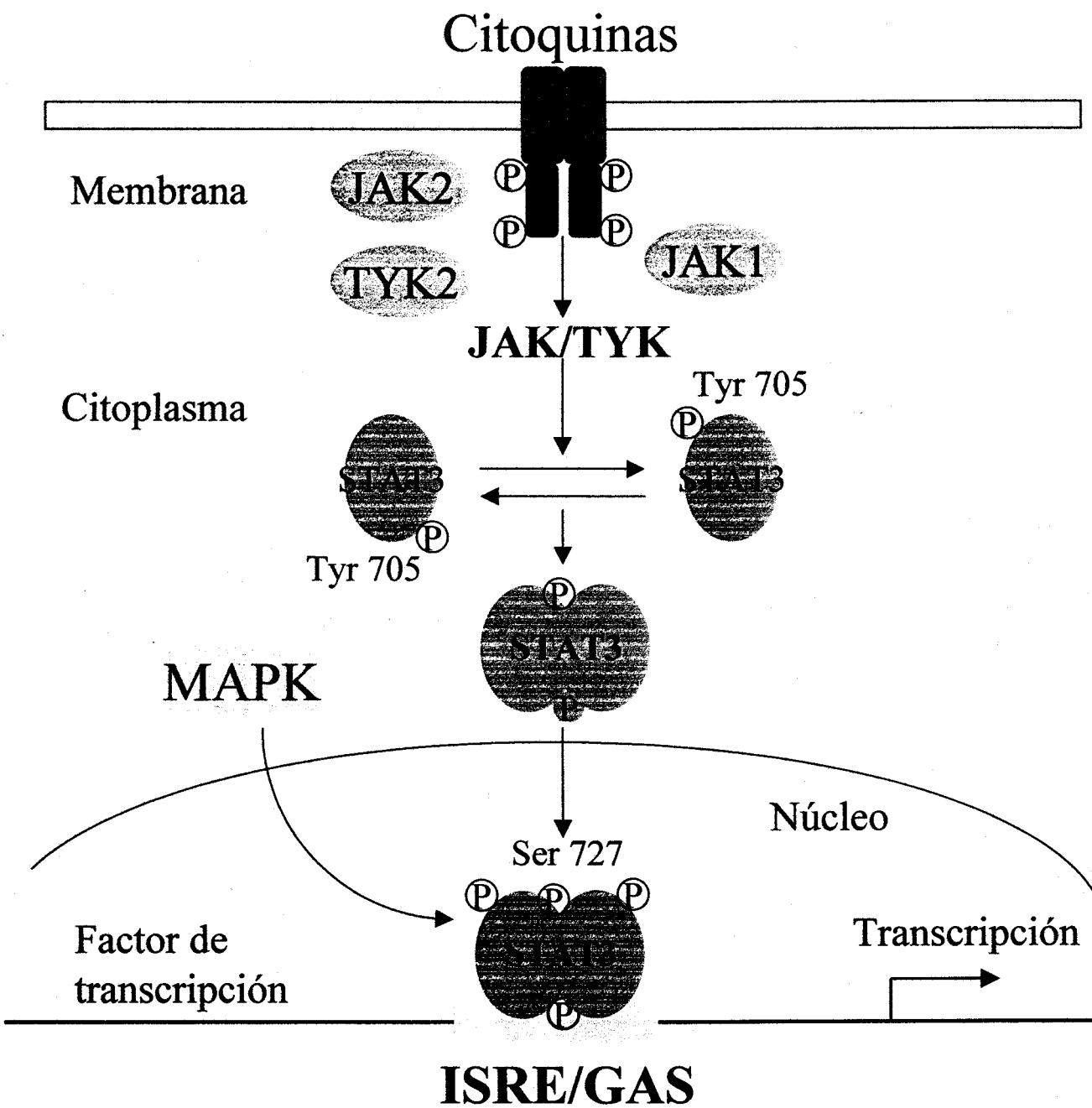


Figura 10. Fosforilación en tirosina y dimerización de la proteína STAT3

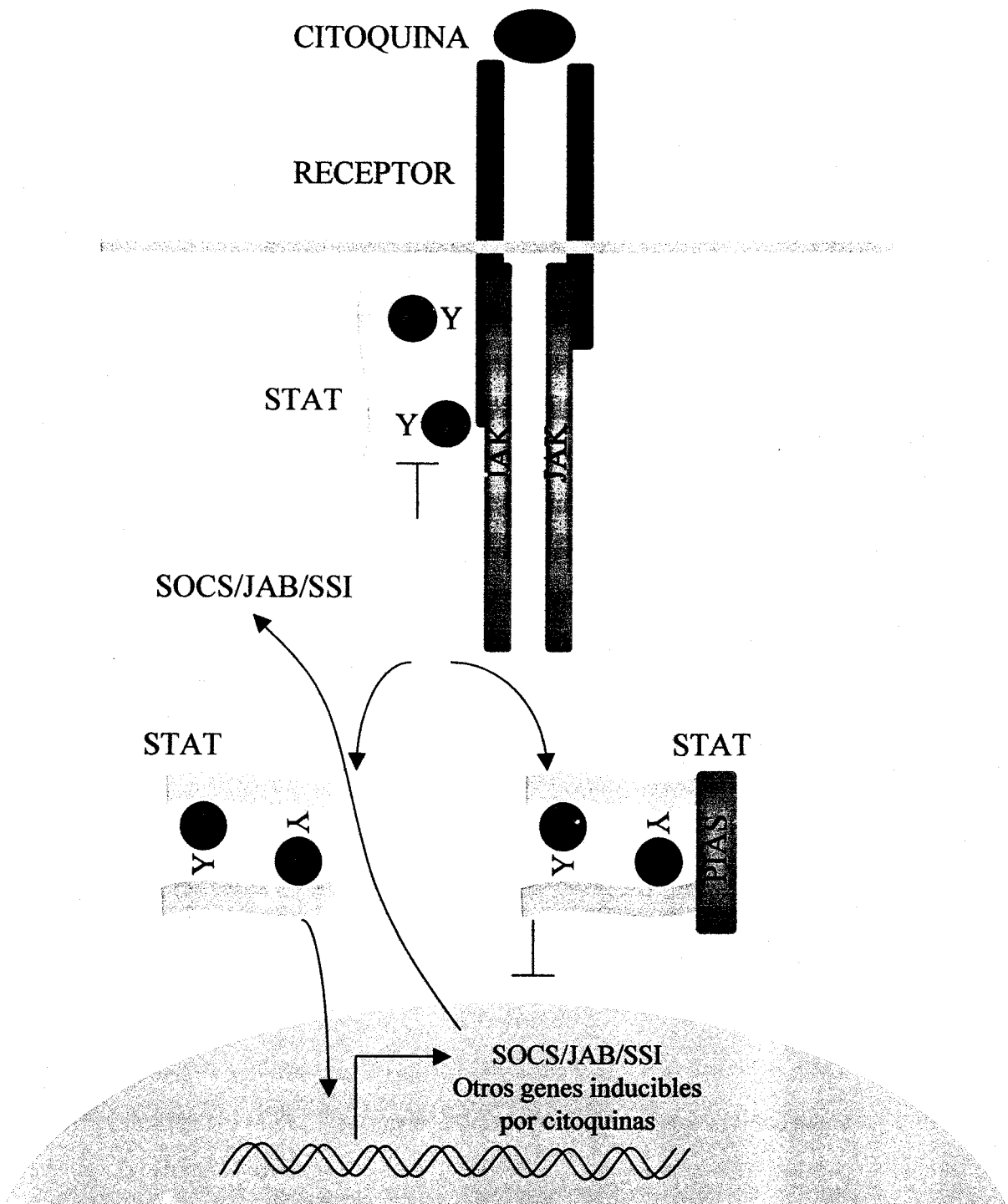


Figura 11. Mecanismos de regulación de la vía JAK-STAT

La unión de ligandos induce dimerización de las subunidades del receptor y activación de las proteínas JAK fosforilándose el receptor. Estas fosforilaciones del receptor son reconocidas por dominios SH2 y por las STATs. Así las STATs se fosforilan y forman dímeros a través de interacciones fosfotirosina y dominios SH2. Una vez activadas las STATs se translocan al núcleo donde se unen al ADN y modulan la expresión de genes. Las proteínas SOCS/JAB/SSI son inducidas por estimulación con citoquinas; algunos miembros de esta familia se unen a las JAKs y bloquean su actividad quinasa. Por tanto, la regulación de estas proteínas parece ser un ejemplo de regulación por retroinhibición negativa. La unión de las proteínas PIAS a las STATs y la inhibición que provocan son aún mecanismos que se desconocen. Cómo estos inhibidores están regulados es hoy en día un tema de investigación.

OBJETIVOS

El objetivo general de esta Tesis ha sido estudiar el efecto del estrés oxidativo sobre diferentes sistemas de transducción de señales en células leucocíticas. Los objetivos específicos son los siguientes:

1. En la primera parte de la misma, se analiza el efecto de un nuevo complejo, derivado del rutenio, sobre la activación del estallido respiratorio (producción de $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2) en neutrófilos humanos. Esta actividad podría estar asociada con la capacidad citotóxica de algunos derivados de rutenio y con la infiltración de las células fagocíticas en los nódulos tumorales.

2. En segundo lugar, se ha analizado la caracterización de la actividad calcineurina (CN) en neutrófilos humanos:

- (i) Análisis de la presencia de la fosfatasa CN usando como sustrato un fosfopéptido sintético, correspondiente al sitio de fosforilación de la subunidad RII de la proteína quinasa dependiente de AMP cíclico.
- (ii) Estudio de la inhibición de esta actividad CN en neutrófilos tratados con drogas inmunosupresoras (ej. CsA y FK 506).
- (iii) Efecto de oxidantes sobre la actividad CN. Se han estudiado las alteraciones que podría producirse sobre la unión al ADN de factores de transcripción, tales como NF-AT y NF- κ B.

La conexión entre ambas señales, es decir, entre CN y radicales libres de oxígeno, es desconocida. En este trabajo nos centramos en esta cuestión y en las implicaciones de los radicales libres de oxígeno como mensajeros universales para activar al NF- κ B.

3. En la tercera parte, el objetivo ha sido el estudio de agentes oxidantes sobre la vía JAK-STAT. Se analiza el efecto del H_2O_2 y otras especies reactivas de oxígeno (reacción de Fenton) sobre uno de los miembros de esta familia, concretamente el STAT3.

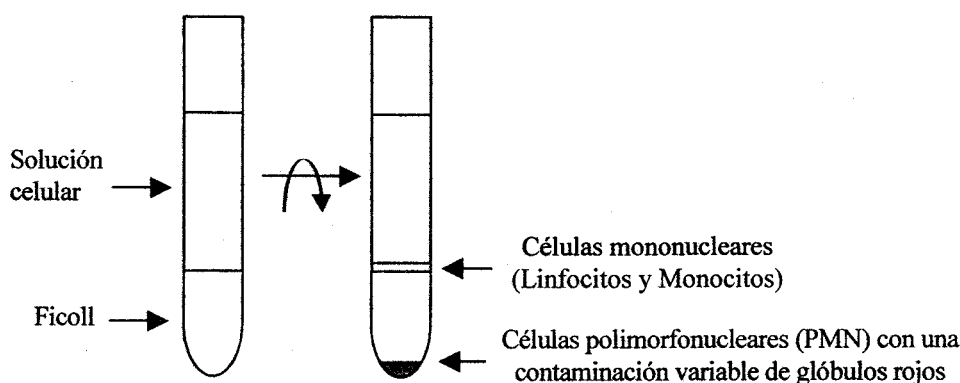
MATERIAL Y MÉTODOS

1.- PREPARACIÓN DE NEUTRÓFILOS Y LINFOCITOS

A) Preparación de neutrófilos humanos.

1.- Sangre heparinizada se mezcla con dextrano al 10 %, disuelto en ClNa al 0.9 %, para que quede a una concentración final de 0.7 % (Por ejemplo: a 20 ml de sangre se le añaden 1.4 ml de dextrano al 10 %). Se mezcla cuidadosamente sin formar espuma durante 2 min y se deja sedimentar durante 45 – 60 min.

2.- La capa superior, rica en leucocitos, se coloca cuidadosamente con pipeta Pasteur de cristal sobre un tubo que contiene Ficoll-Hypaque (d: 1.077) a una proporción de 1:2 (1 ml de Ficoll y 2 ml de la solución celular), evitando que no se mezclen los dos líquidos. Se centrifuga a 1400 rpm (400 x g) durante 20 min a 4 °C. Se obtiene las siguientes fracciones:



Esquema 1.

3.- La capa de linfocitos se recoge con pipeta Pasteur y se lavan en PBS, luego se resuspende en el medio apropiado. A la fracción de PMN, después de retirar todo el sobrenadante, se les da un choque hipoosmótico para romper los glóbulos rojos con el siguiente procedimiento: Los PMN se resuspenden en un volumen de agua durante 30 s y sin formar espuma se pasan a otro tubo limpio en el que hay el mismo volumen de ClNa (1.8 %). De esa forma restauramos la isoosmolaridad. El tiempo en el que las células están en el agua no debe ser superior a 30 s. Se centrifuga a 1000 rpm durante 5 min y se elimina el sobrenadante. A continuación se lavan los PMN dos veces en solución HBSS y finalmente se resuspenden en el medio deseado. De los 20 ml de sangre se obtienen aproximadamente de 20 – 40 millones de PMN.

B) Preparación de linfocitos humanos.

Sangre heparinizada se diluye con igual volumen de una solución de ClNa (0.9 %), mezclándose suavemente. Ahora, igual que para los PMN, se deposita esta mezcla sobre Ficoll

en una proporción 1:2, y se centrifuga 20 min a 2000 rpm. De esa forma obtenemos el halo de células mononucleares del esquema 1. Los linfocitos se separan de los monocitos haciendo que estos últimos se adhieran a una placa de cultivo. Muchas veces también hay contaminación de plaquetas que se pueden quitar con una centrifugación muy suave. De los 20 ml de sangre se obtienen aproximadamente de 15 – 35 millones de linfocitos.

2.- OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS CITOSÓLICAS Y DE MEMBRANA EN NEUTRÓFILOS HUMANOS

1.- Después del tratamiento indicado en cada experimento, las células se centrifugan a 1000 rpm y se resuspenden en un tampón de lisis sin detergente (tampón A). La suspensión celular se rompe por sonicación en hielo (3 pulsos de 5 s con intervalos de 30 s), se centrifuga a 3000 rpm durante 5 min a 4 °C, para eliminar las células no rotas y el debris, y se recoge el sobrenadante.

2.- Las proteínas citosólicas se obtienen por ultracentrifugación del sobrenadante a 92000 g, durante 1 h. El precipitado se resuspende en un tampón de lisis con detergente (tampón B) y se centrifuga a 20000 g durante 40 min a 4 °C para obtener la fracción de proteínas de membrana. En vez de octil-glucósido utilizado en nuestros experimentos, se puede utilizar otros detergentes (Tritón x-100, Nonidet P40, etc), dependiendo de las características del experimento y del grado de solubilidad que se desee.

3.- MEDIDA DE LA PRODUCCIÓN DE ANIÓN SUPERÓXIDO EN NEUTRÓFILOS HUMANOS

Este método se basa en la capacidad del $O_2^{\cdot-}$ para reducir al ferricitocromo c, y en el cambio de absorción del citocromo c reducido a 550 nm.

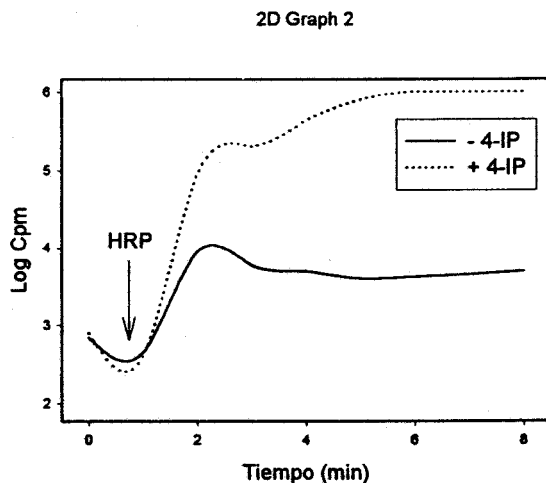


Las células se incuban a 37 °C a una concentración de 0.5×10^6 células/ml de solución tampón Krebs Ringer bicarbonato oxigenado, pH 7.4, (KRB), que contiene: 118 mM NaCl, 4.74 mM KCl, 1.18 mM KH_2PO_4 , 1.18 mM $MgSO_4$, 10 mM Hepes, 25 mM $NaHCO_3$ y 1.25 mM CaCl, con glucosa 10 mM. A continuación se añade el citocromo c (80 μ M concentración final) (40 μ l de una solución 2 mM) y después de unos segundos se añade el agente a estudiar. La reducción del citocromo c se mide en la cubeta termostaticada a 37 °C de un espectrofotómetro

por registro continuo del incremento de absorbancia a una longitud de onda de 550 nm. Los cambios de absorbancia son convertidos a nanomoles de $O_2^{\cdot-}$, empleando un coeficiente de extinción del citocromo c de $21.1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. En cada experimento se comprueba que no se produce $O_2^{\cdot-}$ en ausencia de estímulo y como control positivo del sistema celular se utiliza 100 nM de mezereína o PMA.

4.-REVELADO DE PROTEINAS POR QUIMIOLUMINESCENCIA EN MEMBRANAS: MÉTODO DE QUIMIOLUMINESCENCIA CON LUMINOL E IODOFENOL.

Esta técnica produce resultados equivalentes a la usada comercialmente (ECL, Amersham), y se basa en la emisión de quimioluminescencia a partir de luminol en presencia de H_2O_2 . Hemos utilizado la molécula de 4-iodofenol (4-IP) para potenciar este efecto. Después de análisis por técnicas de luminescencia, hemos determinado las concentraciones idóneas para que este efecto sea máximo. En el esquema 2 se observa como en presencia de (4-IP) y peroxidasa (HRP) las cpm aumentan del orden de 100000 veces.



Esquema 2. Efecto del 4-IP sobre el luminol y H_2O_2 en presencia de peroxidasa

Una vez que las proteínas han sido separadas, transferidas a membranas de nitrocelulosa e incubadas con los anticuerpos adecuados se procede al revelado de las bandas, es decir, a la identificación de la proteína que queremos estudiar. Esta proteína fijada en la membrana tiene unido el anticuerpo contra ella y sobre éste se pega un segundo anticuerpo marcado con una molécula de HRP. Esta técnica tiene las siguientes etapas:

1.- Se incuba la membrana durante 1 min en 10 ml de solución luminescente, a temperatura ambiente: 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 0.45 mM 4-iodofenol, 2.25 mM luminol, y 0.015 % (v/v) H₂O₂. Para ello, se disuelve 0.121 g de Tris-HCl en 100 ml de H₂O, se ajusta a pH 8.3 y se hacen alícuotas de 10 ml. Esta disolución se puede congelar. A continuación, se disuelve 1 mg de 4-iodofenol en 5 ml de 10 mM Tris-HCl pH 8.3. Es preciso su disolución completa; para ello hay que agitarlo de 15 a 30 min. Se pesan 4 mg de luminol y se disuelven en 25-50 µl de NaOH 1M. Luego se añaden 5 ml de 10 mM Tris-HCl pH 8.3. Se evita la exposición a la luz. La solución del luminol (5 ml) se mezcla con la del 4-iodofenol (5 ml). A continuación se añade el H₂O₂ (5 µl al 30 %) a los 10 ml de solución luminescente preparada anteriormente con el 4-IP y el luminol, se agita vigorosamente y se usa al momento. La membrana se sumerge en la solución luminescente durante 1 minuto.

2.- Transcurrido el minuto de incubación, se saca la membrana del tampón luminescente y todavía húmeda se coloca sobre un papel de filtro, se cubre con un plástico fino y se expone a una película fotográfica de rayos X de 1 a 5 min. Luego se revela.

5.- MEDICIÓN DEL CALCIO INTRACELULAR (FURA-2AM)

El análisis de la concentración intracelular de Ca²⁺ incluye varias etapas:

1.- La carga de las células se lleva a cabo con FURA-2AM. Para ello se incuban las células (10⁷ células/ml) en tampón C con 2 µM de FURA-2AM (FURA-2 éster de acetoximetilo) a 37 °C y durante 45 min. El volumen habitual es de 3-5 ml y el medio además contiene 2.5 mM de probenecid como inhibidor del transporte de aniones (evita que el FURA que se haya introducido en el citoplasma salga). Para disolver el probenecid se usa NaOH (5 M). Se añaden cantidades sucesivas de 1 µl de NaOH hasta disolverlo, luego se completa con H₂O hasta el volumen deseado. Además del probenecid se puede añadir 1 mg/ml de BSA y 10 mM de glucosa dependiendo del tipo celular.

2.- Transcurrido ese tiempo las células se lavan en tampón C (5 volúmenes de medio por cada volumen de células) con probenecid pero sin BSA ni glucosa con el objeto de eliminar del exterior todo el FURA-2AM que no haya sido captado.

3.- Se centrifuga a 1000 rpm durante 5 min y se desecha el sobrenadante. El precipitado de células se resuspende en tampón C con probenecid, en un volumen similar al inicial. Se

procede a continuación a un nuevo contaje celular para obtener aproximadamente el mismo número de células (10^7 células/ml).

4.- Para el experimento se resuspenden 4×10^6 células/0.6 ml (el volumen usado en nuestro fluorímetro). Este número de células puede variarse en función de cómo se hayan cargado las células.

5.- Antes de probar el estímulo a estudiar, hay que medir como se han cargado con Fura las células. A esta operación se le llama calibrado. Se utiliza un fluorímetro Perkin-elmer y un registrador. La suspensión celular y reactivos se mezclan en una cubeta de vidrio termostatizada a 37°C con agitación constante (se usan "micromoscas"), que se colocan en el fluorímetro (λ_{exc} 340 nm; λ_{emis} 500 nm). Para el calibrado se adicionan sucesivamente en una misma cubeta los siguientes compuestos:

- (i) 0.6 ml de suspensión celular (4×10^6 células/ 0.6 ml): Se obtiene así la fluorescencia basal calibrada (F_{basal} calibr).
- (ii) 6 μl de Cl_2Mn 10 mM que anula la fluorescencia emitida por el Fura residual, que pueda encontrarse en el medio. Leak calibrada (leak calibr).
- (iii) 3 μl de Ca-DTPA 100 mM que quela el Mn^{2+} .
- (iv) 1.2 μl de digitonina 50 mM que rompe las células y nos permite medir la fluorescencia máxima calibrada (F_{máx} calibr).
- (v) 18 μl de Cl_2Mn 100 mM que apaga la fluorescencia del FURA (autofluorescencia propia de la célula): Fluorescencia del Mn^{2+} calibrada. (F_{Mn²⁺} calibr).

6.- A otra nueva preparación celular se le añade un control positivo, que en nuestro caso es el timerosal (20 μM), el cual produce una elevación del Ca^{2+} intracelular. Ello no dará una indicación de que el sistema celular esta en condiciones correctas. Otras preparaciones nuevas se usan con el estímulo a estudiar.

7.- Cálculo de la concentración de Ca^{2+} intracelular.

El cálculo se efectúa mediante las siguientes fórmulas:

$$F_{\text{máx experimental}} = \frac{F_{\text{basal experimental}}}{F_{\text{basal calibr}}} \times (F_{\text{máx calibr}} - \text{leak calibr})$$

$$F_{Mn^{2+}} \text{ experimental} = \frac{F_{\text{basal experimental}}}{F_{\text{basal calibr}}} \times F_{Mn^{2+}} \text{ calibr}$$

$$F_{\text{min experimental}} = \frac{F_{\text{máx experim}} - F_{Mn^{2+}} \text{ exp}}{3.7} + F_{Mn^{2+}} \text{ experimental}$$

$$[Ca^{2+}] = \frac{F - F_{\text{min experim}}}{F_{\text{máx experim}} - F_{\text{min experim}}} \times K_d$$

La K_d para el FURA es de 224 nM

6.- MEDIDA DE LA ACTIVIDAD CALCINEURINA EN NEUTRÓFILOS HUMANOS

A) Para medir actividad calcineurina se requiere lo siguiente:

A.1.- Activación de la resina Dowex

- (i) Lavar la resina con H_2O abundantemente
- (ii) Lavar con NaOH 1 M dos veces
- (iii) Lavar con HCl 1 M dos veces
- (iv) Lavar con H_2O hasta que el pH este ~ 6.5

A.2.- Preparado de las columnas Dowex

Las columnas se preparan en pipetas Pasteur de cristal, poniéndose un poquito de lana de vidrio para retener la resina. A continuación se añade la resina, compactándola con un poco de H_2O . Antes de añadir la mezcla de reacción se deja que toda el H_2O fluya.

A.3.- Marcaje del fosfopéptido

El péptido usado (Asp-Leu-Asp-Val-Pro-Ile-Pro-Gly-Arg-Phe-Asp-Arg-Arg-Val-Ser-Val-Ala-Ala-Glu) corresponde a un segmento de la subunidad RII de la quinasa dependiente de AMP cíclico. Este péptido se fosforila por $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, en un único residuo de serina; la reacción esta catalizada por la subunidad catalítica de la proteína quinasa dependiente de AMP cíclico. La actividad específica de las preparaciones frescas del fosfopéptido marcado son de $500 \mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$ de péptido. Para el marcaje se mezclan los siguientes compuestos en un volumen final de $250 \mu\text{l}$ de tampón de marcaje (tampón H):

- 1.- $46 \mu\text{l}$ de péptido (1 mM; $1 \text{ nmol}/\mu\text{l}$): 46 nmoles de péptido
- 2.- $5 \mu\text{l}$ de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ ($250 \mu\text{Ci}$ en $25 \mu\text{l}$): $50 \mu\text{Ci}$

3.- 37 μ l de ATP "frío" 2 mM (disuelto en solución de marcaje) para obtener una concentración final de 0.3 mM.

4.- 17 μ l de PKC disuelto en tampón de reconstitución, buffer I (concentración final de 5.6 mg/ml).

5.- 145 μ l de tampón de marcaje (tampón H).

La mezcla se incuba a 30 °C por un tiempo de 2 h.

A.4.- Purificación del fosfopéptido marcado

Se realiza usando un cartucho (Sep-pak, de Waters), que separa el fosfopéptido marcado del [γ - 32 P]ATP. Tiene varias etapas:

1.- El cartucho se lava previamente con 6 ml de una solución de 30 % de acetonitrilo en 0.1 % de trifluoroacético (TFA). Finalmente se lava con 5 ml de una solución de 0.1 % de TFA.

2.- Se añade la muestra (250 μ l) y a continuación se lava el cartucho con 0.1 % TFA.

3.- El fosfopéptido se eluye con 30 % de acetonitrilo en 0.1 % TFA.

Se recogen pequeñas alícuotas (1 ml), tomando de cada una de ellas 1 μ l para medir la radioactividad. Juntamos aquellas en las que es máxima la radioactividad y lo dejamos liofilizando toda la noche. El liofilizado se resuspende en 2 ml del tampón de reconstitución (tampón I). Se hacen alícuotas de 200 μ l.

B) Preparación de un extracto crudo de neutrófilos purificado en Sephadex G-25.

Los neutrófilos (aproximadamente 5×10^7) se rompen por sonicación en 500 μ l de tampón D, dejándose en hielo durante 30 min. El homogenado se centrifuga a 12000 rpm durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante se hace pasar a través de una columna de Sephadex G-25 equilibrada con el tampón E y se recogen fracciones de 100 μ l. La fracción que de mayor absorbancia a 280 nm es la que se usa para medir la actividad calcineurina.

C) Tratamiento de las células y lisis, sin posterior cromatografía.

Después del tratamiento indicado en cada experimento las células (7×10^6 células/ml) se lavan una vez con 1 ml de solución salina de Hanks' (HBSS) de Bio-Whittaker. A continuación se da un pulso de centrifugación y el precipitado celular se resuspende en el tampón de lisis F, rompiéndose por sonicación. El extracto se centrifuga a 12000 rpm durante 10 min a 4 °C. Los sobrenadantes se usan como fuente de CN.

D) Medida de la actividad fosfatasa de la calcineurina.

D.1.- Fundamento.

La actividad de la fosfatasa calcineurina (CN) se mide usando como sustrato un fosfopéptido sintético correspondiente al sitio de fosforilación de la subunidad RII de la proteína quinasa dependiente de AMP cíclico. Es una adaptación de Hubbard, M. J., and Klee, C. B. (1991) in *Molecular Neurobiology*. Una vez obtenido la fuente de CN se procede al análisis:

D.2.- Método de análisis

1.- Se adicionan sucesivamente en un tubo eppendorf los siguientes compuestos, en un volumen final de 60 μ l. La incubación dura 15 min a 30 °C.

- (i) 25 – 35 μ l de tampón de incubación (tampón G)
- (ii) 20 – 30 μ l (80 μ g de proteína) del sobrenadante
- (iii) 500 nM de ácido okadaico (1 μ l de una solución patrón de 25 μ M)
- (iv) 2 μ M del fosfopéptido marcado con 32 P (5 μ l de una solución patrón de 24 μ M)

El volumen del tampón de incubación variará en función de lo concentrado que esté el sobrenadante. El ácido okadaico es un inhibidor específico de las fosfatasas 1A y 2A, independientes de Ca^{2+} (500 nM es suficiente para inhibir dichas fosfatasas). El EGTA es un quelante de calcio. Se añade a la solución de análisis cuando se desea medir la actividad de otras fosfatasas distintas de la calcineurina.

2.- Transcurrido el tiempo de incubación, la reacción se detiene añadiendo 500 μ l de una solución 100 mM fosfato potásico, pH 7.0, que contiene 5 % ácido tricloroacético.

3.- Como tubo “blanco” de las muestras se pone:

- (i) 55 μ l del tampón de incubación
- (ii) 5 μ l del fosfopéptido marcado

4.- La mezcla de reacción (60 μ l) se hace pasar por columnas con 500 μ l de resina Dowex (intercambio catiónico). Para liberar el fosfato inorgánico (producto de la actividad fosfatasa) se añade 500 μ l de H_2O a la columna. Todo el volumen que sale de ella, se recoge en viales de centelleo. El conteo, en un contador β , se realiza después de la adición de 2 ml de líquido de centelleo.

7.- OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS CITOSÓLICAS Y NUCLEARES DE LINFOCITOS HUMANOS PARA EXPERIMENTOS DE WESTERN BLOTTING E INMUNOPRECIPITACIÓN

A) Para transferencia de proteínas de gel a membrana (Western blotting).

1.- Después del tratamiento indicado en cada experimento, las células (10×10^6 células/ml) se lisan en 75 μ l del tampón de lisis (tampón J), dejándose en hielo durante 30 min con agitación periódica. A continuación se centrifugan a 10000 x g durante 10 min a 4 °C. Los sobrenadantes se usan como fracciones citosólicas (proteínas citosólicas) mientras que los precipitados se usan como fracciones nucleares (proteínas nucleares).

2.- Los sobrenadantes se mezclan con “buffer de muestra” (tampón de Laemmli), cuya concentración final (tampón de muestra + sobrenadante) debe ser: 62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2 % SDS, 10 % glicerol, 5 % 2- β mercaptoetanol y 0.05 % azul de bromofenol. (Esta solución debe prepararse 4 veces concentrada y se diluye bien con la muestra con Tris-HCl 0.5 mM pH 6.8).

3.- La muestra junto con el “tampón de muestra” se agita y se calienta a 95 °C durante 5 min. Se centrifuga a 10000 x g durante 10 min. Las muestras se pueden congelar o utilizarse para separar las proteínas en un gel de poliacrilamida por electroforesis.

4.- El precipitado de núcleos se lava 3 veces con el mismo tampón de lisis J, centrifugando cada vez a 10000 x g durante 5 min y 4 °C. A continuación se le añaden ~40 μ l de tampón de muestra 1x. Se agita y se calienta a 95 °C durante 5 min. Luego se centrifuga a 10000 x g durante 10 min y de nuevo se puede congelar o usarse para la electroforesis.

B) Para inmunoprecipitación

1.- Después del tratamiento de cada experimento las células (10×10^6 células/ml) se lisan en 75 μ l del tampón de lisis para inmunoprecipitar (tampón K). Se dejan en hielo durante 30 min con agitación periódica y luego se centrifugan a 10000 x g durante 10 min a 4 °C.

2.- El sobrenadante, que es donde esta la proteína a inmunoprecipitar, se incuba con el anticuerpo apropiado durante 2 h a 4 °C. Se le añaden 40 μ l de proteína A-Sepharosa (50 %) y se incuba por 2 h más. Pasado este tiempo, se centrifuga a 10000 x g durante 5 min y se recoge el precipitado.

3.- Se lava el precipitado 5 veces con el tampón de lisis K. Después del último lavado se le añade el tampón de muestra 1x (tampón Laemmli), y se procede como se indicó anteriormente.

C) Técnica para limpiar la membrana de anticuerpos (stripping)

Se usa para quitar el anticuerpo de la membrana y de nuevo usarla para detectar otra proteína diferente (Immunoblotting).

Después de la técnica de quimioluminiscencia, la membrana se lava con H₂O o TBST (150 mM NaCl, 50 mM Tris HCl pH 7.5, y 0.1 % Tween 20) durante 1 – 2 min. La membrana se incuba durante 30 min a 50 °C en el tampón siguiente: 62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2 mM EDTA y 100 mM 2-β Mercaptoetanol. A continuación la membrana se lava 3 veces durante 10 min en TBST. Una vez transcurridos los tres lavados se continúa con el proceso de bloqueo e incubación con anticuerpos (immunoblotting).

8.- ANÁLISIS DEL CAMBIO EN LA MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA

I.-Preparado de extractos nucleares

Después del tratamiento de las células ($5-10 \times 10^6$ células/ml), éstas se lavan con 1 ml de tampón. Según se estudien PBL o PMN se usan los medios de lavado siguientes:

PBL con PBS + 400 μ M Na_3VO_4 + 400 μ M EDTA

PMN con RPMI + 2 mM DFP (diisopropilo fluorofostato)

A partir de aquí todo el proceso debe de hacerse a 4 °C.

A.- Experimentos con PBL

1.- Después de lavar las células, éstas se resuspenden en 75–100 μ l de tampón de lisis hipotónico (tampón L), dejándose en hielo durante 10 min con agitación periódica. Se centrifuga a 13000 rpm durante 1 min a 4 °C y se recoge el precipitado.

2.- Los núcleos obtenidos en el precipitado del paso anterior, se lavan dos veces con 150 μ l del tampón L. A continuación, se lisan en 25 μ l de tampón de lisis hipertónico: tampón L + 20 % glicerol y 420 mM NaCl. Se dejan en hielo durante 30 min con agitación periódica y se centrifugan a 13000 rpm durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante se transfiere a un tubo limpio, y antes de congelar, se mide la concentración de proteínas por Bradford (5 μ l). Los extractos nucleares se congelan a –80 °C.

B.- Experimentos con PMN

1.- Después de lavar las células, éstas se resuspenden en 75–100 μ l de tampón de relajación (tampón M), dejándose en hielo durante 10 min con agitación periódica. A continuación, los neutrófilos se les da un pulso de sonicación suave (1 s). Se centrifuga a 3000 rpm durante 10 min a 4 °C y se recoge el precipitado.

2.- Las células no rotas y núcleos intactos del precipitado del paso anterior se resuspenden de nuevo en 100 μ l del tampón M. Se les da otro pulso de sonicación (1 s) y se centrifuga a 3000 rpm durante 10 min a 4 °C recogiendo el precipitado.

3.- Los núcleos obtenidos en el precipitado del paso anterior, se lavan con 200 μ l del tampón M, se centrifuga a 3000 rpm durante 10 min a 4 °C y se lisan en 25 μ l de tampón M con adición suplementaria de 10 % glicerol y 380 mM NaCl. Se deja en hielo durante 20 min con

agitación periódica y se centrifuga a 13000 rpm durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante se transfiere a un tubo limpio, y antes de congelar los extractos nucleares a - 80 °C, se mide la concentración de proteínas por Bradford (5 µl).

II.- Anillamiento de oligonucleótidos

Para hacer los experimentos de análisis del cambio de movilidad electroforética (EMSA), se han utilizado dos oligonucleótidos: Un oligonucleótido de 22 pb conteniendo una región de consenso para el factor de transcripción NF-κB, y otro (SIEM 67) de 20 pb con una zona de unión para el factor de transcripción STAT3.

Anillamiento de oligonucleótidos

1.- Los oligonucleótidos de cadena sencilla se mezclan en la proporción molar 1:1 de cada cadena, en solución tampón TEN (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl). La cantidad que se pone de cada cadena va a depender de la preparación comercial de los oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos para el STAT3 fueron:

SIEM 67 (1): Longitud: 20 5'-GTC GAC ATT TCC CGT AAA TC-3'

SIEM 67 (2): Longitud: 20 5'-GAT TTA CGG GAA ATG TCG AC-3'

Los oligonucleótidos para el NF-κB fueron:

NF-κB (1): Longitud: 22 5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3'

NF-κB (2): Longitud: 22 5'-GCC TGG GAA AGT CCC CTC AAC T-3'

2.- La mezcla resultante de la etapa 1, se incuba durante 10 min a 95 °C. A continuación, se deja enfriar lentamente a temperatura ambiente durante 2 h y posteriormente se diluye con el tampón TEN hasta una concentración de 0.5 pmol/µl de los oligonucleótidos.

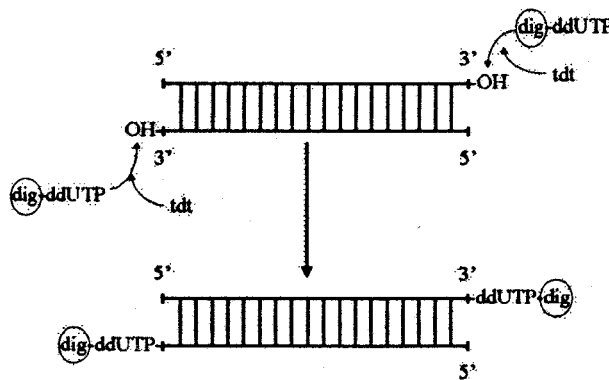
III.- MARCAJE DE OLIGONUCLEÓTIDOS

El uso de métodos no radiactivos para el marcaje de ácidos nucleicos, ha aumentado en los últimos años puesto que se evitan las desventajas asociadas con los radioisótopos. El método más frecuente es marcar el oligonucleótido con digoxigenina (DIG). La DIG es un hapteno artificial cuya base es la cardenolida. Los cardenolides pueden ser obtenidos de la planta *Digitalis*. La DIG es detectado por los anticuerpos policlonales, altamente específicos que tienen acoplado

actividad fosfatasa alcalina (complejo Ab-AP). Este enzima reacciona con un sustrato quimioluminescente y la señal luminosa resultante impresiona una placa fotográfica.

Ejemplo: Marcaje del oligonucleotido para el NF- κ B

Se marca en los extremos 3'-OH de cada cadena del oligonucleotido con digoxigenina-dideoxi-UTP (Digoxigenina-11-ddUTP. Se utiliza un dideoxinucleótido para sólo añadir un nucleotido a ambos extremos, empleando la enzima transferasa terminal para catalizar la reacción en presencia de iones de Co^{2+} (preferibles cuando se utilizan nucleotidos pirimidínicos).



Esquema 3.

Protocolo: (Boehringer Mannheim, DIG Gel Shift Kit)

Materiales:

- Solución tampón de marcaje (5x) (1M cacodilato potásico, 125 mM Tris-HCl pH 6.6, 1.25 mg/ml BSA)
- CoCl_2 (25 mM en H_2O bidestilada)
- Digoxigenina-11-ddUTP (1 mM en H_2O bidestilada)
- Transferasa terminal (50 U/ μl en 0.2 M cacodilato potásico pH 6.5, 1 mM EDTA, 0.2 M KCl, 0.2 mg/ml BSA, glicerol 50 %)
- Oligonucleotido de doble cadena NF- κ B (Promega) (1.75 pmol/ μl ó 25 ng/ μl), secuencia consenso para NF- κ B
- Alcohol etílico concentrado
- Alcohol etílico 70 %
- LiCl (4 M en H_2O bidestilada)

Método de marcaje:

1.- Se mezcla, en hielo, hasta un volumen final de 20 μ l las siguientes cantidades:

- 4 μ l de tampón de marcaje 5 x
- 4 μ l CoCl_2
- 4 μ l oligonucleotido NF- κ B ~100 ng
- 1 μ l dig-ddUTP
- 1 μ l transferasa terminal
- 6 μ l ddH₂O

2.- Se incuban 15 min a 37 °C, parando la reacción por enfriamiento a 4 °C.

3.- El oligonucleótido marcado con digoxigenina se precipita con 2 μ l de LiCl 4 M y 60 μ l de etanol frío (-20 °C). Posteriormente se incuba a -70 °C durante 30 min.

4.- Se centrifuga a 12000 rpm durante 15 min a 4 °C; se lava el precipitado 3 veces con 500 μ l de etanol al 70 % frío (-20 °C) y se vuelve a centrifugar durante 5 min a 4 °C tras cada adición de etanol.

5.- Después del último lavado, se elimina todo el sobrenadante y se seca en centrífuga con vacío durante 5 min (Speed-vac). Se resuspende el precipitado en 25 μ l de solución de tampón TEN y se congela a -20 °C.

IV.- Análisis del cambio de movilidad electroforética (EMSA)

Para llevar a cabo la técnica EMSA se ha utilizado el kit comercial "Dig gel shift kit" (Boehringer Mannheim).

1.- Preparación de geles de acrilamida. El gel de acrilamida (5 %), se prepara el día antes del experimento y se deja a 4 °C.

Preparación de soluciones:

- (i) Solución concentrada de acrilamida: bis acrilamida (29,2: 0,8).
- (ii) Tampón Tris-borato-EDTA (TBE) 10x: 890 mM Trizma BASE, 890 mM Ácido bórico, 20 mM EDTA pH 8

El pH de las soluciones resultantes no se modifica

(iii) Mini-gel (para EMSA)

	5 % (1 Gel)
Acrilamida:Bis (29,02:0,8)	1.375 ml
H ₂ O	5.475 ml
TBE x 5	0.6 ml
Amonio Persulfato 10%	50 µl
TEMED	7.5 µl

2.- La electroforesis se lleva a cabo a 4 °C en una solución tampón TBE 0.25x. Con el fin de eliminar contaminantes salinos, se hace pasar la corriente eléctrica 1-2 h, antes de introducir la muestra.

3.- Reacción de unión:

El siguiente caso práctico ilustra la manera de proceder, para que tenga lugar la unión del factor de transcripción a estudiar con una secuencia específica de oligonucleótido. Se mezcla a temperatura ambiente lo siguiente:

Tubos	1	2	3	4	5	6	Frente ¹	Compt ²
Tampón N (4 x)	4 µl	4 µl	4 µl	4 µl	4 µl	4 µl	4 µl	4 µl
Poli [d(I-C)] (vial 9)	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
Poli L-Lys (vial 11)	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
Oligo. marcado con Dig	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
H ₂ O csp	7 µl	7 µl	7 µl	7 µl	7 µl	7 µl	7 µl	6 µl
Oligo sin marcar	-	-	-	-	-	-	-	1 µl
Extracto nuclear ³	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	-	5 µl
H ₂ O	-	-	-	-	-	-	5 µl	-
Se agita suavemente, se centrifuga y se deja transcurrir la reacción de unión 20 min a temperatura ambiente								
Tampón de carga sin colorante, vial 12	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	-	5 µl
Tampón de carga con bromofenol, vial 13	-	-	-	-	-	-	5 µl	-

¹Este tubo contiene todos los reactivos, con la excepción del extracto nuclear, y con el suplente de un tampón de carga con colorante azul.

²100-200 veces más que el marcado. Se añade antes del oligonucleótido marcado. Se usa para estudiar la especificidad del oligonucleotido.

³De muestra se ponen los μ l necesarios para tener 3-10 μ g de proteína, el resto con H₂O.

4.- A continuación damos un pulso de centrifugación y vertimos la mezcla resultante en el gel. Se hace pasar la corriente a través del gel a 80 V (8 V/cm), durante un tiempo aproximadamente de 1h. y 20 min. Se para cuando las muestras hayan recorrido 3/4 partes del recorrido de la electroforesis.

5.- Transferencia en semiseco de oligonucleótidos del gel a una membrana de nylon. Se requiere lo siguiente:

- (i) Tampón de transferencia TBE 0.25 x
- (ii) Membrana de nylon, cargada positivamente (Amersham)
- (iii) Papel Whatman 3 MM

La membrana de nylon se equilibra en tampón de transferencia durante 10 min. Esta debe de cortarse del tamaño del gel y 8 papeles Whatman 3 MM, disponiéndose de la siguiente forma, en el aparato de transferencia:

4 papeles Whatman equilibrados

Membrana de nylon equilibrada

Gel

4 papeles Whatman equilibrados

La transferencia tiene lugar a 400 mA durante 30 min (Inicio: 28-30 V; Final: 40-42 V).

6.- Una vez realizada la transferencia, se equilibra la membrana en SSC 10 x durante 1-2 min. SSC (10 x): 1.5 M NaCl, 0.15 M Citrato Sódico, pH 7.0. Luego se fija el oligonucleotido a la membrana con radiación ultravioleta (UV-"cross linker"). Dos pulsos de radiación de 100000 μ J/cm². Si el revelado no se va a llevar a cabo después de la fijación, la membrana se puede secar al aire y mantenerse a temperatura ambiente entre 2 hojas de papel Whatman 3 MM.

7.- La membrana de nylon se lava durante 1 min con solución maleico: (0.1 M Acido Maleico, 0.15 M NaCl pH 7.5. Se ajusta el pH con NaOH solido o concentrado). Se esteriliza por calor.

8.- La membrana se bloquea con 3 % de reactivo de bloqueo (Boehringer Mannheim) en solución maleico durante 1 h.

9.- Se incuba con el anticuerpo α -Ig-DIG 1:10000 (Boehringer Mannheim) en solución de reactivo de bloqueo durante 30 min.

10.- Se lava 3 veces durante 10 min cada vez con 0.3 % Tween 20 en solución de Maleico.

11.- Se lava durante 2-3 min a 37 °C en tampón de sustrato: 0.1M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 50 mM MgCl₂ pH 9.5.

12.- Se incuba la membrana en un sustrato quimioluminescente de la fosfatasa alcalina CSPstar (Tropix) durante 15 min a 37 °C. CSPstar se prepara disolviendo 60 μ l CSPstar en 6 ml de tampon de sustrato (indicado en el punto 11).

13.- La membrana se expone a una película fotográfica de rayos X de 1 a 5 min y se revela.

9.- RELACIÓN DE TAMPONES

Tampón A (Tampón de lisis sin detergente)

100 mM HEPES pH 7.3

100 mM KCl

3 mM NaCl

3 mM MgCl₂

1.25 mM EGTA

1 mM PMSF

5 µg/ml Aprotinina

156 µg/ml Benzamidina

Tampón B (Tampón de lisis con detergente)

120 mM NaH₂PO₄ pH 7.4

1 mM MgCl₂

1 mM EGTA

1 mM Ditioneitol

20 % Glicerol

40 mM Octil glucosido

Tampón C (Medio de incubación)

137 mM NaCl

2.7 mM KCl

1 mM MgCl₂

1 mM CaCl₂

20 mM HEPES pH 7.4

Tampón D

50 mM Tris, pH 8.0

0.5 % Tritón X-100

150 mM NaCl

50 µg/ml PMSF

50 µg/ml tripsnina soybean

10 µg/ml aprotinina

10 µg/ml leupeptina

Tampón E (Tampón de equilibrado)

50 mM Tris-HCl pH 7.5
0.1 mM EDTA
0.1 % β -mercaptoetanol
50 μ g/ml PMSF
50 μ g/ml tripsina soybean
10 μ g/ml aprotinina
10 μ g/ml leupeptina

Tampón F (Tampón de lisis)

50 mM Tris-HCl pH 7.5
0.1 mM EGTA
1 mM EDTA
0.5 mM DTT
50 μ g/ml PMSF
50 μ g/ml tripsina soybean
10 μ g/ml aprotinina
10 μ g/ml leupeptina

Tampón G (Tampón de incubación)

20 Tris-HCl pH 8.0
100 mM NaCl
6 mM MgCl₂
0.5 mM DTT
0.1 mg/ml BSA
0.1 mM CaCl₂ or 5 mM EGTA

Tampón H (Tampón de marcaje)

40 mM HEPES pH 6.5
0.4 mM EGTA
0.8 mM EDTA
4 mM MgCl₂
0.1 mM CaCl₂
0.1 mg/ml BSA

Tampón I (Tampón de reconstitución)

50 mM Tris-HCl pH 7.5

0.1 mM EGTA

5 % DTT

1 mg/ml BSA

Tampón J (Tampón de lisis)

1 % NP-40

20 mM Tris HCl pH 8.0

137 mM NaCl

5 mM MgCl₂

10 % Glicerol

5 mM EDTA

100 μM PAO

1 mM Na₃VO₄

10 μg/ml aprotinina

10 μg/ml leupeptina

1 mM PMSF

Tampón K (Tampón de lisis para inmunoprecipitar)

1 % Tritón - X 100

300 mM NaCl

50 mM Tris-HCl pH 7.4

5 mM EDTA

100 μM PAO

1 mM Na₃VO₄

10 μg/ml aprotinina

10 μg/ml leupeptina

2 mM PMSF

Tampón L (Tampón hipotónico)

20 mM HEPES pH 7.9

10 mM KCl

10 % glicerol

1 mM Na₃VO₄
1 mM EDTA
1 mM PMSF
10 µg/ml aprotinina
10 µg/ml leupeptina
20 mM NaF
1 mM DTT
0.2 % NP-40

Tampón M (Tampón de relajación)

10 mM HEPES pH 7.3
30 mM KCl
3 mM NaCl
3.5 mM MgCl₂
1.25 mM EGTA
0.5 mM DTT
2 mM DFP
1 mM PMSF
10 mM iodoacetamida
1 mM benzamidina
10 µg/ml aprotinina
10 µg/ml leupeptina
10 µg/ml captopril

Tampón N (Tampón de unión) (4x)

80 mM Tris-HCl pH 7.5
200 mM KCl
4 mM EDTA
4 mM DTT
0.4 % NP-40

RESULTADOS

CAPÍTULO 1.**1.- UNA NUEVA MOLÉCULA DERIVADA DE CATIONES DE RUTENIO, CON ACTIVIDAD ANTITUMORAL, ACTIVA LA NADPH OXIDASA EN NEUTRÓFILOS HUMANOS.**

Para determinar la naturaleza de los mecanismos por los que ciertos complejos derivados de rutenio (Ru) inducen regresión en tumores en crecimiento, nosotros hemos investigado la posibilidad de que estos mecanismos estén asociados con un aumento de la producción de anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) por células fagocíticas, las cuales normalmente se encuentran en los nódulos tumorales. Se demuestra que la síntesis de un nuevo complejo, el Ru-PDTA (ácido Ru³⁺-propileno-1, 2-diaminotetra-acético), derivado de rutenio y el ligando que lo secuestra (PDTA), estimula específicamente la producción de $O_2^{\cdot-}$. Este incremento está asociado con la translocación a la membrana de los factores citosólicos p47^{phox} y p67^{phox} de la NADPH-oxidasa. La producción de $O_2^{\cdot-}$ dependiente del complejo Ru-PDTA es anulada por estaurosporina, parcialmente inhibida por DPI (iodonio de difenileno), y es insensible al previo tratamiento con la toxina colérica o el dibutiril AMPcíclico. En neutrófilos tratados con el complejo Ru-PDTA también se detecta un aumento en los niveles de Ca²⁺ citosólico. El complejo Ru-PDTA también induce fosforilación en residuos de tirosina de varias proteínas, medida por experimentos de transferencia de proteínas del gel a una membrana y posteriormente incubación con anticuerpos antifosfotirosina. Estos datos son coherentes con la posibilidad, de que los efectos antitumorales del complejo Ru-PDTA sean debido, en parte, a su capacidad para estimular la producción de metabolitos tóxicos de oxígeno por las células fagocíticas infiltradas en las masas tumorales.

A newly synthesized molecule derived from ruthenium cation, with antitumour activity, activates NADPH oxidase in human neutrophils

Modesto CARBALLO*, Rosario VILAPLANA†, Gracia MÁRQUEZ*, Manuel CONDE*, Francisco J. BEDOYA*, Francisco GONZÁLEZ-VÍLCHEZ† and Francisco SOBRINO*

*Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Sevilla, Av. Sánchez Pizjuan 4, Sevilla-41009, Spain, and

†Departamento de Química Inorgánica, Facultad de Química, Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain

To determine the nature of the mechanism by which certain derived ruthenium (Ru) complexes induce regression in tumour growth, we have investigated the possibility that this mechanism was associated with an increase of superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) production by phagocytic cells, which are usually found in tumour nodes. Here we present evidence that a newly synthesized complex, Ru^{3+} -propylene-1,2-diaminotetra-acetic acid (Ru-PDTA), derived from Ru and the sequestering ligand (PDTA), specifically stimulates $O_2^{\cdot-}$ production. This increase was associated with the translocation of cytosolic factors p47^{phox} and p67^{phox} of NADPH oxidase to the plasma membrane. The

Ru-PDTA-complex-dependent $O_2^{\cdot-}$ production was abrogated by staurosporine, partially inhibited by diphenylene iodonium, and it was insensitive to pertussis toxin or dibutyryl cyclic AMP pretreatment. An increase of cytosolic Ca^{2+} levels were also detected in neutrophils treated with the Ru-PDTA complex. Also, Ru-PDTA complex induced the phosphorylation of tyrosine residues of several proteins as assessed by Western blotting. Present data are consistent with the possibility that Ru-PDTA-dependent antitumour effects are due in part to the complex's ability to stimulate the release of toxic oxygen metabolites from phagocytic cells infiltrating tumour masses.

INTRODUCTION

The potential use of ruthenium (Ru^{3+}) complexes in cancer chemotherapy has been recognized by researchers in different areas [1–4]. These substances have not only shown good anti tumour activity in screening studies [5,6], but many also localize in tumour tissues [7]. Ru^{3+} compounds, as prodrugs, can be reduced in the hypoxic tumoural areas into more active species which bind rapidly to cellular DNA [8,9]. In this way, amine-Ru complexes may be activated *in vivo* to co-ordinate the appropriate atoms of the nucleobase in a similar fashion to that of platinum anticancer drugs [10–12]. A recently investigated new group of promising anticancer compounds, namely Ru complexes with polyaminopolycarboxylic chelating ligands, are highly soluble in water and their active forms are six-co-ordinate with octahedral structures [13]. Recently we synthesized and characterized a new molecule formed by Ru^{3+} and the chelating ligand propylene-1,2-diaminotetra-acetic acid (PDTA) [14]. Compounds formed by this chelating agent, a methyl derivative of EDTA, are about two orders of magnitude more stable than the analogues formed with the parent ligand. It is likely that these complexes are transported to the tumour site by transferrin [15,16]. Indeed, the *in vivo* distribution of Ru might be determined by its interaction with this iron-transport protein because of similarities between the two metal ions. Since malignant cells have a high requirement for iron, it has been suggested that the accumulation of Ru^{3+} complexes in tumour cells might be mediated by transferrin [8].

NADPH oxidase, an enzyme found in phagocytic cells, catalyses the reduction of oxygen to $O_2^{\cdot-}$ using NADPH as the electron donor (see for a review, 17–21). The $O_2^{\cdot-}$ that is formed, along with reactive species derived from it, is used as a potent

antimicrobial weapon in the process of host defence. The NADPH oxidase complex consists of two membrane-bound redox centres: a FAD-containing flavoprotein and a heterodimeric *b*-type cytochrome, cytochrome *b*₅₅₈ (also called cytochrome *b*₅₅₉). The oxidase is dormant in resting neutrophils, but acquires catalytic activity when the cells are exposed to appropriate stimuli [22]. The components of NADPH oxidase exist in the form of a complex that contains the cytosolic proteins p47^{phox} and p67^{phox}. The fact that the $O_2^{\cdot-}$ -forming NADPH oxidase is always recovered in the particulate fraction suggests that, in the course of physiological enzyme activation, cytosolic components are translocated to the membrane.

The present study was undertaken to analyse whether the novel Ru-PDTA complex was able to activate the respiratory burst in human neutrophils. This activity could be associated with the cytostatic capacity of specific cells, such as neutrophils, which participate in the defence mechanisms. It is known that activated phagocytic cells have the capacity to exert cytotoxicity towards tumour cells *in vitro*. It is also known that phagocytic cells infiltrate tumour nodes and that they are very proximal to tumour cells [23]. The present paper provides evidence that the Ru-PDTA complex stimulates $O_2^{\cdot-}$ production and also that it increases cytoplasmic Ca^{2+} levels by human neutrophils *in vitro*. This effect could mediate the tumour regression that was observed with the Ru-PDTA complex in previous studies [24].

EXPERIMENTAL

Materials

Ru-PDTA complex (molecular mass 548.3) was synthesized as described previously [14]. Chemicals were of analytical grade

Abbreviations used: $[Ca^{2+}]_i$, cytosolic free calcium concentration; DPI, diphenylene iodonium; Ru-PDTA, complex from ruthenium (Ru^{3+}) and propylene-1,2-diaminotetra-acetic acid {PDTA, $[Ru(C_{11}H_{15}N_2O_8)Cl_2] \cdot H_4H_2O$ }; $O_2^{\cdot-}$, superoxide anion.

† To whom correspondence should be addressed.

from Merck (Darmstadt, Germany). Cytochrome *c*, Fura-2 acetoxymethyl ester, pertussis toxin, dibutyl cyclic AMP and horseradish peroxidase conjugated with goat anti-mouse IgG were obtained from Sigma Chemical (Madrid, Spain). Other biochemical reagents were from Boehringer (Mannheim, Germany). 2-Mercaptoethanol, SDS, acrylamide, *NN'*-methylenebisacrylamide, Coomassie Brilliant Blue R-250 and nitrocellulose blotting membranes were purchased from Bio-Rad (Richmond, CA, U.S.A.). Ficoll 400 and molecular-mass standards were from Pharmacia (Uppsala, Sweden). Staurosporine was purchased from Calbiochem-Boehringer (La Jolla, CA, U.S.A.). Rabbit polyclonal antibodies raised against p47^{phox} and p67^{phox}, together with diphenylene iodonium (DPI) were kindly given by Professor O. T. G. Jones (Department of Biochemistry, University of Bristol, Bristol, U.K.). Monoclonal antibody specific for phosphotyrosine (PY20) was purchased from Transduction Laboratories (Lexington, KY, U.S.A.). Luminol (5-amino-2,3-dihydrophthalazine-1,4-dione) was purchased from Serva (Spain) and 4-iodophenol was from Aldrich.

Neutrophil preparation and culture

Neutrophils were obtained from normal adult human subjects and purified by dextran sedimentation and Ficol-Hypaque centrifugation as indicated in [25]. Neutrophils (5×10^6 cells/ml) were suspended in Krebs-Ringer bicarbonate buffered with Hepes (KRB), pH 7.4 (118 mM NaCl/4.75 mM KCl/1.18 mM KH_2PO_4 /1.18 mM MgSO_4 /10 mM Hepes/25 mM NaHCO_3 /1.25 mM CaCl_2) and containing 10 mM glucose. Further additions are described in the legends to the individual Figures.

Preparation of cytosolic and membrane fractions

After different times of incubation cells were centrifuged (800 *g*) and lysed in buffer A [100 mM Hepes (pH 7.3)/100 mM KCl/3 mM NaCl/3 mM MgCl_2 /1.25 mM EGTA/1 mM PMSF/5 $\mu\text{g/ml}$ aprotinin/156 $\mu\text{g/ml}$ benzamidine]. The cells were disrupted by sonication on ice (20 W for three bursts of 5 s each, separated by 30 s intervals). Unbroken cells and debris were removed by centrifugation at 10000 *g* for 5 min at 4 °C. The cytosolic fraction was obtained by ultracentrifugation at 92000 *g* for 60 min at 4 °C, as indicated in [26]. The pellets were resuspended in the sonication buffer B, with detergent [120 mM NaH_2PO_4 (pH 7.4)/1 mM MgCl_2 /1 mM EGTA/1 mM dithiothreitol/20% glycerol and 40 mM octyl glucoside] and then centrifuged at 18000 rev./min (20000 *g*) for 40 min at 4 °C. The resulting pellets were used as the membrane fraction.

Measurement of $\text{O}_2^{\cdot-}$ release by neutrophils

Neutrophils (0.5×10^6 cells/ml) were added to paired cuvettes containing 80 μM cytochrome *c* in KRB with a final assay volume of 1 ml. $\text{O}_2^{\cdot-}$ was measured by monitoring the superoxide dismutase-inhibitable reduction of cytochrome *c* at 550 nm, at 37 °C, using a diode-array double-beam spectrophotometer (Hewlett Packard) [27]. $\text{O}_2^{\cdot-}$ production was stimulated by different concentrations of the Ru-PDTA complex or 100 nM mezerein. $\text{O}_2^{\cdot-}$ generation was calculated by using a molar absorption coefficient of 21.1 $\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

Electrophoresis, immunoblotting and detection by enhanced chemiluminescence

Membrane and cytosolic fractions were subjected to SDS/PAGE on 10% polyacrylamide gels using the Laemmli buffer system [28]. Separated proteins were transferred on to a nitrocellulose

membrane, which was blocked with 5% defatted milk. The membrane was incubated with a mixture of partially purified rabbit antibodies raised against p47^{phox} and p67^{phox} and finally detected with horseradish peroxidase conjugated with goat anti-rabbit IgG (1:5000 final dilution). The bound secondary antibody was detected by enhanced chemiluminescence. Briefly, membranes were incubated for 1 min in 10 ml of fresh luminol reagent solution, composed of 10 mM HCl/Tris, pH 8.5, 2.25 mM luminol, 0.015% (v/v) H_2O_2 and 0.45 mM 4-iodophenol, the latter acting as enhancer of the chemiluminescence reaction [29]. These concentrations of luminol, H_2O_2 and 4-iodophenol had been determined to be optimal for maximum light production (M. Carballo, G. Marquez and F. Sobrino, unpublished work). Luminol and 4-iodophenol were freshly prepared in 10 ml of 10 mM Tris/HCl, pH 8.5. Luminol was previously dissolved in 50 μl of 1 M NaOH. The use of DMSO as solvent should be avoided since, under alkaline-DMSO conditions, luminol autoxidizes with emission of intense luminol [30]. After 1 min of incubation the membranes were placed on a filter paper, covered with Saran wrap ('clingfilm') and exposed to X-ray films (X-OMAT; Kodak) in the dark for 1–5 min.

Analysis of protein tyrosine phosphorylation

Neutrophils (5×10^6 cells) in 0.5 ml of KRB were pretreated with different concentrations of the Ru-PDTA complex. The reaction was terminated at 20 min by centrifugation and aspiration of the reaction medium. A volume (75 μl) of sample buffer [28] containing 125 mM Tris/HCl (pH 6.8)/2%, SDS/5%, glycerol/5%, mercaptoethanol/0.003%, Bromophenol Blue was added to the pellet, and the samples were boiled for 5 min. The cell lysates were resolved by SDS/10% PAGE. Separated proteins were electrotransferred to a nitrocellulose membrane. After blocking with 3% BSA/1 mM PMSF/5 $\mu\text{g/ml}$ aprotinin in TBST [150 mM NaCl/50 mM Tris/HCl (pH 7.5)/0.1% Tween 20] the membrane was incubated with anti-phosphotyrosine antibody (PY20) (1:2000 final dilution). Bound antibodies were detected by luminol enhanced chemiluminescence, as indicated above. Protein concentrations were analysed as previously described [31].

Measurement of intracellular Ca^{2+}

Intracellular Ca^{2+} was analysed as described in [25]. Briefly, neutrophils were incubated in a medium (Ca^{2+} medium) composed of 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 1 mM CaCl_2 , 20 mM Hepes at pH 7.4, at a concentration of 10^7 cells/ml at 37 °C for 45 min in the presence of 2 μM Fura-2 acetoxymethyl ester and 2.5 mM probenecid. The excess of the dye was then washed away, and the neutrophils were kept in the same medium. Batches of 10^7 cells were resuspended in 0.6 ml of Ca^{2+} medium at 37 °C, and the Ru-PDTA complex was added to the cellular suspension. Fura-2 fluorescence ($\lambda_{\text{excitation}}$ at 340 nm and $\lambda_{\text{emission}}$ at 500 nm) was recorded on a Perkin-Elmer LS-5 spectrofluorimeter. Ca^{2+} was calibrated using a value of 224 for the K_d of Fura-2.

RESULTS

Stimulation of the respiratory burst by the Ru-PDTA complex

The tumour promoter PMA has been described as the most active stimulator of the respiratory burst [32]. In preliminary experiments, human neutrophils were incubated with PMA and the Ru-PDTA complex. It was found that the complex did not alter a PMA-dependent respiratory burst (results not shown).

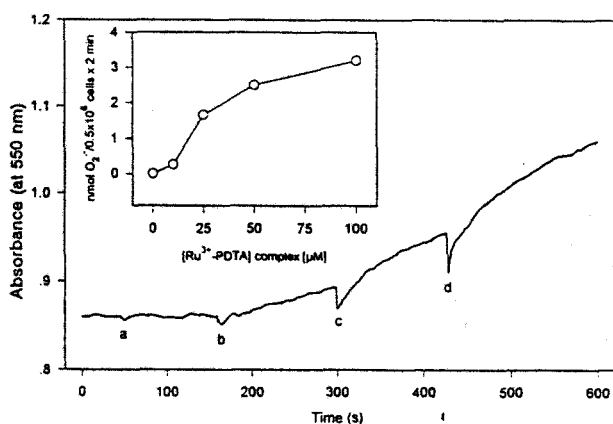


Figure 1 Absorption measurement showing the reduction of cytochrome *c* after neutrophil activation by the Ru-PDTA complex

Neutrophils (0.5×10^6 cells/ml) were incubated with $10 \mu\text{M}$ (a), $25 \mu\text{M}$ (b), $50 \mu\text{M}$ (c) and $100 \mu\text{M}$ (d) for the indicated times. Data are representative of three independent experiments. The dose-dependence of $\text{O}_2^{\cdot -}$ ($= \text{O}_2^{\cdot -}$) production is illustrated in the inset.

However, when the Ru-PDTA complex was added alone to cell suspensions, a clear production of $\text{O}_2^{\cdot -}$ was found (Figure 1). Successive additions of the Ru-PDTA induced a rapid stimulation of $\text{O}_2^{\cdot -}$ production by neutrophils which seemed to be sustained after 10-min of incubation. This $\text{O}_2^{\cdot -}$ production was dependent upon the Ru-PDTA complex concentration with an apparent $k_{0.5}$ of approx. $25 \mu\text{M}$. (Figure 1, insert). It was verified that some preparations of Ru-PDTA complex, in the absence of cells, produced a slight decrease in cytochrome *c*, which oscillates between 8 and 18% of the total change of absorbance, measured when Ru-PDTA complex was added to cells. That unspecific change of absorbance was subtracted from experimental values to obtain the specific Ru-PDTA-dependent $\text{O}_2^{\cdot -}$ production.

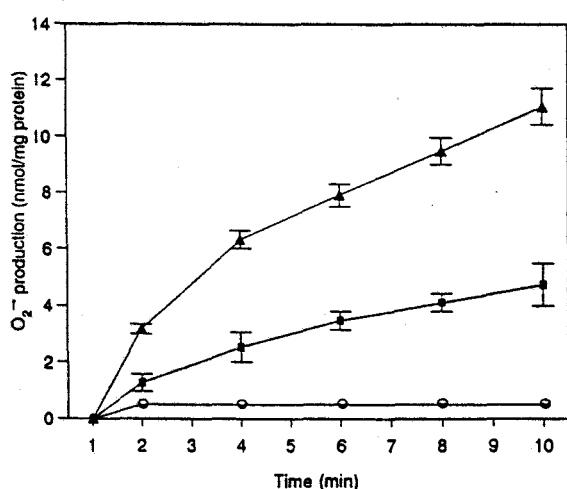


Figure 2 Kinetics of production stimulated by the Ru-PDTA complex, RuCl_3 and PDTA by human neutrophils

Neutrophils (0.5×10^6 cells/ml) were incubated with $25 \mu\text{M}$ (■) or $50 \mu\text{M}$ (▲) of the Ru-PDTA complex, and $25 \mu\text{M}$ RuCl_3 (○) or $25 \mu\text{M}$ PDTA (●). Values are means \pm S.E.M. for three independent experiments.

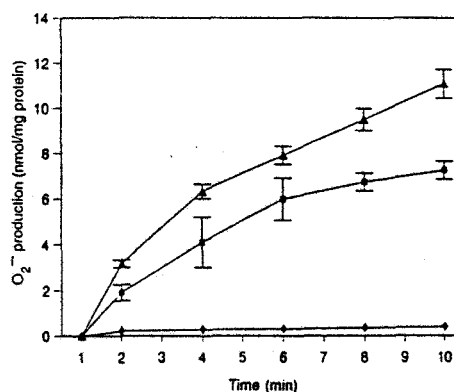


Figure 3 Effect of DPI and staurosporine on the Ru-PDTA-complex-induced ($\text{O}_2^{\cdot -}$) production by neutrophils

Neutrophils (0.5×10^6 cells/ml) were incubated with $100 \mu\text{M}$ Ru-PDTA complex in the absence (▲) or in the presence of $10 \mu\text{M}$ DPI (■) or $1 \mu\text{M}$ staurosporine (◆) for 10 min at 37°C . Data are means \pm S.E.M. for three independent experiments performed in duplicate.

Also, when Ru-PDTA complex was added to inactivated cells (e.g. by heat), it had no effect. Further experiments were then designed to assess whether the stimulatory effect of the Ru-PDTA complex was due to the Ru-PDTA molecule itself or was due to one or more of its constituents (e.g. RuCl_3 , PDTA). Figure 2 shows that only the Ru-PDTA complex had the capacity to stimulate $\text{O}_2^{\cdot -}$ production, since neither RuCl_3 nor PDTA at $25 \mu\text{M}$ had any effect. Concentrations of the constituents higher than $25 \mu\text{M}$ had no effect (results not shown). We then analysed the specificity of Ru-PDTA-dependent $\text{O}_2^{\cdot -}$ production. Figure 3 illustrates that diphenylene iodonium (DPI), a well-known inhibitor of NADPH oxidase [33], decreased $\text{O}_2^{\cdot -}$ production by approx. 25%. DPI at doses higher than $10 \mu\text{M}$ produced further inhibition, but this never reached 100%. Previous data with protein kinase inhibitors have demonstrated that NADPH oxidase activation is mediated by protein phosphorylation [34,35]. The presence of $1 \mu\text{M}$ staurosporine produced a complete inhibition of Ru-PDTA-dependent formation $\text{O}_2^{\cdot -}$ (Figure 3). The lower inhibition observed with DPI may be interpreted in terms of previous findings, which indicate the necessity of reducing conditions for inhibition of $\text{O}_2^{\cdot -}$ production by DPI [36]. Since the Ru-PDTA complex forms an oxidant environment [37], this may explain the decreased inhibitory capacity of DPI. The response to the Ru-PDTA complex was not altered by pertussis-toxin pretreatment, indicating that the involvement of G_i -type guanine-nucleotide-regulatory protein was unlikely. Since pertussis toxin produces an activation of adenylyl cyclase, the effect of dibutyryl cyclic AMP was also investigated (results not shown). In agreement with the observations with pertussis toxin, cyclic AMP did not alter the response to the Ru-PDTA complex. Previously [38] it was shown that cyclic AMP or agents that elevate intracellular levels of cyclic AMP decrease $\text{O}_2^{\cdot -}$ production [38]. However, it has been shown recently that cyclic AMP treatment does not alter PMA-dependent $\text{O}_2^{\cdot -}$ production in neutrophil-like HL-60 cells [39].

Translocation of NADPH oxidase subunits and phosphorylation on tyrosine residues induced by the Ru-PDTA complex

Studies performed with neutrophils treated PMA and other stimuli have shown that translocation of cytosolic $p47^{\text{phox}}$ and $p67^{\text{phox}}$ to the plasma membrane is an essential process for the

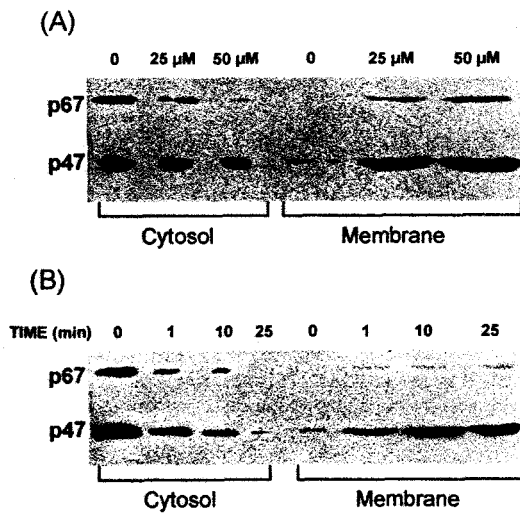


Figure 4 Effect of the Ru-PDTA complex on the translocation of p47^{phox} (p47) and p67^{phox} (p67) from cytosol to the membrane

(A) Neutrophils (5×10^6 cells/ml) were incubated with 25 and 50 μM Ru-PDTA complex for 20 min at 37 °C. Cytosolic and membrane fractions were separated and electrotransferred as indicated in the Experimental section. The nitrocellulose membrane was then probed with anti-p47^{phox} and anti-p67^{phox} antisera and proteins were revealed with luminol-enhanced chemiluminescence. (B) Neutrophils were exposed to the Ru-PDTA (50 μM) for the indicated times, and then analysed for p47^{phox} and p67^{phox} as indicated in the Experimental section. This Figure is representative of three independent experiments.

activation of the NADPH oxidase [40–42]; for a review, see [19]). In order to compare the translocation from cytosol to the membrane of cytosolic proteins p47^{phox} and p67^{phox}, cytosolic and membrane fractions from resting neutrophils or those stimulated with the Ru-PDTA complex were subjected to electrophoresis and immunoblotted with specific anti-p47^{phox} and anti-p67^{phox} polyclonal antibodies. The results are shown in Figures 4(A) and 4(B). Figure 4(A) shows that, with 25 μM of the Ru-PDTA complex, there was a clear translocation of both proteins from the cytosol to the plasma membrane after 20 min and that this translocation was more pronounced with 50 μM Ru-PDTA. In our hands p47^{phox} was always readily detected using the polyclonal antisera. By contrast, detection of p67^{phox}, particularly in plasma-membrane preparations, was less reliable. This could be explained by the recent finding of Heyworth et al. [43] that p67^{phox} is located in the Triton X-100-insoluble fraction. The kinetics of the translocation are shown in Figure 4(B). At 1 min after treatment with the Ru-PDTA complex, p47^{phox} was clearly detectable in the plasma membrane, whereas in cytosolic fractions the opposite was observed. This translocation seemed to be completed after 25 min, since no cytosolic p47^{phox} was detected at this time. The p67^{phox} protein showed similar kinetics of disappearance from the cytosol, but was barely detectable in the plasma-membrane fraction.

It is well established that activation of NADPH oxidase by different stimulants is accomplished by tyrosine phosphorylation of several cytosolic proteins [44–46]. The next experiments were therefore designed to assess whether the Ru-PDTA complex produced a similar effect. Figure 5 shows that the Ru-PDTA complex induced tyrosine phosphorylation of 40, 57, 66, 75, 100, and 120 kDa proteins in a dose-dependent manner. It is noteworthy that, in these last-mentioned experiments, the cytosolic and membrane fractions were processed together. A similar

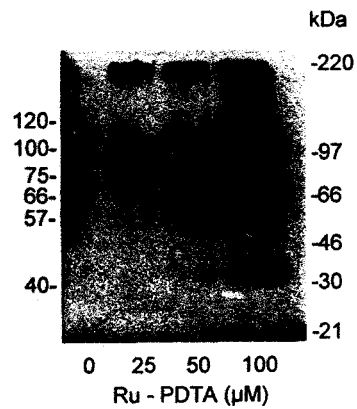


Figure 5 Tyrosine phosphorylation induced by the Ru-PDTA complex and analysed by anti-phosphotyrosine immunoblotting

Neutrophils (5×10^6 cells/ml) were pretreated for 20 min without complex (0 μM) or in the presence of 25, 50 or 100 μM of Ru-PDTA complex. Phosphotyrosine was detected using a luminol-enhanced chemiluminescence method. Arrows indicate molecular masses calculated from the positions of the molecular-mass standards. This Figure is representative of three independent experiments.

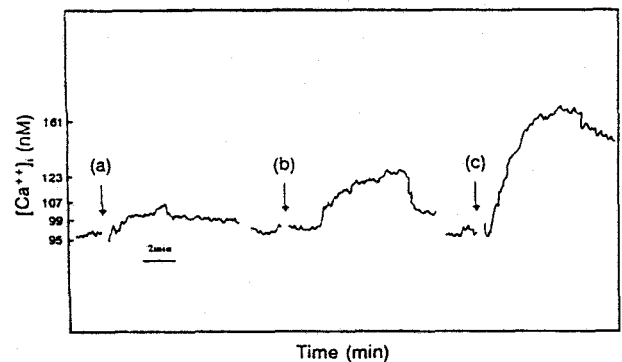


Figure 6 Dose-dependent effect of the Ru-PDTA on cytosolic free Ca²⁺ (Ca²⁺)

The Ru-PDTA complex was added as follows: 2 μM (a), 5 μM (b) and 25 μM (c). The mean change in peak value of [Ca²⁺]_i at 25 μM of Ru-PDTA complex was (means \pm S.E.M., $n = 3$) 164 ± 6 nM. The Ca²⁺ concentration in resting cells was 91 ± 4 nM. The results shown are representative of three experiments.

pattern of phosphorylation was previously observed in neutrophils incubated with different stimuli [43–46]. When cells were stimulated with Ru-PDTA complex in the presence of staurosporine (1 μM), a diminished protein phosphorylation was detected (results not shown). This fact agrees with previous observations in human neutrophils [34].

Effect of the Ru-PDTA complex on Ca²⁺ levels

Ca²⁺ appears to play a role as a second messenger in the neutrophil activation sequence, just as it does in other systems, and the relative roles of intra- and extra-cellular calcium have been assessed [47]. A rapid increase in cytosolic Ca²⁺ has been demonstrated in neutrophils in response to a variety of stimuli [48]. Figure 6 shows that the Ru-PDTA complex increased intracellular Ca²⁺ in a dose-dependent manner and, at 5 μM Ru-

PDTA complex, a clear effect was detectable. At 25 μ M Ru-PDTA complex a rapid onset of intracellular Ca²⁺ levels was detected. This observation suggests a relationship between the increased Ca²⁺ levels and the activation of the oxidase. However, this classical Ca²⁺-dependent signalling pathway has been discussed in terms of different data (see [19] for a review), which have demonstrated the possibility, under appropriate circumstances, of a Ca²⁺-independent oxidase activation. Also the effect of Ru-PDTA was analysed in the presence of staurosporine (1 μ M). In this case staurosporine had no effect (results not shown). The results obtained with staurosporine on Ca²⁺ levels and phosphorylation on protein provided further evidence that different signal-transduction processes are involved in Ru-PDTA-dependent neutrophil activation.

In order to study the specific effect of Ru-PDTA complex on neutrophils, other non-phagocytic cells (e.g. blood T-cell lymphocytes) were analysed. In the presence of Ru-PDTA complex, no production of O₂⁻ was detected in these cells. However, Ru-PDTA complex was able to increase intracellular Ca²⁺ and phosphorylation of proteins (results not shown), as it did in neutrophils.

DISCUSSION

We have presented evidence that a novel complex, derived from Ru³⁺ and a chelating agent, PDTA, was able to stimulate O₂⁻ production by human neutrophils. This stimulation was specific for the complex, since the individual constituents had no effect. Several lines of evidence suggest that the complex acts as a true stimulator of NADPH oxidase. First, the mechanism of activation seems to be associated with the translocation of cytosolic proteins, p47^{phox} and p67^{phox}, from cytosol to the plasma membrane, since the assembly of the NADPH oxidase components is a well-established phenomenon for other defined stimulators of the enzyme [40-42]. The critical functional importance of these two proteins was established by studies of a subset of chronic-granulomatous-disease patients, who exhibit autosomal inheritance, normal membrane content of cytochrome b₅₅₈ and a defect localized to the cytosol in a cell-free oxidase system. Secondly, the overall inhibition by staurosporine of the Ru-PDTA-complex-dependent activation of NADPH oxidase suggests the participation of protein kinase C, in a manner similar to other stimuli. Also, a partial unresponsiveness of the Ru-PDTA complex to DPI inhibition was detected, which could be due to the requirement for a reduced environment for DPI activity, as suggested by other authors [36]. Thirdly, the Ru-PDTA complex elicited phosphorylation at tyrosine residues on several proteins (Figure 5), with a phosphorylation pattern very similar to that described previously [43-46]. In addition, the short time required to produce a measurable response to the Ru-PDTA (Figure 1) suggests that non-specific or cytotoxic effects are unlikely. The stimulation of the respiratory burst elicited by the Ru-PDTA complex seems to be independent of cyclic AMP levels, since neither dibutyryl cyclic AMP nor pertussis toxin (which increases cyclic AMP levels) altered the O₂⁻ production.

Our present findings on the stimulation of the respiratory burst by the Ru-PDTA complex provides a hypothetical model to explain the antitumour properties of the compound. Evidence based on structural studies indicates that phagocytic cells infiltrate tumour nodes, and this defence mechanism has been observed in different tumour types [23,49]. Conversely, the administration of agents that induce macrophage disruption or dysfunction has been reported to increase host susceptibility to neoplasia [50]. Also tumour rejection elicited by interleukin-4 [23] or interleukin-13 [49], delivered to the site of the tumour, is

the result of direct membrane and cytoplasmic damage to tumour cells by eosinophils, neutrophils and macrophages that deeply penetrate the proliferating tumour mass. Thus the death of tumour cells elicited by the Ru-PDTA complex could be interpreted as having been caused by the infiltrating neutrophils (and other phagocytic cells). These cells, located near to tumour nodes, are activated by the Ru-PDTA complex to produce an increased level of free radicals (e.g. O₂⁻), thereby providing damage in the proximal tumour cells. Previously it has been shown that another antineoplastic agent, a muramyl dipeptide analogue, enhances killing activity on tumour cells and the synthesis of O₂⁻ by neutrophils [51]. Although the O₂⁻ and other reactive oxygen intermediates have traditionally been viewed primarily as potent microbicidal agents synthesized by phagocytic cells [52], the complexity of the phenomenon it is now well recognized. The specificity of an oxygen-free radical-mediated response is likely to depend on the activation status of individual cells, as well as interference by, and integration with, other possible concomitant signalling events [53].

This work was supported by Research Grants from the Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) (grant no 94/1484) and Comision Interministerial de Ciencia y Tecnologia (grants no SAF96-205 and SAF94-0467) of Spain. We thank Professor O. T. G. Jones for providing us with anti-p47 and -p67 antibodies and DPI. We also acknowledge the help of Professor E. D. Saggerson (University College London, London, U.K.) for critically reading the text and revising the English form of the manuscript before its submission. G. M. is a recipient of a Fondo Investigaciones Sanitarias Fellowship.

REFERENCES

- Dwyer, F. P., Mayhew, E., Roe, E. M. F. and Shulman, S. (1965) *Br. J. Cancer* **19**, 195-199.
- Cleare, M. J. (1974) *Coord. Chem. Rev.* **12**, 349-405.
- González-Vilchez, F. and Vilaplana, R. (1986) in *Trends in Cancer Research* (Barbera, E., ed.), pp. 194-198, Universidad Del Pais Vasco, Vizcaya.
- Clarke, M. J. (1983) *Am. Chem. Soc. Symp. Ser.* **209**, 335-352.
- Margalit, R., Gray, H. B., Podbielski, L. and Clarke, M. J. (1986) *Chem.-Biol. Interact.* **59**, 231-245.
- Keppler, B. K. and Rupp, W. (1986) *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **111**, 166-168.
- Tanabe, M. (1976) *Radioisotopes* **25**, 44-49.
- Clarke, M. J. (1989) *Prog. Clin. Biochem. Med.* **10**, 25-39.
- Mei, H. Y. and Barton, J. K. (1986) *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 7414-7416.
- Clarke, J. J., Bitler, S., Rennart, D., Buchbinder, M. and Kelman, A. D. (1980) *J. Inorg. Biochem.* **12**, 79-87.
- Clarke, M. J. (1979) *Metal Ions Biol. Syst.* **11**, 231-283.
- Vilaplana, R., Basallote, M. G. and González-Vilchez, F. (1984) *Rev. Esp. Oncol.* **31**, 575-582.
- Vilaplana, R., Basallote, M. G., Ruiz, C., Gutierrez, E. and González-Vilchez, F. (1991) *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 100-101.
- Vilaplana, R., Romero, M. A., Quirós, M., Salas, J. M. and Gonzalez-Vilchez, F. (1995) *Met.-Based Drugs* **2**, 211-219.
- Kratz, F., Hartmann, M., Keppler, B. K. and Messori, L. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 2581-2588.
- Messori, L., Blasco, G., Vilaplana, R. and Gonzalez-Vilchez, F. (1997) *J. Inorg. Biochem.*, in the press.
- Baggiolini, M. and Wymann, M. P. (1990) *Trends Biol. Sci.* **15**, 69-72.
- Cross, A. R. and Jones, O. T. G. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* **1057**, 281-298.
- Morel, F., Doussièrre, J. and Vignais, P. V. (1991) *Eur. J. Biochem.* **201**, 523-546.
- Segal, A. W. and Abo, A. (1993) *Trends Biol. Sci.* **18**, 43-47.
- Edwards, S. W. and Watson, F. (1995) *Immunol. Today* **16**, 508-510.
- Babior, B. M. (1978) *N. Engl. J. Med.* **298**, 8745-8750.
- Modesti, A., Masuelli, L., Modica, A., D'Orazi, G., Scarpa, S., Bosco, M. C. and Forni, G. (1993) *Int. J. Cancer* **53**, 988-993.
- Keppler, B. K., Lippner, K. G., Stenzel, B. and Kreft, F. (1993) in *Metal Complexes in Cancer Chemotherapy*, (Keppler, B. K., ed.), pp. 187-200, VCH, Weinheim.
- Monteserín, J., Camacho, M. J., Montaño, R., Llamas, E., Conde, M., Carballo, M., Guardia, P., Conde, J. and Sobrino, F. (1996) *J. Exp. Med.* **183**, 2571-2579.
- Abo, A., Boyhan, A., West, I., Thrasher, A. J. and Segal, A. W. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 16767-16770.
- Chiara, M. D., Bedoya, F. and Sobrino, F. (1989) *Biochem. J.* **264**, 21-26.
- Laemmli, U. K. (1970) *Nature (London)* **227**, 680-685.

- 29 Hodgson, M. and Jones, P. (1989) *J. Biolumin. Chemilumin.* **3**, 21–25
- 30 White, E. H., Zaliniou, O. C., Kagi, H. M. and Hill, J. H. M. (1964) *J. Am. Chem. Soc.* **86**, 940–941
- 31 Markwell, M. A. K., Haas, S. M., Bieber, L. L. and Tolbert, N. E. (1978) *Anal. Biochem.* **87**, 206–210
- 32 Cox, J. A., Jeng, A. Y., Sharkey, N. A., Blumberg, P. M. and Tauber, A. I. (1985) *J. Clin. Invest.* **76**, 1932–1938
- 33 Cross, A. R. and Jones, O. T. G. (1986) *Biochem. J.* **237**, 111–116
- 34 Dewald, B., Thelen, M., Wymann, M. P. and Baggiolini, M. (1989) *Biochem. J.* **264**, 879–884
- 35 Okamoto, N., Curnutte, J. T., Roberts, R. L. and Babior, B. M. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 6777–6782
- 36 Doussier, J. and Vignais, P. V. (1992) *Eur. J. Biochem.* **208**, 61–71
- 37 Clarke, M. J. (1996) *Met. Ions Biol. Syst.* **32**, 727–780
- 38 Lehmeyer, J. E. and Johnston, Jr., R. B. (1978) *Clin. Immunol. Immunopathol.* **9**, 482–490
- 39 Yu, H., Suchard, S. J., Nairn, R. and Jove, R. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 15719–15724
- 40 Shneider, C., Zanetti, M. and Romero, D. (1981) *FEBS Lett.* **127**, 4–8
- 41 Heyworth, P. G. and Segal, A. W. (1986) *Biochem. J.* **239**, 723–731
- 42 Dusi, S., Della Bianca, V., Grzeskowiak, M. and Rossi, F. (1993) *Biochem. J.* **290**, 173–178
- 43 Heyworth, P. G., Erickson, R. W., Ding, J., Curnutte, J. T. and Badwey, J. A. (1995) *Biochem. J.* **311**, 81–87
- 44 Torres, M., Hall, F. L. and O'Neil, K. (1993) *J. Immunol.* (1993) **150**, 1563–1578
- 45 Dusi, S., Donini, M. and Rossi, F. (1994) *Biochem. J.* **304**, 243–250
- 46 Rollet, E., Caon, A. C., Roberge, C. J., Liao, N. W., Malawista, S. E., McColl, S. R. and Naccacne, P. H. (1994) *J. Immunol.* **153**, 353–363
- 47 Di Virgilio, F., Treves, S., Lew, D. and Pozzan, T. (1989) in *The Neutrophils: Cellular Biochemistry and Physiology*, (Hallett, M. B., ed.), pp. 199–218. CRC Press, Boca Raton, FL
- 48 Nasmith, P. E. and Gristein, S. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 13558–13566
- 49 Pecceu, F., Caput, D., Ferrara, P. and Fradelizi, D. (1995) *Eur. J. Immunol.* **25**, 2340–2348
- 50 Di Luzio, N. R., Gilbert, K. M. and Spanjers, M. A. (1980) *Cancer Immunol. Immunother.* **9**, 37–42
- 51 Matsumoto, K., Osada, Y., Une, T., Otani, T., Ogawa, H. and Azuma, I. (1987) in *Immunostimulants: Now and Tomorrow*, (Azuma, I. and Jolles, G., eds.), pp. 79–97. Springer-Verlag, Berlin
- 52 Cross, A. R. and Jones, O. T. G. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* **1057**, 281–298
- 53 Darley-Usmar, V., Wiseman, H. and Halliwell, B. (1995) *FEBS Lett.* **369**, 131–135

Received 28 April 1997/29 July 1997; accepted 30 July 1997

CAPÍTULO 2.**2.- CARACTERIZACIÓN DE LA CALCINEURINA EN NEUTRÓFILOS HUMANOS. EFECTO INHIBIDOR DEL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO SOBRE SU ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y SOBRE LA UNIÓN DEL NF- κ B AL ADN.**

En este capítulo, se describe una actividad calcineurina específica en lisados de neutrófilos, que es dependiente de Ca^{2+} , inhibible por trifluoroperazina, e insensible a ácido okadaico. Experimentos de incubación con anticuerpos, usando un antisuero específico, reconoce ambas cadenas A y B de la calcineurina. En neutrófilos tratados con ciclosporina A y FK 506 la actividad calcineurina es inhibible de una manera dosis dependiente. También se ha investigado el efecto de compuestos oxidantes sobre la actividad calcineurina. Neutrófilos tratados con peróxido de hidrógeno (H_2O_2), donde la catalasa era inhibida con aminotriazole, muestran una inhibición específica de la actividad calcineurina. Sin embargo, la adición de agentes reductores a extractos de neutrófilos, parcialmente revierten la inhibición causada por H_2O_2 . Un efecto similar de inhibición del H_2O_2 sobre la actividad calcineurina, fue observado en linfocitos aislados. Esta es la primera demostración de que agentes redox modulan la actividad calcineurina en un sistema celular. Además, ensayos de movilidad electroforética, revelan que la activación del NF- κ B inducida por lipopolisacárido en neutrófilos humanos, es inhibida por el previo tratamiento con H_2O_2 de una manera dosis dependiente. Por tanto la actividad calcineurina puede regular la actividad funcional de las proteínas NF- κ B/Rel inducida por lipopolisacárido en neutrófilos humanos. Estos datos indican un papel de los peróxidos en la modulación de la actividad calcineurina y que la inactivación del NF- κ B dependiente de H_2O_2 en neutrófilos, ocurre en concordancia con la inhibición de la calcineurina.

Characterization of Calcineurin in Human Neutrophils

INHIBITORY EFFECT OF HYDROGEN PEROXIDE ON ITS ENZYME ACTIVITY AND ON NF- κ B DNA BINDING*

(Received for publication, August 18, 1998, and in revised form, October 15, 1998)

Modesto Carballo^{‡§}, Gracia Márquez^{‡§¶}, Manuel Conde[‡], José Martín-Nieto[¶],
Javier Monteseirín^{**}, José Conde^{**}, Elizabeth Pintado[‡], and Francisco Sobrino^{‡***‡‡}From the [‡]Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, ^{**}Departamento de Medicina, Servicio Regional de Inmunología y Alergia, Hospital Universitario Virgen Macarena, Universidad de Sevilla, 41009 Sevilla and [¶]Departamento de Biotecnología, Campus Universitario San V. del Raspeig, Universidad de Alicante, Alicante, Spain

We describe here a specific calcineurin activity in neutrophil lysates, which is dependent on Ca^{2+} , inhibited by trifluoroperazine, and insensitive to okadaic acid. Immunoblotting experiments using a specific anti-serum recognized both the A and B chains of calcineurin. Neutrophils treated with cyclosporin A or FK 506 showed a dose-dependent inhibition of calcineurin activity. The effect of oxidant compounds on calcineurin activity was also investigated. Neutrophils treated with hydrogen peroxide (H_2O_2), where catalase was inhibited with aminotriazole, exhibited a specific inhibition of calcineurin activity. However, the addition of reducing agents to neutrophil extracts partially reversed the inhibition caused by H_2O_2 . A similar inhibitory effect of H_2O_2 on calcineurin activity was observed to occur in isolated lymphocytes. This is the first demonstration that redox agents modulate calcineurin activity in a cellular system. In addition, electrophoretic mobility shift assays revealed that lipopolysaccharide-induced activation of NF- κ B in human neutrophils is inhibited by cell pretreatment with H_2O_2 in a dose-dependent manner. These data indicate that calcineurin activity regulates the functional activity of lipopolysaccharide-induced NF- κ B/Rel proteins in human neutrophils. These data indicate a role of peroxides in the modulation of calcineurin activity and that the H_2O_2 -dependent NF- κ B inactivation in neutrophils occurs in concert with inhibition of calcineurin.

Calcineurin (CN)¹ has recently been established as a key enzyme in the signal transduction cascade leading to T cell

* This work was supported in part by Fondo Investigaciones Sanitarias Grants 94/1484 and 97/1289 (to F. S.) and Grant 97/207 (to J. C.) and the Foundation of SEAIC of Spain. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

§ The first two authors contributed equally to this work.

¶ Recipient of a grant from the Fondo Investigaciones Sanitarias of Spain.

‡‡ To whom correspondence should be addressed: Dept. de Bioquímica Médica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Ave. Sánchez Pizjuan 4, Sevilla-41009, Spain. Fax: 34-95-4907041; E-mail: fsobrino@cica.es.

¹ The abbreviations used are: CN, calcineurin; NF-AT, nuclear factor of activated T cells; NF- κ B, nuclear factor κ B; CsA, cyclosporin A; CNA, calcineurin A subunit; CNB, calcineurin B subunit; ROI, reactive oxygen intermediates; H_2O_2 , hydrogen peroxide; pV(phen), sodium oxodiperoxo(1,10-phenanthroline)vanadate(V); HBSS, Hanks' balanced salt solution; BSA, bovine serum albumin; DTT, dithiothreitol; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; PDTC, pyrrolidine dithiocarbamate; AMT, 3-amino-1,2,4-triazole; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; DFP, diisopropyl fluorophosphate; H_2DCFDA , 2',7'-dichlorodihy-

drofluorescein diacetate; EMSA, electrophoretic mobility shift assay; LPS, lipopolysaccharide.

activation (1–4), and an important regulator of transcription factors such as NF-AT, NF- κ B, and AP-1, which are involved in the expression of a number of important T cell early genes. *i.e.* interleukin-2, tumor necrosis factor- α , and interleukin-2R (5–8). CN, also known as phosphatase 2B, is a calcium/calmodulin-dependent serine/threonine phosphatase (9–11) and is composed of the following two subunits: a 59-kDa catalytic subunit (CNA), which contains a calmodulin-binding domain and an autoinhibitory region, and a 19-kDa intrinsic calcium-binding regulatory subunit (CNB) (12–14). Human CN possesses a Fe-Zn active center. The assignment of stoichiometric amounts of Zn^{2+} and Fe^{3+} in the CNA center is based on atomic absorption experiments (15). The same assignments were made for the di-metal site in the structure of some CNA (16). The central role of CN in T cell signaling was appreciated by its identification as the target of the immunosuppressive drugs cyclosporin A (CsA) and FK 506 (1–4). The phosphatase activity of CN is inhibited by either drug when complexed to intracellular binding proteins (immunophilins), *i.e.* CsA to cyclophilin and FK 506 to the FK 506-binding protein 12 (FKBP12), respectively. Neither drug nor immunophilin alone bind to or affect the activity of CN (1). This phosphatase is expressed ubiquitously in eukaryotic cells. In mammals, CN is most abundant in the brain (17) but has also been detected in T cells (1–4). On the other hand, it is known that NF-AT-mediated transactivation depends on the CN activity (18, 19). Other findings suggest that NF- κ B activity is also under CN control (20–22).

In neutrophils, only indirect evidence has been presented on the occurrence of the phosphatase CN. The treatment of these cells with inhibitors of CN (*e.g.* CsA and FK 506) inhibited the neutrophils chemokinesis on vitronectin matrix (23, 24). Furthermore, intracellular calcium and CN regulate neutrophil motility on vitronectin through a receptor identified by antibodies against the integrins α v and β_3 (25, 26). The first purpose of the present work was to assess the presence of CN in neutrophils using as a substrate a specific peptide corresponding to the phosphorylation site of the RII subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase.

Additionally, reactive oxygen intermediates (ROI) have been implicated in mediating signal transduction by a variety of stimuli in lymphoid cells, and transcription factors seem to be responsible for the inducible expression of a number of genes in response to oxidative stress (27, 28). In this context, the addition of H_2O_2 to the culture medium has been shown to activate NF- κ B (29). Hydroxyl radicals produced from H_2O_2 cannot function as diffusible intracellular messengers, since they can react with the nearest molecule in a nonspecific fashion. A

drofluorescein diacetate; EMSA, electrophoretic mobility shift assay; LPS, lipopolysaccharide.

more suitable ROI messenger would be the less reactive H_2O_2 . However, arguments against ROI involvement in NF- κ B activation have been published (30–32), and despite the fact that phorbol 12-myristate 13-acetate-dependent NF- κ B stimulation is cancelled by antioxidants, it has been recently shown that phorbol 12-myristate 13-acetate does not increase intracellular ROI (33). Peroxide-mediated stimulation of NF- κ B appears to be cell line-specific, since *N*-acetylcysteine, an antioxidant, elicited up-regulation of NF- κ B binding activity in monocyte-derived macrophages (34). Moreover, NF- κ B is not the only nuclear factor whose activity is altered by H_2O_2 . In a fashion opposite to that observed for NF- κ B, NF-AT has been shown to be actively suppressed by H_2O_2 in Jurkat T cells (35). Recently, the development of stabilized peroxovanadium compounds has provided the opportunity to more fully characterize the action of oxidants within the cell (36). Treatment of lymphocytes with sodium oxodiperoxo(1,10-phenanthroline)vanadate (V), pV(phen), results in a large increase in intracellular oxidation, which correlates with a strong induction of cellular tyrosine phosphorylation and activation of kinases. The same authors (37) have documented that antioxidant treatment does not prevent the activation of NF- κ B by pV(phen). Therefore, we have also used pV(phen) as another tool to study the effect of oxidative stress on calcineurin activity.

In summary, previous data suggest that, first, CN modulates the DNA binding activity of essential transcription factors (e.g. NF-AT and NF- κ B), and second, ROI regulates positively or negatively those transcription factors. However, a link between both signals, that is CN and ROI, is lacking. In this paper we address this question and the implications of the ROI as universal messenger to activate NF- κ B.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell and Reagents—Neutrophils were isolated from fresh heparinized blood of healthy human donors by dextran sedimentation, followed by Ficoll-Paque gradient centrifugation and hypotonic lysis of residual erythrocytes as indicated (38). Neutrophils were washed twice in Hanks' balanced salt solution (HBSS), suspended at a density of 1×10^7 cells/ml in HBSS supplemented with 0.1 mg/ml BSA, and maintained at 37 °C in an atmosphere of 5% CO_2 and 95% O_2 for 1–2 h. Peripheral blood lymphocytes were obtained from heparinized venous blood of normal volunteers by Ficoll-Paque centrifugation.

Dextran T-500 was obtained from Pharmacia Biotech (Barcelona, Spain). Ficoll-Paque, HBSS, and RPMI 1640 were obtained from Bio-Whittaker (Verviers, Belgium). CsA and FK 506 were kindly provided by Dr. S. F. Borel (Sandoz Ltd., Basel, Switzerland) and Fujisawa GmbH (München, Germany), respectively. Chemicals were of analytical grade from Merck (Darmstadt, Germany). Dithiothreitol (DTT) and phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) were obtained from Boehringer Mannheim (Barcelona, Spain). Bovine serum albumin (BSA), okadaic acid, trifluoroperazine, pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC), hydrogen peroxide (30% v/v), 3-amino-1,2,4-triazole (aminotriazole, AMT), soybean trypsin inhibitor, leupeptin, aprotinin, Nonidet P-40, and goat anti-rabbit IgG conjugated to horseradish peroxidase were purchased from Sigma (Madrid, Spain). Rabbit anti-bovine calcineurin IgG was kindly provided by C. B. Klee. The synthetic peptide used as a substrate for calcineurin was purchased from Peninsula Laboratories (Bellmont, CA). pV(phen) was synthesized as described previously (37). [γ - ^{32}P]ATP was obtained from NEN Life Science Products. 2-Mercaptoethanol, SDS, acrylamide, *N,N'*-methylene-bisacrylamide, Coomassie Brilliant Blue R-250, and blotting nitrocellulose membranes were purchased from Bio-Rad. Luminol (5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione) and diisopropyl fluorophosphate (DFP) were purchased from Serva (Madrid, Spain), and 4-iodophenol was from Aldrich (Madrid, Spain). Molecular weight standards (Rainbow markers) were obtained from Amersham Corp. (London, UK); Sephadex G-25 was from Pharmacia (Barcelona, Spain); and double-stranded oligonucleotide probe (5'-AGTTGAG GG-GACTTTC CAGGC-3') containing NF- κ B sites was from Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Germany). 2',7'-Dichlorodihydro-fluorescein diacetate (H_2 DCFDA) was purchased from Molecular Probes (Leiden, The Netherlands).

Crude Neutrophils Extract—Untreated neutrophils (1×10^6 cells/ml) were lysed for 30 min on ice in 500 μ l of buffer A (50 mM Tris, pH 8.0,

0.5% Triton X-100, 150 mM NaCl, 50 μ g/ml PMSF, 50 μ g/ml soybean trypsin inhibitor, 10 μ g/ml leupeptin, and 10 μ g/ml aprotinin) and disrupted by sonication. The homogenate was centrifuged at $12,000 \times g$ for 10 min at 4 °C. The supernatant fluid (crude extract) was separated from low molecular weight material by passage through a 0.5×10 -cm Sephadex G-25 column equilibrated with 50 mM Tris-Cl, pH 7.5, 0.1 mM EDTA, 0.1% β -mercaptoethanol, and a mixture of protease inhibitors as above (39). Fractions containing most of the $A_{280 \text{ nm}}$ material eluting with the void volume of the column were pooled and used to measure CN activity.

Cell Treatments and Lysis—Immunosuppressive agents were dissolved in dimethyl sulfoxide (Me_2SO) at a concentration 1000-fold higher than that used for cell treatments. Neutrophils (7×10^6 cells/ml) were suspended in 1 ml of HBSS supplemented with 0.1 mg/ml BSA in microcentrifuge tubes, 1 μ l of Me_2SO or CsA or FK 506 was added, and the cells were incubated at 37 °C for 2 h. For experiments with H_2O_2 and other stimuli, neutrophils were incubated at 37 °C. The incubation times and concentration of agents are indicated in the figure legends. After incubation, the cells were washed once with 1 ml of HBSS on ice and lysed in 60 μ l of buffer B (50 mM Tris, pH 7.5, 0.1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 0.5 mM dithiothreitol, 50 μ g/ml PMSF, 50 μ g/ml soybean trypsin inhibitor, 10 μ g/ml leupeptin, and 10 μ g/ml aprotinin) and disrupted by sonication. Cell debris was removed by centrifugation at 4 °C for 10 min at $12,000 \times g$, and supernatant was used as the source of CN.

Calcineurin Phosphatase Assay—CN phosphatase activity was measured using an assay adapted from Hubbard and Klee (40), basically as described (22). Neutrophils (7×10^6 cells/ml) were incubated for 2 h at 37 °C in the presence or absence of drugs as indicated in the text. Reaction mixtures containing 2 μ M ^{32}P -labeled phosphopeptide, 500 nM okadaic acid (added to inhibit PP-1A and PP-2A type phosphatase activities), and 20 μ l of cell lysate (about 80 μ g of protein) were incubated in a total volume of 60 μ l of assay buffer C (20 mM Tris, pH 8.0, 100 mM NaCl, 6 mM $MgCl_2$, 0.5 mM dithiothreitol, and 0.1 mM $CaCl_2$ or 5 mM EGTA, as indicated in the figures) for 15 min at 30 °C. After this time, reactions were terminated by the addition of 0.5 ml of 100 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0, containing 5% trichloroacetic acid. The reaction mixture was passed through a 500- μ l column of activated Dowex cation-exchange resin, and free inorganic phosphate was quantitated in the eluate by scintillation counting. It was verified that at 15 min of incubation time the assay was linear. Assays were performed in triplicate, and the counts/min measured in blank assay lacking cell lysate were subtracted. Data are expressed as the number of picomoles of $^{32}PO_4$ released in 15 min per mg of protein.

^{32}P -Labeled Phosphopeptide—The synthetic peptide (Asp-Leu-Asp-Val-Pro-Ile-Pro-Gly-Arg-Phe-Asp-Arg-Arg-Val-Ser-Val-Ala-Ala-Glu), corresponding to a segment of the RII subunit of cAMP-dependent kinase (41), was phosphorylated on the unique serine residue by the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase using [γ - ^{32}P]ATP, essentially as described (40), and used as phosphatase substrate. The specific activity of fresh preparations of ^{32}P -labeled phosphopeptide was about 500 μ Ci/ μ mol peptide.

Western Blot Analysis—Cells (7×10^6 cells/ml) were lysed for 30 min on ice in 100 μ l of buffer A (see above). Lysates were clarified by centrifugation at 4 °C for 2 min at $12,000 \times g$. Protein concentrations in the lysates were determined by the Bradford method (42), using ESA as a standard. For the Western blot analysis of CN subunits A and B, neutrophil lysates were subjected to 12.5% SDS-PAGE followed by electroblotting onto nitrocellulose using the Bio-Rad Mini-blotting apparatus. Filters were blocked for 1 h in TBS (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5) containing 3% BSA. Furthermore, they were rinsed twice with TBS containing 0.1% Tween 20 (TBST), and they were incubated overnight with rabbit anti-bovine calcineurin IgG diluted 1:1000 in TBST. After three washes in TBST, the filters were incubated for 90 min with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:5000, final dilution). Filters were then washed twice with TBS and then twice with TBST for 10 min each time. The bound secondary antibody was detected by enhanced chemiluminescence (43). Briefly, the membranes were incubated for 1 min in 10 ml of fresh luminescent reagent solution, composed of 10 mM Tris-HCl, pH 8.5, 2.25 mM luminol, 0.015% (v/v) H_2O_2 , and 0.45 mM 4-iodophenol, the latter acting as an enhancer of the chemiluminescence reaction (44). These concentrations of luminol, H_2O_2 , and 4-iodophenol were determined to be optimal for maximum light production.² Luminol and 4-iodophenol were freshly prepared in 10 ml of 10 mM Tris-HCl, pH 8.5. Luminol was previously dissolved in 50 μ l of 1 M NaOH. The use of Me_2SO as solvent should be

² M. Carballo and F. Sobrino, unpublished data.

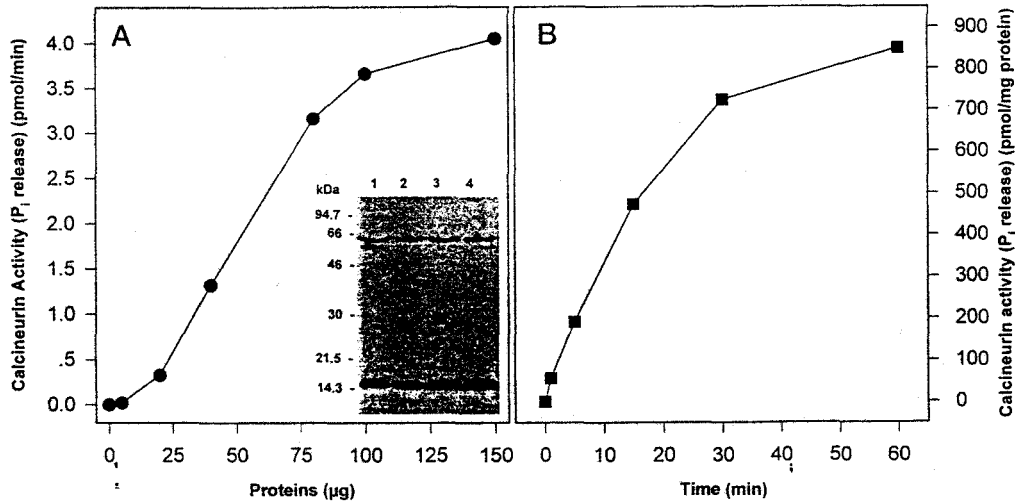


FIG. 1. Specific dephosphorylation of a synthetic peptide substrate by crude neutrophil lysates. Calcineurin phosphatase activity was measured as indicated under "Experimental Procedures." Reaction mixtures contained $2 \mu\text{M}$ ^{32}P -labeled phosphopeptide and 500 nM okadaic acid in a total volume of $60 \mu\text{l}$ of assay buffer C. A, calcineurin activity was assayed using increasing amounts of neutrophil lysates during 15 min of incubation at 30°C . B, calcineurin activity was assayed during the indicated times with $50 \mu\text{g}$ of protein from neutrophil lysates. Inset, immunoblotting analysis of calcineurin expression. Proteins were resolved by SDS-PAGE (12% polyacrylamide gel), transferred to nitrocellulose, and probed with an antiserum that recognizes both the A and B chains of calcineurin. Lane 1, blood human lymphocytes ($50 \mu\text{g}$ of protein); lanes 2–4, crude neutrophil lysates (25, 50, and $100 \mu\text{g}$ of protein, respectively). Size markers are indicated on the left.

avoided since in alkaline/ Me_2SO conditions, luminol autoxidizes with emission of intense luminescence (45). After 1 min of incubation, the membranes were placed on paper filter, covered with Saran Wrap, and exposed to x-ray films (X-Omat, Eastman Kodak Co.) in the dark for 1–5 min.

Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA)—Human neutrophils whose viability exceeded 98% after 3 h in culture, as determined by trypan blue exclusion, were resuspended at a density of 5×10^6 cells/ml in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum. The cells were then incubated at 37°C under a 5% CO_2 atmosphere for 3 h, with occasional shaking in the absence or presence of $1 \mu\text{g/ml}$ LPS, $1 \mu\text{g/ml}$ CsA , or H_2O_2 at the concentrations indicated in each experiment. Then nuclear extracts were prepared basically as described by McDonald *et al.* (46). With this purpose, cell suspensions were transferred into pre-cooled tubes containing an equivalent volume of ice-cold RPMI 1640 supplemented with DFP (2 mM , final concentration). After centrifugation at $4,000 \times g$ for 1 min at 4°C , the cells were resuspended in $100 \mu\text{l}$ of ice-cold relaxation buffer, consisting of 10 mM HEPES, $\text{pH } 7.3$, 30 mM KCl, 3 mM NaCl, 3.5 mM MgCl_2 , 1.25 mM EGTA, and 0.5 mM DTT, supplemented with an antiprotease mixture composed of 2 mM DFP, 1 mM PMSF, 10 mM iodoacetamide, 1 mM benzamide, and $10 \mu\text{g/ml}$ each of aprotinin, leupeptin, and captopril. Cells were disrupted by short sonication (1 s), and the lysates were spun at $3,000 \times g$ for 10 min at 4°C to pellet unbroken cells and intact nuclei. The pellets were resuspended in $100 \mu\text{l}$ of ice-cold relaxation buffer, again subjected to short (1 s) sonication, and respun as above to pellet intact nuclei. These were resuspended in $200 \mu\text{l}$ of relaxation buffer, and after new centrifugation, the nuclear pellet was resuspended in $25 \mu\text{l}$ of ice-cold relaxation buffer, additionally containing 10% (v/v) glycerol and 380 mM NaCl. Following a 20-min incubation on ice with occasional mixing, the samples were spun at $13,000 \times g$ for 15 min at 4°C , and the resulting supernatants were stored at -70°C . EMSA was performed by using as a probe the double-stranded 22-base pair NF- κB consensus oligonucleotide indicated above, which was labeled with DIG using the labeling kit from Boehringer Mannheim. The nuclear extracts ($5 \mu\text{g}$ of protein) were assayed for κB binding activity using the DIG gel shift assay kit (Boehringer Mannheim, GmbH). The reactions were performed in $15 \mu\text{l}$ of binding buffer (20 mM Tris-HCl, $\text{pH } 7.5$, 50 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1% (v/v) Nonidet P-40, 6% glycerol) and allowed to proceed for 20 min at room temperature. For competition assays, binding reactions were performed in the presence of the unlabeled oligonucleotide (100-fold molar excess) for 20 min at room temperature. Supershift assays including anti-p50 and anti-p65 were carried out as described previously (46). The samples were finally electrophoresed on 5% polyacrylamide native gels at 4°C in $0.25 \times \text{TBE}$.

RESULTS

Calcineurin Is Present in Neutrophil Lysates—CN is a well characterized phosphatase that plays an important role in T cell activation pathways (1–4). In this work we have characterized the presence of CN activity and immunoreactive CN protein in human neutrophils. In crude neutrophil lysates, specific CN activity was observed, and a linear appearance of product during the assay was obtained in the range of 20 – $75 \mu\text{g}$ of lysate proteins (Fig. 1A). The time course of CN activity is shown in Fig. 1B. Clearly, ^{32}P release increased linearly along assay time until 15 min, and then a slow activity was found. Fig. 1 (inset) illustrates an immunoblotting analysis of CN expression in lymphocytes (lane 1) and different amounts of human neutrophil lysates (lanes 2–4). We used an antiserum that recognizes both the A (59 kDa) and B (19 kDa) chains of CN, confirming that both subunits are expressed in human neutrophils. As shown, neutrophil CNB migrates as a 16-kDa band in SDS-polyacrylamide gels, and it is detected along with a predominant CNA band migrating at 59 kDa . A third band, detected at 57 kDa in lymphocytes extracts, is probably a proteolytic fragment of CNA generated during preparation of the cell lysates. In some preparations of neutrophil lysates, a similar band of 55 – 57 kDa was also found (data not shown). Next experiments were addressed to analyze the regulation of CN activity in crude neutrophil lysates. Fig. 2 illustrates that the dephosphorylation of the CN-specific substrate peptide by crude neutrophil lysates was Ca^{2+} -dependent, as well as insensitive to okadaic acid, a potent and specific inhibitor of phosphatases 1A and 2A (reviewed in Ref. 47). When 500 nM okadaic acid was included in the assays, nearly all of the remaining phosphatase activity was Ca^{2+} -dependent and could be eliminated by substituting 5 mM EGTA for Ca^{2+} (Fig. 2). In contrast, the okadaic acid-sensitive component was resistant to EGTA, which is consistent with the reported Ca^{2+} independence of phosphatases 1A and 2A (17). CN activity was abrogated in nominally calcium-free medium and in the presence of a known inhibitor of calmodulin, trifluoroperazine (48). However, trifluoroperazine did not inhibit calcium-independent, okadaic acid-sensitive phosphatases from neutrophil lysates (Fig. 2). Taken

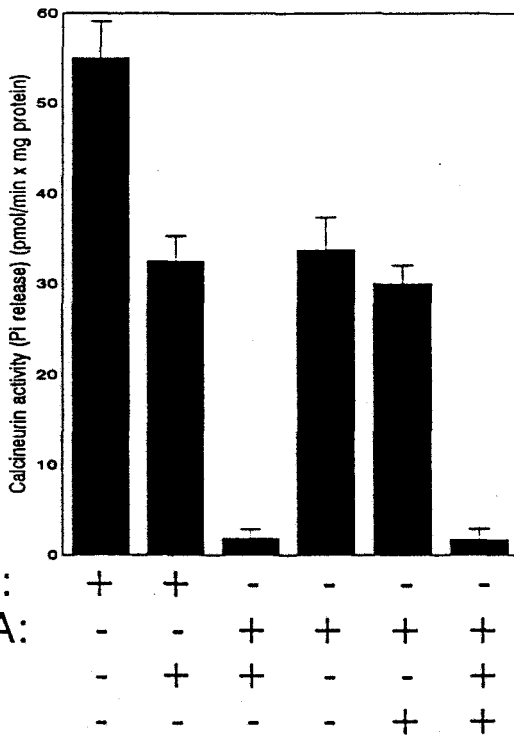


FIG. 2. Effect of calcium, okadaic acid, and trifluoroperazine on calcineurin activity from crude neutrophil lysates. Reaction mixtures contained 20 μ l of crude neutrophil lysate (80 μ g of protein), 2 μ M ³²P-labeled phosphopeptide, and 40 μ l of assay buffer. Other additions were as follows: 0.1 mM CaCl₂, 5 mM EGTA, 500 nM okadaic acid (OA), or 200 nM trifluoroperazine (TFP), as indicated. CN activity was assayed during 15 min at 30 °C. Phosphatase activity is expressed as picomoles of phosphate released per min per mg of protein.

together, these data indicate that a specific Ca²⁺/calmodulin-dependent phosphatase activity is present in the neutrophil lysates.

Inhibition of Calcineurin Activity in Isolated Neutrophils Treated with Immunosuppressive Drugs—As previously indicated (1–4), CsA and FK 506 can now be used as tools to elucidate the participation of CN on signal transduction processes. To assess whether treatment with these drugs inhibits CN activity, neutrophils were incubated with different concentrations of FK 506 and CsA for 2 h, and phosphatase activity was measured in cell lysates. Both agents effectively inhibited Ca²⁺-dependent phosphatase activity, as shown in Fig. 3. These results indirectly suggested that the drug-sensitive phosphatase present in neutrophils is CN. Furthermore, in drug titration experiments both FK 506 and CsA inhibited CN activity in a concentration-dependent fashion. IC₅₀ values determined for CN inhibition were approximately 0.5 ng/ml for FK 506 and 5 ng/ml for CsA. This greater sensitivity to FK 506 than to CsA exhibited by neutrophil CN is similar to that previously described for lymphocyte CN (1–4).

Effect of Oxidants on Calcineurin Activity—As previously indicated, there is a clear relationship between the oxidative stress and activation or suppression of transcription factor activity (27–29). Since it has been shown that H₂O₂ suppresses the transcriptional activation of NF-AT (35) and that NF-AT is able to directly interact with CN (18, 19), we have explored whether H₂O₂ could alter CN activity. Fig. 4 illustrates that preincubation of neutrophils with H₂O₂ alone had no effect on this phosphatase. However, the preincubation of cells with AMT, an inhibitor of catalase, for 30 min and the further addition of H₂O₂ produced a clear decrease in CN activity.

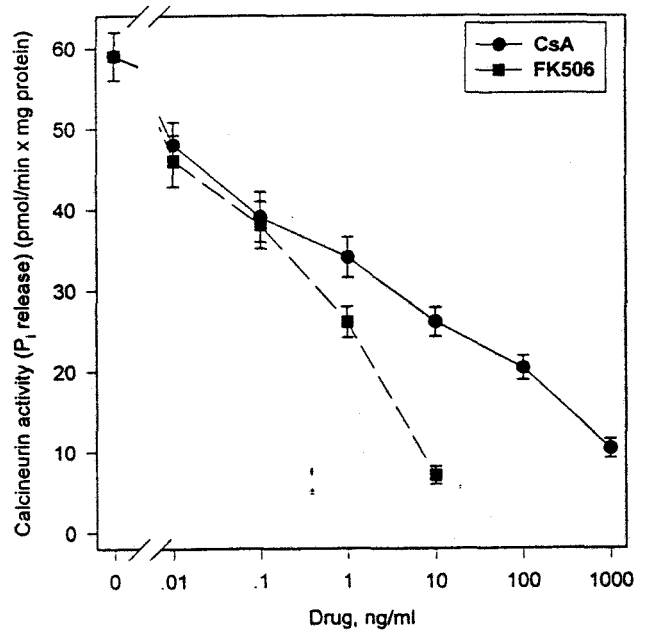


FIG. 3. Calcineurin phosphatase activity in CsA and FK 506-treated neutrophils. Neutrophils (7×10^6 cells/ml) were incubated in 1 ml of incubation medium with the indicated doses of CsA and FK 506 for 2 h at 37 °C. Then the cells were harvested and washed, and the pellet was lysed in buffer B. Calcineurin activity was assayed in the cell lysates (80 μ g of protein) as indicated under "Experimental Procedures." Phosphatase activity is expressed as picomoles of phosphate released per min per mg of protein. Three experiments were performed with similar results.

These data suggest that intracellular catalase in neutrophils (49) diminishes the effective concentration of exogenously added H₂O₂ and also indicate a potential protective role of catalase against CN inactivation. The preincubation of cells with AMT/H₂O₂ and PDTC, an antioxidant, partially ameliorated the inhibitory effect of H₂O₂ on CN activity. Neither AMT nor PDTC added by themselves had any effect on CN activity. The antioxidant action of PDTC against AMT/H₂O₂ inhibition was found to occur only when equimolar concentrations of H₂O₂ and PDTC were used; at 500–1000 μ M H₂O₂ the preincubation with 100 μ M PDTC was without effect (data not shown). A similar inhibitory effect of AMT/H₂O₂ on CN activity was observed to occur in isolated human lymphocytes. The treatment of these cells with 500 μ M H₂O₂ or 50 μ M pV(phen) for 1 h resulted in a marked decrease in CN activity (54 and 43% inhibition after H₂O₂ and pV(phen)-treatment, respectively). To explain this inhibitory effect of H₂O₂ on CN activity two possibilities may be raised: (i) H₂O₂ alters the CN polypeptide structure, and (ii) H₂O₂ damages CN prosthetic group structure. To test the first hypothesis, lysates from neutrophils previously incubated with AMT and H₂O₂ were analyzed by immunoblotting using a specific CN antibody. Fig. 5 shows that these agents did not alter the ability of the A and B subunits to be recognized by the anti-calcineurin antibody, suggesting that the CN protein structure remained intact. However, the modification of prosthetic groups associated with the catalytic center of CN remains a possibility. Previous data (50) describe a protective role of superoxide dismutase on partially purified CN from brain, suggesting that the environment redox can alter the structure of Fe-Zn center of CN in a reversible manner. In agreement with this possibility we have observed (Fig. 6) that the inhibition of CN by H₂O₂ in a neutrophil cell-free system can be partially reversed by the further addition of Fe²⁺, DTT, or ascorbate, all of which act as reductants. A

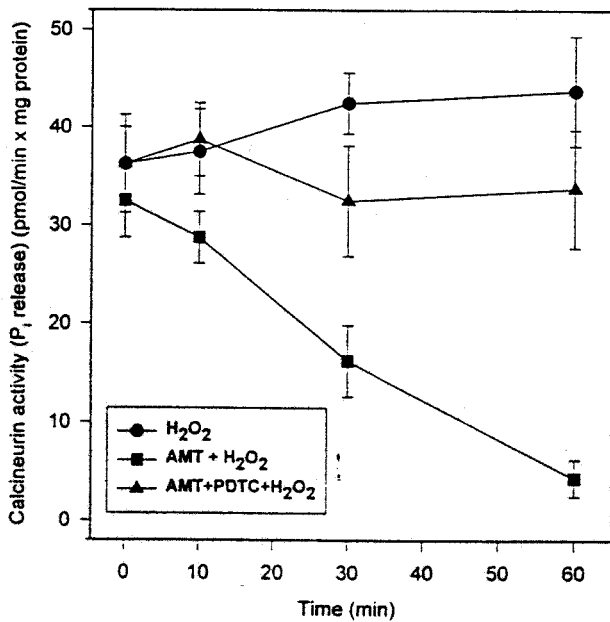


FIG. 4. Inhibition of calcineurin activity in neutrophils treated with hydrogen peroxide. Neutrophils (7×10^6 cells/ml) were incubated at 37°C under the following conditions: with $100 \mu\text{M}$ H_2O_2 alone (●); preincubated with 25 mM AMT for 30 min and then with $100 \mu\text{M}$ H_2O_2 (■); preincubated with 25 mM AMT for 30 min , then $100 \mu\text{M}$ PDTC for 10 min , and finally treated with $100 \mu\text{M}$ H_2O_2 (▲). The times of incubation with H_2O_2 are indicated. Incubation of cells was stopped at different times, and calcineurin activity was assayed in cell lysates ($80 \mu\text{g}$ of protein) as indicated under "Experimental Procedures." Phosphatase activity is expressed as picomoles of phosphate released per min per mg of protein. Means \pm S.E. values from three separate experiments performed in triplicate are presented.

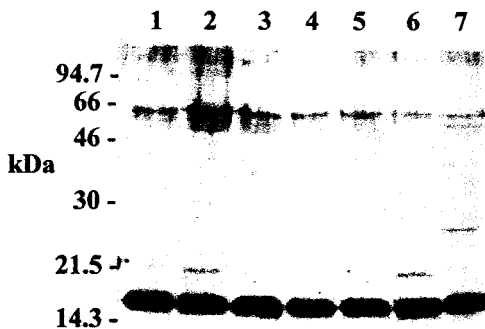


FIG. 5. Immunoblot analysis of the stability of calcineurin structure. Neutrophils (1×10^7 cells/ml) were incubated under the following conditions: lane 1, no additions (control); lane 2, 0.5 mM H_2O_2 for 30 min ; lane 3, 25 mM AMT for 30 min and then 0.5 mM H_2O_2 for 30 min ; lane 4, $100 \mu\text{M}$ PDTC for 10 min and then 0.5 mM H_2O_2 for 30 min ; lane 5, 25 mM AMT for 30 min and then $100 \mu\text{M}$ PDTC for 10 min ; lane 6, 25 mM AMT for 30 min followed by $100 \mu\text{M}$ PDTC for 10 min and then 0.5 mM H_2O_2 for 30 min ; lane 7, T cells without treatment. Proteins were resolved by SDS-PAGE (12% polyacrylamide gel), transferred to nitrocellulose, and probed with a polyclonal antiserum against calcineurin. The band at 28 kDa is probably a proteolytic fragment of calcineurin A generated during the preparation of cell lysates.

previous report on the protective effect of these agents was documented in a partially purified CN assay activity from brain (50). Thus, our results are more consistent with a reversible modification of the catalytic center of CN elicited by H_2O_2 .

H_2O_2 rapidly diffuses away from and into cells. In order to analyze the ability of neutrophils to internalize exogenous H_2O_2 , intracellular oxidant levels were monitored by measuring the fluorescence of H_2DCFDA , a highly fluorescent probe sensitive to peroxides (51). Cells labeled with H_2DCFDA dis-

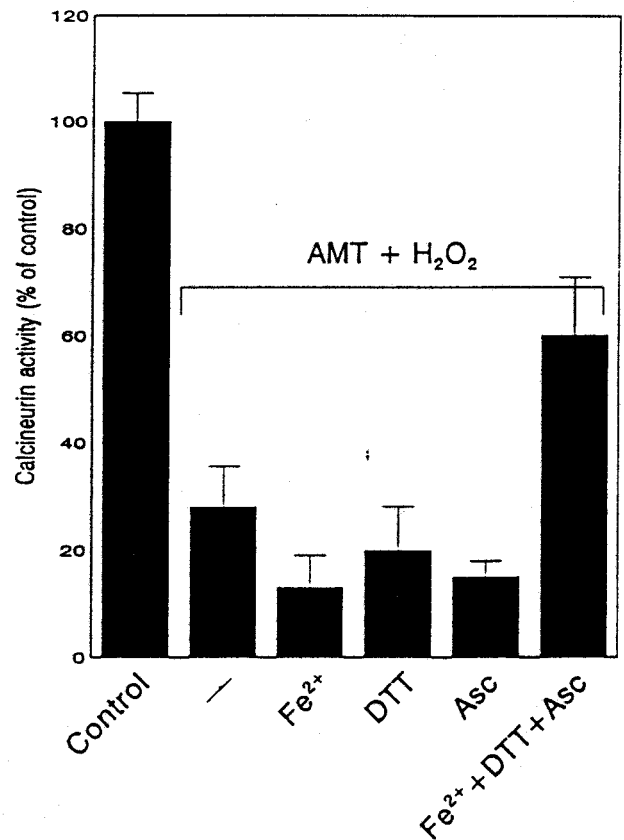


FIG. 6. Reversibility by Fe^{2+} , ascorbate, and dithiothreitol of H_2O_2 -inhibited calcineurin in neutrophil lysates. Cell lysates ($80 \mu\text{g}$ of protein) were incubated with 5 mM AMT for 5 min , followed with $100 \mu\text{M}$ H_2O_2 for 10 min . When present, 0.5 mM ferrous sulfate (Fe^{2+}), 5 mM DTT, or 5 mM sodium ascorbate (Asc) were added, either alone or altogether, for 20 min before the peptide substrate for the assay of calcineurin activity was added. Phosphatase activity is expressed in relation to the value obtained without cell treatment (Control).

played a significant increase in DCF fluorescence upon incubation with H_2O_2 (154.5 ± 3.2 fluorescence units in $100 \mu\text{M}$ H_2O_2 -treated cells versus 12.7 ± 1.1 units in control cells). In other experiments, the treatment of neutrophils with a variety of physiological and pharmacological stimuli revealed that agents that promoted an increase of intracellular H_2O_2 also induced a dose-dependent inhibition of CN activity in human neutrophils. Notably, both tumor necrosis factor- α (50 ng/ml) and interferon- γ (50 units/ml) elicited an inhibition of CN activity of about 25% after 2 h of treatment. Increased times of tumor necrosis factor- α treatment (e.g. 8 h) resulted in an enhanced inhibitory effect (of about 35%) on CN activity. However, LPS (100 ng/ml), platelet-activating factor, or glucocorticoids were without effect on CN activity (data not shown).

To investigate whether the H_2O_2 effect was specific, we also analyzed the CN activity with a new peroxovanadium compound, pV(phen), which causes intracellular oxidative stress and induces strong protein tyrosine phosphorylation (37). The treatment of neutrophils with pV(phen) caused a dose- and time-dependent inhibition of CN activity (Fig. 7). After 60 min of incubation of the cells with $50 \mu\text{M}$ pV(phen), an inhibition of about 60% was observed, with an apparent IC_{50} of about $30 \mu\text{M}$. Therefore, we provide evidence that the observed inhibition of CN by H_2O_2 could be the result of oxidative stress. Under these conditions (e.g. in the presence of H_2O_2 and pV(phen)), the cell viability was determined to be about 90%, and hence significant cytotoxic effects can be ruled out. Also, a strong

Inhibition of Calcineurin Activity by Oxidants

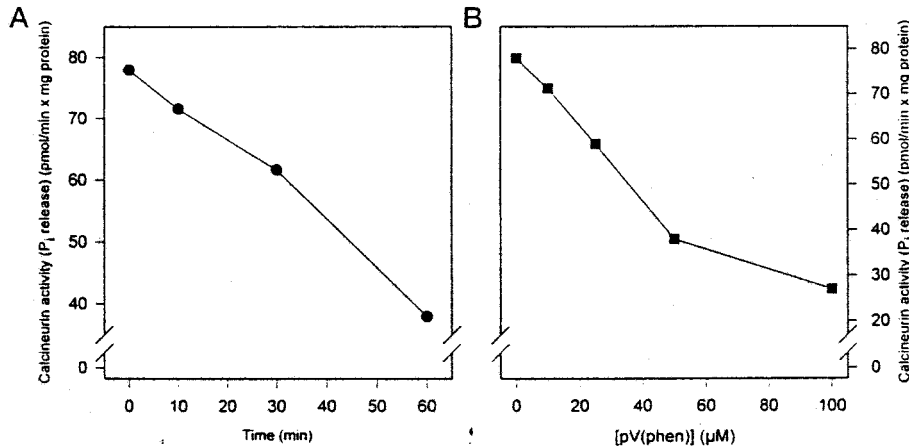


FIG. 7. Inhibition of calcineurin activity in neutrophils incubated with pV(phen). A, neutrophils (7×10^6 cells/ml) were treated with $50 \mu\text{M}$ pV(phen) at 37°C at different times. B, neutrophils (7×10^6 cells/ml) were treated with different pV(phen) concentrations at 37°C for 1 h. Calcineurin activity was assayed in cell lysates ($80 \mu\text{g}$ of protein). Phosphatase activity is expressed as picomoles of phosphate released per minute per mg of protein. Means \pm S.E. values from three separated experiments performed in triplicate are presented.

increase in the intracellular phosphotyrosine levels was detected in neutrophil lysates after incubation of the cells with pV(phen),² in agreement with previous reports on B lymphocytes (37).

EMSA analyses were carried out in order to test whether the changes in CN activity promoted by H_2O_2 were accompanied by an alteration of the DNA binding activity of two transcription factors, namely NF-AT and NF- κB . No binding activity was detected on neutrophil nuclear extracts when the NF-AT probe was used. However, activated NF- κB was detectable as a uniquely positioned band in assays of nuclear extracts from human neutrophils stimulated with LPS ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) (Fig. 8). On the basis of the results from McDonald *et al.* (46) and of supershift assays using anti-p50 and anti-p65 antibodies (data not shown), we interpreted the upper band as corresponding to the activated form of NF- κB (*i.e.* the p50/p65 tetramer). Gel retardation analysis of extracts from neutrophils stimulated with LPS and different doses of H_2O_2 demonstrated that H_2O_2 selectively inhibits the activation of NF- κB , resulting in a gradual decrease of the intensity of the p50/p65 band, as H_2O_2 was increased. As a negative control, we also analyzed the effect of CsA ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) (lane 1). In agreement with previous data from other cell lines (1–4), the p50/p65 band was only barely detectable in extracts from CsA/LPS-treated neutrophils. These results are consistent with an NF- κB activity regulated by CN in neutrophils, in agreement with previous reports (20–22). Present data concerning H_2O_2 inhibition of CN in neutrophils and lymphocytes suggest that previous evidence on H_2O_2 -stimulated NF- κB functional activity (27, 29) can be interpreted as the result that peroxides, above a threshold level, are able to bypass the CN modulatory step and regulate transcription factors activity independently of CN.

DISCUSSION

Only a few reports concerning CN in neutrophils and presenting indirect evidence of its presence in these cells have been published (23–26). All of them deal with neutrophil motility on vitronectin and its inhibition by CsA and FK 506 (23–26), a couple of well known inhibitors of CN activity. Here we have analyzed accurately, using a synthetic peptide corresponding to the phosphorylation site of the RII subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase, the presence of CN in human neutrophils. Lysates from neutrophils dephosphorylate this substrate in a dose- and time-dependent manner. CN activity in neutrophils is insensitive to okadaic acid, whereas other phosphatases (*e.g.* 1A and 2A) are sensitive to this inhibitor

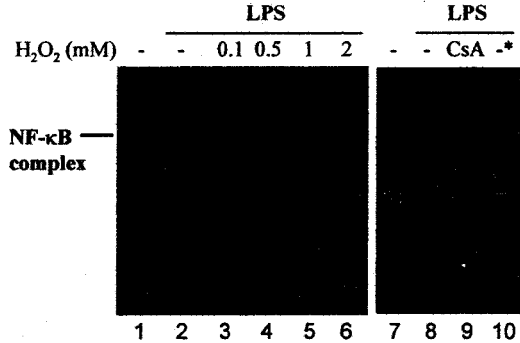


FIG. 8. Reduced binding activity of NF- κB in H_2O_2 -treated human neutrophils. Binding activity of nuclear proteins ($5 \mu\text{g}$) from human neutrophils to a digoxigenin-labeled oligonucleotide containing the consensus NF- κB binding sequence was assessed by EMSA (see "Experimental Procedures"). The cells were untreated (lanes 1 and 7) or incubated with H_2O_2 (0.1, 0.5, 1, and 2 mM; lanes 3, 4, 5, and 6, respectively) for 15 min prior to LPS stimulation ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) for 10 min. Before treatment with H_2O_2 , cells were incubated with AMT (25 mM) for 30 min. CsA ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$, lane 9) was added 30 min prior to LPS stimulation ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) without AMT. A control including a 100-fold excess of unlabeled oligonucleotide in the reaction performed with nuclear extracts from LPS-treated human neutrophils is also shown (lane 10). The figure shows a representative experiment out of three carried out with identical results.

(47). In the presence of okadaic acid the CN activity from neutrophil lysates is both Ca^{2+} -dependent and Ca^{2+} -sensitive to inhibition by trifluoroperazine, a calmodulin inhibitor. In addition, we present evidence that two well known immunosuppressants and inhibitors of CN activity in lymphocytes, CsA and FK 506 (1–4), potently depressed CN activity in neutrophils. It is well accepted that CN plays an important role as a prominent component of the calcium signaling pathway in T cells, by acting as an obligatory step between immunosuppressive drugs (*e.g.* CsA and FK 506) and some transcription factors (*e.g.* NF-AT and NF- κB) (1–4, 20, 21). The mechanism by which CN activates NF-AT seems rather complex. It has been shown that the coexpression in transfected cells of the activated CN and activated p21_{ras} could mimic T cell receptor signaling during NF-AT induction, both acting as cooperative partners during T cell activation (52). Also, recent data show that CN forms a complex with cytosolic NF-AT4 (an isoform of NF-AT), which is transported to the nucleus where CN continues to dephosphorylate NF-AT4 (53). On the other hand the important role of ROI in the regulation of some transcription factors, mainly

NF- κ B, is stressed by its activation in response to the addition of H_2O_2 (29), although doubts that it represents a universal phenomenon has been raised (30–32, 34). Moreover, an inverse relationship between ROI and NF-AT has also been pointed out, since low levels of H_2O_2 can actively suppress the transcription activity of NF-AT and the expression of interleukin-2 mRNA (35). These studies indicate that CN is a key component of the T cell signal transduction cascade and that oxidative signals can positively or negatively regulate transcription factor activity (54, 55). However, a deep knowledge of the molecular mechanism connecting both components (*i.e.* CN and oxidative signals) is lacking. We present here evidence for the first time that human neutrophils treated with H_2O_2 or pV(phen) exhibit a suppression of CN activity and that H_2O_2 effect required the previous inhibition of catalase activity. Only when catalase was inhibited by AMT a clear decrease of CN activity in the presence of exogenous H_2O_2 was observed. As expected, we have observed that the preincubation of neutrophils with the antioxidant PDTC cancelled the inhibition of CN activity by H_2O_2 . As a preliminary effort toward the elucidation of the functional consequences of H_2O_2 -dependent CN inhibition, we focused our attention on the transcription factor NF-AT as a potential target. However, we were unable to find any NF-AT DNA binding activity in nuclear extracts from neutrophils (data not shown). This fact closely agrees with previous results from immunoblotting analysis pointing out the absence of NF-AT proteins in neutrophils (56). Subsequent experiments were thus addressed to analyze whether H_2O_2 -dependent CN inactivation could affect NF- κ B activation. Conflicting results have been published on the presence or absence of NF- κ B in human neutrophils. Browning *et al.* (57) did not observe any NF- κ B activation in these cells. However, Cassatella and co-workers (46) described the presence of NF- κ B subunits as well as the existence of NF- κ B DNA binding activity in human neutrophils. We have followed the methodology described by the latter authors, with minor modifications, and have detected NF- κ B DNA binding activity in fresh human neutrophils, together with its inhibition by H_2O_2 . These data indicate that NF- κ B activation is modulated by CN activity in human neutrophils.

Indirect evidence that CN is an enzyme sensitive to its redox environment has been reported, based on the fact that superoxide dismutase protects CN from spontaneous inactivation in brain crude extracts (50). This inactivation was interpreted as resulting from oxidative damage of the Fe-Zn active center of CN (50). Since there is a good evidence that CN is an Fe-Zn-containing enzyme (16), the hypothetical mechanism that can be proposed for this oxidative damage is that H_2O_2 and pV(phen) could modify the redox state of the Fe-Zn center in the catalytic site and thereby inactivate the enzyme. This mechanism is in agreement with the observation that the reactivation of H_2O_2 -inhibited neutrophil CN requires the addition of reducing agents, such as Fe^{2+} , ascorbate, and DTT (Fig. 6), as it was also previously demonstrated for a preparation of CN from brain (50). The observed inhibition of CN in intact neutrophils by oxidants, such as H_2O_2 and pV(phen), represents a novel mechanism of action for these agents. The pV(phen) molecule presents a dual activity, acting both as an intracellular oxidant and as an inhibitor of phosphotyrosine phosphatase (37). Evidence also has been presented that the activities of both protein tyrosine phosphatase and protein phosphatase 2A were reduced after H_2O_2 treatment of intact Jurkat T cells (58). Previously it has been described that CN has a regulatory phosphorylation site that is phosphorylated by the Ca^{2+} -independent form of calmodulin-kinase II. This phosphorylated CN exhibits a 50% decrease in its V_{max} and 2-fold increase in

the K_m values (59). Thus, a hypothetical model in which oxidants modulate CN activity through phosphorylation of its regulatory site can therefore be postulated in the light of present data.

An apparent discrepancy between CN inhibition by H_2O_2 and other oxidant species, described here, and the protection exerted on CN by superoxide dismutase (50), which converts anion superoxide on H_2O_2 , may be raised. In this context, however, the role of catalase and peroxidases, as detoxicant enzymes that degradate H_2O_2 , should be introduced. These enzymes are also mutually protective, and therefore synergistic, when both O_2^- and H_2O_2 are being made. In fact, experimental evidence (Fig. 4) illustrates the absence of effect by exogenous H_2O_2 added alone and the requirement of AMT to inhibit intracellular catalase and to detect H_2O_2 -dependent CN inactivation. These data indirectly provide the notion of catalase as an additional protecting enzyme for CN against ROI inactivation. The implication of this suggestion is that, under normal physiological conditions, the cellular CN may be relatively less susceptible to molecular oxidative damage by ROI. Conversely, in pathological process, such as inflammation and reperfusion injury, or situations characterized by an inhibition of ROI-detoxicant enzymes, the CN inactivation by oxidant species may take place, and it could be a relevant process in the context of the oxidative stress state.

In summary, available evidence indicates that CN activity is a redox-sensitive step in cellular signaling cascades and suggests that the inhibition of NF-AT from lymphocytes (35) and NF- κ B from neutrophils (present work) by H_2O_2 is elicited through inactivation of CN.

Acknowledgment—We thank Dr. C. B. Klee for anti-calcineurin antiserum and for the critical reading of manuscript.

REFERENCES

- Liu, J., Farmer, J. D. J., Lane, W. S., Friedman, J., Weissman, I., and Schreiber, S. L. (1991) *Cell* 66, 807–815
- Fruman, D. A., Klee, C. B., Bierer, B. E., and Burakoff, S. J. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 3686–3690
- O'Keefe, S. J., Tamura, J., Kincaid, R. L., Tocci, M. J., and O'Neill, E. (1992) *Nature* 357, 692–694
- Clipstone, N. A., and Crabtree, G. R. (1992) *Nature* 357, 695–697
- Sen, R., and Baltimore, D. (1986) *Cell* 46, 705–716
- Ullman, K. S., Northrop, J. P., Verweij, C. L., and Crabtree, G. R. (1990) *Annu. Rev. Immunol.* 8, 421–452
- Karin, M., and Smeal, T. (1992) *Trends Biochem. Sci.* 17, 418–422
- Rao, A. (1994) *Immunol. Today* 15, 274–281
- Klee, C. B., and Krinks, M. H. (1978) *Biochemistry* 17, 120–126
- Klee, C. B., Crouch, T. H., and Krinks, M. H. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76, 6270–6273
- Stewart, A. A., Ingebritsen, T. S., Manalan, A., Klee, C. B., and Cohen, P. (1982) *FEBS Lett.* 137, 80–84
- Aitkin, A., Klee, C. B., and Cohen, P. (1984) *Eur. J. Biochem.* 139, 663–671
- Perrino, B. A., Ng, L. Y., and Soderling, T. R. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 340–346
- Sikkink, R., Haddy, A., MacKelvie, S., Mertz, P., Litwiller, R., and Rusnak, F. (1995) *Biochemistry* 34, 8348–8356
- King, M. M., and Huang, C. Y. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 8847–8856
- Griffith, J. P., Kim, J. L., Kim, E. E., Sintchak, M. D., Thomson, J. A., Fitzgibbon, M. J., Fleming, M. A., Caron, P. R., Hsiao, K., and Navia, M. A. (1995) *Cell* 82, 507–522
- Stemmer, P., and Klee, C. B. (1991) *Curr. Opin. Neurobiol.* 1, 53–64
- Liu, J., Albers, M. W., Wandless, T. J., Luan, S., Alberg, D. G., Belshaw, P. J., Cohen, P., MacKintosh, C., Klee, C. B., and Schreiber, S. L. (1992) *Biochemistry* 31, 3896–3901
- Loh, C., Shaw, K. T.-Y., Carew, J., Viola, J. P. B., Luo, C., Perrino, B. A., and Rao, A. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 10884–10891
- Schmidt, A., Hennighausen, L., and Siebenlist, U. (1990) *J. Virol.* 64, 4037–4041
- Frantz, B., Nordby, E. C., Bren, G., Steffan, N., Paya, C. V., Kincaid, R. L., Tocci, M. J., O'Keefe, S. J., and O'Neill, E. A. (1994) *EMBO J.* 13, 861–870
- Gualberto, A., Marquez, G., Carballo, M., Youngblood, G. L., Hunt, S. W., III, Baldwin, A. S., and Sobrinho, F. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 7088–7093
- Hendey, B., Klee, C. B., and Maxfield, F. R. (1992) *Science* 258, 296–299
- Hendey, B., and Maxfield, F. R. (1993) *Blood Cells* 19, 143–161
- Lawson, M. A., and Maxfield, F. R. (1995) *Nature* 377, 75–79
- Hendey, B., Lawson, M., Marcantonio, E. E., and Maxfield, F. R. (1996) *Blood* 87, 2038–2048
- Schreck, R., and Baeuerle, P. A. (1991) *Trends Cell Biol.* 1, 39–42
- Gomez del Arco, P., Martinez-Martinez, S., Calvo, V., Armesilla, A. L., and Redondo, J. M. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 26335–26340

29. Schreck, R., Rieber, P., and Baeuerle, P. A. (1991) *EMBO J.* 10, 2247-2258
30. Brennan, P., and O'Neil, L. (1995) *Biochim. Biophys. Acta* 1260, 1670-1675
31. Suzuki, Y., Mizuno, M., and Parker, L. (1995) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 40, 537-541
32. Suzuki, Y. J., Mizuno, M., and Packer, L. (1994) *J. Immunol.* 153, 5008-5015
33. Courtois, G., Whiteside, S. T., Sibley, C. H., and Israel, A. (1997) *Mol. Cell. Biol.* 17, 1441-1449
34. Nottet, H. S. L. M., Moelans, I. I. M. D., de Vos, N. M., de Graaf, L., Visser, M. R., and Verhoef, J. (1997) *J. Leukocyte Biol.* 61, 33-39
35. Beiqing, L., Chen, M., and Whisler, R. L. (1996) *J. Immunol.* 157, 160-169
36. Posner, B. I., Faure, R., Burgess, J. W., Bevan, A. P., Lachance, D., Zhang-Sun, G., Fantus, I. G., Ng, J. B., Hall, D. A., and Lum, B. S. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 4596-4604
37. Krejsa, C. M., Nadler, S. G., Esselstyn, J. M., Kavanagh, T. J., Ledbetter, J. A., and Schieven, G. L. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 11541-11549
38. Monteseirin, J., Camacho, M. J., Montaña, R., Llamas, E., Conde, M., Carballo, M., Guardia, P., Conde, J., and Sobrino, F. (1996) *J. Exp. Med.* 183, 2571-2579
39. Stemmer, P. M., Wang, X., Krinks, M. H., and Klee, C. B. (1995) *FEBS Lett.* 374, 237-240
40. Hubbard, M. J., and Klee, C. B. (1991) in *Molecular Neurobiology* (Wheal, H. and Chad, J., eds) pp. 135-137, Oxford University Press, Oxford
41. Blumenthal, D. R., Takio, K., Hansen, R. S., and Krebs, E. G. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 8140-8145
42. Bradford, M. M. (1976) *Anal. Biochem.* 72, 248-254
43. Carballo, M., Vilaplana, R., Márquez, G., Conde, M., Bedoya, F. J., Gonzalez-Vilchez, F., and Sobrino, F. (1997) *Biochem. J.* 328, 559-564
44. Hodgson, M., and Jones, P. (1989) *J. Biolum. Chemilumin.* 3, 21-25
45. White, E. E., Zafirion, O. C., Kagi, H. M., and Hill, J. H. M. (1964) *J. Am. Chem. Soc.* 86, 940-941
46. McDonald, P. P., Bald, A., and Cassatella, M. A. (1997) *Blood* 89, 3421-3433
47. Cohen, P., Holmes, C. F. B., and Tsukitani, Y. (1990) *Trends Biol. Sci.* 15, 98-102
48. Stewart, A. A., Ingebritsen, T. S., and Cohen, P. (1983) *Eur. J. Biochem.* 132, 289-295
49. Margoliash, E., Novogrodsky, A., and Schejter, A. (1960) *Biochem. J.* 74, 339-348
50. Wang, X., Culotta, C., and Klee, C. B. (1996) *Nature* 383, 434-437
51. Garcia-Ruiz, C., Colell, A., Morales, A., Kaplowitz, N., and Fernández-Checa, C. (1995) *Mol. Pharmacol.* 48, 825-834
52. Woodrow, M., Clipstone, N. A., and Cantrell, D. (1993) *J. Exp. Med.* 175, 1517-1522
53. Shihasaki, F., Price, E. R., Milan, D., and Mckeon, F. (1996) *Nature* 382, 370-373
54. Schreck, R., Meier, B., Männel, D. N., Dröge, W., and Baeuerle, P. A. (1992) *J. Exp. Med.* 175, 1181-1194
55. Martinez, S.-M., Gomez del Arco, P., Armesilla, A. L., Aramburu, J., Luo, C., Rao, A., and Redondo, J. M. (1997) *Mol. Cell. Biol.* 17, 6437-6447
56. Wang, D. Z., McCaffrey, P. G., and Rao, A. (1995) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 766, 182-194
57. Browning, D. D., Pan, Z. K., Prossnitz, E. R., and Ye, R. D. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 7995-8001
58. Whisler, R. L., Goyette, M. A., Grants, I. S., and Newhouse, Y. G. (1995) *Arch. Biochem. Biophys.* 319, 23-35
59. Hashimoto, Y., King, M. M., and Soderling, T. R. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 7001-7005

ANEXO I

En otros experimentos, el tratamiento de neutrófilos con una variedad de estímulos fisiológicos y farmacológicos revela que estos agentes que promueven un aumento del H_2O_2 intracelular, también inducen de manera dosis dependiente una inhibición de la actividad CN en neutrófilos humanos.

Tratamiento	Actividad enzimática
No adiciones	100 %
TNF- α (50 ng/ml)	75 %
INF- γ (50 U/ml)	73 %
LPS (100 ng/ml)	No afecta
PAF (50 nM)	95 %
Glucocorticoides (10 μ M) (Budesonida, Nedocromil)	No afecta

Tabla 1. Estímulos fisiológicos y farmacológicos que afectan a la actividad CN.



CAPÍTULO 3.**3.- EL ESTRÉS OXIDATIVO PROVOCA LA FOSFORILACIÓN EN TIROSINA Y LA TRANSLOCACIÓN AL NÚCLEO DEL STAT3 EN LINFOCITOS HUMANOS.**

Los agentes oxidantes son potentes activadores de factores responsables de la activación transcripcional de genes de citoquinas involucrados en el daño tisular. En este capítulo, estudiamos como la actividad del factor de transcripción STAT3, es modulada por el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), en linfocitos humanos, en los que la catalasa endógena había sido previamente inhibida. La translocación de STAT3 al núcleo, inducida por H_2O_2 , para formar complejos de unión a secuencias específicas de ADN, se demostró por incubación con anticuerpos de fracciones nucleares y ensayos de movilidad electroforética y junto con vanadato, fuertemente sinergiza con el H_2O_2 . Además, anticuerpos anti-STAT3, precipitan específicamente una proteína de 92 kDa, que es fosforilada en tirosina en linfocitos incubados con H_2O_2 . Óxido de fenilo arsénico (PAO), un inhibidor de tirosina fosfatasa, y genisteína, un inhibidor de tirosina quinasa, coopera y cancela respectivamente la translocación al núcleo de STAT3 promovida por H_2O_2 . El H_2O_2 añadida exógenamente, es rápidamente convertida en otras especies químicas. También se presentan evidencias, que usando iones Fe^{2+} y Cu^{2+} que generan radicales $\cdot OH$ a partir de H_2O_2 por la reacción de Fenton, podría ser un candidato de especies reactivas de oxígeno para activar directamente al STAT3. Los datos presentes sugieren que el H_2O_2 y el vanadato probablemente inhiben la actividad de tirosinas fosfatasas intracelulares, provocando un aumento en la fosforilación de tirosina y por tanto su translocación al núcleo. Estos resultados, demuestran que la unión del STAT3 al ADN, puede ser modulado por agentes oxidantes y proporciona un marco para comprender los efectos del estrés oxidativo sobre la vía JAK-STAT.

Oxidative stress triggers STAT3 tyrosine phosphorylation and nuclear translocation in human lymphocytes

Modesto Carballo*, Manuel Conde*, Rajaa El Bekay*, Jose Martín-Nieto[§], María Jesús Camacho¹,
Javier Monteseirín¹, José Conde¹, Francisco Bedoya*, and Francisco Sobrino*¹¹.

*From the *Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, ¹Departamento de Medicina, Servicio Regional de Inmunología y Alergia, Hospital Universitario Virgen Macarena, Universidad de Sevilla, Sevilla, and [§]División de Genética, Univesidad de Alicante, Campus Universitario San Vicente, Alicante, Spain.*

¹ To whom correspondence should be addressed.

Running title: Oxidative stress activates lymphocyte STAT3

Address for correspondence: F. Sobrino. Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular. Facultad de Medicina. Avda. Sánchez Pizjuán 4. E-41009 Seville. Spain.

Fax: +34-95-4907041. E-mail: fsobrino@cica.es

SUMMARY

Oxidizing agents are powerful activators of factors responsible for the transcriptional activation of cytokine-encoding genes involved in tissue injury. In this study we show evidence that STAT3 is a transcription factor whose activity is modulated by hydrogen peroxide (H_2O_2) in human lymphocytes, in which endogenous catalase had previously been inhibited. H_2O_2 -induced nuclear translocation of STAT3 to form sequence-specific DNA-bound complexes was evidenced by immunoblotting of nuclear fractions and electrophoretic mobility shift assays, and vanadate found to strongly synergize with H_2O_2 . Moreover, anti-STAT3 antibodies specifically precipitated a protein of 92 kDa which becomes phosphorylated on tyrosine upon lymphocyte treatment with H_2O_2 . Phenylarsine oxide, a tyrosine phosphatase inhibitor, and genistein, a tyrosine kinase inhibitor, cooperated and cancelled, respectively, the H_2O_2 -promoted STAT3 nuclear translocation. Evidence is also presented, using Fe^{2+}/Cu^{2+} ions, that $\cdot OH$ generated from H_2O_2 through Fenton reactions, could be a candidate oxygen reactive species to directly activate STAT3. Present data suggest that H_2O_2 and vanadate are likely to inhibit the activity of intracellular tyrosine phosphatase(s), leading to enhanced STAT3 tyrosine phosphorylation and hence its translocation to the nucleus. These results demonstrate that the DNA binding activity of STAT3 can be modulated by oxidizing agents and provide a framework to understand the effects of oxidative stress on the JAK-STAT signaling pathway.

INTRODUCTION

Oxidative stress is characterized by high intracellular levels of reactive oxygen intermediates (ROI)¹, which may function as physiological mediators of a number of cellular responses by acting as second messengers for specific signaling pathways (1-3). In addition, ROI have been implicated in a variety of clinical conditions, including rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases (4, 5), and can also play a role as tumor promoters (6). Hydrogen peroxide (H_2O_2), as well as superoxide anions ($O_2^{\cdot-}$), have traditionally been viewed as potent microbicidal agents (7). H_2O_2 is a small, diffusible and ubiquitous molecule that can be rapidly synthesized, as well as destroyed, in response to several stimuli. It has been proposed that H_2O_2 is converted into highly reactive $\cdot OH$ radicals via the Fenton chemistry through its reduction by ferrous/cuprous ions (8, 9). H_2O_2 fulfills the prerequisites for intracellular second messengers. In this regard, recent studies have demonstrated that exposure of lymphocytes to oxidants, such as H_2O_2 (10-12), diamide (12, 13) or phenylarsine oxide (PAO) (14-16) results in an increased tyrosine phosphorylation of intracellular proteins.

STATs (signal transducers and activators of transcription) are a class of transcription factors bearing SH2 domains which become activated upon tyrosine phosphorylation. STATs are often activated by members of the JAK family of protein tyrosine kinases (PTKs) in response to cytokine stimulation. This activation mechanism involves the SH2-domain dependent recruitment of the STATs to tyrosine-phosphorylated cytokine receptors. The STATs then become phosphorylated by receptor-associated JAKs, which induces their dimerization via reciprocal SH2-phosphotyrosine interaction. STAT dimers then enter the nucleus and bind to specific DNA elements, thereby activating the transcription of a number of genes. The JAK-STAT pathway has been the subject of many recent comprehensive reviews (17-21). STAT3, a well characterized 92-kDa protein, has been shown to become activated by both EGF and IL-6 in human A-431 cells (22). Since the ROI generated in response to various external stimuli can play a role both as regulators of transcription factors, including NF- κB (2, 23) and NF-AT (24), and as inhibitors of protein tyrosine phosphatases (PTPases) (25-27), we have investigated whether H_2O_2 and other oxidizing agents could modulate STAT3 function in human lymphocytes. Enhanced phosphotyrosine accumulation could then result from the combined effects of increased phosphorylation and decreased dephosphorylation. Moreover, the DNA-binding activity of STATs is known to depend primarily on tyrosine phosphorylation (19, 28-31), although serine phosphorylation is also important in modulating the binding affinity of STAT3 (32-34). Here we show for the first time that STAT3 is phosphorylated on tyrosine residue(s),

translocated to the nucleus and elicited to bind to specific DNA elements upon lymphocyte treatment with H₂O₂. An additive effect between H₂O₂ and vanadate was also evidenced, which suggests that inhibition of tyrosine phosphatase(s) by pervanadate could take place. The effects of H₂O₂ were also enhanced by the presence of Fe²⁺ and Cu²⁺ ions, which indicates the participation of other chemical reactive species derived from oxygen. These data collectively indicate that STAT3 is a major component of the signaling pathways that become activated by oxidative stress in human lymphocytes.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

Hydrogen peroxide (30%, v/v), 3-amino-1,2,4-triazole, sodium orthovanadate (Na_3VO_4), phenylarsine oxide (PAO), diamide, genistein, fetal bovine serum and 1,10-phenantroline were purchased from Sigma Chemical (Madrid, Spain). Ficoll-Hypaque, phosphate-buffered saline and RPMI 1640 were obtained from Bio-Whittaker (Verviers, Belgium). Phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) and the double-stranded SIE m67 oligonucleotide (5'-GTCGACATTTCCCGTAAATC-3') were obtained from Boehringer Mannheim (Barcelona, Spain). Interferon- α (INF- α) was purchased from Schering-Plough (Brinny Innishannon, Ireland).

Antibodies

Polyclonal antiserum directed against STAT1 and STAT3 were purchased from Santa Cruz Biotechnology (CA, USA). Monoclonal antibodies (4G10) against phosphotyrosine (free or conjugated to agarose beads) were purchased from Upstate Biotechnology (NY, USA). Polyclonal anti-STAT5B antibody was kindly provided by Dr. J. O'Shea (Bethesda, MD, USA). Goat anti-rabbit and anti-mouse antibodies conjugated to horseradish peroxidase were purchased from Sigma Chemical (Madrid, Spain).

Cell culture and treatment

Human peripheral blood lymphocytes (PBL) were prepared by Ficoll/Hypaque gradient centrifugation from normal blood donors, following informed consent. Normally, PBL were used immediately after they were obtained. In other cases, PBL were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10 % (v/v) fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicilin, and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin, and maintained at 37 °C in an atmosphere of 5 % CO_2 and 95 % O_2 for 24 h.

For stimulation treatments, the cells were washed with RPMI 1640, resuspended in fresh medium at a density of 10×10^6 cells/ml and incubated in RPMI 1640 with the reagents indicated in each case and for the specified times at 37 °C. Stimulation was terminated by centrifugation at 5,000 rpm for 30 s and washing once with ice-cold phosphate-buffered saline supplemented with 400 μM Na_3VO_4 and 400 μM EDTA. In all the experiments in which H_2O_2 was used, the cells were previously incubated with 25 mM aminotriazole for 30 min in order to inhibit endogenous catalase activity, and the cells were not washed before H_2O_2 addition.

Western blotting analysis

Stimulated cells were pelleted and lysed in 75 μ l of ice-cold lysis buffer A, containing 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 1% (v/v) Nonidet P-40, 137 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 10% glycerol and the following inhibitors of phosphatase and protease: 5 mM EDTA, 100 mM PAO, 1 mM Na₃VO₄, 10 μ g/ml aprotinin, 10 μ g/ml leupeptin and 1 mM PMSF. The lysates were kept on ice for 30 min with occasional mixing, and then centrifuged at 10,000 x g for 10 min at 4°C. The supernatants obtained constituted the cytoplasmic fraction, and the nuclei-containing pellets were washed three times with buffer A. Standard Laemmli sample buffer was then added to cytosolic and nuclear fractions and, after boiling for 5 min followed by centrifugation at 10,000 x g for 10 min, the supernatants were analyzed by SDS-PAGE on 7.5 % polyacrylamide gels. The separated proteins were electrophoretically transferred to nitrocellulose membranes and, after blocking non-specific interactions in TBST (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1 % Tween-20) containing 3 % bovine serum albumin for 1 h, incubation with anti-STAT or 4G10 antibodies, diluted 1:1000 in TBST, was carried out overnight at 4°C. Next, the membranes were washed twice with TBST, and incubation with a 1:5000 dilution of goat anti-rabbit secondary antibody coupled to horseradish peroxidase was performed for 1 h at room temperature. After washing three times with TBST, immunoreactive bands were visualized by using the enhanced chemiluminescence assay as previously described (36).

Immunoprecipitation

Stimulated cells were pelleted and lysed in 75 μ l of ice-cold lysis buffer B, containing 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 1% Triton-X 100, 300 mM NaCl, 100 mM PAO, 10 μ g/ml leupeptin, 10 μ g/ml aprotinin, 1 mM PMSF, 1 mM Na₃VO₄ and 5 mM EDTA. The lysates were centrifuged at 12,000 x g for 5 min. For immunoprecipitation, incubation with anti-STAT3 specific antibodies (0.5 μ g/70 μ l) was carried out with rotation for 2 h at 4°C, followed by addition of 40 μ l of a (50 %) slurry of protein A-Sepharose beads and further incubation for 2 h at 4°C. Alternatively, anti-phosphotyrosine antibodies covalently attached to agarose (10 μ g/70 μ l) and a single incubation step performed for 2 h at 4°C. The immune complexes were washed five times with ice-cold lysis buffer B, and the proteins were extracted by boiling the pellet in standard Laemmli sample buffer. After resolution by SDS-PAGE (7.5% polyacrylamide), the proteins were electrotransferred to nitrocellulose membranes, and subjected to immunoblotting analysis as indicated above.

Electrophoretic mobility shift assay

Stimulated cells were lysed on ice for 10 min in hypotonic buffer C, which contained 20 mM HEPES pH 7.9, 10 mM KCl, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM EDTA, 10% glycerol, 1 mM PMSF, 10 µg/ml aprotinin, 10 µg/ml leupeptin, 20 mM NaF, 1 mM DTT, and 0.2% (v/v) Nonidet P-40. After centrifugation at 13,000 rpm for 1 min at 4°C, the supernatant obtained was collected as the cytoplasmic fraction. Nuclear extracts were prepared by resuspension of the pellet in 25 µl of high-salt buffer (buffer C supplemented with 20% glycerol and 420 mM NaCl), followed by incubation on ice for 30 min with occasional mixing. After centrifugation at 13,000 rpm for 10 min at 4°C, the supernatants obtained constituted the nuclear extracts. STAT3 DNA binding activity was assayed using the SIE m67 20 bp oligonucleotide as a probe (see sequence above) and the digoxigenin (DIG)-gel shift assay kit from Boehringer Mannheim. The reactions were performed in 15 µl of a binding buffer containing 20 mM Tris-HCl pH 7.8, 50 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1% (v/v) Nonidet P-40, 6% glycerol and 10 µg of nuclear extract, in the presence of 1 pmol of DIG-labeled oligonucleotide, and allowed to proceed for 20 min at room temperature. For competition assays, binding reactions were performed in the presence of a 100-fold molar excess of unlabeled oligonucleotide. The samples were finally electrophoresed on 5% polyacrylamide native gels at 4°C in 0.25X TBE buffer.

RESULTS

Hydrogen peroxide promotes tyrosine phosphorylation and nuclear translocation of STAT3. In order to investigate the changes on the STAT3 tyrosine phosphorylation status that take place under oxidative stress conditions, PBL cells were treated with H_2O_2 for 2 min and then STAT3 was immunoprecipitated using specific antibodies. Immunoblotting analyses revealed that, whereas the amount of STAT3 protein immunoprecipitated from H_2O_2 -treated and untreated cells was comparable, the phosphotyrosine content of STAT3 was considerably higher in lymphocytes treated with H_2O_2 (Fig. 1A). In other experiments, cells treated with H_2O_2 and untreated control cells were lysed and subject to immunoprecipitation with anti-phosphotyrosine antibodies. As shown in Fig. 1B, a high number of proteins underwent tyrosine phosphorylation upon H_2O_2 treatment, as revealed by immunoblotting using the same anti-phosphotyrosine antibodies. The presence of STAT3 as a 92 kDa protein among these phosphorylated polypeptides was further evidenced by immunoblotting with anti-STAT3 antibodies. A detectable signal was only obtained in the immunoprecipitates from cells treated with H_2O_2 , which was virtually absent in control untreated cells (Fig 1B).

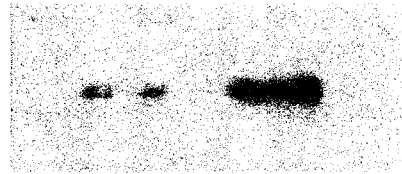
In order to test whether the H_2O_2 -promoted increase in tyrosine phosphorylation of STAT3 was accompanied by its translocation from the cytosol to the nucleus, PBL cells treated with H_2O_2 for different times were lysed, and the cytoplasmic and nuclear fractions were subject to immunoblotting analysis using anti-STAT3 antibodies. As illustrated in Fig. 2A, STAT3 was clearly detectable in the nucleus after 10 min of treatment with H_2O_2 , whereas in the cytosol the STAT3 signal at this time was significantly diminished. Nuclear translocation of STAT3 appeared to be completed after 30 min, since no cytosolic STAT3 was detected at this point. In some untreated cell preparations, a certain amount of STAT3 was found in the nuclei, attributable to basal levels of activation in the absence of stimulus.

The effect on STAT3 nuclear translocation of phytohemagglutinin (PHA), a well known promoter of lymphocyte proliferation, was also analyzed alone or in combination with H_2O_2 . As shown, PHA by itself was able to slightly induce STAT3 nuclear translocation (Fig 2B, lane 8). This effect was, however, considerably enhanced when PHA acted in combination with H_2O_2 , conditions under which a synergistic effect was found (Fig 2C). Recently, it has been documented that the treatment of T lymphocytes with IL-2 results in an increase of STAT3 tyrosine phosphorylation, though no such effect was observed to occur in cells treated with PHA for 3 days (37). Present results suggest that PHA enhances the transduction of signals which are required for optimal H_2O_2 effect.

A

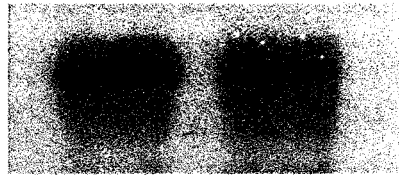
IP: STAT3

H₂O₂ - +



← STAT3

BLOT: PY

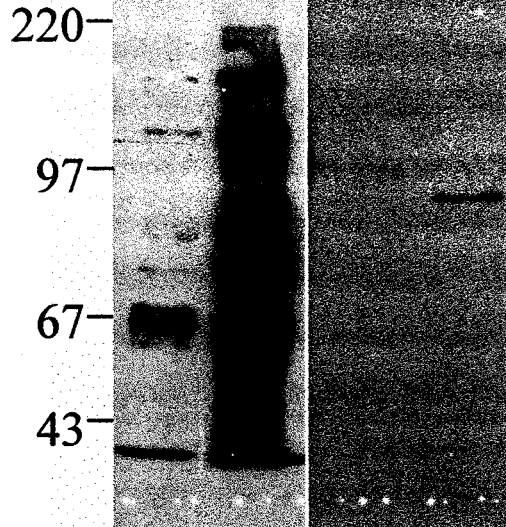


BLOT: STAT3

B

IP: PY

H₂O₂ - + - +



← STAT3

1 2 3 4
BLOT: PY STAT3

Figure 1.-

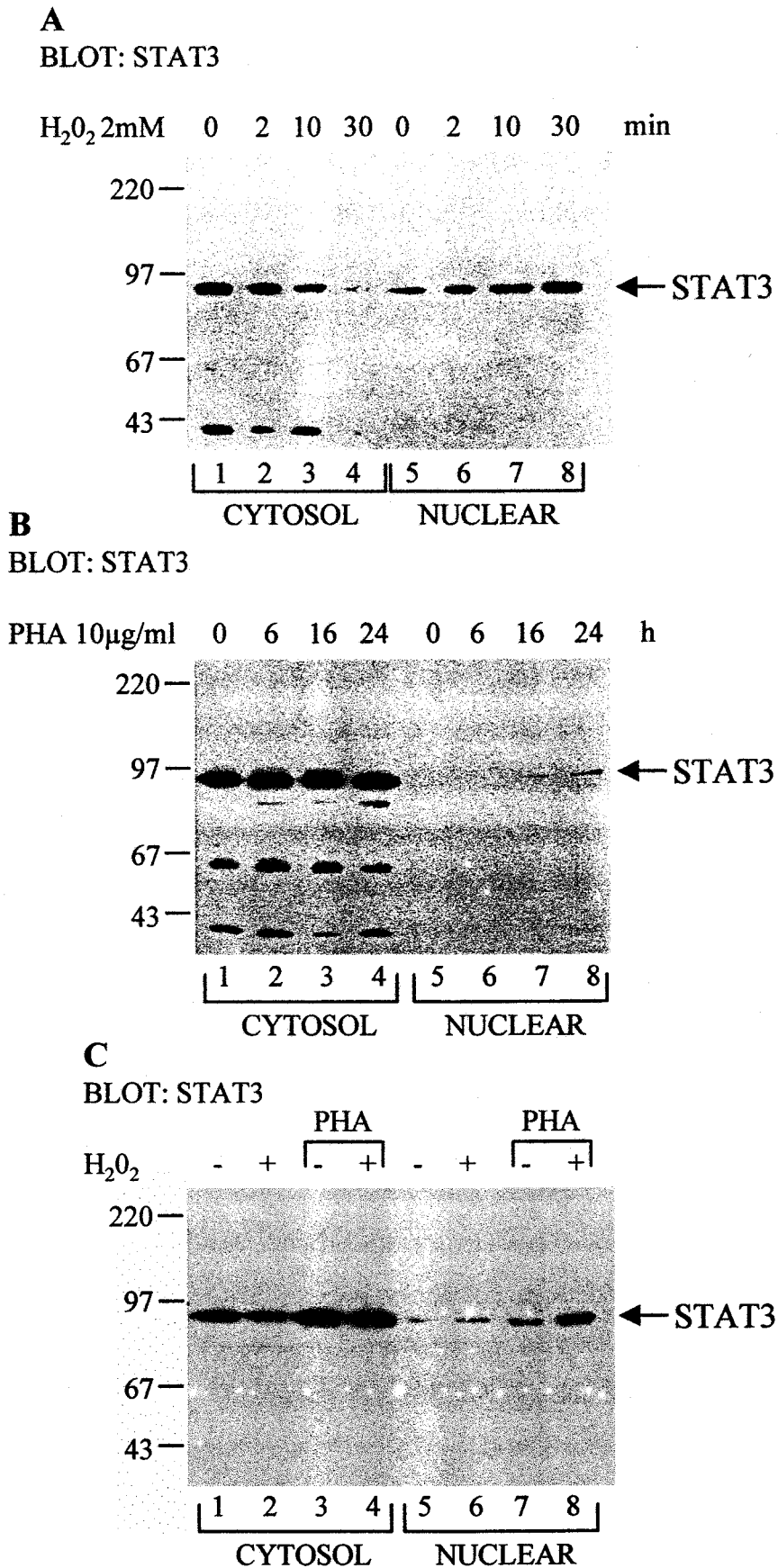
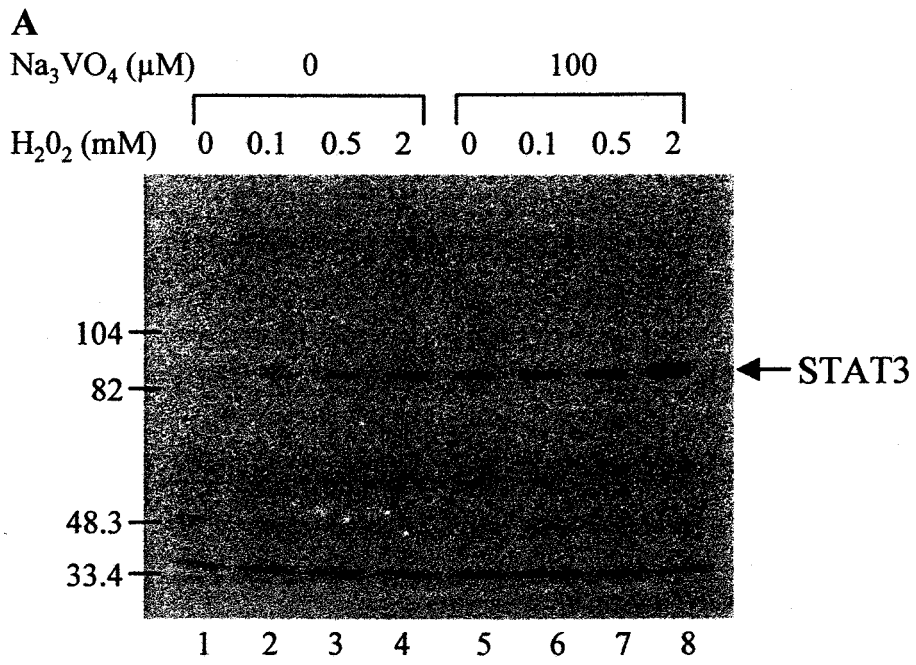


Figure 2.-

Hydrogen peroxide and vanadate act synergistically to induce nuclear translocation of STAT3. It has been previously proposed that the combination of H_2O_2 and orthovanadate potently inhibits PTPase activity (25, 26) and/or synergistically stimulates insulin-dependent PTK activity (38) in T lymphocytes. Also, the mixture of H_2O_2 and sodium orthovanadate promote tyrosine phosphorylation of phospholipase $C\gamma 1$ and to activate $p56^{lck}$ and $p59^{fyn}$ tyrosine kinases (23). These facts have been explained in the light of inhibition of protein tyrosine phosphatase(s) by pervanadate, which originates from vanadate oxidation by H_2O_2 (38). Further experiments were therefore addressed to analyze whether a decrease in intracellular PTPase activity could be implicated in the H_2O_2 -induced STAT3 nuclear translocation effect. Toward this end, human PBL were treated with orthovanadate, alone or in combination with and H_2O_2 , and the nuclear levels of STAT3 were analyzed. Vanadate alone at 100 μM (the maximal dose tested) promoted a slight accumulation of STAT3 in the nucleus (Fig 3A, lane 5), and H_2O_2 alone (Fig 3A, lanes 1-4) induced this STAT3 translocation detectably only at the highest tested concentration (2 mM). However, the combination of vanadate and H_2O_2 markedly stimulated in a synergistic fashion the nuclear translocation of STAT3, enhancing about 6-fold the effect obtained with 2 mM H_2O_2 alone. As shown, at 100 μM vanadate combined with a low dose of H_2O_2 , a nuclear translocation of STAT3 took place (lane 6), whereas at higher concentrations of H_2O_2 an intense nuclear STAT3 signal was observed (lanes 7 and 8).

Effects of phenylarsinine oxide, diamide and genistein on H_2O_2 -induced nuclear translocation of STAT3. Since the above effects of pervanadate could be due to the inhibition of intracellular tyrosine phosphatase(s), experiments were addressed to analyze whether other reagents known to alter the tyrosine phosphorylation status of proteins could influence the nuclear translocation of STAT3. Since the effect of phenylarsinine oxide (PAO) as a PTPase inhibitor in T lymphocytes is well known (39), we decided to test its effect on STAT3 nuclear translocation in human PBL. As shown in Figure 4A, PAO induced a dose-dependent enhancement of STAT3 nuclear translocation, as monitored in nuclear fractions from cells treated with different concentrations of PAO, upon immunoblotting analysis with anti-STAT3 antibodies. It could also be observed that the nuclear levels of this factor reached in the presence of 2 mM H_2O_2 could be mimicked by 50 μM PAO. Furthermore, PAO and H_2O_2 were found to act in a synergistic fashion (Fig. 4B, compare lanes 2 and 4 with 5), which suggests that both molecules could be cooperatively acting as inhibitors of intracellular tyrosine phosphatases. Diamide, a compound with oxidative properties (12, 13), was also shown to stimulate the nuclear



BLOT: STAT3

B

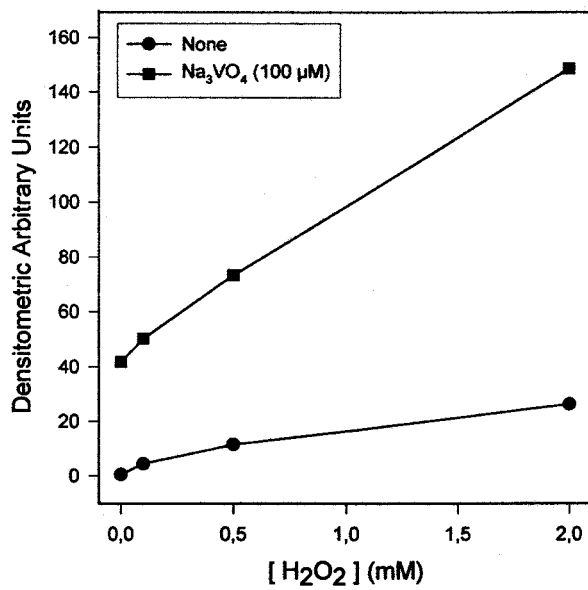


Figure 3.-

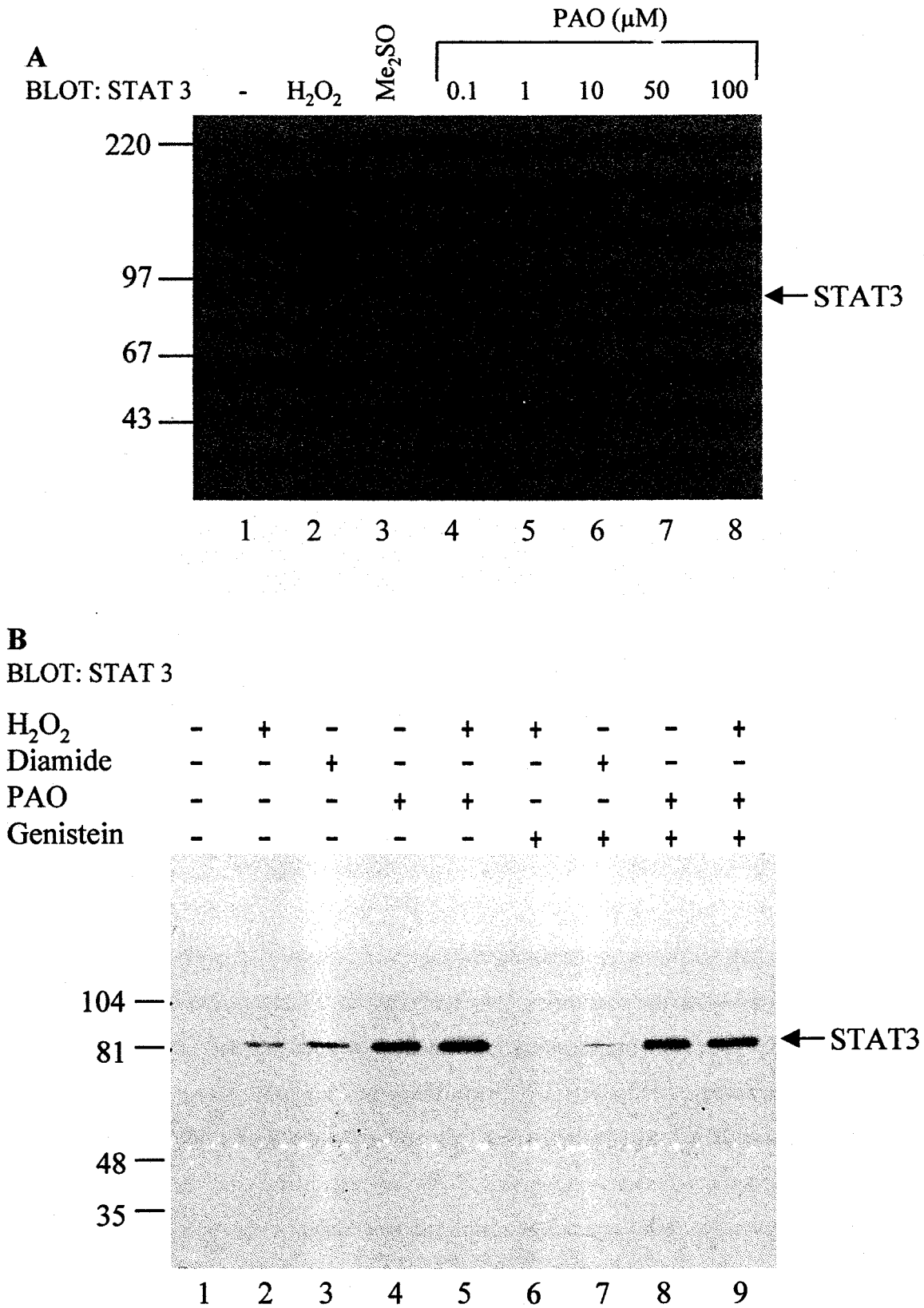


Figure 4.-

translocation of STAT3 (Fig. 4B, lane 3). This drug was reported to induce a marked enhancement of the tyrosine phosphorylation status of several cellular proteins (13, 40), possibly mediated by inhibition of tyrosine phosphatase(s) (13, 37). In an opposite fashion, genistein, an inhibitor of protein tyrosine kinases, produced a partial inhibition of the STAT3 nuclear translocation elicited by H₂O₂ (Fig. 4B, lane 6) or diamide (lane 7). However, genistein was unable to counteract the stimulating action of PAO (lane 8). These results clearly suggest that the nuclear levels of STAT3 are balanced by the opposite actions of intracellular PTKs and PTPases.

Experiments were also addressed to study the specificity of oxidant-induced STAT nuclear translocation. Immunoblotting analyses of PBL nuclear extracts revealed that H₂O₂ treatment induced lightly the nuclear translocation of STAT1 and STAT5B, although to a lesser extent than that observed for STAT3 (Fig. 5). The distinct behavior displayed by these STAT proteins upon cell challenge with H₂O₂ agrees with recent observations regarding their activation by different cytokines and growth factors (41). In this regard, although G-CSF induces tyrosine phosphorylation of STAT1, STAT3, and STAT5B, however STAT5B can be activated by mutant receptors that lack tyrosine residues (41, 42). Moreover efficient STAT3 activation requires additional receptor sequences that include Tyr 704 (42).

Effect of Fe²⁺/Cu²⁺ ions on H₂O₂-promoted STAT3 nuclear translocation. After passive diffusion through the plasma membrane, H₂O₂ can be converted into other active oxygen species, such as O₂⁻ and [•]OH (23). The most likely mode of intracellular [•]OH radical production is via the Fenton chemistry, which involves the reduction of H₂O₂ by ferrous ions according to the reaction (8):



As well, cuprous ions are elemental producers of [•]OH radicals via Fenton reactions (9). We have analyzed whether the chemical species generated from H₂O₂ through Fenton reactions could affect STAT3 nuclear translocation. Figure 6 illustrates that the prior addition of Fe²⁺ and Cu²⁺ ions notably enhanced the H₂O₂-induced nuclear translocation of STAT3 (lane 3). By contrast, the pretreatment of cells with 1,10-phenantroline, a chelator of copper and iron ions resulted in cancellation of the STAT3 nuclear accumulation induced by H₂O₂ (lane 4). These results indicate that the intracellular reduction of H₂O₂ to yield more reactive oxygen species, such as [•]OH, could constitute a more efficient mechanism for the positive action of H₂O₂ on STAT3.

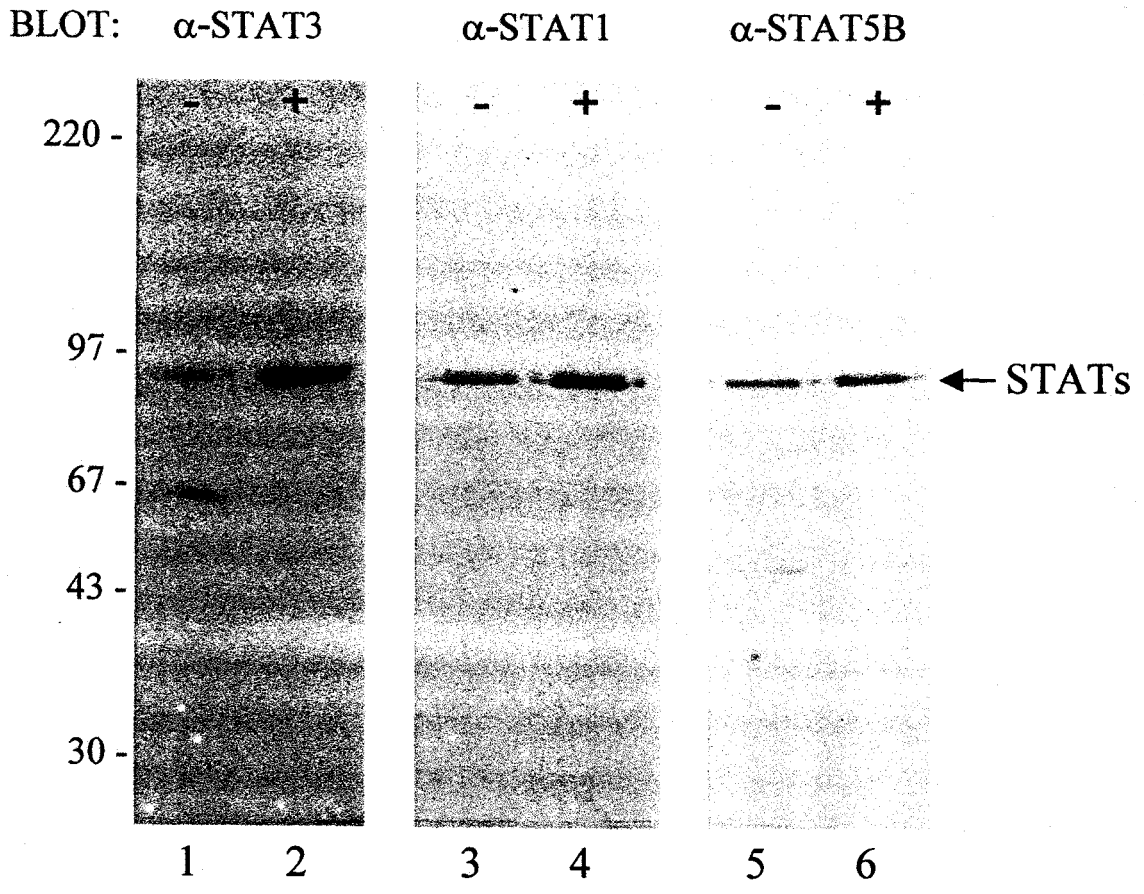


Figure 5.-
97

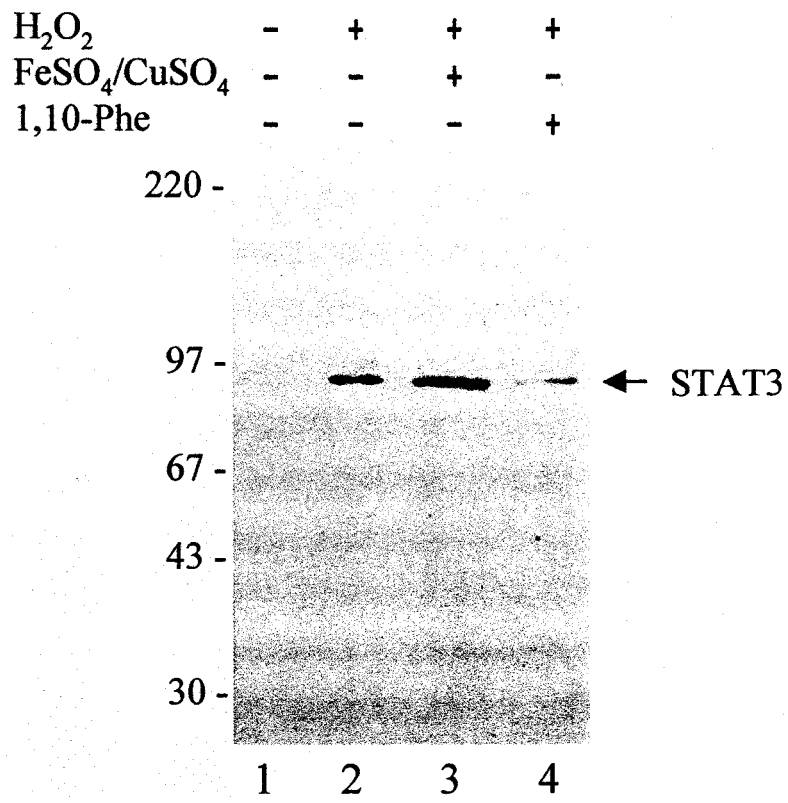


Figure 6.-

Hydrogen peroxide enhances STAT3 DNA binding activity. The enhancement of the ability of nuclear STATs to bind to specific DNA elements in PBL cells upon cell stimulation by oxidizing agents was assessed through gel mobility shift assays using a double-stranded oligonucleotide probe containing a high-affinity target sequence for STAT factors. This binding sequence, named m67, was derived from the *sis*-inducible element (SIE) of the human *c-fos* promoter (43, 44). Nuclear extracts were thus prepared from PBL challenged with orthovanadate, H₂O₂ or both, and incubated with the DIG-labeled SIE m67 oligonucleotide probe. Figure 7A illustrates that H₂O₂ induced a rapid assembly of complexes able to bind to the SIE m67 probe within PBL nuclei (lane 3). The same effect was observed upon vanadate treatment (lane 2), and a cooperative effect was found to take place between vanadate and H₂O₂ (lane 4). As a positive control, we also analyzed the effect of INF- α (18), with the same results (lane 5). The shifted band could be competed by an excess of unlabeled SIE m67 oligonucleotide, thus, it indicates that nuclear factor binding was specific (lane 6). However, and quite intriguingly, we found that treatment with PAO, despite this compound enhanced STAT3 nuclear translocation, cancelled completely nuclear factor binding to the STAT specific sequence, even below basal levels of binding seen in the absence of H₂O₂ (data not shown). We cannot offer any explanation for this fact, although it could be related to the hyperphosphorylation of proteins (e.g. STAT3) found to occur after PAO treatment (38, 45, 46). Figure 7B illustrates that the presence of Fe²⁺/Cu²⁺ in combination with H₂O₂ greatly enhanced the capacity of nuclear factors to bind to the SIE m67 oligonucleotide (Fig 7B, lane 3), and that the addition of 1,10-phenantroline reduced the H₂O₂-induced nuclear factor binding. These results show a clear correlation with the observations described in Figure 6 regarding the nuclear translocation of STAT3.

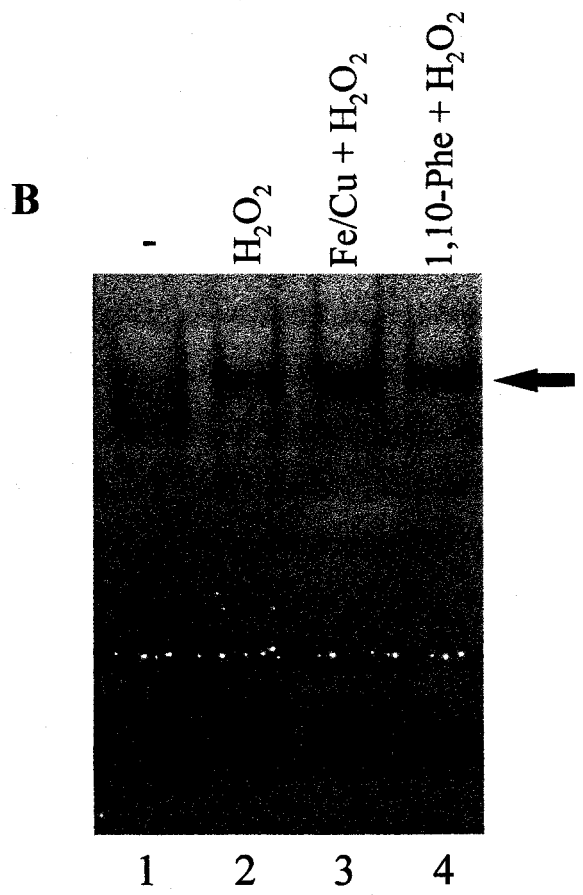
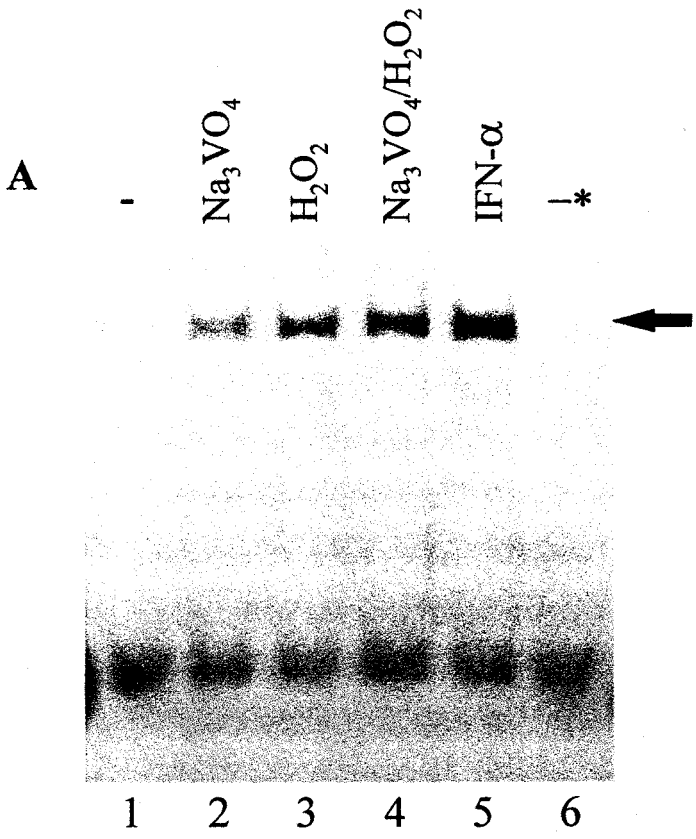


Figure 7.-

DISCUSSION

The intracellular processes that become triggered upon oxidative stress constitute nowadays a focus of extensive research. Very recently, we have described that H_2O_2 and other peroxides are able to inhibit calcineurin activity and to inactivate NF- κ B DNA binding in human neutrophils (36). In contrast, Schreck et al. (2) have provided evidence that peroxides activate NF- κ B in lymphocytes through an undetermined mechanism involving the synthesis of ROI. As well, H_2O_2 has been implicated in the positive modulation of the activity of a number of PTKs whose function is critical for lymphocyte activation (11, 47). An involvement of STAT factors in mediating leukocyte activation elicited by IL-2 has been recently underlined (33, 37, 48). However, the potential role of STAT factors as mediators of peroxide-triggered lymphocyte activation, by acting as target molecules of oxidative processes, has not been previously explored. In this paper, we provide the first evidence that H_2O_2 promotes tyrosine phosphorylation of STAT3 in peripheral blood human lymphocytes, which is followed by its translocation to the nucleus and binding to a specific DNA element.

It is well established that the activation of STAT factors requires their phosphorylation on tyrosine residue(s) (34). To explain the mechanism whereby they become activated by oxidants, two possibilities can be contemplated. First, the alteration of their redox status could directly alter STAT conformation, in such a way that their interaction with cytosolic proteins responsible for nuclear targeting would be enabled. Since the structure of STAT3, and especially of its presumptive redox centers, are not completely understood, this hypothesis requires further investigation. Current state of knowledge makes thus more suggestive a second explanation based on the ability of oxidants to act as inhibitors of tyrosine phosphatases. According to this possibility, STAT3 nuclear translocation would be facilitated or promoted by its increased status of tyrosine phosphorylation, this being the consequence of inhibition by H_2O_2 of the activity of intracellular PTPases (25, 39). In this context, exogenously-added H_2O_2 has been shown to increase protein tyrosine phosphorylation in several cell types, such as lung epithelial and FAO cells (49, 50). As well, H_2O_2 can directly inhibit PTPase activity *in vitro*, and this inhibition can be completely reversed by dithiothreitol (25). All PTPases are known to contain an essential sulfhydryl group at their active site which is susceptible of oxidation because of its unusually low pKa (<5) (51). These observations thus suggest that PTPases may constitute targets for intracellularly generated H_2O_2 , and that their inhibition by oxidants may well lead to activation of number of signaling molecules, such as STAT3, by virtue of their increased phosphotyrosine content. It can be presumed that, since the specific activities of PTPases *in vitro* are 10-1000 times higher than those of PTKs (52), in most cell

types the activation of a receptor tyrosine kinase upon ligand binding may not be sufficient to increase the steady-state level of protein tyrosine phosphorylation, so that concurrent inhibition of PTPases by H_2O_2 and/or derived ROI could additionally be necessary.

The treatment of lymphocytes with vanadium derivatives induces a strong tyrosine phosphorylation of protein kinases of the Erk2 and Syk families, leading to their activation (45). Also, it has been reported that H_2O_2 treatment of blood T cells elicits tyrosine phosphorylation of Lck kinases, and that a much stronger response on tyrosine phosphorylation of multiple cellular proteins is observed following treatment with the sulfhydryl oxidizing agent diamide (12). Furthermore, the Src kinases, such as p56^{lck} and p59^{fyn} in T cells, were transiently activated by H_2O_2 in combination with vanadate (23). It is interesting to note that vanadate by itself exerts a limited effect on the tyrosine phosphorylation of STAT3, as shown in this work. However, upon the simultaneous addition of H_2O_2 and vanadate, the resulting pervanadate enhanced several fold the effects exerted separately by these two compounds. It is of interest that pervanadate administered as such induces the tyrosine phosphorylation and nuclear translocation of a number of STAT proteins in liver cells, including STAT3 (53). Also, pervanadate has been shown to induce T-cell activation and transcription of *c-fos* (54), the activation of IFN γ - and prolactin-dependent transcription factors and the activation of JAK kinases in epithelial cells (55, 56). The possibility that the H_2O_2 and pervanadate effects on nuclear translocation of STAT3 could be ascribed to inhibition of tyrosine phosphatases is reinforced by experiments using PAO and diamide, two compounds able to act as PTPase inhibitors. As shown in this work, these drugs elicited an enhancement of the H_2O_2 action, whereas genistein, an inhibitor of protein tyrosine kinases, antagonized the H_2O_2 and diamide effects. Genistein did not, however, counteract the increase in STAT3 phosphorylation promoted by PAO, possibly due to an unbalance between the phosphorylation and dephosphorylation of STAT3 at the studies doses of both agents. Taken together, present results are in line with previous reports demonstrating that H_2O_2 acts an inhibitor of tyrosine phosphatase(s) (10-12), leading in turn to enhanced STAT3 tyrosine phosphorylation. The complexity of this phenomenon is evidenced, however, by the recent demonstration that phosphorylation of STAT3 on the residue Ser-727 is also required for competent STAT3 transcriptional activation (33, 34). It may thus be speculated that H_2O_2 could as well increase a serine kinase activity necessary for the activation of STAT3.

It is noteworthy that the enhancing effect of H_2O_2 on STAT3 nuclear translocation seems rather specific, since neither STAT1 nor STAT5B underwent migration to the nucleus under oxidative conditions, as shown in this paper. However, which is the active oxygen species

directly responsible for the observed H_2O_2 effects on STAT3 activation is currently unknown. Exogenously H_2O_2 added is rapidly converted into other chemical species, and in this context we present evidence, using a combination of Fe^{2+} and Cu^{2+} ions, that $\cdot\text{OH}$ radicals generated through Fenton reactions could fulfill such a role. In fact, in the presence of these metal ions, an enhanced STAT3 nuclear translocation and DNA binding was found in cells exposed to H_2O_2 . Accordingly, it is clear that H_2O_2 is not the sole species implicated in the nuclear translocation of STAT3. In line with a recent paper, showing that 1,10-phenantroline, a chelator of iron and copper ions, completely prevented DNA strand breakage induced by H_2O_2 (57), we have found that this compound was able to cancel STAT3 nuclear translocation induced by H_2O_2 . These results speak in favor of the possibility that intracellular $\text{Fe}^{2+}/\text{Cu}^{2+}$ ions could play a role as intermediates under H_2O_2 -induced oxidative stress conditions.

In summary, present observations support a role for oxidants in the regulation of STAT3 transcription factor activity *in vivo* in human lymphocytes. In keeping with extensive work done elsewhere, our results favor the hypothesis that H_2O_2 by itself and/or derived oxidative species generated through Fenton reactions, can modulate the STAT3 tyrosine phosphorylation status, and hence promote its translocation to the nucleus and the formation of bound complexes at specific DNA promoter elements.

Abbreviations

The abbreviations used are: ROI, reactive oxygen intermediates; H₂O₂, hydrogen peroxide; O₂⁻, superoxide anion; PAO, phenylarsine oxide; STAT, signal transducers and activators of transcription; JAK, Janus kinase; NF-κB, nuclear factor kappaB; PTK, protein tyrosine kinases; PTPase, protein tyrosine phosphatases; PMSF, phenylmethylsulphonyl fluoride; PHA, phytohemagglutinin; PBL, peripheral blood lymphocytes; SDS, sodium dodecyl sulfate; SDS-PAGE, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; DIG, digoxigenin.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. O'Shea for kindly providing the anti-STAT5B antiserum. This work was supported by Fondo Investigaciones Sanitarias (FIS), Grants 94/1484 and 97/1289 (to F. S.) and 97/207 (to J. C.), a Grant from the Foundation of SEAIC of Spain (to J. M.), a Grant SAF 96/0205 from the Dirección General Investigación Científica Técnica (to F. J. B.), a Grant from Consejería Salud (Junta de Andalucía) (to F. S.), and a Grant from Innogenetis Diagnostica y Terapeutica S.A. from Spain.

REFERENCES

- 1.- Schreck, R., and Baeuerle, P. A. (1991) *Trends Cell Biol.* **1**, 39-42
- 2.- Schreck, R., Rieber, P., and Baeuerle, P. A. (1991) *EMBO J.* **10**, 2247-2258
- 3.- Burmell, J. H., Burkhardt, A. L., Bolen, B. J., and Grinstein, S. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 1455-1461
- 4.- Curmutte, J. T. (1993) *Clin. Immunol. Immunopathol.* **67**, S2-15
- 5.- Flescher, E., Ledbetter, J. A., Schieven, G. L., Vela-Roch, N., Fossum, D., Dang, H., Ogawa, N., and Talal, N. (1994) *J. Immunol.* **153**, 4880-4889
- 6.- Cerutti, P. A. (1985) *Science* **227**, 375-381
- 7.- Cross, A. R., and Jones, O. T. G. (1989) in *The Neutrophil: Cellular Biochemistry and Physiology* (Hallet, M. B., ed) pp. 97-111, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL
- 8.- Halliwell, B., and Gutteridge, J. M.C. (1992) *FEBS Lett.* **307**, 108-112
- 9.- Gunther, M. R., Hanna, P. M., Mason, R. P., and Cohen, M. S., (1995) *Arch. Biochem. Biophys.* **316**, 515-522
- 10.- Schieven, G. L., Kirihara, J. M., Burg, D. L., Geahlen, R. L., and Ledbetter, J. A. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 16688-16692
- 11.- Schieven, G. L., Mittler, R. S., Nadler, S. G., Kirihara, J. M., Bolen, J. B., Kanner, S. B., and Ledbetter, J. A. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 20718-20726
- 12.- Nakamura, K., Hori, T., Sato, N., Sugie, K., Kawakami, T., and Yodoi, J. (1993) *Oncogene* **8**, 3133-3139
- 13.- Bauskin, A. R., Alkalay, I., and Ben-Neriah, Y. (1991) *Cell* **66**, 685-696
- 14.- Bernier, M., Laird, D. M., and Lane, M. D. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 1844-1848.
- 15.- Lander, H. M., Levine, D. M., and Novogrodsky, A. (1992) *Cell. Immunol.* **145**, 146-155
- 16.- Oetken, C., von Willebrand, M., Autero, M., Ruutu, T., and Andersson, L. C. (1992) *Eur. J. Haematol.* **49**, 208-214
- 17.- Ihle J. N., Witthuhn, B. A., Quelle, F. W., Yamamoto, K., and Silvennoinen, O. (1995) *Annu. Rev. Immunol.* **13**, 369-398
- 18.- Schindler, C., and Darnell, J. E. Jr. (1995) *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 621-651
- 19.- Ihle, J. N. (1996) *Cell* **84**, 331-334
- 20.- Watanabe, L., and Arai, K. (1996) *Curr. Opin. Genet. Dev.* **6**, 587-596
- 21.- Darnell, J. E., Jr. (1997) *Science* **277**, 1630-1635
- 22.- Zhong, Z., Wen, Z., and Darnell, J. E., Jr. (1994) *Science* **264**, 95-98

- 23.- Schieven, G., Kirihara, J., Myers, D., Ledbetter, J., and Ucken, F. (1993) *Blood* **82**, 1212-1220
- 24.- Beiqing, L., Chem, M., and Whisler, R. L. (1996) *J. Immunol.* **157**, 160-169
- 25.- Hecht, D., and Zick, Y. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **188**, 773-779
- 26.- Zor, U., Ferber, E., Gergely, P., Szücs, K., Dombradi, V., and Goldman, R. (1993) *Biochem. J.* **295**, 879-888
- 27.- Fialkow, L., Chan, C. K., Rotin, D., Grinstein, S., and Downey, G. P. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 31234-31242
- 28.- Darnell, J. E., Jr., Kerr, I. M., and Stark, G. R. (1994) *Science*, **264**, 1415-1421
- 29.- Taniguchi, T. (1995) *Science* **268**, 251-255
- 30.- Ihle, J. N. (1995) *Nature (London)* **377**, 591-594
- 31.- Ivashkiv, L. B. (1995) *Immunity* **3**, 1-4
- 32.- Zhang, X., Blenis, J., Li, H.-C., Schindler, C., and Chen-Kiang, S. (1995) *Science* **267**, 1990-1994
- 33.- Ng, J. and Cantrell, D. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 24542-24549
- 34.- Wen, Z., Zhong, Z., and Darnell, J. E., Jr. (1995) *Cell* **82**, 241-250
- 35.- Coligan, J. E., Kruisbeek, A. M., Margulies, D. H., Shevach, E. M., and Strober, W. (Eds.), *Current Protocols in Immunology*. Greene Publishing Associates, New York (1993). P. 8.0.1
- 36.- Carballo, M., Márquez, G., Conde, M., Martín-Nieto, J., Monteseirín, J. Conde, J., Pintado, E., and Sobrino, F. (1999) *J. Biol. Chem.* **In press**.
- 37.- Johnston, J. A., Bacon, C. M., Finbloom, D. S., Rees, R. C., Kaplan, D., Shibuya, L., Ortaldo, J. R., Gupta, S., Chen, Y. Q., Giri, J. D., and O'Shea, J. J. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 8705-8709
- 38.- O'Shea, J. J., McVicar, D. W., Bailey, T. L., Burns, C., and Smyth, M. J. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 10306-10310
- 39.- Garcia-Morales, P., Minami, Y., Luong, E., Klausner, R.D., and Samelson, L. E. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 9255-9259
- 40.- Fialkow, L., Chan, C. K., Grinstein, S., and Downey, G. P. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 17131-17137
- 41.- Tian S.-S. Tapley, P., Sincich, C., Stein, R. B., Rosen, J., and Lamb, P. (1996) *Blood* **12**, 4435-4444
- 42.- De Koning, J. P., Dong, F., Smith, L., Schelen, A. M., Barge, R. M. Y., van der Plas, D. C., Hoefsloot, L. H., Lowenberg, B., and Touw, I. P. (1996) *Blood* **87**, 1335-1342

- 43.- Sadowski, H. B., Shuai, K., Darnell, J. E., Jr., and Gilman, M. Z. (1993) *Science* **261**, 1739-1744
- 44.- Wagner, B. J., Hayes, T. E., Hoban, C. J., and Cochran, B. H. (1990) *EMBO J.* **9**, 4477-4484
- 45.- Krejsa, C. M., Nadler, S. G., Esselstyn, J. M., Kavanagh, T. J., Ledbetter, J. A., Schieven, G. L. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 11541-11549
- 46.- Singh, S., and Aggarwal, B. B. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 10631-10639
- 47.- Lahdenpohja, N., Savinainen, K., and Hurme, M. (1998) *J. Immunol.* **160**, 1354-1358
- 48.- Brunn, G. J., Falls, E. L., Nilson, A. E., and Abraham, R. T. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 11628-11635
- 49.- Goldkorn, T., Balaban, N., Matsukuma, K., Chea, V., Gould, R., Last, J., Chan, C., and Chavez, C. (1998) *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **19**, 786-798
- 50.- Heffetz, D., Bushkin, I., Dror, R., and Zick, Y. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 2896-2902
- 51.- Stone, R. L., and Dixon, J. E. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 31323-31326
- 52.- Fischer, E. H., Charbonneau, H., and Tonks, N. K. (1991) *Science* **253**, 401-406
- 53.- Ruff, S. J., Chem, K., and Cohen, S. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 1263-1267
- 54.- Imbert, V., Peyron, J. F., Farahi, F. D., Mari, B., Auberger, P., and Rossi, B. (1994) *Biochem. J.* **297**, 163-173
- 55.- Lamb, P., Haslam, J., Kessler, L., Seidel, H. M., Stein, R. B., and Rosen, J. (1994) *J. Interferon Res.* **14**, 365-373
- 56.- Tourkine, N., Schindler, C., Larose, M., and Houdebine, L. M. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 20952-20961
- 57.- Jornot, L., Petersen, H., and Junod, A. F. (1998) *Biochem. J.* **335**, 85-94

FIGURE LEGENDS

Figure 1. H₂O₂ induces tyrosine phosphorylation of STAT3 in human lymphocytes. A, PBL were left untreated (-) or were treated (+) with 2 mM H₂O₂ for 2 min in RPMI 1640 medium at 37°C. The cells were then lysed in buffer B, and the supernatants obtained after centrifugation were incubated with anti-STAT3 antibodies followed by precipitation of the immune complexes with protein A-Sepharose beads. The bound proteins were resolved by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and immunoblotted sequentially with anti-phosphotyrosine antibodies (upper panel) or, after stripping, with anti-STAT3 antibodies (lower panel). B, PBL were treated and lysed as in A, and immunoprecipitation was carried out with anti-phosphotyrosine antibodies cross-linked to protein A-agarose. Tyrosine phosphorylation was detected by immunoblotting with anti-phosphotyrosine antibodies and, after blot stripping, STAT3 protein levels were analyzed by immunoblotting with anti-STAT3 antibodies. The size of molecular weight markers, expressed in kDa, is indicated at the left of the panel. Arrows in A and B show the position of migration of STAT3.

Figure 2. H₂O₂ and PHA induce STAT3 translocation from the cytosol to the nucleus in human lymphocytes. PBL were treated with 2 mM H₂O₂ (A) or 10 µg/ml PHA (B) for the indicated times under culture conditions. The cells were then lysed in buffer A, and the cytoplasmic and nuclear fractions were obtained as described in "Materials and Methods". The proteins were resolved by SDS-PAGE and subject to immunoblotting analysis with anti-STAT3 antibodies. C, PBL were treated or not with 10 µg/ml PHA for 24 h and then were treated in the presence or absence of 2 mM H₂O₂ for 15 min, as indicated by the "-" and "+" symbols. The cells were then lysed, and cytoplasmic and nuclear fractions were analyzed by immunoblotting with anti-STAT3 antibodies. The size of molecular weight markers, expressed in kDa, is indicated at the left of the three panels. Arrows indicate the position of migration of STAT3.

Figure 3. Orthovanadate and H₂O₂ cooperatively induce STAT3 nuclear translocation. A, PBL were treated with several doses of H₂O₂ in the presence or absence of 100 µM sodium orthovanadate, for 15 min at 37°C. The cells were then lysed in buffer A, and nuclear fractions obtained as described in "Materials and Methods" were resolved by SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting with anti-STAT3 antibodies. The arrow indicates the STAT3 band. The size of molecular weight markers, expressed in kDa, is indicated at the left of the panel. B, STAT3

nuclear levels obtained from densitometric analysis of panel A are plotted versus the concentration of H_2O_2 .

Figure 4. PAO induces nuclear translocation of STAT 3. A, PBL were left untreated (lane 1), or were treated for 15 min with 2 mM H_2O_2 (lane 2), with 1 μ l of Me_2SO (lane 3), or with the indicated doses of PAO (lanes 4-8). The cells were then lysed in buffer A, and nuclear fractions resolved by SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting with anti-STAT3 antibodies. B, PBL were subjected to the indicated treatments. PBL were left untreated (lanes 1-5) or treated (lanes 6-9) with genistein (100 μ M) for 30 min, followed by 2 mM H_2O_2 (lanes 2 and 6), 1 mM diamide (lanes 3 and 7), or 100 μ M PAO (lanes 4 and 8) for 15 min. In lanes 5 and 9, H_2O_2 and PAO were added together at the same times. Nuclear fractions were analyzed by immunoblotting with anti-STAT3 antibodies. The arrows indicate the STAT3 band, and the size of molecular weight markers, expressed in kDa, is indicated at the left of both panels.

Figure 5. H_2O_2 induces nuclear translocation of STAT3, but not of STAT1 or STAT5B. PBL were left untreated (-) or were treated (+) with 2 mM H_2O_2 for 15 min, and nuclear fraction samples were resolved by SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting with anti-STAT3, anti-STAT1 or anti-STAT5B antibodies, as indicated.

Figure 6. Pretreatment with $FeSO_4/CuSO_4$ or 1,10-phenantroline modulates STAT3 nuclear translocation induced by H_2O_2 . PBL were left untreated (lane 1), were treated with 2 mM H_2O_2 (lane 2) for 15 min, or were pretreated for 15 min with 100 μ M $FeSO_4/100 \mu$ M $CuSO_4$ (lane 3) or 20 μ M 1,10-phenantroline (lane 4), and then exposed to 2 mM H_2O_2 for further 15 min. Nuclear fractions were resolved by SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting with anti-STAT3 antibodies

Figure 7. H_2O_2 enhances STAT3 DNA binding activity. A, PBL were left untreated (lane 1) or were treated with 100 μ M Na_3VO_4 (lane 2), 2 mM H_2O_2 (lane 3), both H_2O_2 and Na_3VO_4 (lane 4), or 1000 U/ml $INF-\alpha$ (lane 5) for 10 min. The cells were then lysed in buffer C, and nuclear extracts were prepared as described in "Materials and Methods". DNA binding to the DIG-labeled SIE m67 oligonucleotide probe was assessed by gel mobility shift assays. The retarded band is indicated by an arrow. Where indicated by an asterisk (lane 6), binding reactions were

performed in the presence of a 100-fold molar excess of unlabeled oligonucleotide in the reaction performed with nuclear extracts from H₂O₂-treated human lymphocytes. B, PBL were untreated (lane 1) or treated with 2 mM H₂O₂, alone (lane 2) or in combination with 100 μM FeSO₄/100 μM CuSO₄ (lane 3) or 20 μM 1,10-phenantroline (lane 4) for 15 min. Nuclear extracts were used for gel mobility shift assays as indicated for panel A.

DISCUSIÓN

En esta tesis hemos analizado como se ven afectados en respuesta al estrés oxidativo, diferentes complejos proteicos. Se han estudiado diferentes vías de transducción de señales, tratando de profundizar sobre algunos mecanismos que no se conocían. En primer lugar, todas las células producen radicales libres de oxígeno y a veces son producidos en cantidad suficiente para actuar como agentes citotóxicos. Uno de estos radicales libres, el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), es producido por la NADPH-oxidasa en respuesta a estímulos externos. Este estado se conoce como estallido respiratorio (29), porque es acompañado de un aumento del consumo de O_2 por la célula. Asimismo, todas las células poseen mecanismos detoxificadores (SOD, catalasa y glutatión peroxidasa, principalmente) que inactivan o convierten a estos radicales libres en especies menos activas (223). En segundo lugar, se ha descrito que la activación del factor de transcripción NF- κ B también es dependiente de los radicales libres de oxígeno (ROI), especialmente del H_2O_2 . El grupo de Baeuerle (10, 133), es el máximo exponente de la hipótesis que postula al H_2O_2 como segundo mensajero, conectando señales externas con cambios en el núcleo. Un punto débil de esta teoría es que no se conoce específicamente la especie química de los ROI que separa y degrada al I κ B del NF- κ B, ni su translocación al núcleo. Se ha supuesto que los ROI proceden tanto de la NADPH-oxidasa, por estimulación con linfoquinas u otros agentes, como del propio metabolismo de la mitocondria. Un posible abordaje experimental, que simula el aumento intracelular de los ROI es la adición de H_2O_2 exógena. Otra cuestión es si esta especie química actúa directamente sobre el NF- κ B, o bien lo hace a través de un intermediario, y si esto es una especificidad celular universal. De otra parte, dado el papel central de la calcineurina (CN) en la regulación de factores específicos de transcripción tan importantes como el NF-AT y el NF- κ B, hemos también analizado el efecto que los ROI pueden tener sobre este enzima. En tercer lugar, las citoquinas, hormonas y factores de crecimiento regulan muchas vías de señalización dentro de la célula. Los receptores inician señales dirigidas tanto a los compartimentos citosólicos como a los nucleares. Muchas de estas señales nucleares culminan en la inducción de nuevos genes. La capacidad de una de estas citoquinas, como son los interferones, ha permitido la identificación de una nueva vía de transducción de señales en linfocitos, la vía de las JAK-STAT. Esta vía también se ve afectada por los ROI producidos por neutrófilos y macrófagos. Pasamos a discutir ahora por separado cada uno de los puntos señalados.

1.- Regulación de la producción de anión superóxido por la NADPH-oxidasa de neutrófilos humanos, tratados con sustancias anticancerígenas.

En un primer lugar, presentamos evidencias de que un nuevo complejo, Ru-PDTA derivado de rutenio y un agente quelante, PDTA (Fig. 12), son capaces de estimular la producción de $O_2^{\cdot -}$ en neutrófilos humanos. Esta estimulación es específica del complejo, ya que ni el rutenio ni el PDTA por separado, tienen efecto.

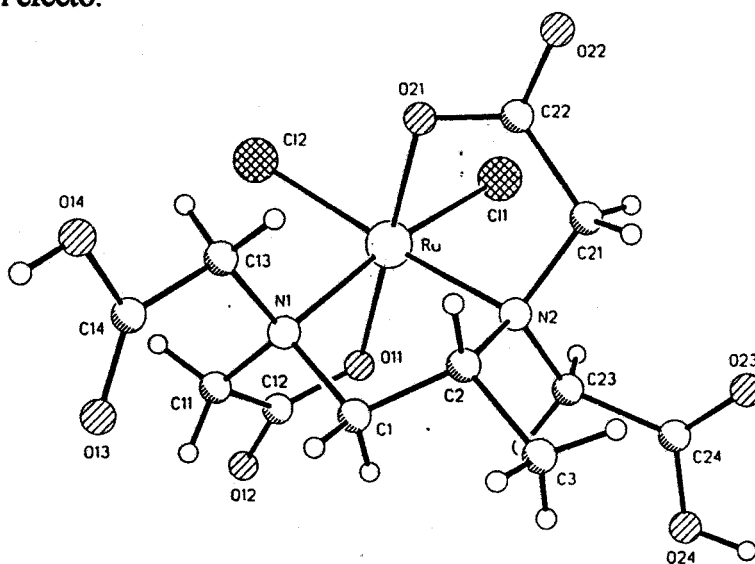


Figura 12. Estructura del complejo Ru-PDTA



Datos experimentales, sugieren que el complejo actúa como un verdadero estimulador de la NADPH-oxidasa. Primero, los mecanismos de activación parecen estar asociados con la translocación de las proteínas citosólicas $p47^{phox}$ y $p67^{phox}$ del citosol a la membrana plasmática, ya que el ensamblaje de los componentes de la NADPH-oxidasa es un fenómeno bien establecido por otros estímulos ya definidos del enzima (224, 225). También, la importancia de estas dos proteínas queda reflejada por las infecciones recurrentes y graves que padecen los enfermos con granulomatosis crónica (CGD), donde $p47^{phox}$ y $p67^{phox}$ están mutadas (57-59). Segundo, la total inhibición de la actividad NADPH-oxidasa, dependiente del complejo Ru-PDTA por estaurosporina, sugiere la participación de proteína quinasa C, igual que otros estímulos. También se detectó una parcial insensibilidad del complejo Ru-PDTA a la inhibición por DPI, esto podría ser debido a los requerimientos de un ambiente reducido que el DPI necesita para actuar, como sugieren otros autores (226). Tercero, el complejo Ru-PDTA provoca la fosforilación en residuos de tirosina de varias proteínas, con un patrón de fosforilación muy similar a los descritos por otros autores (227-230). Además, el corto tiempo requerido para producir una respuesta a Ru-PDTA, sugiere que los efectos no específicos o citotóxicos son improbables. La estimulación del estallido

respiratorio llevado a cabo por el complejo Ru-PDTA, parece ser independiente de los niveles de AMP cíclico, ya que ni el dibutil AMP cíclico ni la toxina colérica (que aumentan los niveles de AMP cíclico), alteran la producción de $O_2^{\cdot-}$.

Nuestros resultados sobre la estimulación del estallido respiratorio por el complejo Ru-PDTA, proporcionan un modelo hipotético para explicar las propiedades antitumorales del compuesto. Estudios morfológicos muestran que las células fagocíticas, están presentes en los nódulos tumorales y este mecanismo de defensa ha sido observado en diferentes tipos de tumores (231, 232). Por otro lado, sustancias que disminuyen la función del macrófago, aumentan la susceptibilidad del huésped a la neoplasia (233). Además, el rechazo del tumor inducido por la IL-4 (231) o IL-13 (232), está mediado por las células fagocíticas del tipo de eosinófilos, neutrófilos y macrófagos, los cuales penetran en la masa tumoral. Así la muerte de las células tumorales, provocada por el complejo Ru-PDTA, podría ser debido al infiltrado de neutrófilos y otras células fagocíticas. Estas células, localizadas cerca de los nódulos tumorales son activadas por el complejo Ru-PDTA para producir grandes cantidades de radicales libres (ej. $O_2^{\cdot-}$), dañando así las células del tumor. Se ha demostrado que otro agente antineoplásico, un dipéptido análogo al muramilo, aumenta la actividad citotóxica en células tumorales, a través de la síntesis de $O_2^{\cdot-}$ por neutrófilos (234). Aunque el $O_2^{\cdot-}$ y otros intermediarios reactivos de oxígeno, sintetizados por células fagocíticas (235), han sido considerados tradicionalmente como potentes agentes microbicidas, la complejidad de este fenómeno es hoy día bien reconocida. La especificidad de una respuesta mediada por radicales libre de oxígeno, es probablemente dependiente del estado de activación de la célula individual, así como de la interferencia e integración con otros posibles eventos (236).

2. Papel de los peróxidos en la modulación de la actividad calcineurina de neutrófilos humanos. La inactivación del NF- κ B por H₂O₂ está en concordancia con la inactivación de la calcineurina.

Muy pocos trabajos hay publicados sobre la CN de neutrófilos y éstos sólo versan de pruebas indirectas de su presencia en estas células. Todos ellos tratan de la movilidad de los neutrófilos sobre la vitronectina y su inhibición por CsA y FK 506 (237-240). Una característica esencial de este enzima, parece ser su inhibición por la CsA. Nuestro grupo ha demostrado previamente, que la producción de O₂⁻ por macrófagos se encuentra inhibida por la CsA (241). Sin embargo, la activación de la NADPH-oxidasa de neutrófilos no se ve afectada por la presencia del inmunosupresor (242). La explicación de esta diferencia entre células es difícil, pero se podría sugerir que es debida al diferente grado de activación del enzima en ambas células, es decir, macrófagos y neutrófilos. Por el contrario, bien es sabido que la CsA y el FK 506, son inmunosupresores de uso clínico en el transplante de órganos por su carácter no citotóxico y específico para las células linfoides (161, 163-167, 243). Su mecanismo de acción ha comenzado a aclararse a partir de los trabajos de los grupos de Fruman, Crabtree, Scheiber, O'keefe, y O'Neil (163, 165, 167, 244). Estos inmunosupresores, atraviesan la membrana e interaccionan con proteínas citoplasmáticas, llamadas inmunofilinas. Estos complejos, ciclosporina-ciclofilina y FK 506-FKBP12, inhiben la actividad CN. La CN se convierte en un enzima clave, ya que actúa sobre factores de transcripción NF-AT y NF- κ B, que regulan la formación de mensajeros de diferentes interleuquinas (ej. IL-2) (17, 164, 244). También se ha demostrado, que la producción de TNF- α , inducida por PKC, así como la síntesis de IL-2R α y la activación del NF- κ B, están bajo el control de la CN ya que la CsA bloquea estos procesos (245).

Nosotros hemos analizado la presencia de CN en neutrófilos, usando un péptido sintético correspondiente al sitio de fosforilación de la subunidad RII de la proteína quinasa dependiente de AMP cíclico. Lisados de neutrófilos desfosforilan este sustrato dependiendo tanto de la concentración del enzima como del tiempo de incubación. La actividad CN en neutrófilos es insensible a ácido okadaico, mientras que otras fosfatasas (ej. 1A y 2A) son sensibles a este inhibidor (246). En presencia de ácido okadaico, la actividad CN de lisados de neutrófilos es tanto dependiente de Ca²⁺ como sensible a la inhibición por trifluoroperazina, un inhibidor de la calmodulina.

Además, nosotros presentamos datos de que los ya bien conocidos inmunosupresores e inhibidores de la actividad CN en linfocitos, CsA y FK 506 (161, 163, 164, 167), también inhiben

esta actividad CN de neutrófilos. Esta bien aceptado que la CN juega un importante papel como un principal componente de la vía de señalización del Ca^{2+} en células T, actuando como puente entre drogas inmunosupresoras (ej. CsA y FK 506) y algunos factores de transcripción (ej. NF-AT y NF- κ B) (161, 163, 164, 167, 244, 247) (Fig. 13).

Los mecanismos por los que la CN activa al NF-AT son complejos. Datos recientes, muestran que la CN forma un complejo con el NF-AT4 citosólico (una isoforma del NF-AT), que es transportado al núcleo, donde la CN continua desfosforilándolo (248). Por otro lado, el importante papel de los ROI en regulación de algunos factores de transcripción, principalmente NF- κ B, es acentuado por su activación en respuesta a la adición de H_2O_2 (42), aunque se duda que ello represente un fenómeno universal (249-252). También se ha señalado una relación inversa entre ROI y NF-AT, ya que bajos niveles de H_2O_2 pueden suprimir la activación transcripcional del NF-AT y la expresión del ARNm de la IL-2 (253). Estos estudios indican que la CN es un componente clave de la cascada de transducción de señales de las células T y que señales oxidativas pueden regular positivamente o negativamente la activación de factores de transcripción (132, 254). Sin embargo falta un profundo conocimiento de los mecanismos moleculares que conecten ambos componentes (ej. CN y oxidantes) (Fig. 14).

Nosotros describimos que neutrófilos humanos tratados con H_2O_2 o pV(phen), tienen una actividad CN inhibida, y que el efecto del H_2O_2 requiere la previa inhibición de la actividad catalasa. Sólo cuando la catalasa es inhibida con aminotriazole, se observa una clara disminución de la actividad CN en presencia de H_2O_2 exógena. Como se esperaba, hemos observado que la previa incubación de la CN con el antioxidante PDTC cancela parcialmente la inhibición del H_2O_2 .

En un primer empeño para averiguar las consecuencias funcionales de la inhibición de la CN por el H_2O_2 , nosotros dirigimos nuestra atención sobre el factor de transcripción NF-AT como un potencial blanco. Sin embargo, fuimos incapaces de encontrar NF-AT unido a ADN en extractos nucleares de neutrófilos. Este hecho concuerda con previos resultados de análisis de incubación con anticuerpos, que señalan la ausencia de proteínas NF-AT en neutrófilos (255). Los siguientes experimentos, fueron por tanto dirigidos a analizar si la inactivación de la CN dependiente de H_2O_2 , podría afectar la activación del NF- κ B. Resultados conflictivos han sido publicados sobre la posible presencia de NF- κ B en neutrófilos humanos. Browning y *col.* (256) no observan activación de NF- κ B en estas células. Sin embargo Cassatella y *col.* (257) describen la presencia de subunidades del NF- κ B, así como la existencia de NF- κ B unido a ADN en neutrófilos humanos. Nosotros hemos

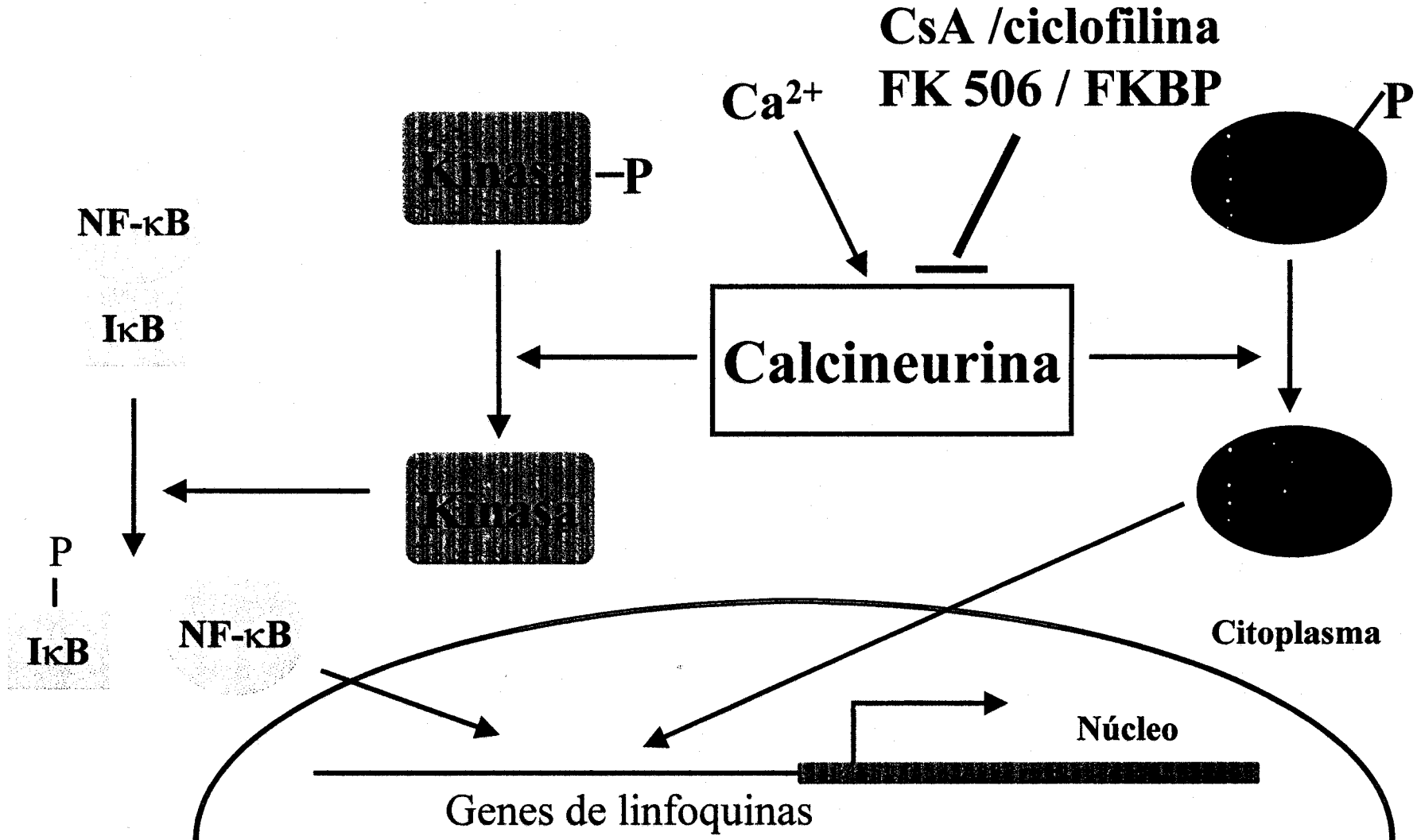
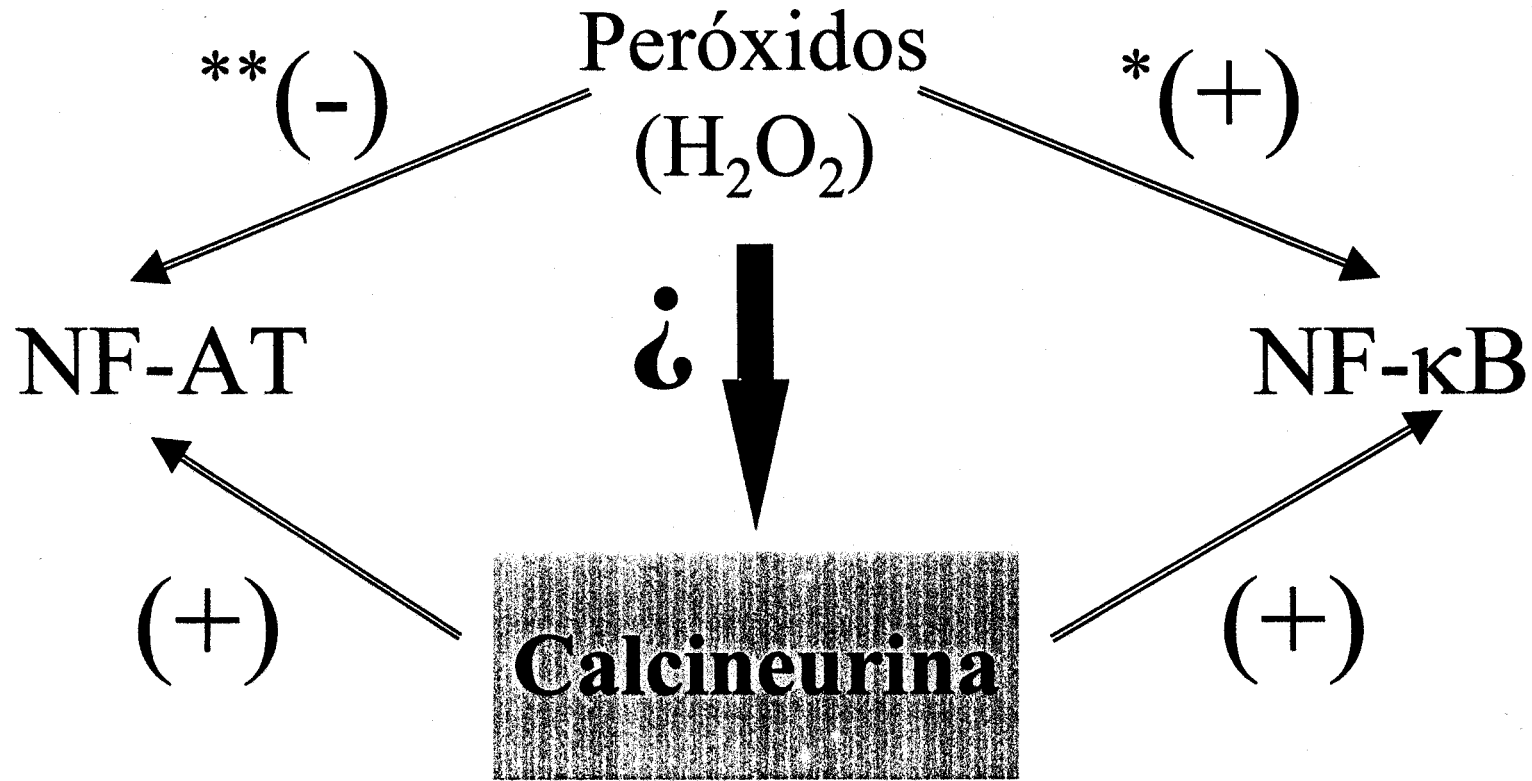


Figura 13. Papel de la CN en la activación de las células T



(*) Grupo de Bauerle

(**) J. Immunol. (1996) **157** 160-169

Figura 14. Relación del H₂O₂ con factores de transcripción

seguido la metodología descrita por los últimos autores, con pequeñas modificaciones y hemos detectado NF- κ B unido al ADN en estas células, junto con su inhibición por H₂O₂. Estos datos indican que la activación del NF- κ B está modulado por actividad CN en neutrófilos humanos.

Hay evidencias indirectas de que la CN es un enzima sensible a su ambiente redox, basado en el hecho de que la superóxido dismutasa protege a la CN de la inactivación espontánea en extractos crudos de cerebro (223). Esta inactivación es interpretada como resultado del daño oxidativo del centro activo de la CN (223). Se han presentado evidencias, que la CN es un enzima que contiene Fe-Zn en el centro catalítico (179). El mecanismo hipotético que puede ser propuesto para explicar este daño oxidativo, es que el H₂O₂ y otros compuestos oxidativos como el pV(phen), podrían modificar el estado redox del centro catalítico y por tanto inactivar al enzima (Fig. 15).

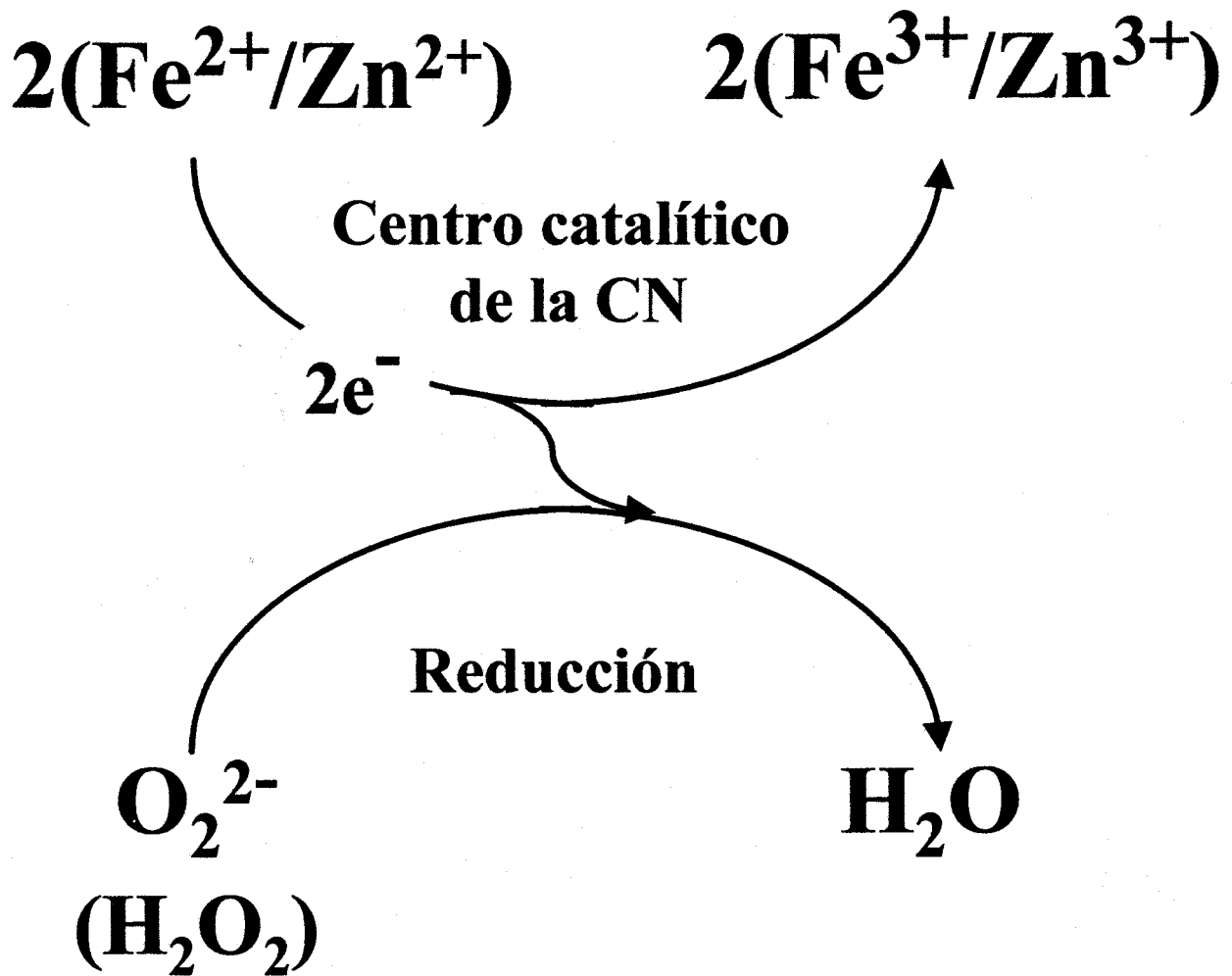


Figura 15. Modelo hipotético del efecto del H_2O_2 sobre el centro catalítico de la CN.

Este mecanismo está de acuerdo con la observación de que la reactivación de la CN de neutrófilos inhibida por H_2O_2 , requiere la adición de agentes reductores tales como Fe^{2+} , DTT, y ascorbato, como ocurrió con las preparaciones de la CN de cerebro (223). Esta inhibición de la CN por oxidantes, tales como el H_2O_2 y el pV(phen), representa un nuevo mecanismo de acción de estos agentes. El compuesto del pV(phen) tiene una doble actividad, actúa tanto como oxidante intracelular y como inhibidor de fosfotirosina fosfatasas (258). También hay descripciones de que tanto las actividades de las tirosina fosfatasas, como las de las serina/treonina fosfatasas (fosfatasas 2A) son reducidas después del tratamiento con H_2O_2 en células Jurkat (259). Anteriormente ha sido descrito, que la CN tiene una subunidad reguladora que es fosforilada por la forma de la calmodulina quinasa II independiente de Ca^{2+} . Esta CN fosforilada tiene un 50 % disminuida su V_{max} y dos veces aumentada los valores de su K_m (260). Así, un modelo hipotético en el que los oxidantes modulan la actividad CN a través de fosforilaciones en su sitio regulador, puede por tanto ser postulado para interpretar los datos presentes. Aparece aquí una aparente discrepancia entre la inhibición de la CN por H_2O_2 y otros oxidantes, frente a la protección que ejerce la superóxido dismutasa (223) sobre la CN al convertir el $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 . En este contexto, no obstante debería ser introducido el papel de la catalasa y peroxidasa como enzimas detoxificantes que degradan el H_2O_2 . Estos enzimas son también protegidos mutuamente y por tanto sinérgicos cuando ambos: $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 están siendo sintetizados. De hecho, en la Figura 4 del capítulo 2 de resultados, se ilustra la ausencia del efecto del H_2O_2 exógena, cuando se añade sola, sin inhibición de la catalasa. Estos datos indirectamente suministran la idea de que la catalasa es un enzima protector adicional de la CN, contra la inactivación por parte de los ROI. La implicación de esta sugerencia es que, bajo condiciones fisiológicas normales, la CN celular, puede ser relativamente menos susceptible a los daños moleculares de oxidación producidos por los ROI. Recíprocamente, en procesos patológicos, tales como lesiones inflamatorias y síndrome isquémia/reperfusión o situaciones caracterizadas por una inhibición de los enzimas detoxificantes de los ROI, la inactivación de la CN por especies oxidantes puede tener lugar, y este proceso podría ser importante en el contexto del estrés oxidativo.

En resumen, estas pruebas indican que la actividad CN es un paso sensible al estado redox en cascadas de señalización celular y sugiere que la inactivación del NF-AT de linfocitos (253) y NF- κ B de neutrófilos (presente trabajo, ref. 261) por H_2O_2 es obtenido a través de la inactivación de la CN.

3. Activación del factor de transcripción STAT3 por H₂O₂ en linfocitos humanos.

Los procesos bioquímicos que ocurren durante el estrés oxidativo, constituyen hoy día un enfoque de numerosas investigaciones. Nosotros hemos descrito que el H₂O₂ y otros peróxidos, son capaces de inhibir la actividad CN en neutrófilos humanos e inactivar la unión del NF-κB al ADN (261). Por el contrario Schreck y col (42), opinan que los peróxidos activan al NF-κB a través de un mecanismo común, que incluye la síntesis de ROI, y que el H₂O₂ está implicada en la regulación de diferentes PTKs, cuya función es crítica para la activación de los linfocitos (24, 262). Por otro lado, la participación de las proteínas STAT, como factores de transcripción, activados por IL-2, ha sido recientemente destacado (210, 263, 264). Sin embargo la conexión entre la activación provocada por peróxidos y las proteínas STAT, como moléculas diana de los procesos oxidativos, no ha sido todavía explorado. En este trabajo, hemos llevado a cabo experimentos, en los que el H₂O₂ promueve la fosforilación en tirosina de la proteína STAT3 en linfocitos de sangre periférica, y de un modo asociado a su translocación al núcleo y unión a secuencias específicas del ADN.

Se sabe que para la activación de los factores STAT, éstos deben de fosforilarse en tirosina (207). Para explicar este mecanismo de activación, caben destacar dos posibilidades. Primero, su estado redox podría directamente alterar la funcionalidad del STAT3 e inducir su translocación al núcleo. Esta posibilidad puede ser descartada debido a que la estructura del STAT3 y sus potenciales centros redox, están en la actualidad, mal conocidos. Una segunda explicación se basa en el efecto de los oxidantes como inhibidores de las tirosina fosfatasas, según lo cual, la translocación al núcleo de STAT3 inducida por H₂O₂, podría ser posterior a su previa fosforilación. Hay numerosos datos indicando que los oxidantes inducen un aumento en el estado de fosforilación en tirosina de muchas proteínas intracelulares, como resultado de la inhibición de la actividad de múltiples tirosina fosfatasas (48, 265). En este sentido, se ha demostrado que el H₂O₂ añadida exógenamente provoca la fosforilación en tirosina de proteínas en varios tipos celulares (51, 266). Además, el H₂O₂ puede inhibir directamente la actividad PTPasa in vitro y esta inhibición puede ser revertida completamente por ditioneitol (48). Todas la PTPasas contienen un grupo esencial sulfidrilo en su centro activo, que es susceptible de oxidación por su inusual baja pKa (<5) (267). Estas observaciones sugieren que las PTPasas pueden ser dianas para el H₂O₂ generada intracelularmente y esta inactivación de las PTPasas, conllevaría a un aumento de la fosforilación en tirosina de proteínas. Teniendo en cuenta que la actividad específica de las PTPasas in vitro es del orden de 10-1000 veces más alta que la de las PTKs (268), es de esperar que en la mayoría de los tipos celulares, la activación de un receptor

tirosina quinasa por la unión de un factor de crecimiento, puede que no sea suficiente para aumentar el nivel de fosforilación en tirosina de las proteínas. Con este fin, la simultánea inhibición de las PTPasas, puede por tanto ser necesario y en este sentido el H_2O_2 ejercería su efecto.

El tratamiento de linfocitos con derivados de vanadio, fuertemente induce la fosforilación en tirosina de proteínas quinasas de la familia Erk2 y Syk, provocando su activación (258). También, se ha demostrado que el tratamiento de células T con H_2O_2 , induce la fosforilación en tirosina de las quinasas Lck, y en ellas se observa una respuesta más fuerte si seguidamente se las trata con diamide, que es un agente oxidante de grupos sulfidrilos (54). Además, es posible que las quinasas Src, tales como $p56^{lck}$ y $p59^{fyn}$ en células T, pueden ser activadas transitoriamente por H_2O_2 en combinación con vanadato (43). Es interesante notar que el vanadato por si mismo tiene un efecto limitado sobre la fosforilación en tirosina del STAT3, como se muestra en el capítulo 3 de resultados. Sin embargo, la simultánea adición de H_2O_2 y vanadato, resultando pervanadato, aumenta varias veces el efecto ejercido por separado de estos dos compuestos. Es de interés, que el pervanadato administrado como tal, induce la fosforilación en tirosina y translocación al núcleo de un número de proteínas STAT en células de hígado, incluyendo a STAT3 (219). También, el pervanadato induce activación de células T y transcripción de c-fos (269), la activación de factores de transcripción dependientes de $IFN-\gamma$ y prolactina y la activación de las quinasas JAK (270, 271). La posibilidad de que los efectos del H_2O_2 y pervanadato sobre la translocación al núcleo de STAT3 pudiese ser atribuido a la inhibición de las tirosina fosfatasas, es reforzado por experimentos usando PAO y diamide, dos compuestos que son capaces de actuar como inhibidores de PTPasas. Como se muestra en este trabajo, estas drogas ejercen un aumento de la acción del H_2O_2 , mientras que genisteína, un inhibidor de proteínas quinasas, se opone al efecto del H_2O_2 y diamide. La genisteína, sin embargo no contrarresta el aumento de fosforilación de STAT3 provocado por el PAO a las dosis estudiadas. Estos resultados están de acuerdo con informes anteriores que demuestran que el H_2O_2 actúa como inhibidor de tirosina fosfatasa, aumentando la fosforilación en tirosina de STAT3. La complejidad de este fenómeno es evidente por la reciente demostración de la fosforilación de STAT3 sobre el residuo Ser-727, que también es requerido para la completa activación transcripcional (207, 210). Por tanto puede ser especulado, que el H_2O_2 podría también aumentar la actividad serina quinasa necesaria para la activación de STAT3. Hay que decir, que el aumento del efecto del H_2O_2 sobre la translocación al núcleo del STAT3, parece más bien específica, ya que ni STAT1 ni STAT5B sufren migración al núcleo bajo condiciones oxidativas, como se muestra en este trabajo. Sin embargo, cual es la especie activa de oxígeno directamente

responsable de los efectos observados con el H_2O_2 sobre la activación de STAT3 es actualmente desconocida. El H_2O_2 y el $\text{O}_2^{\cdot-}$ pueden reaccionar a través de reacciones redox que dependen de Fe^{2+} y Cu^{2+} , produciendo radicales altamente reactivos, tales como el radical $\cdot\text{OH}$ (272, 273). El H_2O_2 añadida exógenamente es rápidamente convertida en otras especies químicas, y en este contexto, nosotros hemos usado una combinación de iones Fe^{2+} y Cu^{2+} que generan radicales $\cdot\text{OH}$ a través de reacciones de Fenton y éstos podrían cumplir tal papel (Fig. 16).

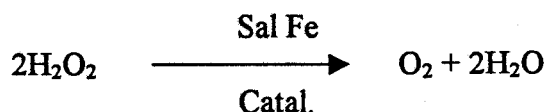
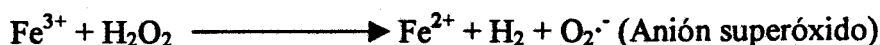
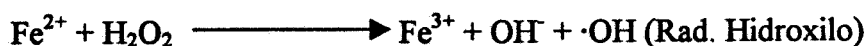


Figura 16.- Reacción de Fenton

De hecho en presencia de estos iones metálicos se encontró un aumento en la translocación al núcleo del STAT3 y una unión al ADN en células expuestas a H_2O_2 . Por lo tanto, es claro que el H_2O_2 no es la única especie implicada en la translocación al núcleo del STAT3. De acuerdo con recientes trabajos, que muestran que el compuesto 1, 10 fenantrolina, un quelador de iones de hierro y cobre, que evita completamente la rotura de la hebra de ADN inducida por H_2O_2 (274), nosotros hemos encontrado que este compuesto fue capaz de cancelar la translocación al núcleo del STAT3 inducida por el H_2O_2 . Estos resultados hablan a favor de la posibilidad de que las concentraciones intracelulares de $\text{Fe}^{2+}/\text{Cu}^{2+}$, podrían jugar un papel como intermediarios en las condiciones de estrés oxidativo inducido por H_2O_2 .

En resumen, estas observaciones, suponen un papel in vivo para los oxidantes, en la regulación del factor de transcripción STAT3 en linfocitos humanos. De acuerdo con extensos trabajos hechos en otros laboratorios, nuestros resultados favorecen la hipótesis de que el H_2O_2 por ella misma y/o especies oxidativas derivadas, generadas por reacciones de Fenton, pueden modular el estado de fosforilación en tirosina de la proteína STAT3, y por tanto promover su translocación al núcleo y la formación de complejos de unión a específicos promotores del ADN.

CONCLUSIONES

1.- Un nuevo complejo derivado de rutenio, el ácido propileno-1,2-diaminotetra-acético de rutenio (Ru-PDTA), estimula específicamente la producción de $O_2^{\cdot-}$ en neutrófilos humanos. Este incremento estaba asociado con la translocación de los factores citosólicos p47^{phox} y p67^{phox} de la NADPH-oxidasa a la membrana plasmática. Asimismo se detectó un aumento de los niveles de Ca^{2+} citosólico en neutrófilos tratados con el complejo de rutenio. Estos datos son concordantes con la posibilidad de que el efecto antitumoral del complejo de rutenio, previamente descrito, sea debido en parte a la liberación de radicales libres de oxígeno producidos por las células fagocíticas que infiltran la masa tumoral.

2.- El enzima calcineurina (CN) (fosfatasa 2B) está presente en lisados de neutrófilos. Antisueros específicos reconocen tanto la cadena A como la cadena B de la CN. Ello confirma que ambas subunidades están expresadas en neutrófilos humanos. Esta actividad fosfatasa es dependiente de Ca^{2+} y calmodulina e inhibible por ciclosporina y FK 506, confirmando que esta actividad fosfatasa funcional de la CN presente en neutrófilos posee unas propiedades similares a la CN de los linfocitos.

3.- Neutrófilos tratados con diferentes dosis de H_2O_2 , muestran una inhibición dosis-dependiente de la actividad CN intracelular. En linfocitos tratados con H_2O_2 se observó una inhibición similar. El efecto del H_2O_2 se imita por otros agentes oxidantes tales como compuestos de peroxovanadato. Esta inhibición puede ser revertida por la adición de agentes reductores. Estos datos sugieren un papel funcional de los oxidantes intracelulares en la modulación de la actividad CN.

4.- El H_2O_2 añadida exógenamente a neutrófilos, inhibe la unión del NF- κ B al ADN. Debido a la conexión existente entre actividad CN y NF- κ B, los resultados presentados sugieren que la inhibición de la unión del NF- κ B al ADN es consecuencia de la previa inhibición de la actividad CN.

5.- El H_2O_2 modula al factor de transcripción STAT3, fosforilándolo en tirosina, activando su translocación al núcleo e induciendo su unión a secuencias promotoras específicas del ADN.

6.- Experimentos con Fe^{2+}/Cu^{2+} , sugieren que, el H_2O_2 y otras especies oxidativas derivadas de ella, generadas por la reacción de Fenton, son las responsables, al menos parcialmente, de la fosforilación en tirosina y translocación al núcleo de la proteína STAT3, para formar complejos de unión a secuencias específicas del ADN.

BIBLIOGRAFIA DE LA INTRODUCCIÓN Y LA DISCUSIÓN

- 1.- Ohba, M., Shibamura, M., Kuroki, K., and Nose, K. (1994) Production of hydrogen peroxide by transforming growth factor-beta 1 and its involvement in induction of egr-1 in mouse osteoblastic cells *J. Cell Biol.* **126**, 1079-1088
- 2.- Thannickal, V. J., and Fanburg, B. L. (1995) Activation of an H₂O₂-generating NADH oxidase in human lung fibroblasts by transforming growth factor beta 1 *J. Biol. Chem.* **270**, 30334-30338
- 3.- Meier, B., Radeke, H. H., Selle, S., Younes, M., Sies, H., Resch, K., and Habermehl, G. G. (1989) Human fibroblasts release reactive oxygen species in response to interleukin-1 or tumour necrosis factor-alpha *Biochem J.* **263**, 539-545
- 4.- Lo, Y. Y. C., and Cruz, T. F. (1995) Involvement of reactive oxygen species in cytokine and growth factor induction of c-fos expression in chondrocytes *J. Biol. Chem.* **270**, 11727-11730
- 5.- Sundaresan M., Yu, Z.-X., Ferrans, V., Irani, K., and Finkel, T. (1995) Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction *Science* **270**, 296-299
- 6.- Krieger-Brauer, H. I., and Kather, H. (1995) Antagonistic effects of different members of the fibroblast and platelet-derived growth factor families on adipose conversion and NADPH-dependent H₂O₂ generation in 3T3 L1-cells *Biochem J.* **307**, 549-556
- 7.- Chen, Q., Olashaw, N., and Wu, J. (1995) Participation of reactive oxygen species in the lysophosphatidic acid-stimulated mitogen-activated protein kinase activation pathway *J. Biol. Chem.* **270**, 28499-28502
- 8.- Sha'afi, R. I., and Molski, T. F. P. (1988) Activation of the neutrophil in *Progress in Allergy* (Ishizaki, K., ed) Vol. **42**, pp. 1-64, S. Karger, Basel, Switzerland
- 9.- Halliwell, B., and Gutteridge, J. M. C. (1985) *Free Radicals in Biology and Medicine*, Clarendon Press, Oxford
- 10.- Schreck, R., and Baeuerle, P. A. (1991) A role for oxygen radicals as second messengers *Trends Cell Biol.* **1**, 39-42
- 11.- Fialkow, L., Chan, C. K., Grinstein, S., and Downey, G. P. (1993) Regulation of tyrosine phosphorylation in neutrophils by the NADPH oxidase. Role of reactive oxygen intermediates *J. Biol. Chem.* **268**, 17131-17137
- 12.- Brumell, J. H., Burkhardt, A. L., Bolen, J. B., and Grinstein, S. (1996) Endogenous reactive oxygen intermediates activate tyrosine kinases in human neutrophils *J. Biol. Chem.* **271**, 1455-1461
- 13.- Badwey, J. A., and Karnovsky, M. L. (1980) Active oxygen species and the functions of phagocytic leukocytes *Annu. Rev. Biochem.* **49**, 695-726
- 14.- Chanock, S. J., El Benna, J., Smith, R. M., and Babior, B. M. (1994) The respiratory burst oxidase *J. Biol. Chem.* **269**, 24519-24522

- 15.- Segal, A. W., and Abo, A. (1993) The biochemical basis of the NADPH oxidase of phagocytes *Trends Biochem. Sci.* **18**, 43-47
- 16.- Clark, R. A. (1990) The human neutrophil respiratory burst oxidase *J. Infect. Dis.* **161**, 1140-1147
- 17.- Crabtree, G. R., and Clipstone, A., A. (1994) Signal transmission between the plasma membrane and nucleus of T lymphocytes. *Annu. Rev. Biochem.* **63**, 1045-1083
- 18.- Berridge, M. J., (1993) Inositol trisphosphate and calcium signalling *Nature* **361**, 315-325
- 19.- Alford, R. H. (1970) Metal cation requirements for phytohemagglutinin-induced transformation of human peripheral blood lymphocytes *J. Immunol.* **104**, 698-703
- 20.- Truneh, A., Albert, F., Golstein, P., and Schmitt-Verhulst, A.-M. (1985) Early steps of lymphocyte activation bypassed by synergy between calcium ionophores and phorbol ester *Nature* **313**, 318-320
- 21.- Baeuerle, P. A., and Henkel, T. (1994) Function and activation of NF- κ B in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* **12**, 141-179
- 22.- Dröge, W., Mihm, S., Bockstette, M., and Roth, S. (1994) Effect of reactive oxygen intermediates and antioxidants on proliferation and function of T lymphocytes *Methods Enzymol* **234**, 135-151
- 23.- Schulze-Osthoff, K., Los, M., and Baeuerle, P. A. (1995) Redox signalling by transcription factors NF- κ B and AP-1 in lymphocytes *Biochem. Pharmacol.* **50**, 735-741
- 24.- Schieven, G. L., Mittler, R. S., Nadler, S. G., Kirihara, J. M., Bolen, J. B., Kanner, S. B., and Ledbetter, J. A. (1994) ZAP-70 tyrosine kinase, CD 45, and T cell receptor involvement in UV- and H₂O₂-induced T cell signal transduction *J. Biol. Chem.* **269**, 20718-20726
- 25.- Lander, H. M., Ogiste, J. S., Teng, K. K., and Novogrodsky, A. (1995) p21^{ras} as a common signaling target of reactive free radicals and cellular redox stress *J. Biol. Chem.* **270**, 21195-21198
- 26.- Sen, C. K., Roy, S., and Packer, L. (1996) Involvement of intracellular Ca²⁺ in oxidant-induced NF- κ B activation *FEBS Lett.* **385**, 58-62
- 27.- Beiqing, L., Hackshaw, K. V., and Whisler, R. L. (1996) Calcium signals and protein tyrosine kinases are required for the induction of c-jun in Jurkat cells stimulated by the T cell receptor complex and oxidative signals *J. Interferon Cytokine Res* **16**, 77-90
- 28.- Baeuerle, P. A., and Baltimore, D. (1996) NF- κ B: ten years after. *Cell* **87**, 13-20
- 29.- Babior, B. M. (1978) Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes (first of two parts) *N. Engl. J. Med.* **298**, 659-668

- 30.- Mukherjee, S. P., Lane, R. H., and Lynn, W. S. (1978) Endogenous hydrogen peroxide and peroxidative metabolism in adipocytes in response to insulin and sulfhydryl reagents *Biochem. Pharmacol.* **27**, 2589-2594
- 31.- May, J. M., and de Haen, C. (1979) The insulin-like effect of hydrogen peroxide on pathways of lipid synthesis in rat adipocytes *J. Biol. Chem.* **254**, 9017-9021
- 32.- Bae, Y. S., Kang, S. W., Seo, M. S., Baines, I. C., Tekle, E. Chock, P. B., and Rhee, S. G. (1997) Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation *J. Biol. Chem.* **272**, 217-221
- 33.- Robertson, F. M, Beavis, A. J., Oberyshyn, T. M., O'Connell, S. M., Dokidos, A., Laskin, D. L., Laskin, J. D., and Reiners, J. J., Jr. (1990) Production of hydrogen peroxide by murine epidermal keratinocytes following treatment with the tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate *Cancer Res.* **50**, 6062-6067
- 34.- Carballo, M., Vilaplana, R., Márquez, G., Conde, M., Bedoya, F. J., González-Vilchez, F., and Sobrino, F. (1997) A newly synthesized molecule derived from ruthenium cation, with antitumour activity, activates NADPH oxidase in human neutrophils *Biochem. J.* **328**, 559-564
- 35.- Moncada, S., Palmer, R. M., and Higgs, E. A. (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology *Pharmacol. Rev.* **43**, 109-142
- 36.- Huie, R. E., and Padmaja, S. (1993) The reaction of NO with superoxide *Free Radic. Res. Commun.* **18**, 195-199
- 37.- Yim, M. B., Chae, H. Z., Rhee, S. G., Chock, P. B., and Stadtman, E. R. (1994) On the protective mechanism of the thiol-specific antioxidant enzyme against the oxidative damage of biomacromolecules *J. Biol. Chem.* **269**, 1621-1626
- 38.- Stadtman, E. R., and Oliver, C. N. (1991) Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences *J. Biol. Chem.* **266**, 2005-2008
- 39.- Cross, A. R., and Jones, O. T. G. (1989) in *the Neutrophil, Cellular Biochemistry and Physiology* (Hallet, M. B., ed) pp.97-111, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL
- 40.- Meyer, M., Schreck, R. and Baeuerle, P. A. (1993) H₂O₂ and antioxidants have opposite effects on activation of NF-kappa B and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor *EMBO J.* **12**, 2005-2015
- 41.- Pahl, H. L., and Baeuerle, P. A. (1994) Oxygen and the control of gene expression *Bioessays* **16**, 497-502
- 42.- Schreck, R., Rieber, P., and Baeuerle, P. A. (1991) Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kB transcription factor and HIV-1. *EMBO J.* **10**, 2247-2258
- 43.- Schieven, G. L., Kirihara, J. M., Myers, D. E., Ledbetter, J. A., and Ucken, F. M. (1993) Reactive oxygen intermediates activate NF-kappa B in a tyrosine kinase-dependent

- mechanism and in combination with vanadate activate the p56^{lck} and p59^{fyn} tyrosine kinases in human lymphocytes *Blood* **82**, 1212-1220
- 44.- Stevenson, M., Pollock, S., Coleman, C. And Calderwood, S. (1994) X-irradiation, phorbol esters, and H₂O₂ stimulate mitogen-activated protein kinase activity in NIH-3T3 cells through the formation of reactive oxygen intermediates *Cancer Res.* **54**, 12-15
- 45.- Zor, U., Ferber, E., Gergely, P., Szücs, K., Dombradi, V., and Goldman, R. (1993) Reactive oxygen species mediate phorbol ester-regulated tyrosine phosphorylation and phospholipase A2 activation: potentiation by vanadate *Biochem. J.* **295**, 879-888
- 46.- Jacobson, M. (1996) Reactive oxygen species and programmed cell death *Trends Biochem. Sci.* **21**, 83-86
- 47.- Staal, F. J. Y., Roederer, M., Raju, P., Anderson, M., Ela, S., Herzenberg, L. And Herzenberg, L (1993) Antioxidants inhibit stimulation of HIV transcription *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **9**, 299-306
- 48.- Hecht, D., and Zick, Y. (1992) Selective inhibition of protein tyrosine phosphatase activities by H₂O₂ and vanadate in vitro *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **188**, 773-779
- 49.- Fialkow, L., Chan, C. K., Rotin, D., Grinstein, S., and Downey, G. P. (1994) Activation of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway in neutrophils. Role of oxidants *J. Biol. Chem.* **269**, 31234-31242
- 50.- Sullivan, S. G., Chiu, D. T.-Y., Errasfa, M., Wang, J. M., Qi, J.-S., and Stern, A. (1994) Effects of H₂O₂ on protein tyrosine phosphatase activity in HER14 cells *Free Radical Biol. & Med.* **16**, 399-403
- 51.- Heffetz, D., Bushkin, I., Dror, R. And Zick, Y. (1990) The insulinomimetic agents H₂O₂ and vanadate stimulate protein tyrosine phosphorylation in intact cells *J. Biol. Chem.* **265**, 2896-2902
- 52.- O'Shea, J. J., McVicar, D. W., Bailey, T. L., Burns, C. And Smyth, M. J. (1992) Activation of human peripheral blood T lymphocytes by pharmacological induction of protein-tyrosine phosphorylation *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 10306-10310
- 53.- Secrist, J. P., Burns, L. A., Karnitz, L., Koretzky, G. A. And Abahams, R. T. (1993) Stimulatory effects of the protein tyrosine phosphatase inhibitor, pervanadate, on T-cell activation events *J. Biol. Chem.* **268**, 5886-5893
- 54.- Nakamura, K., Hori, T., Sato, N., Sugie, K., Kawakami, T. And Yodoi, J. (1993) Redox regulation of a src family protein tyrosine kinase p56lck in T cells *Oncogene* **8**, 3133-3139
- 55.- Morel, F., Doussiere, J., and Vignais, P. V. (1991) The superoxide-generating oxidase of phagocytic cells. Physiological, molecular and pathological aspects *Eur. J. Biochem.* **201**, 523-546
- 56.- Halliwell, B., and Gutteridge, J. M. C. (1990) Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview *Methods Enzymol.* **186**, 1-85

- 57.- Smith, R. M., and Curnutte, J. T. (1991) Molecular basis of chronic granulomatous disease *Blood* **77**, 673-686
- 58.- Curnutte, J. T. (1992) Molecular basis of the autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease *Immunol. Rev.* **3**, 149-172
- 59.- Roos, D. (1994) The genetic basis of chronic granulomatous disease *Immunol. Rev.* **138**, 121-157
- 60.- Segal, A. W. (1987) Absence of both cytochrome b-245 subunits from neutrophils in X-linked chronic granulomatous disease *Nature* **326**, 88-91
- 61.- Nakamura, M., Sendo, S., van Zwieten, R., Koga, T., Roos, D., and Kanegasaki, S. (1988) Immunocytochemical discovery of the 22- to 23-Kd subunit of cytochrome b558 at the surface of human peripheral phagocytes *Blood*, **72**, 1550-1552
- 62.- Parkos, C. A., Dinauer, M. C., Walker, L. E., Rodger, A. A., Jesaites, A. J., and Orkin, S. H. (1988) Primary structure and unique expression of the 22-kilodalton light chain of human neutrophil cytochrome b *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 3319-3323
- 63.- Rotrosen, D., Yeung, C. L., Leto, T. L., Malech, H. L., and Kwong, C. H. (1992) Cytochrome b558: the flavin-binding component of the phagocyte NADPH oxidase *Science* **256**, 1459-1462
- 64.- Segal, A. W., West, I., Wientjes, F., Nugent, J. H. A., Chavan, A. J., Haley, B., Garcia, R. C., Rosen, H., and Scrace, G. (1992) Cytochrome b-245 is a flavocytochrome containing FAD and the NADPH-binding site of the microbicidal oxidase of phagocytes *Biochem. J.* **284**, 781-788
- 65.- Sumimoto, H., Sakamoto, N., Nozaki, M., Sakaki, Y., Takeshige, K., and Minakami, S. (1992) Cytochrome b558, a component of the phagocyte NADPH oxidase, is a flavoprotein *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **186**, 1368-1375
- 66.- Nisimoto, Y., Otsuka-Murakami, H., and Lambeth, D. (1995) Reconstitution of flavin-depleted neutrophil flavocytochrome b558 with 8-mercapto-FAD and characterization of the flavin-reconstituted enzyme *J. Biol. Chem.* **270**, 16428-16434
- 67.- Clark, R. A., Volpp, B. D., Leidal, K. G., and Nauseef, W. M. (1990) Two cytosolic components of the human neutrophil respiratory burst oxidase translocate to the plasma membrane during cell activation *J. Clin. Invest.* **85**, 714-721
- 68.- Quinn, M. T., Evans, T., Loetterle, L. R., Jesaites, A. J., and Bokoch, G. M. (1993) Translocation of Rac correlates with NADPH oxidase activation. Evidence for equimolar translocation of oxidase components *J. Biol. Chem.* **268**, 20983-20987
- 69.- El Benna, J., Ruedi, J. M., and Babior, B. M. (1994) Cytosolic guanine nucleotide-binding protein Rac2 operates in vivo as a component of the neutrophil respiratory burst oxidase. Transfer of Rac2 and the cytosolic oxidase components p47phox and p67phox to the submembranous actin cytoskeleton during oxidase activation *J. Biol. Chem.* **269**, 6729-6734

- 70.- Freeman J. L., and Lambeth, D. (1996) NADPH oxidase activity is independent of p47phox in vitro *J. Biol. Chem.* **271**, 22578-22582
- 71.- de Mendez, I., Garrett, M. C., Adams, A. G., and Leto, T. (1994) Role of p67-phox SH3 domains in assembly of the NADPH oxidase system *J. Biol. Chem.* **269**, 16326-16332
- 72.- Sumimoto, H., Kage, Y., Nunoi, H., Sasaki, H., Nose, T., Fukumaki, Y., Ohno, M., Minakami, S., and Takeshige, K. (1994) Role of Src homology 3 domains in assembly and activation of the phagocyte NADPH oxidase *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A.* **91**, 5345-5349
- 73.- De Leo, F., Ulman, K., Davis, A., Jutila, K., and Quinn, M. (1996) Assembly of the human neutrophil NADPH oxidase involves binding of p67phox and flavocytochrome b to a common functional domain in p47phox *J. Biol. Chem.* **271**, 17013-17020
- 74.- Someya, A., Nagaoka, I., and Yamashita, T. (1993) Purification of the 260 kDa cytosolic complex involved in the superoxide production of guinea pig neutrophils *FEBS Lett.* **330**, 215-218
- 75.- Wientjes, F. B., Hsuan, J. J., Totty, N. F., and Segal, A. W. (1993) p40phox, a third cytosolic component of the activation complex of the NADPH oxidase to contain src homology 3 domains *Biochem. J.* **296**, 557-561
- 76.- Heyworth, P. G., Curnutte, J. T., Nauseef, W. M., Volpp, B. D., Pearson, D. W., Rosen, H., and Clark, R. A. (1991) Neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase assembly. Translocation of p47-phox and p67-phox requires interaction between p47-phox and cytochrome b558 *J. Clin. Invest.* **87**, 352-356
- 77.- Lomax, K. J., Leto, T. L., Nunoi, H., Gallin, J. I., and Malech, H. L. (1989) Recombinant 47-kilodalton cytosol factor restores NADPH oxidase in chronic granulomatous disease *Science* **245**, 409-412
- 78.- Leto, T. L., Lomax, K. J., Volpp, B. D., Nunoi, H., Sechler, J. M. G., Nauseef, W. M., Clark, R. A., Gallin, J. I., and Malech, H. L. (1990) Cloning of a 67-kD neutrophil oxidase factor with similarity to a noncatalytic region of p60c-src *Science* **248**, 727-730
- 79.- Tyagi, S. R., Neckelmann, N., Uhlinger, D. J., Burnhan, D. N., and Lambeth, J. D. (1992) Cell-free translocation of recombinant p47-phox, a component of the neutrophil NADPH oxidase: effects of guanosine 5'-O-(3-thiotriphosphate), diacylglycerol, and an anionic amphiphile *Biochemistry* **31**, 2765-2774
- 80.- Uhlinger, D. J., Inge, K. L., Kreck, M. L., Tyagi, S. R., Neckelmann, N., and Lambeth, J. D. (1992) Reconstitution and characterization of the human neutrophil respiratory burst oxidase using recombinant p47-phox, p67-phox and plasma membrane *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **186**, 509-516
- 81.- Didsbury, J., Weber, R. F., Bokoch, G. M., Evans, T., and Snyderman, R. (1989) rac, a novel ras-related family of proteins that are botulinum toxin substrates *J. Biol. Chem.* **264**, 16378-16382

- 82.- Hiraoka, K., Kaibuchi, K., Ando, S., Musha, T., Takaishi, K., Mizuno, T., Asada, M., Menard, L., Tomhave, E., Didsbury, J., Snyderman, R., and Takai, Y. (1992) Both stimulatory and inhibitory GDP/GTP exchange proteins, smg GDS and rho GDI, are active on multiple small GTP-binding proteins *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **182**, 921-930
- 83.- Abo, A., Pick, E., Hall, A., Totty, N., Teahan, C. G., and Segal, A. W. (1991) Activation of the NADPH oxidase involves the small GTP-binding protein p21rac1 *Nature* **353**, 668-670
- 84.- Kwong, C. H., Malech, H. L., Rotrosen, D., and Leto, T. L. (1993) Regulation of the human neutrophil NADPH oxidase by rho-related G-proteins *Biochemistry* **32**, 5711-5717
- 85.- Chuang, T., Bohl, B. P., and Bokoch, G. M. (1993) Biologically active lipids are regulators of Rac.GDI complexation *J. Biol. Chem.* **268**, 26206-26211
- 86.- Abo, A., Webb, M. R., Grogan, A., and Segal, A. (1994) Activation of NADPH oxidase involves the dissociation of p21rac from its inhibitory GDP/GTP exchange protein (rhoGDI) followed by its translocation to the plasma membrane *Biochem. J.* **298**, 585-591
- 87.- Uhlinger, D. J., Tyagi, S. R., Inge, K. L., and Lambeth, J. D. (1993) The respiratory burst oxidase of human neutrophils. Guanine nucleotides and arachidonate regulate the assembly of a multicomponent complex in a semirecombinant cell-free system *J. Biol. Chem.* **268**, 8624-8631
- 88.- Le Cabec, V., Mohn, H., Gacon, G., and Maridonneau-Parini, I. (1994) The small GTP-binding protein rac is not recruited to the plasma membrane upon NADPH oxidase activation in human neutrophils *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **198**, 1216-1224
- 89.- Philips, M., Feoktistov, A., Pillinger, M., and Abramson, S. (1995) Translocation of p21rac2 from cytosol to plasma membrane is neither necessary nor sufficient for neutrophil NADPH oxidase activity *J. Biol. Chem.* **270**, 11514-11521
- 90.- Heyworth, P., Bohl, B., Bokoch, G., and Curnutte, J. (1994) Rac translocates independently of the neutrophil NADPH oxidase components p47phox and p67phox. Evidence for its interaction with flavocytochrome b558 *J. Biol. Chem.* **269**, 30749-30752
- 91.- Dorseuil, O., Quinn, M. T., and Bokoch, G. M. (1995) Dissociation of Rac translocation from p47phox/p67phox movements in human neutrophils by tyrosine kinase inhibitors *J. Leukocyte Biol.* **58**, 108-113
- 92.- Kleinberg, M. E., Malech, H. L., Mital, D. A., and Leto, T. L. (1994) p21rac does not participate in the early interaction between p47-phox and cytochrome b558 that leads to phagocyte NADPH oxidase activation in vitro *Biochemistry* **33**, 2490-2495
- 93.- Dusi, S., Donini, M., and Rossi, F. (1996) Mechanisms of NADPH oxidase activation: translocation of p40phox, Rac1 and Rac2 from the cytosol to the membranes in human neutrophils lacking p47phox or p67phox *Biochem. J.* **314**, 409-412
- 94.- Babior, B. M. (1988) Protein phosphorylation and the respiratory burst *Arch. Biochem. Biophys.* **264**, 361-367

- 95.- Heyworth, P. G., and Badwey, J. A. (1990) Protein phosphorylation associated with the stimulation of neutrophils. Modulation of superoxide production by protein kinase C and calcium *J. Bioenerg. Biomembr.* **22**, 1-26
- 96.- Bokoch, G. M. (1995) Chemoattractant signaling and leukocyte activation *Blood* **86**, 1649-1660
- 97.- Okamura, N., Curnutte, J. T., Roberts, R. L., and Babior, B. M. (1988) Relationship of protein phosphorylation to the activation of the respiratory burst in human neutrophils. Defects in the phosphorylation of a group of closely related 48-kDa proteins in two forms of chronic granulomatous disease *J. Biol. Chem.* **263**, 6777-6782
- 98.- Rotrosen, D., and Leto, T. L. (1990) Phosphorylation of neutrophil 47-kDa cytosolic oxidase factor. Translocation to membrane is associated with distinct phosphorylation events *J. Biol. Chem.* **265**, 19910-19915
- 99.- El Benna, J., Faust, L. P., and Babior, B. M. (1994) The phosphorylation of the respiratory burst oxidase component p47phox during neutrophil activation. Phosphorylation of sites recognized by protein kinase C and by proline-directed kinases *J. Biol. Chem.* **269**, 23431-23436
- 100.- El Benna, J., Faust, L. P., Johnson, J. L., and Babior, B. M. (1996) Phosphorylation of the respiratory burst oxidase subunit p47phox as determined by two-dimensional phosphopeptide mapping. Phosphorylation by protein kinase C, protein kinase A, and a mitogen-activated protein kinase *J. Biol. Chem.* **271**, 6374-6378
- 101.- Nauseef, W. M., Volpp, B. D., McCormick, S., Leidal, K. G., and Clark, R. A. (1991) Assembly of the neutrophil respiratory burst oxidase. Protein kinase C promotes cytoskeletal and membrane association of cytosolic oxidase components *J. Biol. Chem.* **266**, 5911-5917
- 102.- Faust, L. P., El Benna, J., Babior, B. M., and Chanock, S. J. (1995) The phosphorylation targets of p47phox, a subunit of the respiratory burst oxidase. Functions of the individual target serines as evaluated by site-directed mutagenesis *J. Clin. Invest.* **96**, 1499-1505
- 103.- Park, J.-W., Hoyal, C. R., El Benna, J., and Babior, B. M. (1997) Kinase-dependent activation of the leukocyte NADPH oxidase in a cell-free system. Phosphorylation of membranes and p47phox during oxidase activation *J. Biol. Chem.* **272**, 11035-11043
- 104.- El Benna, J., Dang, P. My-C., Gaudry, M., Fay, M., Morel, F., Hakim, J., and Gougerot-Pocidalò, M.-A. (1997) Phosphorylation of the respiratory burst oxidase subunit p67phox during human neutrophil activation. Regulation by protein kinase C-dependent and independent pathways *J. Biol. Chem.* **272**, 17204-17208
- 105.- Brennan, J. M., Maini, R. N., Feldmann, M., (1995) Cytokine expression in chronic inflammatory disease. *Br. Med. Bull* **51**, 368-384
- 106.- Papavassiliou, A. G. (1995) Transcription factors *N. Engl. J. Med.* **332**, 45-47
- 107.- Kopp, E. B., Ghosh, S. (1995) NF- κ B and rel proteins in innate immunity *Adv. Immunol.* **58**, 1-27

- 108.- Sen, R., Baltimore, D. (1986) Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* **46**, 705-716
- 109.- Barnes, P. J., and Adcock, I. M. (1997) NF- κ B: a pivotal role in asthma and a new target for therapy *TIPS* **18**, 46-50
- 110.- Barnes, P. J., and Karin, M. (1997) NF- κ B – A pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases *N. Engl. J. Med.* **336**, 1066-1071
- 111.- Nabel, G., and Baltimore, D. (1987) An inducible transcription factor activates expression of human immunodeficiency virus in T cells *Nature* **326**, 711-713
- 112.- Jones, K. A., and Peterlin, B. M. (1994) Control of RNA initiation and elongation at the HIV-1 promoter *Annu. Rev. Biochem.* **63**, 717-743
- 113.- Siebenlist, U., Franzoso, G., Brown, K. (1994) Structure, regulation and function of NF- κ B. *Annu. Rev. Cell Biol.* **10**, 405-455
- 114.- Bours, V., Burd, P. K., Brown, K., Villalobos, J., Park, S., Ryseck, R. P., Bravo, R., Kelly, K., and Siebenlist, U. (1992) A novel mitogen-inducible gene product related to p50/p105-NF-kappa B participates in transactivation through a kappa B site *Mol. Cell. Biol.* **12**, 685-695
- 115.- Bours, V., Villalobos, J., Burd, P. R., Kelly, K., and Siebenlist, U. (1990) Cloning of a mitogen-inducible gene encoding a kappa B DNA-binding protein with homology to the rel oncogene and to cell-cycle motifs *Nature* **348**, 76-80
- 116.- Ghosh, S., Gifford, A. M., Riviere, L. R., Tempst, P., Nolan, G. P., and Baltimore, D. (1990) Cloning of the p50 DNA binding subunit of NF-kappa B: homology to rel and dorsal *Cell* **62**, 1019-1029
- 117.- Kieran, M., Blank, V., Logeat, F., Vandekerkove, J., Lottspeich, F., LeBail, O., Urban, M. B., Kourilsky, P., Baeuerle, P. A., and Israel, A. (1990) The DNA binding subunit of NF-kappa B is identical to factor KBF1 and homologous to the rel oncogene product *Cell* **62**, 1007-1018
- 118.- Baldwin, A. S. Jr. (1996) The NF- κ B and I κ B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev. Immunol.* **14**, 649-681
- 119.- Beg, A. A., and Baldwin, J., A. (1993) The I kappa B proteins: multifunctional regulators of Rel/NF-kappa B transcription factors *Genes Dev.* **7**, 2064-2070
- 120.- Brockman, J. A., Scherer, D. C., Hall, S. M., McKinsey, T. A., Qi, X., See, W. Y., and Ballard, D. W. (1995) Coupling of signal-response domain in I κ B-a to multiple pathways for NF- κ B activation. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 2809-2818
- 121.- Brown, K., Gerstberger, S., Carlson, L., Franzoso, G., and Siebenlist, U. (1995) Control of I κ B-a proteolysis by site-specific, signal-induced phosphorylation. *Science* **267**, 1485-1491

- 122.- Traenckner, E. B.-M., Pahl, H. L., Henkel, T., Schmidt, K. N., Wilk, S., and Baeuerle, P. A. (1995) Phosphorylation of human I κ B- α on serines 32 and 36 controls I κ B- α proteolysis and NF- κ B activation in response to diverse stimuli. *EMBO J.* **14**, 2876-2883
- 123.- DiDonato, J., Mercurio, F., Rosette, C., et al. (1996) Mapping of the inducible I κ B phosphorylation sites that signal its ubiquitination and degradation. *Mol. Cell Biol.* **16**, 1295-1304
- 124.- Chen, Z. J., Parent, L., and Maniatis, T. (1996) Site-specific phosphorylation of I κ B- α by a novel ubiquitination-dependent protein kinase activity *Cell* **84**, 853-862
- 125.- Baeuerle, P. A., and Baltimore, D. (1991) in *The Hormonal Control Regulation of Gene Transcription*, (Cohen, P., and Foulkes, J., eds.), pp. 423-446, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands
- 126.- Arenzana-Seisdedos, F., Thompson, J., Rodriguez, M., S., Bachelier, F., Thomas, D., Hay, R. T. (1995) Inducible nuclear expression of newly synthesized I κ B- α negatively regulates DNA-binding and transcriptional activities of NF- κ B. *Mol. Cell Biol.* **15**, 2689-2696
- 127.- Janosch, P., Schellerer, M., Seitz, T., et al. (1996) Characterization of I κ B kinases: I κ B- α is not phosphorylated by Raf-1 or protein kinase C isozymes, but is a casein kinase II substrate. *J. Biol. Chem.* **271**, 3868-3874
- 128.- Régnier, C. H., Song, H. Y., Gao, X., Goeddel, D. V., Cao, Z., and Rothe, M. (1997) Identification and Characterization of an I κ B kinase. *Cell* **90**, 373-383
- 129.- Zandi, E., Rothwarf, D. M., Delhase, M., Hayakawa, M., and Karin, M. (1997) The I κ B kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKK α and IKK β , necessary for I κ B phosphorylation and NF- κ B activation. *Cell* **91**, 243-252
- 130.- Mercurio, F., Zhu, H., Murray, B. W., Shevchenko, A., Bennett, B. L., Wu Li, J., Young, D. B., Barbosa, M., Mann, M., Manning, A., and Rao, A. (1997) IKK-1 and IKK-2: Cytokine-activated I κ B kinases essential for NF- κ B activation. *Science* **278**, 860-866
- 131.- Woronicz, J. D., Gao, X., Cao, Z., Rothe, M., Goeddel, D. V. (1997) I κ B kinase- β : NF- κ B activation and complex formation with I κ B kinase- α and NIK. *Science* **278**, 866-869
- 132.- Schreck, R., Meier, B., Männel, D. N., Dröge, W., and Baeuerle, P. A. (1992) Dithiocarbamates as potent inhibitors of NF- κ B activation in intact cells *J. Exp. Med.* **175**, 1181-1194
- 133.- Schreck, R., Albermann, K., and Baeuerle, P. A. (1992) Nuclear factor κ B: An oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review) *Free. Rad. Res. Comms* **17**, 221-2137
- 134.- Lahdenpohja, N., Savinainen, K., and Hurme, M. (1998) Pre-exposure to oxidative stress decreases the nuclear factor- κ B-dependent transcription in T lymphocytes *J. Immunol.* **160**, 1354-1358

- 135.- Flescher, E., Ledbetter, J. A., Schieven, G. L., Vela-Roch, N., Fossum, D., Dang, H., Ogawa, N., and Talal, N. (1994) Longitudinal exposure of human T lymphocytes to weak oxidative stress suppresses transmembrane and nuclear signal transduction *J. Immunol* **153**, 4880-4889
- 136.- Durand, D. B., Shaw, J.-P., Bush, M. R., Replogle, R. E., Belagaje, R., and Crabtree, G. R. (1988) Characterization of antigen receptor response elements within the interleukin-2 enhancer. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 1715-1724
- 137.- Rao, A. (1994) NF-ATp: a transcription factor required for the co-ordinate induction of several cytokine genes *Immunol. Today* **15**, 274-281
- 138.- Jain, J., Loh, C., and Rao, A. (1995) Transcriptional regulation of the IL-2 gene *Curr. Opin. Immunol.* **7**, 333-342
- 139.- Shaw, J. P., Utz, P. J., Durand, D. B., Toole, J. J., Emmel, E. A., and Crabtree, G. R. (1988) Identification of a putative regulator of early T cell activation genes. *Science* **241**, 202-205
- 140.- Chuvpilo, S. D., Schomberg, D., Gerwig, R., Heinfling, A., Reeves, R., Grummt, F., and Serfling, E. (1993) Multiple closely-linked NFAT/octamer and HMG I (Y) binding sites are part of the interleukin-4 promoter. *Nucleic Acids Res.* **21**, 5694-5704
- 141.- Cockerill, P. N., Shannon, M. F., Bert, A. G., Ryan, G. R., and Vadas, M. A., (1993) The granulocyte-macrophage colony-stimulating factor/interleukin 3 locus is regulated by an inducible cyclosporin A-sensitive enhancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 2466-2470
- 142.- Cockerill, P. N., Bert, A. G., Jenkins, F., Ryan, G. R., Shannon, M. F., and Vadas, M. A. (1995) Human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhancer functions associated with cooperative interactions between AP-1 and NFATp/c. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 2071-2079
- 143.- Goldfeld, A. E., McCaffrey, P. G., Strominger J. L., and Rao, A. (1993) Identification of a novel cyclosporin-sensitive element in the human tumor necrosis factor alpha gene promoter. *J. Exp. Med.* **178**, 1365-1379
- 144.- Lee, H. J., Masuda, E. S., Arai, N., Arai, K., and Yokota, T. (1995) Definition of cis-regulatory elements of the mouse IL-5 gene promoter: involvement of nuclear factor of activated T cell-related factors in interleukin-5 expression. *J. Biol. Chem.* **270**, 17541-17550
- 145.- Masuda, E. S., Tokumitsu, H., Tsuboi, A. Shlomai, J. Hung, P., Arai, K.-I., and Arai, N. (1993) The granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promoter cis-acting element CLE0 mediates induction signals in T cells and is recognized by factors related to AP-1 and NFAT. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 7399-7404
- 146.- Prieschl, E. E., Gouilleux-Gruart, V., Walker, C., Harrer, N. E., and Baumruker, T. (1995) A nuclear factor of activate T cell-like transcription factor in mas T cells is involved in IL-5 gene regulation after IgE plus antigen stimulation. *J. Immunol.* **154**, 6112-6119

- 147.- Szabo, S. J., Gold, J. S., Murphy, T. L., and Murphy, K. M., (1993) Identification of cis-acting regulatory element controlling interleukin-4 gene expression in t cells: roles for NF-Y and NF-ATc. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 4793-4705
- 148.- Rao, A., Luo, C., and Hogan, P. G. (1997) Transcription factors of the NFAT family: Regulation and Function. *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 707-747
- 149.- Hoey, T., Sun, Y.-L., Williamson, K., and Xu, X. (1995) Isolation of two new members of the NF-AT gene family and functional characterization of the NF-AT proteins *Immunity* **2**, 461-472
- 150.- Jain, J., Burgeon, E., Badalian, T. M., Hogan, P. G., and Rao, A. (1995) A similar DNA-binding motif in NFAT family proteins and the Rel homology region *J. Biol. Chem.* **270**, 4138-4145
- 151.- Nolan, G. P. (1994) NF-AT, AP-1 and Rel-bZIP: hybrid vigor and binding under the influence *Cell* **77**, 795-798
- 152.- Masuda, E. S., Naito, Y., Tokumitsu, H., Campbell, D., Saito, F., Hannum, C., Arai, K.-I., and Arai, N. (1995) NFATx, a novel member of the nuclear factor of activated T cells family that is expressed predominantly in the thymus *Mol. Cell. Biol.* **15**, 2697-2706
- 153.- Ho, S., Thomas, K. J., Timmerman, L. A., Li, X., Francke, U., and Crabtree, G. R. (1995) NFATc3, a lymphoid-specific NFATc family member that is calcium-regulated and exhibits distinct DNA binding specificity *J. Biol. Chem.* **270**, 19898-19907
- 154.- Boise, L. H., Petryniak, B., Mao, X., June, C. H., Wang, C.-Y., Lindsten, T., Bravo, R., Kovary, K., Leiden, J. M., and Thompson, C. B. (1993) The NFAT1 DNA binding complex in activated T cells contains Fra-1 and JunB. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 1911-1919
- 155.- Jain, J., McCaffrey, P. G., Miner, Z., Kerppola, T. K., Lambert, J. N., Verdine, G. L., Curran, T., and Rao, A., (1993) The T-cell transcription factor NFATp is a substrate for calcineurin and interacts with Fos and Jun. *Nature* **365**, 352-355
- 156.- Rooney, J. W., Hoey, T., and Glimcher, L. H. (1995) Coordinate and cooperative roles for NFAT and AP-1 in the regulation of the murine IL-4 gene. *Immunity* **2**, 473-483
- 157.- McCaffrey, P. C., Perrino, B. A., Soderling, T. R., and Rao, A. (1993) NF-ATp, a T lymphocyte DNA-binding protein that is a target for calcineurin and immunosuppressive drugs *J. Biol. Chem.* **268**, 3747-3752
- 158.- Goldfeld, A. E., Tsai, E., Kincaid, R., Belshaw, P. J., Schreiber, S. L., Strominger, J. L., and Rao, A. (1994) Calcineurin mediates human tumor necrosis factor alpha gene induction in stimulated T and B cells *J. Exp. Med.* **180**, 763-768
- 159.- Aramburu, J., Azzoni, L., Rao, A., and Perussia, B. (1995) Activation and expression of the nuclear factors of activated T cells, NFATp and NFATc, in human natural killer cells: regulation upon CD16 ligand binding *J. Exp. Med.* **182**, 801-810

- 160.- Hutchinson, L. E., and McCloskey, M. A. (1995) Fc epsilon RI-mediated induction of nuclear factor of activated T-cells *J. Biol. Chem.* **270**, 16333-16338
- 161.- Liu, J., Farmer, J. D., Lane, W. S., Friedman, J., Weissman, I., and Schreiber, S. L. (1991) Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes *Cell* **66**, 807-815
- 162.- Liu, J., Albers, M. W., Wandless, T. J., Luan, S., Alberg, D. G., Belshaw, P. J., Cohen, P., MacKintosh, C., Klee, C. B., and Schreiber, S. L. (1992) Inhibition of T cell signaling by immunophilin-ligand complexes correlates with loss of calcineurin phosphatase activity *Biochemistry* **31**, 3896-3901
- 163.- O'Keefe, S. J., Tamura, J., Kincaid, R. L., Tocci, M. J., and O'Neill, E. A. (1992) FK-506- and CsA-sensitive activation of the interleukin-2 promoter by calcineurin *Nature* **357**, 692-694
- 164.- Clipstone, N. A., and Crabtree, G. R. (1992) Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation *Nature* **357**, 695-697
- 165.- Schreiber, S. L., and Crabtree, G. R. (1992) The mechanism of action of cyclosporin A and FK 506 *Immunol. Today* **13**, 136-142
- 166.- Liu, J. (1993) FK 506 and cyclosporin A: molecular probes for studying intracellular signal transduction. *Immunol. Today* **14**, 290-295
- 167.- Fruman, D. A., Klee, C. B., Bierer, B. E., and Burakoff, S. J. (1992) Calcineurin phosphatase activity in T lymphocytes is inhibited by FK 506 and cyclosporin A *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 3686-3690
- 168.- Klee, C. B., and Krinks, M. H. (1978) Purification of cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase inhibitory protein by affinity chromatography on activator protein coupled to Sepharose *Biochemistry* **17**, 120-126
- 169.- Klee, C. B., Crouch, T. H., and Krinks, M. H. (1979) Calcineurin: a calcium- and calmodulin-binding protein of the nervous system *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**, 6270-6273
- 170.- Stewart, A. A., Ingebritsen, T. S., Manalan, A., Klee, C. B., and Cohen, P. (1982) Discovery of a Ca²⁺- and calmodulin-dependent protein phosphatase: probable identity with calcineurin (CaM-BP80) *FEBS Lett.* **137**, 80-84
- 171.- Hubbard, M. J., and Klee, C. B. (1989) Functional domain structure of calcineurin A: mapping by limited proteolysis *Biochemistry* **28**, 1868-1874
- 172.- Perrino, B. A., Ng, L. Y., and Soderling, T. R. (1995) Calcium regulation of calcineurin phosphatase activity by its B subunit and calmodulin. Role of the autoinhibitory domain *J. Biol. Chem.* **270**, 340-346

- 173.- Fruman, D. A., Pai, S., Burakoff, S. J., and Bierer, B. E. (1995) Characterization of a mutant calcineurin A alpha gene expressed by EL4 lymphoma cells *Mol. Cell. Biol.* **15**, 3857-3863
- 174.- Hashimoto, Y., Perrino, B. A., and Soderling, T. R. (1990) Identification of an autoinhibitory domain in calcineurin *J. Biol. Chem.* **265**, 1924-1927
- 175.- Bierer, B. E., Hollander, G., Fruman, D. A., and Burakoff, S. J. (1993) Cyclosporin A and FK506: molecular mechanisms of immunosuppression and probes for transplantation biology *Curr. Opin. Immunol.* **5**, 763-773
- 176.- Cardenas, M. E., Mutt, R. S., Breuder, T., and Heitman, J. (1995) Targets of immunophilin-immunosuppressant complexes are distinct highly conserved regions of calcineurin A *EMBO J.* **14**, 2772-2783
- 177.- Etzkorn, F. A., Chang, Z., Stolz, L. A., and Walsh, C. T. (1994) Cyclophilin residues that affect noncompetitive inhibition of the protein serine phosphatase activity of calcineurin by the cyclophilin.cyclosporin A complex *Biochemistry* **33**, 2380-2388
- 178.- Milan, D., Griffith, J., Su, M., Puce, L. R., and McKeon, J. (1994) The latch region of calcineurin B is involved in both immunosuppressant-immunophilin complex docking and phosphatase activation *Cell* **79**, 437-447
- 179.- Griffith, J. P., Kim, J. L., Kim, L. L., Sintchak, M. D., Thomson, J. A., Fitzgibbon, M. J., Fleming, M. A., Caron, P. R., Hsiao, K., and Navia, M. A. (1995) X-ray structure of calcineurin inhibited by the immunophilin-immunosuppressant FKBP12-FK506 complex *Cell* **82**, 507-522
- 180.- Kissinger, C. T., Parge, H. E., Knighton, D. R., Lewis, C. T., Pelletier, L. A., Tempczyk, A., Kalish, V. J., Tucker, K. D., Showalter, R. E., Moomaw, E. W. Et al (1995) Crystal structures of human calcineurin and the human FKBP12-FK506-calcineurin complex *Nature* **378**, 641-644
- 181.- Wesselborg, S., Fruman, S. A., Sagoo, J. K., Bierer, B. E., and Burakoff, S. J. (1996) Identification of a physical interaction between calcineurin and nuclear factor of activated T cells (NFATp) *J. Biol. Chem.* **271**, 1274-1277
- 182.- Beals, C. R., Sheridan, C. M., Turck, C. W., Gardner, P., Crabtree, G. R. (1997) Nuclear export of NF-ATc enhanced by glycogen synthase kinase-3 *Science* **275**, 1930-1934
- 183.- Timmerman, L. A., Clipstone, N. A., Ho, S. N., Northrop, J. P., Crabtree, G. R. (1996) Rapid shuttling of NF-AT in discrimination of Ca²⁺ signals and immunosuppression *Nature* **383**, 837-840
- 184.- Werlen, G., Jacinto, E., Xia, Y., and Karin, M. (1998) Calcineurin preferentially synergizes with PKC-theta to activate JNK and IL-2 promoter in T lymphocytes *EMBO J* **17**, 3101-3111
- 185.- Darnell, J. E. Jr., Kerr, I. M., and Stark, G. R. (1994) JAK-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins *Science*, **264**, 1415-1421

- 186.- Wilks, A. F. (1989) Two putative protein-tyrosine kinases identified by application of the polymerase chain reaction *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 1603-1607
- 187.- Wilks, A. F., Harpur, A., Kurlan, R. R., Ralph, S. J., Zurcher, G., et al. (1991) Two novel protein-tyrosine kinases, each with a second phosphotransferase-related catalytic domain, define a new class of protein kinase *Mol. Cell. Biol.* 11, 2057-2065
- 188.- Firmbach-Kraft, I., Byers, M., Shows, T., Dalla-Favera, R., Krolewski, J. J. (1990) tyk2, prototype of a novel class of non-receptor tyrosine kinase genes *Oncogene* 5, 1329-1336
- 189.- Shuai, K., Stark, G. R., Kerr, I. M., Darnell, J. E. Jr. (1993) A single phosphotyrosine residue of Stat91 required for gene activation by interferon-gamma *Science* 261, 1744-1746
- 190.- Zhong, Z., Wen, Z., and Darnell J. E. Jr. (1994) STAT3: A STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6 *Science* 264, 95-98
- 191.- Pellegrini, S., Schindler, C. (1993) Early events in signalling by interf *Trends Biochem Sci* 18, 338-342
- 192.- Ihle, J. N., Witthuhn, B. A., Quelle, F. W., Yamamoto, K., Thierfelder, W. E., Kreider, B., and Silvennoinen, O. (1994) Signaling by the cytokine receptor superfamily: JAKs and STATs *Trends Biochem Sci* 19, 222-227
- 193.- Shuai, K. (1994) Interferon-activated signal transduction to the nucleus *Current Opin. Cell Biol.* 6, 253-259
- 194.- Velazquez, I., Fellous, M. Stark, G. R., Pellegrini, S. (1992) A protein tyrosine kinase in the interferon alpha/beta signaling pathway *Cell* 70, 313-322
- 195.- Watling, D., Gushin, D., Müller, M., Silvennoinen, O., Witthuhn, B. A., et al. (1993) Complementation by the protein tyrosine kinase JAK2 of a mutant cell line defective in the interferon-gamma signal transduction pathway *Nature* 366, 166-170
- 196.- Müller, M., Briscoe, J., Laxton, C., Gushin, D., Ziemiecki, A., et al. (1993) The protein tyrosine kinase JAK1 complements defects in interferon-alpha/beta and -gamma signal transduction *Nature* 366, 129-135
- 197.- Witthuhn, B. A., Silvennoinen, O., Miura, O., Lai, K. S., Cwik, C., et al. (1994) Involvement of the Jak-3 Janus kinase in signalling by interleukins 2 and 4 in lymphoid and myeloid cells *Nature* 370, 153-157
- 198.- Barbieri, G., Velazquez, L., Scrobogna, M., Fellous, M., Pellegrini, S. (1994) Activation of the protein tyrosine kinase tyk2 by interferon alpha/beta *Eur. J. Biochem.* 223, 427-435
- 199.- Johnston, J., Kawamura, M., Kirken, R., Chen, Y-Q., Blake, T., et al. (1994) Phosphorylation and activation of the Jak-3 Janus kinase in response to interleukin-2 *Nature* 370, 151-153

- 200.- Müller, M., Laxton, C., Briscoe, J., Schindler, C., Improta, T., et al. (1993) Complementation of a mutant cell line: central role of the 91 kDa polypeptide of ISGF3 in the interferon- α and - γ signal transduction pathways *EMBO J.* **12**, 4221-4228
- 201.- Yamamoto, K., Quell, J., Thierfelder, W., Kreider, B., Gilbert, D., et al. (1994) Stat4, a novel gamma interferon activation site-binding protein expressed in early myeloid differentiation *Mol. Cell. Biol.* **14**, 4342-4379
- 202.- Schindler, C., and Darnell, J. E. Jr. (1995) Transcriptional responses to polypeptide ligands: The JAK-STAT pathway *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 621-651
- 203.- Ihle, J. N., (1995) Cytokine receptor signalling *Nature* **377**, 591-594
- 204.- Ihle, J. N., and Kerr, I. M., (1995) Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily *Trends Genet.* **11**, 69-74
- 205.- Ihle, J. N., Witthuhn, B. A., Quelle, F. W., Yamamoto, K., and Silvennoinen, O. (1995) Signaling through the hematopoietic cytokine receptors *Annu. Rev. Immunol.* **13**, 369-398
- 206.- Zhang, Z., Blenis, J., Li, H., Schindler, C., and Chen-Kiang, S. (1995) Requirement of serine phosphorylation for formation of STAT-promoter complexes. *Science* **267**, 1990-1994
- 207.- Wen, Z., Zhong, Z., and Darnell, J. E. Jr. (1995) Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation *Cell* **82**, 241-250
- 208.- David, M., Petricoin III, E., Benjamin, C., Pine, R., Weber, M. J., and Lerner, A. C. (1995) Requirement for MAP kinase (ERK2) activity in interferon α - and interferon β -stimulated gene expression through STAT proteins *Science* **269**, 1721-1723
- 209.- Ihle, J. N. (1996) STATs and MAPKs: obligate or opportunistic partners in signaling *BioEssays* **18**, 95-98
- 210.- Ng, J., and Cantrell, D. (1997) STAT3 is a serine kinase target in T lymphocytes. Interleukin 2 and cell antigen receptor signals converge upon serine 727 *J. Biol. Chem.* **272**, 24542-24549
- 211.- Ihle, J. (1996) STATs: signal transducers and activators of transcription *Cell* **84**, 331-334
- 212.- Leaman, D. W., Pisharody, S., Flickinger, T. W., Commane, M. A., Schlessinger, J., Kerr, I. M., Levy, D. E., and Stark, G. R. (1996) Roles of JAKs in activation of STATs and stimulation of c-fos gene expression by epidermal growth factor *Mol. Cell. Biol.* **16**, 369-375
- 213.- David, M., Wong, L., Flavell, R., Thompson, S. A., Wells, A., Lerner, A. C., and Johnson, G. R. (1996) STAT activation by epidermal growth factor (EGF) and amphiregulin. Requirement for the EGF receptor kinase but not for tyrosine phosphorylation sites or JAK1 *J. Biol. Chem.* **271**, 9185-9188
- 214.- Yu, C.-L., Meyer, D. J., Campbell, G. S., Lerner, A. C., Carter-Su, C., Schwartz, J., and Jove, R. (1995) Enhanced DNA-binding activity of a Stat3-related protein in cells transformed by the Src oncoprotein *Science* **269**, 81-83

- 215.- Cao, X., Tay, A., Guy, G. R., and Tan, Y. H. (1996) Activation and association of Stat3 with Src in v-Src-transformed cell lines *Mol. Cell. Biol.* **16**, 1595-1603
- 216.- Zong, C., Riqiang, Y., August, A., Darnell, J. E. Jr., and Hanafusa, H. (1996) Unique signal transduction of Eyk: constitutive stimulation of the JAK-STAT pathway by an oncogenic receptor-type tyrosine kinase *EMBO J.* **15**, 4515-4525
- 217.- Chaturvedi, P., Sharma, S., and Reddy, E. P. (1997) Abrogation of interleukin-3 dependence of myeloid cells by the v-src oncogene requires SH2 and SH3 domains which specify activation of STATs *Mol. Cell. Biol.* **17**, 3295-3304
- 218.- Smith, P. D., and Crompton, M. R. (1998) Expression of v-src in mammary epithelial cells induces transcription via STAT3 *Biochem. J.* **331**, 381-385
- 219.- Ruff, S. J., Chen, K., and Cohen, S. (1997) Peroxovanadate induces tyrosine phosphorylation of multiple signaling proteins in mouse liver and kidney *J. Biol. Chem.* **272**, 1263-1267
- 220.- Aman, M. J., and Leonard, W. J. (1997) Cytokine signaling: cytokine-inducible signaling inhibitors *Curr. Biol.* **7**, R784-R788
- 221.- Chung, C. D., Liao, J., Liu, B., et al (1997) Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3 *Science* **278**, 1803-1805
- 222.- Chen, E. H., Gadina, M., Galon, J., Chen, M., and O'Shea, J. J. (1998) Not just another meeting: the coming of age of JAKs and STATs *Immunol. Today* **19**, 338-341
- 223.- Wang, X., Culotta, C., and Klee, C. B. (1996) Superoxide dismutase protects calcineurin from inactivation *Nature* **383**, 434-437
- 224.- Schneider, C., Zanetti, M. and Romero, D. (1981) Surface-reactive stimuli selectively increase protein phosphorylation in human neutrophils *FEBS Lett.* **127**, 4-8
- 225.- Heyworth, P.G. and Segal, A.W. (1986) Further evidence for the involvement of a phosphoprotein in the respiratory burst oxidase of human neutrophils *Biochem. J.* **239**, 723-731
- 226.- Clarke, M.J. (1996) in *Metal Ions in Biological Systems* (Sigel, H., ed.), vol 32, pp. 727-780, Marcel Dekker, New York
- 227.- Heyworth, P.G., Erickson, R.W., Ding, J., Curnutte, J.T. and Badwey, J.A. (1995) Naphthalenesulphonamides block neutrophil superoxide production by intact cells and in a cell-free system: is myosin light chain kinase responsible for these effects? *Biochem. J.* **311**, 81-87
- 228.- Torres, M., Hall, F.L. and O'Neil, K. (1993) Stimulation of human neutrophils with formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine induces tyrosine phosphorylation and activation of two distinct mitogen-activated protein-kinases *J. Immunol* **150**, 1563-1577

- 229.- Dusi, S., Donini, M. and Rossi, F. (1994) Tyrosine phosphorylation and activation of NADPH oxidase in human neutrophils: a possible role for MAP kinases and for a 75 kDa protein *Biochem. J.* **304**, 243-250
- 230.- Rollet, E., Caon, A.C., Roberge, C.J., Liao, N.W., Malawista, S. E., McColl, S.R. and Naccache, P.H. (1994) Tyrosine phosphorylation in activated human neutrophils. Comparison of the effects of different classes of agonists and identification of the signaling pathways involved *J.Immunol.* **153**, 353-363
- 231.- Modesti, A., Masuelli, L., Modica, A., D'Orazi, G., Scarpa, S., Bosco, M.C. and Forni, G. (1993) Ultrastructural evidence of the mechanisms responsible for interleukin-4-activated rejection of a spontaneous murine adenocarcinoma *Int. J. Cancer* **53**, 988-993
- 232.- Label-Binay, S., Laguerre, B., Quintin-Colonna, F., Conjeaud, H., Magazin, M., Miloux, B., Pecceu, F. Caput, D. Ferrara, P., and Fradelizi, D. (1995) Experimental gene therapy of cancer using tumor cells engineered to secrete interleukin-13 *Eur. J. Immunol.* **25**, 2340-2348
- 233.- Di Luzio, N. R., Gilbert, K. M., and Spanjers, M. A. (1980) Comparative evaluation of macrophage stimulation and depression on tumor growth and macrophage content and function in mice *Cancer Immunol. Immunother.* **9**, 37-42
- 234.- Matsumoto, K., Osada, Y., Une, T., Otani, T., Ogawa, H. and Azuma, I. (1987) in *Immunostimulants: Now and Tomorrow* (Azuma, I. and Jolles, G., eds.) pp. 79-97, Springer-Verlag, Berlin
- 235.- Cross, A. R., and Jones, O. T. G., (1991) Enzymic mechanisms of superoxide production *Biochim. Biophys. Acta* **1057**, 281-298
- 236.- Darley-Usmar, V., Wiseman, H., and Halliwell, B. (1995) Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance *FEBS Lett.* **369**, 131-135
- 237.- Hendey, B., Klee, C. B., and Maxfield, F. R. (1992) Inhibition of neutrophil chemokinesis on vitronectin by inhibitors of calcineurin *Science* **258**, 296-299
- 238.- Hendey, B., and Maxfield, F. R. (1993) Regulation of neutrophil motility and adhesion by intracellular calcium transients *Blood Cells* **19**, 143-161
- 239.- Lawson, M. A., and Maxfield, F. R. (1995) Ca^{2+} - and calcineurin-dependent recycling of an integrin to the front of migrating neutrophils *Nature* **377**, 75-79
- 240.- Hendey, B., Lawson, M., Marcantonio, E. E., and Maxfield, F. R. (1996) Intracellular calcium and calcineurin regulate neutrophil motility on vitronectin through a receptor identified by antibodies to integrins α and β 3 *Blood* **87**, 2038-2048
- 241.- Chiara, M. D., Bedoya, F. J., and Sobrino, F. (1989) Cyclosporine A inhibits phorbol ester-induced activation of superoxide production in resident mouse peritoneal macrophages *Biochem. J.* **264**, 21-26

- 242.- Chiara, M. D., Foot, A. B. M., Sobrino, F., and Jones, O. T. G. (1991) Differential effect of cyclosporine a on respiratory burst by several types of human leukocytic cells *Biochem. Inter.* **23**, 1185-1193
- 243.- Wiesinger, D., and Borel, J. F. (1980) Studies on the mechanism of action of cyclosporin A *Immunobiology* **156**, 452-463
- 244.- Frantz, B. S., Nordby, E. C., Bren, G., Steffan, N., Paya, C. V., Kincaid, R. L., Tocci, M. J., O'Keefe, S. J., and O'Neill, E. A. (1994) Calcineurin acts in synergy with PMA to inactivate I kappa B/MAD3, an inhibitor of NF-kappa B *EMBO J.* **13**, 861-870
- 245.- Pimentel-Muiños, F. X., Mazana, J., and Fresno, M. (1994) Regulation of interleukin-2 receptor α chain expression and nuclear factor- κ B activation by protein kinase C in T lymphocytes. Autocrine role of tumor necrosis factor α *J. Biol. Chem.* **269**, 24424-24429
- 246.- Cohen, P., Holmes, C. F. B., and Tsukitani, Y. (1990) Okadaic acid: a new probe for the study of cellular regulation *Trend. Biol. Sci.* **15**, 98-102
- 247.- Schmidt, A., Hennighausen, L., and Siebenlist, U. (1990) Inducible nuclear factor binding to the kappa B elements of the human immunodeficiency virus enhancer in T cells can be blocked by cyclosporin A in a signal-dependent manner *J. Virol.* **64**, 4037-4041
- 248.- Shibasaki, F., Price, E. R., Milan, D., and Mckeon, F. (1996) Role of kinases and the phosphatase calcineurin in the nuclear shuttling of transcription factor NF-AT4 *Nature* **382**, 370-373
- 249.- Brennan, P., and O'Neil, I. (1995) Effects of oxidants and antioxidants on nuclear factor kappa B activation in three different cell lines: evidence against a universal hypothesis involving oxygen radicals *Biochem. Biophys. Acta* **1260**, 167-175
- 250.- Suzuki, Y., Mizuno, M., and Parker, L. (1995) Transient overexpression of catalase does not inhibit TNF- or PMA-induced NF-kappa B activation *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **40**, 537-541
- 251.- Suzuki, Y. J., Mizuno, M., and Packer, L. (1994) Signal transduction for nuclear factor-kappa B activation. Proposed location of antioxidant-inhibitable step *J. Immunol.* **153**, 5008-5015
- 252.- Nottet, H. S. L. M., Moelans, I. I. M D., de Vos, N. M., de Graaf, L., Visser, M. R., and Verhoef, J. (1997) N-acetyl-L-cysteine-induced up-regulation of HIV-1 gene expression in monocyte-derived macrophages correlates with increased NF-kappaB DNA binding activity *J. Leukoc. Biol.* **61**, 33-39
- 253.- Beiqing, L., Chen, M., and Whisler, R. L. (1996) Sublethal levels of oxidative stress stimulate transcriptional activation of c-jun and suppress IL-2 promoter activation in Jurkat T cells *J. Immunol.* **157**, 160-169
- 254.- Martinez, S.-M., Gomez del Arco, P., Armesilla, A. L., Aramburu, J., Luo, C., Rao, A., and Redondo J. M. (1997) Blockade of T-cell activation by dithiocarbamates involves novel mechanisms of inhibition of nuclear factor of activated T cells *Mol. Cell. Biol.* **17**, 6437-6447

- 255.- Wang, D. Z., McCaffrey, P.G., and Rao, A. (1995) The cyclosporin-sensitive transcription factor NFATp is expressed in several classes of cells in the immune system *Ann. N. Y. Acad. Sciences* 766, 182-194
- 256.- Browning, D. D., Pan, Z. K., Prossnitz, E. R., and Ye, R. D. (1997) Cell type- and developmental stage-specific activation of NF-kappaB by fMet-Leu-Phe in myeloid cells *J. Biol. Chem.* 272, 7995-8001
- 257.- McDonald, P. P., Bald, A., and Cassatella, M. A. (1997) Activation of the NF-kappaB pathway by inflammatory stimuli in human neutrophils *Blood* 89, 3421-3433
- 258.- Krejsa, C. M., Nadler, S. G., Esselstyn, J. M., Kavanagh, T. J., Ledbetter, J. A., and Schieven, G. L. (1997) Role of oxidative stress in the action of vanadium phosphotyrosine phosphatase inhibitors. Redox independent activation of NF-kappaB *J. Biol. Chem.* 272, 11541-11549
- 259.- Whisler, R. L., Goyette, M. A., Grants, I. S., and Newhouse, Y. G. (1995) Sublethal levels of oxidant stress stimulate multiple serine/threonine kinases and suppress protein phosphatases in Jurkat T cells *Arch. Biochem. Biophys.* 319, 23-35
- 260.- Hashimoto, Y., King, M. M., and Soderling, T. R. (1988) Regulatory interactions of calmodulin-binding proteins: phosphorylation of calcineurin by autophosphorylated Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85, 7001-7005
- 261.- Carballo, M., Márquez, G., Conde, M., Martín-Nieto, J., Monteseirín, J. Conde, J., Pintado, E., and Sobrino, F. (1999) Characterization of calcineurin in human neutrophils: Inhibitory effect of hydrogen peroxide on its enzyme activity and on NF-κB DNA-binding. *J. Biol. Chem.* 274, 93-100.
- 262.- Lahdenpohja, N., Savinainen, K., and Hurme, M. (1998) Pre-exposure to oxidative stress decreases the nuclear factor-κB-dependent transcription in T lymphocytes *J. Immunol.* 160, 1354-1358
- 263.- Johnston, J. A., Bacon, C. M., Finbloom, D. S., Rees, R. C., Kaplan, D., Shibuya, L., Ortaldo, J. R., Gupta, S., Chen, Y. Q., Giri, J. D., and O'Shea, J. J. (1995) Tyrosine phosphorylation and activation of STAT5, STAT3, and Janus Kinases by interleukins 2 and 15 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 8705-8709
- 264.- Brunn, G. J., Falls, E. L., Nilson, A. E., and Abraham, R. T. (1995) Protein- tyrosine kinase-dependent activation of STAT transcription factors in interleukin-2-or interleukin-4-stimulated T lymphocytes *J. Biol. Chem.* 270, 11628-11635
- 265.- Garcia-Morales, P., Minami, Y., Luong, E., Klausner, R.D., and Samelson, L. E. (1990) Tyrosine phosphorylation in T cells is regulated by phosphatase activity: studies with phenylarsine oxide *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 9255-9259
- 266.- Goldkorn, T., Balaban, N., Matsukuma, K., Chea, V., Gould, R., Last, J., Chan, C., and Chavez, C. (1998) EGF-Receptor phosphorylation and signaling are targeted by H₂O₂ redox stress *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 19, 786-798

- 267.- Stone, R. L., and Dixon, J. E. (1994) Protein-tyrosine phosphatases *J. Biol. Chem.* **269**, 31323-31326
- 268.- Fischer, E. H., Charbonneau, H., and Tonks, N. K. (1991) Protein tyrosine phosphatases: a diverse family of intracellular and transmembrane enzymes *Science* **253**, 401-406
- 269.- Imbert, V., Peyron, J. F., Farahi, F. D., Mari, B., Auberger, P., and Rossi, B. (1994) Induction of tyrosine phosphorylation and T-cell activation by vanadate peroxide, an inhibitor of protein tyrosine phosphatase *Biochem J.* **297**, 163-173
- 270.- Lamb, P., Haslam, J., Kessler, L., Seidel, H. M., Stein, R. B., and Rosen, J. (1994) Rapid activation of the interferon-gamma signal transduction pathway by inhibitors of tyrosine phosphatases *J. Interferon Res.* **14**, 365-373
- 271.- Tourkine, N., Schindler, C., Larose, M., and Houdebine, L. M. (1995) Activation of STAT factors by prolactin, interferon-gamma, growth hormones, and a tyrosine phosphatase inhibitor in rabbit primary mammary epithelial cells *J. Biol. Chem.* **270**, 20952-20961
- 272.- Halliwell, B., and Gutteridge, J. M.C. (1992) Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. An update *FEBS Lett.* **307**, 108-112
- 273.- Gunther, M. R., Hanna, P. M., Mason, R. P., and Cohen, M. S., (1995) Hydroxyl radical formation from cuprous ion and hydrogen peroxide: a spin-trapping study *Arch. Biochem. Biophys.* **316**, 515-522
- 274.- Jornot, L., Petersen, H., and Junod, A. F. (1998) Hydrogen peroxide-induced DNA damage is independent of nuclear calcium but dependent on redox-active ions *Biochem. J.* **335**, 85-94

LISTA DE PUBLICACIONES

Obtenidas durante la realización de la Tesis Doctoral.

- 1.- Monteseirín, J., Camacho, M. J., Montaña, R., Llamas, E., Conde, M., **Carballo, M.**, Guardia, P., Conde, J., and Sobrino, F. (1996) Enhancement of antigen-specific functional responses by neutrophils from allergic patients *J. Exp. Med.* 183, 2571-2579.
- 2.- **Carballo, M.**, Vilaplana, R., Márquez, G., Conde, M., Bedoya, F. J., González-Vilchez, F., and Sobrino, F. (1997) A newly synthesized molecule derived from ruthenium cation, with antitumour activity, activates NADPH oxidase in human neutrophils *Biochem. J.* 328, 559-564.
- 3.- Gualberto, A., Márquez, G., **Carballo, M.**, Youngblood, G. L., Hunt, S. H., Baldwin, A. S., and Sobrino, F. (1998) p53 transactivation of the HIV-1 long terminal repeat is blocked by PD 144795, a calcineurin-inhibitor with anti-HIV properties *J. Biol. Chem.* 273, 7088-7093.
- 4.- **Carballo, M.**, Márquez, G., Conde, M., Martín-Nieto, J., Monteseirín, J., Conde, J., Pintado, E., and Sobrino, F. (1999) Characterization of calcineurin in human neutrophils. Inhibitory effect of hydrogen peroxide on its enzyme activity and on NF- κ B DNA binding *J. Biol. Chem.* 274, 93-100.
- 5.- **Carballo, M.**, Conde, M., El Bekay, R., Camacho, M. J., Monteseirín, J., Conde, J., Bedoya, F. J., Sobrino, F. (1999) Oxidative stress triggers STAT3 tyrosine phosphorylation and nuclear translocation in human lymphocytes *J. Biol. Chem.* (en prensa)
- 6.- Conde, M., **Carballo, M.**, Márquez, G., Gualberto, A., Baldwin, A. S., Monteseirín, J., Conde, J., and Sobrino, S. (1999) A benzothiophene-derivative molecule blocks LPS-induced nitric oxide production by inhibiting iNOS gene expression (Enviado a *Biochem. J.*).

7.- Hmadcha, A., Carballo, M., Conde, M., Santamaria, C., Márquez, G., Martín-Nieto, J., Bedoya, F., Pintado, E., and Sobrino, F. (1998) Phenylarsine oxide increases intracellular calcium mobility and inhibits Ca^{2+} -dependent ATPase activity (Enviado a FEBS Letts).

8.- Márquez, G., Carballo, M., Martín-Nieto, J., Conde, M., and Sobrino, F. Lability of calmodulin binding to solid membranes: evidence that calmodulin is lost during blotting procedures. (Enviado a Analytical Biochemistry).

9.- Márquez, G., Carballo, M., Conde, M., Bedoya, F., Sánchez-Madrid, F., and Sobrino, F. (1998) Engagement of CD69 antigen induces tyrosine phosphorylation of p56^{lck} via Ca^{2+} -dependent and cyclosporin a-sensitive pathways in human lymphocytes (Sometido a revisión).

10.- Zegarra, F., El Bekay, R., Carballo, M., Bernabé, J. C., Monteseirín, F., Conde, J., Bedoya, F., and Sobrino, F. (1998) In vitro stimulation of NADH/NADPH oxidase activity in smooth muscle from aorta (Sometido a revisión).

11.- Carballo, M., Márquez, C., Montañó, R., Conde, M., and Sobrino, F. 4-iodophenol acts as an enhancer in the luminol/HPR-dependent chemiluminescent reaction. (En preparación).

12.- Conde, M., Carballo, M., Camacho, M., Monteseirín, F., Conde, J., and Sobrino, F. Crosslinking of IgE-bound to neutrophil membrane stimulates IL-8 production through a Ca^{2+} -calcineurin dependent pathway. Role in allergic diseases (En preparación).



UNIVERSIDAD DE SEVILLA



600672165

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Departamento de Biología Celular y Molecular

en el
D. ROBERTO J. CABALLERO ALCAZAR
ESTRUCTURA ORGÁNICA EN LEUCOCITOS Y PROMOCIÓN
DE LA NADPH-OXIDASA DE LA CÉLULA Y DE LA
FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN NF- κ B Y STAT-3
SEBASTIÁN DE CUNCA DE

A Brice